

博士論文

精巣癌の新規予後規定因子 Tripartite motif 44 (TRIM44) の  
同定および解析に関する研究

山田 雄太

## 目次

第 1 章 要旨 .....	7
第 2 章 序文 .....	8
第 3 章 方法	
3-1 対象 .....	14
3-2 使用した抗体 .....	14
3-3 免疫学的染色法	
3-3-1 染色方法 .....	15
3-3-2 解析方法 .....	16
3-4 細胞培養 .....	16
3-5 DNA プラスミドの作製およびトランスフェクション.....	17
3-6 ウェスタンブロッティング法 .....	17
3-7 RNA 抽出および Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) .....	18
3-8 Small interfering RNA (siRNA) トランスフェクション .....	20
3-9 機能実験	
3-9-1 細胞増殖能実験 .....	20
3-9-2 細胞遊走能実験 .....	21

3-9-3	TUNEL 染色実験	22
3-10	マイクロアレイ実験	23
3-11	統計学的解析	23
第4章 結果		
4-1	精巣癌における TRIM44 の免疫学的発現	24
4-2	精巣癌における TRIM44 免疫学的発現の臨床的意義	
4-2-1	TRIM44 免疫学的発現と臨床病理学的パラメーターとの関連	27
4-2-2	TRIM44 免疫学的発現と予後の関連	30
4-3	精巣癌細胞の TRIM44 一過性過剰発現と機能解析	
4-3-1	精巣癌細胞の TRIM44 一過性過剰発現	33
4-3-2	TRIM44 の一過性過剰発現は精巣癌細胞の増殖能を促進した	35
4-3-3	TRIM44 の一過性過剰発現は精巣癌細胞の遊走能を促進した	38
4-4	精巣癌細胞における TRIM44 ノックダウンと機能解析	
4-4-1	精巣癌細胞の TRIM44 ノックダウン	41
4-4-2	TRIM44 ノックダウンは精巣癌細胞の増殖能を抑制した	44
4-4-3	TRIM44 ノックダウンは精巣癌細胞の遊走能を抑制した	46
4-4-4	TRIM44 ノックダウンは精巣癌細胞のアポトーシスを促進した	49
4-5	TRIM44 ノックダウンにより発現レベルが変動した遺伝子の多くは	

癌関連遺伝子であった（マイクロアレイ実験） .....	53
4-6 TRIM44 依存性シグナルの mRNA 発現 .....	56
第 5 章 考察 .....	58
第 6 章 まとめ .....	64
第 7 章 結論 .....	65
謝辞 .....	66
略語一覧 .....	67
引用文献 .....	69

## 図表目次

図 1 ユビキチン経路における蛋白の分解までの流れ .....	12
図 2 TRIM family と TRIM44 分子の構造 .....	13
図 3 精巣癌組織における TRIM44 の免疫学的発現 .....	25
図 4 TRIM44 の免疫学的発現と精巣癌の予後 .....	31
図 5 TRIM44 を一過性過剰発現した精巣癌腫瘍の TRIM44 蛋白の発現 .....	34
図 6 TRIM44 を一過性過剰発現した NTERA2 細胞の細胞増殖能実験 .....	36
図 7 TRIM44 を一過性過剰発現した NEC8 細胞の細胞増殖能実験 .....	37
図 8 TRIM44 を一過性過剰発現した NTERA2 細胞の細胞遊走能実験 .....	39
図 9 TRIM44 を一過性過剰発現した NEC8 細胞の細胞遊走能実験 .....	40
図 10 TRIM44 をノックダウンした精巣癌細胞の TRIM44 の mRNA 発現 .....	42
図 11 TRIM44 をノックダウンした精巣癌細胞の TRIM44 蛋白の発現 .....	43
図 12 TRIM44 をノックダウンした精巣癌細胞の増殖能 .....	45
図 13 TRIM44 をノックダウンした NTERA2 細胞の遊走能実験 .....	47
図 14 TRIM44 をノックダウンした NEC8 細胞の遊走能実験 .....	48
図 15 TRIM44 をノックダウンした NTERA2 細胞の TUNEL 染色実験 .....	50
図 16 TRIM44 をノックダウンした NEC8 細胞の TUNEL 染色実験 .....	51
図 17 TRIM44 をノックダウンした精巣癌細胞の TUNEL 染色実験（カウント および解析） .....	52

図 18	TRIM44 依存性に発現が変動した遺伝子の mRNA 発現	57
図 19	精巣癌における TRIM44 の作用機序	65
表 1	International Germ Cell Consensus Classification (IGCCC) リスク分類	11
表 2	Intensity score による TRIM44 免疫学的発現の評価	26
表 3	精巣癌における TRIM44 免疫学的発現と臨床的パラメータの関係	28
表 4	精巣癌における TRIM44 免疫学的発現と病理学的因子の関係	29
表 5	精巣癌における癌特異的生存率と各因子との関連	32
表 6	NTERA2 細胞において TRIM44 ノックダウンにより発現が上昇した シグナル（上位 20 以内）	54
表 7	NTERA2 細胞において TRIM44 ノックダウンにより発現が低下した シグナル（上位 20 以内）	55

## 第1章 要旨

Tripartite motif (TRIM) family に属する蛋白は、ユビキチン経路において E3 ユビキチン・リガーゼもしくはモジュレーターとして機能することが知られており、TRIM44 もそのうちの一つである。本研究では、精巣癌における TRIM44 の発現および機能を調べ、精巣癌における TRIM44 の臨床的意義と作用機序を解析した。精巣癌において TRIM44 の発現が陽性の症例では、TRIM44 陰性例と比較して、癌特異的生存率が低いことがわかった。精巣癌細胞株における機能の解析も行い、TRIM44 が細胞増殖、細胞遊走能を促進し、アポトーシスを抑制することを確認した。TRIM44 をノックダウンした NTERA2 細胞のマイクロアレイ実験を行い、TRIM44 によって制御される遺伝子を探索した。その結果、発現レベルが最も変動した遺伝子は癌関連遺伝子が多く、*C3AR1*, *ST3GAL5*, *NT5E (CD73)*, *CDK19*, *CADM1*, *PRKACB* などの遺伝子を同定した。TRIM44 はこれらの遺伝子を制御することで癌増殖や遊走能を促進し、アポトーシスを抑制することで tumorigenesis を促進する役割を担っていると考えられた。

## 第2章 序文

精巣癌は男性癌の 1-2%を占め、比較的まれな癌である [1]。診断は、触診や腫瘍マーカーの測定、画像検査により行うが、診断の確定には精巣摘除術による病理診断が必要である。治療方法としては、精巣摘除術に加えて転移を有する症例では、化学療法、放射線療法、後腹膜リンパ節郭清などの治療方法が存在する[1]。病理組織型は、一般的に seminomatous germ cell tumor (SGCT)と nonseminomatous germ cell tumor (NSGCT) に大別され、治療方法もこの組織型の違いにより異なる [1]。後者の NSGCT はさらに、絨毛癌、胎児性癌、奇形腫、卵黄嚢腫に亜分類されている。精巣癌の大部分の症例では、予後が良好であり転移を有する患者であっても IGCCC リスク分類において good prognosis group であれば 5 年生存率は、SGCT で 86%、NSGCT で 92%である [2]。しかし、poor prognosis group に分類される患者の予後は悪く、NSGCT 患者における 5 年生存率は 48%と決して良いとは言えない（表 1） [1, 2]。

近年、癌治療における化学療法の新規薬剤の開発や治療戦略が、直接的な抗腫瘍効果をもつ古典的抗癌剤治療から Tyrosine kinase inhibitor に代表される分子標的薬剤や抗 PD-L1 抗体を含む免疫学的薬剤などの治療方法にパラダイム・シフトしつつある [3, 4]。これらの新規治療方法の中でも、図 1 に示すユビキチン経路をターゲットとした新規抗癌剤が注目を浴びている [5]。多発性骨髄



腫に用いられる Bortezomib (ベルケイド®)や Carfilzomib (キプロリス®)は、プロテアソームを阻害することで骨髄腫細胞の anti-apoptosis を阻止し、腫瘍細胞の apoptosis を誘導していると考えられている [5, 6]。ユビキチン経路に作用する薬剤の開発は進んでおり、同経路に関与する新規ターゲットとなる分子の探索も行われている。なかでも、Tripartite motif (TRIM) 蛋白が知られており、2 個の zinc finger が合わさった構造の ring finger, B-box, そして coiled coil の 3 つの特徴的構造をもつこれらの蛋白を総称して TRIM ファミリーと呼んでいる (図 2)。

TRIM ファミリーに属する TRIM 蛋白は約 70 種類も同定されており、その大部分が E3 ユビキチン・リガーゼや E3 ユビキチン・リガーゼ モジューレーターとして機能することで蛋白のユビキチン経路に関与し、最終的にはターゲット蛋白がプロテアソームにより分解されることで蛋白の分解が行われることが知られている (図 1) [7]。したがって、TRIM の機能を一言で表すとユビキチン経路に関与し、蛋白の分解も含めた蛋白の修飾を行う分子であるといえる。TRIM ファミリーに属する蛋白は、このような蛋白の制御により転写、細胞増殖、アポトーシス、細胞分化などのさまざまな生物学的プロセスに関与している [8]。特に、悪性腫瘍との関連でいえば、TRIM ファミリーに属する約 70 の遺伝子のうちすでに約 20 の遺伝子が癌関連遺伝子であることが報告されている [9-17]。

本研究で解析を行った TRIM44 もこの TRIM ファミリーに属する。

TRIM44 は、そもそもマウスの脳の cDNA ライブラリーから単離されたものである [18]。分子的構造の特徴としては、TRIM の一般的構造にみられる B-box や coiled-coil を有しているが、ring finger は有しておらず、zinc finger を有している (図 2)。癌との関連でいえば、TRIM44 は、頭頸部癌、食道癌、胃癌、乳癌において強発現していることが知られている[19-21]。また、TRIM44 の過剰発現が癌増殖を促進し、特に胃癌では予後不良となることが報告されている [19]。このように多種の癌において TRIM44 が癌促進作用を有することから、精巣癌の tumorigenesis に関与する TRIM 分子の同定を考えた場合に、TRIM44 は TRIM ファミリーの中でも特に有望であると考えた。さらに、TRIM44 と精巣癌の関連は既知の報告がみられないことから精巣癌における TRIM44 の発現や役割、そしてその機能を明らかにすれば、新たな診断指標や治療標的となる可能性があると考えたと着想するに至った。

本研究は、精巣癌における TRIM44 の発現およびその臨床的意義を検討し、TRIM44 の機能的解析を行うことで精巣癌における TRIM44 の作用機序や役割を解明することを目的とした。

表 1

**International Germ Cell Consensus Classification (IGCCC) リスク分類 [1, 2]**

<b>Good prognosis group</b>	
<b>NSGCT</b> (5 年生存率 92 %)	<b>SGCT</b> (5 年生存率 86%)
精巣もしくは後腹膜原発	原発の部位を問わず
肺以外の臓器転移を認めない	肺以外の臓器転移を認めない
AFP < 1000 ng/ml	AFP 正常
hCG < 5000 IU/l	hCG と LDH 値に上限なし
LDH < 1.5 * ULN	
<b>Intermediate prognosis group</b>	
<b>NSGCT</b> (5 年生存率 80 %)	<b>SGCT</b> (5 年生存率 72%)
精巣もしくは後腹膜原発	原発部位を問わず
肺以外の臓器転移を認めない	肺以外の臓器転移を認める
AFP 1000 – 10000 ng/ml	AFP 正常
hCG 5000 – 50000 IU/l	hCG と LDH 値に上限なし
LDH 1.5 – 10 * ULN	
<b>Poor prognosis group</b>	
<b>NSGCT</b> (5 年生存率 48 %)	<b>SGCT</b>
縦隔原発	分類されず
肺以外の臓器転移を認める	
AFP > 100000 ng/ml	
hCG > 50000 IU/l	
LDH > 10 * ULN	

NSGCT: nonseminomatous germ cell tumor, SGCT: seminomatous germ cell tumor, AFP: alpha-feto protein, hCG: human chorionic gonadotropin, LDH: lactate dehydrogenase, ULN: upper limit of normal range.

本分類は、転移を有する胚細胞腫瘍の患者にのみ適用することが可能。

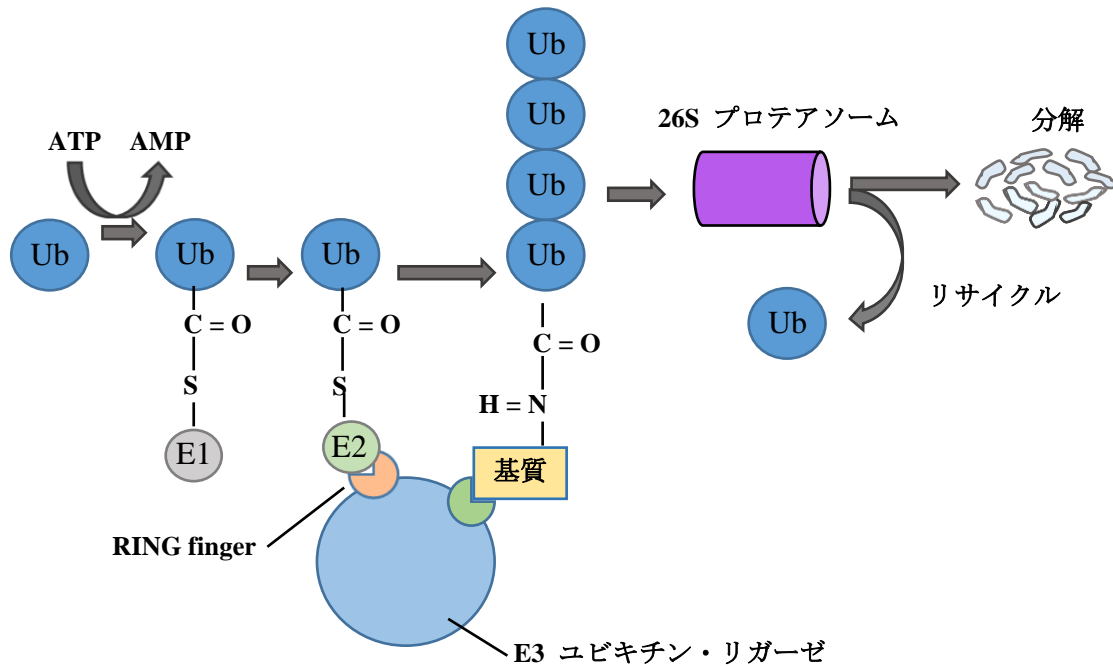
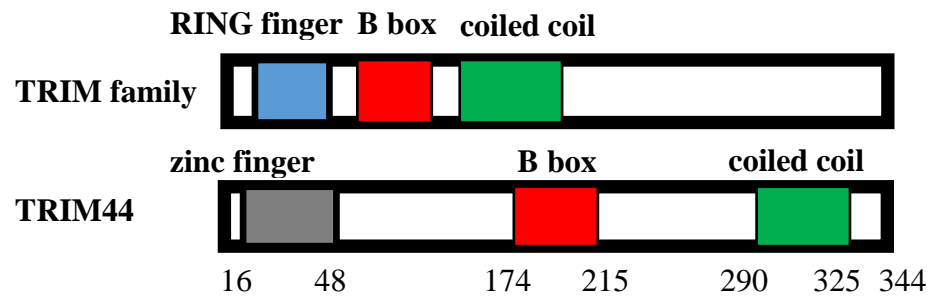


図 1 ユビキチン経路における蛋白の分解までの流れ

Ub: ユビキチン, ATP: adenosine triphosphate, AMP: adenosine monophosphate.

