

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592401

研究課題名(和文) 停留精巣における精巣腫瘍の発症機序の解明と精原幹細胞を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Etiology of testicular cancer derived from cryptorchidism and development of novel therapeutic approach targeting to spermatogonial stem cells

研究代表者

加藤 利基 (Kato, Toshiki)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：60444965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、停留精巣モデルラット精巣の網羅的遺伝子解析と精巣腫瘍責任遺伝子の同定・機能解析を目的とし、複数の実験を行った。(1) UTF1の局在や経時的な発現変化を検討した。(2) マイクロアレイ解析から、停留精巣では停留精巣ではヒストン脱メチル化酵素であるKdm5aと、microRNAであるmiR-135aの特異的発現変化を観察した。(3) ヒト精巣腫瘍組織でのUTF1発現変化を評価した。

研究成果の概要(英文)：In order to analyses comprehensive gene expressions in the testes of cryptorchid model rats and elucidate disease genes associated with testicular cancer, we performed following several experiments. We demonstrated as follows; (1) distribution and expression variations of UTF1, specific marker of spermatogonial stem cells, (2) specific expressions of Kdm5a, histone demethylase, and miR-135a in the testes of cryptorchid rats, (3) expression alterations of UTF1 in human testicular cancer tissues.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：精巣 精子幹細胞 精巣腫瘍

1. 研究開始当初の背景

(1) 国内外の研究動向

停留精巣は新生児の約 1%にみられ、泌尿器科先天性疾患の中で最も発症頻度が高い。その主要な合併症として、男子不妊症と将来の精巣の悪性化があげられる。小児期の早期に精巣固定術を行うことが原則とされるが、精巣固定術そのものが精巣の悪性化を回避するものではない。停留精巣の既往歴がある場合の精巣腫瘍の発生する相対的リスクは 3.8~5.2 である。一方、精巣固定術やホルモン補充療法などを行った症例における長期追跡結果に基づくコホート研究では、その相対的発生リスクは 7.5 と報告されている。しかしながら、腫瘍発症の原因、さらには、精巣固定術を行ったとしても、腫瘍が発症する患者と、発症しない患者が存在する理由については、全く明らかになっていない。停留精巣の精巣腫瘍発症についての報告は、国内外ともにほとんどなく、研究がなされていないのが現状である。そこで、これらの発症メカニズムを明らかにすることは、停留精巣患者の精巣腫瘍発症を予防することにも役立つのではないかと考えた。

(2) 本研究の着想に至った経緯

私たちはこれまでに、ラットの胎児期に、抗アンドロゲン剤を一定量投与することによって、停留精巣モデル実験動物を作製することに成功した[1]。このラットが、精巣固定術やホルモン補充療法の有効性を検討する上で、有用なモデル実験動物になりうることを報告してきた。さらに停留精巣ではその妊孕性が低下すること[2]と、最近幹細胞マーカーである UTF1 の発現異常が、生後 1 年の精巣において認められることを見出し、停留精巣においては、異常な幹細胞分化が男子不妊症を引き起こす大きな原因であることを見出した[3,4,5]。加えて、停留精巣において精原幹細胞の残存が悪性化を引き起こす主たる原因であると考え、老齢期の精巣において上皮内癌 (Carcinoma in situ) が発症する可能性を検討してきた。しかしながら、精巣癌に至るまでのメカニズムについてはほとんどわかっていないのが現状である。

【参考文献】

- [1] Mizuno K, et al. Influence for testicular development and histological peculiarity in the testes of flutamide-induced cryptorchid rat model. *Int J Urol.* 14: 67-72, 2007
- [2] Mizuno K, et al. Early orchiopexy improves subsequent testicular development and spermatogenesis in the experimental cryptorchid rat *J Urol.* 179: 1195-1199, 2008
- [3] Mizuno K, et al. Altered expression and localization of estrogen receptors alpha and beta in the testes of a cryptorchid rat model. *Urology.* 77: 251.e1-6, 2011

[4] Mizuno K, et al. Identification of differentially expressed genes in human cryptorchid testes using suppression subtractive hybridization. *J Urol.* 181: 1330-1337, 2009

[5] Mizuno K, et al. Activation of NF- κ B associated with germ cell apoptosis in testes of experimentally induced cryptorchid rat model. *Urology.* 73: 389-393, 2009

