

平成 22 年 12 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390413
 研究課題名 (和文) 散在性反復配列(利的遺伝子) の脱メチル化による新たなヒト精巣腫瘍発
 癌モデルの構築
 研究課題名 (英文) A proposal of new concept of tumorigenesis in human testicular cancer
 by abnormal de-methylation of interspersed elements
 研究代表者 岡本 圭生 (OKAMOTO KEISEI)
 滋賀医科大学・医学部・講師
 研究者番号： 50303780

研究成果の概要 (和文) : われわれは精巣腫瘍 DNA には脱メチル化を基本とする興味深い特性が存在することを見出し、その臨床応用への可能性についても呈示してきた。本研究では精巣腫瘍ゲノムが脱メチル化状態に維持されていることが、精巣腫瘍発生のトリガーになりうるとの仮説にもとづき散在性反復配列(利己遺伝子)の脱メチル化による新たなヒト精巣腫瘍発がんモデルの構築を目指して研究を行い精巣腫瘍関連新規分子として DNMT3L を見出した。

研究成果の概要 (英文) :

Our group has continuously studied on epigenetics of testicular germ cell tumors (TGCTs) and shown that DNA of TGCTs has distinctive demethylated DNA profiles that differ from those of somatic tissue-derived cancers or somatic tissues (Int J Androl 2007). We have already described the potential clinical utility of this unique methylation phenotype in TGCTs with regard to developing a novel tumour marker. In this study, we have tried to establish a new tumorigenesis model based on abnormal demathylation of DNA repetitive elements in TGCTs. Through this study, we have obtained evidence that DNMT3L is a novel marker and is essential for the growth of human embryonal carcinoma (Clin Cancer Res 2010). Also, we have shown that unique methylation patterns of DNA repetitive elements are present in TGCTs. These methylation patterns most likely reflect the origin of these cells. Further elucidation of the mechanisms behind the maintenance of DNA hypomethylation in TGCTs is necessary in order to clarify the basic biology of this unique neoplasm.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2008 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：泌尿器科学

キーワード：精巣腫瘍、散在性反復配列、脱メチル化、メチルトランスフェラーゼ

1. 研究開始当初の背景

われわれのグループは精巣腫瘍のエピジェネティクスとその制御機構について先端的研究成果を報告し、精巣腫瘍 DNA には脱メチル化状態という体細胞由来の癌とは異なる興味深い特性が存在することを見出し、さらに新規 DNA マーカーとして利用するという臨床応用の可能性についても呈示してきた。一方で精巣腫瘍 DNA の脱メチル化を基盤としたとき、どのような発癌モデルが考えられるかを考察した結果、精巣腫瘍固有のエピジェネティクス特性に立脚した新たな発癌機構モデルとして、散在反復配列の制御破綻（脱メチル化）による精巣腫瘍発癌機構というモデルを考えるに至った。さらに精巣腫瘍において脱メチル化というエピジェネティックプロフィールを規定する因子をさまざまな角度から検討することにより新規マーカーを含めた新たな知見が得られると考えた。

2. 研究の目的

本研究では精巣腫瘍ゲノムの脱メチル化という特徴に立脚した精巣胚細胞腫瘍固有の発癌モデルの構築をめざし、この中で精巣腫瘍のエピジェネティクス維持に key となる分子を同定することにより、新たな精巣腫瘍治療や診断の方向性を開拓したいと考えた。これらの Key player の候補としてわれわれは散在反復配列、micro RNA をはじめとする non-coding RNA、DNA methyltransferase、ヒストンテールの脱メチル化、クロマチンリモデリング因子、幹細胞遺伝子群、RNA 修飾

遺伝子が重要であると考えており、これらの因子が精巣腫瘍発癌に果たす役割を明確にし、これらの後成的異常による精巣腫瘍の発癌新規モデルを構築する。さらにこれらを一步進めて精巣腫瘍感受性新規薬剤の可能性となる標的遺伝子の同定や新規 DNA マーカーの確立をめざす。

3. 研究の方法

・既知のメチルトランスフェラーゼについて RT-PCR により正常精巣組織、精巣腫瘍組織、精巣腫瘍細胞株、体細胞癌細胞株における発現を検討し、転写レベルで精巣腫瘍特異的なメチルトランスフェラーゼを探索した。

・上記の結果からスクリーニングされた DNMT3L は精巣胚細胞腫瘍固有のエピジェネティクス規定因子となりうるとの仮説から、ヒトでの DNMT3L 抗体を模索し、最終的にはヒト DNMT3L の全長蛋白を含む GST 融合タンパク質を作成し、これを用いて DNMT3L に対するポリクローナル抗体を独自に作成した。

・作成した抗体が、ヒト DNMT3L を認識するかをウェスタンブロットで検討した。

・精巣腫瘍細胞において DNMT3L 蛋白の生物学的役割を検討するために、siRNA 法による DNMT3L 発現抑制を行い、その影響について細胞生物学的に検討した。

・作製した抗ヒト DNMT3L 抗体を用いて多数の臨床検体で免疫染色を行い、新規精巣腫瘍マーカーとしての DNMT3L の意義を検討した。

・精巣腫瘍組織および精巣腫瘍由来細胞株と体細胞由来癌組織、体細胞由来癌細胞株より DNA を抽出し、これらを持ちいてヒト散在性

反復配列 (LINE1 および Alu1) のメチル化プロフィールを検討した。

・精巣腫瘍株において DNMT3L をノックダウンした細胞を作成し、DNMT3L によるヒト散在性反復配列 (LINE1 および Alu1) のメチル化プロフィールの変化を検討した。