ユビキチンが E1 リガーゼ (ユビキチン活性化酵素) と結合し活性化ユビキチンとなり、E2 リガーゼ (ユビキチン結合酵素) に結合する。この E2 リガーゼ複合体は、E3 リガーゼにある RING finger に結合し、すでに E3 リガーゼに結合している基質にユビキチンがトランスファーされる。ユビキチンが E2 リガーゼ複合体よりはずれたことで E2 リガーゼ複合体は、E3 リガーゼとの結合がはずれる。新たな E2 複合体が E3 リガーゼに結合することで新たなユビキチンが基質にトランスファーされることになる。こうして複数のユビキチンが基質に連なることとなり 26S プロテアソームにより基質は分解される。TRIM family に属する蛋白の多くが E3 ユビキチン リガーゼもしくはそのモジュレーターである。



**図 2 TRIM family と TRIM44 分子の構造**

一般的に TRIM は、RING finger, B box, coiled coil の 3 つの特徴的な構造を有している。RING finger は、2 個の zinc finger が合体したユニークな構造をもつ。そして、ユビキチン経路において E2 ユビキチン複合体が E3 ユビキチン・リガーゼと結合するドメインである。B box の役割はまだよくわかっていない。Coiled coil は、基質と結合するドメインである。

TRIM44 は、B box, Coiled coil を有しているが、RING finger をもたず、zinc finger を有している。

## 第3章 方法

### 3-1 対象

1985-2006 年に東京大学医学部付属病院で施行した精巣摘除術を施行し、精巣癌（精巣原発胚細胞腫瘍）と診断された 103 例を対象とした。年齢、手術日、腫瘍マーカーの値、病理所見、最終生存確認日などの臨床情報をレトロスペクティブに調査した。なお、本研究を行うにあたり倫理委員会の許可を得ている（倫理番号 #2283）。

### 3-2 使用した抗体

抗 DYKDDDDK タグ抗体（抗 flag 抗体）は、Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) より、抗 GAPDH 抗体は、Sigma-Aldrich Japan (Tokyo, Japan)より購入した。抗 TRIM44 ポリクローナル抗体は、下記のごとく作成した [22]。本抗体は、マウス TRIM44 蛋白を含む glutathione S-transferase (GST) 融合タンパクを抗原としてウサギに免疫した後、アフィニティ精製したポリクローナル抗体である。抗血清は、GST 結合レジンに溶解され抗 GST 抗体を除去した。ろ過された非溶解物は、抗原を含むアフィニティ・カラムを通され精製した。抗体の精製の質はウェスタンブロッティング法によりヒト TRIM44 トランスフェクションされた 293T 細胞株で確認した。

### 3-3 免疫学的染色法

#### 3-3-1 染色方法

病理診断のために通常の臨床診療に用いている病理検体ブロックと同じブロックより切片を作成し未染色プレパラートを作成した。したがって下記の染色にて診断が不明瞭な病変に関しては、通常診療用にすでに作成されているヘマトキシリン-エオジン染色の切片を参考にした。

TRIM44 の免疫染色は、streptavidin-biotin 法により行った [23]。6  $\mu\text{m}$  厚の切片を作成しこれをキシレンに 3 分浸漬し、計 3 回行い、脱パラフィン化した。濃度を順次下げたエタノール (100%  $\rightarrow$  95%  $\rightarrow$  70%) にて脱水しトリス塩バッファー (Tris-Buffered Saline; TBS) にて計 3 回洗浄した。クエン酸溶液 (2 mM citric acid and 9 mM trisodium citrate dehydrate, pH 6.0) を用いて 121°C オートクレーブ 10 分にて抗原の賦活化を行った。3 分間のクーリングの後、切片は TBS で洗浄し、0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  を用いて内因ペロキシダーゼのブロッキングを行った。10% ウシ血清アルブミンを 60 分間切片にのせた後、抗 TRIM44 抗体をのせ、その上からカバーガラスを被せ、4°C にて一晚反応を行った。抗 TRIM44 抗体は、10% ウシ血清アルブミンにて 200 倍希釈したものを使用した。一晚の反応の後、切片を TBS で洗浄し、CSA II <sup>TM</sup> (DAKO, Carpinteria, CA, USA) にて 2 次抗体反応

を行った。抗原抗体複合体は、3,3'-diaminobenzidine tetrachloride (DAB) 溶液 (1 mM DAB, 50 mM Tris-HCL buffer, pH 7.6, and 0.006% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)により発色させ、反応は精製水により止めた。適度な染色に必要な反応時間は 45 秒であった。陰性コントロールには、1 次抗体として抗ラビット IgG 抗体を使用した。

### 3-3-2 解析方法

免疫学的染色した切片は、intensity score を用いて評価した [23, 24]。すなわち免疫学的反応は、0 から 3+ (0 : なし、1+ : 弱、2+ : 中、3+ : 強) まで分類された。2 人の観察者が免疫染色した切片を観察、評価し、その評価が割れた場合には、3 人目の観察者が判定を行いその結果をもって最終判断とした [24]。

### 3-4 細胞培養

本研究では、293T (ヒト胎児由来腎臓上皮細胞), NTERA2 (精巣原発 NSGCT), NEC8 (精巣原発 NSGCT)の細胞株が使用された。すべての細胞が、37°C 下、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養された。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)と Roswell Park Memorial Institute (RPMI) は、Sigma-Aldrich Japan (Tokyo, Japan)より購入し、10% fetal bovine serum (FBS)と 1% penicillin-streptomycin とするよう調整後、メディウムとして使用した。



### 3-5 DNA プラスミドの作成およびトランスフェクション

N 末端に FLAG タグづけされたヒト TRIM44 cDNA は、polymerase chain reaction (PCR) により増幅した。生成した PCR 産物は、pcDNA3 (Invitrogen, St. Louis, MO, USA) にサブクローニングされ哺乳類発現プラスミドを生成した。

細胞は 6 穴プレートで培養し 24 時間後にトランスフェクションされた。Lipofectamine 3000 (Invitrogen, St. Louis, MO, USA) を製造会社プロトコルに従って用い、FLAG タグ付き TRIM44 発現ベクター (pcDNA3-FLAG-TRIM44) およびベクター単独 (pcDNA3-vector) でトランスフェクションを行った。細胞抽出は、トランスフェクションしてから 48 時間後に行われ、蛋白の発現をウェスタンブロッティング法により分析した [24]。

### 3-6 ウェスタンブロッティング法

ウェスタンブロッティング法は以下のごとく施行した [25]。ディッシュに培養された細胞は PBS (phosphate buffered saline) にて洗浄後、proteinase inhibitor 入りの NP40 バッファー溶液 (50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40) に溶解しタンパクを抽出し同濃度となるように希釈した。sodium dodecyl sulfate (SDS) サンプル・バッファーおよびメルカプトエタノールを混ぜその懸濁液を 100°C 5

秒加熱した。ポリアクリルアミドゲル内（10% SDS-polyacrylamide）へ流し電気泳動した（150V, 45 分）。次に分離したタンパクを、電圧をかけてゲルからメンブレンに転写した（0.1 mA, 60 分）。転写されたメンブレンは TBS で洗浄し、Blocking One® (ナカライテスク株式会社)にてブロッキングを行った（60 分）。1 次抗体と指定の希釈濃度で一晩反応させた。抗 TRIM44 抗体、抗 FLAG 抗体、抗 GAPDH 抗体は、それぞれ、500 倍、1000 倍、1 万倍の濃度に希釈して使用した。メンブレンは、TBS で洗浄後、2 次抗体と反応させた（60 分）。TBS で洗浄後、enhanced chemiluminescence system (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社)にて発光しバンドを検出した。

293T 細胞に pcDNA3-vector もしくは pcDNA3-FLAG-TRIM44（TRIM44 発現ベクター）をトランスフェクションし、これらを陰性コントロールと陽性コントロールとして用いた [24]。

### **3-7 RNA 抽出および Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)**

Total RNA は ISOGEN™ reagent (ニッポン・ジーン株式会社)を用いて抽出した。PrimeScript™ (タカラバイオ株式会社)を用いて first strand cDNA を合成した。Applied Biosystems 7300 real time PCR system を用いてインターカレーター

法により SYBR Greenfluorescence を使用しリアルタイム PCR を施行した。mRNA の発現レベルは、GAPDH をコントロールとし各発現量の相対量を測定した [23, 24]。プライマーの配列は、以下の通りで使用した。

*GAPDH* forward: 5'-GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA

*GAPDH* reverse: 5'-GTGGTCGTTGAGGGCAATG

*TRIM44* forward: 5'-GTGGACATCCAAGAGGCAAT

*TRIM44* reverse: 5'-AGCAAGCCTTCATGTGTCCT

*C3AR1* forward: 5'-ATGGCGTCTTTCTCTGCTG

*C3AR1* reverse: 5'-CCCTGGCAATCCCAGTAAAAA

*ST3GAL5* forward: 5'- GAGCAATGCCAAGTGAGTACA

*ST3GAL5* reverse: 5'-GGGCCTTCTCATCTTGCTT

*NT5E* forward: 5'-TGAATTATTAAGACATGACTCTGGTGA

*NT5E* reverse: 5'-TGGAAACTTGATCCGACCT

*CDK19* forward: 5'-GAGCATGACTTGTGGCATATT

*CDK19* reverse: 5'-TGGATACCATCAAGAATCTGGT

*CADM1* forward: 5'-TAAAAGGCAAATCGGAGGTG

*CADM1* reverse: 5'-AGATCACTGGGACCCCATC

*PRKACB* forward: 5'-TTTACCAGAGGAAGGTTGAAGC

*PRKACB* reverse: 5'-GAGACACGGATATCTTCTTCTTCAT

### 3-8 Small interfering RNA (siRNA) トランスフェクション

TRIM44 のノックダウンには、small interfering RNA (siRNA) トランスフェクション法を用いた。TRIM44 をターゲットにした 3 種類の siRNA およびノンターゲット siRNA をフナコシ株式会社より購入した。Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, St. Louis, MO, USA)を用いて、販売会社のプロトコルに従い、精巢原発 NSGCT (NTERA2、NEC8)の細胞に siRNA トランスフェクションを行った。TRIM44 のノックダウン効率は、RT-PCR 法とウェスタンブロッティング法により確認した。siRNA のセンス鎖配列は、以下の通りのものを使用した [24]。

siControl: 5'- GUACCGCACGUCAUUCGUAUC - 3'

siTRIM44 #1: 5' - GAAUCAGUCGGAUACUCAUAG - 3'

siTRIM44 #2: 5' - CCGAGUAAGCAGGGAUGUACU - 3'

siTRIM44 #3: 5' - CCGCUAUGAUCGAAUUGGUGG - 3'

### 3-9 機能実験

#### 3-9-1 細胞増殖能実験

NTERA2 細胞を用いた実験では、96 ウェルプレートに細胞数が  $4.0 \times 10^3$

cells/well となるようにウェルに細胞を播種し、NEC8 細胞を用いた実験では、 $3.0 \times 10^3$  cells/well となるように播種した。24 時間後にトランスフェクションを行った。細胞増殖能実験は、MTS assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)を用いて解析した。販売会社プロトコルに従い、The Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (プロメガ株式会社)を使用した。MTS assay は、5 ウェルで行われ、その平均値  $\pm$  standard deviation (SD)を解析した [24]。

### 3-9-2 細胞遊走能実験

Transwell migration assay を用いて細胞の遊走能実験を行った。フィブロネクチン 5 $\mu$ l+PBS 混合液を 24 ウェルプレートに 500 $\mu$ l ずつ入れ、その上へ 8.0  $\mu$ m のポアサイズの polyethylene terephthalate (PET) filter (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)つきのメンブレンインサートを挿入し 30 分インキュベート。別のウェルに 700  $\mu$ l の FBS 入りメディウムをいれた。遊走能を評価したい  $5 \times 10^4$  個の細胞を 300  $\mu$ l の FBS を含まないメディウムで希釈した。次に、インサートを取り出し、700  $\mu$ l の FBS 入りメディウムが入っているウェルへ挿入した。 $5 \times 10^4$  個 / 300  $\mu$ l FBS (-) メディウムをインサート内へ滴下し、37  $^{\circ}$ C 下で 24 時間インキュベート。綿棒でインサート内を拭き、PBS にて 3 回洗浄。メタノールに

30 分漬けて固定後、PBS にて洗浄。インサートをギムザ液に 30 秒浸し PBS で洗浄。インサート底を尖刃にて切り取り、プレパラートに接着し顕微鏡にてカウントを行った。200 倍の視野でランダム 5 視野の遊走した細胞の数をカウントしその平均値  $\pm$  SD を解析に用いた [24]。

### 3-9-3 TUNEL 染色実験

アポトーシスの解析目的で DEADEND<sup>TM</sup> Fluorometric TUNEL System<sup>®</sup> (プロメガ株式会社)を用いた TUNEL アッセイを施行した。6 ウェルプレートに細胞数を  $1.0 \times 10^5$  ウェルとなるように播種し 24 時間培養した。細胞は、前述に従い siRNA トランスフェクションし 24 ウェルプレート内の Poly-L-Lysine coated glass (松浪硝子工業株式会社)に再度播種された。24 時間後に、販売会社のプロトコル通りに、細胞を TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labelling)染色した。核の染色には DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) (サーモフィッシュサイエンティフィック株式会社) を使用し、シグナルのキャプチャーには、デジタル顕微鏡 (VH-8000, 株式会社キーエンス) を用いた。TUNEL 染色陽性細胞と viable な精巣癌細胞の数をランダム 5 視野 ( $\times 100$ ) にてカウントした。データは、平均値  $\pm$  SD で表示した [24]。

### 3-10 マイクロアレイ実験

NTERA2 細胞において TRIM44 に制御される遺伝子を同定する目的でマイクロアレイ実験を施行した。コントロール群と siRNA 処理群で遺伝子発現量の比較を行った。Qiagen RNeasy<sup>®</sup> micro kit を用いて、siRNA トランスフェクションされた NTERA<sup>2</sup>細胞より Total RNA を抽出した。RNA integrity number (RIN) 値は、すべて 8.0 をこえていることを確認した。GeneChip Human Exon 1.0 ST array (アフィメトリクス社) を使用しマイクロアレイ実験・解析を行った [21]。遺伝子の発現量は log2 変換されカットオフ値は 0.3 (発現上昇) もしくは -0.3 (発現低下) に設定した [20]。

### 3-11 統計学的解析

統計解析には、JMP<sup>®</sup> Pro version 11.0.2 (©2010 SAS Institute Inc.)を使用した。カテゴリカル・バリューに関しては、Pearson's chi-square test ( $\chi^2$ )もしくは、frequency が<5 の場合には Fisher's test を適用した。TRIM44 発現陽性群および発現陰性群における癌特異的生存率や全生存率の比較には Log-rank test を用いた。qRT-PCR, MTS assay, migration assay, TUNEL 染色実験には Student's t test を適用した。P<0.05 で統計学的に有意とみなした。

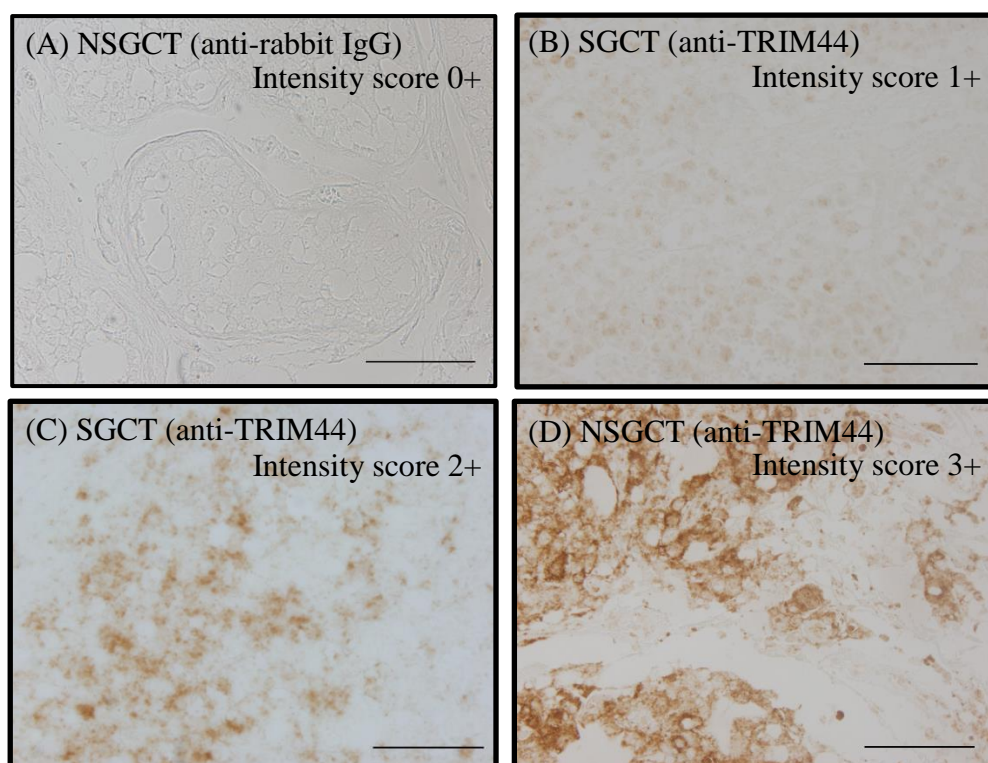
## 第4章 結果

### 4-1 精巣癌における TRIM44 の免疫学的発現

精巣癌の切片を抗 TRIM44 抗体で免疫染色した。図 3 に TRIM44 免疫染色の代表的写真を示す。Nonseminomatous germ cell tumor (NSGCT)の切片を anti-rabbit IgG 抗体で免疫染色し、染色が見られなかったことを確認した（陰性コントロール、図 3A）。Seminomatous germ cell tumor (SGCT) を anti-TRIM44 抗体で免疫染色した切片では、図 3B (intensity score 1+)のように淡く染色される症例や図 3C (intensity score 2+)のように中等度の免疫学的染色を認める症例を散見した。NSGCT を anti-TRIM44 抗体で免疫染色した切片では、強発現している症例も認めた（図 3D, intensity score 3+）。また、TRIM44 発現の局在は、細胞質優位であった。

精巣癌における TRIM44 の免疫学的発現を intensity score を用いて評価した。精巣癌全体では、103 例中 41 例で intensity score が 1+ から 3+であり、intensity score の中央値は 0、平均値は 0.51 であった（表 2）。そこで、TRIM44 の免疫学的陽性のカットオフ値を 1+と定め、1+以上の intensity score を持つ症例を「TRIM44 免疫学的陽性」と判断した。





### 図 3 精巣癌組織における TRIM44 の免疫学的発現

精巣癌組織における TRIM44 の免疫学的発現の代表的な写真を示す。(A) NSGCT (nonseminomatous germ cell tumor) の切片に rabbit IgG 抗体を 1 次抗体として免疫染色した (陰性コントロール, 0+)。 (B) SGCT (seminomatous germ cell tumor) の切片。TRIM44 染色にて SGCT 細胞が淡く染色された (1+)。 (C) SGCT の切片。細胞質優位に TRIM44 の中等度の免疫学的発現がみられた (2+)。 (D) NSGCT (nonseminomatous germ cell tumor) で細胞質優位に TRIM44 の強い免疫学的発現がみられた (3+)。 Scale bar = 100 μm。