2. 研究の目的

前述した背景をふまえ、本研究では、停留精巣モデルラット精巣の網羅的遺伝子解析と精巣腫瘍責任遺伝子の同定・機能解析を目的とした。これにより停留精巣に対する新たな治療法を模索し、将来的な臨床応用へ発展させたいと考えている。

3. 研究の方法

(1) 停留精巣モデルラットの作成

8~10 週齢の妊娠 Sprague-Dawley ラットを対象に、妊娠 14-20 日の 7 日間連続して、非ステロイド性抗アンドロゲン剤である flutamide を腹腔内投与した。出生した雄仔を停留精巣モデルラットとして以下の研究に使用した。

(2) モデルラットの精巣組織の組織学的検討

胎生 18 日から、生後 144 日にわたり、経時的にモデルラットから精巣を摘出し、HE 染色で精巣の形態学的検討を行った(胎生 18, 20 日、出生 1, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 19, 21, 28, 144 日)。また、精子幹細胞マーカーとして、UTF1 (Undifferentiated embryonic cell transcriptional factor 1) を用い、各日齢で免疫染色を行った(抗 Utf1 抗体、1:500、Abcam #ab24273)。正常ラットの精巣組織との比較も行った。

(3) ラット精巣における UTF1 の発現

Utf1 遺伝子発現を定量 RT-PCR で、UTF1 タンパク発現を Western blotting 法で検討した。

(4) モデルラット精巣における網羅的遺伝子発現解析

生後 9 日齢のモデルラット精巣において、対照の正常精巣と遺伝子発現変化を比較するため、マイクロアレイ解析を行った。精巣組織から RNeasy® Midi Kit を用いて total RNA を抽出した。Affimetrix 社製 DNA マイクロアレイシステムを用いて、正常に比べて発現が亢進あるいは低下している遺伝子を網羅的に探索した。また、マイクロ RNA の変化を比較するため、Agilent 社製 miRNA マイクロアレイシステムを用いた。いずれも解析には GeneSpring GX10.0 ソフトウェアを用いた。

(5) マイクロアレイ解析結果の検証

mRNA および microRNA いずれもマイクロアレイ解析で得られた候補因子について、精巣における発現量を定量 RT-PCR 法によって検証した。マイクロアレイ・定量 RT-PCR の両者で整合性が見られた因子のみを以下の検討に使用した。

(6) 候補因子の精巣における局在

検証した候補因子の精巣における局在を、in situ hybridization 法および、免疫染色によって検討した。

(7) 候補因子の機能解析

mRNA マイクロアレイで得られた Kdm5a については強制発現ベクターを作成し、精原細胞の培養株である GC-1 細胞に強制発現し、変動のある遺伝子変化を検討した。microRNA マイクロアレイで得られた miR-135a については、標的遺伝子を各種データベースツールを用いて検討した。

(8) ヒト精巣(精巣腫瘍)組織における UTF1 発現の検討

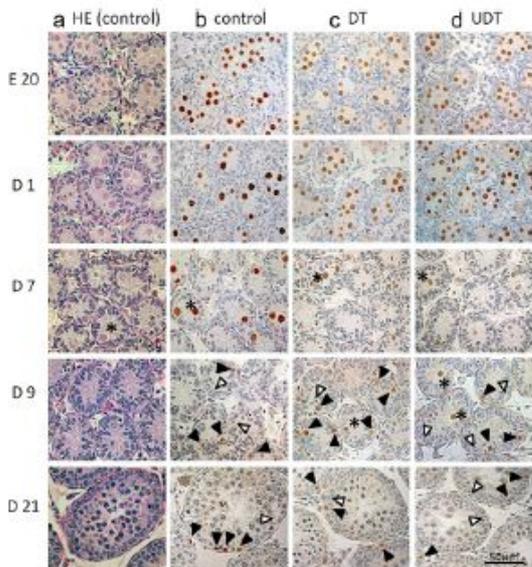
手術で摘出したヒト精巣腫瘍組織において UTF1 の発現を免疫染色・定量 RT-PCR 法によって解析した。組織型によって変動があるかどうかも検討した。

