

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390303

研究課題名（和文） ヒト胎児性癌新規マーカー DNMT3L の機能解析とその臨床応用

研究課題名（英文） Analysis and clinical application of DNMT3L, a novel marker for human embryonal carcinoma

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のもつ生物学的特性としてステムネス(幹細胞性)とエピジェネティクスに着目し、研究を進めてきた。シスプラチンを用いた化学療法によりほとんどの転移性精巣腫瘍において完治が得られるようになってきた。しかしながら依然としてあらゆる治療に抵抗性を示す精巣腫瘍症例が非セミノーマの中に存在する。胎児性癌成分は非セミノーマ成分の幹細胞的役割を担っており、胎児性癌が分化をすることにより化学療法抵抗性を示す可能性が示唆される。胎児性癌はステージが低くても転移、再発率が高く、精巣腫瘍の中で悪性度が高い組織型であるため、胎児性癌の制御は精巣腫瘍の臨床において重要な課題である。われわれは、本研究課題を通じて、DNMT3L 蛋白がヒト胎児性癌の増殖に必須の分子であること、また胎児性癌に特異的な新規マーカーとなりうることを見出した (Clin Cancer Res 2010)。さらに、ヒト精巣腫瘍における幹細胞遺伝子の果たす役割を検討するために胎児性癌に対する SOX2 の抑制効果についても検討した。その結果、胎児性癌に発現する幹細胞遺伝子 SOX2 をターゲットとした非セミノーマ精巣腫瘍の治療モデルを In vitro, In vivo で示した (J Urol 2012)。また精巣腫瘍のゲノム全体のプロフィールを探索するためにゲノムの大半を占める繰り返し DNA 配列のエピジェネティクスに関する包括的解析についても検討した。その結果 精巣腫瘍には体細胞由来の癌とはことなるゲノムの脱メチル化維持機構が存在することが示唆された (Mol Carcinogenesis 2012)。これらの知見をもとに、精巣腫瘍の化学療法感受性や多分化能といった興味深い生物学的特性を始原生殖細胞や胚性幹細胞にみられる弛緩したクロマチンという観点からの総説を記した (Int J Urol 2012)。

研究成果の概要（英文）：

We have advanced our research by focusing on the two unique biological features of TGCTs. Most TGCTs are curable even at the metastatic stage since they are extremely sensitive to cisplatin based chemotherapy. However, some NSGCT cases are refractory to any type of chemotherapy. EC is considered a stem cell component of NSGCT. EC cells may acquire resistance to chemotherapy in parallel with differentiation. EC has highly malignant potential in nonseminomatous TGCT. Therefore, control of EC is a key to success for patients with nonseminomas or metastatic TGCTs.

Through this project, we have shown that DNMT3L, a fetal specific DNA methyltransferase like protein, is a novel marker and essential for the growth of human embryonal carcinoma (Clin Cancer Red 2010).

EC has highly malignant potential in nonseminomatous TGCT.

To further study role of stemness genes in TGCT development, we also have examined effect of SOX2 inhibition in EC cells. The study has shown that the therapeutic potential of SOX2 silencing for EC in vitro and in vivo. Applying SOX2-siRNA may be a novel therapy for NSGCT containing EC cells. To further evaluate epigenetics of TGCTs, we have examined methylation patterns of DNA repetitive elements in TGCTs. The results showed that the underlying mechanisms to undergo or maintain demethylation of DNA repetitive sequences differ between TGCTs and cancer cells of somatic tissue origin (Mol Carcinogenesis 2012). Finally we have proposed underlying mechanism to define biological and clinical characteristics of TGCTs in view of epigenetics (Int J Urol 2012).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2012年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,370,000	18,850,000

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・精巣腫瘍のエピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

精巣腫瘍の発生頻度は決して高いものではないが、20-30歳台の青年男子に発生する悪性腫瘍としては最も頻度の高いものである。1) 1990年代以降ヨーロッパ、北米を中心に着実な精巣腫瘍の増加が世界的に認められていること、2) 21世紀に入ってもさまざまな形で精巣腫瘍の診断の遅れとそれによる悲劇が存在すること (LANCET 2002)、3) 未だ非治療症例も少なからず存在すること、4) 青年期の担癌患者の精神的、肉体的負担などを鑑みると、依然として社会的な影響が極めて大きい悪性腫瘍と考えられ、精巣腫瘍発生機構の解明、新規腫瘍マーカーの樹立、化学療法抵抗性症例に対する新たな治療法の開発は世界的に見ても大変重要な課題である。われわれは精巣腫瘍や幹細胞に特異的に発現する DNMT3L をはじめとする幹細胞遺伝子について腫瘍マーカーとしての有用性や標的分子としての有効性について検討をおこなった。

2. 研究の目的

本研究では DNMT3L のヒト胎児性癌の新規マーカーとしての意義をさらに解析するとともに精巣腫瘍治療のための新たな標的分子としての DNMT3 の役割を基礎的、臨床的に明

らかにするとともに他の幹細胞遺伝子群が精巣腫瘍治療の標的分子となりうるかについても検討した

3. 研究の方法

・作製した抗ヒト DNMT3L 抗体と SOX2 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。

・精巣腫瘍細胞において DNMT3L および SOX2 の生物学的役割を検討するために、siRNA 法による発現抑制を行い、その影響について細胞生物学的に検討した。

・SOX2 についてはマウスに Xenograft 移植をおこないこれに対して SOX2 の siRNA 投与をおこなうことにより増殖抑制がみられるかも検討した・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) のメチル化プロファイルを検討した。方法としてバイサルファイトシーケンスおよび COBRA 法を持ちいた

・DMSO 添加により胎児性癌細胞株において DNMT3L の発現減弱が誘導されることを見出したため、この条件下にて細胞の分化誘導および CDDP に対する薬剤耐性の発現について

も検討した。

4. 研究成果

・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因子である DNMT3L が、ヒト胎児性癌（精巣腫瘍）の増殖因子であり、かつ新規マーカーであることを示した。この結果は妊孕性と精巣腫瘍発生を考える上で DNMT3L が重要な分子であることを意味する。さらにヒト胎児性癌において DNMT3L の抑制によりアポトーシスを誘導できることを示したが、DNMT3L は、出生後の細胞や成人の生殖細胞、体細胞、体細胞由来の癌のいずれにおいても発現が認められないことから、胎児性癌治療の標的として理想的標的分子となりうることを示した

・精巣腫瘍の中で胎児性癌は多分化能を有し、胚性幹細胞に似た遺伝子プロフィールをもつ興味深い腫瘍である。SOX2 は胚性幹細胞や胎児性癌のいずれにも発現する幹細胞遺伝子のひとつであり、iPS（人工多能性幹細胞）を作成する際にも導入される遺伝子である。胎児性癌は奇形腫への変化をとめない、ステージが低くても転移、再発率が高く、精巣腫瘍の中で悪性度が高い組織型であるため、胎児性癌の制御は精巣腫瘍の臨床において重要な課題である。本研究では精巣腫瘍で胎児性癌に発現する幹細胞遺伝子 SOX2 をターゲットとした非セミノーマ精巣腫瘍の治療モデルを In vitro, In vivo で示した。In vivo においては効果的な siRNA デリバリーシステムの改善が必要という検討課題も判明した。

・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。特にセミノーマにおいては協力的な脱メチル化維持機構が存在するものと思われた。またセミノーマと非セミノーマの間に存在するメチル化の違いは Alu 配列のメチル化に起因すると考えられた。

・DMSO 添加により胎児性癌細胞株の分化の乱れが観察された、これにより幹細胞遺伝子である DNMT3L および SOX2 はその発現が減弱し LINE1 配列のメチル化増強が観察された。また同時に CDDP に対する薬剤耐性も増強がみられた。以上より精巣腫瘍における Stemness が CDDP への高感受性に寄与している可能性が示唆された。

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. Ushida H, Koizumi S, Kato K, Okabe H,

Okada Y, Okamoto K: Stage I nonseminomatous testicular germ cell tumor with rhabdomyosarcoma through malignant transformation treated with adjuvant BEP chemotherapy: a case report. *Int J Urol*. 2013 May;20(5):544-6. 査読あり

2. Okamoto K: Epigenetics: A way to understand the origin and biology of testicular germ cell tumors. *Int J Urol*. 2012 Jun;19(6):504-11. 査読あり

3. Ushida H, Chano T, Minami K, Kita H, Kawakami T, Okabe H, Okada Y, Okamoto K: Therapeutic potential of SOX2 inhibition for embryonal carcinoma. *J Urol*. 187(5):1876-1881, 2012. 査読あり

4. Noda S, Kageyama S, Tsuru T, Kubota S, Yoshida T, Okamoto K, Okada Y, Morita S, Terada T: Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of a hemodialyzed patient treated with 25 mg of sunitinib. *Case Rep Oncol* 5:627-632, 2012. 査読あり

5. Ushida H, Kawakami T, Minami K, Chano T, Okabe H, Okada Y, Okamoto K: Methylation profile of DNA repetitive elements in human testicular germ cell tumor. *Mol Carcinog*. 2012. 51(9):711-22. 査読あり

6. 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. 査読あり

〔学会発表〕（計 3 件）

1. 牛田博、南かほり、茶野徳宏、岡部英俊、岡田裕作、岡本圭生. 胎児性癌における SOX2 発現抑制の治療的潜在能力について：第 100 回日本泌尿器科学会総会 2012

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.

〔図書〕（計 4 件）

1. 岡本圭生：精巣腫瘍の化学療法感受性を規定する分子生物学的要因：発生とエピジェネティクスからの考察。泌尿器外科 25(3):291-5, 2012.
2. 岡本圭生：精巣腫瘍。泌尿器科診療ガイド。勝岡洋治 編集、2011; pp. 221-4、金芳堂、京都
3. 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.
4. 岡本圭生：精巣腫瘍の診断と治療アップデート 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。Urol View. 2009; 7(3): 116-21.

〔その他〕

ホームページ等 なし

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

茶野 徳宏 (CHANO TOKUHIRO)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40346028

(3) 連携研究者

磯野 高敬 (ISONO TAKAHIRO)
滋賀医科大学・実験実習支援センター
准教授
研究者番号：20176259