表 2

## Intensity score による TRIM44 免疫学的発現の評価

TRIM44 intensity score	症例数 (%)		
	SGCT	NSGCT	精巣癌
0	46 (74)	16 (39)	62 (60)
1+	10 (16)	10 (25)	20 (19)
2+	5 (8)	12 (29)	17 (17)
3+	1 (2)	3 (7)	4 (4)
計	62 (100)	41 (100)	103 (100)
TRIM44 intensity score	SGCT	NSGCT	精巣癌
中央値	0	1	0
平均値	0.37	1.05	0.51

免疫学的染色は、Intensity score を用いて 0 to 3+に分類した（0: 免疫学的染色なし, 1+: 弱い染色, 2+: 中等度の染色, 3+: 強い染色。精巣癌全体の免疫学的染色の中央値は 0, 平均値は 0.51 であった。TRIM44 の免疫学的反応は、intensity score 1+以上で免疫学的発現が「陽性」と判断した。

## 4-2 精巣癌における TRIM44 免疫学的発現の臨床的意義

### 4-2-1 TRIM44 の免疫学的発現と臨床病理学的パラメーターとの関連

TRIM44 免疫学的陽性と陰性の群では、年齢に関して、有意差を認めなかった ( $P = 0.198$ , 表 3)。TRIM44 免疫学的陽性は、AFP 値 ( $P = 0.0009$ ), N stage ( $P = 0.0035$ ), 臨床病期 (Stage 1 vs Stage 2,  $P = 0.0073$ ) と有意に関連があった (表 2)。そのほかの腫瘍マーカーに関して、LDH および  $\beta$ hCG は、TRIM44 免疫学的陽性と有意な関連を認めなかった (表 3)。Seminomatous germ cell tumor (SGCT) および nonseminomatous germ cell tumor (NSGCT) における TRIM44 の免疫学的発現陽性率は、それぞれ 16/62 (26%) と 25/41 (61%) であり、NSGCT のほうが SGCT と比較して TRIM44 免疫学的が陽性の症例が有意に多かった ( $P = 0.0004$ , 表 3)。病理組織型の種類以外で TRIM44 免疫学的発現と有意に関連のある病理学的パラメータを認めなかった (表 4)。

表 3  
精巣癌における TRIM44 免疫学的発現と臨床的パラメータの関係 (N = 103)

臨床的パラメーター		TRIM44 免疫学的発現		
		陰性 (N = 62)	陽性 (N = 41)	P 値
年齢 (歳 ± SD)		35.4 ± 10.8	31.9 ± 12.1	0.198
腫瘍マーカー				
LDH (n = 98)	正常	31	17	0.5037
	異常高値	29	21	
	不明	2	3	
AFP (n = 99)	正常	47	19	0.0009
	異常高値	12	21	
	不明	3	1	
βhCG (n = 102)	正常	25	14	0.5892
	異常高値	37	26	
	不明	0	1	
T stage	T1	35	24	0.8341
	T2-T4	27	17	
N stage	N0	50	22	0.0035
	N1-3	12	19	
M stage	M0	58	34	0.1093
	M1	4	7	
S stage (n = 102)	S0	17	7	0.2489
	S1	45	33	
	不明	0	1	
Stage (TNM 分類)	Stage 1	50	22	0.0035
	Stage 2	12	19	
IGCCC リスク分類 (N = 31)	Good	9	9	0.3142
	Intermediate	2	7	
	Poor	1	3	

TRIM44: tripartite motif 44, LDH: lactate dehydrogenase, AFP: alpha-fetoprotein, βhCG: β human chorionic gonadotropin, stage (TNM 分類): stage1 は転移なし、stage2 は転移あり。IGCCC: International Germ Cell Consensus Classification (転移症例のみ適用可能)

表 4

精巣癌における TRIM44 免疫学的発現と病理学的因子の関係 (N = 103)

病理学的因子		TRIM44 免疫学的発現		
		陰性 (N = 62)	陽性 (N = 41)	P 値
組織型	SGCT	46	16	0.0004
	NSGCT	16	25	
白膜浸潤	無	44	29	0.4596
	有	18	11	
	不明	0	1	
微小血管浸潤	無	46	28	0.5145
	有	16	13	
微小リンパ管浸潤	無	54	31	0.1329
	有	8	10	
鞘膜浸潤	無	53	36	0.5603
	有	9	4	
	不明	0	1	
精巣上体浸潤	無	53	36	0.5078
	有	7	5	
	不明	2	0	
精索浸潤	無	54	34	0.5570
	有	8	7	

TRIM44: tripartite motif 44, SGCT: seminomatous germ cell tumor, NSGCT: nonseminomatous germ cell tumor. 免疫学的発現は、intensity score (0, none; 1, weak; 2, moderate; and 3, strong)を用いて評価した。Intensity score 1 以上で免疫学的発現「陽性」と判断した。Pearson's chi-square test を使用し TRIM44 免疫学的発現とパラメーターとの関係を統計学的に解析した。ただし、「鞘膜浸潤」は、Fisher's test を用いて解析した。

#### 4-2-2 TRIM44 の免疫学的発現と予後との関連

精巣癌患者における TRIM44 免疫学的発現と予後に関して図 4 に示す。

精巣癌患者全体 (N = 103) で、TRIM44 発現陽性群は、陰性群と比較して癌特異的生存率が低かった (P = 0.0140, 図 4A)。

次に、サブ解析として NSGCT と SGCT の患者にわけて癌特異的生存率を解析した。NSGCT の患者でも同様に TRIM44 発現陽性群で予後が悪い傾向がみられた(P = 0.0604, 図 4B)。一方で、SGCT の患者では、癌特異的生存率に関して TRIM44 発現陽性群と陰性群との間に有意な差を認めなかった(P = 0.5159, 図 4C)。

癌特異的生存率との関連で N stage, M stage, 病理組織型、TRIM44 の免疫学的発現を含めて多変量解析を行ったところ、TRIM44 発現陽性は、癌特異的生存率に関して有意に低下する因子であった (P = 0.046, 表 5)。

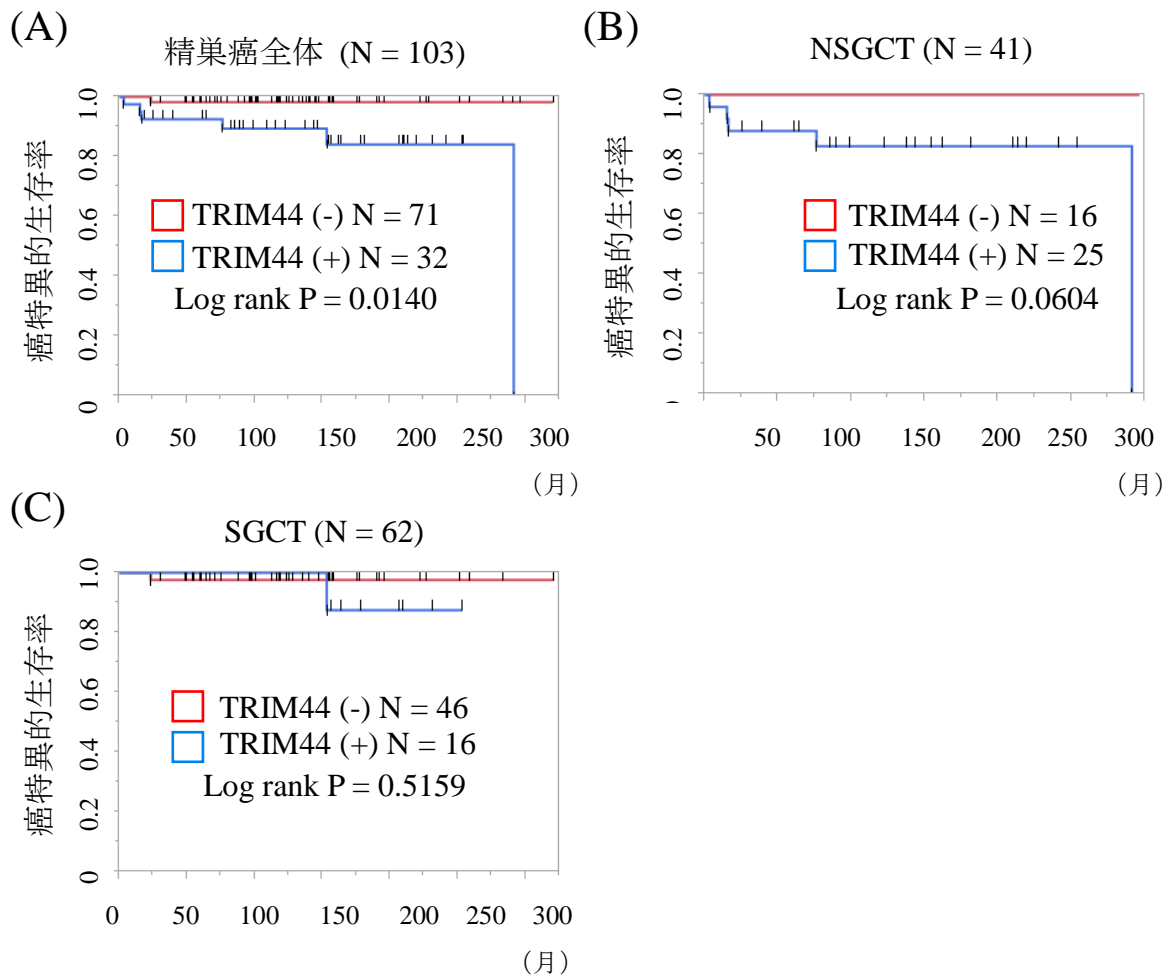


図 4 精巣癌における TRIM44 の免疫学的発現と予後

TRIM: Tripartite motif, NSGCT: nonseminomatous germ cell tumor, SGCT: seminomatous germ cell tumor.

(A) 精巣癌患者における癌特異的生存率と TRIM44 免疫学的発現の関係 (N = 103)。TRIM44 発現陽性群は予後が悪かった(P = 0.0140, Log rank test)。(B) NSGCT 患者における癌特異的生存率と TRIM44 発現の関係。TRIM44 発現陽性群の予後は悪い傾向にあった (P = 0.0604, Log rank test)。(C) SGCT 患者における癌特異的生存率と TRIM44 発現の関係。TRIM44 発現陽性群と陰性群の間に有意な差を認めなかった(P = 0.5159, Log rank test)。

表 5 精巣癌における癌特異的生存率と各因子との関連

因子	単変量解析		多変量解析	
	オッズ比 (95% CI)	P 値	オッズ比 (95% CI)	P 値
S stage (S0 vs ≥ S2)	3.2 (0.7 - 17.1)	0.144		
T stage (T1 vs ≥ T2)	3.7 (0.7 - 26.4)	0.112		
N stage (N0 vs ≥ N1)	17.0 (2.7 - 330.1)	0.001	7.9 (0.6 - 220.3)	0.127
M stage (M0 vs M1)	17.0 (3.2 - 102.2)	0.001	6.9 (0.9 - 74.0)	0.058
脈管侵襲 (無 vs 有)	2.9 (0.6 - 15.7)	0.174		
組織型 (SGCT vs NSGCT)	4.2 (0.8 - 30.1)	0.079	0.4 (0 - 4.5)	0.417
TRIM44 免疫学的発現 (陰性 vs 陽性)	10.5 (1.7 - 201.7)	0.009	10.5 (1.0 - 299.0)	0.046

CI: confidence interval, SGCT: seminomatous germ cell tumor, NSGCT: nonseminomatous germ cell tumor, TRIM44: tripartite motif protein 44。単変量解析と多変量解析に回帰分析を用いた。P 値 < 0.05 を有意とした。



### 4-3 精巣癌細胞の TRIM44 一過性過剰発現と機能解析

#### 4-3-1 精巣癌細胞の TRIM44 一過性過剰発現

NTERA2、NEC8 細胞に TRIM44 発現ベクターをトランスフェクションし TRIM44 の一過性過剰発現を行った (NTERA2-TRIM44 細胞と NEC8-TRIM44 細胞)。陽性コントロールは、TRIM44 発現ベクター (pcDNA3-FLAG-TRIM44) を 293T 細胞にトランスフェクションしものを使用した。また、TRIM44 発現ベクターの陰性コントロールとして TRIM44 を含まない Vector (pcDNA3)を用いて同様に NTERA2 と NEC8 にトランスフェクションした (NTERA2-Vector 細胞と NEC8-Vector 細胞)。各細胞における TRIM44 と FLAG の蛋白発現をウェスタンブロッティング法により確認した。

NTERA2-TRIM44 細胞では、TRIM44 発現ベクターにタグ付けされている FLAG のバンドが検出できており、コントロールである NTERA2-Vector 細胞では FLAG のバンドは検出されなかった。また、NTERA2-TRIM44 細胞では、TRIM44 のバンドがみられた (図 5B)。NEC8-TRIM44 細胞でも TRIM44 プラスミドにタグ付きされている FLAG のバンドを検出しており、コントロールである NEC8-Vector 細胞では FLAG のバンドは検出されなかった。また、NEC8-TRIM44 細胞では、TRIM44 のバンドがみられた (図 5B)。

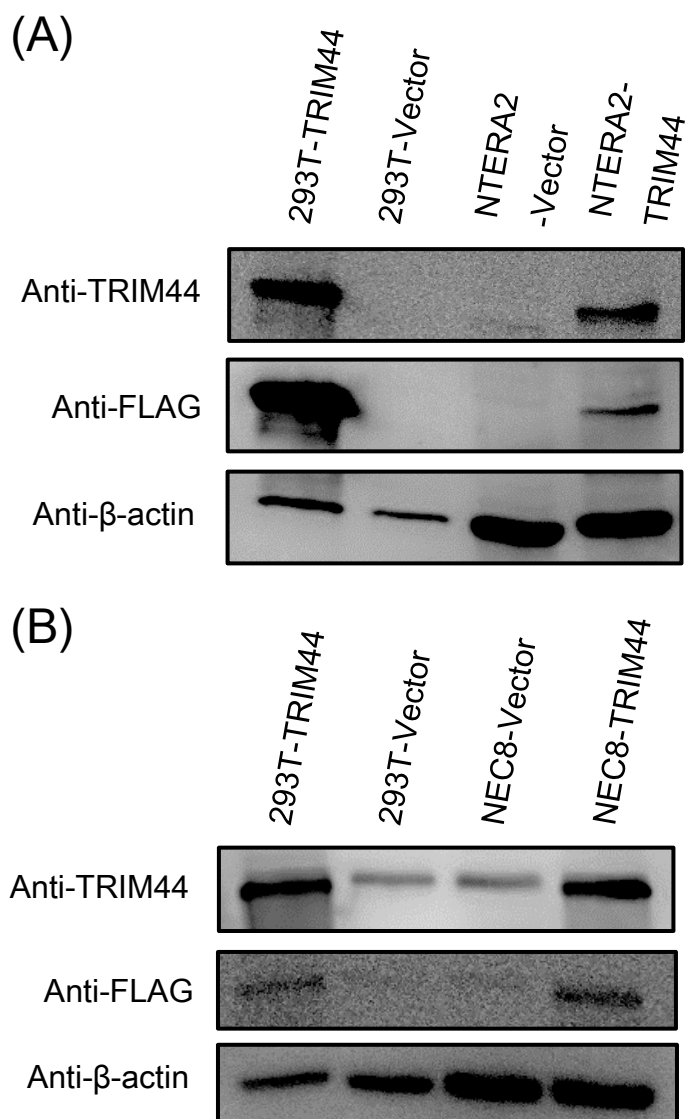
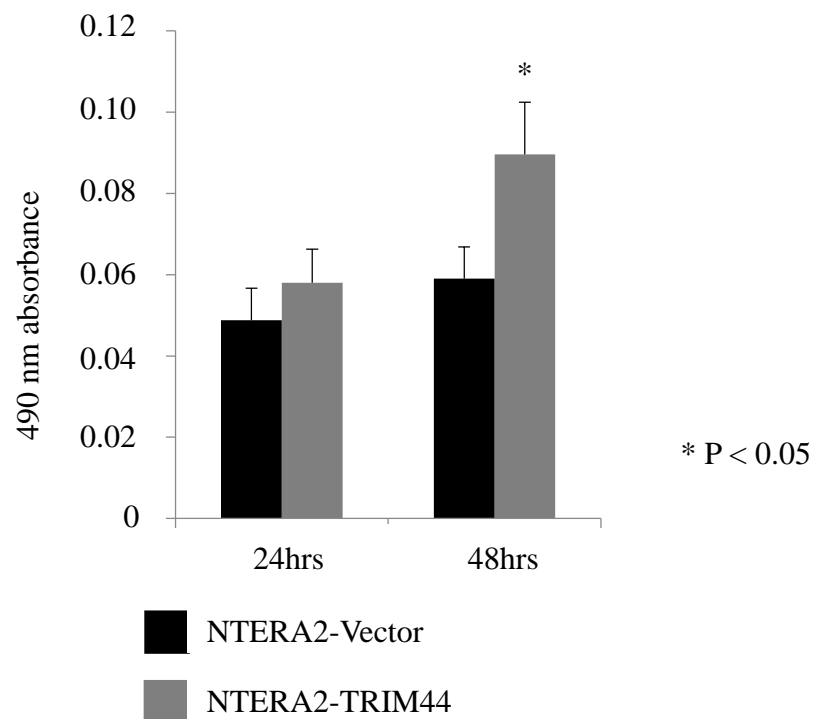


