

精巣腫瘍特異的遺伝子の PCR を用いた 分子生物学的診断

大阪大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 奥山明彦教授)

野々村祝夫, 今津 哲央, 原田 泰規, 野澤 昌弘

小野 豊, 福井 辰成, 西村 和郎, 奥山 明彦

MOLECULAR STAGING OF TESTICULAR CANCER USING POLYMERASE CHAIN REACTION OF THE TESTICULAR CANCER-SPECIFIC GENES

Norio NONOMURA, Tetsuo IMAZU, Yasunori HARADA, Masahiro NOZAWA,
Yutaka ONO, Tatsunari FUKUI, Kazuo NISHIMURA and Akihiko OKUYAMA

From the Department of Urology, Osaka University Medical School

Most testicular germ cell tumors have serological tumor markers such as α -fetoprotein (AFP) and human chorionic gonadotropin β -subunit (β -HCG). On the other hand, molecular staging of these tumors has not been well established compared to other urogenital malignancies like prostate cancer. Recently, melanoma antigen (MAGE) which is one of the tumor-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes (CTL) has been found to be present in a variety of malignant tumor types and normal testis. In addition, Wilms' tumor-associated gene WT1 has been found to be expressed in some testicular cancers. Thus, we examined the expression of these genes in testicular cancer tissues and peripheral blood of cancer-bearing patients using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

The expression of the MAGE1-3 genes was examined in 34 testicular germ cell tumors (24 seminomas and 10 nonseminomas). Of the seminomas and nonseminomas, 87.5% and 40% were positive for MAGE1, 91.7% and 60% for MAGE2, and 83.3% and 30% for MAGE3, respectively. The expression of the MAGE genes was not correlated with the tumor stage. The expression of the WT1 gene was quantified in 26 testicular germ cell tumors. WT1 was highly expressed in 5 of the 7 high stage cases, but in only 4 of the 19 low stage cases ($p < 0.01$). The mRNA of these genes could not be detected from the peripheral blood of patients with high stage tumors.

These results suggest that MAGE genes may be useful tumor markers for molecular staging of testicular cancer, especially seminoma, and that the WT1 gene may be a tumor marker for high stage testicular germ cell tumors. However, these genes cannot yet be used for molecular staging of testicular germ cell tumors.

(Acta Urol. Jpn. 45: 593-597, 1999)

Key words: Testicular tumor, RT-PCR, WT1 gene, MAGE gene

緒 言

精巣腫瘍の診断には AFP や β -HCG のような血清学的な腫瘍マーカーが広く用いられている。しかし, seminoma の一部では腫瘍マーカーが存在せず, 治療経過の評価に難渋することもしばしばある。したがって, 精巣腫瘍に特異的に発現している遺伝子を見出すことは, 分子生物学的病期診断に利用できる可能性を考慮するときわめて重要な課題といえる。

T細胞認識メラノーマ抗原としてクローニングされた melanoma antigen (MAGE)¹⁾ は, 最近の研究で, メラノーマだけでなく各種癌および正常精巣組織

にも発現していることが判明した^{2,3)}。X染色体上に存在する MAGE ファミリーは少なくとも12の遺伝子から成り, MAGE と同様の組織発現パターンを示す GAGE, BAGE, NY-ESO-1 などのT細胞認識抗原と共に cancer-testis 抗原群と呼ばれる⁴⁾。トランスジェニックマウスを用いた研究で, 本抗原に対する免疫応答が腫瘍選択的な破壊を誘導する例が報告されている^{5,6)}。これらの抗原をコードする遺伝子は健常人の末梢血リンパ球には発現を認めないため, 末梢血中や腹水中への微量な腫瘍細胞の播種などを polymerase chain reaction (PCR) を用いて検索することが可能であると考えられる。したがって, これらの遺伝

子は分子生物学的病期診断のため一種の腫瘍マーカーとして用いられる可能性がある。

WT1 遺伝子は当初 Wilms 腫瘍の癌抑制遺伝子としてクローニングされたが⁷⁾、最近の研究により、白血病の増殖プロモーターとして作用することが判明した^{8,9)} さらに、本遺伝子は精巣腫瘍でも発現していることから¹⁰⁾、腫瘍マーカーとして用いられる可能性がある。

