

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791463

研究課題名（和文） 精巣腫瘍における新しいバイオマーカーの確立

研究課題名（英文） Establishment of a novel biomarker of testicular cancer

研究代表者

山田 成幸 (YAMADA SHIGEYUKI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：60509256

研究成果の概要（和文）：

DNMT3A に対する抗体（マウス、ラビット）について、フローサイトメトリーを行った。正常精巣由来の Hs1 細胞では反応が見られなかったが、精巣腫瘍由来の NCCIT 細胞では両抗体にて反応を認めた。また、Triton 処理により反応が増大した。一方、臨床像との関連を調べるため、手術時に摘出されたセミノーマ組織に対して、DNMT3A に対する抗体を用いて免疫染色を行った。数検体において免疫染色での発現を確認した。

研究成果の概要（英文）：

We conducted flow cytometry analysis about DNMT3A antibody of mouse and rabbit. There was no reaction with Hs1 cell arriving from normal testicular tissues. However, there was a significant reaction with NCCIT cell arriving from testicular cancer tissues, and this reaction was amplified by Triton preparation. We also conducted immunohistochemical analysis of DNMT3A for human testicular seminoma tissues, and confirmed that human seminoma cells were positively stained.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：精巣腫瘍、セミノーマ、バイオマーカー、DNMT3A 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

精巣腫瘍は、15-35 歳の若年男性において最も頻度が高い悪性固形腫瘍であること、化学療法の奏率が非常に高く有転移例であっても集学的治療により治癒が見込める数少ない悪性腫瘍の一つであることから、その罹患数以上に社会的な影響が大きい癌種の一

つである。

現在のところ、精巣腫瘍は精細管内胚細胞腫瘍(CIS)を経て発生するとの説が有力だが、CIS の起源やその後の浸潤性精巣腫瘍への進展に関する遺伝子レベルでの機序は解明されていない。

精巣腫瘍は組織学的にセミノーマ、非セミ

ノーマという2つの組織型に大別され、非セミノーマでは α フエトプロテイン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)が腫瘍マーカーとして臨床使用されており、予後予測や治療効果、再発時の判定材料として重要な役割を担っている。一方、セミノーマには特異的な腫瘍マーカーが存在していない。

これまでの研究で、山田はセミノーマ発癌関連遺伝子探索を目的としたマイクロアレイによる網羅的解析の結果、106個の遺伝子が正常精巣組織よりもセミノーマで強く発現していることを発見した。106遺伝子について各染色体の長腕・短腕ごとの分布を調べたところ、高発現する遺伝子が集中する染色体部位が見られ、その多くは染色体コピー数の増加が報告されている部位であった。その中から、DNMT3A、CCND2、FGD1、PIM2、ACVR1B、SOX4の6遺伝子については免疫染色による検討を行い、蛋白レベルでも同様にセミノーマで強く発現していることを報告している(Yamada, DNA Research, 2004)。

また、共同研究者である石井は、DNMT3A(DNA-methyltransferase 3A)遺伝子について、イントロン25部位における低メチル化の程度が精巣腫瘍における同遺伝子の高発現と関連していることを報告している(Ishii, Tohoku J Exp Med, 2007)。しかしながら、これら6遺伝子発現によるセミノーマ発生への影響や臨床像との関係については、未だ解明されていない状況にある。

2. 研究の目的

蛋白レベルでもセミノーマで強く発現していた6遺伝子のうち、特にDNMT3A遺伝子がセミノーマに強く発現することの細胞生物学的な意義や臨床像との関連を解明する。それにより、DNMT3A遺伝子をセミノーマの新しいバイオマーカーとして確立し、臨床応用することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

培養細胞でのDNMT3Aの発現をmRNAレベル、蛋白レベルで解析後、DNMT3Aノックダウン細胞や強制DNMT3A発現細胞を作成する。これらを用いて、増殖能、運動能、浸潤能などのbiological activityの違いを調べ、DNMT3Aが癌細胞におよぼす影響を解析する。

一方、DNMT3Aに対する抗体を用いて手術標本の免疫染色を行い、発現様式と臨床像や病理組織学的パラメーターを比較検討し、セミノーマにおけるDNMT3A発現の臨床的意義を解明する。ELISAによるDNMT3A遺伝子の血清レベルでのアッセイ系を確立する。セミノーマ患者と健常者の血清を用いて、DNMT3Aの発現と予後や臨床像との関連を調べ、腫瘍マーカーとしての有用性を検討する。

4. 研究成果

(1) DNMT3Aに対する抗体(マウス、ラビット)について、フローサイトメトリーを行った。正常精巣由来のHs1細胞では反応が見られなかった(図1)が、精巣腫瘍由来のNCCIT細胞では両抗体にて反応を認めた。また、Triton処理により反応が増大した(図2)。

