

博士論文

論文題目 尿路生殖器がんにおける細胞膜裏打ちタンパク質 4. 1B の
異常とその意義に関する研究

氏 名 金谷 淳志

尿路生殖器がんにおける細胞膜裏打ちタンパク質 4.1B の
異常とその意義に関する研究

東京大学大学院博士課程

医学系研究科外科学専攻泌尿器外科分野

指導教官 本間 之夫 教授

金谷 淳志

目次

	頁
要旨	1
はじめに	2
1.膀胱がんにおける細胞膜裏打ちタンパク質 4.1B の検討	
序文	4
方法	11
結果	23
考察	45
2.精巣胚細胞腫瘍における 4.1B の検討	
序文	52
方法	58
結果	60
考察	65
略語一覧	70
謝辞	71
参考文献	72

要旨

ヒト膀胱がんにおける細胞膜裏打ちタンパク質 4.1B の発現と機能について検討した。膀胱がん組織において 4.1B の発現は欠如しており、その頻度は筋層非浸潤がんに比し筋層浸潤がんでは高率であった。細胞株への 4.1B 強制発現により、マウス皮下移植モデルでの造腫瘍能の低下を認めた。これらの結果から、4.1B の発現欠如は膀胱がんの進展に関与することが示唆された。

次にヒト精巣における 4.1B の発現を検討した。4.1B は精母細胞性セミノーマ以外の精巣胚細胞腫瘍では発現が欠如していたことから、精母細胞性セミノーマの陽性マーカーとして有用と考えられた。

はじめに

がんは、がん遺伝子やがん抑制遺伝子などの多段階的な遺伝子変異や異常、エピジェネティックな異常を経て発生、進行に至る。従って、これらの各遺伝子の異常の実態を把握しその機能を明らかにすることは、がんの診断や治療を考えるうえで重要である。

細胞膜裏打ちタンパク質 4.1B をコードする *4.1B/DAL-1/EPB41L3* は、正常肺に比べ肺がんで RNA 発現が低下している遺伝子として同定された(1)。4.1B は細胞膜直下に存在するアクチン結合タンパク質であり、膜タンパク質 - 4.1B - アクチン経路は細胞骨格、細胞接着およびシグナル伝達に参与している。

当研究室での先行研究により、4.1B は腎がん、乳がん、非小細胞肺がんにおいて発現が低下、欠如していることが明らかになっている(2-4)。また、非小細胞肺がんや乳がんの細胞株に 4.1B の発現を回復させると、増殖が抑制されることが報告されており(1,5)、4.1B の発現低下はがんの無秩序な増殖や浸潤、転移に重要な役割を果たしていると考えられる。

そこで、尿路生殖器腫瘍における 4.1B の分子生物学的機構を解明するために、これまで明らかでなかった膀胱がんにおける 4.1B の発現解析と機能解析を行った (1.膀胱がんにおける細胞膜裏打ちタンパク質 4.1B の検討)。次に精巣胚細

胞腫瘍における 4.1B の発現を解析した（2.精巣胚細胞腫瘍における 4.1B の検討）。

1. 膀胱がんにおける細胞膜裏打ちタンパク質 4.1B の検討

序文

膀胱がんは泌尿器系がんの中では前立腺がんに次いで罹患者数の多い疾患である。世界的には 2008 年における膀胱がん新規罹患者数は 38.6 万人、死亡者数は 15 万人と推定されている(6)。

我が国においては、2011 年における男性の膀胱がん推定罹患者数は 15345 人、女性の推定罹患者数は 4962 人であり、全がんのそれぞれ 3.1%、1.4%を占める。同年の膀胱がん罹患率は 10 万人あたり 15.9 であり、男女別では男性 24.7、女性 7.6 と、男性では 3.3 倍高頻度である(7)。男性の罹患率が高い原因として、喫煙や職業性発がん物質への曝露が主に考えられている(8)。2015 年の予測罹患数は男性が 16300 人、女性が 5000 人と軽度の上昇が予測されている(9)。

2014 年の死亡数は男性 5308 人、女性 2452 人であり、全がんのそれぞれ 2.4%、1.6%を占める(10)。罹患率に比し死亡率の男女差は小さく、女性の予後は男性に比べて不良とされている(11)。

膀胱がんは病理学的には 90%以上が尿路上皮がん (Urothelial carcinoma) である。腫瘍の深達度によって Ta、Tis、T1、T2、T3、T4 に分類され (表 1)

表 1：膀胱がんの TNM 分類（文献(12)）

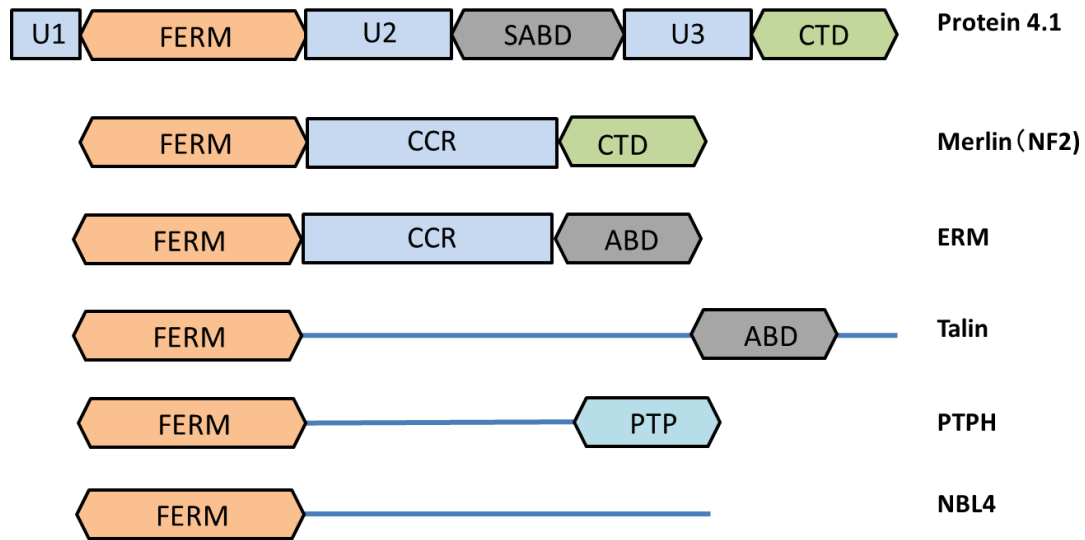
T- 原発腫瘍の壁内深達度	
TX	膀胱腫瘍の評価が不可能
T0	原発腫瘍を認めない
Ta	乳頭状非浸潤がん
Tis	上皮内がん
T1	粘膜上皮結合組織に浸潤する腫瘍
T2	筋層に浸潤する腫瘍
T2a	浅筋層に浸潤する腫瘍（内側 1/2）
T2b	深筋層に浸潤する腫瘍（外側 1/2）
T3	膀胱周囲組織に浸潤する腫瘍
T3a	顕微鏡的
T3b	肉眼的（膀胱外の腫瘍）
T4	次のいずれかに浸潤する腫瘍：前立腺間質、精嚢、子宮、膣、骨盤壁、腹壁
T4a	前立腺間質、精嚢、子宮または膣に浸潤する腫瘍
T4b	骨盤壁、または腹壁に浸潤する腫瘍
N- 所属リンパ節	
NX	所属リンパ節転移の評価が不可能
N0	所属リンパ節転移なし
N1	小骨盤腔内の 1 個のリンパ節（下腹、閉鎖リンパ節、外腸骨および前仙骨リンパ節）への転移
N2	小骨盤腔内の多発性リンパ節（下腹、閉鎖リンパ節、外腸骨および前仙骨リンパ節）転移
N3	総腸骨リンパ節転移
M- 遠隔転移	
M0	遠隔転移なし
M1	遠隔転移あり

(12)、70%以上が筋層非浸潤がん (Ta、Tis、T1) であり、残りが筋層浸潤がん (T2、T3、T4) である。筋層非浸潤膀胱がんの標準的治療は経尿道的膀胱腫瘍切除術であり、筋層浸潤膀胱がんでは骨盤内リンパ節郭清を含む膀胱全摘除術が標準的治療となる。筋層非浸潤膀胱がんの生物学的特徴として高い再発率が挙げられ、経尿道的膀胱腫瘍切除単独の治療では、およそ 60-90%の症例で再発を認める。その一方で、筋層浸潤膀胱がんへ進行する頻度は約 25%に留まる (13,14)。5 年がん特異的生存率は 90%以上であり、生命予後は概ね良好である (15)。

一方で、筋層浸潤膀胱がんにおいては、膀胱全摘術後の 5 年非再発率、5 年全生存率は各々 48-70%、57-60%と報告されている(16-18)。さらに、再発後の生存期間の中央値は 15 ヶ月と予後不良である(19)。このように予後不良な浸潤性膀胱がんの発生、進行に関わる分子機構の解明は、治療抵抗性を克服する重要課題であると考えられる。

4.1B / DAL-1 / EPB41L3 は、4.1G、4.1N、4.1R と共に 4.1 ファミリーに属する細胞膜裏打ちタンパク質である。4.1 ファミリーは FERM (4.1-Ezrin-Radixin-Moesin) ドメインを N 末端側にもち、さらにスペクトリン-アクチン結合ドメイン、そして C 末端に共通構造 (C 末端ドメイン) をもつ (図 1)。FERM ドメインは CD44、ICAM、CADM1 などの細胞膜を貫通す

A



B

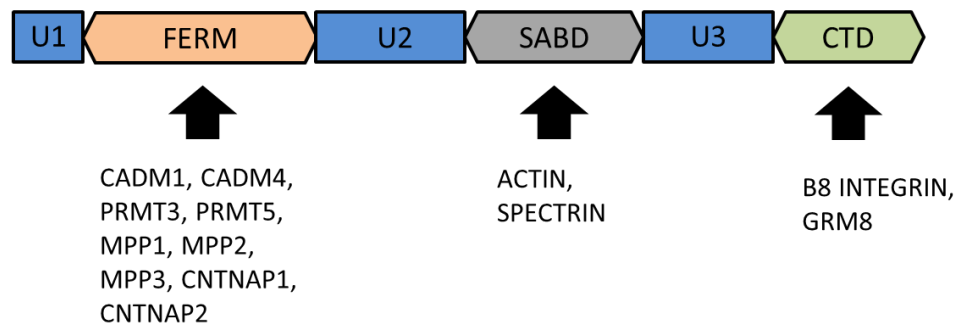


図 1. 4.1 スーパーファミリーの分子構造 (A) と 4.1B と結合する分子群 (B)

(A) 共通構造として FERM ドメインを持つ。Protein4.1 は 4.1B、4.1G、4.1N、4.1R から成る。FERM; 4.1/ezrin/radixin/moesin, SABD; Spectrin-actin-binding domain, CTD; C-terminal domain, CCR; Coiled-coil region, ABD; Actin-binding domain, PTP; Protein tyrosine phosphatase, NBL4; Band 4.1-like protein 4A

(B) 4.1B は FERM ドメイン、SAB ドメイン、C 末端ドメインを介して様々な分子と結合し、複合体を形成する。

る膜内タンパク質と結合することが報告されており、3つのサブドメインからなるクローバー構造が想定されている。また 4.1 ファミリーは膜骨格の線維構造を主に構成するスペクトリン - アクチン交差部位に結合し、その結合強度を制御していると考えられている。この膜骨格構造は細胞膜強度を維持する構造と考えられており、また、膜骨格構造が細胞 - 細胞間、もしくは細胞 - 細胞外基質との接着機能を膜内タンパクとともに果たすことが報告されており、これらの機能は上皮細胞の細胞構築、極性や細胞増殖に寄与している(20,21)。

また、4.1 ファミリーは **Talin**、タンパク質チロシンフォスファターゼ、ERM ファミリータンパク質である **Ezrin**, **Radixin**, **Moesin**、そしてがん抑制遺伝子 *NF2* の転写産物である **Merlin** と相同性を示し(22)、これらと 4.1 スーパーファミリーを構成する。

4.1B は、正常肺に比して肺がんで **RNA** 発現が低下している遺伝子として同定された(1)。これまでに、腎がんでは **4.1B** 遺伝子のプロモーター領域のメチル化により **4.1B** 発現が低下しており、そのメチル化の有無が予後に相関することが報告されている(2)。また肺がん、乳がん、卵巣がん、髄膜腫などにおいても発現の低下が指摘され(3,4,23-25)、乳がん、肺がんにおいては、腎がん同様にメチル化が不活化の原因として報告されている(表 2)。肺がんや乳がんの細胞株に **4.1B** の発現を回復させると、細胞増殖が抑制されること(1,5)、卵巣がん細胞

表 2 : 各種がんにおける *4.1B* 遺伝子発現の欠如

腫瘍	プロモーターメチル化	発現欠如	文献
非小細胞肺癌細胞株	17/39 (44%)	14/16 (87%)	(41)
小細胞肺癌細胞株	3/11 (27%)	4/11 (36%)	(41)
原発性非小細胞肺癌	147/268 (55%)	21/39 (54%)	(1,41)
乳がん細胞株	5/6 (83%)	4/6 (67%)	(3)
原発性乳がん	21/50 (42%)	49/67 (73%)	(3)
腎細胞がん細胞株	9/19 (47%)	10/19 (53%)	(2)
原発性腎細胞がん	10/20 (50%)	11/20 (55%)	(2)

株への 4.1B 発現回復により 3D 培養スフェロイドアッセイでの細胞増殖が抑えられることに加え(25)、4.1B ノックアウトマウスはヘテロマウスに比し、悪性の高い前立腺がんを発がんすることが報告されている(26)。このように様々ながん腫において、4.1B はがん抑制的に作用することが分かってきている。しかしながら、膀胱がんにおける 4.1B に関する報告はこれまでになく、その分子生物学的な意義は不明である。

膀胱がんは、他の様々なヒトにおけるがんと同様に、多段階的な遺伝子変異や異常、エピジェネティックな異常を経ることで腫瘍の発生、進行に至る。その中で、細胞間接着の破綻は、がん細胞が原発巣から浸潤、転移していく際に最初に起こると考えられるイベントである。実際、膀胱がんにおいても E-cadherin や Claudin などの接着分子の変異が高頻度に認められていることが報告されている(27-29)。そこで、本研究では尿路上皮における 4.1B 発現の局在を示し、膀胱がんにおける役割を解明するために、ヒト膀胱がん細胞株を用いて 4.1B の発現を解析した。そして 4.1B の発現が欠如した膀胱がん細胞株へ 4.1B を導入して、*in vitro* および *in vivo* における細胞の増殖抑制効果を確認し、4.1B が膀胱がんのがん抑制タンパク質として機能している可能性を示した。

方法

ヒト原発性膀胱がん組織標本とヒト膀胱がん細胞株

東京大学医学部附属病院泌尿器科において、原発性膀胱がん患者に対して施行された根治的膀胱全摘除術（1997 年 1 月～2009 年 10 月）および経尿道的膀胱腫瘍切除術施行症例（2009 年 11 月～2011 年 1 月）のうち、尿路上皮がんとして診断された 115 症例の手術切除検体を解析に使用した。対照尿路上皮検体として、膀胱尿路上皮がん症例検体の非がん部組織、および腎細胞がんの診断で根治的腎摘除術を施行された症例の正常尿管組織を用いた。本研究に対して、東京大学倫理委員会の審査承認を得た（倫理審査番号；3124）。原発性膀胱がん標本の病理診断は、東京大学医学部附属病院病理部によって行われた。

ヒト膀胱がん細胞株として、東京大学医学部泌尿器外科学教室で継代培養されている RT112、RT4、T24、VMCub1、647V、KK47、SW780、SW800、SW1710、575A、JMSU1、J82 の 12 種類、及び ATCC 社（Manassas, VA, USA）から購入した TCC-SUP、UMUC-3、5637 の 3 種類、計 15 種類の膀胱尿路上皮がんの細胞株を解析に使用した。それぞれの細胞株は、RPMI 1640 培地（ナカライテスク株式会社、京都、日本）に 10% ウシ胎児血清（FBS）（BioWest 社、Nuaille、France）、100 units/ml ペニシリンを加えた培地で維持した。

マウスの飼育

移植実験に使用するヌードマウス (BALB/c nu/nu)は、東京大学医科学研究所の動物センターで動物施設基準に従って飼育された。動物実験は医科学研究所の承認を得て行った (審査番号 ; A15-38)。

抗体

ウェスタン・ブロット解析、及び免疫組織化学的解析には以下の抗体を用いた。ウサギ・ポリクローナル抗 EPB41L3 / 4.1B 抗体は Atlas Antibodies 社 (Stockholm, Sweden) から購入した。マウス・モノクローナル抗 Actin 抗体 (C-2) は Santa Cruz Biotechnology 社 (Dallas, TX, USA) から購入した。