4. 研究成果

(1) ラット精巣における形態学的変化と UTF1 発現の推移

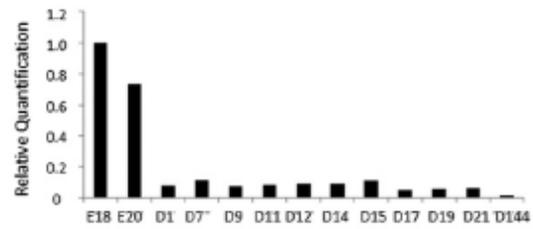
下図に示すように、UTF1 は精子幹細胞とその前駆細胞とに特異的に発現しており、Sertoli 細胞や Leydig 細胞などの体細胞には発現が認められなかった。

また、形態学的に精子幹細胞であっても、UTF1 陽性となるものと陰性となる細胞の 2 種類が存在していることが新たに判明した。

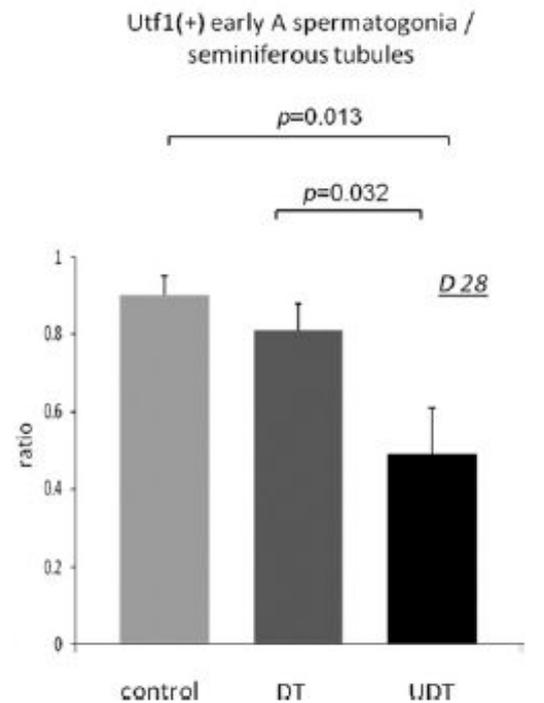


定量 RT-PCR 法による解析からは、出生直前では UTF1 発現が高いのに対し、発育とと

もにその発現は次第に減少することも明らかにすることができた(下グラフ)



さらに、停留精巣では正常に比べると UTF1 陽性の精子幹細胞数が有意に減少することも明らかにできた(下グラフ)



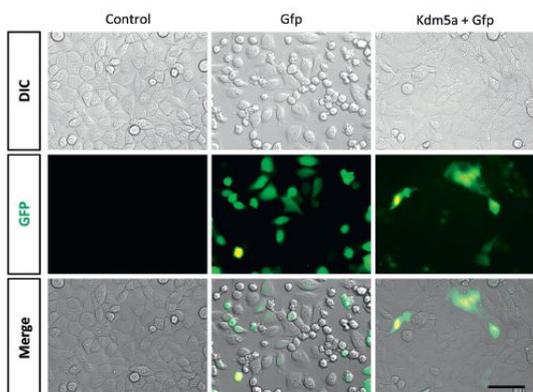
(1 精細管あたり UTF1 陽性精子幹細胞数 : DT; descended testis, UDT; undescended testis)

(2) ラット停留精巣における網羅的遺伝子発現解析 (mRNA マイクロアレイ)

生後 9 日齢の精巣組織から mRNA を抽出し、正常精巣・下降精巣・停留精巣で発現している遺伝子群を比較したところ、停留精巣で Kdm5a 遺伝子が有意に発現亢進していることを見出した。Kdm5a 遺伝子はヒストン脱メチル化酵素の一つとして知られ、ヒストンタンパク H3K4 を脱メチル化する作用を持つ。Western blotting 法により H3K4me1/2/3 タンパクの発現量を定量したところ、停留精巣では Kdm5a 発現が亢進するにつれて、H3K4me2/3 発現が低下することを見出すことができた。

Kdm5a 遺伝子の精巣における機能解析を行うため、全長 cDNA を組み込んだ強制発現ベクターを作成し、精原細胞の培養株である GC-1 細胞へ遺伝子導入した。導入できた細胞には、蛍光タンパク質である GFP も発現