4. 研究成果

・精巣腫瘍では胎生期特異的メチルトランスフェラーゼである DNMT3L の mRNA が特異的に発現していた。DNMT3L の転写産物は 50 を超える他の体細胞由来の細胞株では全く発現がみられなかった。

・ DNMT3L は精巣胚細胞腫瘍固有のエピジェネティクス規定因子になりうるとの仮説から、ヒト DNMT3L の全長蛋白を含む GST 融合タンパク質を作成し、これを用いて DNMT3L に対するポリクローナル抗体を独自に作成した。作製した抗体は極めて特異性、感度とも優れ、DNMT3L 発現ベクターを導入した 293 細胞において目的とするヒト DNMT3L 蛋白を認識した。さらにヒト胎児性癌由来細胞株 (精巣腫瘍由来株) およびヒト ES 細胞においても、特異的に DNMT3L を認識した。

さらに胎児性癌由来細胞株 (精巣腫瘍由来細胞株) において、siRNA 法による DNMT3L 発現抑制を行った結果、DNMT3L が抑制された胎児性癌細胞では、アポトーシスによる細胞死が見られた。

・作製した抗ヒト DNMT3L 抗体を用いて多数の臨床検体で免疫染色を行った結果、DNMT3L は、精巣腫瘍のうち胎児性癌にきわめて特異的な染色性を示した。従来胎児性癌のマーカーとして使用されてきた幹細胞遺伝子マーカーである OCT4, NANOG, SOX2 との比較も行ったが、DNMT3L は胎児性癌細胞の検出について感度、特異度とももともと優れていることがわかった。

以上より、胎児期特異的メチルトランスフェ

ラーゼ DNMT3L がヒト胎児性癌に特異的マーカーであり、また胎児性癌の増殖に必須のタンパクであることを示した

・従来から男性不妊症は精巣腫瘍の発生頻度を高める要因としてよく知られているが、両者をつなぐ分子は同定されていなかった。本研究成果により、胎生期生殖細胞に短期的に発現し将来の精巣機能を決定する胚性因子である DNMT3L が、ヒト胎児性癌の増殖因子であり、かつ新規マーカーであることを示し、このことは、妊孕性と精巣腫瘍を考える上で DNMT3L が大変重要な分子であることを意味する。

・精巣腫瘍にはヒト散在性反復配列 (LINE1 および Alu1) において腫瘍特異的な脱メチル化がおこっており、そのメチル化パターンは精巣腫瘍の起源細胞である胎児期の始原生殖細胞のそれに近似するものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Ikari R, Okamoto K, Yoshida T, Johnin K, Okabe H, Okada Y. A rare case of multiple schwannomas presenting with scrotal mass: a probable case of schwannomatosis. Int J Urol 17:734-736, 2010. (査読有)
- ② Kageyama S, Tsuru T, Okamoto K, Narita M, Okada Y: Primary synovial sarcoma arising from a crossed ectopic kidney with fusion. Int J Urol 17:96-98, 2010. (査読有)
- ③ Minami K, Chano T, Kawakami T, Ushida H, Kushima R, Okabe H, Okada Y, and Okamoto K. DNMT3L is a novel marker and is essential for the growth of human embryonal carcinoma. Clin Cancer Res 16:2751-9. 2010. (査読有)

- ④ 岡本圭生： 発生起源から考える精巣腫瘍の生物学的特性. 日本臨床 68 巻増刊号 4 68:453-456, 2010. (査読なし)
- ⑤ 岡本圭生： 発生起源からみた精巣腫瘍の分子生物学的特性と新たなバイオマーカーの探索. Urology View7:116-121, 2009. (査読なし)
- ⑥ Okamoto K and Kawakami T Epigenetic profile of testicular germ cell tumours. Int J Androl: 30: 385-392, 2007. (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

- ① Kahori Minami, Takahiro Kawakami, Tokuhiko Chano, Hidetoshi Okabe, Keisei Okamoto. Mutational analysis of *P53* gene in cancer cells presenting loss of the inactive X chromosome. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会. 2010
- ② 牛田博、南かほり、茶野徳宏、岡部英俊、岡田裕作、岡本圭生. 散在性反復配列のエピジェネティックス異常が精巣腫瘍発生に果たす意義について 第 98 回日本泌尿器科学会総会. 2010
- ③ Hiroshi Ushida, Kahori Minami, Tokuhiko Chano, Takahiro Kawakami, Hidetoshi Okabe, Yusaku Okada and Keisei Okamoto. DNMT3L is a novel marker and essential for the growth of human embryonal carcinoma. The 27th Japan-Korea Urological Congress. 2010.
- ④ Kahori Minami, Tokuhiko Chano, Hidetoshi Okabe, Keisei Okamoto. Role of fetal specific methyltransferase like protein DNMT3L in testicular germ cell tumors. 第 68 回日本癌学会総会. 2009
- ⑤ 牛田博、南かほり、茶野徳宏、岡部英俊、岡田裕作、岡本圭生. 精巣腫瘍における DNMT3L の解析 第 97 回日本泌尿器科学会総会. 2009

- ⑥ Kahori Minami, Tokuhiko Chano, Takahiro Kawakami, Hiroshi Ushida, Ryoji Kushima, Hidetoshi Okabe, Yusaku Okada and Keisei Okamoto. DNMT3L is a novel marker for human embryonal carcinoma of the testis 第 69 回日本癌学会. 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 圭生 (OKAMOTO KEISEI)
滋賀医科大学・医学部・講師
研究者番号：50303780

(2) 研究分担者

川上 享弘 (KAWAKAMI TAKAHIRO)
滋賀医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：90346023

岡田 裕作 (OKADA YUSAKU)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：90346023

上仁 数義 (JOHNIN KAZUYOSHI)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：90324590