図5 TRIM44を一過性過剰発現した精巣癌細胞のTRIM44蛋白の発現

293T細胞と精巣癌細胞（NTERA2とNEC8）にTRIM44発現ベクターとpcDNA3ベクターのトランスフェクションを行い、TRIM44とFLAGの蛋白発現を確認した。293T-TRIM44を陽性コントロール、293T-Vectorを陰性コントロールとした。(A) NTERA2-TRIM44細胞でTRIM44蛋白のバンドを検出した。また、FLAGに関しては、NTERA2-TRIM44細胞でバンドを検出しており、NTERA2-Vector細胞では明らかなバンドを認めなかった。(B) NEC8-TRIM44細胞でTRIM44蛋白のバンドを検出した。また、FLAGに関しては、NEC8-TRIM44細胞でバンドを検出しており、NEC8-Vector細胞ではバンドを認めなかった。

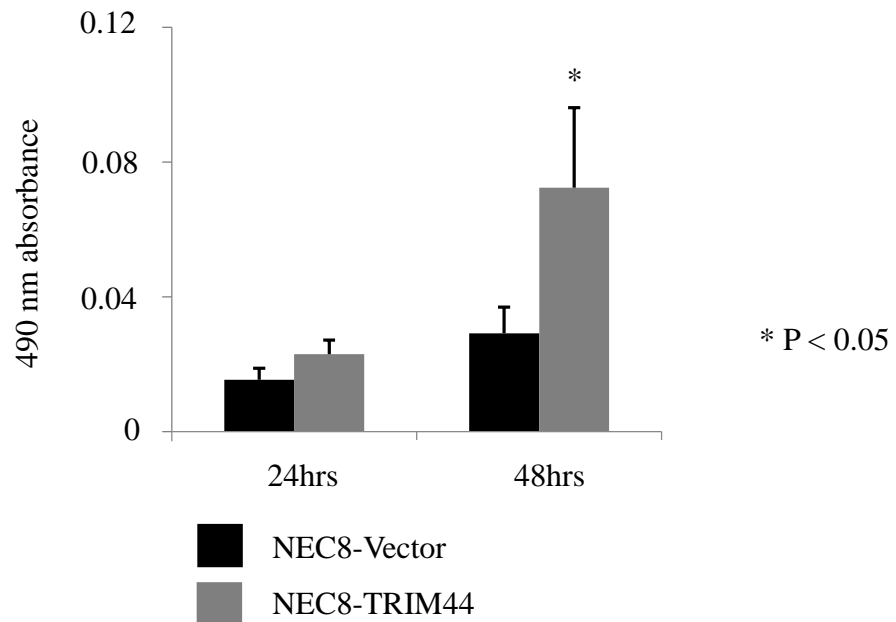
#### 4-3-2 TRIM44 の一過性過剰発現は精巣癌細胞の増殖能を促進した

TRIM44 を一過性過剰発現させた精巣癌細胞（NTERA2-TRIM44 と NEC8-TRIM44）の細胞増殖能を MTS assay を用いて検証した。Vector (pcDNA3) をトランスフェクションした細胞（NTERA2-Vector と NEC8-Vector）を TRIM44 の過剰発現した細胞に対するコントロールとした。トランスフェクション後 24 時間では、NTERA2、NEC8 細胞で細胞の増殖能に有意差はみられなかったが、48 時間後では、NTERA2-TRIM44 細胞と NEC8-TRIM44 細胞で有意に細胞の増殖能が促進された（図 6, 7）。



**図 6 TRIM44 を一過性過剰発現した NTERA2 細胞細胞増殖能実験**

NTERA2 細胞の TRIM44 を一過性過剰発現させ、細胞の増殖能を MTS assay を用いて検証した。トランスフェクションから 48 時間後で、NTERA2-TRIM44 細胞では、NTERA2-Vector (Control) 細胞と比較して有意に細胞の増殖が亢進していた ( $P < 0.05$ )。



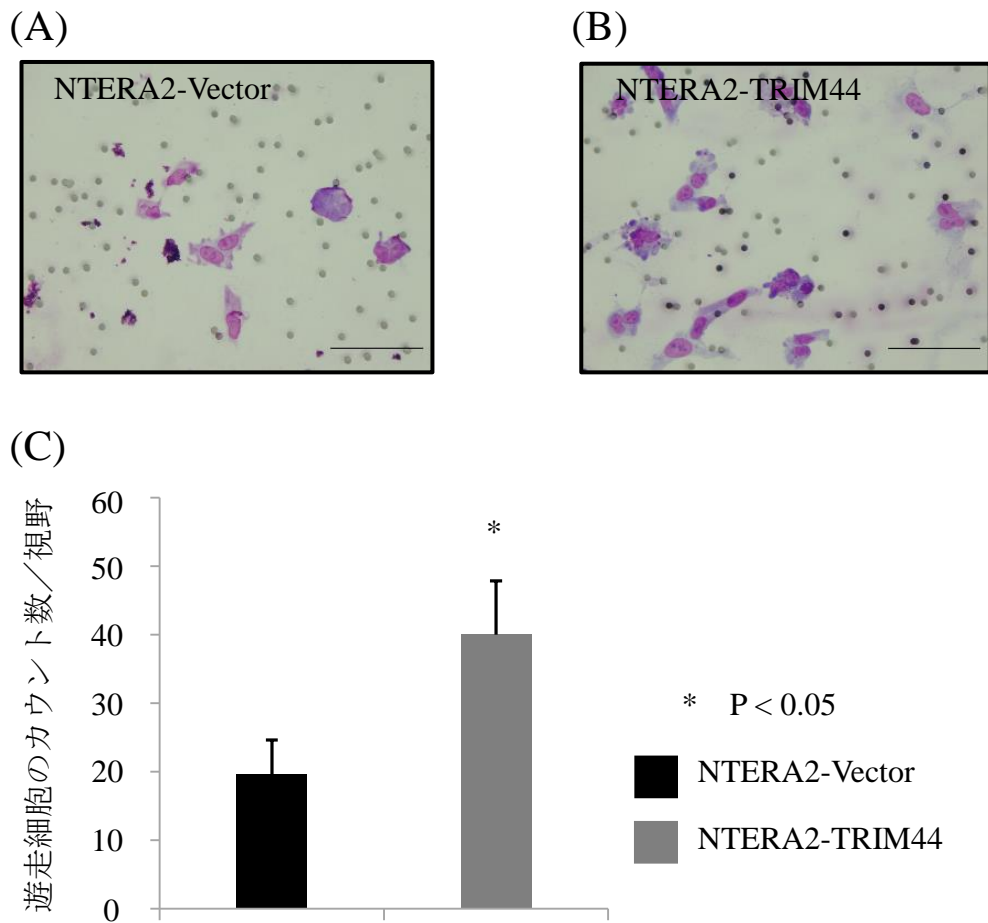
**図 7 TRIM44 を一過性過剰発現した NEC8 細胞の細胞増殖能実験**

NEC8 細胞の TRIM44 を一過性過剰発現させ細胞の増殖能を MTS assay を用いて検証した。トランスフェクション後 48 時間で、NEC8-Vector (Control) 細胞と比較して NEC8-TRIM44 細胞で有意に細胞の増殖が亢進していた ( $P < 0.05$ )。

#### 4-3-3 TRIM44 の一過性過剰発現は精巣癌細胞の遊走能を促進した

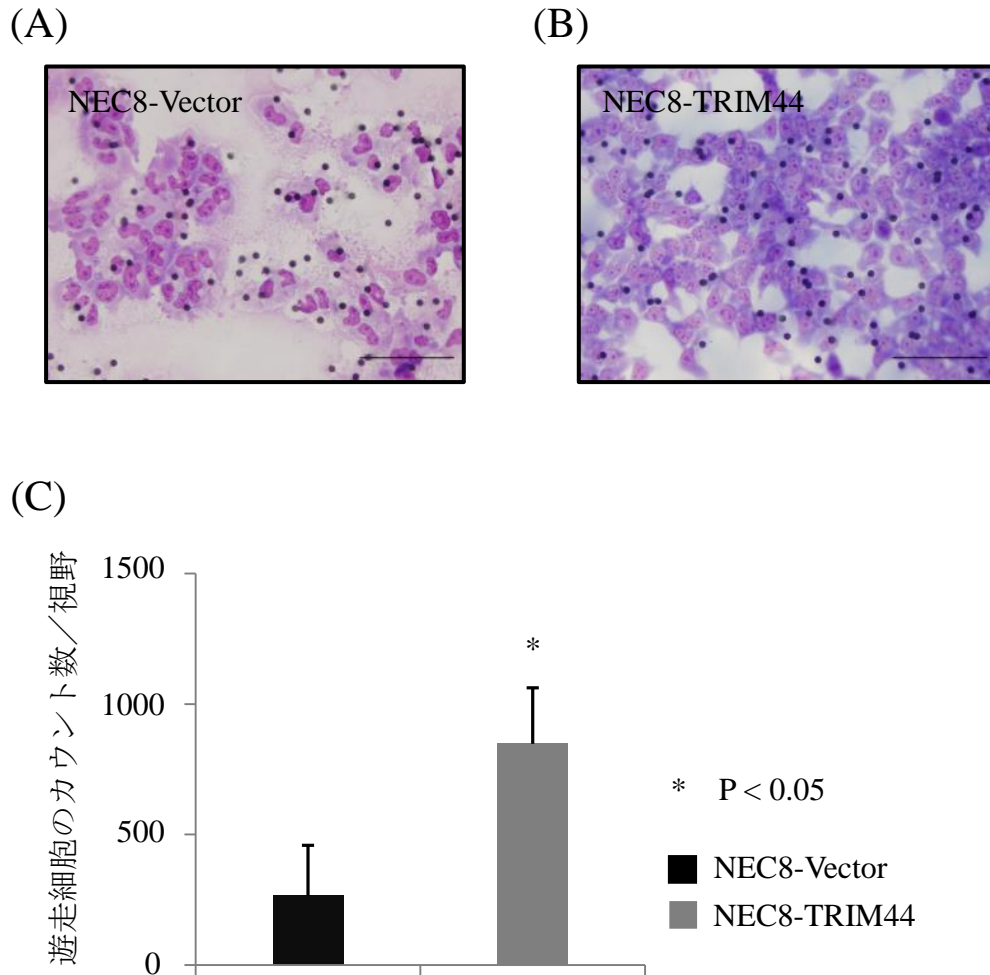
遊走能実験として transwell migration assay を行い、TRIM44 を一過性過剰発現させた精巣癌細胞（NTERA2-TRIM44 と NEC8-TRIM44）の細胞遊走能を検証した。Vector (pcDNA3)をトランスフェクションした細胞（NTERA2-Vector と NEC8-Vector）をそれぞれの細胞のコントロールとした。

NTERA2-TRIM44 細胞では、NTERA2-Vector 細胞と比較して有意に細胞の遊走能の促進を認めた（図 8A, B, C,  $P < 0.05$ ）。また、NEC8 でも同様に NEC8-TRIM44 細胞で有意に細胞の遊走能の促進を認めた（図 9A, B, C,  $P < 0.05$ ）。



**図 8 TRIM44 を一過性過剰発現した NTERA2 細胞の細胞遊走能実験**

遊走能実験として transwell migration assay を行った。(A)と(B)は、NTERA2-Vector 細胞と NTERA2-TRIM44 細胞のそれぞれ代表的な写真を示す。Scale bar 100  $\mu$ l。 (C)では、各細胞でランダムに 5 視野選び遊走した細胞の数をカウントしその平均値を Student's t test にて統計解析した。NTERA-TRIM44 細胞が NTERA2-Vector 細胞と比較して有意に遊走能が亢進していることがわかった ( $P < 0.05$ )。



**図 9 TRIM44 を一過性過剰発現した NEC8 細胞の細胞遊走能実験**

遊走能実験として transwell migration assay を行った。(A)と(B) は、NEC8-Vector 細胞と NEC8-TRIM44 細胞のそれぞれ代表的な写真を示す。Scale bar 100  $\mu$ l。(C) では、各細胞でランダムに 5 視野選び、遊走した細胞の数をカウントし、その平均値を Student's t test にて統計解析した。NEC8-TRIM44 細胞が NEC8-Vector 細胞と比較して有意に遊走能が亢進していることがわかった ( $P < 0.05$ )。



#### 4-4 精巣癌細胞における TRIM44 ノックダウンと機能解析

##### 4-4-1 精巣癌細胞の TRIM44 ノックダウン

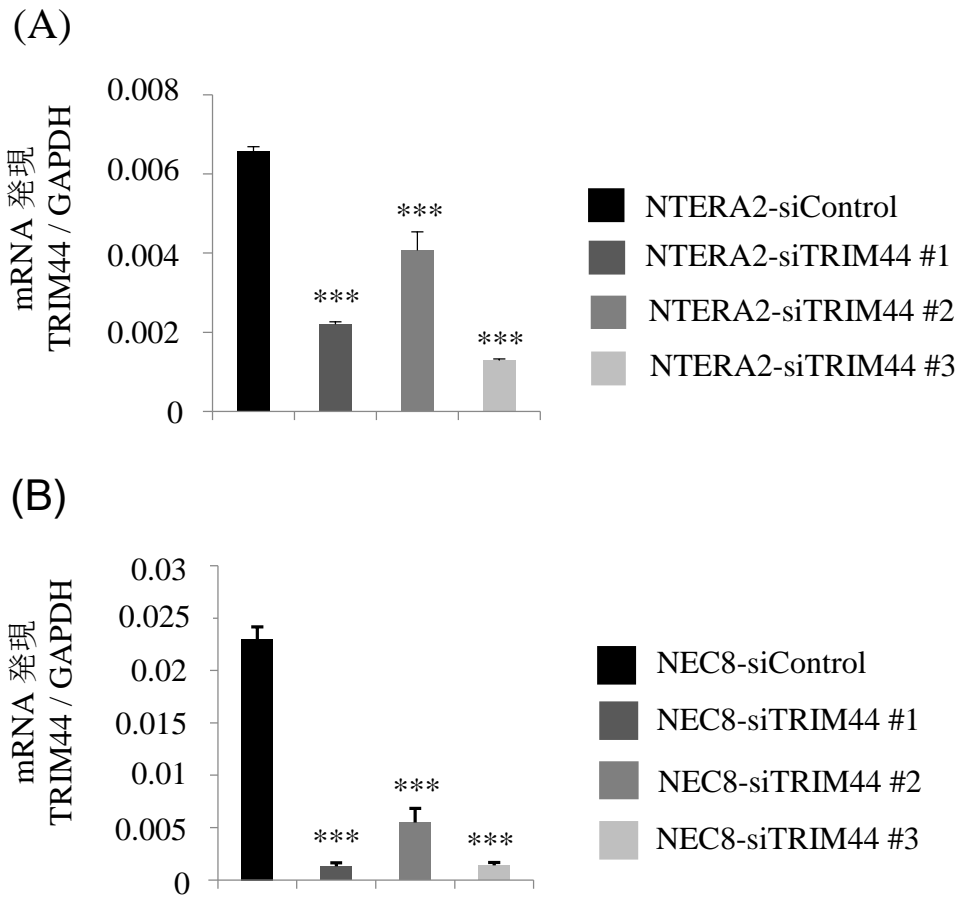
TRIM44 ノックダウンによる細胞の機能変化を検証するために、NTERA2, NEC8 細胞で siRNA 法による TRIM44 のノックダウンを行った。siRNA は #1, #2, #3 の 3 種類の siRNA を用いて siControl 処理細胞と比較を行った。

細胞が適切にノックダウンされているか確認するため、quantitative real time PCR (qRT-PCR) 法およびウェスタンブロッティング法によりそれぞれ mRNA とタンパクレベルで TRIM44 発現を確認した。

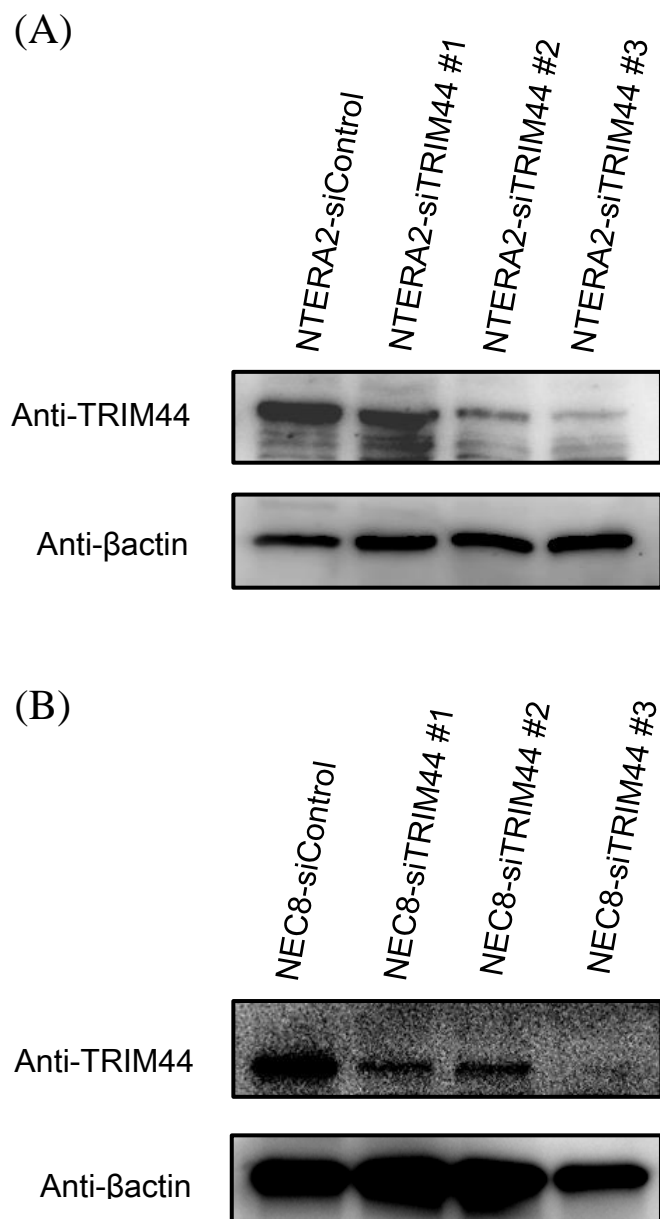
qRT-PCR により siTRIM44 (#1- #3) でトランスフェクションした細胞がどれも siControl で処理した細胞よりも TRIM44 mRNA 発現が低下していることを確認した (図 10A, B)。