免疫組織染色

パラフィン切片は、65℃で 30 分間静置した後、キシレンに浸してパラフィンを除去し (脱パラフィン処理)、次いでエタノールに浸してキシレンを除去、さらに 5 分間水洗した。HISTOFINE pH 9 (Nichirei Biosciences 社, Tokyo, Japan)に浸して、オートクレーブで 121℃、20 分間処理して、抗原を賦活化した。室温に戻した後、3% H₂O₂ に室温で 10 分間浸して、内因性ペルオキシダーゼを除去した。次に非特異的反応を抑制するために、2% ウシ血清アルブミ

ン (bovine serum albumin) / PBS を加え、室温で 30 分間反応させた。一次抗体として抗 4.1B 抗体を 1:4000 で希釈して、4℃で 12 時間反応させた。翌日、Labeled Polymer (DAKO ENVISION kit / HRP (AEC), DAKO 社, Glostrup, Denmark)をそれぞれのプレパラートへ滴下し、室温で 30 分間反応させた後、PBS で洗浄し、Liquid DAB diluted Mix Buffered Substrate (DAKO 社)で発色させた。最後に、ヘマトキシリンで対比染色を行ない、マリノールで封入した。

発現の判定は、各標本のがん部組織の細胞膜上の発現の割合で行った。Takahashi らの報告に従い、細胞膜上の発現陽性細胞が 10%以下の場合に発現欠如とした(3)。

RT-PCR 法

膀胱がん細胞株における 4.1B の mRNA の発現を RT-PCR 法によって解析した。対照には glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を用いた。

各膀胱がん細胞株から RNeasy Mini kit (QIAGEN 社、Venlo、The Netherlands)を用い、推奨の条件に従って total RNA を抽出した。次に Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche 社, Basel, Switzerland)を用い、推奨の条件に従って逆転写を行った。PCR の酵素には KOD FX (東洋

紡績株式会社、大阪、日本)を使用し、プライマーの対はそれぞれ、4.1B の検出には 5'-GGAATTCATGCATTTCTTGAAAATGCC-3' 及び 5'-CTGCAGCAGACATAGAATCC-3' (PCR 産物は 551bp)、GAPDH の検出には 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'及び 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (PCR 産物は 452bp) を使用した。反応の条件は、変性を 98℃で 10 秒、アニーリングを 56℃で 20 秒、伸長反応を 68℃で 30 秒とし、これを 35 サイクル繰り返した。

ウェスタン・ブロッティング法

Lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5 / 150 mM NaCl / 1% Triton X-100 / 1 mM EDTA) にプロテアーゼ阻害剤 (200 µM AEBSF, 10µM leupeptin, 1 µM pepstatin A)と 0.01% βメルカプトエタノール (βME)を加え、これに細胞を溶解した後、氷上に 10 分間静置し、15,000rpm で 4℃にて 10 分間遠心し、上清を回収した。そして 4×SDS loading buffer (0.25 M Tris-HCl (pH 6.8) / 40% glycerol / 8% SDS / 20% βME / 0.2% BPB)と純水で濃度を調整し、100℃で 5 分間煮沸し、氷上で 10 分間静置した。SDS-PAGE ゲルは 7.5% acrylamide: bis Separating gel を用いた。SDS PAGE electrode buffer (25mM Tris / 0.2M Glycine / 0.1% SDS)にて、電気泳動を定電流 15 mA で約 15 分、続いて電流

20 mA で約 60 分間行なった。ブロッティングはセミドライ方式を用い、Transfer buffer (50 mM Tris, 40 mM Glycine, 20% methanol, 0.1% SDS)に浸した PVDF 膜へ定電流 100 mA で 60 分間ブロットした。次に 3% スキムミルク / PBS (ブロッッキング液)に浸して室温で 60 分間ブロッッキングした。一次抗体は下記の濃度で、3% スキムミルク / PBS で希釈し、4℃で約 12 時間反応させた。抗 4.1B 抗体は 1: 2000、抗 Actin 抗体は 1: 1000 とした。二次抗体は、それぞれの horseradish peroxidase (HRP) 標識抗 IgG 抗体を 3%スキムミルク /PBS で濃度 1: 2000 に希釈し、室温で 60 分反応させた。PBS で洗浄した後、Lumi-Light PLUS Western Blotting Substrate(Roche 社、Mannheim、Germany)を用いて検出を行った。

脱メチル化剤およびヒストン脱アセチル化阻害剤による 4.1B の発現回復

1×10^5 個の細胞株を 6 cm シャーレに撒いた。2、5 日目に、脱メチル化剤 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC; Sigma-Aldrich 社, St. Louis, MO, USA)を 10 μ M の濃度になるように培地に加え、24 時間反応させたあと、PBS で洗浄し、再び脱メチル化剤無しの培地に戻して培養を続け、8 日目に細胞を回収した。

上記脱メチル化処理で発現回復を認めなかった細胞株に対しては、以下の実

験を行った。 1×10^5 個の細胞株を 6 cm シャーレに撒いた。翌日より 5-aza-dC を $10 \mu\text{M}$ の濃度になるように培地に加え、24 時間後に培地と試薬を新鮮なものに交換した。計 48 時間の反応の後、PBS で洗浄し、Trichostatin A(Sigma-Aldrich 社)を $50 \mu\text{M}$ の濃度になるよう培地に加え、Trichostatin A 存在下に 24 時間培養した後に細胞を回収した。

MiR-223 による 4.1B 発現の低下

内因性に 4.1B を発現している UMUC-3 細胞株を用いた。12 well plate に撒いた UMUC-3 細胞に miR-223 (Thermo Fisher 社、Waltham, MA, USA) を、Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社)を用いてトランスフェクションした。コントロールには Non-targeting RNA (OriGene 社、Rockville, MD, USA)を用いた。48 時間後に細胞を回収し、タンパク質を抽出した。ウェスタン・ブロット法でタンパク質の発現を検出し、これを Image J(30)を用いて半定量した。

パイロシーケンス法による DNA メチル化の解析

ヒト原発性膀胱がんにおける 4.1B 遺伝子のメチル化をパイロシーケンス法により解析した。凍結膀胱がん組織から Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega 社, CA, USA)を用い、推奨の条件に従ってゲノム DNA を抽出した。

500ng のゲノム DNA を Methyl Code bisulfite conversion kit (Invitrogen 社, CA, USA)を用い、推奨の条件に従って重亜硫酸処理を行った。処理後のゲノム DNA を PyroMark PCR Kit (Qiagen 社)を用い、推奨の条件に従って PCR により増幅した。プライマーの対は 4.1B のプロモーター領域に設定し、5'-AGGAGGTTTGTAAAGGAGATTTATATTTTG-3' 及び ビオチン標識された 5'-Biotin-ACACCTCCAAATTACCACCTACAAC-3' (PCR 産物は 194bp)を用いた。ビオチン標識された PCR 産物を、ストレプトアビジンでコーティングしたセファロースビーズに固定した。DNA 鎖の一本鎖化、シーケンスプライマーのアニーリング、パイロシーケンスを PyroMark Q24 (Qiagen 社)を用いて推奨の条件で行った。シーケンスプライマーはフォワードプライマーと同じプライマーを使用した。メチル化率は各 CpG サイトにおいて、メチル化率 = シトシンのピークの高さ / (シトシンのピークの高さ + チミンのピークの高さ) と計算した。メチル化率が 20%以上を高度メチル化、5%以上 20%未満を中等度メチル化、5%未満を非メチル化と判定した。免疫組織化学的検討で 4.1B 陽性であった症例と陰性であった症例、それぞれ 5 例について検討した。

定量的 RT-PCR 法による miR-223 の発現解析

ヒト原発性膀胱がんにおける miR-223 の発現を定量的 RT-PCR 法によって解

析した。パラフィン包埋組織より RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation

(Ambion 社、TX, USA) を用い、推奨の条件に従って Total RNA を抽出した。

次に TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems 社,

CA, USA) を用い、推奨の条件に従って逆転写を行った。逆転写及び定量的

RT-PCR に使用するプライマーは TaqMan MicroRNA Assays (Applied

Biosystem 社)を用いた。定量的 RT-PCR は ABI7300 Real-Time PCR System

(Applied Biosystems 社)で行った。反応の条件は 50℃で 2 分、95℃で 10 分

ののち、変性を 95℃で 15 秒、アニーリングと伸長反応を 60℃で 1 分とし、こ

れを 40 回繰り返した。各実験は 3 ウェルずつ施行し、平均値を解析に用いた。

miRNA の発現量は内因性コントロールとして U6 small nuclear RNA (RNU6B)

を用いて標準化した。免疫組織化学的検討で 4.1B 陽性であった症例と陰性であ

った症例、それぞれ 10 例について検討した。

レトロウイルス発現ベクターの作製

4.1B アミノ酸全長の C 末端に HA タグを付加したベクターを作製するため、

終止コドンの直上に HA 配列 (5'-TACCCATACGATGTTCCAGATTACGCT-3')

を挿入し、PCR で増幅した。ベクターにはレトロウイルスの pMX-IRES-GFP

を用いた(31)。Bam-HI - Not I 間に挿入した。

膀胱がん細胞株 5637 および T24 の 4.1B 強制発現株樹立

内因性に 4.1B を発現していないヒト膀胱がん細胞株 5637 および T24 を用いた。発現ベクター pMX へ HA タグ付き 4.1B の cDNA を組み込み、pMX /4.1B を得た。10cm ディッシュに撒いた Plat A 細胞に pMX / 4.1B もしくは pMX 単独を、Lipofectamine LTX (Invitrogen 社)を用いてトランスフェクションした。48 時間後に培養上清を回収し、0.22 μ m フィルターを通し、各細胞株を撒いた 6cm ディッシュの培養液と置換した。48 時間後、10cm ディッシュに継代し、細胞が 80-90%コンフルエントまで増えた時点で、FACS Aria (BD 社, Franklin Lakes, NJ, USA) により Green Fluorescent Protein 陽性画分をソートした。

抗 4.1B 抗体を用いて免疫細胞化学的解析およびウェスタン・ブロット法で 4.1B の発現を確認した。

免疫細胞化学

滅菌したカバーガラス上で細胞を培養し、PBS で洗浄後に 4 %パラホルムアルデヒドを加えて 15 分静置して固定した。固定液を吸引除去し、0.1% Triton X-100 を加え 5 分静置した。次に非特異的反応を抑制するために 3% ウシ血清アルブミンを加えて 30 分静置した。一次抗体の抗 4.1B 抗体を 1 : 1000 で希釈して、室温で 1 時間反応させた。Alexa Fluor[®] 647 (abcam 社, Cambridge, UK)

を 1:1000 で希釈して、遮光のうえ室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄し、Prolong Gold Antifade Reagent with DAPI (Thermo Fisher 社)を加えてからマリノールで封入した。

in vitro の膀胱がん細胞増殖実験

5637 及び T24 それぞれにおいて、4.1B 強制発現株、ベクター単独導入株を 1×10^4 個ずつ撒き、10%FBS 添加 RPMI 培地で培養した。2 日目から 5 日目まで各日細胞数を直接計測した。細胞数の計測はそれぞれ独立に 3 回ずつ行なった。

細胞遊走試験 (Migration assay)

径 8 μm の小孔 (ポア)をもつトランスウェルを使用して細胞遊走試験 (Migration assay)を施行した。5637 及び T24 それぞれの 4.1B 強制発現株、ベクター単独導入株を、 1×10^4 個ずつトランスウェルへ撒いた。トランスウェルの内側には、無血清 RPMI 培地を 500 μl 、外側には 10% FBS 添加 RPMI 培地を 750 μl 入れて培養した。各細胞株の遊走能を考慮し、T24 は 10 時間後、5637 細胞は 35 時間後にトランスウェルの内側に張り付いた細胞を綿棒で剥離し、小孔 (ポア)を通り抜けてトランスウェルの外側に出た細胞を 4% パラホルムアル

デヒドで固定し、エオジンで染色した。顕微鏡下にその細胞数を直接計測した。

実験はそれぞれ独立に 3 回以上行なった。

軟寒天コロニー形成試験 (Soft agar colony formation assay)

42°Cに保温した 0.5%寒天-RPMI 培養液を 60mm プラスチックシャーレに広げ、放冷、固化させた。次に、45°Cに保温した 0.33% 寒天-RPMI 培養液に 1×10^4 個の細胞を加え、0.5% 寒天 - RPMI 培地に一様に広げた。固化を待ち、その上に乾燥予防のため RPMI 培養液を加え、37°C, CO₂ インキュベーター (95% air、5% CO₂) に入れ約 2 週間培養した。顕微鏡下にコロニーを計数した。実験はそれぞれ独立に 3 回以上行なった。

膀胱がん細胞株のヌードマウス皮下での *in vivo* 腫瘍形成実験

4.1B 強制発現およびベクター単独導入の 5637 細胞を使用した。 1×10^7 個 / 200 μ l の濃度で PBS にて希釈し、細胞懸濁液を作った。ヌードマウス (BALB/c nu/nu) は 6 週齢から 8 週齢のメスを使用し、27 ゲージの注射針を用いて、背部へ左右 1 ヶ所ずつ、もしくは右 1 ヶ所のみに皮下注射により細胞を移植した。

4.1B 強制発現株に対してマウス 9 匹、計 12 ヶ所、ベクター単独導入株に対してマウス 9 匹、計 12 ヶ所移植した。腫瘍の大きさは 3 日毎に測定し、腫瘍容積

は、(容積) = $1/2 \times (\text{長径}) \times (\text{短径})^2$ の演算で算出した。33 日に予定解剖を行い腫瘍の固定を行った。腫瘍はヒト膀胱がん標本と同様の方法で、4.1B の免疫組織化学により 4.1B の発現の有無を確認した。

統計学的解析

ヒト原発性膀胱がんにおける 4.1B の発現の異常と、それぞれの臨床病理学的特徴との相関の解析には χ^2 検定を用いた。ヒト原発性膀胱がんにおける miR-223 の発現の解析には Mann-Whitney の U 検定を用いた。4.1B による *in vitro* の細胞増殖抑制効果、遊走能抑制効果、ソフトアガー培地でコロニー形成能抑制効果の検討、及びヌードマウス皮下腫瘍抑制効果の検討には Unpaired Student's t 検定を用いた。統計解析ソフトは、StatView-J 5.0 (SAS Institute 社, Cary, NC, USA) を使用し、P 値が 0.05 未満であるとき有意差ありと判定した。

結果

ヒト正常膀胱、及びヒト膀胱がん細胞株における 4.1B の発現

4.1B がヒト正常膀胱で発現しているか、及び発現欠如が膀胱がん細胞株において認められるかどうか検証するため、手術で採取されたヒト正常膀胱検体及び 15 種のヒト膀胱がん細胞株におけるこれらの mRNA、タンパク質の発現を検討した。RT-PCR 法、及びウェスタン・ブロット法で解析した。まず RT-PCR 法による解析の結果、15 種の細胞株のうち、UMUC3、KK47、SW800、SW1710 を除く 11 種（73%）の細胞株で発現の欠如が認められた（図 2A）。また正常膀胱での発現が確認された。次にウェスタン・ブロット解析を行った結果、15 種の細胞株のうち、UMUC3、KK47、SW1710 を除く 12 種（80%）の細胞株で発現の欠如が認められた（図 2B）。また正常膀胱では発現を認めた。

正常膀胱では mRNA、タンパク質ともに発現を認めた。4.1B mRNA の発現が欠如した 11 種の細胞株では全てそれぞれのタンパク質の発現も欠如しており、逆にタンパク質の発現が欠如していた細胞株は 12 種中 11 種（92%）と高率に mRNA の発現の欠如を伴った。以上の検討から、4.1B の mRNA の発現とタンパク質の発現との間には相関が認められ（ $P=0.005$ ）、4.1B の発現は主に転写段階で制御されていることが示唆された。

