

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 3 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890108

研究課題名（和文） 精巣腫瘍高転移細胞株に高発現する分泌蛋白 SERPINE2 の抗体作製及び機能解析

研究課題名（英文） Creation of polyclonal antibody of secreted protein SERPINE2, which is expressed in testicular cancer cell line with high metastatic potential. How does it work in testicular cancer metastasis?研究代表者 永原 啓 (NAGAHARA AKIRA)
大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90588774

研究成果の概要(和文)：我々が以前に報告した精巣腫瘍における転移促進遺伝子 SERPINE2 につき、機能解析を目指し抗体作成を試みた。しかしながら、本研究では SERPINE2 を安定的に発現する細胞株を樹立することには成功したものの、動物実験においても臨床検体を用いた検討においても SERPINE2 が精巣腫瘍の転移促進因子として機能することを示唆する結果は得ることができず、抗体作成まで至らなかった。

研究成果の概要（英文）：We tried to create a polyclonal antibody of secreted protein SERPINE2 that we had reported before and to elucidate how it work in testicular cancer metastasis. Although we established stable SERPINE-expressed testicular cancer cell line, we couldn't get evidence that SERPINE2 was metastatic promoter in vivo and mRNA expression analysis in clinical samples. And we regretted to create the antibody of SERPINE2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011 年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

研究分野：泌尿器科腫瘍科研費の分科・細目：泌尿器科学キーワード：精巣腫瘍、転移、SERPINE2

1. 研究開始当初の背景

精巣腫瘍は 20～34 歳の青壮年期男性に発症する固形悪性腫瘍では最多を占める腫瘍であり、臨床的特徴として診断時に約 30%と高率に後腹膜リンパ節や肺に転移を認める。近年シスプラチンを中心とした化学療法によりこのような有転移症例においても予後

の改善を認めてきたが、一部には治療抵抗性症例が存在し、そのような症例は不幸な転帰を辿る。

転移を認める進行性精巣腫瘍を根治するためには最低 3 コース以上の化学療法を必要とし、症例によっては 10 コース以上の化学療法が必要となることもある。患者の年齢が

若年であることから抗癌剤の投与量も多量となり、化学療法による副作用は急性期における骨髄抑制、嘔気・嘔吐、末梢神経障害等、重度なものが多い。また近年では化学療法に伴う男性不妊や二次癌といった晩期有害事象も問題視されている。しかしながら、化学療法以上の有効な治療法は開発されていないのが現状である。

申請者は過去にヒト精巣腫瘍セミノーマ由来細胞株である JKT-1 ヌードマウス皮下移植モデルを用いて、JKT-1 およびその高転移変異株である JKT-HM の培養上清を投与することにより、JKT-HM 培養上清群において有意にマウスのリンパ節転移が増加したとの結果を得た。また、JKT-HM に高発現する分泌蛋白遺伝子 SERPINE2 をノックダウンした JKT-HM の培養上清を投与することにより同様のマウスモデルにおいてリンパ節転移の増加が有意に抑制され、SERPINE2 のリンパ節転移促進候補遺伝子としての可能性を報告した。過去に精巣腫瘍の転移に関する研究は多くなされておらず、転移のメカニズムについては以前不明な点が多いのが現状である。SERPINE2 の機能解析を進めることは精巣腫瘍の転移のメカニズムの解明においては非常に意義があると考えられる。しかしながら、以前の研究においては市販の抗体が機能しなかったため、SERPINE2 に関する mRNA レベルの解析しかできておらず、また SERPINE2 がどのように転移のメカニズムに関与するかも以前不明であった。

そこで、本研究においては SERPINE2 に対する抗体の作成および、SERPINE2 安定発現 JKT-1 を用いた SERPINE2 の転移促進機序の解明を目指し研究をスタートした。

2. 研究の目的

以前に我々が報告した精巣腫瘍転移促進候補遺伝子 SERPINE2 の機能解析を目指し、SERPINE2 安定発現株を樹立および SERPINE2 ポリクローナル抗体の作成を試みる。その後、作成した抗体を用い臨床検体における SERPINE2 の発現様式を評価し、SERPINE2 が精巣腫瘍における転移のバイオマーカーとなりうるかどうかにつき検討を加える。

3. 研究の方法

まず、遺伝子工学手技により SERPINE2 安定発現株を樹立する。その後、樹立した細胞株がヌードマウス皮下移植モデルにおいてリンパ節転移を、また尾静脈投与モデルにおいて肺転移を促進するかどうかを検討する。

次いで、SERPINE2 ポリクローナル抗体を作

成し、臨床検体における SERPINE2 の発現様式と診断時転移の有無との相関を検討し、SERPINE2 が精巣腫瘍において転移のバイオマーカーとなりうるかどうかを評価する。

4. 研究成果

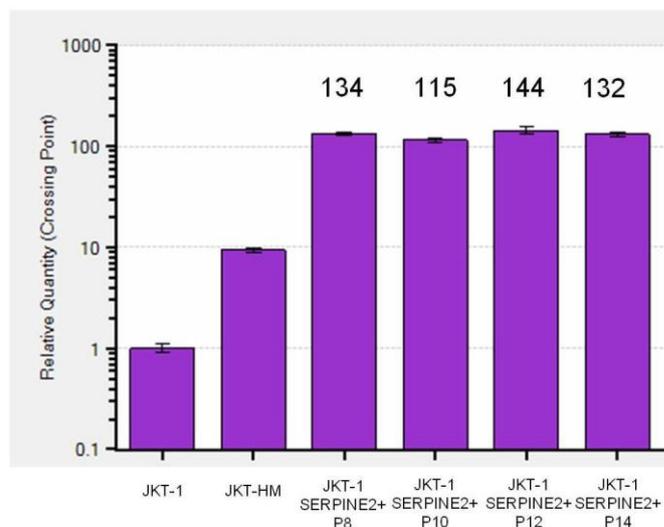
(1) SERPINE2 安定発現 JKT-1 細胞株の樹立

SERPINE2 をネオマイシン耐性発現ベクターである pBK-RSV に遺伝子工学的手技を用いて組み込んだ。次いで、これを精巣腫瘍セミノーマ細胞株である JKT-1 に transfection させ、G418 を添加した培養液で培養することにより transfection された JKT-1 をクローニングすることに成功した。

得られた安定発現株における SERPINE2 の mRNA レベルにおける発現は、親株である JKT-1 の 100 倍以上であり、SERPINE2 を高発現する JKT-1 の変異株である JKT-HM における発現量である 10 倍をも大きく上回っていた。また、樹立した細胞株の SERPINE2 の発現量は 10 代以上継代を繰り返しても低下を認めなかった。(図 1)

図 1

安定発現JKT-1におけるSERPINE2発現量



(2) SERPINE2 強制発現 JKT-1 による動物実験における転移促進評価。

次いで、樹立した SERPINE2 高発現 JKT-1 を用い動物実験を行った。まず、ヌードマウスに細胞株を皮下移植し、5 週後にリンパ節転移を評価したモデルにおいて、SERPINE2 強制発現 JKT-1 を皮下移植した群において、コントロール群と比し有意な転移の促進を認めなかった。続いてヌードマウスに細胞株を尾静脈投与し、6 週後に肺転移の有無を評価したモデルにおいて、SERPINE2 強制発現

JKT-1 を投与したモデル、コントロール群ともに肺転移の誘導を認めなかった。

以上より、動物実験において SERPINE2 がリンパ節転移および肺転移について促進的に働く事を示唆するデータを得ることはできなかった。

(3) 臨床検体における SERPINE2 発現様式の検討

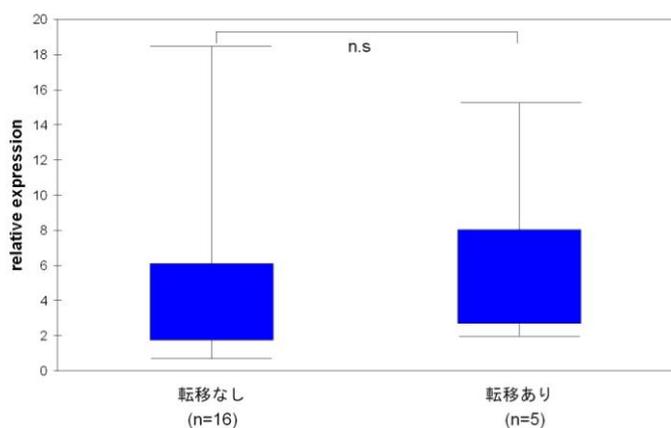
動物実験において SERPINE2 が転移に対し促進的な役割を果たすことを示唆する結果を得られなかったため、抗体作成に先立ち臨床検体における mRNA レベルの SERPINE2 の発現様式と診断時転移の有無との相関を評価した。

過去 15 年間に当科において施行した高位精巣摘除術の際に凍結保管しておいた 21 検体を用いて検討を行った。21 例のうち診断時転移を認めたものは 15 例、転移を認めなかったものは 6 例であった。凍結検体より total RNA を抽出、続いて逆転写により cDNA を作成し、real time PCR 法で SERPINE2 の発現様式を検討した。結果は転移の有無と SERPINE2 発現様式とに有意な相関を得る事ができなかった。(図 2)

臨床検体における mRNA レベルでの検討においても SERPINE2 が転移に促進的に働く事を示唆する結果を得ることができなかった。

図 2

臨床検体におけるSERPINE2発現量



(4) 動物実験および臨床検体を用いた mRNA レベルでの検討の結果、SERPINE2 が転移に促進的に作用することを示唆する結果を得ることができなかった。この結果をふまえ、SERPINE2 の抗体作成を行い、臨床検体における発現の検討を行う事により有意な結果を得る可能性は低いと判断した。また、研究責任者の 2011 年 10 月からの異動に伴い、抗体作成を行うための十分な期間を確保できなかったため、SERPINE2 ポリクローナル抗体の作成を断念し、本研究を終了した。

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 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

永原 啓 (NAGAHARA AKIRA)

研究者番号 : 90588774

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :