

泌尿器科腫瘍学における分子研究の展望： 発癌・転移機構（精巣腫瘍）

大阪大学大学院医学系研究科臓器制御外科学（泌尿器科学）（主任：奥山明彦教授）
野々村祝夫，奥山 明彦

A PROSPECT OF MOLECULAR BIOLOGY IN THE FIELD OF UROLOGIC ONCOLOGY: MECHANISMS OF CARCINOGENESIS OR TUMOR DEVELOPMENT IN TESTICULAR CANCER

Norio NONOMURA and Akihiko OKUYAMA
*From the Department of Specific Organ Regulation (Urology),
Osaka University Graduate School of Medicine*

Testicular germ cell tumor comprises about 1% of all the malignancies of males in Japan, and occurs in only one over 100,000 males annually. A susceptibility gene may be located on the short arm of the chromosome 12. Among the genes in this region, the expression of the KRAS2 mRNA was increased in testicular cancer compared to the normal testicular tissue. By DNA typing, HLA-DR4 and 0405 allele in HLA-DRB1 showed high relative risk for testicular cancer.

We analyzed the expression of the WT1 gene, reported to be a growth promoter for leukemia, by quantitative reverse transcription-PCR. Relative expression of the WT1 gene was significantly increased in high-stage cases than in low-stage cases, suggesting that WT1 could be useful as a tumor marker for progression of testicular cancers.

Testicular germ cell tumors are usually very sensitive to chemotherapeutic agents such as cisplatin, and p53 has been reported to play an important role in chemosensitivity. Therefore, mutations of the p53 gene or other genes downstream may be responsible for their chemoresistance. The expression of the GML (GPI-anchored molecule like protein) gene was examined in testicular cancers. Its expression was not correlated with histology or stage. However, 4 refractory cases, 2 of which were recurrent cases from stage I and the others were at high stages, showed no expression of the GML mRNA. These interesting facts suggest that the expression of GML gene could be a good marker for the prognosis of testicular germ cell tumors.

(Acta Urol. Jpn. 47 : 803-807, 2001)

Key words: Testicular cancer, Molecular biology, HLA, WT1, GML

緒 言

精巣腫瘍（精巣胚細胞腫瘍）は日本人においては全悪性腫瘍の約1%に相当し、発生率は人口10万人当たり約1人である¹⁾。精巣腫瘍に関しては遺伝子レベルでの研究も早くから進み、ほとんどの症例で第12番染色体短腕部の増幅（isochromosome 12p=i(12p)という）が存在することが以前から報告されており、第12番染色体短腕上には精巣胚細胞腫瘍の責任遺伝子が存在する可能性があると考えられてきたが^{2,3)}、最近、イギリスのグループが精巣胚細胞腫瘍の責任遺伝子の1候補がXq27上に存在すると報告した⁴⁾。

一方、精巣腫瘍の進展や治療反応性に関する分子生物学的研究は少ない。細胞増殖に関係するKi-67をMIB-1抗体で染色し、臨床病理学的検討を行った報

告などが散見されるに過ぎない^{5,6)}。従来癌抑制遺伝子として単離されたWT1の遺伝子産物が白血病の増殖プロモーターとして作用することや精巣腫瘍細胞株でも発現していることは興味深く⁷⁾、精巣腫瘍臨床検体におけるWT1遺伝子産物の発現とその増殖進展には何らかの関連が期待される。また、精巣胚細胞腫瘍は一般的に抗癌剤特にシスプラチンに対する感受性がきわめて高い。免疫組織染色においては、精巣腫瘍細胞の核内にp53蛋白が高発現を示すが、実際にはp53の遺伝子変異は少ないといわれている^{8,9)}。

本論文では、精巣腫瘍の発生に関してHLA解析の研究成果を、精巣腫瘍の進展に関してWT1遺伝子のmRNA発現量とstageとの関連の解析結果を報告する。また、腫瘍の抗癌剤耐性に関して、p53遺伝子の下流にある抗癌剤感受性に関連するといわれている

GML (GPI-anchored molecule like protein)¹⁰⁾ 遺伝子の発現と化学療法に対する感受性についての検討結果を報告する。

材料と方法

HLA の DNA タイピング：精巣胚細胞腫瘍の診断のついた男性52名の末梢血から DNA を抽出し、PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) を用いて HLA-DR と HLA-DRB の DNA タイピングを行った。日本人の正常対照として Akaza らが報告した1,216名の遺伝型頻度を用い¹¹⁾、カイ二乗検定あるいは Fisher's probability test により有意差検定を行った。

WT1 mRNA の測定と免疫組織染色：精巣腫瘍組織中の WT1 mRNA の定量にはまず、34名の精巣胚細胞腫瘍患者 (セミノーマ23例, 非セミノーマ11例) の凍結組織から total RNA を抽出し、段階希釈による定量 RT-PCR を行った¹²⁾ ヒト精巣腫瘍細胞株 NEC8 における WT1 mRNA の発現量を1.0として、各症例における発現量を数値化した。Stage に関しては、9例が high stage で、25例が low stage であった。免疫組織染色にはパラフィン包埋組織を 3 μ m に薄切し、抗ヒト WT1 ウサギモノクローナル抗体 (Santa Cruz 社, 100倍希釈) を用いて染色し、LSAB (labeled streptavidin-biotin) 法で発色させた。

GML mRNA の発現検討：上記34例について GML mRNA の発現を RT-PCR にて検討した。

KRAS2 の発現検討：13例の患者で、精巣腫瘍組織

と同一患者の正常精巣組織 (切除組織内に存在した正常部分) における KRAS2 遺伝子の mRNA を定量 RT-PCR により測定した。

結 果

HLA-DR および HLA-DRB：正常コントロールに比べて DR4 が有意に高頻度に認められ、その相対危険率は2.8倍で、p 値0.0004であった (Table 1)。DRB に関しては DRB1 の0405 allele が有意に高頻度に認められ、その相対危険率は3.2倍で、p 値0.00006であった (Table 2)。

KRAS2 mRNA の発現：13例中11例において正常部分に比べて腫瘍部分で高発現を示し、その相対発現比は2.01であった。

WT1 mRNA の発現：組織学的分類では、セミノーマと非セミノーマでは WT1 mRNA の発現に有意差は認められなかった。しかし、high stage 群と low stage 群を比較すると、有意に high stage 群に高発現症例が多く存在した (p<0.017) (Fig. 1)。高発

Table 2. DRB1 allele frequencies in Japanese patients with testicular germ cell tumor

DRB1 allele	No. of patients	PF	No. of control	AF	P value	RR
0101	7	13.7	48	5.0	0.3683	
1501	9	17.6	65	6.8	0.3762	
1502	12	23.5	86	9.2	0.2817	
1602	0	0.0	7	0.7		
0401	4	7.8	18	1.8	0.148	
0405	25	49.1	115	12.5	0.00006	3.2
0410	0	0.0	10	1.0		
0403	2	3.9	26	2.7	0.6774	
0406	3	5.9	34	3.5	0.7842	
1101	3	5.9	21	2.1	0.5911	
1201	3	5.9	37	3.9	0.6725	
1202	0	0.0	20	2.0		
1301	2	3.9	7	0.7	0.1824	
1302	0	0.0	71	7.4		
1401	3	5.9	37	3.8	0.6725	
1402	1	2.0	0	1.8		
1405	2	3.9	17	1.5	0.8609	
1403	1	2.0	15	1.8	0.6633	
1406	1	2.0	17	7.3	0.5718	
0803	6	11.8	70	0.4	0.6331	
0801	0	0.0	4	3.8		
0802	5	9.8	37	0.0	0.532	
0901	12	23.5	126	13.7	1.756	
1001	1	2.0	9	0.9	0.9454	
Total	51		493			

PF: phenotypic frequency=positive allele number/total patient number. control: by Akaza T, et al. (1994). AF: allele frequency=1-(1-PF)^{1/2}. RR: relative risk=PF/AF.

Table 1. HLA-DR antigen frequencies in Japanese patients with testicular germ cell tumor

DR antigen	No. of patients	PF	No. of control	AF	P value	RR
1	7	13.5	96	5.5	0.5325	
4	34	65.4	363	22.8	0.0004	2.8
7	0	0.0	7	0.4	—	
8	11	21.2	223	13.3	0.5493	
9	12	23.1	218	13	0.8443	
10	1	1.9	11	0.6	0.6612	
11	3	5.8	46	2.6	0.8387	
12	3	5.7	121	7	0.1088	
13	2	3.5	135	7.8	0.0256	
14	10	19.2	96	5.5	0.0572	
15	21	40.4	285	17.4	0.1945	
16	0	0.0	14	0.8	—	
17	0	0.0	4	0.2	—	
18	0	0.0	0	0	—	
Total	52		898			

PF: phenotypic frequency=positive allele number/total patient number. control: by Akaza T, et al. (1994). AF: allele frequency=1-(1-PF)^{1/2}. RR: relative risk=PF/AF.

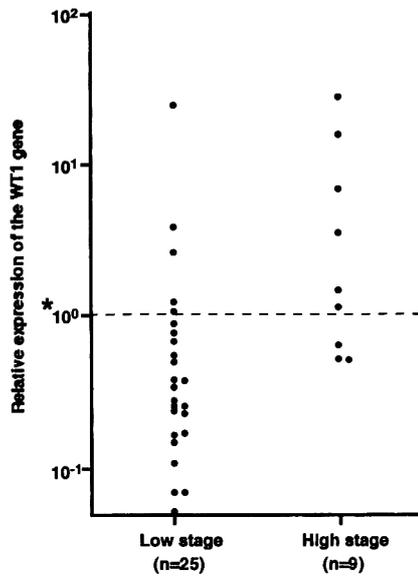


Fig. 1. Relative expression of the WT1 gene mRNA in testicular germ cell tumors according to tumor stage. The level of the WT1 mRNA expression in NEC8 cells was defined as 1. The cut-off point of 1.0 is marked by asterisk.

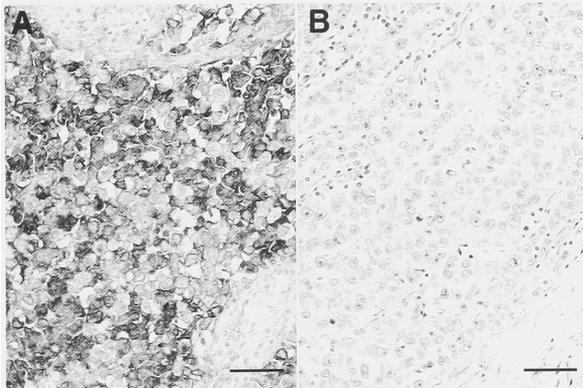


Fig. 2. Immunohistochemical staining of WT1 proteins. Section was probed with polyclonal antibody against WT1 (1:100). Scale bar represents 40 μ m. A: Seminoma with high expression of WT1 protein. B: Seminoma without expression of WT1 protein.

現症例では WT1 タンパクも高発現していた (Fig. 2).

GML mRNA の発現: GML は high stage の 9 例中 6 例に, また, low stage 25 例中の 18 例に発現を認め, high stage と low stage では有意差を認めなかった. 組織学的にはセミノーマ 23 例中の 18 例に, 非セミノーマ 11 例中 6 例に認められ GML の陽性率はセミノーマと非セミノーマで有意な差を示さなかった (Table 3). しかし, stage I の症例のうち, 後に再発して治療に難渋した 2 例と, high stage 9 例のうちの難治性になった 2 例では GML の発現を認めなかった.

Table 3. Expression of the GML gene in testicular germ cell tumors

	GML (-)	GML (+)	
Low stage	7 例	18 例	N.S.
High stage	3 例	6 例	
Seminoma	5 例	18 例	N.S.
Nonseminoma	5 例	6 例	

N.S.: not significant.

考 察

—精巣腫瘍の発生に関する分子研究—

精巣腫瘍は白人に多く, 有色人種に少ない傾向がある. 白人における罹患率は黒人におけるその約 5 倍であるといわれている¹²⁾. そして, 世界的にみるとその頻度は過去 40 年の間に約 2 倍以上に増加している¹³⁾. わが国でも, 最近の調査で, 過去 9 年間に約 1.35 倍に増加したことが明らかになった¹⁴⁾. Cytogenetic な解析により, 精巣胚細胞腫瘍は組織型にかかわらず, その細胞内に少なくとも 1 つ以上の X 染色体と Y 染色体を有していることがわかっている. そして, ほとんどすべての精巣腫瘍細胞に 12 番染色体短腕の重複 (12p isochromosome = i(12p)) が見られることも明らかにされている^{2,3)}. i(12p) は, 12 番染色体の長腕上の癌抑制遺伝子あるいは 12 番染色体短腕上の癌遺伝子の存在を予測させる. この重複する 12 番染色体短腕上の癌遺伝子として同定されているものの中に KRAS2 遺伝子や cyclin D2 などが存在する^{15,16)}. KRAS2 はそれ自身癌遺伝子として知られている. われわれの検討では同一患者の精巣腫瘍組織における KRAS2 mRNA の発現量は正常の精巣組織におけるその 2 倍以上であった. これが単に 12 番染色体短腕の重複を意味しているのか, KRAS2 遺伝子の精巣腫瘍発生への関与を意味しているのかは不明である.

癌の発生には主として, 単一の遺伝子 (癌抑制遺伝子や癌遺伝子) が関与すると考えられるが, それらの遺伝子以上の生じやすさなどが多くの遺伝子によって規定されている可能性がある. 最近では, ヒト遺伝子の中に存在する多くの多型を解析して特定の表現系が生じる相対危険度を算出することが可能となり, 将来の遺伝子診断やいわゆるオーダーメイド医療へつながるものと期待されている. HLA typing も遺伝子多型検索の一種であり, 特定の HLA の型を有する個体の特定の疾患に対するなりやすさを検討することができる. われわれは, 精巣腫瘍患者の HLA-DR および HLA-DRB1 に関して検討してみた. Table 1 に示すごとく, HLA-DR は精巣腫瘍患者において DR4 が有意に高頻度にみられた. また, Table 2 のごとく, DRB1 では 0405 allele を有するものが有意に高頻度

であった。これらの HLA のタイプが精巣腫瘍の発生と関連があるということを示唆している。しかし、現在まで HLA locus の近傍に精巣腫瘍の発生と関連のありそうな遺伝子の報告はない。

—精巣腫瘍の進展や予後に関する分子研究—

以前から、精巣腫瘍（特に non-seminoma）の予後規定因子として脈管内の細胞浸潤、embryonal carcinoma の含有率¹⁷⁻¹⁹、Ki-67 の発現^{5,6}などについて臨床病理学的な検討がなされていたが、分子生物学的手法の進歩と普及に伴って、E-cadherin や MMP (matrix metalloproteinase) の発現に関する分子レベルでの検討も行われるようになった²⁰

白血病において増殖のプロモーターと考えられた WT1 は精巣腫瘍にも発現しており、その発現量は high stage 症例で高く、low stage で低い傾向を示した (Fig. 1)。しかも、高発現症例においては WT1 がタンパクレベルでも高発現していることが証明され、タンパクとしての何らかの働きが示唆されている (Fig. 2)²¹。しかし、実際に WT1 が精巣腫瘍細胞において増殖促進因子となっているか否かはまだ明らかにはされていない。精巣腫瘍細胞株に WT1 遺伝子を導入するかあるいは WT1 の antisense oligonucleotide を導入することによって証明する必要がある。

また、精巣腫瘍はシスプラチンをはじめとする抗癌剤に対する感受性が非常に高く、p53 遺伝子の異常が低頻度であるといわれている。しかし、シスプラチン治療に対して抵抗性を示す精巣腫瘍ではやはり p53 遺伝子の異常がみられるという報告があり、p53 遺伝子は本腫瘍の薬剤感受性に関して重要な位置を占めると考えられる⁹。したがって、p53 遺伝子の上流や下流に存在する遺伝子の異常も薬剤耐性に関して重要な役割を果たしている可能性がある。GML (GPI-anchored molecule-like protein) は p53 の下流に存在し、抗癌剤や放射線による刺激に対して細胞に apoptosis を実行させる働きを有していると考えられている。また、GML は正常組織では精巣にかなり特異的に発現している¹⁰。われわれの検討では、GML の発現は組織型や stage とは関連を示さなかった。しかし、stage 1 のうち再発した 2 例はその後治療に難渋したが、これら 2 例は GML を発現していなかった。また、high stage 症例 9 例のうち 2 例は難治性で死亡したが、これら 2 例も GML の発現を示さなかった。これらの事実は GML がもともと精巣に特異的に発現していて、抗癌剤に対する感受性を担っている分子であることを考えると非常に興味深い。症例数を増やしての、今後の系統だった研究が待たれる。抗癌剤抵抗性には GST- π や MDR などの関与も考えられるが、抗癌剤感受性に関してはやはり p53 とその下流の遺伝子が中心的な役割を担っているのではないだろ

うか。

結 語

精巣腫瘍の発生、進展、予後に関する分子研究による知見を紹介した。発生については KRAS2 遺伝子や HLA-DR, HLA-DRB1 の 0405 allele が関連している可能性が示唆された。進展には WT1 遺伝子産物の関与が示唆された。さらに、抗癌剤耐性に関しては p53 遺伝子の下流にある GML の関与が示唆された。

文 献

- 1) 細木 茂, 古武敏彦: 精巣 (睾丸) 腫瘍. 新図説泌尿器科学講座, 泌尿器科腫瘍学. 小柳知彦, 村井 勝, 大島伸一編. 第 1 版, pp 147-158, メジカルビュー社, 東京, 1999
- 2) Rodriguez E, Mathew S, Reuter V, et al.: Cytogenetic analysis of 124 prospectively ascertained male germ cell tumors. *Cancer Res* **52**: 2285-2291, 1992
- 3) Chaganti RSK, Rodriguez E and Bosl GJ: Cytogenetics of male germ-cell tumors. *Urol Clin North Am* **20**: 55-66, 1993
- 4) Rapley EA, Crockford GP, Teare D, et al.: Localization of Xq27 of a susceptibility gene for testicular germ-cell tumours. *Nat Genet* **24**: 197-200, 2000
- 5) Heidenreich A, Sesterhenn IA and Moul JW: Prognostic risk factors in low stage testicular germ cell tumors. *Cancer* **79**: 1641-1645, 1997
- 6) Albers P, Bierhoff E, Neu D, et al.: MIB-1 immunohistochemistry in clinical stage I nonseminomatous testicular germ cell tumors predicts patients at low risk for metastasis. *Cancer* **79**: 1710-1716, 1997
- 7) Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, et al.: WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* **87**: 3071-3079, 1994
- 8) Peng H-Q, Hogg D, Malkin D, et al.: Mutations of the p53 gene do not occur in testis cancer. *Cancer Res* **53**: 3574-3578, 1993
- 9) Schenkman NS, Seterhenn IA, Washington L, et al.: Increased p53 protein does not correlate to p53 gene mutations in microdissected testicular germ cell tumors. *J Urol* **154**: 617-621, 1995
- 10) Furuhashi T, Tokino T, Urano T, et al.: Isolation of a novel GPI-anchored gene specifically regulated by p53; correlation between its expression and anti-cancer drug sensitivity. *Oncogene* **13**: 1965-1970, 1996
- 11) Akaza T, Imanishi T, Fujiwara K, et al.: HLA alleles and haplotype frequencies in Japanese. *Transplant Now* **7**(suppl): 87-99, 1994
- 12) Daniels JL Jr, Stutzman RE and McLeod DG: A comparison of testicular tumors in black and white patients. *J Urol* **125**: 341-342, 1981

- 13) Bosl GJ, Bajorin D, Sheinfeld J, et al.: Cancer of the testis. In: Cancer: principles and practice of oncology. Edited by Devita VT, Hellman S and Rosenberg S. 5th ed., pp 1397-1425, JB Lippincott, Philadelphia, 1997
- 14) 三浦 猛, 小林一樹, 三好康秀: 日本における過去9年間の精巣癌罹患数(率)の変化. 日泌尿会誌 **92**: 203, 2001
- 15) Mostert MC, Verkerk AJ, van de Pol, et al.: Identification of the critical region of 12p overrepresentation in testicular germ cell tumors of adolescents and adults. *Oncogene* **16**: 2617-2627, 1998
- 16) Houldsworth J, Reuter V, Bosl GJ, et al.: Aberrant expression of cyclin D2 is an early event in human male germ cell tumorigenesis. *Cell Growth Differ* **8**: 293-299, 1997
- 17) Hoskin P, Dilly S and Easton D: Prognostic factors in stage I nonseminomatous germ cell testicular tumors managed by orchiectomy and surveillance: implications for adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* **7**: 1031-1036, 1986
- 18) Klepp O, Olsson AM, Henrikson H, et al.: Prognostic factors in clinical stage I nonseminomatous germ cell tumors of the testis: multivariate analysis of a prospective multicenter study. *J Clin Oncol* **8**: 509-518, 1990
- 19) Droz JP and Van Oosterom AT: Treatment options in clinical stage I nonseminomatous germ cell tumors of the testis: a wager on the future? a review. *Eur J Cancer* **29A**: 1038-1044, 1993
- 20) 越田 潔, 小中弘之, 加藤浩章, ほか: 精巣腫瘍における転移関連遺伝子の発現とリンパ節転移との関連について. 泌尿紀要 **46**: 775-781, 2000
- 21) Harada Y, Nonomura N, Nishimura K, et al.: WT1 gene expression in human testicular germ-cell tumors. *Mol Urol* **3**: 357-363, 1999

(Received on September 18, 2001)
(Accepted on September 18, 2001)