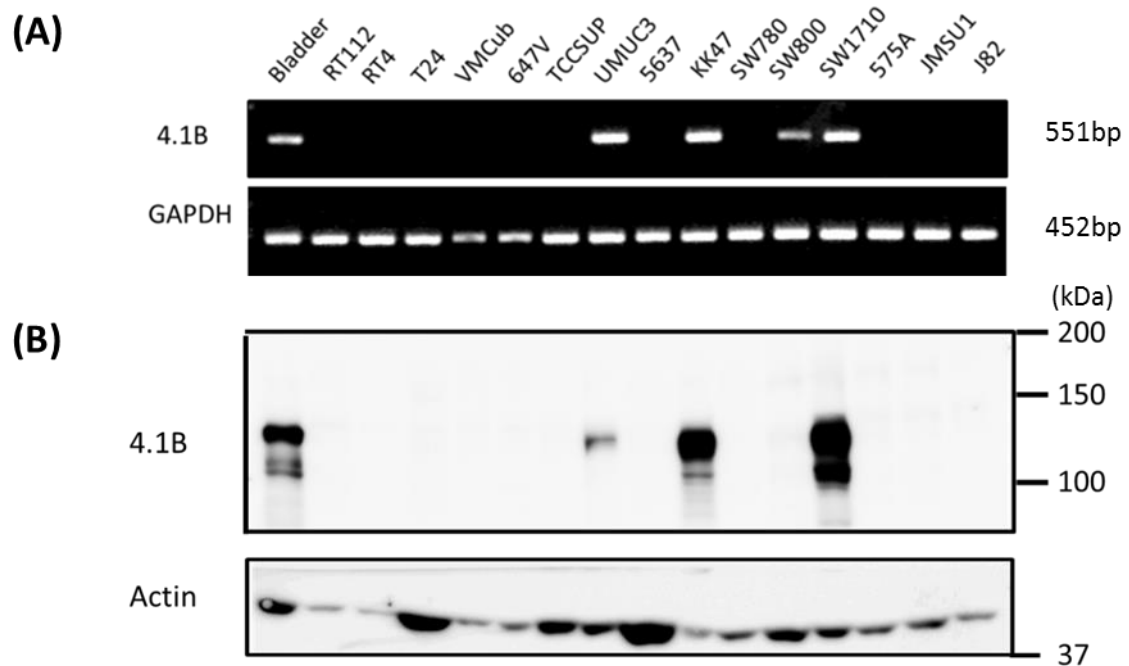


図 2：ヒト膀胱がん細胞株における 4.1B の発現の欠如

(A) ヒト正常膀胱上皮、および 15 種の膀胱がん細胞株における 4.1B mRNA の発現を RT-PCR 法により解析した。対照として GAPDH を用いた。15 種の細胞株のうち、UMUC3、KK47、SW800、SW1710 を除く 11 種 (73%) の細胞株において mRNA の発現欠如を認めた。

(B) ヒト正常膀胱上皮、および 15 種の膀胱がん細胞株における 4.1B タンパク質の発現をウェスタン・ブロット法により解析した。対照として Actin を用いた。15 種の培養細胞のうち、UMUC3、KK47、SW1710 を除く 12 種 (80%) の培養細胞においてタンパク質の発現の欠如を認めた。

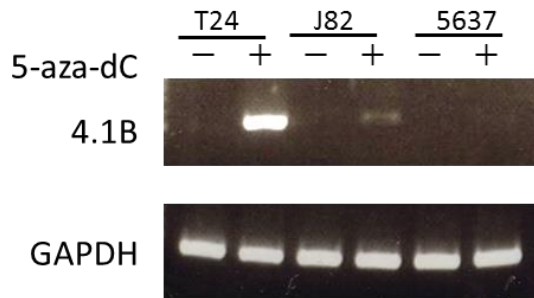
脱メチル化およびヒストン脱アセチル化阻害による 4.1B 発現の回復

先行研究より、様々ながんにおける 4.1B の発現欠如の主要な原因として、遺伝子プロモーター領域のメチル化が報告されている。ヒト膀胱がん細胞株における 4.1B の発現は主に転写段階で制御されていることが示唆されたことから、膀胱がんにおいてもプロモーター領域のメチル化が 4.1B の不活化の主たる原因となっている可能性が考えられた。そこで 5-aza-dC を用いた脱メチル化処理により、4.1B mRNA の発現が回復するか検討した。

RT-PCR 法で mRNA の発現を認めなかった 11 種の細胞株を対象とし、5-aza-dC 処理後に RT-PCR 法で解析した。11 種中 T24、J82 の 2 種 (18%) のみで mRNA の発現回復を認めた (図 3A)。

次に、脱メチル化処理によって mRNA の発現が回復しなかった 9 種の細胞株の発現欠如の原因を調べるため、5-aza-dC 処理に加えて Trichostatin A (TSA) による処理を追加し、ヒストン脱アセチル化の 4.1B 発現欠如への影響を検討した。RT-PCR 法による解析により、9 株中 5 株 (56%) で mRNA の発現回復を認めた (図 3B)。これらの結果から、膀胱がん細胞株における 4.1B の発現欠如には、遺伝子のメチル化、およびヒストン脱アセチル化が主な原因のひとつであることが示唆された。

A



B

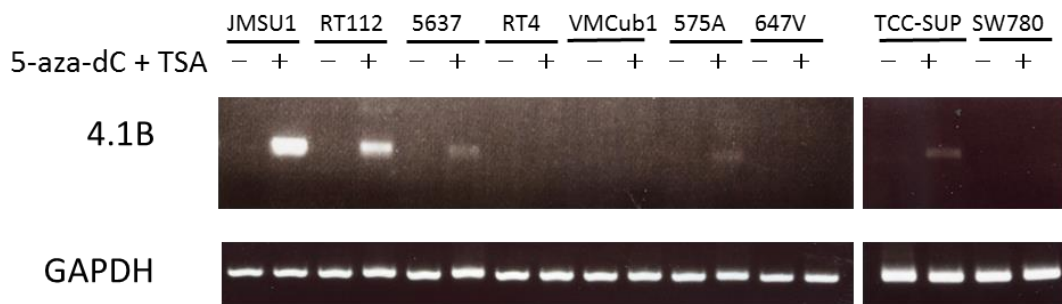


図 3：膀胱がん細胞株における脱メチル化、ヒストン脱アセチル化阻害による 4.1B の発現回復（RT-PCR 法）

(A) 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) 処理した膀胱がん細胞株における 4.1B の発現回復。4.1B の発現が欠如している膀胱がん細胞株 11 株に 5-aza-dC 処理したところ、2 株で mRNA の発現回復を認めた。発現を回復した 2 株 (T24、J82) と回復しなかった 1 株 (5637) を示す。

(B) 5-aza-dC 及び Trichostatin A (TSA) 処理した膀胱がん細胞株における 4.1B の発現回復。(A) で発現回復を認めなかった 9 株に 5-aza-dC 及び TSA 処理したところ、5 株 (JMSU1、RT112、5637、575A、TCC-SUP) で mRNA の発現回復を認めた。

MiR-223 による 4.1B 発現の低下

これまで非小細胞肺癌、胃がんにおいて、マイクロ RNAs (miRNAs)のひとつである miR-223 の発現上昇により 4.1B の発現が低下することが指摘されている(32,33)。膀胱がん細胞株でも miR-223 により 4.1B の発現が影響されるか検証した。内因性に 4.1B を発現する UMUC-3 に miR-223 をトランスフェクションしたところ、コントロールに比べて有意に 4.1B 発現の低下を認めた ($P=0.027$) (図 4)。これにより、膀胱がんにおける 4.1B 発現欠如の原因として miR-223 が関与している可能性が示された。

ヒト原発性膀胱がん組織標本における 4.1B 発現の異常、及び臨床病理学的特徴との相関

4.1B 発現の異常がヒト原発性膀胱がんにおいて認められるかどうか検証するため、免疫組織化学にてヒト原発性膀胱がん組織標本におけるタンパク質の発現を解析した。まず抗 4.1B 抗体を用いてヒト膀胱非がん部組織で 4.1B の発現を解析したところ、尿路上皮の細胞膜に 4.1B の発現を認めた (図 5A)。また、正常尿管組織においても尿路上皮の細胞膜に 4.1B の発現を認めた (図 5B)。これに対して、115 例のヒト原発性膀胱がん組織において 4.1B の発現を解析したところ、21 例 (18%) では正常膀胱尿路上皮と同様に細胞膜での 4.1B の発現

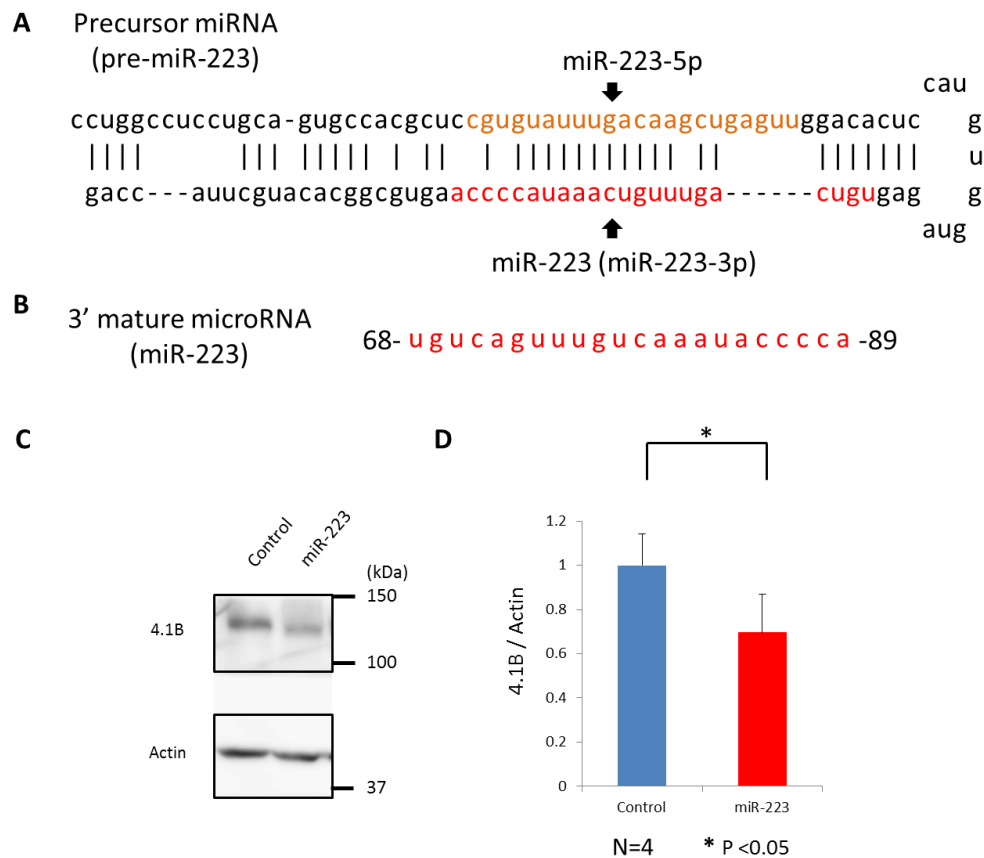


図 4 : miR-223 による 4.1B 発現の低下

内因性に 4.1B を発現する UMUC-3 細胞株に miR-223 をトランスフェクションした。Control に比して、miR-223 トランスフェクション細胞株で有意に 4.1B の発現低下を認めた。(A) pre-miR-223 の分子構造、橙色部分が 5p 配列部分、赤色部分が 3p 配列部分。(B) pre-miR-223 から切り出された miR-223 の分子構造。(C) ウェスタン・ブロット法。(D) Image J による半定量。miR-223 トランスフェクションにより 4.1B の発現は有意に低下した。

が認められたが (図 5C)、94 例 (82%) では細胞膜での発現が欠如していた (図 5D)。

4.1B の発現異常と臨床病理学的特徴との相関を解析した (表 3)。4.1B の発現異常と年齢、性別との間にはどちらも有意な差は認められず、4.1B の発現異常の頻度と患者の年齢あるいは性別との間に相関はないことが示された。次に膀胱がんの深達度 (pT ステージ) との相関を解析した。がんの浸潤が膀胱筋層に及ぶ pT2 以上の浸潤性膀胱がんは転移を生じる頻度が高く、pTa、pT1 の筋層非浸潤膀胱がんに比べて予後不良である。pT2-4 の浸潤性膀胱がんの群では、pTa,pT1 の筋層非浸潤膀胱がんの群に比し、4.1B 発現欠如が有意に高頻度であった (P=0.02)。また、筋層非浸潤膀胱がんの pTis 腫瘍は上皮内がん (Carcinoma in situ) と呼ばれ、pTa 腫瘍と異なり非乳頭状の形態を呈し、浸潤性膀胱がんへ進行する危険が高い腫瘍である (34,35)。pTis の群では 7 例中 7 例とも発現の欠如を認めた。

リンパ節転移の有無、遠隔転移の有無、核の異型度 (Grade)、リンパ管浸潤の有無、血管浸潤の有無との相関も検討したが、これらと 4.1B 発現欠如との間に有意な相関は認めなかった。

以上の結果から、4.1B 発現の欠如は早期病変 (pTa,pT1) から高率に認められ、病期が進行するに従ってさらに高頻度となり、膀胱がんの発生・進展に關与す

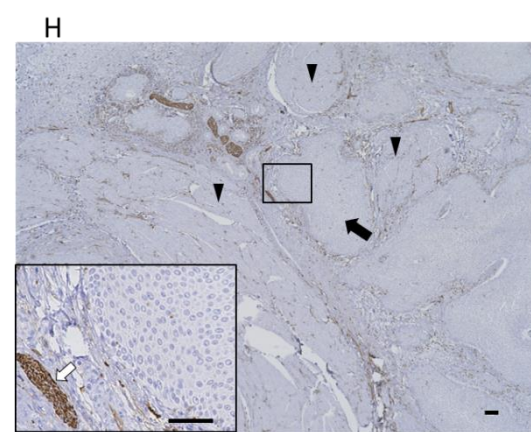
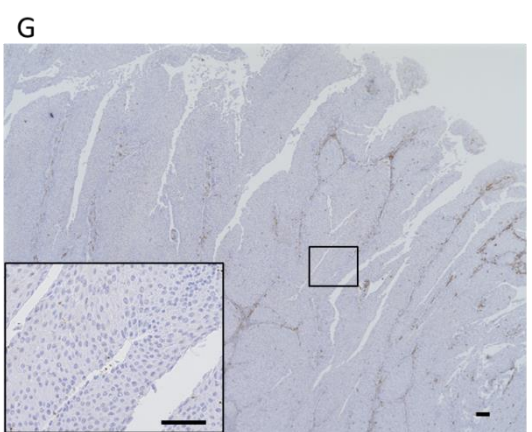
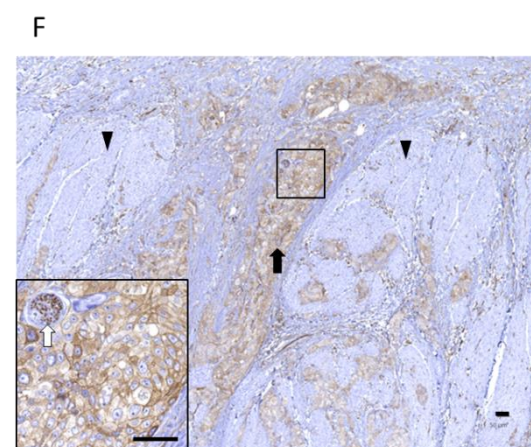
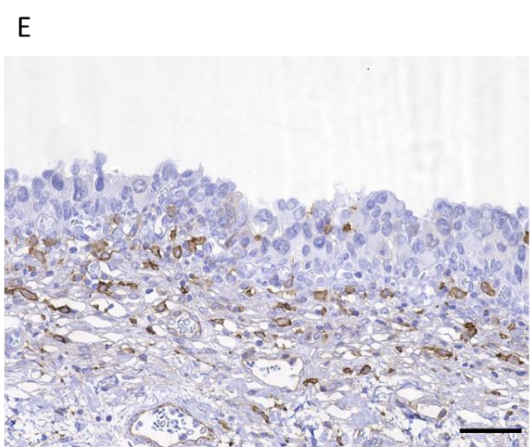
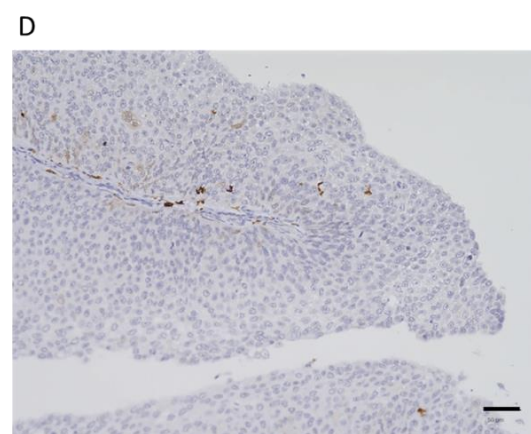
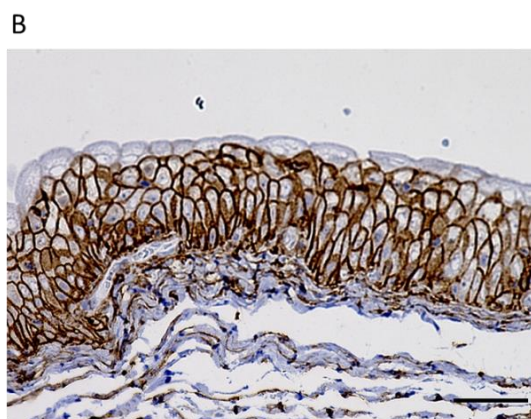
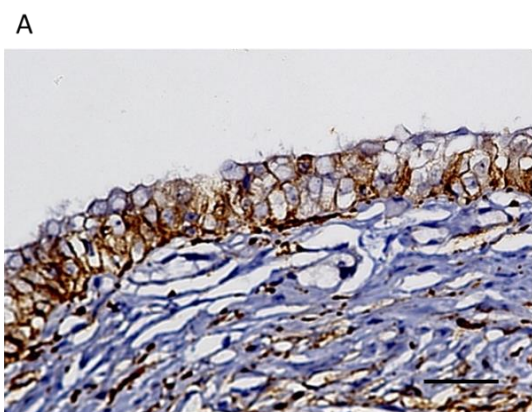


