

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592346

研究課題名(和文) 精巣腫瘍における癌精巣抗原の発現パターンの解析とその予後予測への応用

研究課題名(英文) Identification of cancer testis antigens as a prognostic marker for testicular tumor

研究代表者

中村 晃和 (Nakamura, Terukazu)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：10381964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：癌精巣抗原のひとつであるSPAG4が、腎癌組織において正常組織と比較して著明に発現が上昇していることを見出した。SPAG4の発現は低酸素下で誘導される転写因子の一つであるHIF1により制御されていた。SPAG4の発現レベルは腫瘍の悪性度と負の相関を示し、SPAG4の発現が低いグループでは、腫瘍の再発率が優位に上昇していた。以上の結果より、癌精巣抗原の一つであるSPAG4が腎癌において有望なバイオマーカーとなることが示された。現在、精巣腫瘍において、SPAG4の発現とその予後との相関について検討を加えている。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that one of cancer testis antigens (CTAs), sperm associated antigen 4 (SPAG4), was highly up-regulated in cancer specimens from renal cell carcinoma (RCC) patients compared with adjacent normal renal tissues. In renal cancer cells, SPAG4 was induced by the treatment of HIF stabilizing agent, DFO, and this induction was blocked by the knockdown of HIF1 alpha. Finally, SPAG4 mRNA expression was inversely correlated with tumor grade and stage, and lower expression of SPAG4 mRNA was significantly associated with shorter progression-free time in patients with RCC. These results suggest that SPAG4 is HIF-regulated CTAs and may be a potential prognostic candidate for RCC. Further study is ongoing to evaluate the potential of SPAG4 as a prognostic marker for testicular tumor.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：癌精巣抗原 精巣腫瘍 SPAG4 腎癌 HIF1

1. 研究開始当初の背景

シスプラチンを中心とした化学療法により進行性精巣腫瘍の約 70～80%が治癒可能となりつつあるが、残りの約 20-30%の症例は難治性となり、治療が困難であるのが現状である。この進行性精巣腫瘍をいかに根治に導くかが、現在の精巣腫瘍の治療における最も大きな課題となっている。

Cancer Testis Antigens (CTAs) とは精巣以外の正常組織では発現がない、もしくは非常に低く、様々な腫瘍において様々な頻度で発現が認められる遺伝子群の総称である。CTAs はその発現特異性から理想的な免疫療法のターゲットとなりうる可能性が期待されている。また免疫療法の標的分子としてだけでなく、これら分子の発現は抗癌剤の感受性との相関があること、患者の予後との相関性があることなどが、様々な腫瘍で報告されている。興味深いことに、精子の発育過程と腫瘍の進展過程において多くの表現型が一致し、さらに CTAs の発現パターンは精子の発育過程においてダイナミックに変化することが報告されている。

以上の背景より、CTAs の発現パターンが精巣腫瘍における腫瘍の進展程度(分化および多分化能)を反映するマーカーとして有用である可能性がとらえた。

2. 研究の目的

癌および精巣で特異的に発現する Cancer Testis Antigens (CTAs)に着目し、その発現パターン(CTAs gene signature)を解析することで、精巣腫瘍患者の予後および化学療法の有効性を予測し、治療成績の向上に寄与することができるか否かを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

精巣腫瘍のホルマリン固定、パラフィン包埋組織切片より抽出した RNA に対して、一度に多数の遺伝子を解析することができる multiplex real-time qPCR 法を用いて、CTAs の発現解析を行う予定であった。しかしながら、種々の RNA 抽出 kit を用いて、プロコール中の様々な step (温度や時間など)に対して様々な条件を検討したものの、multiplex real-time qPCR 施行可能な quality を有する RNA を抽出することができなかった。そこで、まず凍結組織が利用可能な腎癌において、CTAs の発現を検討することとした。

(1) その機能消失が腎癌の発生と密接な関係があることが知られている von Hippel-Lindau (VHL) 遺伝子を過剰発現させた細胞株とその親株 (VHL 発現なし) の間で、multiplex real-time qPCR により CTAs の発現に差があるかを検討する。

(2) VHL の下流因子である HIF をターゲットとする small interference RNA (siRNA) や薬剤 (HIF 安定化を調節する) 処理により、同定された CTA (SPAG4) の発現制御メカニズムを検討する。

(3) 同定された CTA (SPAG4) の機能について、過剰発現させた細胞株を作成して検討する。

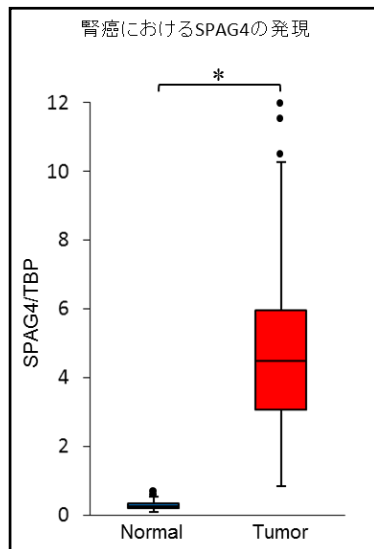
(4) 同定された CTA (SPAG4) の発現と予後との相関につき、臨床検体を用いて検討する。

4. 研究成果

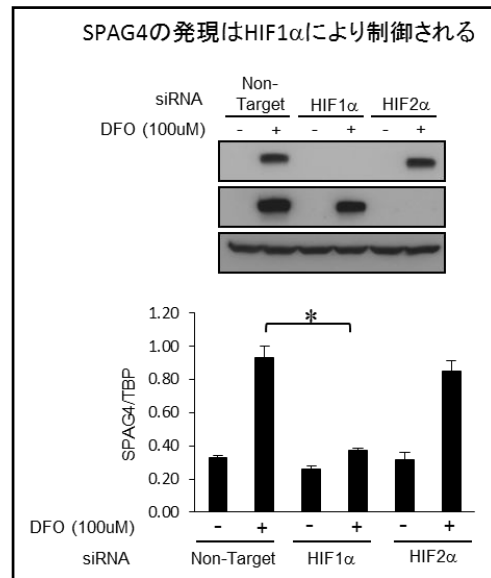
(1) まず、von Hippel-Lindau (VHL) 遺伝子を過剰発現させた細胞株とその親株 (VHL 発現なし) の間で、multiplex real-time qPCR により CTAs の発現に差があるかを検討したところ、SPAG4 の発現が両細胞間で著大な差があることが、確認された。さらに、SPAG4 は腎腫瘍組織において隣接正常組織に比べて、有意に上昇していた。

VHL+/-細胞株におけるCTAsの発現比較

	Fold change \pm SD (RCC4+EV/RCC4+VHL)
SPAG4	14.86 \pm 0.31
SSX2/3	2.37 \pm 0.01
SSX4	2.10 \pm 0.15
MAGEA4	1.89 \pm 0.40
MAGEA1	1.81 \pm 0.34
MAGEA6	1.80 \pm 0.08
CSAG2	1.77 \pm 0.18
MAGEA2	1.71 \pm 0.09
MAGEA12	1.59 \pm 0.21
PAGE4	1.39 \pm 0.01
TTK	1.21 \pm 0.03
DDX43	1.12 \pm 0.12
JARID1B	1.05 \pm 0.01
PBK	0.96 \pm 0.03
CEP55	0.88 \pm 0.01
NUF2	0.73 \pm 0.06
CTAG1B	0.70 \pm 0.12

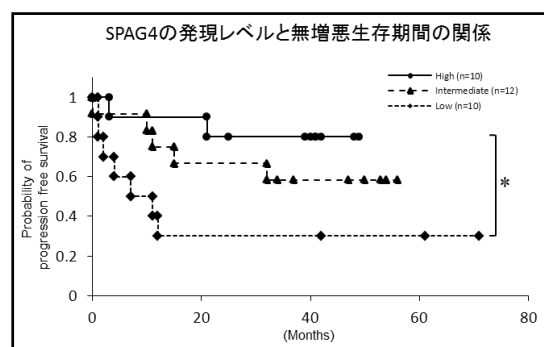


(2) SPAG4 の発現制御メカニズムを明らかにするため、VHL の下流因子である HIF を誘導する薬剤である desferrioxamine mesylate (DFO) で腎癌細胞株 (Caki-1) を処理した。DFO 処理により HIF1 α および HIF2 α の発現は著明に上昇し、この条件下で有意な SPAG4 発現の上昇が認められた。一方で、この発現上昇は HIF1 α のノックダウンで消失した。また、HIF2 α のノックダウンは SPAG4 の発現上昇に影響を及ぼさなかった。



(3) SPAG4 の機能的な役割を同定するために、SPAG4 を過剰発現させた細胞株を 2 種類作成した (786-O および ACHN)。いずれの細胞株においても、SPAG4 の発現上昇は、細胞の増殖、migration および invasion に影響を及ぼさなかった。

(4) 臨床検体を用いて SPAG4 の発現と種々の病理パラメーターおよび予後について検討した。SPAG4 の発現レベルは腫瘍の悪性度と負の相関を示し、SPAG4 の発現が低いグループでは、腫瘍の再発率が優位に上昇していた。



以上の結果より、癌精巢抗原の一つである SPAG4 が腎癌において有望なバイオマーカーとなることが示された。現在、精巣腫瘍において、SPAG4 の発現とその予後との相関について検討を加えている。

5. 主な発表論文等

当研究の研究成果は現在データ蓄積中のため論文、学会発表はまだ行っていない。

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 晃和 (NAKAMURA TERUKAZU)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号: 10381964

(2) 研究分担者

三木 恒治 (MIKI TSUNEHARU)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号: 10243239

河内 明宏 (KAWAUCHI AKIHIRO)

滋賀医科大学・医学研究科・教授

研究者番号: 90240952

三神 一哉 (MIKAMI KAZUYA)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号: 10291585

本郷 文弥 (HONGO FUMIYA)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号: 80291798

上田 崇 (UEDA TAKASHI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号: 50601598