本研究では、MAGE や WT1 といった遺伝子が精巣腫瘍の腫瘍マーカーや予後規定因子となりうるか、さらに、PCR 法にもとづいた分子生物学的診断に用いることができるかという点について検討した。

対象と方法

対象は1994年1月から1998年12月までに大阪大学医学部附属病院およびその関連病院で高位精巣摘除術を受けた精巣腫瘍患者34例である。内訳は seminoma が24例、nonseminoma が10例であった。Stage は stage 1 が23例、stage 2A が4例、stage 2B が2例、stage 3B2 が4例、stage 3C が1例であった。摘除組織検体は術後すみやかに液体窒素にて凍結し、使用時まで -70°C で保存した。RNA 抽出には ISOGEN キット (ニッポンジーン) を用いた。また、一部の進行性精巣腫瘍患者からは術前に末梢血 20 ml を採取した。Ficoll-Paque 比重遠心法により単核球成分を分離し、同様の方法で RNA を抽出した。MAGE1-3 の増幅には後述の primer を用いて以下のような step-down PCR を行った。すなわち、total RNA (100 ng/ml) を reverse transcriptase で cDNA に変えた後、($94^{\circ}\text{C} \times 30$ 秒, $70^{\circ}\text{C} \times 20$ 秒, $72^{\circ}\text{C} \times 30$ 秒) を5サイクル、($94^{\circ}\text{C} \times 30$ 秒, $66^{\circ}\text{C} \times 20$ 秒, $72^{\circ}\text{C} \times 30$ 秒) を5サイクル、($94^{\circ}\text{C} \times 30$ 秒, $62^{\circ}\text{C} \times 20$ 秒, $72^{\circ}\text{C} \times 30$ 秒) を5サイクル、($94^{\circ}\text{C} \times 30$ 秒, $58^{\circ}\text{C} \times 20$ 秒, $72^{\circ}\text{C} \times 30$ 秒) を25サイクル行い、 72°C で5分間処理した。

[MAGE1 primers]

Forward primer

5'-CGGCCGAAGGAACCTGACCCAG-3'

Reverse primer

5'-GCTGGAACCCTCACTGGGTTGCC-3'

[MAGE2 primers]

Forward primer

5'-AAGTAGGACCCGAGGCACTG-3'

Reverse primer

5'-GAAGAGGAAGAAGCGGTCTG-3'

[MAGE3 primers]

Forward primer

5'-TGGAGGACCAGAGGCCCCC-3'

Reverse primer

5'-GGACGATTATCAGGAGGCCTGC-3'

WT1 の定量的 RT-PCR については total RNA を 1×10^{-10} ng/ μl から 1×10^{-1} ng/ μl まで2倍毎に段階希釈し、WT1, β -actin それぞれについて下記の primer set を用いて RT-PCR を行った。3% agarose gel で電気泳動した後 SYBR Green I (FMC BioProducts) で染色し、PCR 産物の発現強度を蛍光イメージアナライザー (Vistra Fluorolmager SI, Molecular Dynamics) で測定した。WT1, β -actin 共に、RNA の濃度勾配に対して PCR 産物の発現強度が exponential phase に認められる RNA の希釈領域で発現強度の比 (WT1/ β -actin) を測定した。RNA 量を横軸、発現量を縦軸として両対数グラフ上にプロットし、それぞれの勾配を算出した。同様に CML 急性転換細胞 K562 についても PCR を行い、その値 (WT1/ β -actin) を1.00と定義した (Fig. 1)。すべての検体における WT1/ β -actin 値を K562 に対する相対値で表し、これを相対発現量とした。増幅は、WT1 に関しては ($94^{\circ}\text{C} \times 1$ 分, $64^{\circ}\text{C} \times 1$ 分, $72^{\circ}\text{C} \times 2$ 分) を30サイクル、 β -actin に関しては ($94^{\circ}\text{C} \times 1$ 分, $60^{\circ}\text{C} \times 1$ 分, $72^{\circ}\text{C} \times 2$ 分) を25サイクル行った。