図 5：ヒト正常尿路上皮、および原発性膀胱尿路上皮がんにおける 4.1B の発現
抗 4.1B 抗体を用いた 4.1B タンパク質の免疫組織化学的解析。スケールバー：50 μ m。
(A, B) 非がん部膀胱(A)および正常尿管(B)。尿路上皮がんの発生母地となる尿路上皮の細胞膜に 4.1B の発現を認める。(C, D) 筋層非浸潤性尿路上皮がん。4.1B 陽性例(C)と 4.1B 陰性例(D)。(E) 上皮内がん。7 例全例で 4.1B の発現が欠如していた。陽性に染まる細胞はマクロファージ。(F) 4.1B 陽性の筋層浸潤性尿路上皮がん。大小の胞巣を形成して筋層に浸潤する尿路上皮がんを認める (矢印ががん、矢頭が筋層)。がん細胞の細胞膜に 4.1B 陽性像を認める。がん胞巣内に巻き込まれている 4.1B 陽性の束状の線維 (白矢印) は末梢神経である。(G, H) 4.1B 陰性の筋層浸潤性尿路上皮がん。同一症例の表層部分 (G) と筋層部分 (H)。(G) では乳頭状に増殖する尿路上皮がんを認める。(H) では不整形胞巣を形成して膀胱筋層に浸潤する尿路上皮がん (矢印ががん、矢頭が筋層) を認める。がん胞巣近傍にみられる束状の陽性構造 (白矢印) は末梢神経。

表 3：115 例のヒト原発性膀胱尿路上皮がんの臨床病理学的特徴と 4.1B の発現との関係

	計(N =115)	4.1B	
		陽性 (N=21)	陰性 (N=94)
年齢			
中央値(範囲)	67 (51-93)	70 (54-91)	67 (51-93)
性別 (%)			
男性	88	14 (15.9)	74 (84.1)
女性	27	7 (25.9)	20 (74.1)
pT 分類(%)			
pTa	35	11 (31.4)	24 (68.6)
pT1	28	7 (25.0)	21 (75.0)
pT2	12	0 (0)	12 (100)
pT3	23	2 (8.7)	21 (91.3)
pT4	10	1 (10)	9 (90)
pTis	7	0 (0)	7 (100)
N 分類 (%)			
N0	93	19 (20.4)	74 (79.6)
N1	7	1 (14.3)	6 (85.7)
N2	11	1 (9.1)	10 (90.9)
N3	3	0 (0)	3 (100)
M 分類 (%)			
M0	110	21 (19.1)	89 (80.9)
M1	5	0 (0)	5 (100)
Grade 分類 (%)			
G1	3	1 (33.3)	2 (66.7)
G2	36	7 (19.4)	29 (80.6)
G3	76	13 (17.1)	63 (82.9)
リンパ管浸潤			
ly (－)	81	17 (21.0)	64 (79.0)
ly (+)	34	4 (11.8)	30 (88.2)
血管浸潤			
v (－)	84	17 (20.2)	67 (79.8)
v (+)	31	4 (12.9)	27 (87.1)

*P <0.05

る可能性が示唆された。

ヒト原発性膀胱がんにおける **4.1B** のメチル化

ヒト膀胱がん細胞株における **4.1B** 発現欠如の原因として、エピジェネティックな制御が示唆された。そこで、ヒト膀胱がんにおいても遺伝子のメチル化が **4.1B** の発現欠如の原因となっているか、パイロシーケンス法により解析した。Takahashi らの報告に従い、エクソン 1 の上流 -158bp から -117bp の領域に存在する 7 カ所の CpG サイト (-158 、 -154 、 -152 、 -150 、 -139 、 -128 、 -118) を解析の対象とした。解析の結果、免疫組織化学的解析で **4.1B** 陰性であった 5 例の膀胱がん症例のうち、3 例で中等度のメチル化が認められた (図 6)。これに対して **4.1B** 陽性であった 5 例の膀胱がん症例においては、1 例で中等度のメチル化が認められたのみで、残り 4 例ではメチル化が認められなかった。この結果から、**4.1B** のメチル化はヒト原発性膀胱がんにおける **4.1B** の発現欠如の原因のひとつである可能性が示唆された。

ヒト原発性膀胱がんにおける **miR-223** の発現

ヒト膀胱がんにおける **miR-223** の発現を定量的 RT-PCR 法で解析した。**4.1B** 陽性群、**4.1B** 陰性群との間に有意な差は認めなかったが ($P=0.082$)、**4.1B** 陰

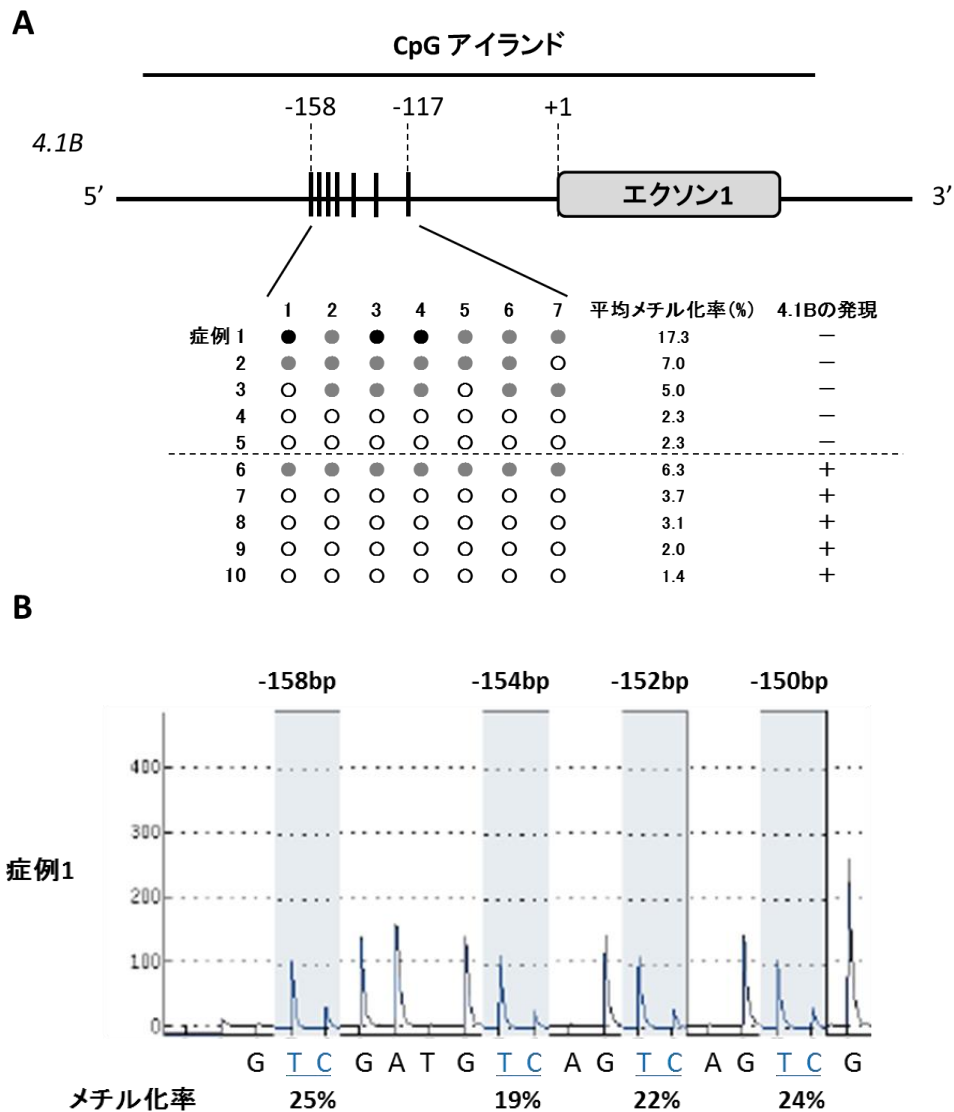


図 6. ヒト膀胱がんにおける *4.1B* のメチル化

(A) *4.1B* のメチル化を解析した 7 カ所の CpG サイトを含むゲノム領域の模式図と、ヒト膀胱がんにおける各 CpG サイトのパイロシーケンス解析の結果。縦線はエクソン 1 からそれぞれ 158bp、154bp、152bp、150bp、139bp、128bp、117bp 上流の CpG サイトを表す。
 ● 高度メチル化 (メチル化率 >20%)、● 中等度メチル化 (メチル化率 5-20%)、○ 非メチル化 (メチル化率 <5%)。7 カ所のメチル化率の平均値、並びに免疫組織化学における *4.1B* の発現解析結果を示す。

(B) パイロシーケンス解析の 1 例。それぞれの CpG サイトごとに、メチル化率 = シトシン (C) のピーク高 / {シトシン (C) のピーク高 + チミン (T) のピーク高} を算出し、メチル化を定量的に解析した。

性群では、miR-223 の発現が高値を示す 3 症例を認めた (図 7)。このことから 4.1B 発現欠如の原因のひとつとして miR-223 の上昇が関与している可能性が示唆された。

4.1B 強制発現細胞株の樹立

これまでの結果から 4.1B の欠如が膀胱がんの発生・進展に関与する可能性が示唆されたため、細胞株を用いて膀胱がんにおける 4.1B の機能の解析を行った。

4.1B の発現が欠如している膀胱がん細胞株である T24 細胞、5637 細胞に、それぞれ 4.1B もしくはベクター単独を導入し、4.1B 強制発現株を樹立した。これら外因性に 4.1B を発現させた T24 細胞、5637 細胞の細胞形態の解析を行ったところ、ベクター単独導入細胞と比し、細胞サイズや形態に明らかな変化は認めなかった (図 8A)。また継代間隔など培養条件にも変化は無かった。また免疫細胞化学的検討により、4.1B 強制発現株の細胞膜に 4.1B の発現を認めた (図 8B)。ウェスタン・ブロット法により、4.1B 強制発現株でタンパク質の発現を確認した (図 8C)。

4.1B は *in vitro* において膀胱がん細胞の増殖に関与しない

先行研究において 4.1B は細胞増殖を抑制することが報告されている。細胞増

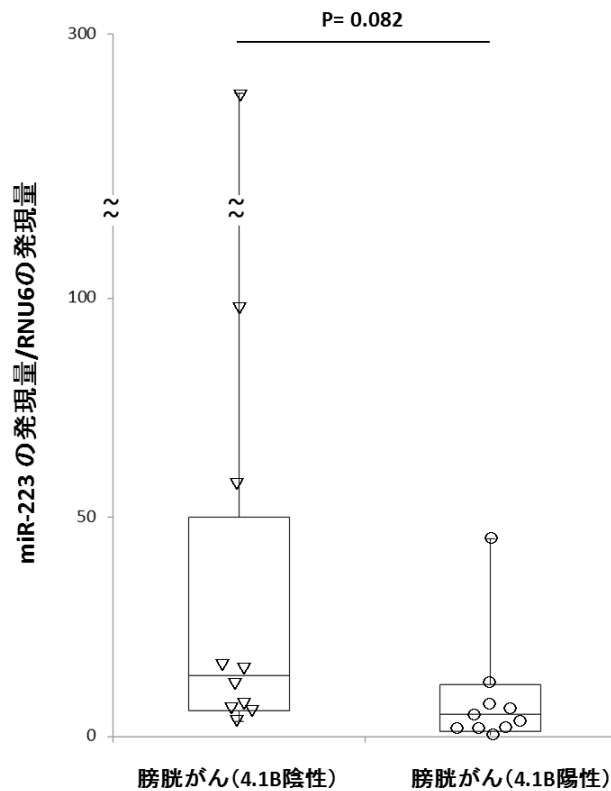


図 7. ヒト原発性膀胱がんにおける miR-223 の発現解析

免疫組織化学的検討により 4.1B 陽性もしくは 4.1B 陰性と診断された症例、各 10 例を対象とした。ボックスは四分位値、ボックス内の横線は中央値、エラーバーは最大値、最小値を示す。▽および○は各症例の値を示す。

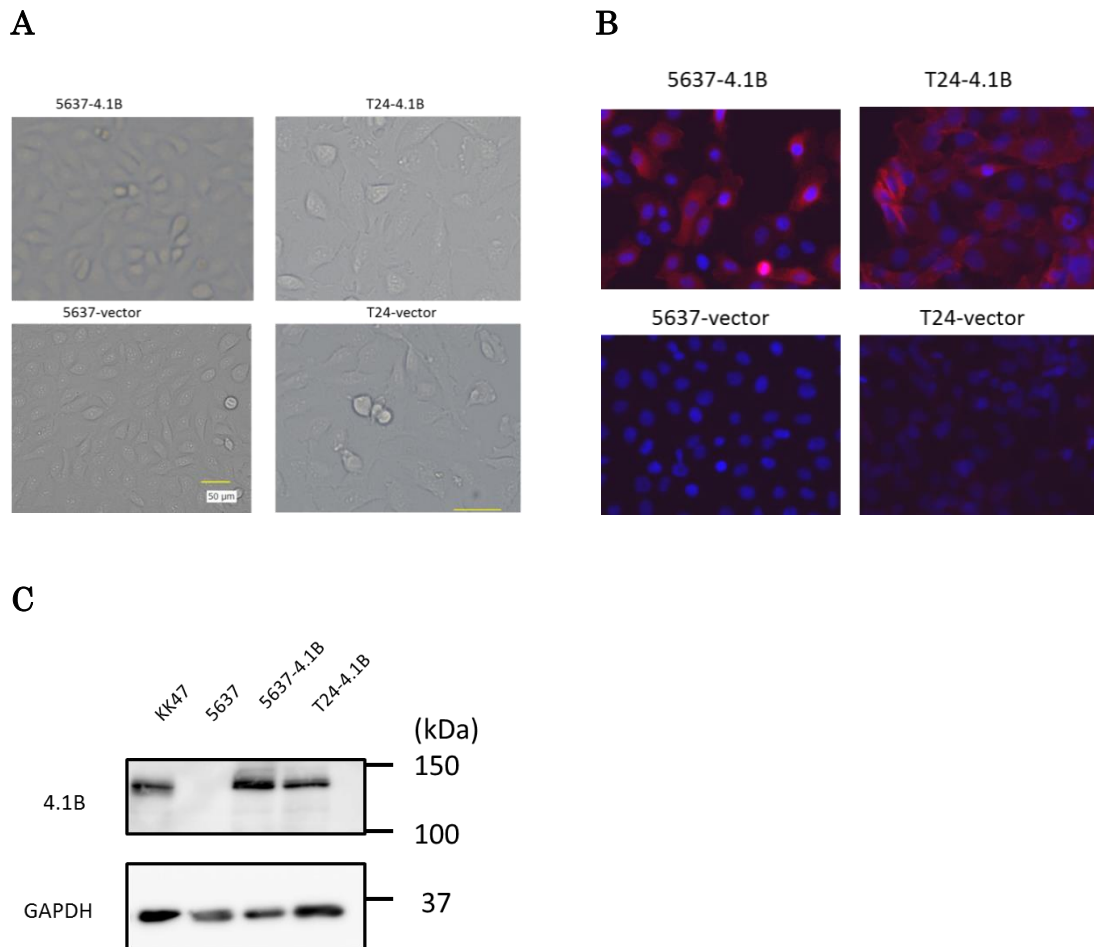


図 8：4.1B を強制発現させた膀胱がん細胞株 T24 および 5637

4.1B の発現欠如が認められる膀胱がん細胞株 T24 および 5637 に 4.1B を強制発現させた恒常的発現株の発現確認と細胞形態的变化

(A) 5637 細胞の細胞形態。ベクター単独導入株と 4.1B 導入株との間に形態的变化を認めない。

(B) T24 細胞、5637 細胞の免疫細胞化学的検討。T24 および 5637 細胞へベクター単独を導入した細胞株と 4.1B を導入した細胞株の 4.1B に対する免疫細胞化学的検討。4.1B を導入した細胞株でのみ細胞膜への染色を認めた。

(C) ウェスタン・ブロット法による 4.1B の発現確認。4.1B を導入した細胞株における 4.1B タンパク質の発現をウェスタン・ブロット法で確認した。内因性に 4.1B を発現する細胞株である KK47 を陽性コントロールとして用いた。4.1B 導入した細胞株で KK47 細胞と同等のサイズのバンドを認めた。

殖抑制能が膀胱がんにおいても認められるか検討するため、これらの細胞を用いて、*in vitro*における 4.1B の細胞増殖抑制効果を検討した。T24 細胞株、5637 細胞株へ 4.1B を導入した強制発現株、およびベクター単独導入株を 1×10^4 個ずつ撒き、5 日目まで細胞数を直接計測した。その結果、T24 細胞株、5637 細胞株ともに 4.1B 強制発現細胞とベクター単独導入細胞との間に細胞の増殖速度に有意な差を認めなかった(図 9)。この結果から、4.1B は膀胱がんにおいて *in vitro* の細胞増殖に関与していない可能性が示唆された。

4.1B は膀胱がん細胞の遊走能を低下させる

次に 4.1B の細胞遊走に対する抑制効果を検討するため、細胞遊走試験 (Transwell migration assay) を行った。直径 $8\mu\text{m}$ の無数の小孔をもつトランスウェルに 1×10^4 個の細胞を撒き、トランスウェルの外側に血清を添加した培地を加え、小孔を通り抜けて下面に出た細胞数を計測した。この結果、T24 細胞と 5637 細胞との間に遊走能の大きな差を認めた。しかしながらいずれの細胞株においても、4.1B 強制発現細胞ではベクター単独導入細胞に比し、トランスウェルを通過する細胞の数が有意に減少した (T24 細胞, $P=0.004$; 5637 細胞, $P=0.02$, 図 10)。以上より、4.1B の発現は膀胱がん細胞の遊走能を抑制することが示された。

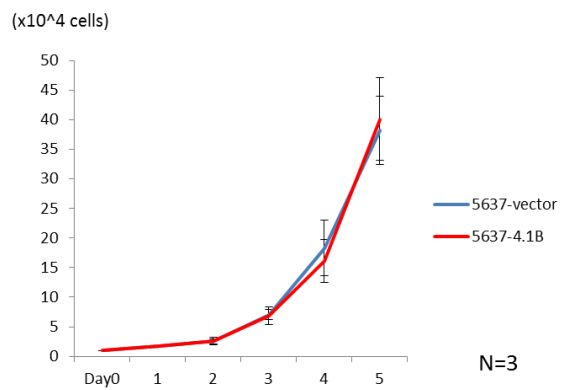
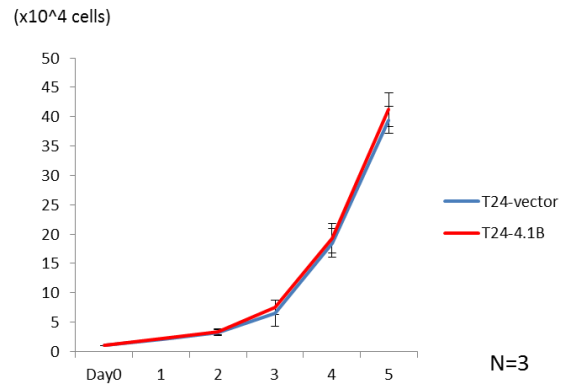
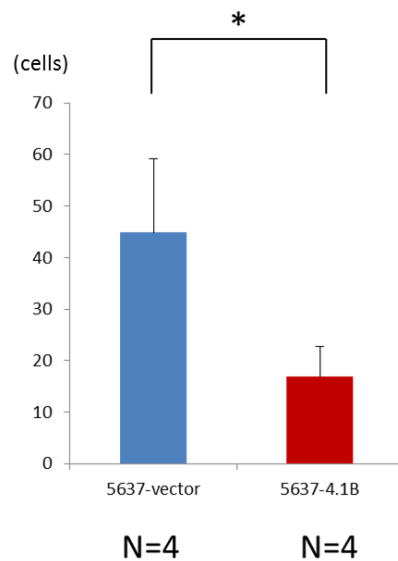
A**B**

図 9 : 4.1B による細胞増殖への影響

5637 細胞 (A) および T24 細胞 (B) の細胞増殖曲線。ベクター単独導入細胞株と 4.1B 強制発現細胞株で、細胞の増殖を評価した。Day0 に 1×10^4 の細胞を撒き、Day2、Day3、Day4 に細胞数をカウントした。各細胞株を独立に 3 回ずつ施行した。いずれの時点でもベクター単独導入細胞と比べて 4.1B 強制発現細胞の細胞数は有意な差を認めなかった。

A

* P<0.05, ** P<0.01

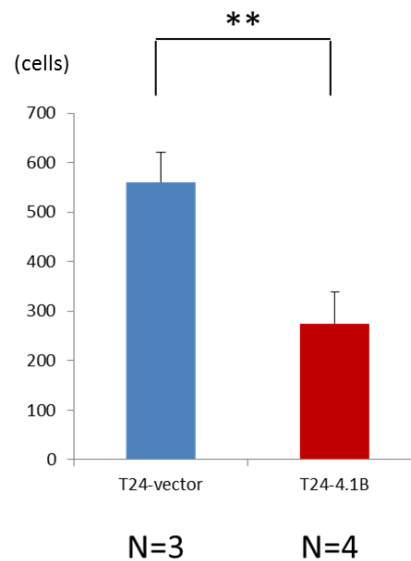
B

図 10 : 4.1B による細胞遊走能への影響

Transwell migration assay で遊走能への影響を評価した。1 x 10⁴個の細胞をウェルの内側に撒き、5637 細胞は 35 時間後 (A)、T24 細胞は 10 時間後 (B) にトランスウェル下面に通り抜けて出た細胞を観察し計測した。トランスウェル内側は無血清培地、外側は血清添加培地であり、トランスウェルには径 8μm のポアが無数にある。5637 細胞、T24 細胞ともに 4.1B 強制発現株で有意な遊走細胞数の減少を認めた。

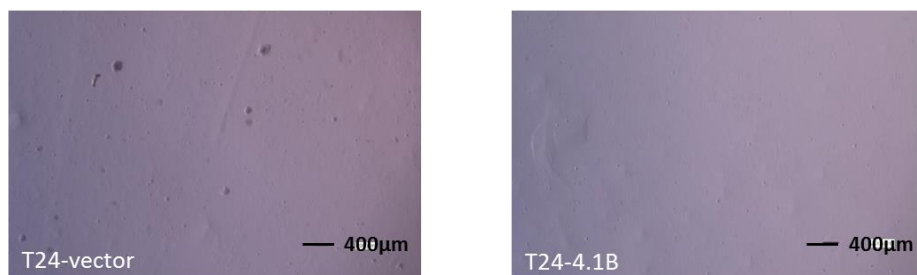
4.1B は T24 細胞の足場非依存的な増殖を抑制する

4.1B の足場非依存的な増殖を検討するため、Soft-agar colony formation assay を行った。 1×10^4 個の細胞を撒き、2 週間後にコロニーを形成した細胞の数を直接計測した。T24 細胞、5637 細胞の両方で施行したが、5637 細胞は 4.1B 強制発現細胞、ベクター単独導入細胞ともにコロニーを形成しなかった。T24 細胞において、4.1B 強制発現細胞はベクター単独導入細胞に比し、有意にコロニー数の減少を認めた ($P < 0.0001$ 、図 11)。これにより、4.1B の発現は足場非依存的に増殖する、悪性形質転換を抑制することが示された。

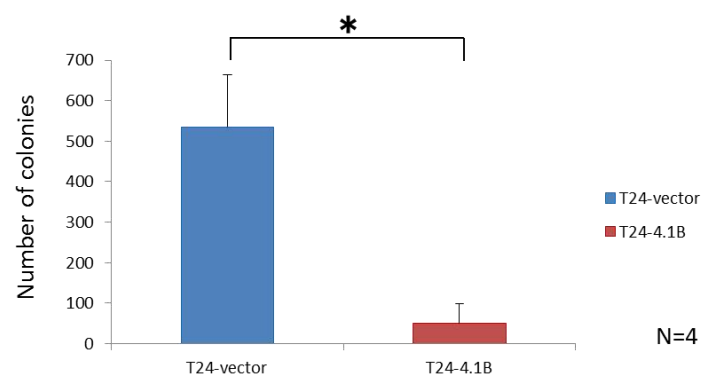
ヌードマウス皮下における *in vivo* での 5637 細胞の増殖を 4.1B は抑制する

In vitro の検討において、4.1B は足場非依存的な細胞の増殖を抑制することが示唆された。*In vivo* における細胞の増殖に対する抑制能を検討するため、ヌードマウスへの腫瘍皮下移植モデルを用いた。4.1B 強制発現細胞とベクター単独導入細胞を皮下移植した。T24 細胞、5637 細胞の両方で施行したが、T24 細胞は 4.1B 強制発現細胞、ベクター単独導入細胞ともに腫瘍を形成しなかったため、5637 細胞のみで検討した。ベクター単独導入細胞群では、日数が経過するに従い皮下腫瘍は著明に増大した。これに比し、4.1B 強制発現細胞群では皮下腫瘍の増大は有意に抑制された (図 12)。

A



B

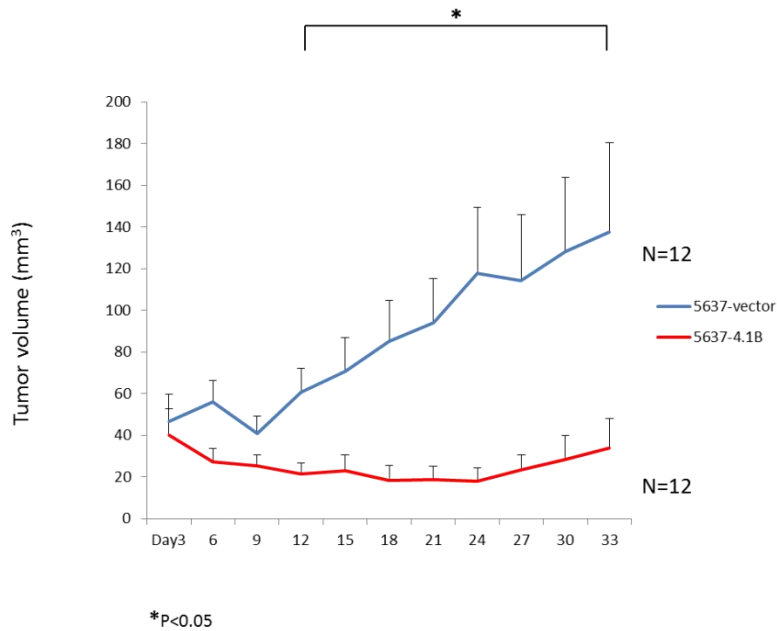


* P<0.0001

図 11 : 4.1B による足場非依存的増殖能への影響

Soft agar colony formation assay で足場非依存的増殖能への影響を評価した。1 x 10⁴ 個の細胞を撒き、2 週間後にコロニー数を計測した。(A) 拡大鏡下での観察所見。(B) 4.1B 強制発現株で有意にコロニー数の減少を認めた。

A



B

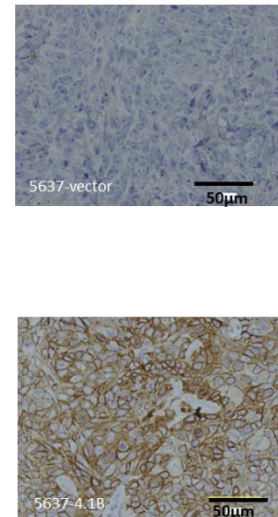


図 12 : 4.1B によるヌードマウス皮下移植膀胱がん細胞株の in vivo 増殖抑制効果

(A) ヌードマウス皮下腫瘍の容積増加曲線。4.1B 強制発現 5637 細胞と、ベクター単独導入 5637 細胞を 6-8 週齢メスのヌードマウスに各々 1×10^7 個皮下移植した。腫瘍容積は 3 日毎に測定した。33 日後の腫瘍容積は 4.1B 発現細胞投与群が有意に小さかった ($P=0.038$)。 (B) 皮下腫瘍の免疫組織化学的所見。33 日に予定解剖を行い、4.1B の免疫組織学的検討を行った。4.1B 強制発現株の移植腫瘍において、細胞膜に 4.1B の発現を認めた。

以上の結果より、4.1B は膀胱がん細胞の培養プレート上での細胞形態や増殖速度に著明な変化をもたらさないが、遊走能を抑制し、また足場非依存的な細胞増殖を抑制することが示された (*in vitro*)。さらに *in vivo* においてヌードマウスの皮下移植腫瘍の増殖をも抑制することが示され、4.1B の分子機能の破綻は膀胱がんの進展に関与することが示唆された。

考察

今回の免疫組織化学的解析によって、4.1B は、膀胱がんの発生母地である尿路上皮で発現しているが、膀胱がんにおいては高率に発現が欠如していることが明らかとなった。これは、4.1B が膀胱がんの発生・進行に関わっている可能性を示している。

初めに、ヒト正常尿路上皮における 4.1B の細胞膜直下での発現の局在を示した。膀胱、尿管ともに発現を認め、部位によらず尿路上皮に発現していることが示された。これに対して筋層非浸潤がんである pTa 症例のうち 3 分の 2 以上の症例で 4.1B の発現欠如が認められたことは、4.1B の発現欠如が腫瘍発生の初期段階に関与していることを示唆している。また、pT2 以上の筋層浸潤がん症例と、それ以下の非筋層浸潤がん症例との間にも有意な発現の差を認めた。

これは 4.1B 発現を欠如している腫瘍がより浸潤性の高い腫瘍であり、4.1B ががん抑制的に作用している可能性を示している。また、筋層非浸潤がんでも悪性度が高く浸潤性膀胱がんへ進行しやすい pTis では、7 例全例で 4.1B の発現欠如を認めたことから、4.1B は上皮内がんを生じる機構にも関与する可能性があると考えられる。

これまで様々ながん腫で 4.1B の発現欠如が報告されているが、その欠如の割

合はがん腫により異なっている。例えば肺扁平上皮がんでは、ステージ I の 90% で *4.1B* 遺伝子プロモーター領域のメチル化をきたしているものの、ステージの進行とは相関がみられない。一方、肺腺がんではステージの進行に従ってメチル化率が上昇しており、がんの発生よりは進行に関与している可能性が示唆されている(4)。髄膜腫では *4.1B* のヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity; LOH) が 71%に認められ、悪性度 (グレード分類) との相関を認めず、発現欠如が髄膜腫の腫瘍発生の早期に起こっているとされる(23)。腎淡明細胞がんでもプロモーター領域のメチル化を pT1a ステージの 47%で認める一方、ステージの進行との相関は認めていない(2)。また、卵巣がんでは良性腫瘍の 24%、浸潤性卵巣がんの 66%で *4.1B* の発現欠如を認め、がんの進展に関与していると考えられる(25)。このように、がん腫によって発生の初期段階、後期段階のいずれにも関与することが報告されており、前述のように、膀胱尿路上皮がんでは *4.1B* が初期段階から関与している可能性が高いと考えられた。

今回、膀胱がん細胞株に脱メチル化剤の *5-aza-dC* 処理をしたところ、内因性の *4.1B* の発現を欠く T24、J82 株において *4.1B* mRNA の発現が回復した。このことから、これらの細胞株の *4.1B* 発現欠如がプロモーター領域のメチル化によるものであることが示唆される。また、*5-aza-dC* 単独で発現を回復しなかった細胞株においても、*5-aza-dC* に加えてヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であ

る TSA 処理を行うことで、約半数で 4.1B mRNA の発現が回復した。これまで他のがん腫において 4.1B のヒストン脱アセチル化を検討した報告はなく、今回の検討で初めて、メチル化に加えてヒストン脱アセチル化もがん細胞株における 4.1B 発現欠如の原因のひとつとなっていることが明らかとなった。これらのことから、実際の膀胱がんでの 4.1B の発現欠如の原因も少なくとも一部はプロモーター領域のメチル化と、ヒストンの脱アセチル化であると考えられる。今回の我々のパイロシーケンス解析の結果、4.1B 陽性 5 症例の解析では 4.1B のメチル化は 1 例を除いて認めない一方、4.1B 陰性症例では 5 例中 3 例でメチル化を認めることが明らかとなった。検討症例数が限られるため、ヒト膀胱がんにおける一般的傾向を評価することは難しいが、腎がんでも 4.1B 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が発現欠如と相関することが示されていることから、少なくともヒト原発性膀胱がんの一部の症例ではメチル化が 4.1B 発現低下に関与している可能性が考えられた。なお、4.1B 陽性の 1 例で、4.1B 遺伝子の中等度メチル化が認められた例では、2 つのアレルの片側のメチル化が生じているものの、もう一方のアレルにはメチル化が生じていない可能性も示唆される。

Gutmann らによると 4.1B 遺伝子の位置する 18p11.3 領域の LOH が原発性髄膜腫の 71%に認められる(23)。その一方で不活化変異はこれまで報告されていない(36)。これらのことから DNA メチル化以外の 4.1B 発現低下の機構とし

て、4.1B 遺伝子の不活化変異が関与する可能性は低い、LOH が関与する可能性は高いと考えられる。

さらに、近年胃がん患者、非小細胞性肺がん患者で miR-223 の発現上昇が認められており、この miR-223 により 4.1B の発現が抑制されることが報告されている(32,33)。そこで我々はまず miR-223 のトランスフェクション実験の検討を行い、膀胱がんにおいても miR-223 が 4.1B の発現欠如に関与していることを示した。興味深いことに、miR-223 は膀胱がんで発現が上昇している microRNA のうちのひとつである。Gottardo らは膀胱がん患者、腎がん患者の腫瘍組織の解析から、膀胱がんでのみ miR-223 の発現が上昇していることを見出した(37)。今回の我々のヒト原発性膀胱がん症例の検討でも、4.1B 陰性症例では miR-223 が高値を示す症例が 3 例存在した。メチル化の検討の結果を含めて考察すると、膀胱がんにおいて 4.1B は DNA メチル化、miR-223 の上昇など複数の原因によりその発現が欠如していると考えられる。Yamada らは腎がん症例で 4.1B 発現異常を認めた症例の内の 80%でメチル化が認められることを報告しているが(2)、がん腫により 4.1B 発現欠如の要因は大きく異なるものと考えられる。

4.1B を強制発現させることで *in vitro* の膀胱がん細胞の遊走能、足場非依存的増殖能が抑制されることが、Transwell migration assay, Soft-agar colony

formation assay で確認された (図 8、9)。しかし *in vitro* の増殖能試験では、4.1B の細胞増殖抑制効果は確認できなかった (図 7)。先行研究では、細胞増殖抑制効果が報告されているが(1,38)、一方で効果を認めなかったとの報告もある(38)。4.1B は膜裏打ちタンパク質であり、膜タンパクとの結合を介して機能をもつため、細胞種の相違に基づくものと考えられる。一方で、足場非依存的細胞増殖の抑制効果を持つことが確認された。これは Defau らの卵巣がんにおける 3D 培養スフェロイド増殖アッセイの報告と一致する結果であった(25)。4.1B の細胞増殖抑制能には細胞種とともに細胞外環境も影響していると考えられる。また、4.1B 発現が欠如している 5637 細胞の *in vivo* のヌードマウス皮下移植腫瘍の増大が、4.1B の強制発現により抑制されることが分かった (図 12)。このことは生体内において、がんが進展を起こした結果として 4.1B が発現異常をきたしているのではなく、より積極的に、がんが進展を起こす機構に 4.1B の発現異常が関与していることを示唆している。

この結果は、Wong らによる前立腺がんにおける 4.1B の報告と一致する。Wong らは、Simian Virus 40 の強制発現により前立腺がんを発がんする TRAMP マウスと、4.1B ノックアウトマウスを交配させた。そして発症した前立腺がんを定量したところ、ヘテロマウスに比べてノックアウトマウスで悪性の高い腫瘍が有意に増加したことを報告している(26)。さらに彼らは、4.1B

ノックアウトマウスではアポトーシスを来した腫瘍細胞が減少していることを見出した(26)。4.1B がアポトーシスを引き起こす機構は明らかになっていないが、4.1B の過剰発現が caspase-8 の活性化を介してアポトーシスを誘導するとの報告もある(39)。今回の検討での 4.1B 強制発現が造腫瘍性を抑制した機構として、アポトーシスの誘導は有力な候補である。また、4.1B は種々の膜タンパク質と結合し、様々な細胞内カスケードに関与することが報告されている(20)。

今回の検討の結果、膀胱がんにおいて 4.1B ががん抑制タンパク質として働いていることが明らかとなった。今後は、こういった経路を介してがん抑制的に作用しているのか、分子機構の検証を行っていく必要があると考えられる。

今後の臨床的展望として、実際の膀胱尿路上皮がん症例においても、腫瘍に 4.1B の発現を回復させることで腫瘍抑制的な効果が得られる可能性がある。4.1B タンパク質は約 130kDa とサイズが大きいため、タンパク質を導入することは困難であろう。しかし、メチル化が 4.1B 発現低下の一因と考えられるため、メチル化を解除することにより発現を回復できる可能性がある。近年、TALE-TET1 融合タンパク質により内因性遺伝子の選択的 DNA 脱メチル化が可能であるとする報告もあり(40)、このような技術を用いることで、少なくとも一部の症例で、4.1B の発現回復は実現可能と考えられる。また、miR-223 が 4.1B の発現を抑制することから、miR-223 を抑制することでも 4.1B の発現が回復す

ることが予想される。実際 Liang らは、miR-223 に対するアンチセンスオリゴを用いて、4.1B の発現が回復することを非小細胞肺癌を用いた *in vitro* の検討で示している(32,33)。これらのことから、miR-223 はマイクロ RNA が膀胱尿路上皮がんを制御する antagomir 創薬における標的となる可能性が考えられる。ただし、今回 miR-223 の発現を検討した症例は 20 例に限られるため、症例数を増やした解析は今後の課題である。

2. 精巣胚細胞腫瘍における 4.1B の検討

序文

精巣胚細胞腫瘍 (Testicular germ cell tumor, TGCT) は精巣がんの 90～95% を占める。我が国における罹患率は人口 10 万人当たり 1-2 人と比較的まれだが (42)、世界的に発生頻度が増加しており、青年期悪性腫瘍の中では最も高頻度である (43)。シスプラチンベースの化学療法により良好な治療成績となっているが、いまだ非治癒症例も少なからず存在する。したがって TGCT は依然として社会的影響の大きい悪性腫瘍である。

スウェーデンでの疫学調査により、TGCT 罹患者の 25% は遺伝的要因で説明されると報告されている (44)。家族歴は重要なリスク因子であり、TGCT 患者の兄弟は 8-10 倍のリスク、息子は 4-6 倍のリスクとされている (45)。さらには一卵性双生児の場合 75 倍のリスクとされる (46)。また、停留精巣や染色体異常もリスク因子である。そしてこの二つは、TGCT と不妊の共通のリスク因子であるが、不妊はこれら二つと独立に TGCT のリスク因子である (47-49)。不妊症例の精巣がん有病率は 0.5%、つまり 10 万人あたり 500 人とされ (50-52)、健常青年に比して不妊症患者の TGCT 発がんリスクは 20 倍とされる (49)。

胎生期のストレスやホルモン異常が始原胚細胞やセルトリ細胞、間質細胞の分化に悪影響を及ぼし、精巣の異常を来し得るという概念（Testicular dysgenesis syndrome）が提唱され(48)、精子分化の異常は TGCT や不妊の母地となると考えられている。このように TGCT と不妊は共通の発生経路を共有していると考えられている。それを裏付ける証拠として、TGCT 患者の兄弟は、健常人に比べて妊孕性が低く、同時に TGCT のリスクも高いと報告されている(53)。

TGCT の病理組織分類には WHO 分類が使用されている(表 4)(54)。一方で、疫学的、臨床的、および組織発生の見地から、TGCT を 3 型に分類する分類法も有用である(55,56)。つまり I 型：乳幼児期に発生する胚細胞腫瘍（奇形腫や卵黄嚢腫瘍）、II 型：青壮年期の胚細胞腫瘍、III 型：精母細胞性セミノーマであり、II 型がその大部分を占める。

II 型の TGCT は胎生期の始原生殖細胞を起源とし、出生を経て思春期以後にこの起源細胞が精細管内胚細胞腫瘍（Intratubular germ cell neoplasia, unclassified; IGCNU）を経て臨床的な TGCT になると考えられている(57-59)。他方、I 型、III 型の TGCT は IGCNU を伴わない(48)。

II 型の TGCT はセミノーマ、非セミノーマに大別され、非セミノーマはさらに WHO 分類に従って胎児性がん、卵黄嚢腫瘍、絨毛がん、奇形腫などに分類

表 4：精巣胚細胞腫瘍の WHO 分類（文献(54)）

A. 前駆病変

精細管内胚細胞腫瘍、分類不能型

その他

B. 単一型

1) セミノーマ

亜型：合胞性栄養膜細胞を伴うセミノーマ

2) 精母細胞性セミノーマ

亜型：肉腫を伴う精母細胞性セミノーマ

3) 胎児性がん

4) 卵黄嚢腫瘍

5) 栄養膜細胞性腫瘍（絨毛性腫瘍）

a) 絨毛がん

b) 絨毛がん以外の栄養膜細胞腫瘍

6) 奇形腫

亜型：

a) 皮様嚢腫

b) 単胚葉性奇形腫

c) 体細胞性悪性腫瘍を伴う奇形腫

C. 混合型

される。セミノーマは放射線感受性が高く、またシスプラチンに代表される白金製剤を中心とした化学療法にも良好な反応を示すため、临床上はセミノーマと非セミノーマの鑑別が肝要である。

Ⅲ型の精母細胞性セミノーマは TGCT の約 2% を占める(60)。セミノーマの好発年齢が 20－40 歳代なのに対して、発症の平均年齢は 55 歳とやや高いものの、20 歳代、30 歳代での発症例も報告されている(61)。その病理学的所見として、構成細胞の大きさが種々で、大型細胞のクロマチンパターンが精母細胞に類似した糸くず状を示すという特徴をもつものの、類円形細胞が敷石状に配列して増殖する点でセミノーマと類似しており、頻度が極めて少ないこともあって診断が困難な組織型である。そのため、鑑別には免疫組織化学的解析が用いられ、 α -fetoprotein や placental alkaline phosphatase (PLAP) に陰性であること、spalt-like transcription factor 4 (SALL4) に陽性であることなどから診断されている(表 5) (62)。しかし、精母細胞性セミノーマに特異的な陽性マーカーとして確立したものはない。精母細胞性セミノーマは転移を来さない良性疾患と考えられており、精巣腫瘍に対する標準的治療法である高位精巣摘除術により根治できると考えられている。そのため、精母細胞性セミノーマとセミノーマの鑑別は臨床的に重要である。転移例ではセミノーマを精母細胞性セミノーマと誤診している可能性を考慮する必要がある(56)。

表 5：胚細胞腫瘍の免疫染色マーカー（文献(62)より引用、改編）

マーカー	SS	Se	EC	YST	CHC
AFP	—	—	±	+	—
β-hCG	—	—	—	—	+
PLAP	—	+	±	±	—
KIT	±	+	—	±	—
OCT4	—	+	+	—	—
SOX2	—	—	+	—	—
SALL4	±	+	+	+	+

SS; spermatocytic seminoma, Se; seminoma, EC; embryonal carcinoma, YST; yolk sac tumor, CHC; choriocarcinoma, AFP; α-fetoprotein, hCG; Human chorionic gonadotropin, PLAP; Placental alkaline phosphatase, KIT; v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog, OCT4; organic cation transporter 4, SOX2; SRY (sex determining region Y)-box 2, SALL4; spalt-like transcription factor 4

TGCT は様々な病理組織的特徴をもった腫瘍で構成されており、TGCT の分子遺伝学的特性を明らかにしていくことは、新規精巣腫瘍マーカーの樹立、難治性精巣腫瘍の新たな治療方法の模索につながると考えられる。

精巣における 4.1B に関しては、Real time RT-PCR 法を用いた検討において 4.1B がヒト精巣に強く発現していることが報告されている(63)。また Terada らはマウス精巣の免疫組織化学的検討により、精細管内のセルトリ細胞に 4.1B の発現を確認している(64)。しかしこれまでヒト正常精巣および TGCT の免疫組織化学的検討は行われておらず、その局在を含めた意義については分かっていない。

今回我々は 4.1B について、正常精巣および TGCT における発現を免疫組織化学的手法により検討した。

方法

ヒト原発性 TGCT 組織標本

東京大学医学部附属病院泌尿器科において、1990 年 3 月から 2013 年 3 月の間に原発性精巣腫瘍に対して高位精巣摘除術が施行された症例を対象とした。病理診断で TGCT と診断された症例のうち、他の非セミノーマの組織型を含まない奇形腫を除く 92 例を解析の対象とし、腫瘍の主病変の組織型で評価した。ただし、セミノーマを含む非セミノーマの場合はセミノーマの割合に関わらず、非セミノーマの主病変で評価した。また、奇形腫を含む場合も奇形腫の割合に関わらず、それ以外の主病変で評価した。本研究に対して東京大学倫理委員会の審査承認を得た(審査番号 ; 3124)。原発性精巣腫瘍標本の病理診断は東京大学医学部附属病院病理部によって行われた。

抗体

ヤギ・ポリクローナル抗 OCT4 抗体は Santa Cruz Biotechnology 社 (Dallas, TX, USA) から購入した。ウサギ・ポリクローナル抗 4.1B/EPB41L3 抗体は Atlas Antibodies 社 (Stockholm, Sweden) から購入した。

免疫組織染色

前項「1. 膀胱がんにおけるがん抑制遺伝子 4.1B の検討」と同様に行った。
ただし抗原賦活化に関しては、OCT4 抗体での染色の場合はクエン酸バッファ
ー、4.1B 抗体での染色の場合は HISTOFINE pH 9 (Nichirei Biosciences 社)
を用いた。発現の判定も前項同様に、細胞膜上の発現陽性細胞が 10%以下の場
合に発現欠如とした(3)。

結果

ヒト精巣における 4.1B の発現

4.1B がヒト正常精巣でも発現しているかどうか検証するため、免疫組織化学にてヒト原発性精巣腫瘍患者の非腫瘍部精細管部位での発現を評価した。抗 4.1B 抗体を用いて正常精細管で 4.1B の発現を解析したところ、精粗細胞、精母細胞、精子細胞いずれにおいても細胞膜に 4.1B の発現を認めた (図 13A)。一方でライディッヒ細胞での発現は明らかではなかった (図 13B)。セルトリ細胞は支持組織であり、各精細胞と接着している。そのため、セルトリ細胞自体に 4.1B が発現しているかの判断は困難であった。

以上より、ヒト精巣においては精粗細胞から精子細胞まで 4.1B が発現していることが明らかとなった。

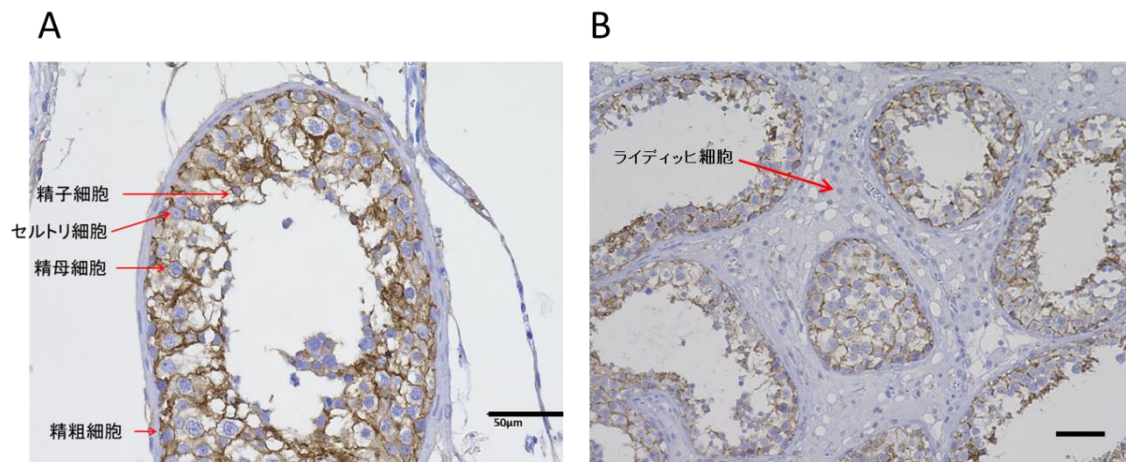


図 13：ヒト正常精細管における 4.1B の発現

抗 4.1B 抗体を用いた 4.1B タンパク質の免疫組織化学的解析。

(A) 正常精細管における 4.1B の発現の典型例。精細管内において精粗細胞、精母細胞、精子細胞の細胞膜に 4.1B の発現を認めた。(B) ライディッヒ細胞には明らかな発現を認めなかった。

