

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592376

研究課題名(和文) 難治性精巣腫瘍における Cyclin / Rb 経路の活性化の意義とその制御機構

研究課題名(英文) Expression of the oncoprotein gankyrin and phosphorylated retinoblastoma protein in human testis and testicular germ cell tumor

研究代表者

末富 崇弘 (SUETOMI, TAKAHIRO)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：10574650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円

研究成果の概要(和文)：ヒトの正常精巣と精巣腫瘍における gankyrin と pRb の発現を免疫染色にて検討した。gankyrin の発現抑制が pRb の発現や増殖に及ぼす影響を精巣腫瘍細胞株を用いて解析した。精巣腫瘍においては、セミノーマと胎児性癌において gankyrin と pRb の高発現をみとめたが、他の非セミノーマではこれらの発現は弱かった。growing teratoma や奇形腫悪性転化の症例においては、pRb は高発現を示したが、gankyrin は低発現であった。gankyrin は正常精巣における spermatocyte やセミノーマ、胎児性癌に発現しており、その発現は pRb と関連していた。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the expression of gankyrin, Rb and phosphorylated Rb (pRb) in human testis and testicular germ cell tumors by immunohistochemistry. The effects of suppression of gankyrin on phosphorylation status of Rb and cell proliferation were analyzed in vitro. Suppression of gankyrin led to suppression of Rb and cell proliferation in NEC8 cells. In testicular germ cell tumors, high expressions of gankyrin and pRb were observed in seminoma and embryonal carcinoma, whereas the expressions of both proteins were weak in histological subtypes of non-seminoma. Growing teratoma and testicular malignant transformation tissues expressed pRb strongly, but gankyrin faintly. Gankyrin is dominantly expressed in normal spermatocytes and seminoma/embryonal carcinoma, and its expression correlates well with pRb expression except in the growing teratoma and testicular malignant transformation cases. These data provide new insights into the molecular mechanisms of pathogenesis of testicular tumor.

研究分野：testicular cancer

キーワード：gankyrin testicular cancer

1. 研究開始当初の背景

本研究は精巣腫瘍の発生とその難治化に関与している Cyclin/Rb 経路の制御機構を明らかにし、新規分子標的治療のターゲットとなりえる分子生物学機序の同定を目的にした。Cyclin/Rb 経路に関与する蛋白質として Rb タンパクに結合することで過剰なリン酸化を引き起こし、Rb 経路の阻害をする Gankyrin に注目した。

2. 研究の目的

本研究は以下の2点に重点をおき、精巣腫瘍の発生機構を解明し、その知見をもとに精巣腫瘍における新たな治療法の開発を目的にしたものである。

(1) 正常精巣、精巣腫瘍における Gankyrin-Cyclin/Rb 経路の発現について

(2) Gankyrin を標的とした新規標的治療の開発

3. 研究の方法

93 例の精巣腫瘍と 5 例の正常精巣を用いて組織アレイを作成した (Table 1)。これら症例と精巣腫瘍細胞株における gankyrin, Rb, pRb, p53, CDK4 の発現を免疫染色、定量 PCR 法にて検討した。さらに細胞株を用いて、gankyrin の発現抑制が細胞増殖や pRb の発現に与える影響を検討した。

Table 1 Number of tissue specimens used for immunohistochemistry	
Histology	No. specimens
Normal testis	5
Total no. tumor specimens	93
Primary sites	64
Seminoma	20
Non-seminoma	44
Pure histological type	20
Mixed histological type	24
Metastatic sites	29
Non-teratomatous viable germ cell cancer	7
Teratomatous tumor	22
Teratoma	13
Growing teratoma	6
Teratoma with malignant transformation	3

4. 研究成果

(1) 細胞株、臨床検体における発現について

Gankyrin の mRNA は正常精巣にも精巣腫瘍細胞株にも存在していた (Fig. 1)。組織アレイでの染色にて Gankyrin は spermatocytes には発現しているものの、spermatogonia にはほとんど発現していないことがわかった (Fig. 2)。また、gankyrin の発現はセミノーマと胎児性癌においては高発現だが、それ以外の組織型では発現が低下していた。また、gankyrin の発現と pRb の発現は逆相関していた。Growing teratoma や奇形腫悪性転化の症例では、gankyrin は低発現であったが、pRb は高発現を示した (Fig 3)。

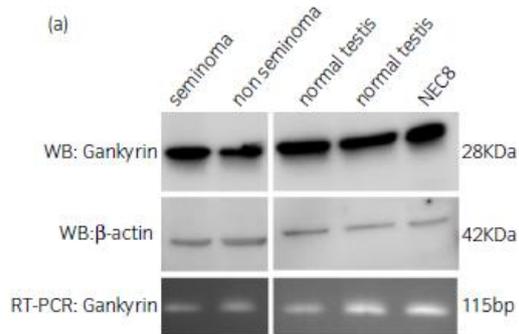


Fig. 1 正常精巣と精巣腫瘍における gankyrin の mRNA, タンパク発現

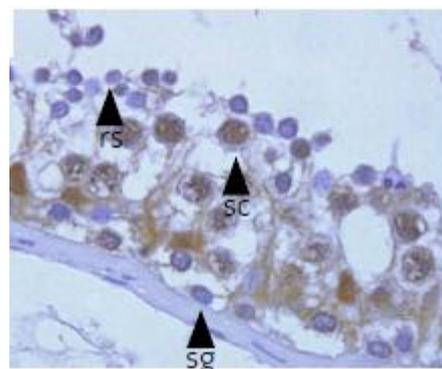


Fig.2 正常精巣における gankyrin 発現の局在について

rs, round spermatid; sc, spermatocyte; sg, spermatogonia

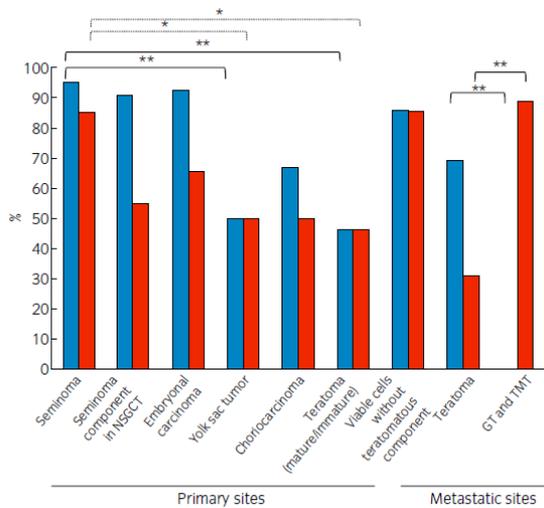


Fig. 3 Rates of strong gankyrin and phospho-Rb staining in various TGCT at primary and metastatic sites. The proportions of cases with strong staining are presented. Statistical analysis was carried out in comparison with seminoma in primary sites, and also between teratoma and growing teratoma/teratoma with malignant transformation (GT/TMT). Primary sites are compared with seminoma. Secondary sites are compared with teratoma without growth. * $P < 0.5$, ** $P < 0.01$. ■, Gankyrin; ■, phospho-Rb Ser795.

作成した組織アレイを用いて、gankyrin の制御分子のひとつである p53 と CDK4 の発現を検討した。精巣腫瘍においては、p53 が 10% 以上の腫瘍細胞陽性を示す検体はみとめられなかった。CDK4 は一部の絨毛癌のみに陽性であった。これらの結果から、p53 の変異は精巣腫瘍において頻度は高くないと考えられたが、gankyrin の発現との関連は検討が困難であった。

(2) 細胞株、臨床検体における発現について Gankyrin 抑制の精巣腫瘍細胞への影響を検討するため、siRNA を用いて発現を抑制し、細胞増殖への影響を WST8 にて検討した。また western-blotting にて pRB の発現への影響も検討した。gankyrin の抑制により、NEC-8、JEG-3 とともに細胞増殖が抑制された (Fig 4)。また、western-blot にて pRB の抑制も確認した (Fig 5)。