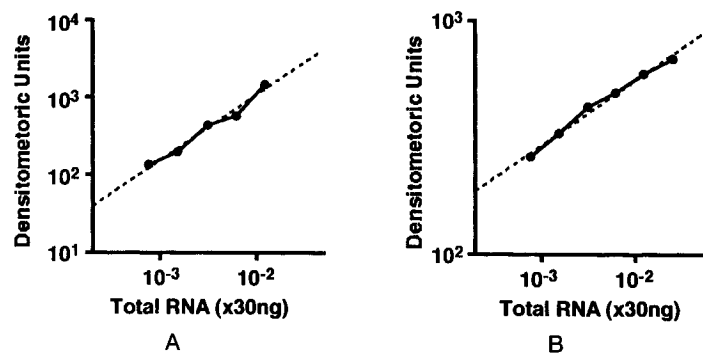


Fig. 1. Calibration curves drawn from the amount of RT-PCR products of the WT1 gene (A) and the β -actin gene (B) in K562 cells. The amount of RT-PCR products was expressed as the densitometric units.

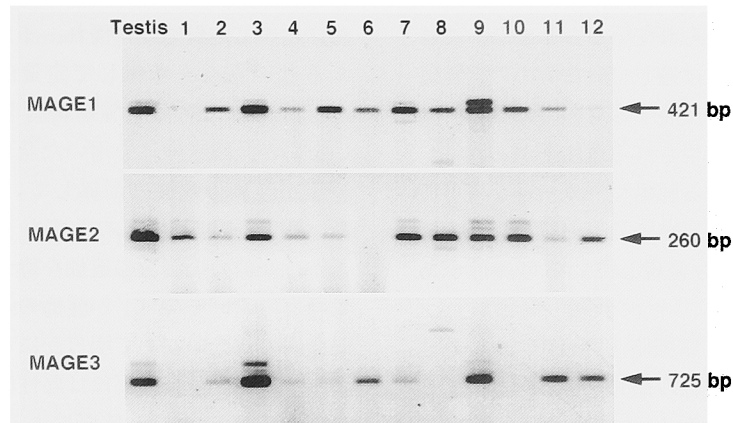


Fig. 2. Detection of RT-PCR products of MAGE1-3 genes from normal and malignant testicular tissues. Testis; normal portion of testicular tissue, 1-12; testicular cancer tissues.

[WT1 primers]

Forward primer

5'-GGCATCTGAGACCAGTGAGAA-3'

Reverse primer

5'-GAGAGTCAGACTTGAAAGCAGT-3'

[β -actin primers]

Forward primer

5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'

Reverse primer

5'-GTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'

結 果

1. 精巣腫瘍における MAGE 遺伝子の発現

MAGE1 の seminoma, nonseminoma における発現頻度はそれぞれ87.5% (24例中21例), 40% (10例中4例)であった。MAGE2 では91.7% (24例中22例), 60% (10例中6例), MAGE3 は83.3% (24例中20例), 30% (10例中3例)であった (Table 1)。いずれも, seminoma で高頻度に発現を認める傾向にあった。Stage や年齢とは関連を認めなかった。また, いずれも正常精巣組織で発現を認めたが, 末梢血リンパ球では発現を認めなかった。MAGE1-3 の PCR 産物の電気泳動像を Fig. 2 に示す。

2. 精巣腫瘍における WT1 遺伝子の発現

WT1 遺伝子の発現については前述のように定量的 RT-PCR を行った。相対発現量が0.05以上の症例は, low stage (stage 1) 群では20例中4例, high stage (stage 2 および 3) 群では7例中5例あり, high

Table 1. Expression of MAGE genes in testicular tumors

	MAGE1 positive	MAGE2 positive	MAGE3 positive
Seminoma (n=24)	21 (87.5%)	22 (91.7%)	20 (83.3%)
Nonseminoma (n=10)	4 (40 %)	6 (60 %)	3 (30 %)

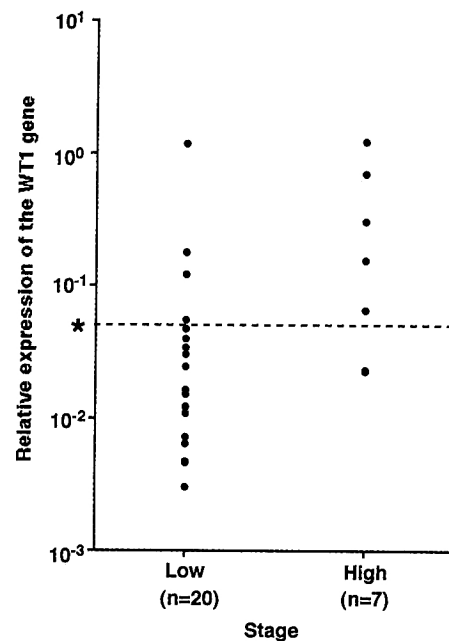


Fig. 3. Relative expression of the WT1 gene mRNA in testicular germ cell tumors according to tumor stage. The level of the WT1 mRNA expression in K562 cells was defined as 1.00. The cut-off point of 0.05 was marked by asterisk.

stage 群で有意に高発現症例が多かった ($p < 0.05$) (Fig. 3)。発現量と組織型, 年齢, マーカー値などの間には相関を認めなかった。

3. 末梢血中の腫瘍細胞の検出

原発巣で MAGE1-3 の発現を認める 6 症例 (stage 2 および stage 3) の術前末梢血 RNA を用いた RT-PCR では MAGE1-3 は検出できなかった。同様に, WT1 が高発現 (相対発現量 0.05 以上) を示した 5 症例においても WT1 は検出されなかった (data not shown)。

考 察

精巣腫瘍の診断には AFP や β -HCG といった優れ

た血清学的マーカーが用いられている。しかし、これらは治療の経時的な評価には適しているものの、腫瘍の悪性度や増殖速度を直接反映するものではない。精巣腫瘍において特異的に発現される遺伝子があれば、それもまた精巣腫瘍における腫瘍マーカーとなる可能性がある。また、正常精巣組織で発現の認められる遺伝子は精巣腫瘍においても発現している可能性がある。

MAGE 遺伝子は、ヒト癌細胞上 MHC-class I 分子上に提示され、宿主T細胞の標的分子となる抗原をコードする遺伝子としてメラノーマ細胞からクローニングされた¹⁾。最近の研究で、本遺伝子はメラノーマだけでなく各種癌および正常精巣組織でも発現していることが明らかとなった^{2,3)}。正常精巣組織に発現しているという知見から、精巣腫瘍においても本遺伝子が発現している可能性が示唆される。実際、われわれの検討では精巣腫瘍においても MAGE 遺伝子の発現が認められた。精巣腫瘍で発現している MAGE 遺伝子が、正常精巣組織に発現している MAGE の遺残であるのか、腫瘍特異的に発現している癌表面抗原であるのかという点については現時点では明らかではない。RT-PCR を用いた MAGE 遺伝子の発現検討では nonseminoma より seminoma で有意に高発現を示す傾向が見られた。MAGE 遺伝子が正常の精巣組織に由来するものと仮定すると、seminoma の方が正常精巣の形質をより高率に受け継いでいると考えられる。また、定量的検討をしていないため、発現量と stage が再発率との関連については言及しえなかった。本遺伝子はT細胞の標的抗原となる蛋白であるため、その発現量と腫瘍の進展には何らかの関連が予想される。今後、免疫組織化学などによる発現量の検討が必要であろう。

WT1 遺伝子は Wilms 腫瘍の癌抑制遺伝子としてクローニングされた zinc finger 型の転写因子である⁷⁾。WT1 は胎生期の腎、脾、精巣、卵巣組織において発現を認め、これら器官の発生や分化に関して重要な働きをしていると考えられているが、成熟精巣でも Sertoli 細胞に発現を認め、転写因子として何らかの働きを担っていることが示唆されている¹⁰⁾。最近の研究で、本遺伝子が白血病における腫瘍増殖の promoter となることが判明した⁸⁾。すなわち、K562 細胞に WT1 のアンチセンス オリゴヌクレオチドを加えることでその増殖が抑制される⁹⁾。さらに、白血病患者のうち末梢血中の WT1 発現が高いものは寛解導入されにくく、再燃の指標になることも明らかになった。精巣腫瘍と白血病には、若年者に好発することや化学療法に対して高感受性を示すことなどの共通点が多いことから、精巣腫瘍における WT1 発現の検討を試みた。遺伝子発現の検討には、Northern blot

