

論文の内容の要旨

論文題目： 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

氏名： 山田雄太

序文：

精巣癌は、男性癌の 1-2%を占める比較的まれな癌である。一般的に、精巣癌患者の予後は良好であるが、International Germ Cell Consensus Classification (IGCCC)リスク分類の poor prognosis group では 5 年生存率は 48%と高くない。これまでに精巣癌の予後因子としては、病理組織型、腫瘍マーカー、臓器転移、脈管侵襲、腫瘍内好中球数などの因子が報告されている。しかし、分子細胞レベルでは、精巣癌の予後因子の報告は多くない。

近年、ユビキチン経路をターゲットとする Tripartite motif (TRIM) family が感染症や癌の領域で注目されている。TRIM family に属する TRIM 蛋白は、そのほとんどが E3 ubiquitin ligase やその modulator として機能し、ターゲットとなる蛋白のユビキチン化に関与することで蛋白の degradation を行っている。TRIM44 は、TRIM family に属し、胃癌、食道癌、頭頸部癌において強発現し、胃癌においては癌増殖を促進することで予後を悪化させることが知られている。しかし、精巣癌に関する報告はない。そこで、他臓器の癌で癌増殖と関連を認める TRIM44 の精巣癌における発現や機能を明らかにすることで、TRIM44 が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。

方法：

1. 免疫学的染色法

精巣癌患者 103 例を対象とした。1 次抗体として抗 TRIM44 抗体（ラビットの affinity 精製ポリクローナル抗体）を使用し、2 次抗体として rabbit 抗体を使用した。本抗体は、293T 細胞に

TRIM44 の DNA プラスミドをトランスフェクションし、ウェスタンブロッティング法により TRIM44 蛋白のバンドを確認することで抗体の TRIM44 蛋白の間で抗原抗体反応が生じることを確認している。陰性コントロールは、ラビットの IgG 抗体を 1 次抗体として使用した。TRIM44 の免疫学的発現と臨床病理学的パラメーターや予後との関連について検証した。

2. 精巣癌細胞 (NTERA2 と NEC8) における TRIM44 の一過性過剰発現の検証

TRIM44 の DNA プラスミドを NTERA2 と NEC8 細胞にトランスフェクションし、ウェスタンブロッティング法により TRIM44 の一過性過剰発現を確認した。TRIM44 の DNA プラスミドには flag の tag がついており抗 flag 抗体にて flag のバンドを検出したことにより TRIM44 の一過性過剰発現を確認できた。

3. TRIM44 を一過性過剰発現した精巣癌細胞における細胞増殖能実験

TRIM44 を一過性過剰発現させた精巣癌細胞の増殖能 MTS assay にて検証した。トランスフェクション 24 時間と 48 時間後に cell titer 滴下により 490nm の吸光度測定を行い細胞の増殖能を測定した。

4. TRIM44 を一過性過剰発現した精巣癌細胞における細胞の遊走能実験

TRIM44 を一過性過剰発現した精巣癌細胞の遊走能を migration assay にて検証した。

5. 精巣癌細胞に対して siTRIM44 を用いたノックダウン効率の測定

精巣癌細胞 (NTERA2 と NEC8) に対して siTRIM44 トランスフェクションを行い RT-PCR 法とウェスタンブロッティング法により TRIM44 のノックダウン効率を確認した。

6. TRIM44 ノックダウンによる精巣癌細胞の増殖能の変化

精巣癌細胞 (NTERA2 と NEC8) を siTRIM44 トランスフェクションにより TRIM44 をノックダウンし、MTS assay にて細胞の増殖能を検証した。

7. TRIM44 ノックダウンによる精巣癌細胞の遊走能の変化

精巣癌細胞 (NTERA2 と NEC8)を siTRIM44 トランスフェクションにより TRIM44 をノックダウンし、migration assay にて細胞の遊走能を検証した。

8. TRIM44 ノックダウンによる精巣癌細胞の遊走能の変化

精巣癌細胞 (NTERA2 と NEC8)を siTRIM44 トランスフェクションにより TRIM44 をノックダウンし、TUNEL assay を用いてアポトーシスを生じた精巣癌細胞の数をカウントし siControl 処理細胞と比較した。

9. siTRIM44 #3 でノックダウンした NTERA2 細胞のマイクロアレイ実験

NTERA2 細胞をもっともノックダウン効率の良かった siTRIM44 #3 にてノックダウンし、これをマイクロアレイ実験にて発現が変動したシグナルを同定した。そのうち、代表的なシグナルに関して RT-PCR 法により mRNA の発現を測定した。

結果：

精巣癌の免疫学的発現に関する解析

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。TRIM44 発現陽性例は AFP 陽性 ($P=0.0009$)、NSGCT ($P=0.0004$)、N stage ($P=0.0035$)、転移の有無 ($P=0.0073$)と有意に関連を認めた。また、多変量解析においても TRIM44 発現陽性は癌特異的生存率が有意に低かった ($P=0.046$)。

精巣癌細胞株 (NTERA2 細胞と NEC8 細胞)における機能の解析

TRIM44 を一過性過剰発現した NTERA2 や NEC8 細胞は、トランスフェクション 48 時間後で有意に細胞の増殖能が亢進していた ($P<0.05$)。また、遊走能に関しても TRIM44 一過性過剰発現した NTERA2 と NEC8 細胞において有意に亢進していた ($P<0.05$)。さらに siTRIM44 を用い

て TRIM44 をノックダウンした NTERA2 と NEC8 細胞でもトランスフェクション後 48 時間で細胞の増殖能が有意に低下していた。遊走能に関しても TRIM44 をノックダウンした NTERA2 と NEC8 細胞で有意に遊走能が低下していることがわかった ($P < 0.0001$)。また、TRIM44 をノックダウンした NTERA2 と NEC8 細胞では、アポトーシスが有意に亢進していた。

TRIM44 ノックダウン NTERA2 細胞のマイクロアレイ実験

TRIM44 をノックダウンした NTERA2 細胞で、発現レベルが最も変動した遺伝子のなかには、癌関連遺伝子が多く、*C3AR1*, *ST3GAL5*, *NT5E*, *CDK19*, *CADM1*, *PRKACB* に代表される遺伝子と同定した。*C3AR1*, *ST3GAL5*, *NT5E*, *CDK19*, *CADM1*, *PRKACB* の遺伝子の発現が siTRIM44 によりマイクロアレイ実験と同様の変化をおこすことを RT-PCR 法により mRNA レベルで確認した。

考察：

TRIM44 は、図 1 に示すように *C3AR1*, *ST3GAL5*, *NT5E*, *CDK19*, *CADM1*, *PRKACB* など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精巣癌の tumorigenesis を促進する役割を担っていると考えられた。今後の展望としては、TRIM44 のターゲット蛋白を蛋白レベルで検証していくことが望まれる。

図 1

