

機関番号 : 82609

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20591872

研究課題名 (和文) 精巣腫瘍における生殖幹細胞発現遺伝子 DDX1 の機能解析

研究課題名 (英文) Functional analysis of DDX1 in testicular germ cell tumors

研究代表者

田中貴代子 (TANAKA KIYOKO)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員

研究者番号 : 40124474

研究成果の概要 (和文) :

生殖幹細胞の増殖、分化制御機構を解析する目的で、胎生 13.5 日齢の雄生殖巣から SSEA1 陽性細胞特異的に発現する遺伝子として DDX1 遺伝子を単離した。DEAD box family に属する DDX1 は、網膜芽細胞腫細胞株から増幅している遺伝子として単離され、その後神経芽細胞腫でも N-myc と共に増幅されていることが報告された<sup>1)</sup> が、生殖系での機能については不明であった。DDX1 の精子形成過程での発現を調べた結果、1) 精巣形成過程における DDX1 の発現は胎生 11 日齢生殖巣から成獣の精巣まで維持されていた。2) 7 日齢精巣から分離した c-kit(-), integrin  $\alpha 6$ (+), Thy-1(+) の未分化精原細胞集団で発現していた。3) 成獣の精巣切片を用いた免疫染色により精細管周辺部細胞で発現していた。1)-3) により、DDX1 は生殖系幹細胞で発現している遺伝子であることが示唆された。次に DDX1 の生殖系での機能を調べるために、マウス精原細胞由来 GC1 細胞株における DDX1 mRNA の発現を siRNA 導入によりノックダウンした結果、cyclinD2、CD9、GDF3 の生殖幹細胞で発現している遺伝子が顕著に低下した。発現調節機構を調べる為にマウス cyclinD2 遺伝子の転写開始点上流ゲノム DNA を用いたルシフェラーゼアッセイ、およびゲルシフトアッセイを行った。その結果、DDX1 は cyclinD2 遺伝子の -351 から -369 領域に直接結合し、転写活性を高める働きをしていることが明らかになった。DDX1 により発現制御を受ける cyclin-D2、CD9、GDF3 遺伝子はいずれもヒト精巣腫瘍の 70% でゲノム DNA 増幅がおこる染色体 12p13.3 領域に局在している<sup>2)</sup>。そこで、ヒト精巣腫瘍由来細胞株 NEC8 の DDX1 発現を siRNA 導入によりノックダウンしたところ、マウス GC1 細胞株と同様に cyclin-D2、CD9、GDF3 遺伝子の mRNA 発現が低下した。さらに、軟寒天培地中でのコロニー形成能は約 5% まで低下し、ヌードマウス皮下での造腫瘍能も消失した。実際にヒト精巣腫瘍組織と正常組織での発現を比較したところ、正常組織に比べセミノーマ、ノンセミノーマにおいて強い発現が見られた。これらの実験結果は、DDX1 が 12p13.3 領域に局在する幹細胞遺伝子群の転写活性化因子として、精巣腫瘍の誘導に必須な役割を果たしていることを強く示唆する。

研究成果の概要 (英文) :

Cytogenetic analysis has identified 12p gain as the most frequent abnormality in human testicular germ cell tumors (TGCTs). It has been suggested that amplification and overexpression of stem cell-associated genes, including *cyclin-D2*, on the human chromosome 12p region are involved in germ cell tumorigenesis. By subtractive cDNA analysis, we identified *Ddx1*, a member of the DEAD box protein family, as a gene predominantly expressed in the primordial germ cells of mouse embryos. Knockdown of *Ddx1* in a mouse spermatogonia-derived cell line, GC-1spg, by short interference RNA repressed the expression of *cyclin-D2*, *CD9* and *GDF3* genes. In the mouse *cyclin-D2* gene, a

genomic DNA region between -348 and -329 was responsible for transcriptional activation by DDX1 based on reporter and gel shift assays. Similarly, *DDX1* knockdown in the human TGCT cell line NEC8 repressed the expression of stem cell-associated genes localized on chromosome 12p13.3, including *cyclin-D2*, *CD9* and *NANOG*. *DDX1*-knocked-down TGCT cells could not form solid tumors in nude mice. Furthermore, *in situ* hybridization revealed that *DDX1* mRNA was produced in both seminoma and non-seminoma types of human TGCT samples. We conclude that DDX1 is a critical factor for testicular tumorigenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

生殖幹細胞の増殖、分化制御機構を解析する目的で、胎生 13.5 日齢の雄生殖巣から SSEA1 陽性細胞特異的に発現する遺伝子として DDX1 遺伝子を単離した。DEAD box family に属する DDX1 は、網膜芽細胞腫細胞株から増幅している遺伝子として単離され、その後神経芽細胞腫でも N-myc と共に増幅されていることが報告されていた。

また、ヒト精巣腫瘍では 12 番染色体短腕の重複が非常に高頻度で検出され、幹細胞遺伝子群の存在する 12p13 領域の過剰発現が腫瘍発生に関与していることが報告されている。しかし、DDX1 遺伝子の生殖系での機能については不明であった。

2. 研究の目的

DDX1 遺伝子の精子形成過程での発現および未分化精原細胞集団での発現を調べた結果生殖系幹細胞で発現している遺伝子であることが明らかになった。そこで、精子形成過程における DDX1 遺伝子の役割、精巣腫瘍発生への関与を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