法に比べて定量感度に優れ、また微量検体にも利用できるという点を考慮して定量的 RT-PCR 法を用いた。In vitro での精巣腫瘍細胞を用いた実験は行っていないが、臨床検体を用いた発現検討からは WT1 の発現が腫瘍の進展に関係している可能性が示唆された。WT1 が精巣腫瘍の重要な予後規定因子となるか否かは今後の症例数の追加を待つが、少なくとも、精巣腫瘍において WT1 が腫瘍の進展と関連を持つことが今回の研究で初めて明らかになったことは注目に値する。現在、精巣腫瘍には悪性度を示す指標がない。文献的には、MIB-1 抗原による Ki-67 の免疫組織化学的検討から細胞の増殖能を評価した報告があり、悪性度の指標として考慮されるべきものの一つと考えられる^{12,13)}。

原発巣で MAGE や WT1 遺伝子の発現を認めた high stage 症例においても、末梢血中ではこれら遺伝子を検出することはできなかった。その理由としては、遺伝子の発現自体が低いことや、精巣腫瘍が主としてリンパ行性に転移することなどが考えられる。Molecular staging を行うには、より発現の高い遺伝子を対象とすべきかもしれない。

結 語

精巣胚細胞腫における MAGE1-3 および WT1 遺伝子 mRNA の発現を調べた。MAGE1-3 は seminoma で高率に発現を認める傾向にあったが、stage とは相関を示さなかった。一方、WT1 は組織型とは相関を示さなかったが、進行症例で高発現する傾向を示した。いずれも、患者末梢血の RNA から検出されなかった。

文 献

- 1) van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al.: A gene encoding an antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **254**: 1643-1647, 1991
- 2) van Pel A, van der Bruggen P, Coulie PG, et al.: Genes encoding for tumor antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunol Rev* **145**: 229-250, 1995
- 3) Takahashi K, Shichijo S, Noguchi M, et al.: Identification of MAGE-1 and MAGE-4 proteins in spermatogonia and primary spermatocytes of testis. *Cancer Res* **55**: 3478-3482, 1995
- 4) Sahin U, Tureci O and Pfreundschuh M: Serological identification of human tumor antigens. *Curr Opin Immunol* **9**: 709-716, 1997
- 5) Hu J, Kindsvogel W, Bushy S, et al.: An evaluation of the potential to use tumor-associated antigens as targets for antitumor T cell therapy using transgenic mice expressing a retroviral tumor antigen in

- normal lymphoid tissues. *J Exp Med* **177**: 1681-1690, 1993
- 6) Vierboom MP, Nijman HW, Offringa R, et al.: Tumor eradication by wild-type p53-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* **186**: 695-704, 1997
- 7) Call KM, Glaser T, Ito CY, et al.: Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* **60**: 509-520, 1990
- 8) 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* **84**: 3071-3079, 1994
- 9) Yamagami T, Sugiyama H, Inoue K, et al.: Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms' tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis. *Blood* **87**: 2878-2884, 1996
- 10) Smith RC and Rukstalis DB: Frequent loss of heterozygosity at 11p loci in testicular cancer. *J Urol* **153**: 1684-1687, 1995
- 11) Pelletier J, Schalling M, Buckler AJ, et al.: Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes Dev* **5**: 1345-1356, 1991
- 12) Albers P, Bierhoff E, Neu D, et al.: MIB-1 immunohistochemistry in clinical stage I non-seminomatous testicular germ cell tumors predicts patients at low risk for metastasis. *Cancer* **79**: 1710-1716, 1997
- 13) Heidenreich A, Sesterhenn IA, Mostofi MK, et al.: Prognostic risk factors that identify patients with clinical stage I nonseminomatous germ cell tumors at low risk and high risk for metastasis. *Cancer* **83**: 1002-1011, 1998
- (Received on May 25, 1999)
(Accepted on June 30, 1999)