できるようにし、導入効率を検討した(下図)。



遺伝子導入した細胞では、これまで精子幹細胞の分化に関わると報告されている Ret, Thy1 などの遺伝子発現が亢進しており、Kdm5a 遺伝子発現によりこうした遺伝子発現が変化することで、精子幹細胞の分化に関わることが示唆された。

(3) ラット停留精巣における網羅的遺伝子発現解析 (microRNA マイクロアレイ)

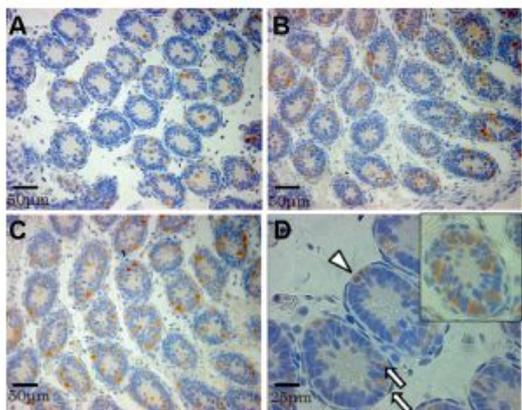
停留精巣で特異的発現する microRNA を探索したところ、下表のように miR-135a が有意に低下していることを明らかにした。

Table

Gene	Fold Change	p Value (t-test)
miR-22-5p	2.53	<0.05
miR-376b-3p	2.54	0.01
miR-71-1-3p	2.40	<0.01
miR-742	2.14	<0.01
miR-135a	0.29	<0.05

さらに様々な予測プログラムを用いて miR-135a が作用する相補的な配列を持つ遺伝子を探索したところ、FOXO1 遺伝子を同定することができた。FOXO1 遺伝子は精子幹細胞に特異的に発現し、さらに活性型では核内へ移行することも明らかにした(下図)。

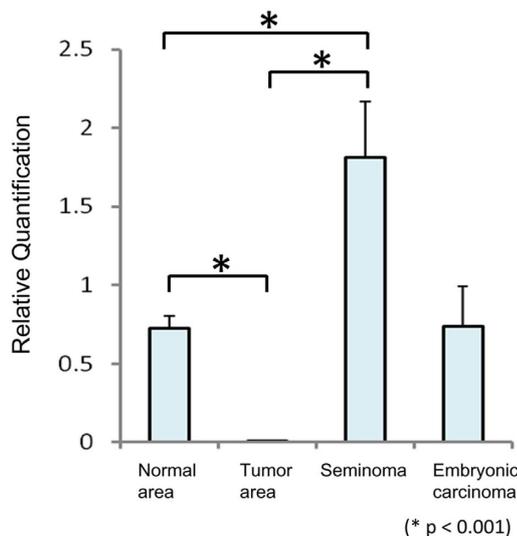
このようにヒストン修飾や microRNA に



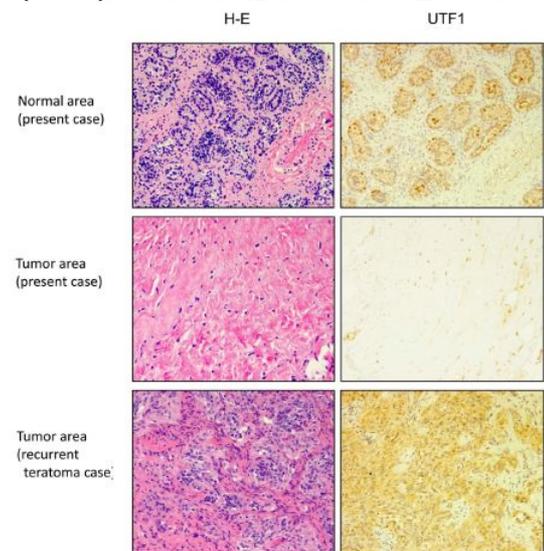
よる RNA 干渉などエピジェネティックな遺伝子発現調節により精子幹細胞の分化が影響を受けることを、世界に先駆けて見出すことができた。

(4) ヒト精巣腫瘍組織における解析

実際のヒト精巣腫瘍組織のサンプルを用いて UTF1 遺伝子発現を検討したところ、正常精巣に比べて、セミノーマでは有意に亢進しており、奇形腫では低下することを明らかにした(下グラフ)。



また、精巣組織の免疫染色でも遺伝子発現と同様の発現強度を確認することができた(下図)。精子幹細胞が何らかの理由でがん



化することにより精巣腫瘍が発生するが、幹細胞マーカーである UTF1 は、特定のがん組織でも発現することを確認することができた。再発性の精巣腫瘍では UTF1 発現強度が高いことから、UTF1 の発現強度によって予後や再発のリスクを予測できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 14 件)(全て査読あり)

1. Havashi Y, Mizuno K, Kurokawa S, Nakane A, Kamisawa H, Nishio H, Moritoki Y, Tozawa K, Kohri K, Kojima Y. Extravesical robotically assisted laparoscopic ureteral reimplantation with the

ureteral advancement technique for vesicoureteral reflux: initial experiences in Japan. *Int J Urol.* 21: 1016-1021, 2014 (doi: 10.1111/iju.12483.)

2. Mizuno K, Kojima Y, Kamisawa H, Moritoki Y, Nishio H, Nakane A, Kurokawa S, Kohri K, Havashi Y. Elucidation of distinctive genomic DNA structures in patients with 46,XX testicular disorders of sex development using genome-wide analyses. *J Urol.* 192: 535-41, 2014 (doi: 10.1016/j.juro.2014.02.044.)

3. Nishio H, Havashi Y, Moritoki Y, Kamisawa H, Mizuno K, Kojima Y, Kohri K. Distinctive changes in histone H3K4 modification mediated via Kdm5a expression in spermatogonial stem cells of cryptorchid testes. *J Urol.* 191: 1564-72, 2014. (doi: 10.1016/j.juro.2013.10.071.)

4. Moritoki Y, Havashi Y, Mizuno K, Kamisawa H, Nishio H, Kurokawa S, Ugawa S, Kojima Y, Kohri K. Expression profiling of microRNAs in cryptorchid testes: miR-135a contributes to the maintenance of spermatogonial stem cells by regulating FoxO1. *J Urol.* 191: 1174-80, 2014 (doi: 10.1016/j.juro.2013.10.137.)

5. Mizuno K, Kojima Y, Kamisawa H, Moritoki Y, Nishio H, Kohri K, Havashi Y. Gene expression profile during testicular development in patients with SRX-negative 46,XX testicular disorder of sex development. *Urology*, 82: 1453. e1-7, 2013 (doi: 10.1016/j.urology.2013.08.040.)

6. Mizuno K, Havashi Y, Kamisawa H, Nishio H, Moritoki Y, Kohri K. Expression analysis of the pluripotency marker UTF-1 for determining the applicability of testis-sparing surgery for prepubertal testis tumors. *J Pediatr Surg Case Rep.*, 1: 125-8, 2013 (doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10279.x.)

7. Havashi Y, Mizuno K, Moritoki Y, Nakane A, Kato T, Kurokawa S, Kamisawa H, Nishio H, Kohri K, Kojima Y. Can spongioplasty prevent fistula formation and correct penile curvature in TIP urethroplasty for hypospadias? *Urology*, 81: 1330-5, 2013. (doi: 10.1016/j.urology.2013.01.005.)

8. Kojima Y, Mizuno K, Umemoto Y, Yasui T, Havashi Y, Kohri K. Ureteral advancement in patients undergoing laparoscopic extravesical ureteral reimplantation for treatment of vesicoureteral reflux. *J Urol.* 188: 582-7, 2012 (doi: 10.1016/j.juro.2012.04.018.)

9. Moritoki Y, Kojima Y, Mizuno K, Kamisawa H, Kohri K, Havashi Y. Histopathologic analysis of bladder in patient with cloacal exstrophy. *Urology*. 79: 1368-71, 2012. (doi: 10.1016/j.urology.2011.09.020.)

10. Mizuno K, Kojima Y, Nishio H, Tozawa K, Mizuno H, Kohri K, Havashi Y. Transumbilical laparoendoscopic single-site gonadectomy for Turner's syndrome with Y-chromosome mosaicism. *J Pediatr Urol.* 8: e39-42, 2012. (doi: 10.1016/j.jpuro.2012.02.010.)

11. Mizuno K, Kojima Y, Kamisawa H, Kurokawa S, Moritoki Y, Nishio H, Havashi Y, Kohri K. Feasible etiology of vanishing testis regarding disturbance of testicular development: histopathologic and immunohistochemical evaluation of testicular nubbins. *Int J Urol.* 19: 450-6, 2012. (doi: 10.1111/j.1442-2042.2011.02951.x.)

