

氏 名	奥山 (南) 佳ほり
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士 第627号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成23年 3月10日
学位論文題目	DNMT3L is a novel marker and is essential for the growth of human embryonal carcinoma.  (DNMT3L はヒト胎児性癌に特異的な新規マーカーであり、胎児性癌の増殖に必須である)
審査委員	主査 教授 堀 池 喜八郎 副査 教授 遠 山 育 夫 副査 教授 山 本 学

## 論文内容要旨

*整理番号	632	(ふりがな) 氏名	南佳ほり
学位論文題目	DNMT3L is a novel marker and is essential for the growth of human embryonal carcinoma. (DNMT3L はヒト胎児性癌に特異的な新規マーカーであり、胎児性癌の増殖に必須である)		
<p>&lt;目的&gt; 精巣腫瘍が他の体細胞由来の癌と異なるエピジェネティクスの特性を有している。すなわち精巣腫瘍は、ゲノム全体が高度に脱メチル化されており、脱メチル化を維持しつつ遺伝子のオン、オフ制御をおこなうというユニークな機構を有している。</p> <p>一方同じ悪性細胞でありながら、胚細胞腫瘍である精巣腫瘍は臨床的にも興味深い性質を持つ。すなわち、精巣腫瘍は抗がん剤に対し格段に高い感受性を有し、転移のある症例でもその 80%以上が治癒する。このことはいったん転移を生じると、最新の分子標的薬剤を駆使しても完治が得られない他の体細胞由来の悪性腫瘍との決定的な違いである。</p> <p>精巣腫瘍固有のエピジェネティクス維持機構を解明することは、精巣腫瘍固有の新規マーカーの同定や精巣腫瘍の抗がん剤高感受性の機序の解明につながると考えた。</p> <p>&lt;方法&gt;</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 既知の DNA 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。</li> <li>2) ヒト DNMT3L の全長蛋白を認識するポリクローナル抗体を作製した。</li> <li>3) 作製した抗体がヒト DNMT3L を認識するかをウェスタンブロットで検討した。</li> <li>4) 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。</li> <li>5) 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。</li> </ol> <p>&lt;結果&gt;</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 既知のメチルトランスフェラーゼについて正常精巣組織、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た結果、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。</li> <li>2) 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、精巣腫瘍細胞における DNMT3L 遺伝子の果たす生物学的意義を検討するために、ヒトでの DNMT3L 抗体を模索した。最初に、ヒトの DNMT3L 発現ベクターを作製、293 細胞に導入し、5 種類の市販の抗ヒト DNMT3L 抗体や、マウスに対する抗体の供与を受けて、ヒトに対する交叉性や反応性を検討したが、いずれの抗体もヒト DNMT3L を認識しなかった。そこで申請者は、ヒ</li> </ol>			

ト DNMT3L の全長蛋白を含む GST 融合タンパク質を作製し、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製した。

3) 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。

4) 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。

5) 新たに作製した抗ヒト 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他の幹細胞遺伝子マーカー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。

#### <考察>

今回申請者は DNMT3L がヒト胎児性癌に特異的なマーカーであり、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が、本研究の成果は以下の点で独創的な意義を有すると考えられる。マウスでは Dnmt3L は胚性幹 (ES) 細胞で発現し、その後、分化過程を経て急速に発現消失をすることが知られている。他のグループによる最近の研究結果より、Dnmt3L は、発生過程において、多分化能をもった細胞、すなわち胚性生殖細胞 (EG) や胚性幹細胞 (ES)、多能性生殖幹細胞 (mGS) に特異的に発現していることが明らかにされた。また Dnmt3L のノックアウトマウスでは、胎生初期の生殖細胞発生において Dnmt3L が適切に発現できないことにより、雄において精子形成の障害をおこし、不妊となることが知られている。

1) 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。今回、申請者は、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た。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。

2) 胎児性癌は ES 細胞や iPS 細胞研究のずっと以前から、多分化能をもった細胞として長く研究されてきた。今回、申請者が示した、DNMT3L の胎児性癌特異的な発現とマウスでのデータは、DNMT3L が多分化能の樹立、維持に関与している可能性を示唆するものであり、今後、多能性獲得のメカニズムを考える意味で重要かつ独創的な発見であると考えられる。

3) ヒト精巣腫瘍の中で、胎児性癌は精巣腫瘍の組織成分の中でも再発率が高い癌であり、胎児性癌のコントロールが、精巣腫瘍治療のカギを握っているといっても過言ではない。

今回われわれが同定した胎児性癌特異的なマーカー 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。このことから、将来の胎児性癌治療の標的として DNMT3L が理想的な分子であると考えられ、今後治療標的としての解析に期待がもてる。

#### <結論>

DNMT3L がヒト胎児性癌に特異的なマーカーであり、また胎児性癌の増殖に必須の分子であることを示した。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	632	氏名	南 佳 ほ り
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>申請者は精巣腫瘍のエピジェネティクスの特性を解明するため、精巣腫瘍の検体と精巣腫瘍由来の細胞株を用いて、エピジェネティクス関連遺伝子の mRNA を網羅的に解析した。その結果、精巣腫瘍では、DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMT) のうち、胎生期に特異的な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ることを見いだした。</p> <p>さらに抗ヒト DNMT3L 抗体を作製し、この抗体を用いて免疫組織化学的に、DNMT3L は精巣腫瘍のうち胎児性がん極めて特異的に存在することを示し、また siRNA 法によって DNMT3L の発現を抑制するとアポトーシス (細胞死) が起こることを明らかにした。</p> <p>このように本論文は、DNMT3L がヒト胎児性がんにて特異的なマーカーであり、またそのがん細胞の増殖に必須のタンパク質であることを示している。</p> <p>この研究成果は、精巣腫瘍固有のエピジェネティクス維持機構や精巣腫瘍の抗がん薬高感受性の機序の解明につながるものであり、さらに精巣腫瘍に対する DNMT3L の新規マーカータンパク質としての臨床応用が期待される。よって本論文は博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p>なお申請者は最終試験として論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 540 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 22 年 8 月 31 日)</p>			