ヒト原発性 TGCT における 4.1B 発現の異常と病理組織学的分類との相関

4.1B 発現の異常がヒト原発性 TGCT において認められるかどうか、免疫組織化学により TGCT 組織標本を評価した (図 14)。OCT4 を発現している、II 型 TGCT の上皮内がん病変である IGCNU での発現を解析した。IGCNU 細胞は全例で発現が消失ないし著明に低下していると考えられたが、精細管内には精細細胞も混在するため、IGCNU 細胞のみでの正確な陽性率の算定は困難であった。セミノーマ 62 例、非セミノーマ 28 例を検討したが、全例で 4.1B の発現を認めなかった (表 6)。一方、精母細胞性セミノーマは 2 例中 2 例とも発現を認めた。

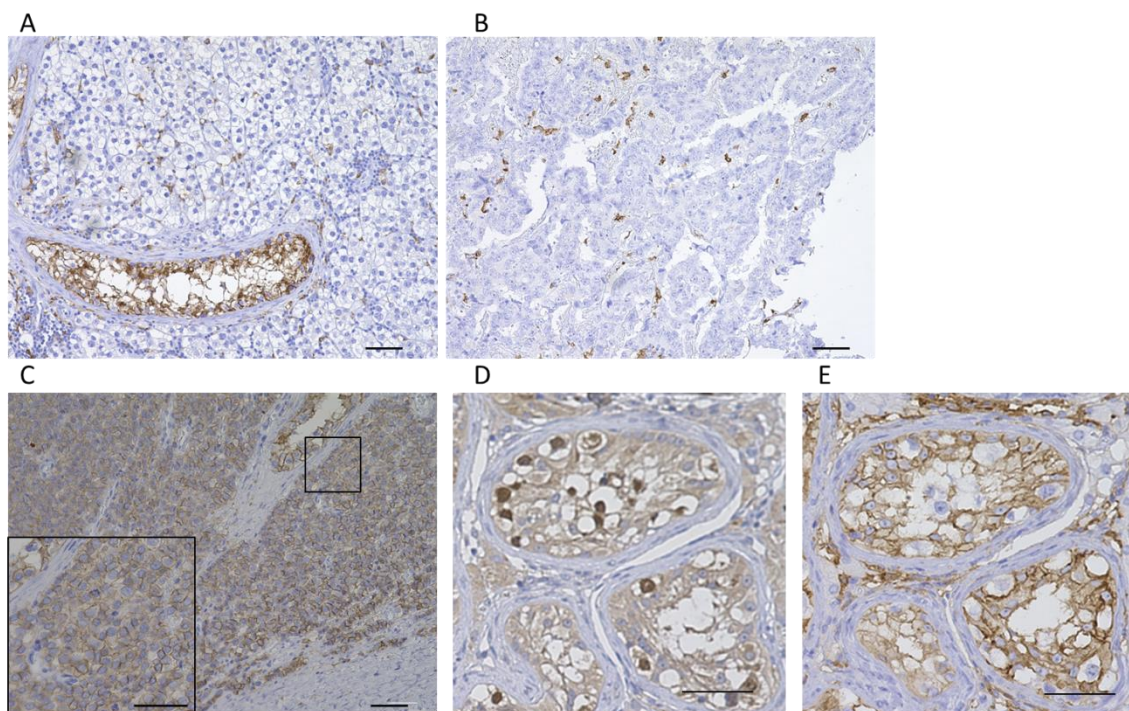


図 14：精巣胚細胞腫瘍組織検体を用いた 4.1B 発現の検討

ヒト精巣胚細胞腫瘍組織における 4.1B の発現を免疫組織化学的手法で解析した。スケールバー：50 μ m。セミノーマ (A)、非セミノーマ (B) とともにすべて染色陰性であった。精母細胞性セミノーマにおいてはびまん性に細胞膜での 4.1B の発現を認めた (C)。OCT4 に対する免疫組織化学により、核への染色が陽性となる IGCNU を同定した (D)。同細胞の細胞膜の 4.1B の発現は消失ないし低下していると考えられたが、周囲に 4.1B 陽性精細胞が存在するために判断が困難であった (E)。

表 6：92 例のヒト精巣胚細胞腫瘍の病理学的分類と 4.1B の発現との関係

ヒト精巣胚細胞腫瘍組織における 4.1B の発現の有無と病理学的分類を解析した。セミノーマ、非セミノーマのいずれも 4.1B の発現を認めなかった。一方精母細胞性セミノーマは 2 例中 2 例とも発現を認めた。

病理学的分類	症例数	4.1B	
		陽性例	陰性例
非がん部精細管	42	42	0
セミノーマ	62	0	62
胎児性がん	23	0	23
卵黄嚢腫瘍	4	0	4
絨毛がん	1	0	1
精母細胞性セミノーマ	2	2	0

考察

今回我々は、初めてヒト正常精巣、およびヒト TGCT における 4.1B の発現を明らかにした。

今回のヒト精細管における精細胞の検討では、4.1B の発現が精祖細胞から精子細胞まで一貫して認められることが分かった。マウスにおけるこれまでの報告では、4.1B はセルトリ細胞でのみ発現していることが明らかになっている(64)。精子形成の過程でマウスとヒトで発現パターンが異なる遺伝子はこれまでの報告でもみられ、Kusz らは生殖細胞の性分化を制御する NANOS2 (nanos homolog 2)がマウスでは一部精粗細胞に発現する一方、ヒトでは精粗細胞に限らず精母細胞にも発現することを報告している(65)。これらの結果は、組織特異性が維持された遺伝子の発現制御が進化過程で変化している可能性を示している。

これまで 4.1B ノックアウトマウスにおける妊孕性に関する異常は報告されていない(66)。しかし同じ 4.1 ファミリーに属する 4.1G は、マウス精巣において CADM1 ファミリー細胞接着分子群に属する CADM4 と結合し、精細胞とセルトリ細胞の結合に関与している。さらに注目すべきことに、C57BL/6 系統の 4.1G ノックアウトマウスでは明らかな表現型の異常を認めなかったものの、

C57BL/6 系統と 129/Sv 系統の交雑系では、*4.1G* ノックアウトマウスが細胞間接着の障害により精細胞の脱落をきたし、雄性不妊を示したと報告されている(67)。*4.1B* においても、交雑系によっては *4.1G* 同様、雄性不妊に関与している可能性も否定できず、精粗細胞から精子細胞まで一貫して発現が認められたヒト精子形成においても重要な役割を担っている可能性が考えられる。

ヒト TGCT における *4.1B* の発現を解析した結果、精母細胞性セミノーマを除く全てのセミノーマ、非セミノーマで発現が欠如していることが明らかになった。精母細胞性セミノーマでは検討できた症例数は 2 例と少ないものの、2 例ともにびまん性に *4.1B* の発現を認めた。これは精母細胞性セミノーマがより分化が進んだ精細胞から発生すると考えられており(56)、IGCNU を経由して発生するセミノーマ、非セミノーマとの発生母地の違いを反映しているものと考えられた。また、IGCNU では *4.1B* の発現は欠如ないし著明に低下していた。このことから以下の二つの可能性が考えられる。ひとつは、*4.1B* は IGCNU を経由して発生するⅡ型 TGCT の発がんの初期段階で、発現が低下するという可能性。もうひとつは *4.1B* は始原胚細胞では発現しておらず、精細胞への分化に伴って発現するという可能性である。これを明らかにするには今後、胎児精巣における始原胚細胞での *4.1B* 発現の有無を評価する必要がある。今回の免疫組織学的検討では IGCNU での発現を正確に評価することが困難であったが、

IGCNU の評価を定量的に行うために、今後蛍光二重染色等を用いた検討が必要と考えられる。

精母細胞性セミノーマは組織学的にセミノーマと類似しており、頻度が極めて少ないこともあって診断が困難な組織型である。そのため、鑑別には免疫組織化学的解析が有用である。通常は KIT や PLAP に陰性であること、SALL4 に陽性であることから診断されているが、これらのマーカーの特異度は必ずしも高いとは言えず、実際の診断には注意が必要である。KIT は精母細胞性セミノーマで特異的に陰性と報告されているが、使用する抗体によっては陽性となり(68,69)、Kraggerud らは精母細胞性セミノーマの 40%で KIT 陽性としているが(70)、Haroon らは全例 KIT 陽性であったと報告している(71)。PLAP にも特異的に陰性であるとされているが、4.2%で陽性例を認めた報告もなされている(68)。陽性マーカーとして、SALL4 が精母細胞性セミノーマに陽性であることが報告されているものの、セミノーマや非セミノーマにおいても陽性となり、精母細胞性セミノーマに特異的なマーカーではない(72)。Stoop らは精細胞で特徴的な発現パターンを示す SSX、XPA、SCP1 / CTDSP1 が精母細胞性セミノーマに特異度の高いマーカーになると報告している。しかしこれらのマーカー候補のうち、市販抗体で検討されているものは XPA のみであり、精母細胞性セミノーマに特異的な陽性マーカーは限られている (表 7) (69)。その他の NUT

表 7：精母細胞性セミノーマの陽性マーカーの報告

マーカー	SS (%)	Se (%)	Em (%)	YST (%)	文献
NUT	17/17 (100)	20/27 (74)	0/26(0)	8/21(38)	(73)
GAGE7	15/15 (100)	9/24 (38)	2/26 (8)	0/21 (0)	(73)
CTAG1B	16/17 (94)	6/23 (26)	0/26 (0)	1/21 (5)	(73)
SSX※	13/13 (100)	3/25 (12)	NA	NA	(69)
CTDSP1※	4/4 (100)	0/6 (0)	NA	NA	(69)
XPA	13/13 (100)	0/25 (0)	NA	NA	(69)
CHK2※	15/16 (93.7)	20/20 (100)	7/13 (54)	NA	(68,74)
MAGEA4※	21/21 (100)	12/12 (100)	Nonseminoma	0/10 (0)	(68,75)
OCT2	5/34 (14)	NA	NA	NA	(76)
SAGE1	14/36(39)	NA	NA	NA	(76)

※非市販抗体による検討

SS; spermatocytic seminoma, Se; seminoma, Em; embryonal carcinoma, YST; yolk sac tumor, NUT; Nuclear protein in testis, GAGE; G antigen 7, CTAG1B; cancer/testis antigen 1B, SSX; synovial sarcoma, X breakpoint, CTDSP1; C-terminal domain small phosphatase 1, XPA; xeroderma pigmentosum, complementation group A, CHK2; checkpoint kinase 2, MAGEA4; melanoma antigen gene A4, OCT2; Organic cation transporter 2, SAGE1; sarcoma antigen 1, NA; Not available

(Nuclear protein in Testis) や、がん・精巢抗原である GAGE7、CTAG1B / NY-ESO-1 を検討した報告においても、やはり精母細胞性セミノーマに対するマーカーとしては特異度が十分とは言えない(73)。精母細胞性セミノーマが極めて稀な疾患であることを考えると、陽性的中率の観点からも特異性の高いマーカーが必要と考えられる。今回明らかとなった、4.1B が精母細胞性セミノーマのみで陽性であるという結果は、4.1B が精母細胞性セミノーマの鑑別に有用な陽性マーカーになりうることを示している。稀な疾患であるため今回は 2 例しか検討できなかったが、今後は他施設での症例を集積し、症例数を増やしての解析を行いたい。

略語一覧

AEBSF	4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride
BPB	bromophenol blue
CADM1	cell adhesion molecule 1
CADM4	cell adhesion molecule 4
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetractetic acid
FERM	4.1B-ezrin-radixin-moesin
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HA	hemagglutinin
HRP	horseradish peroxidase
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IGCNU	intratubular germ cell neoplasia, unclassified
IRES	internal ribosome entry site
LOH	loss of heterozygosity
M	mol/l
miR	microRNA
NF2	neurofibromatosis type 2
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PDZ	PSD (postsynaptic density)-95, Discs-large, ZO (zonula occludens) -1
PLAP	Placental alkaline phosphatase
PVDF	polyvinylidene difluoride
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SALL4	spalt-like transcription factor 4
SDS	sodium dodecyl sulfate
TGCT	testicular germ cell tumor
TRAMP	transgenic adenocarcinoma of mouse prostate
TSA	trichostatin A
β ME	2-mercaptoethanol
5-aza-dC	5-aza-2'-deoxycytidine

謝辞

本研究をまとめるにあたりご指導ご鞭撻を賜りました、指導教官である東京大学大学院医学系研究科泌尿器外科学講座の本間之夫教授に深謝申し上げます。また本研究を遂行するにあたり、ご指導頂きました東京大学医科学研究所人癌病因遺伝子分野の村上善則教授に深謝申し上げます。そして、東京大学医学部附属病院における膀胱がんおよび精巣胚細胞腫瘍の病理診断に関してご指導頂きました東京大学人体病理学・病理診断学分野の森川鉄平講師、自治医科大学病理学講座統合病理学部門の松原大祐准教授、東京大学医科学研究所人癌病因遺伝子分野の種井善一医師に心より感謝申し上げます。

最後に、研究における様々な面でご指導ご協力いただいた東京大学泌尿器外科学講座の久米春喜准教授、川合剛人医師、並びに東京大学医科学研究所人癌病因遺伝子分野の岩井美和子博士、坪井裕見博士、伊藤剛博士、熊谷友紀博士、市原博美氏、明石健氏、土屋武弘氏に感謝いたします。

参考文献

- (1) Tran Y. K., Bogler O, Gorse KM, Wieland I, Green MR, Newsham IF. A novel member of the NF2/ERM/4.1 superfamily with growth suppressing properties in lung cancer. *Cancer Res*, 59: 35-43, 1999.
- (2) Yamada D., Kikuchi S, Williams YN, Sakurai - Yageta M, Masuda M, Maruyama T, Tomita K, Gutmann DH, Kakizoe T, Kitamura T. Promoter hypermethylation of the potential tumor suppressor DAL - 1/4.1 B gene in renal clear cell carcinoma. *International journal of cancer*, 118: 916-923, 2006.
- (3) Takahashi Y., Iwai M, Kawai T, Arakawa A, Ito T, Sakurai-Yageta M, Ito A, Goto A, Saito M, Kasumi F. Aberrant expression of tumor suppressors CADM1 and 4.1 B in invasive lesions of primary breast cancer. *Breast Cancer*, 19: 242-252, 2012.
- (4) Kikuchi S., Yamada D, Fukami T, Masuda M, Sakurai-Yageta M, Williams YN, Maruyama T, Asamura H, Matsuno Y, Onizuka M, Murakami Y. Promoter methylation of DAL-1/4.1B predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 11: 2954-2961, 2005.
- (5) Charboneau A. L., Singh V, Yu T, Newsham IF. Suppression of growth and increased cellular attachment after expression of DAL - 1 in MCF - 7 breast cancer cells. *International journal of cancer*, 100: 181-188, 2002.
- (6) Jemal A., Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61: 69-90, 2011.
- (7) 国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」. 地域がん登録全国推計によるがん罹患データ(1975 年～2011 年). Available at: [http://ganjoho.jp/data/reg_stat/statistics/dl/cancer_incidence\(1975-2011\).xls](http://ganjoho.jp/data/reg_stat/statistics/dl/cancer_incidence(1975-2011).xls). Accessed 30th, Oct., 2015.
- (8) Kirkali Z., Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, Kiemeny L, Kriegsmair M, Montironi R, Murphy WM. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology*, 66: 4-34, 2005.