12. Kamisawa H, Kojima Y, Mizuno K, Imura M, Havashi Y, Kohri K. Attenuation of spermatogonial stem cell activity in cryptorchid testes. *J Urol.* 187:

1047-52, 2012 (doi: 10.1016/j.juro.2011.10.170.)

13. Nishio H, Mizuno K, Moritoki Y, Kamisawa H, Kojima Y, Mizuno H, Kohri K, Havashi Y. Clinical features and testicular morphology in patients with Kallmann syndrome. *Urology*. 79: 684-6, 2012 (doi: 10.1016/j.urology.2011.10.032.)

14. Moritoki Y, Kojima Y, Mizuno K, Kamisawa H, Kohri K, Havashi Y. Intratesticular pressure after testicular torsion as a predictor of subsequent spermatogenesis: a rat model. *BJU Int.* 109: 466-70; discussion 470, 2012. (doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10279.x.)

〔学会発表〕(計 20件)

1. 水野健太郎, 西尾英紀, 守時良演, 神沢英幸, 黒川寛史, 中根明宏, 丸山哲史, 林祐太郎, 郡健二郎: 鼠径管内精巣に対する腹腔鏡下精巣固定術の有用性。第64回日本泌尿器科学会中部総会、2014.10.17-19、アクトシティ浜松(浜松市)
2. 水野健太郎, 西尾英紀, 守時良演, 林祐太郎: 鼠径管内精巣に対する腹腔鏡下精巣固定術の治療成績。第23回日本小児泌尿器科学会総会、2014.7.9-11、パシフィコ横浜(横浜市)
3. 水野健太郎, 西尾英紀, 守時良演, 林祐太郎: 腎淡明細胞肉腫の2例～診断・治療における遺伝子解析の有用性～。第23回日本小児泌尿器科学会総会、2014.7.9-11、パシフィコ横浜(横浜市)
4. 水野健太郎, 神沢英幸, 守時良演, 黒川寛史, 中根明宏, 梅本幸裕, 佐々木昌一, 林祐太郎, 郡健二郎: 精子幹細胞の分化過程におけるアンドロゲン作用機序の解明。第102回日本泌尿器科学会総会、2014.4.24-7、神戸国際会議場(神戸市)
5. Mizuno K, Havashi Y, Kamisawa H, Moritoki Y, Nishio H, Imura M, Shibata Y, Kurokawa S, Nakane A, Kato T, Maruyama T, Kojima Y, Kohri K. Functional analysis of Rho signaling cascade concerned with cell adhesion in the process of testicular development. AUA 2013 Annual Meeting, 2013.5.4-8, San Diego, CA, (USA)
6. Mizuno K, Havashi Y, Kamisawa H, Moritoki Y, Nishio H, Imura M, Shibata Y, Kurokawa S, Nakane A, Kato T, Maruyama T, Kojima Y, Kohri K. Elucidation of genomic DNA structures distinctive of patients with 46,XX testicular DSD using genome-wide analyses. Society for Pediatric Urology's 61st Annual Meeting, 2013.5.3-5, San Diego, CA, (USA)
7. Mizuno K, Havashi Y, Iwatsuki S, Kamisawa H, Umemoto Y, Kojima Y, Sasaki S, Kohri K. Mechanisms of male germ cell development in the prepubertal testis. 10th International Congress of Andrology, 2013.2.23-6, Melbourne, (Australia).
8. Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Kamisawa H, Umemoto Y, Moritoki Y, Nishio H, Sasaki S, Havashi Y, Kohri K. Elucidation of genomic DNA structures distinctive of patients with 46,XX testicular DSD using genome-wide analyses. 10th International Congress of Andrology, 2013.2.23-6, Melbourne, (Australia).
9. 水野健太郎, 神沢英幸, 守時良演, 西尾英紀, 林祐太郎, 郡健二郎: ゲノムワイド解析を用いた精巣発生メカニズムの解明。第64回名古屋市立大学医学部総会、2013.12.8、名古屋市立大学(名古屋)