また、ウェスタンブロッティング法でも siTRIM44 でトランスフェクションした細胞は、siControl と比較して TRIM44 蛋白発現レベルが低下していることを確認した (図 11A, B)。

以上より、NTERA2 と NEC8 の細胞のどちらでも siTRIM44 により TRIM44 がノックダウンされていることを確認した。さらに、qRT-PCR の結果とウェスタンブロッティング実験の結果を総合すると、siTRIM44 #3 がもっとも TRIM44 ノックダウン効率が高いこともわかった。



**図 10 TRIM44 をノックダウンした精巣癌細胞の TRIM44 の mRNA 発現**  
(A) NTERA2 細胞における実験。(B) NEC8 細胞における実験。siControl か 3 種類の siTRIM44(#1, #2, #3)で精巣癌細胞をノックダウンし qRT-PCR 法にて mRNA 発現レベルを調べることでノックダウンの効率を調べた。NTERA2 細胞でも NEC8 細胞でも siControl と比較して 3 種類の siTRIM44 で有意に mRNA 発現が低下しており、特に siTRIM44 #1 と siTRIM44 #3 で顕著であった。\*\*\*  $P < 0.001$ 。



**図 11 TRIM44 をノックダウンした精巣癌細胞の TRIM44 蛋白の発現**  
(A) NTERA2 細胞における実験。(B) NEC8 細胞における実験。siControl か 3 種類の siTRIM44(#1, #2, #3)のいずれかで精巣癌細胞にトランスフェクションした後、ウェスタンブロッティング法により各細胞における TRIM44 のタンパク発現を調べた。siControl と比較してすべての siTRIM44 処理細胞 TRIM44 の蛋白発現の低下を認めた。

#### 4-4-2 TRIM44 ノックダウンは精巣癌細胞の増殖能を抑制した

3 種類の siTRIM44 (#1, #2, #3)を用いて、精巣癌細胞にトランスフェクションし TRIM44 のノックダウンを行ったのち、MTS assay により TRIM44 をノックダウンした精巣癌細胞の細胞増殖能を検証した。トランスフェクションされた細胞をインキュベートし 24 時間、48 時間後に MTS アッセイを行ったところ、siControl と比較して siTRIM44 によるノックダウン処理を行った細胞の増殖能が有意に抑制された。48 時間後では、NTERA2、NEC8 の両細胞において、siTRIM44 処理細胞で細胞増殖能が低下していることがわかった (図 12A, B)。

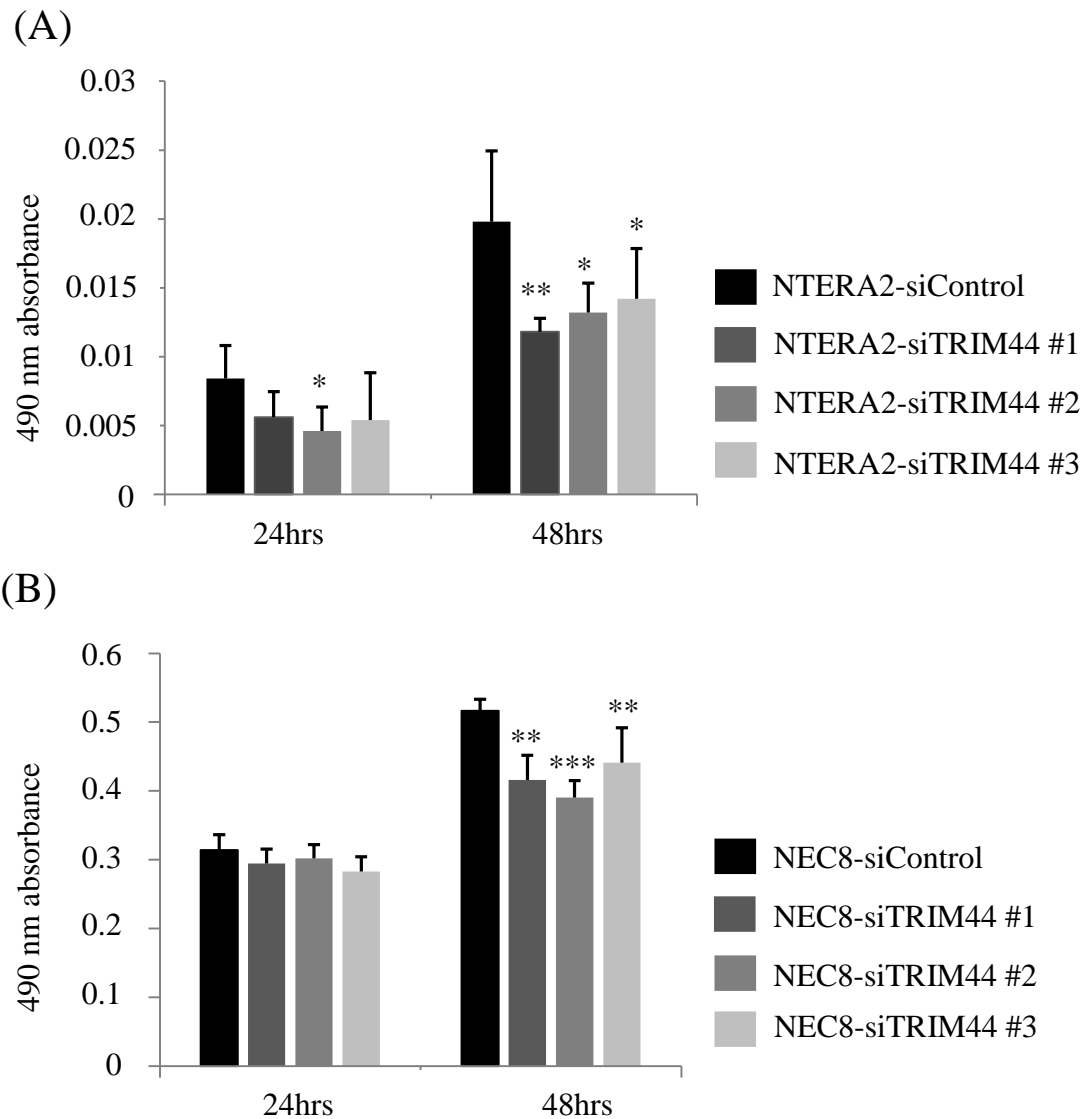


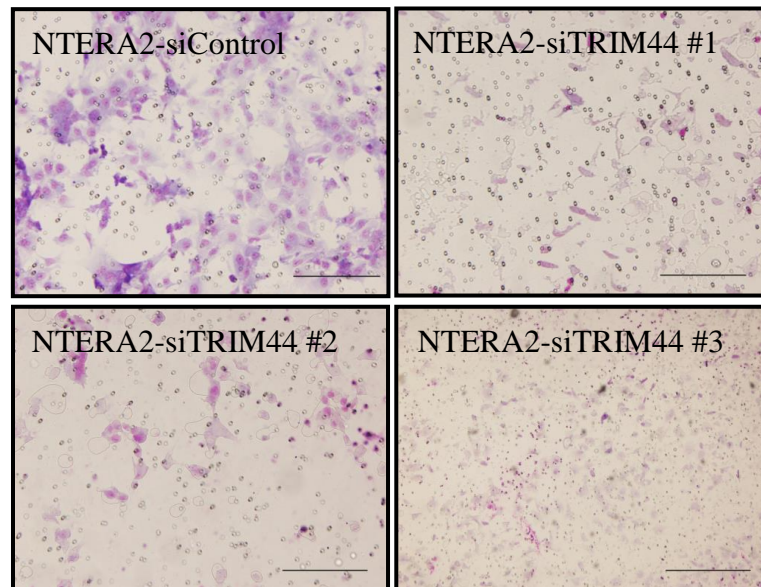
図 12 TRIM44 をノックダウンした精巣癌細胞の増殖能

(A) NTERA2 細胞における実験。(B) NEC8 細胞における実験。NTERA2, NEC8 細胞の増殖能に対する TRIM44 ノックダウンの効果を確認した。トランスフェクションの 48 時間後では、NTERA2 でも NEC8 でも siTRIM44 処理細胞のほうで増殖能が抑制されていた。\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.005$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。

#### 4-4-3 TRIM44 ノックダウンは精巣癌細胞の遊走能を抑制した

細胞の遊走能に対する TRIM44 の影響を評価する目的で transwell migration assay を施行した (図 13A, 14A)。TRIM44 をノックダウンした精巣癌細胞は、コントロール処理した細胞と比較して有意に細胞の遊走能が抑制された。これは、NTERA2 でも NEC8 でも同様な結果が得られた (図 13B, 14B)。

(A)



(B)

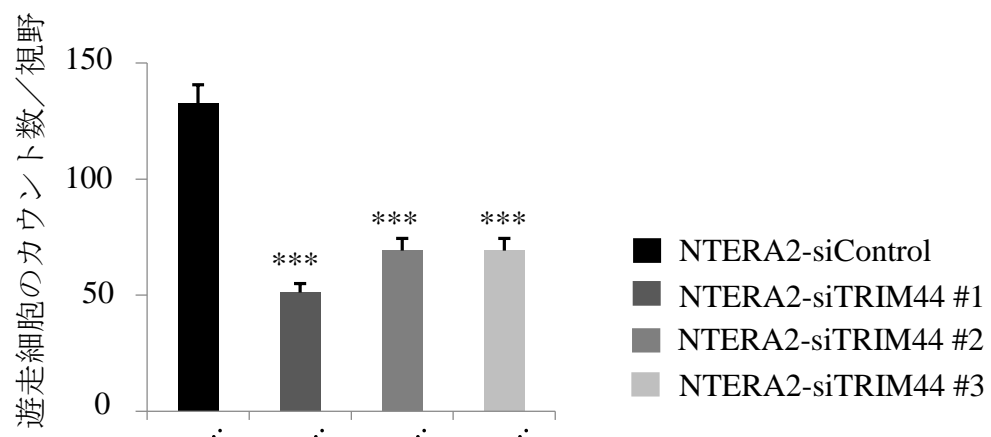
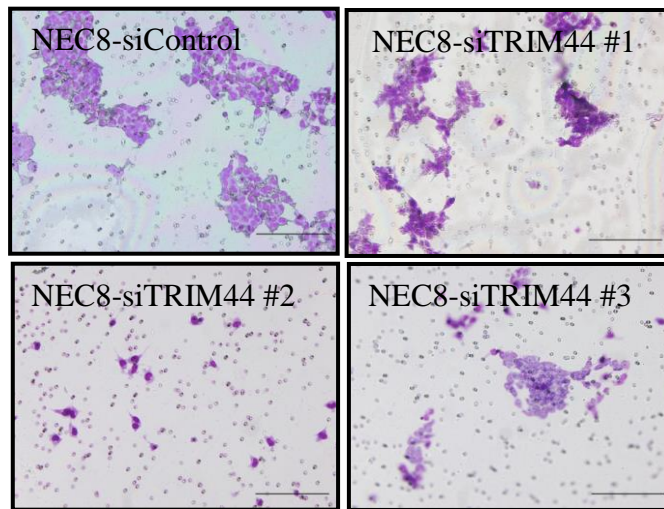


図 13 TRIM44 をノックダウンした NTERA2 細胞の細胞遊走能実験

NTERA2 細胞を siTRIM44 または siControl でトランスフェクションし、siControl 処理 NTERA2 細胞と si 処理 NTERA2 細胞で細胞の遊走能の比較を行った。(A) siControl 処理 NTERA2 細胞 (NTERA2-siControl) と si 処理 NTERA2 細胞 (NTERA2-siTRIM44#1-3) の遊走能を示す代表的な写真。(B) siTRIM44 #1-3 で有意に NTERA2 細胞の遊走能が抑制された。\*\*\*  $P < 0.0001$ 。

(A)



(B)

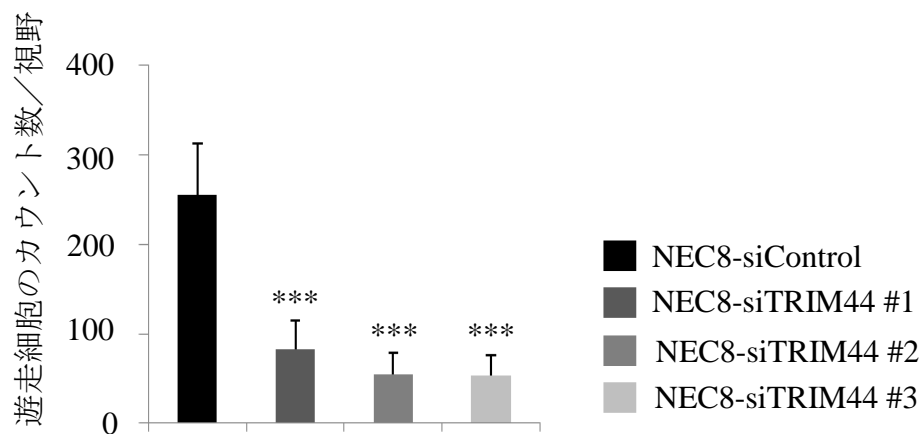


図 14 TRIM44 をノックダウンした NEC8 細胞の細胞遊走能実験

NEC8 細胞を siTRIM44 または siControl でトランスフェクションし、siControl 処理 NEC8 細胞と si 処理 NEC8 細胞で細胞の遊走能の比較を行った。(A) siControl 処理 NEC8 細胞 (NEC8-siControl) と si 処理 NEC8 細胞 (NEC8-siTRIM44#1-3) の遊走能を示す代表的な写真。(B) siTRIM44 #1-3 で有意に NEC8 細胞の遊走能が抑制された。\*\*\*  $P < 0.0001$ 。



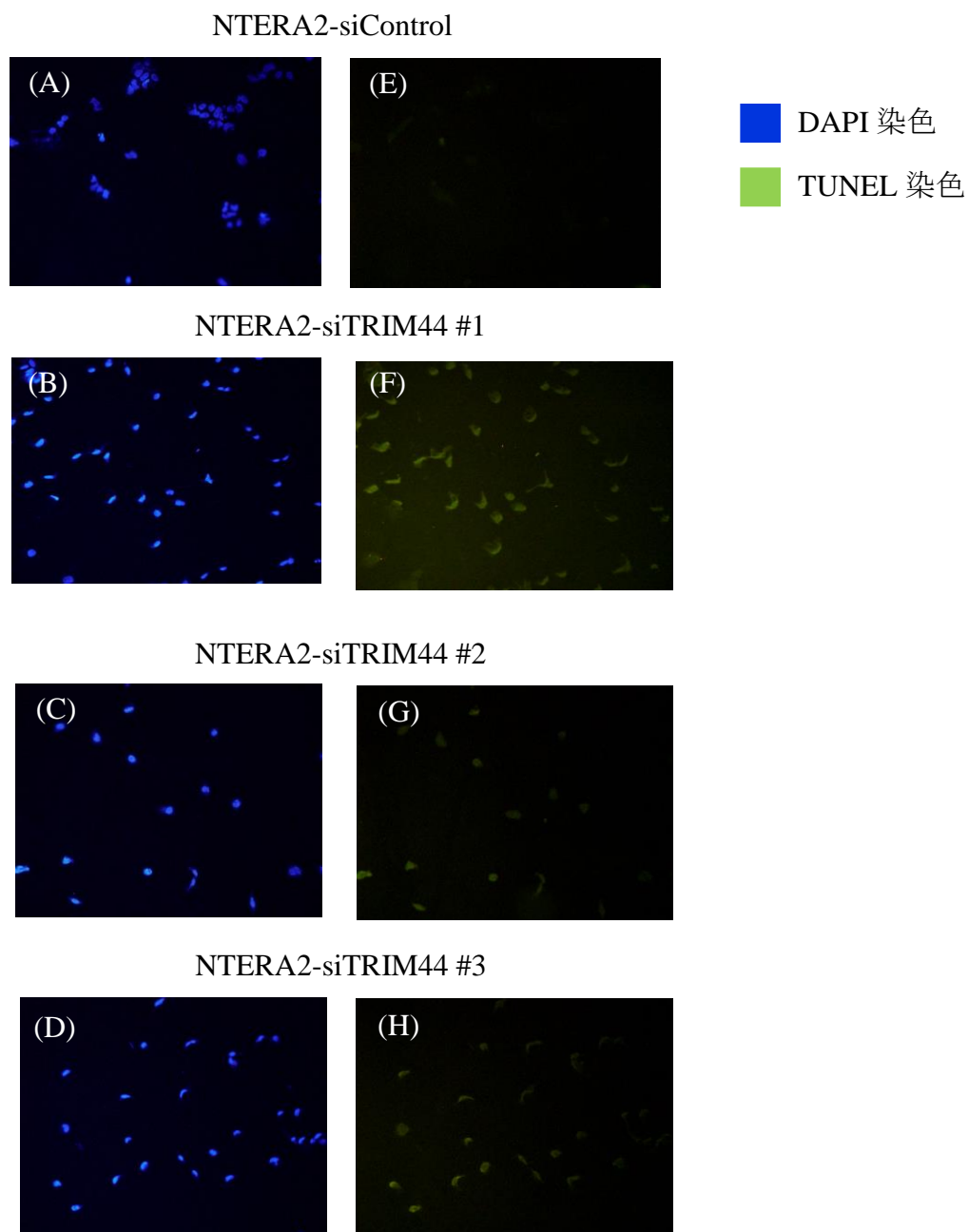
#### 4-4-4 TRIM44 ノックダウンは精巣癌細胞のアポトーシスを抑制した