図1 Hs1細胞(正常精巣由来)

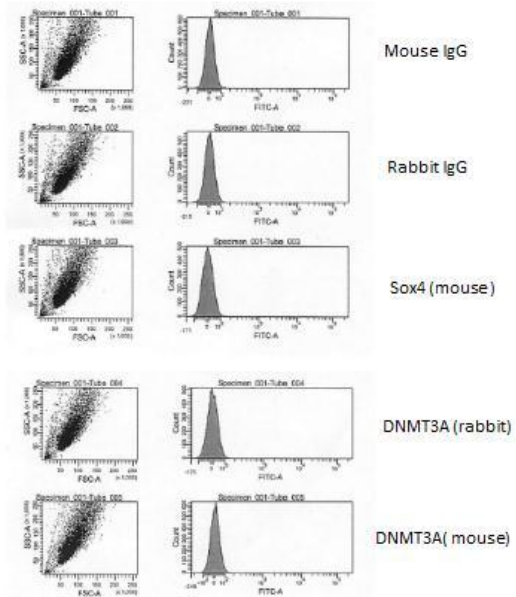
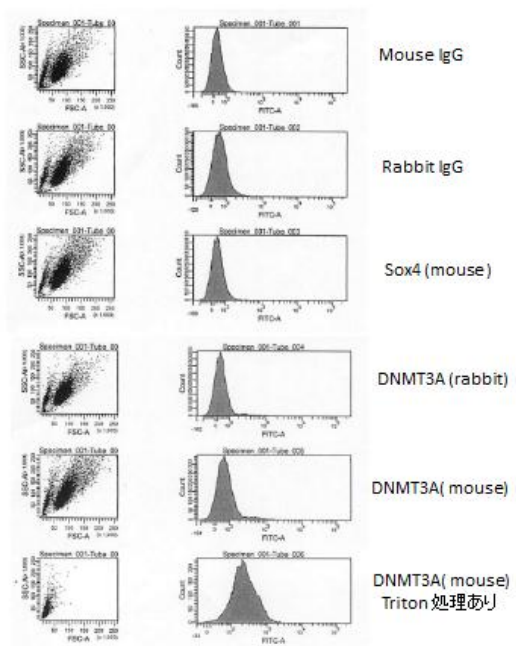


図2 NCCIT細胞(精巣腫瘍由来)



(2) 一方、臨床像との関連を調べるため、手術時に摘出されたセミノーマ組織に対して、DNMT3A に対する抗体を用いて免疫染色を行った。現在、数検体において免疫染色での発現が確認されたが、多数検体での発現様式と臨床像や病理組織学的パラメーターを比較検討するまでには至らなかった。

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 6 件)

- ① Miyazato M, Yamada S, Kaiho Y, Ito A, Ishidoya S, Arai Y, Lumbar incisional hernia of the kidney after laparoscopic adrenalectomy in a patient with Cushing's syndrome, *Urol Int*, 査読あり、2011、87、369-71
- ② Miyazato M, Ishidoya S, Satoh F, Morimoto R, Kaiho Y, Yamada S, Ito A, Nakagawa H, Ito S, Arai Y. Surgical outcomes of laparoscopic adrenalectomy for patients with Cushing's and subclinical Cushing's syndrome: a single center experience, *International Urology and Nephrology*, 査読あり、2011、43 巻、975-981
- ③ Arai Y, Kaiho Y, Saito H, Yamada S, Mitsuzuka K, Miyazato M, Nakagawa H, Ishidoya S, Ito A, Renal hypothermia using ice-cold saline for retroperitoneal laparoscopic partial nephrectomy: evaluation of split renal function with technetium-99m-dimercaptosuccinic acid renal scintigraphy, *Urology*, 査読あり、2011、77 巻、814-818
- ④ Takeda K, Jingu K, Koto M, Fujimoto K, Narazaki K, Kubozono M, Saito H, Yamada S, Mitsuduka K, Ishidoya S, Ariga H, Arai Y, Yamada S, Predicting the severity of acute urinary toxicity after brachytherapy with iodine-125

for localized prostate cancer, *The Tohoku journal of experimental medicine*, 査読あり、2011、223 巻、55-60

- ⑤ 佐藤 真彦, 宮里 実, 山田 成幸, 荒井陽一, 副腎癌との鑑別が困難だった後腹膜 Ewing 肉腫の 1 例, *泌尿器科紀要*, 査読あり、2011、57 巻、303-307
- ⑥ Hatakeyama S, Kyan A, Yamamoto H, Okamoto A, Sugiyama N, Suzuki Y, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Yamada S, Saito H, Arai Y, Fukuda M, Ohyama C, Core 2 N-acetylglucosaminyltransferase-1 expression induces aggressive potential of testicular germ cell tumor., *Int J Cancer*, 査読あり、2010、127 巻、1052-1059