- 市)
10. 水野健太郎、神沢英幸、守時良演、西尾英紀、岩月正一郎、梅本幸裕、佐々木昌一、林祐太郎、郡健二郎：精子幹細胞分化におけるアンドロゲンの役割。日本アンドロロジー学会第 32 回学術大会、2013.7.26-7、グランキューブ大阪（大阪市）
 11. 水野健太郎、西尾英紀、林祐太郎、郡健二郎：骨盤内異形成腎と腹腔内精巣を合併した一例～発症要因の組織学的考察～。第 22 回 日本小児泌尿器科学会総会、2013.7.10-12、東京ビックサイト TFT ホール（東京都）
 12. 水野健太郎、神沢英幸、守時良演、西尾英紀、林祐太郎、郡健二郎：精巣発生における細胞接着制御 Rho シグナル伝達系の機能解析。第 101 回日本泌尿器科学会総会、2013.4.25-28、さっぽろ芸術文化の館ほか（札幌市）
 13. Mizuno K, Kojima Y, Havashi Y, Kohri K. Symposium "DSD & Genital Reconstruction": Sex differentiation of the gonad at the molecular level. 14th Annual Congress of Asia-Pacific Association of Pediatric Urologists, 2012.10.4-6, Busan, (Korea).
 14. Mizuno K, Kojima Y, Havashi Y, Kohri K. Olympus Symposium "On Minimally Invasive Surgery": Laparoscopic extravesical reimplantation with ureteral advancement. 14th Annual Congress of Asia-Pacific Association of Pediatric Urologists, 2012.10.4-6, Busan, (Korea).
 15. Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Kamisawa H, Imura M, Moritoki Y, Nishio H, Kato T, Havashi Y, Kohri K. Elucidation of genomic DNA structures distinctive of patients with 46,XX testicular DSD using genome-wide analyses. 26th Congress of the Societe Internationale d'Urologie, 2012.9.30-10.4, Fukuoka convention center (Fukuoka, Japan)
 16. Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Kamisawa H, Imura M, Moritoki Y, Nishio H, Shibata Y, Nakane A, Kato T, Maruyama T, Havashi Y, Kohri K. Functional analysis of spermatogonial stem cells in cryptorchidism using EEF1A1 and TPT1 gene expression as indexes of cell differentiation. AUA 2012 Annual Meeting, 2012.5.19-23, Atlanta, GA, (USA).
 17. 水野健太郎、小島祥敬、守時良演、神沢英幸、西尾英紀、井村誠、黒川寛史、中根明宏、加藤利基、丸山哲史、林祐太郎、郡健二郎：精巣発生における SOX3 遺伝子の役割。第 21 回 日本小児泌尿器科学会総会、2012.7.4-6、岡山コンベンションセンター（岡山市）
 18. 水野健太郎、佐々木昌一、小島祥敬、黒川寛史、守時良演、神沢英幸、西尾英紀、林祐太郎、郡健二郎：CGH アレイ解析を用いた精巣発生メカニズムの網羅的解析。第 31 回日本アンドロロジー学会、2012.6.29-30、神戸ポートピアホテル（神戸市）
 19. 水野健太郎、小島祥敬、守時良演、神沢英幸、西尾英紀、林祐太郎、郡健二郎：染色体構造分析による精巣発生メカニズムの解明。第 100 回日本泌尿器科学会総会、2012.4.21-24、パシフィコ横浜（横浜市）
 20. 水野健太郎、西尾英紀、守時良演、神沢英幸、梅本幸裕、小島祥敬、河合憲康、戸澤啓一、佐々木昌一、林祐太郎、郡健二郎：核出術により精巣温存が可能であった小児精巣腫瘍の 1 例。第 255 回日本泌尿器科学会東海地方会、2012.3.11、KDX 桜

通ビル（名古屋市）

〔その他〕
名古屋市立大学泌尿器科ホームページ
(<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/uro.dir/>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 利基 (KATO Toshiki)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・
研究員
研究者番号：60444965

(2) 研究分担者

郡 健二郎 (KOHRI Kenjiro)
名古屋市立大学・その他部局・学長
研究者番号：30122047

林 祐太郎 (HAYASHI Yutaro)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・
准教授
研究者番号：40238134

小島 祥敬 (KOJIMA Yoshiyuki)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：60305539

神沢 英幸 (KAMISAWA Hideyuki)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・
研究員
研究者番号：00551277

水野 健太郎 (MIZUNO Kentaro)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・
講師
研究者番号：70448710

(3) 連携研究者

該当なし