- (9) 国立研究開発法人国立がん研究センターがん対策情報センター. 2015 年のがん統計予測. Available at: http://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/short_pred.html. Accessed 30th, Oct., 2015.
- (10) 厚生労働省大臣官房統計情報部編. 平成 26 年(2014)人口動態統計. Available at: <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei14/xls/hyo.xls>. Accessed 30th, Oct., 2015.
- (11) Zaitzu M., Toyokawa S, Tonooka A, Nakamura F, Takeuchi T, Homma Y, Kobayashi Y. Sex differences in bladder cancer pathology and survival: analysis of a population - based cancer registry. *Cancer medicine*, 4: 363-370, 2015.
- (12) 日本泌尿器科学会, 日本病理学会, 日本医学放射線学会. 泌尿器科・病理・放射線科腎盂・尿管・膀胱癌取扱い規約 / 日本泌尿器科学会, 日本病理学会, 日本医学放射線学会編. 東京: 金原出版; 2011.
- (13) Lutzeyer W., Rubben H, Dahm H. Prognostic parameters in superficial bladder cancer: an analysis of 315 cases. *J Urol*, 127: 250-252, 1982.
- (14) Holmang S., Hedelin H, Anderstrom C, Johansson SL. The relationship among multiple recurrences, progression and prognosis of patients with stages Ta and T1 transitional cell cancer of the bladder followed for at least 20 years. *J Urol*, 153: 1823-1827, 1995.
- (15) Hall M. C., Chang SS, Dalbagni G, Pruthi RS, Seigne JD, Skinner EC, Wolf Jr JS, Schellhammer PF. Guideline for the management of nonmuscle invasive bladder cancer (stages Ta, T1, and Tis): 2007 update. *J Urol*, 178: 2314-2330, 2007.
- (16) Stein J. P., Lieskovsky G, Cote R, Groshen S, Feng AC, Boyd S, Skinner E, Bochner B, Thangathurai D, Mikhail M, Raghavan D, Skinner DG. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol*, 19: 666-675, 2001.
- (17) Yafi F. A., Aprikian AG, Chin JL, Fradet Y, Izawa J, Estey E, Fairey A, Rendon R, Cagiannos I, Lacombe L. Contemporary outcomes of 2287 patients with bladder cancer who were treated with radical cystectomy: a Canadian multicentre experience. *BJU Int*, 108: 539-545, 2011.

- (18) Hautmann R. E., de Petriconi RC, Pfeiffer C, Volkmer BG. Radical cystectomy for urothelial carcinoma of the bladder without neoadjuvant or adjuvant therapy: long-term results in 1100 patients. *Eur Urol*, 61: 1039-1047, 2012.
- (19) von der Maase H., Sengelov L, Roberts JT, Ricci S, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, Zimmermann A, Arning M. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol*, 23: 4602-4608, 2005.
- (20) Wang Z., Zhang J, Ye M, Zhu M, Zhang B, Roy M, Liu J, An X. Tumor suppressor role of protein 4.1 B/DAL-1. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71: 4815-4830, 2014.
- (21) Calinisan V., Gravem D, Chen RP, Brittin S, Mohandas N, Lecomte MC, Gascard P. New insights into potential functions for the protein 4.1 superfamily of proteins in kidney epithelium. *Front Biosci*, 11: 1646-1666, 2006.
- (22) Sun C. X., Robb VA, Gutmann DH. Protein 4.1 tumor suppressors: getting a FERM grip on growth regulation. *J Cell Sci*, 115: 3991-4000, 2002.
- (23) Gutmann D. H., Donahoe J, Perry A, Lemke N, Gorse K, Kittiniyom K, Rempel SA, Gutierrez JA, Newsham IF. Loss of DAL-1, a protein 4.1-related tumor suppressor, is an important early event in the pathogenesis of meningiomas. *Hum Mol Genet*, 9: 1495-1500, 2000.
- (24) Nunes F., Shen Y, Niida Y, Beauchamp R, Stemmer-Rachamimov AO, Ramesh V, Gusella J, MacCollin M. Inactivation patterns of NF2 and DAL-1/4.1 B (EPB41L3) in sporadic meningioma. *Cancer Genet Cytogenet*, 162: 135-139, 2005.
- (25) Dafou D., Grun B, Sinclair J, Lawrenson K, Benjamin EC, Hogdall E, Kruger-Kjaer S, Christensen L, Sowter HM, Al-Attar A, Edmondson R, Darby S, Berchuck A, Laird PW, Pearce CL, Ramus SJ, Jacobs IJ, Gayther SA. Microcell-mediated chromosome transfer identifies EPB41L3 as a functional suppressor of epithelial ovarian cancers. *Neoplasia*, 12: 579-589, 2010.
- (26) Wong S. Y., Haack H, Kissil JL, Barry M, Bronson RT, Shen SS, Whittaker CA, Crowley D, Hynes RO. Protein 4.1B suppresses prostate cancer progression and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 12784-12789, 2007.

- (27) Horikawa Y., Sugano K, Shigyo M, Yamamoto H, Nakazono M, Fujimoto H, Kanai Y, Hirohashi S, Kakizoe T, Habuchi T. Hypermethylation of an E-cadherin (CDH 1) promoter region in high grade transitional cell carcinoma of the bladder comprising carcinoma in situ. *J Urol*, 169: 1541-1545, 2003.
- (28) Ribeiro - Filho L. A., Franks J, Sasaki M, Shiina H, Li L, Nojima D, Arap S, Carroll P, Enokida H, Nakagawa M. CpG hypermethylation of promoter region and inactivation of E - cadherin gene in human bladder cancer. *Mol Carcinog*, 34: 187-198, 2002.
- (29) Boireau S., Buchert M, Samuel MS, Pannequin J, Ryan JL, Choquet A, Chapuis H, Rebillard X, Avances C, Ernst M, Joubert D, Mottet N, Hollande F. DNA-methylation-dependent alterations of claudin-4 expression in human bladder carcinoma. *Carcinogenesis*, 28: 246-258, 2007.
- (30) Schneider C. A., Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9: 671-675, 2012.
- (31) Kitamura T., Koshino Y, Shibata F, Oki T, Nakajima H, Nosaka T, Kumagai H. Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Exp Hematol*, 31: 1007-1014, 2003.
- (32) Liang H., Yan X, Pan Y, Wang Y, Wang N, Li L, Liu Y, Chen X, Zhang C, Gu H. MicroRNA-223 delivered by platelet-derived microvesicles promotes lung cancer cell invasion via targeting tumor suppressor EPB41L3. *Molecular Cancer*, 1: 1-13, 2015.
- (33) Li X., Zhang Y, Zhang H, Liu X, Gong T, Li M, Sun L, Ji G, Shi Y, Han Z, Han S, Nie Y, Chen X, Zhao Q, Ding J, Wu K, Daiming F. miRNA-223 promotes gastric cancer invasion and metastasis by targeting tumor suppressor EPB41L3. *Mol Cancer Res*, 9: 824-833, 2011.
- (34) Knowles M. A. Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese? *Carcinogenesis*, 27: 361-373, 2006.
- (35) Schulz W. A. Understanding urothelial carcinoma through cancer pathways. *International journal of cancer*, 119: 1513-1518, 2006.
- (36) Kittiniyom K., Mastronardi M, Roemer M, Wells WA, Greenberg ER, Titus - Ernstoff L, Newsham IF. Allele - specific loss of heterozygosity at the DAL - 1/4.1 B

- (EPB41L3) tumor - suppressor gene locus in the absence of mutation. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 40: 190-203, 2004.
- (37) Gottardo F., Liu CG, Ferracin M, Calin G, Sevignani C, Negrini M, Gomella LG, Croce CM, Baffa R. Micro-RNAs profiling in kidney and bladder cancers. *Cancer Res*, 65: 1438-1438, 2005.
- (38) Gutmann D. H., Hirbe AC, Huang Z, Haipok CA. The protein 4.1 tumor suppressor, DAL-1, impairs cell motility, but regulates proliferation in a cell-type-specific fashion. *Neurobiol Dis*, 8: 266-278, 2001.
- (39) Jiang W., Newsham IF. The tumor suppressor DAL-1/4.1 B and protein methylation cooperate in inducing apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Molecular Cancer*, 5: 1-8, 2006.
- (40) Maeder M. L., Angstman JF, Richardson ME, Linder SJ, Cascio VM, Tsai SQ, Ho QH, Sander JD, Reyon D, Bernstein BE. Targeted DNA demethylation and activation of endogenous genes using programmable TALE-TET1 fusion proteins. *Nat Biotechnol*, 31: 1137-1142, 2013.
- (41) Heller G., Fong KM, Girard L, Seidl S, End-Pfützenreuter A, Lang G, Gazdar AF, Minna JD, Zielinski CC, Zöchbauer-Müller S. Expression and methylation pattern of TSLC1 cascade genes in lung carcinomas. *Oncogene*, 25: 959-968, 2006.
- (42) Matsuda T., Saika K. Comparison of time trends in testicular cancer incidence (1973-97) in East Asia, Europe and USA, from Cancer Incidence in Five Continents Vols IV-VIII. *Jpn J Clin Oncol*, 38: 578-579, 2008.
- (43) van der Horst M., Winther JF, Olsen JH. Cancer incidence in the age range 0–34 years: historical and actual status in Denmark. *International journal of cancer*, 118: 2816-2826, 2006.
- (44) Czene K., Lichtenstein P, Hemminki K. Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish family - cancer database. *International Journal of Cancer*, 99: 260-266, 2002.
- (45) Hutter A. M., Lynch JJ, Shnider BI. Malignant testicular tumors in brothers: a case report. *JAMA*, 199: 1009-1010, 1967.

- (46) Swerdlow A. J., De Stavola BL, Swanwick MA, Mangtani P, Maconochie NE. Risk factors for testicular cancer: a case-control study in twins. *Br J Cancer*, 80: 1098-1102, 1999.
- (47) Doria-Rose V. P., Biggs ML, Weiss NS. Subfertility and the risk of testicular germ cell tumors (United States). *Cancer Causes & Control*, 16: 651-656, 2005.
- (48) Skakkebaek N., Jørgensen N. Testicular dysgenesis and fertility. *Andrologia*, 37: 217-218, 2005.
- (49) Raman J. D., Nobert CF, Goldstein M. Increased incidence of testicular cancer in men presenting with infertility and abnormal semen analysis. *J Urol*, 174: 1819-1822, 2005.
- (50) Behre H. M., Kliesch S, Schadel F, Nieschlag E. Clinical relevance of scrotal and transrectal ultrasonography in andrological patients. *Int J Androl*, 18 Suppl 2: 27-31, 1995.
- (51) Pierik F. H., Dohle GR, van Muiswinkel JM, Vreeburg JT, Weber RF. Is routine scrotal ultrasound advantageous in infertile men? *J Urol*, 162: 1618-1620, 1999.
- (52) Pasqualotto F. F., Pasqualotto EB, Sobreiro BP, Hallak J, Medeiros F, Lucon AM. Clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation in a university hospital. *Urol Int*, 76: 122-125, 2006.
- (53) Richiardi L., Akre O, Montgomery SM, Lambe M, Kvist U, Ekblom A. Fecundity and twinning rates as measures of fertility before diagnosis of germ-cell testicular cancer. *J Natl Cancer Inst*, 96: 145-147, 2004.
- (54) International Agency for Research on Cancer. Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. *World Health Organization Classification of Tumours, Edited by John N.Eble, Guido Sauter, Jonathan I.Epstein, Isabell A.Sesterhenn*, 89-120, 2004.
- (55) Looijenga L., Van Agthoven T, Biermann K. Development of malignant germ cells-the genvironmental hypothesis. *Int J Dev Biol*, 57: 241-253, 2013.
- (56) Oosterhuis J. W., Looijenga LH. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nature Reviews Cancer*, 5: 210-222, 2005.

- (57) Kristensen D. M., Sonne SB, Ottesen AM, Perrett RM, Nielsen JE, Almstrup K, Skakkebaek NE, Leffers H, Rajpert-De Meyts E. Origin of pluripotent germ cell tumours: the role of microenvironment during embryonic development. *Mol Cell Endocrinol*, 288: 111-118, 2008.
- (58) Rajpert-De Meyts E. Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Hum Reprod Update*, 12: 303-323, 2006.
- (59) Skakkebaek N., Berthelsen J, Giwercman A, Müller J. Carcinoma - in - situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int J Androl*, 10: 19-28, 1987.
- (60) Mostofi F. K., Spaander P, Grigor K, Parkinson CM, Shakkebaek NE, Oliver RT. Consensus on pathological classifications of testicular tumours. *Prog Clin Biol Res*, 357: 267-276, 1990.
- (61) 丸田 大, 志田 洋, 竹原 浩. 両側同時精母細胞性セミノーマの 1 例. *泌尿器科紀要*, 57: 525-528, 2011.
- (62) Rajpert-De Meyts E., Nielsen JE, Skakkebaek NE, Almstrup K. Diagnostic markers for germ cell neoplasms: from placental-like alkaline phosphatase to micro-RNAs. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 53: 177-188, 2015.
- (63) Taylor-Harris P. M., Felkin LE, Birks EJ, Franklin RC, Yacoub MH, Baines AJ, Barton PJ, Pinder JC. Expression of human membrane skeleton protein genes for protein 4.1 and betaIIISigma2-spectrin assayed by real-time RT-PCR. *Cell Mol Biol Lett*, 10: 135-149, 2005.
- (64) Terada N., Ohno N, Yamakawa H, Baba T, Fujii Y, Zea Z, Ohara O, Ohno S. Immunohistochemical study of protein 4.1B in the normal and W/W(v) mouse seminiferous epithelium. *J Histochem Cytochem*, 52: 769-777, 2004.
- (65) Kusz K. M., Tomczyk L, Sajek M, Spik A, Latos-Bielenska A, Jedrzejczak P, Pawelczyk L, Jaruzelska J. The highly conserved NANOS2 protein: testis-specific expression and significance for the human male reproduction. *Mol Hum Reprod*, 15: 165-171, 2009.

- (66) Yi C., McCarty JH, Troutman SA, Eckman MS, Bronson RT, Kissil JL. Loss of the putative tumor suppressor band 4.1B/Dal1 gene is dispensable for normal development and does not predispose to cancer. *Mol Cell Biol*, 25: 10052-10059, 2005.
- (67) Yang S., Weng H, Chen L, Guo X, Parra M, Conboy J, Debnath G, Lambert AJ, Peters LL, Baines AJ, Mohandas N, An X. Lack of protein 4.1G causes altered expression and localization of the cell adhesion molecule nectin-like 4 in testis and can cause male infertility. *Mol Cell Biol*, 31: 2276-2286, 2011.
- (68) Meyts R., Jacobsen G, Bartkova J, Aubry F, Samson M, Bartek J, Skakkebaek N. The immunohistochemical expression pattern of Chk2, p53, p19INK4d, MAGE - A4 and other selected antigens provides new evidence for the premeiotic origin of spermatocytic seminoma. *Histopathology*, 42: 217-226, 2003.
- (69) Stoop H., van Gurp R, de Krijger R, van Kessel AG, Köberle B, Oosterhuis W, Looijenga L. Reactivity of germ cell maturation stage-specific markers in spermatocytic seminoma: diagnostic and etiological implications. *Laboratory investigation*, 81: 919-928, 2001.
- (70) Kraggerud S. M., Berner A, Bryne M, Pettersen EO, Fossa SD. Spermatocytic seminoma as compared to classical seminoma: an immunohistochemical and DNA flow cytometric study. *APMIS*, 107: 297-302, 1999.
- (71) Haroon S., Tariq MU, Fatima S, Kayani N. Spermatocytic seminoma: a 21 years' retrospective study in a tertiary care hospital in Pakistan. *Int J Clin Exp Pathol*, 6: 2350-2356, 2013.
- (72) Cao D., Li J, Guo CC, Allan RW, Humphrey PA. SALL4 is a novel diagnostic marker for testicular germ cell tumors. *Am J Surg Pathol*, 33: 1065-1077, 2009.
- (73) Kao C., Badve SS, Ulbright TM. The utility of immunostaining for NUT, GAGE7 and NY - ESO - 1 in the diagnosis of spermatocytic seminoma. *Histopathology*, 65: 35-44, 2014.
- (74) Bartkova J., Falck J, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Lukas J, Bartek J. Chk2 tumour suppressor protein in human spermatogenesis and testicular germ-cell tumours. *Oncogene*, 20: 5897-5902, 2001.

(75) Aubry F., Satie A, Rioux - Leclercq N, Meyts R, Spagnoli GC, Chomez P, De Backer O, Jégou B, Samson M. MAGE - A4, a germ cell specific marker, is expressed differentially in testicular tumors. *Cancer*, 92: 2778-2785, 2001.

(76) Lim J., Goriely A, Turner GD, Ewen KA, Jacobsen GK, Graem N, Wilkie AO, Meyts R. OCT2, SSX and SAGE1 reveal the phenotypic heterogeneity of spermatocytic seminoma reflecting distinct subpopulations of spermatogonia. *J Pathol*, 224: 473-483, 2011.