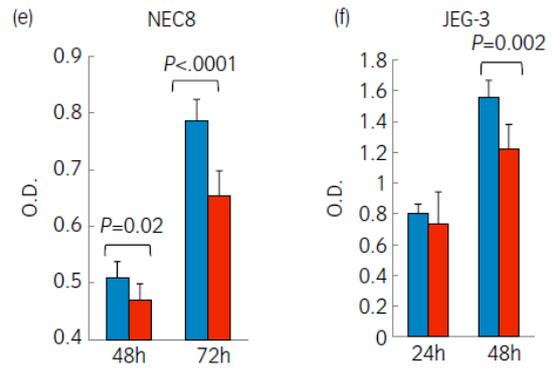


Fig. 4 gankyrin 発現抑制による精巣腫瘍細胞株における増殖への影響

blue bar, anti-gankyrin; red bar, control

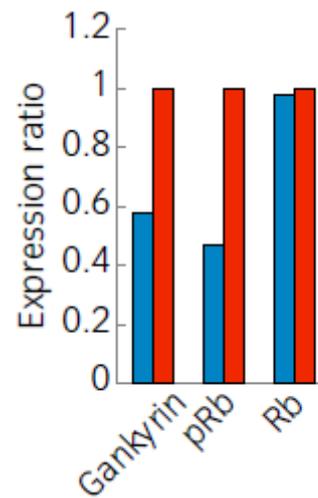


Fig. 5 gankyrin 抑制による Rb, pRb 発現への影響

blue bar, anti-gankyrin; red bar, control

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 7 件)

- ① Kurobe M, Kawai K, Oikawa T, Ichioka D, Kandori S, Takaoka E, Kojima T, Joraku A, Suetomi T, Miyazaki J, Nishiyama H. Paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin (TIP) as salvage and consolidation

chemotherapy for advanced germ cell tumor. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2015 Jan;141(1):127-33. doi:

10.1007/s00432-014-1760-x. 査読あり

② Uchida M, Kawai K, Kimura T, Ichioka D, Takaoka E, Suetomi T, Miyazaki J, Nishiyama H. Salvage chemotherapy with gemcitabine plus oxaliplatin for patients with testicular germ cell cancer. *Int J Clin Oncol.* 2014 Dec;19(6):1112-7. doi: 10.1007/s10147-014-0667-5 査読あり

③ Ando S, Matsuoka T, Kawai K, Sugita S, Joraku A, Kojima T, Suetomi T, Miyazaki J, Fujita J, Nishiyama H. Expression of the oncoprotein gankyrin and phosphorylated retinoblastoma protein in human testis and testicular germ cell tumor. *Int J Urol.* 2014 Oct;21(10):992-8. doi: 10.1111/iju.12484. 査読あり

④ Inai H, Kawai K, Kojima T, Joraku A, Shimazui T, Yamauchi A, Miyagawa T, Endo T, Fukuhara Y, Miyazaki J, Uchida K, Nishiyama H. Oncological outcomes of metastatic testicular cancers under centralized management through regional medical network. *Jpn J Clin Oncol.* 2013 Dec;43(12):1249-54. doi: 10.1093/jjco/hyt152. 査読あり

⑤ Shimazui T, Yoshikawa K, Miyazaki J, Kojima T, Inai H, Ando S, Uemura H, Uchida K, Nishiyama H. Systemic transduction of p16INK4A antitumor peptide inhibits the growth of MBT-2 mouse bladder tumor cell line grafts. *Int J Oncol.* 2013 Feb;42(2):543-8. doi: 10.3892/ijo.2012.1752. 査読有

⑥ Management of ureteral obstruction in advanced testicular tumor with lymph node

metastasis. Ikeda A, Kawai K, Ando S, Oikawa T, Inai H, Kimura T, Takaoka E, Yoshino T, Suetomi T, Kojima T, Miyazaki J, Nishiyama H. *Jpn J Clin Oncol.* 2012 Aug;42(8):748-52. doi:

10.1093/jjco/hys094. 査読有

⑦ Takase H, Kojima T, (他 11 人, 9 番目) Genome-wide identification of endothelial cell-enriched genes in the mouse embryo. *Blood.* 2012 Jul 26;120(4):914-23. doi: 10.1182/blood-2011-12-398156. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

末富 崇弘 (SUETOMI TAKAHIRO)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：10574650