[学会発表] (計 14 件)

- ① 山田 成幸, ミニレクチャー 「精巣腫瘍 Update ～リスクに応じた適切な治療を目指して～」、第 12 回泌尿器科 CPC、2012 年 2 月 4 日、仙台
- ② 山田 成幸, 精巣腫瘍の治療における栄養支持療法 (NST) の有用性について、第 19 回東北 EBM フォーラム、2011 年 12 月 10 日、仙台
- ③ 山田 成幸, 若年女性の尿管管癌に対し腹腔鏡操作と下腹部 Pfannenstiel 切開によるアプローチを併用し、整容的な手術を施行し得た 1 例、第 25 回日本泌尿器内視鏡学会総会、2011 年 11 月 30 日、京都
- ④ 山田 成幸, 難治性精巣腫瘍に対する救済化学療法としての DIN 療法の治療成績、第 49 回日本癌治療学会学術総会 (優秀演題賞)、2011 年 10 月 27 日、名古屋
- ⑤ 三塚 浩二, 山田 成幸, 齋藤 英郎, 伊藤 明宏, 石戸谷 滋人, 荒井 陽一, 腎機能障害を呈する尿路上皮癌への Gemcitabin-Carboplatin 療法の安全性と有用性の検討、第 49 回日本癌治療学会学術総会、2011 年 10 月 27 日、名古屋
- ⑥ 宮里 実, 大原 慎也, 三塚 浩二, 山田 成幸, 齋藤 英郎, 海法 康裕, 伊藤 明宏, 中川 晴夫, 石戸谷 滋人, 齋藤 誠一, 荒井 陽一, 前立腺癌に対する根治的前立腺摘除術後の排尿症状改善と前立腺サイズとの関連性、第 49 回日

本癌治療学会学術総会（優秀演題賞）、
2011年10月27日、名古屋

- ⑦ 山田 成幸、BEP 療法におけるクリニカルパスの導入と支持療法の工夫について、第76回日本泌尿器科学会東部総会（シンポジウム）、2011年10月21日、横浜
- ⑧ Yamada S.、Nutrition support therapy can reduce perioperative complications of open post-chemotherapy RPLND for metastatic germ cell cancer、28th Korea-Japan Urological Congress、2011年9月17日、水原、韓国
- ⑨ 山田 成幸、難治性精巣腫瘍進行症例に対する導入化学療法と管理、第99回日本泌尿器科学会総会（シンポジウム）、2011年4月21日、名古屋
- ⑩ 山田 成幸、歯科領域の感染合併により、sunitinib 内服中に著明な血小板減少症を来した進行腎癌の1例、第62回日本泌尿器科学会西日本総会、2010年11月5日、鹿児島
- ⑪ 山田 成幸、東北大学病院における対側精巣生検および両側精巣腫瘍症例の臨床的検討、第48回日本癌治療学会総会、2010年10月28日、京都
- ⑫ 山田 成幸、精巣腫瘍 Update ～診療ガイドラインの解説と東北大学の治療成績～、宮城県泌尿器科医会講演会（特別講演）、2010年8月21日、仙台
- ⑬ Yamada S.、Improved outcome for ‘Poor-prognosis’ germ cell cancer at a single center in Japan ~ a country with low incidence ~、第109回東北泌尿器科談話会泌尿器科セミナー、2010年6月14日、仙台
- ⑭ Yamada S.、Improved outcome for poor-prognosis metastatic germ cell cancer: a single center experience in Japan、the AUA Annual Meeting 2010、2010年5月31日、San Francisco USA

〔図書〕（計4件）

- ① 山田 成幸、医学図書出版、泌尿器外科 **POOR RISK** 精巣腫瘍の再考—さらなる治療成績の向上を目指して—「**POOR RISK** 精巣腫瘍に対する外科的治療—適応とタイミング—」、2012、311-317
- ② 山田 成幸、総合医学社、エビデンスに基づいたがん治療エキスパートマニュアル 各論16 前立腺がん、2012、207-215
- ③ 山田 成幸、メジカルビュー社、泌尿器科薬物療法 1st VISIT, 2nd VISIT I 感染・炎症性疾患：急性腎盂腎炎、2011、10-13
- ④ 山田 成幸、日本臨床社、精巣癌の手術療法 b) 化学療法後の残存腫瘍切除、2010、501-504

〔その他〕

ホームページ等

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻
外科病態学講座泌尿器科学教室

<http://www.uro.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 成幸 (YAMADA SHIGEYUKI)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：60509256