TRIM44 ノックダウンによる NTERA2、NEC8 細胞のアポトーシスへの影響を検証した。siRNA トランスフェクションによる TRIM44 のノックダウンを行ったのちに、TUNEL アッセイを用いて細胞のアポトーシス実験を施行した。DAPI により核が青く染色される viable な細胞と黄緑色に発光した TUNEL 染色陽性の細胞が観察された (図 15A-H, 図 16A-H)。

NTERA2 細胞では、NTERA2-siControl では、細胞が細胞集塊を形成しており細胞分裂後の状態である可能性が示唆された。一方、NTERA2-siTRIM44 では細胞が個別に散乱しており (図 15A-D)、しかも黄緑色に発光した TUNEL 染色陽性細胞が多く含まれることがわかった (図 15E-H)。

NEC8 細胞でも同様の結果がえられた。すなわち、NEC8-siControl と比較して siTRIM44 処理した NEC8 細胞では、TUNEL 染色陽性の細胞が多く観察された (図 16E-H)。NEC8-siTRIM44 #3 でも細胞集塊が散在していたが (図 16D)、黄緑色に発光した TUNEL 染色陽性細胞であった (図 16H)。

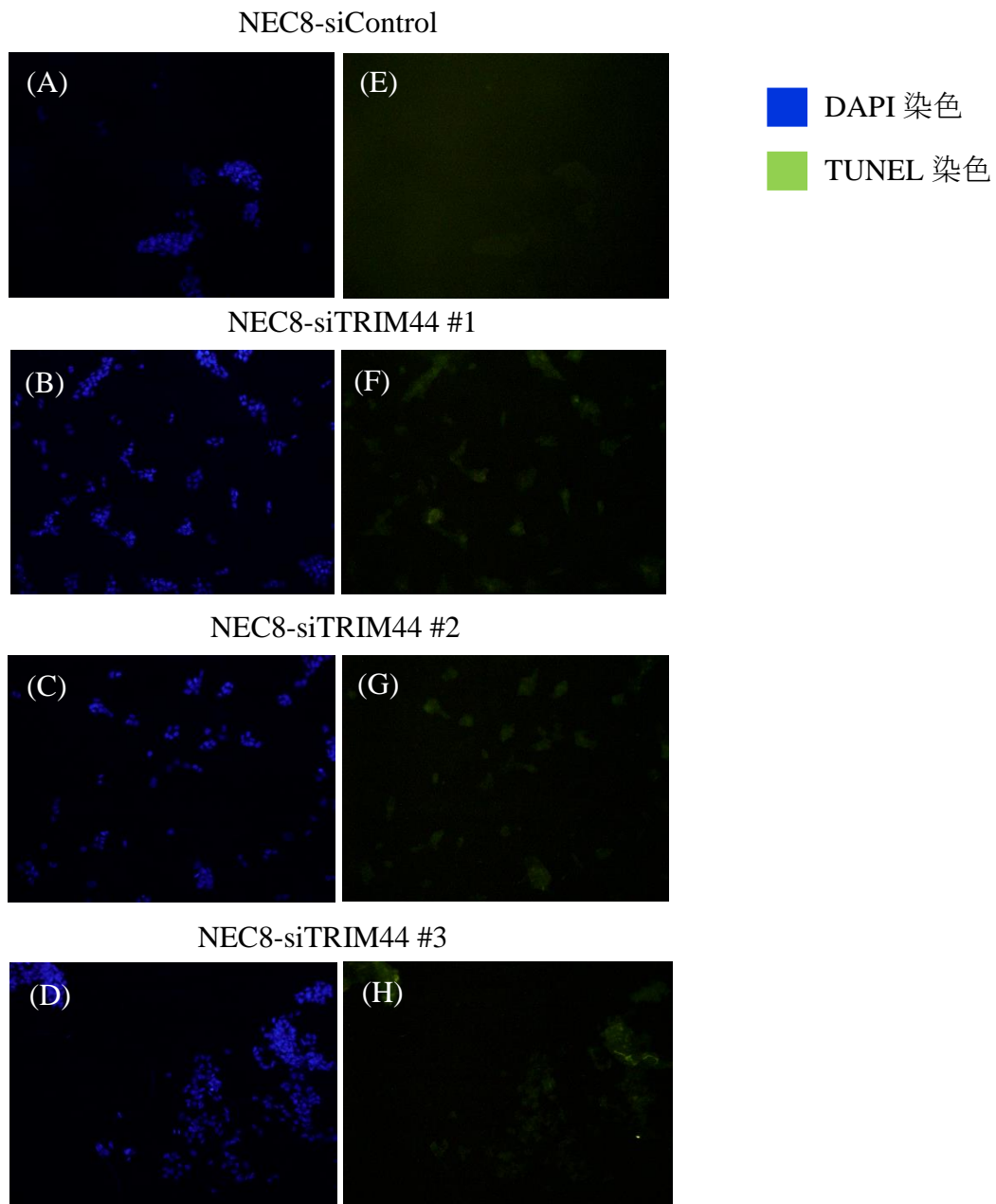
次に、TUNEL 染色陽性細胞のカウントを行い定量的な解析を行った。NTERA2、NEC8 細胞において、TRIM44 ノックダウンにより TUNEL 染色細胞の割合が有意に増加しており、アポトーシスが有意に促進していることが示唆された (図 17A, B)。



**図 15 TRIM44 をノックダウンした NTERA2 細胞の TUNEL 実験**

DAPI 染色：青色に発光 (A-D)、TUNEL 染色：黄緑色に発光 (E-H)

NTERA2-siControl 細胞では TUNEL 染色で陽性を示す細胞は少数であったが (E)、NTERA2- siTRIM44 細胞では TUNEL 染色で陽性を示す細胞が多かった (F-H)。



**図 16 TRIM44 をノックダウンした NEC8 細胞の TUNEL 実験**

DAPI 染色：青色に発光 (A-D)、TUNEL 染色：黄緑色に発光 (E-H)

NEC8-siControl 細胞では TUNEL 染色で陽性を示す細胞は少数だったが (E)、NEC8- siTRIM44 細胞では TUNEL 染色で陽性を示す細胞が多かった (F-H)。

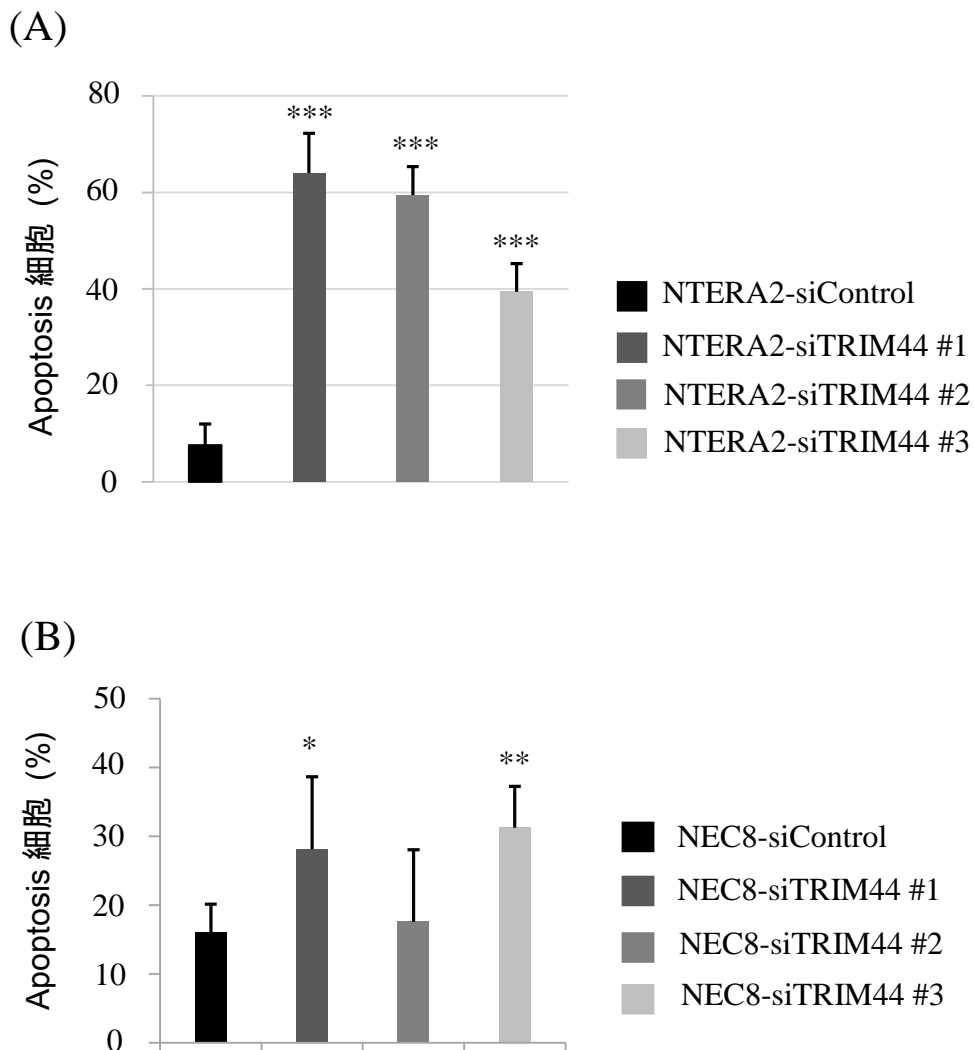


図 17 TRIM44 をノックダウンした精巣癌細胞の TUNEL 染色実験 (カウントおよび解析)

(A) TRIM44 をノックダウンした NTERA2 細胞の TUNEL 実験。各 siRNA 処理細胞で TUNEL 染色陽性となった細胞の数と細胞全体の数 (DAPI 染色陽性細胞数) をランダム 5 視野でカウントしその割合を解析した。siControl 処理細胞と比較して siTRIM44 処理細胞では有 TUNEL 染色陽性細胞が多かった。(B) TRIM44 をノックダウンした NEC8 細胞の TUNEL 実験。NEC8 細胞でも同様の結果が得られた。\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.005$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。

#### 4-5 TRIM44 ノックダウンにより発現レベルが変動した遺伝子の多くは癌関連遺伝子であった (マイクロアレイ実験)

最も TRIM44 ノックダウン効率の良かった siTRIM44 #3 で NTERA2 細胞の TRIM44 をノックダウンし、その細胞のマイクロアレイ実験を行い、siControl 処理細胞と比較して siTRIM44 処理細胞で発現が変動した遺伝子を同定した。TRIM44 ノックダウンにより発現が上昇した上位 20 遺伝子のうち 8 つは、癌抑制遺伝子であった (表 6、薄灰色ハイライト)。この 8 つの癌抑制遺伝子のうち、6 つの遺伝子がアポトーシスに関連のある遺伝子であった (*NUPR1*, *CDK19*, *CADM1*, *INHBA*, *TNFSF10*, *DDIT4*)。逆に、発現が低下した上位 20 遺伝子のうち 9 つは癌遺伝子であった (表 7、濃灰色ハイライト)。

表 6 NTERA2 細胞において TRIM44 ノックダウンにより発現が上昇したシグナル（上位 20 以内）

Gene symbol	Description	Fold change
<i>ZNF487P</i>	Regulation of transcription	2.55
<i>IL2ORB</i>	Blood coagulation	2.19
<i>TMEM178</i>	Integral to membrane	2.02
<i>NUPR1</i>	Reduces tumor growth in PCa <sup>[27,28]</sup>	1.97
<i>DDR2</i>	Regulation of cell growth	1.86
<i>ALDH1 L2</i>	One-carbon metabolic process	1.83
<i>CDK19</i>	Cyclin-dependent protein kinase activity <sup>[29]</sup>	1.81
<i>CADM1</i>	Apoptosis, cell adhesion <sup>[30-43]</sup>	1.80
<i>INHBA</i>	Cell cycle arrest <sup>[44]</sup>	1.72
<i>ITGA11</i>	Cell migration	1.71
<i>SLC7A11</i>	Amino acid transport	1.70
<i>TNFSF10</i>	Induction of apoptosis <sup>[45]</sup>	1.70
<i>ZSCAN5B</i>	Regulation of transcription	1.68
<i>PRKACB</i>	Protein phosphorylation, inhibits cell proliferation <sup>[46]</sup>	1.67
<i>CMPK1</i>	Nucleobase	1.65
<i>B3GALT5</i>	Protein glycosylation	1.65
<i>COL11A2</i>	Skeletal system development	1.64
<i>TAGAP</i>	Signal transduction	1.64
<i>PCDHB6</i>	Cell adhesion <sup>[47]</sup>	1.62
<i>DDIT4</i>	Apoptosis, inhibits mTORC1 <sup>[48]</sup>	1.61

TRIM: tripartite motif, PCa: prostate cancer. 薄灰色ハイライト：癌抑制遺伝子、濃灰色ハイライト：癌遺伝子。

表7 NTERA2細胞において TRIM44 ノックダウンにより発現が低下したシグナル（上位 20 以内）

Gene symbol	Description	Fold change
<i>TRIM44</i>		0.42
<i>C3AR1</i>	Melanoma tumorigenesis <sup>[49]</sup>	0.42
<i>FMN1</i>	Cell proliferation <sup>[50]</sup>	0.44
<i>CDRT1</i>	Biological process	0.53
<i>IFIT1</i>	Inhibits viral replication	0.54
<i>GBP1</i>	Glioma cell proliferation <sup>[51]</sup>	0.55
<i>PIG-S</i>	Attachment of GPI anchor to protein	0.56
<i>UGT2B7</i>	Lipid metabolic process	0.56
<i>GBP3</i>	Nucleotide binding	0.57
<i>EFCAB4B</i>	Ca(2+)-binding protein	0.57
<i>KIR2DL3</i>	Immune response	0.57
<i>ST3GAL5</i>	Cell proliferation <sup>[52]</sup>	0.57
<i>NT5E (CD73)</i>	Cancer progression <sup>[53-64]</sup>	0.58
<i>IGKC</i>	Prognostic marker in breast cancer	0.59
<i>RAB27B</i>	Member of RAS oncogene <sup>[65]</sup>	0.59
<i>RNF185</i>	Protein binding	0.59
<i>FBP2</i>	Tumor growth in HCC <sup>[66]</sup>	0.61
<i>HIPK3</i>	Anti-apoptosis <sup>[67]</sup>	0.62
<i>PLAU</i>	Cell migration <sup>[68]</sup>	0.62
<i>ZNRF4</i>	Protein degradation	0.62

TRIM: tripartite motif, HCC: hepatocellular carcinoma. 薄灰色ハイライト：癌抑制遺伝子、濃灰色ハイライト：癌遺伝子。

#### 4-6 TRIM44 依存性シグナルの mRNA 発現

マイクロアレイ実験により同定した遺伝子発現の変動が大きい遺伝子に関して、mRNA 発現レベルでマイクロアレイ実験と同様の結果であるかを RT-PCR 法により確認した。癌抑制遺伝子として *CDK19*, *CADM1*, *PRKACB*, 癌遺伝子として *C3AR1*, *ST3GAL5*, *NT5E (CD73)* の mRNA 発現を確認した。*CDK19*, *CADM1*, *PRKACB* の遺伝子に関しては、siTRIM44 処理細胞は、siControl 処理 NTERA2 細胞と比較して mRNA 発現レベルが上昇しており、*C3AR1*, *ST3GAL5*, *NT5 (CD73)* では、低下していた (図 18)。



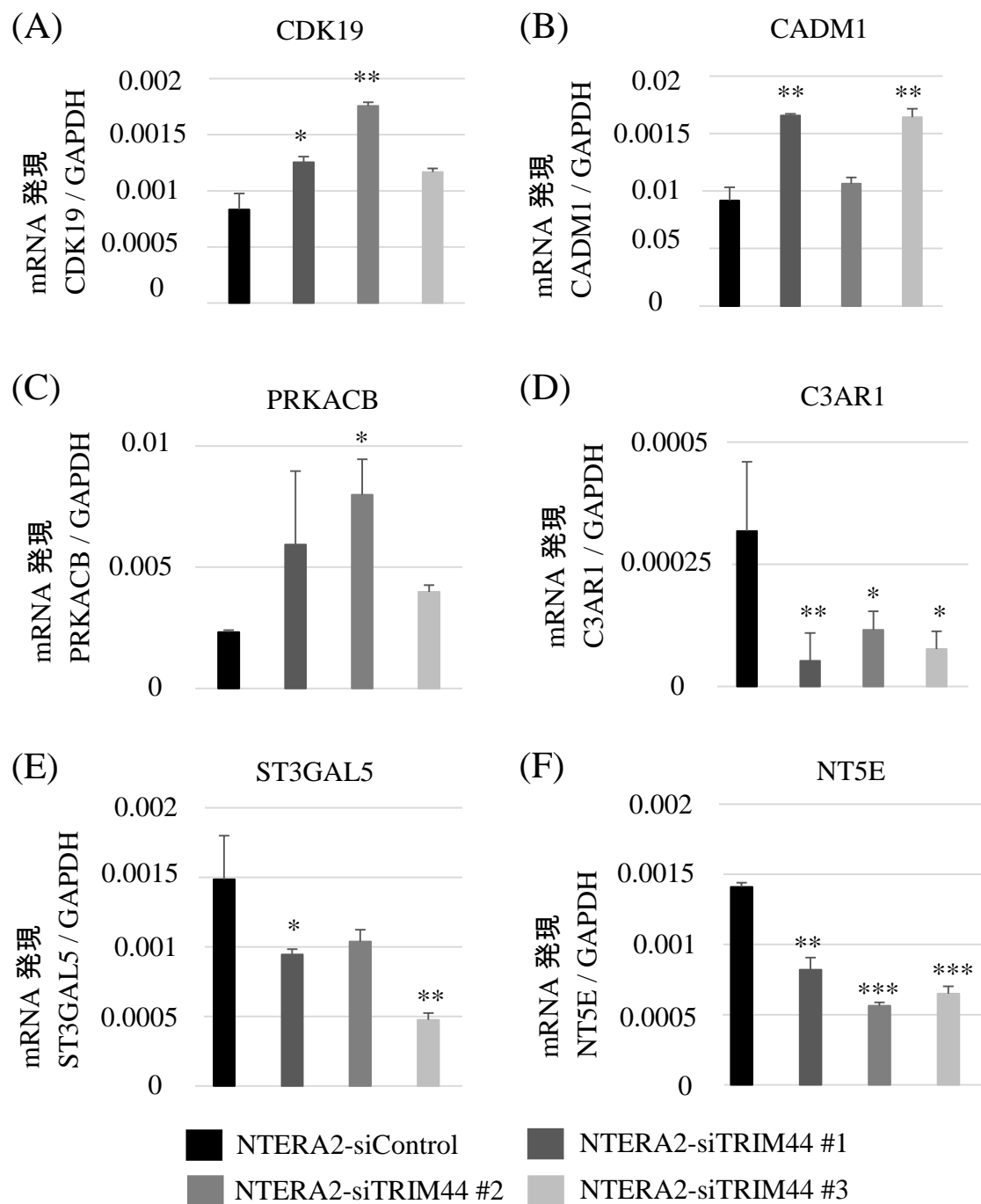


図 18 TRIM44 依存性に発現が変動した遺伝子の mRNA 発現

Microarray 実験で TRIM44 依存性に発現が変動した遺伝子の mRNA 発現を RT-PCR 法にて検証した。\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.005$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。

## 第5章 考察

精巣癌の予後を決定する因子としては、臨床的には IGCCC リスク分類が最も重用されており、そのほかには、病期、腫瘍サイズ、精巣網浸潤、脈管侵襲、腫瘍内好中球数などの臨床病理学的因子が多数確認されている [1, 2, 69]。しかしながら、分子細胞レベルでは精巣癌の予後に影響を与える因子の報告は少ない [23]。本研究では、TRIM44 と精巣癌との関連を臨床病理学的側面と分子細胞レベルとの両側面より解析を行った。その結果、TRIM44 の発現が精巣癌において癌特異的な予後因子であることがわかった [24]。また、TRIM44 の強発現は、リンパ節/遠隔転移、ノンセミノーマの組織型、AFP 値と有意に関連を認めた。さらに、In vitro の実験では、TRIM44 の過剰発現により精巣癌細胞の細胞増殖や遊走能を促進することがわかり、これに加えて TRIM44 のノックダウンが細胞増殖や遊走能を抑制しアポトーシスを促進することがわかった。これらの結果より、TRIM44 は精巣癌において細胞の増殖や遊走能、アポトーシスに強く関与していることが示唆された [24]。

癌に関連した TRIM44 の作用機序は、いくつかの報告はあるものの詳細は不明である。Ong CA らは、gene expression array により 1932 例の上皮由来の悪性腫瘍に関して TRIM44 遺伝子の発現を調べ、食道癌の 15.9%、乳癌の 19.8%、そして全上皮癌の 16.1%で TRIM44 遺伝子が過剰発現していることを報告してい

る [20]。同研究では、さらに TRIM44 をノックダウンした胃癌細胞株で mTOR 経路の遺伝子発現が低下していた。

さらに、肺非小細胞癌の研究では、30 組の肺非小細胞癌と近接正常組織との間で TRIM44 の mRNA と蛋白発現レベルを比較したところ、癌組織で有意に発現が強かったとしている。また、同研究では *in vitro* の実験でも TRIM44 が NF- $\kappa$ B シグナル経路を介して癌細胞の浸潤能や遊走能を促進したと報告している [70]。しかしながら、われわれの研究では、いずれの経路とも TRIM44 の発現と関連は認めなかった。

そこで、私は、精巣癌における TRIM44 の作用機序を理解するために、マイクロアレイ実験により TRIM44 で制御される遺伝子を同定した。具体的には、siControl 処理細胞と TRIM44 ノックダウンを行った細胞で発現に変動がみられた遺伝子を確認した。興味深いことに TRIM44 ノックダウンにより発現が上昇している遺伝子では、上位 20 の遺伝子のうち 8 例で癌抑制作用のある遺伝子が同定された (*NUPR1* [27, 28], *CDK19* [29], *CADM1* [30-43], *INHBA* [44], *TNFSF10* [45], *PRKACB* [46], *PCDHB6* [47], *DDIT4* [48])。さらに、発現が低下した遺伝子のなかには、上位 20 の遺伝子のうち 9 つが癌遺伝子であった(*C3AR1* [49], *FMN1* [50], *GBP1* [51], *ST3GAL5* [52], *NT5E (CD73)* [53-64], *RAB27B* [65], *FBP2* [66], *HIPK3* [67], *PLAU* [68])。次に、これら癌関連遺伝子のうち、代表的な

遺伝子である *CDK19*, *CADM1*, *PRKACB*, そして *C3AR1*, *ST3GAL5*, *NT5E* (*CD73*) に関して *TRIM44* ノックダウンにより mRNA の発現レベルが変動しているかを RT-PCR により確認したところ、やはりマイクロアレイ実験の結果と同様な発現の変動がみられた。

次に、これらの遺伝子より、癌遺伝子と癌抑制遺伝子に関して代表的な遺伝子の一つずつ例にあげて考察を加えたい。*NT5E* は、ATP の代謝に関わるとされる癌遺伝子である。*NT5E* (*CD73*) が AMP を脱リン酸化することでアデノシンが産生される [55]。そして、アデノシンはプリン受容体に結合し癌細胞に対しての免疫学的反応を抑制するため *NT5E* (*CD73*) は tumor immune escape 現象に関与すると考えられている [55, 63]。さらに *NT5E* (*CD73*) は、tumor escape 現象とは独立して癌の血管新生 [61-63]、細胞増殖 [55, 62-64]、遊走能 [64] も促進することが報告されている。実際に臨床的にも頭頸部扁平上皮癌 [60]、胃癌 [56]、乳癌 [59]、大腸癌 [54,57]、前立腺癌 [58]、卵巣癌 [53] などさまざまな臓器の癌で *NT5E* (*CD73*) の過剰発現が報告され、*NT5E* (*CD73*) が過剰発現している症例では予後不良であると考えられている。

癌抑制遺伝子の一つである *CADM 1* は、マイクロアレイ実験において、*TRIM44* ノックダウンにより発現量が最も上昇した遺伝子のうちの一つである。*CADM 1* は、1 回膜貫通型の免疫グロブリンスーパーファミリー細胞接着分子を

コードする遺伝子である [35, 36]。カルシウム非依存性に、細胞間で発現する *CADM1* どうしてホモフィリックに結合し細胞接着を形成する [36]。細胞接着が破綻することで癌の浸潤や転移が促進されるため、細胞接着に寄与する *CADM1* の発現低下は、癌細胞の浸潤や遊走能を促進する可能性がある [31, 71]。実際に、臨床的には喉頭癌 [37]、鼻咽頭癌 [39]、食道癌 [42]、肺癌 [36, 40]、膵臓癌 [43]、乳癌 [30, 38]、大腸癌 [32]、子宮頸癌 [41] など多くの癌で *CADM1* の発現が低下していることがわかっている。たとえば肺の腺癌の研究では、*CADM1* の発現は病期、リンパ節転移の有無、脈管侵襲と有意に逆相関の関係にある [40]。同研究では、*CADM1* の発現をもとに高度、中等度、軽度の 3 グループに分けると 4 年生存率はそれぞれ順に 84%, 28%, 7% であった [39]。また、結腸癌では、41.3% で *CADM1* の発現が低下しており、臨床的にも *CADM1* の発現が低下した症例では、全生存率が有意に低かった [40]。

以上より、*TRIM44* は、*CADM1* のような癌抑制遺伝子や *NT5E (CD73)* に代表される癌遺伝子を制御することで精巣癌細胞の増殖能や遊走能、強いてはアポトーシスを抑制し精巣癌の *tumorigenesis* を促進する役割を担っていると考えられる。したがって、今後、*TRIM44* は治療ターゲットになる可能性を秘めている。

本研究の *limitation* として、第一には、1 施設での精巣癌症例数の確保が

難しいことにある。たとえば、組織型別にサブ解析を行う場合、NSGCT は、本研究では  $N = 39$  となり、NSGCT のなかでさらに卵黄のう腫、奇形腫などに分けて解析となると有効な統計解析処理が困難となる。同様に、精巣癌に対しての治療方法が予後規定因となりえるが、病期や組織型によっても治療方法がかわるものであり、本研究において治療方法別にサブ解析を行うことが可能な症例数を集めることが困難であった。第二に、精巣癌に対応した正常コントロールを入手できなかったことである。30 歳代に罹患率のピークがある精巣癌患者に対応する正常人の精巣組織検体を確保することが困難であった。したがって、本研究は、精巣癌のなかでの TRIM44 の発現や機能解析を調べる研究となった。最後に、siRNA によるノックダウン効率と細胞実験の結果との関連について述べる。本研究では、三種類の siRNA により精巣癌細胞のノックダウン実験を行ったが、ノックダウンの効率としては siRNA#3 が #2 より優位であった。一方で、機能実験において、たとえば、NTERA2 の MTS 実験では、siRNA#3 によるノックダウン細胞で siRNA#2 処理細胞よりも増殖がみられたことなど、ノックダウン効率と必ずしも完全なる一致を示せなかった。しかしながら、siRNA#2 処理細胞と siRNA#3 処理細胞との間で増殖の差は有意ではなかったことから本実験の結果を無効とするほどの理由にはならないと考えた。さらに、設計した siRNA のオフ・ターゲット効果の可能性も考えられた。

今後の展望として以下のことが期待される。第一に、第2次コホートや大規模コホートを行うことで精巣癌における *TRIM44* の新規予後規定因子としての有用性を確認することが可能となる。第二に、*TRIM44* の精巣癌に対する作用メカニズムを蛋白レベルで明らかにすることが望まれる。具体的には、マイクロアレイ実験で同定した、*TRIM44* が制御する *CADM1* や *NT5E (CD73)* などの癌関連遺伝子と *TRIM44* との相互作用やそれらの癌関連遺伝子が tumorigenesis のメカニズムのなかでどのような位置づけを担っているのかを明らかにすることが重要と考える。第三に、腎癌などのそのほかの泌尿器癌における *TRIM44* の発現や機能の解析を行うことで *TRIM44* の癌に対する一般的な作用機序を明らかにすることができる。

## 第6章 まとめ

精巣癌腫瘍における TRIM44 の臨床的意義および機能解析を行い、以下の結論を得た。

- ① TRIM44 免疫学的発現陽性は AFP 高値、転移陽性と有意に関連を認め、TRIM44 免疫学的発現陽性群では癌特異的生存率も低かった。
- ② TRIM44 の過剰発現の実験系では、精巣癌細胞の増殖能および遊走能を促進した。一方、TRIM44 のノックダウンの実験系では、精巣癌細胞の増殖能および遊走能を抑制し、アポトーシスを促進した。
- ③ マイクロアレイ実験により TRIM44 と関連して変動する癌遺伝子 (*C3AR1*, *ST3GAL5*, *NT5E (CD73)*) や癌抑制遺伝子 (*CDK19*, *CADM1*, *PRKACB*) を同定した。



## 第7章 結論

精巣癌における TRIM44 発現陽性症例は、予後が悪いことが分かった。

精巣癌における TRIM44 の作用機序として *NT5E* や *CADM1* などの癌関連遺伝子を制御することで細胞増殖および細胞遊走能を促進し、アポトーシスを抑制することが考えられた（図 19）。TRIM44 は、精巣癌における新規予後因子や治療標的因子となりえることが示唆された。

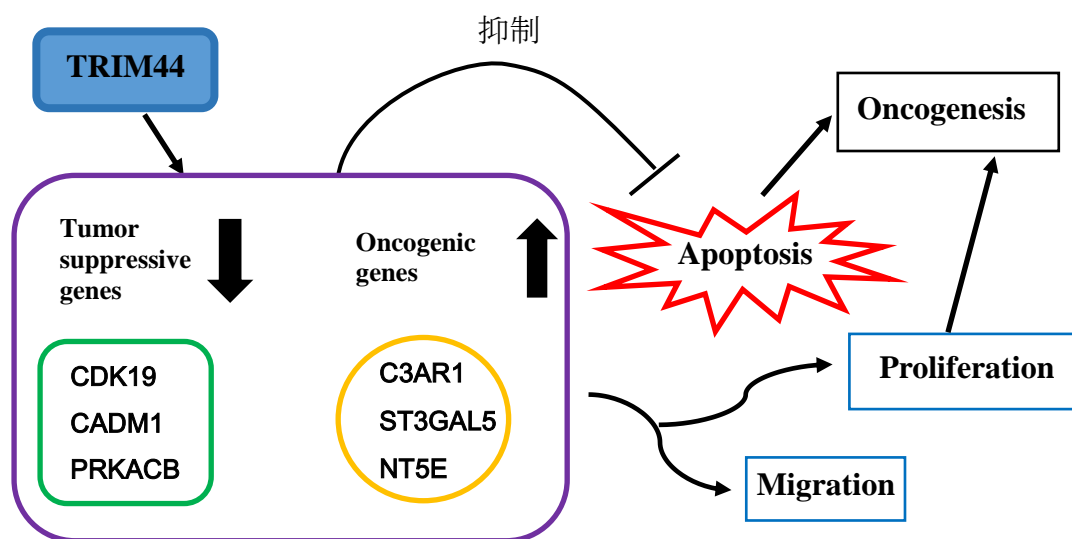


図 19 精巣癌における TRIM44 の作用機序

## 謝辞

本研究をすすめるにあたって、東京大学大学院医学系研究科泌尿器外科学教授の本間之夫先生には、研究テーマから研究の方向性、実験全般にわたって的確なご指導をいただきました。深く感謝の意を表します。

研究をご指導いただいた東京都健康長寿医療センターの高山賢一先生および井上聡先生に心から感謝いたします。

実験全般、研究内容についてご指導をいただいた日本大学泌尿器科学教室主任教授の高橋悟先生および東京大学大学院医学系研究科泌尿器科外学准教授の藤村哲也先生、福原浩先生に深く感謝いたします。

## 略語一覧

TRIM: tripartite motif

SGCT: seminomatous germ cell tumor

NSGCT: nonseminomatous germ cell tumor

AFP: alpha-feto protein

hCG: human chorionic gonadotropin

LDH: lactate dehydrogenase

Ub: ユビキチン

ATP: adenosine triphosphate

AMP: adenosine monophosphate

GST: glutathione S-transferase

TBS: tris-buffered saline

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

FBS: fetal bovine serum

PBS: phosphate buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

qRT-PCR: quantitative real time polymerase chain reaction

SDS: sodium dodecyl sulfate

SD: standard deviation

MTS:

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

TUNEL: TdT-mediated dUTP nick end labelling

DAPI: 4',6-diamino-2-phenylindole

IGCCC: International Germ Cell Consensus Classification

## 引用文献

1. Albers P, Albrecht W, Algaba F, Bokemeyer C, Cohn-Cedermark G, Fizazi K, Horwich A, Laguna MP, Nicolai N, Oldenburg J; European Association of Urology. Guidelines on Testicular Cancer. Available from URL: <http://uroweb.org/guideline/testicular-cancer>. Accessed 13 February, 2017.
2. International germ cell consensus classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers. International Germ Cell Cancer Collaborative Group. *J Clin Oncol* **15**, 594-603 (1997) [no authors listed].
3. Lacovelli R, Palazzo A, Trenta P, Mezi S, Pellegrino D, Naso G, Cortesi E. Management of metastatic renal cell carcinoma progressed after sunitinib or another antiangiogenic treatment. *Am J Clin Oncol* **37**, 611-615 (2014).
4. Sukari A, Nagasaka M, Al-Hadidi A, Lum LG. Cancer Immunology and Immunotherapy. *Anticancer Res* **36**, 5593-606 (2016).
5. Foot N, Henshall T, Kumar S. Ubiquitination and the regulation of membrane proteins. *Physiol Rev* **97**, 253-81 (2017).
6. Shah JJ, Orlowski RZ. Proteasome inhibitors in the treatment of multiple myeloma. *Leukemia* **11**, 1964-1179 (2009).
7. Ikeda K, Inoue S. TRIM proteins as RING finger E3 ubiquitin ligases. *Adv Exp Med Biol* **770**, 27-37 (2012).
8. Hatakeyama S. TRIM proteins and cancer. *Nat Rev* **11**, 792-804 (2011).
9. Liu C, Huang X, Hou S, Hu B, Li H. Silencing of tripartite motif (TRIM) 29 inhibits proliferation and invasion and increases chemosensitivity to cisplatin in human squamous cancer NCI-H520 cells. *Thorac Cancer* **6**, 31-37 (2015).

10. Wang Y, He D, Yang L, Wen B, Dai J, Zhang Q, Kang J, He W, Ding Q, He D. TRIM26 functions as a novel tumor suppressor of hepatocellular carcinoma and its down regulation contributes to worse prognosis. *Biochem Biophys Res Commun* **463**, 458-465 (2015).
11. Qiu F, Xiong JP, Deng J, Xiang XJ. TRIM29 functions as an oncogene in gastric cancer and is regulated by miR-185. *Int J Clin Exp Pathol* **8**, 5053-5061 (2015).
12. Kosaka Y, Inoue H, Ohmachi T, Yokoe T, Matsumoto T, Mimori K, Tanaka F, Watanabe M, Mori M. Tripartite motif-containing 29 (TRIM29) is a novel marker for lymph node metastasis in gastric cancer. *Ann Surg Oncol* **14**, 2543-2549 (2007).
13. Suzuki T, Urano T, Tsukui T, Horie-Inoue K, Moriya T, Ishida T, Muramatsu M, Ouchi Y, Sasano H, Inoue S. Estrogen-responsive finger protein as a new potential biomarker for breast cancer. *Clin Cancer Res* **11**, 6148-6154 (2005).
14. Urano T, Saito T, Tsukui T, Fujita M, Hosoi T, Muramatsu M, Ouchi Y, Inoue S. Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature* **417**, 871-875 (2002).
15. Fujimura T, Inoue S, Urano T, Takayama K, Yamada Y, Ikeda K, Obinata D, Ashikari D, Takahashi S, Homma Y. Increased expression of Tripartite motif (TRIM) 47 is a negative prognostic predictor in human prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer* **14**, 298-303 (2016).
16. Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Takayama K, Sugihara T, Obinata D, Yamada Y, Kumagai J, Kume H, Ouchi Y, Inoue S, Homma Y. Expression of androgen and estrogen signaling components and stem cell markers to predict cancer progression and cancer-specific survival in patients with metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res* **20**, 4625-4635 (2014).

17. Liang J, Xing D, Li Z, Shen J, Zhao H, Li S. TRIM59 is upregulated and promotes cell proliferation and migration in human osteosarcoma. *Mol Med Rep* **13**, 5200-5206 (2016).
18. Botou E, Matsas R, Mamalaki A. Isolation of a mouse brain cDNA expressed in developing neuroblasts and mature neurons. *Brain Res Mol Brain Res* **86**, 153-167 (2001).
19. Kashimoto K, Komatsu S, Ichikawa D, Arita T, Konishi H, Nagata H, Takeshita H, Nishimura Y, Hirajima S, Kawaguchi T, Shiozaki A, Fujiwara H, Okamoto K, Tsuda H, Otsuji E. Overexpression of TRIM44 contributes to malignant outcome in gastric carcinoma. *Cancer Sci* **103**, 2021-2026 (2012).
20. Ong CA, Shannon NB, Ross-Innes CS, O'Donovan M, Rueda OM, Hu D, Kettunen MI, Walker CE, Noorani A, Hardwick RH, Caldas C, Brindle K, Fitzgerald RC. Amplification of TRIM44: pairing a prognostic target with potential therapeutic strategy. *J Natl Cancer Inst* **106**, (2014).
21. Järvinen AK, Autio R, Kilpinen S, Saarela M, Leivo I, Grenman R, Mkitie AA, Monni O. High-resolution copy number and gene expression microarray analyses of head and neck squamous cell carcinoma cell lines of tongue and larynx. *Genes Chromosomes Cancer* **47**, 500-509 (2008).
22. Orimo A, Inoue S, Ikeda K, Noji S, Muramatsu M. Molecular cloning, structure and expression of mouse estrogen-responsive finger protein Efp. Co-localization with estrogen receptor mRNA in target organs. *J Bio Chem* **270**, 24406-24413 (1995).
23. **Yamada Y**, Fujimura T, Takahashi S, Takayama K, Urano T, Murata T, Obinata D, Ouchi Y, Homma Y, Inoue S. Clinical significance of amyloid precursor protein in patients with testicular germ cell tumor. *Adv Urol* **2013**, 348438 (2013).

24. **Yamada Y**, Takayama K, Fujimura T, Ashikari D, Obinata D, takahashi S, Ikeda K, Kakutani S, Urano T, Fukuhara H, Homma Y, Inoue S. A novel prognostic factor TRIM44 promotes cell proliferation and migration, and inhibits apoptosis in testicular germ cell tumor. *Cancer Sci* **108**, 32-41 (2017).
25. Takayama K, Kaneshiro K, Tsutsumi S, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Ijichi N, Ouchi Y, Shirahige K, Aburatani H, Inoue S. Identification of novel androgen response genes in prostate cancer cells by coupling chromatin immunoprecipitation and genomic microarray analysis. *Oncogene* **26**, 4453-4463 (2007).
26. Takayama K, Suzuki T, Tsutsumi S, Fujimura T, Takahaashi S, Homma Y, Urano T, Aburatani H, Inoue S. Integrative analysis of FOXP1 function reveals a tumor-suppressive effect in prostate cancer. *Mol Endocrinol* **28**, 2012-2024 (2014).
27. Jiang WG, Davies G, Martin TA, Kynaston H, Mason MD, Fostad O. Com-1/p8 acts as a putative tumour suppressor in prostate cancer. *Int J Mol Med* **18**, 981-986 (2006).
28. Malicet C, Lesavre N, Vasseur S, Iovanna JL. p8 inhibits the growth of human pancreatic cancer cells and its expression is induced through pathways involved in growth inhibition and repressed by factors promoting cell growth. *Mol Cancer* **2**, 37 (2003).
29. Trakala M, Malumbres M. Cyclin C surprises in tumour suppression. *Nat Cell Biol* **16**, 1031-1033 (2014).
30. Wikman H, Westphal L, Schmid F, Pollari S, Kropidlowski J, Sielaff-Frimpong B, Glatzel M, matschke J, Westphal M, Iljin K, Huhtala H, Terracciano L, Kallioniemi A, Sauter G, Müller V, Witzel I, Lamszus K, Kemming D, Pantel K. Loss of CADM1 expression is associated with poor prognosis and brain metastasis in breast



- cancer patients. *Oncotarget* **5**, 3076-3087 (2014).
31. Faraji F, pang Y, Walker RC, Nieves Borges R, Yang L, Hunter KW. Cadm1 is a metastasis susceptibility gene that suppresses metastasis by modifying tumor interaction with the cell-mediated immunity. *PLoS Genet* **8**, e1002926 (2012).
  32. Zhang J, Ning J, Geng J, Cui B, Dong X. Down-regulation of tumor suppressor in lung cancer 1 (TSLC1) expression correlates with poor prognosis in patients with colon cancer. *J Mol Histol* **33**, 1455-1465 (2012).
  33. Qui Y, Luo X, Kan T, Zhang Y, Yu W, Wei Y, Shen N, Yi B, Jiang X. TGF- $\alpha$  upregulates miR-182 expression to promote gallbladder cancer metastasis by targeting CADM1. *Mol Biosyst* **10**, 679-685 (2014).
  34. Yang Z, Wang R, Zhang T, Dong X. MicroRNA-126 regulates migration and invasion of gastric cancer by targeting CADM1. *Int J Clin Exp Pathol* **8**, 8869-8880 (2015).
  35. Masuda M, Yageta M, Fukuhara H, Kuramochi M, Maruyama T, Nomoto A, Murakami Y. The tumor suppressor protein TSLC1 is involved in cell-cell adhesion. *J Biol Chem* **277**, 31014-31019 (2002).
  36. Kuramochi M, Fukuhara H, Nobukuni T, Kanbe T, Maruyama T, Ghosh HP, Pletcher M, Isomura M, Onizuka M, Kitamura T, Sekiya T, Reeves RH, Murakami Y. TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small cell lung cancer. *Nat Genet* **27**, 427-430 (2001).
  37. Lu B, Di W, Wang H, Ma H, Li J, Zhang Q. Tumor suppressor TSLC1 is implicated in cell proliferation, invasion and apoptosis in laryngeal squamous carcinoma by regulating Akt signaling pathway. *Tumour Biol* **33**, 2007-2017 (2012).
  38. Takahashi Y, Iwai M, Kawai T, Arakawa A, Ito T, Sakurai-yageta M, Ito A, Goto A,

- Saito M, Kasumi F, Murakami Y. Aberrant expression of tumor suppressors CADM1 and 4.1B in invasive lesions of primary breast cancer. *Breast Cancer* **19**, 242-252 (2012).
39. Lung HL, Cheung AK, Xie D, Cheng Y, Kwong FM, Murakami Y, Guan XY, Sham JS, Chua D, Protopopov AI, Zabarovsky ER, Tsao SW, Stanbridge EJ, Lung ML. TSLC1 is a tumor suppressor gene associated with metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* **66**, 9385-9392 (2006).
40. Uchino K, Ito A, Wakayama T, Koma Y, Okada T, Ohbayashi C, Iseki S, Kitamura Y, Tsubota N, Okita Y, Okada M. Clinical implication and prognostic significance of the tumor suppressor TSLC1 gene detected in adenocarcinoma of the lung. *Cancer* **98**, 1002-1007 (2003).
41. Yang YX, Yang AH, Yang ZJ, Wang ZR, Xia XH. Involvement of tumor suppressor in lung cancer 1 gene expression in cervical carcinogenesis. *Int J Gynecol Cancer* **16**, 1868-1872 (2006).
42. Zeng D, Wu X, Zheng Y, Chen J, Hong C, Zhang F, Wu M, Lin D. Loss of CADM1/TSLC1 Expression is associated with poor clinical outcome in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Gastroenterol Res Pract* **2016**, 6947623 (2016).
43. Jansen M, Fukushima N, Rosty C, Walter K, Altink R, van Heek T, Hruban R, Offerhaus JG, Goggins M. Aberrant methylation of the 5'CpG island of TSLC1 is common in pancreatic ductal adenocarcinoma and is first manifest in high-grade PanINs. *Cancer Biol Ther* **1**, 293-296 (2002).
44. Kim YI, Kim BH, Khang I, Cho BN, Lee HK. Cell growth regulation through apoptosis by activin in human gastric cancer SNU-16 cell lines. *Oncol Rep* **21**,

- 491-497 (2009).
45. Johnstone RW, Frew AJ, Smyth MJ. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer* **8**, 782-798 (2008).
  46. Chen Y, gao Y, Tian Y, Tian DL. PRKACB is downregulated in non-small cell lung cancer and exogenous PRKACB inhibits proliferation and invasion of LTP-A2 cells. *Oncol Lett* **5**, 1803-1808 (2013).
  47. Guo H, Nairn A, dela Rosa M, Nagy T, Zhao S, Moremen K, Pierce M. Transcriptional regulation of the protocadherin  $\beta$  cluster during Her-2 protein-induced mammary tumorigenesis results from altered N-glycan branching. *J Bio Chem* **287**, 24941-24954 (2012).
  48. DeYoung MP, Horak P, Sofer A, Sgroi D, Ellisen LW. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev* **22**, 239-251 (2008).
  49. Nabizadeh JA, Manthey HD, Steyn FJ, Chen W, Widiapradja A, Md Akhir FN, Boyle GM, Taylor SM, Woodruff TM, Rolfe BE. The component C3a receptor contributes to melanoma tumorigenesis by inhibiting neutrophil and CD4<sup>+</sup> cell responses. *J Immunol* **196**, 4783-4792 (2016).
  50. Hu J, lu J, Lian G, Ferland RJ, Dettenhofer M, Sheen VL. Formin 1 and filamin B physically interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation in the growth plate. *Hum Mol Genet* **23**, 4663-4673 (2014).
  51. Li L, ma G, Jing C, Liu Z. Guanylate-binding protein 1 (GBP1) promotes lymph node metastasis in human esophageal squamous cell carcinoma. *Discov Med* **20**, 369-378 (2015).
  52. Liang YJ, Ding Y, Levery SB, Lobaton M, Handa K, Hakomori SI. Differential

- expression profiles of glycosphingolipids in human breast cancer stem cells vs. cancer non-stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 4968-4973 (2013).
53. Turcotte M, Spring K, Pommey S, Chouinard G, Cousineau I, George J, Chen GM, Gendoo DM, Haibe-Kains B, Karn T, Rahimi K, Le Page C, Provencher D, Mes-Masson AM, Stagg J. CD73 is associated with poor prognosis in high-grade serous ovarian cancer. *Cancer Res* **75**, 4494-4503 (2015).
  54. Zhang B, Song B, Wang X, Chang XS, Pang T, Zhang X, Yin K, Fang GE. The expression and clinical significance of CD73 molecule in human rectal adenocarcinoma. *Tumour Biol* **36**, 5459-5466 (2015).
  55. Gao ZW, Dong K, Zhang HZ. The roles of CD73 in cancer. *Biomed Res Int* **2014**, 460654 (2014).
  56. Lu XX, Chen YT, Feng B, Mao XB, Yu B, Chu XY. Expression and clinical significance of CD73 and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* **19**, 1912-1918 (2013).
  57. Wu X, He XS, Chen YF, Yuan RX, Zeng Y, Lian L, Zou YF, Lan N, Wu XJ, lan P. High expression of CD73 as a poor prognostic biomarker in human colorectal cancer. *J Surg Oncol* **106**, 130-137 (2012).
  58. Yang Q, Du J, Zu L. Overexpression of CD73 in prostate cancer is associated with lymph node metastasis. *Pathol Oncol Res* **19**, 811-814 (2013).
  59. Loi S, Pommey S, Haibe-Kains B, Beavis PA, Darcy PK, Smyth MJ, Stagg J. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 11901-11906 (2013).
  60. Bonnin N, Armandy E, Carras J, Ferrandon S, Battiston-Montagne P, Aubry M, Guihard S, Meyronet D, Foy JP, Saintigny P, Ledrappier S, Jung A, Rimokh R,

- Rodriguez-Lafrasse C, Poncet D. MiR-422a promotes loco-regional recurrence by targeting NT5E/CD73 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* **7**, 44023-44038 (2016).
61. Allard N, Turcotte M, Spring K, Pommey S, Royal I, Stagg J. Anti-CD73 therapy impairs tumor angiogenesis. *Int J Cancer* **134**, 1466-1473 (2014).
  62. Wang L, Tang S, Wang Y, Xu S, Yu J, Zhi X, Ou Z, Yang J, Zhou P, Shao Z. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes tumor angiogenesis. *Clin Exp Metastasis* **30**, 671-680 (2013).
  63. Wang L, Zhou X, Zhou T, Ma D, Chen S, Zhi X, Yin L, Shao Z, Ou Z, Zhou P. Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* **134**, 365-372 (2008).
  64. Beavis PA, Divisekera U, Paget C, Chow MT, John LB, Devaud C, Dwyer K, Stagg J, Smyth MJ, Darcy PK. Blockade of A2A receptors potently suppresses the metastasis of C73+ tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 14711-14716 (2013).
  65. Zhao H, Wang Q, Wang X, Zhu H, Zhang S, Wang W, Wang Z, Huang J. Correlation between RAB27B and p53 expression and overall survival in pancreatic cancer. *Pancreas* **45**, 204-210 (2016).
  66. Samarin J, Laketa V, Malz M, Roessler S, Stein I, Horwitz E, Singer S, Dimou E, Cigliano A, Bissinger M, Falk CS, Chen X, Dooley S, Pikarsky E, Calvisi DF, Schultz C, Schirmacher P, Breuhahn K. PI3K/AKT/mTOR-dependent stabilization of oncogenic far-upstream element proteins in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* **63**, 813-826 (2016).
  67. Curtin JF, Cotter TG. JNK regulates HIPK3 expression and promotes resistance to Fas-mediated apoptosis in DU 145 prostate carcinoma cells. *J Biol Chem* **279**,

- 17090-17100 (2004).
68. Banyard J, Chung I, Migliozi M, Phan DT, Wilson AM, Zetter BR, Bielenberg DR. Identification of genes regulating migration and invasion using a new model of metastatic prostate cancer. *BMC Cancer* **14**, 387 (2014).
69. Yamada Y, Nakagawa T, Sugihara T, Horiuchi T, Yoshizaki U, Fujimura T, Fukuhara H, Urano T, Takayama K, Inoue S, Kume H, Homma Y. Prognostic value of CD66b positive tumor-infiltrating neutrophils in testicular germ cell tumor. *BMC Cancer* **16**, 898 (2016).
70. Luo Q, Lin H, Ye X, Huang J, Lu S, Xu L. Trim44 facilitates the migration and invasion of human lung cancer cells via the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Int J Clin Oncol* **20**, 508-517 (2015).
71. Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci* **94**, 575-581 (2003).