DDX1 遺伝子の過剰発現により 12p13 上の生殖幹細胞遺伝子群の発現異常により引き起こされると想定される腫瘍形成について、生体での影響およびその分子機構を解明するために、コンディショナルトランスジェニックマウスを作製した。

一般的な過剰発現系ではトランスジェニックマウスを得ることは困難と考えられる。それ故、過剰な DDX1 の生体への影響を検討するために、強力な CAG プロモーターと Ddx1 cDNA の間に、loxP 配列で挿入した GFP 遺伝子を組込んだコンストラクトを用いてマウスを作製した。さらに別に精巣特異的プロモーター支配下に Cre を発現するトランスジェニックマウスを作製し交配させることにより得られた個体について、繊細に解析することにより DDX1 の生体内での影響、生理機能について検討する。

ヒト精巣腫瘍組織（セミノーマ、ノンセミノーマ）と精巣周辺部正常組織において、免疫染色により DDX1 の発現を調べた。

4. 研究成果

DDX1 により発現制御を受ける *cyclin-D2*, *CD9*, *GDF3* 遺伝子はいずれもヒト精巣腫瘍の 70% でゲノム DNA 増幅がおこる染色体 12p13.3 領域に局在している。

ヒト精巣腫瘍由来細胞株 NEC8 の *cyclin-D2*, *CD9*, *GDF3* 遺伝子発現を調べた結果、いずれも増幅している事が明らかになった。そこで、DDX1 発現を siRNA 導入によりノックダウンしたと

ころ、マウス GC1 細胞株と同様に cyclin-D2, CD9, GDF3 遺伝子の mRNA 発現が低下した。さらに、軟寒天培地中でのコロニー形成能は約5%まで低下し、ヌードマウス皮下での造腫瘍能も消失した。DDX1 の過剰発現により、腫瘍形成が起こっている事が明らかになった。

ヒト精巣腫瘍組織と正常組織 (US Biomax 購入から) での発現を比較したところ、正常組織では精細管周辺の精原細胞部位にのみ発現していたのに対してセミノーマ、ノンセミノーマでは多くの細胞で強い発現が見られた。これらの実験結果は、DDX1 が 12p13.3 領域に局在する幹細胞遺伝子群の転写活性化因子として、精巣腫瘍の誘導に必須な役割を果たしていることを強く示唆する。

DDX1 は生殖系で以下の事が明らかになった。

1. DDX1 遺伝子は精子形成過程において幹細胞画分で発現している。

2. マウス精原細胞株 (GC-1) で DDX1 のノックダウンにより 12p13 の幹細胞発現遺伝子が抑制されることから、DDX1 はこれらの遺伝子の上流に位置する。

3. 精巣腫瘍細胞株 (NEC8) で DDX1 のノックダウンにより腫瘍形成能が低下した。

4. ヒト精巣正常組織に比べ、腫瘍組織では発現が亢進していた。

1~4 の結果をふまえ、個体での機能を調べる為に、コンディショナルトランスジェニックマウスを2ライン作製した。

精巣特異的に Cre を発現する Nurogenin3-Cre トランスジェニックマウスと交配し、個体が生まれた。今後、成長過程における精巣を経時的に観察するとともに、組織切片、RNA、タンパク質での DDX1 遺伝子の発現、生殖幹細胞遺伝子発現を調べる予定である。

#### 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3件)

1. DDX1 is required for the testicular tumorigenesis in part by transcriptional activation of 12p stem

cell genes.

K. Tanaka, S. Okamoto, Y. Ishikawa, H. Tamura and T. Hara.

Oncogene 28: 2142-2151. 2009 査読有

2. Novel role for the intraflagellar transport protein CMG-1 in regulating the transcription of cyclin-D2, E-cadherin and integrin alpha family genes in mouse spermatocyte-derived cells:

K. Ohbayashi, K. Tanaka, K. Kitajima, K. Tamuta and T. Hara.

Genes to Cells 15:699-710, 2010 査読有

3. DDX1 [DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box poly peptide.

T. Hara and K. Tanaka.

Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.

<http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/DDX1ID40283ch2p24.html>

[学会発表] (計5件)

1. 第69回日本癌学会学術総会;

大阪国際会議場 2010.9.23

Identification of a candidate tumor suppressor gene, PTPN23, in testicular germ cell tumor.

K. Tanaka, T. Hara

2. 第68回日本癌学会学術総会;

パシフィコ横浜 2009.10.1

DDX1 is required for the testicular tumorigenesis in part by transcriptional activation of 12p stem cell genes.

K. Tanaka, T. Hara

3. 第67回日本癌学会学術総会;

名古屋国際会議場 2008.10.29

overexpression of DDX1 promotes germ cell tumorigenesis.

K. Tanaka, T. Hara

4. 第6回幹細胞シンポジウム;

東京 学術総合センター 2008.5.17

精巣腫瘍形成における DDX1 の役割

田中貴代子、原孝彦

5. 第6回幹細胞シンポジウム;

東京 学術総合センター 2008.5.17

CMG1 は精母細胞の cyclin D2 及び接着関連遺伝子の転写を制御する

原孝彦、田中貴代子

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中貴代子 (TANAKA KIYOKO)  
財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床  
医学総合研究所・主任研究員  
研究者番号：40124474

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし