

ヒト精巣腫瘍における低メチル化維持機構の解明と
その生物学的意義に関する研究

(課題番号: 15591682)

平成15年度～平成16年度科学研究費補助金 基盤研究(C)研究成果

報告書

平成17年6月

研究代表者 成田充弘

(滋賀医科大学泌尿器科助手)

滋賀医科大学附属図書館



2004011642

はしがき

精巣腫瘍の発生頻度は決して高いものではないが、好発年齢が20-40歳の青壮年男子であること、化学療法の進歩にも関わらず未だ非治癒症例も少なからず存在すること、また進行癌治癒症例でも長い期間に及ぶ化学療法やリンパ節郭清術などを要することなど担癌患者の精神的、肉体的負担を考慮するとその社会的な影響が極めて大きい悪性腫瘍と考えられる。今回の申請ではこれまでのわれわれの研究過程で明らかになった精巣腫瘍 DNA における低メチル化状態という興味深い特性に絞って低メチル化状態の維持機構、低メチル化のもたらす腫瘍生物学上の意義付け、低メチル化を応用した精巣腫瘍の診断応用の可能性を検討した。

研究組織

研究代表者 平成16年度より、成田充弘(滋賀医科大学泌尿器科)

平成15年度川上享弘(滋賀医科大学泌尿器科)

研究分担者 岡本 圭生(滋賀医科大学泌尿器科)

岡田裕作(滋賀医科大学泌尿器科)

研究経費

平成15年度 1,900,000 円

平成16年度 1,600,000 円

総額 3,500,000 円

研究成果

本研究課題の成果を要約すると以下のとおりである。その詳細は添付した発表論文および関連資料に記載する。

精巣腫瘍 X 染色体においては XIST の発現がみられるにも関わらず AR, FMR1, GPC3 といった X-linked gene がメチル化を受けていないことが明らかとなり、精巣腫瘍で染色体付加の高頻度である X 染色体では XIST の発現にも関わらず、Hypomethylation で活性型 X であることを証明した(J Urol 2003)。

次に精巣腫瘍でみられた X 染色体の低メチル化状態が常染色体に及んでいる可能性を考え、癌で高頻度にみられる常染色体上の CpG island のメチル化が見られないか否かを精巣胚細胞腫瘍（セミノーマ、非セミノーマ）と精巣悪性リンパ腫を用いて 10 の癌関連遺伝子の CpG island methylation のプロフィールを検討したところ体細胞由来の癌である悪性リンパ腫では比較的高頻度に aberrant methylation を認めたとはい対称的にセミノーマ、非セミノーマともにメチレーションは全く検出されなかった(Genes Chromosome Cancer 2003)。すなわち他の癌腫において高頻度に aberrant methylation の報告されている常染色体上の 9 個の癌関連遺伝子 (*E-cadherin*, *p15*, *p16*, *BRCA1*, *Rb*, *VHL*, *RASSF1A*, *RARβ*, *GSTP1*) の CpG islands について体細胞由来の癌である精巣悪性リンパ腫と比較しながら検討を行ったところ、精巣悪性リンパ腫では *E-cadherin*, *RASSF1A*, *RARβ* のメチル化が高頻度に見られるのに対し、精巣胚細胞腫瘍ではセミノーマ、非セミノーマの如何を問わずメチル化は認められなかった。このことは病理学的に時に鑑別診断を要するセミノーマと悪性リンパ腫の識別にこれら遺伝子のメチル化が応用可能であると考えられた (Genes Chromosome Cancer 2003)。

以上の研究結果や Smiraglia らによる、RLGS を用いた精巣腫瘍ゲノムの包括的メチル化解析の結果を総合すると、精巣腫瘍ゲノムにおいては X 染色体、常染色体を問わず、また刷り込み遺伝子、癌関連遺伝子のいずれのプロモーターでも恒常的に低メチル化に維持されて何らかの強い methylation resistance な特徴を有しているという仮説を持つに至った。

しかしながらこれらの実験結果は精巣腫瘍に固有なメチル化遺伝子を見出し、特異的メチル化 DNA マーカーを作成することが困難であることを意味するものである。そこでわれわれは逆に精巣腫瘍にみられる低メチル化を利用して DNA マーカーを作成出来ないかと考え、精巣腫瘍で発現のみられる XIST 遺伝子自身のプロモーター領域に注目した。XIST 遺伝子のプロモーター領域を含む 5' 領域に分布する 53 個の CpG

sites について詳細な解析をおこなったところ正常細胞では XIST の発現の有無に対応して、これら CpG sites はメチル化の制御を受けていた。すなわち男性リンパ球では完全メチル化、女性リンパ球ではメチル化、非メチル化 DNA が 1 対1の割合で存在することが確認された (LANCET 2004)。興味深いことに精巣腫瘍では XIST の発現の有無やセミノーマ、非セミノーマといった組織型のタイプに関わらずこれら CpG sites は恒常的に非メチル化であった (LANCET 2004)。さらに本来女性にしか存在しない XIST promoter の非メチル化 DNA 断片が精巣腫瘍患者血清中に検出されることを証明し、新たな精巣腫瘍の血液マーカーとして臨床応用の可能性を示した (LANCET 2004)。

さらに Cancer Testis Antigen と呼ばれる遺伝子群についても精巣腫瘍組織における解析を進め、そのメチル化プロフィーを明らかにした (Genes Chromosome Cancer 2005)。精巣腫瘍の低メチル化維持機構については現在、始原生殖細胞との比較を行いながら研究を進めている。

研究発表

(1) 英文原著

1. Distinctive epigenetic phenotype of cancer testis antigen genes among seminomatous and non-seminomatous testicular germ cell tumors. Zhang C, Kawakami T, Okada Y, and Okamoto K* Genes, Chromosomes and Cancer 43:104-112. 2005.
2. Kawakami T, Zhang C, Taniguchi T, Kim CJ, Okada Y, Sugihara H, Hattori T, Reeve AE, Ogawa O, Okamoto K.; Characterization of loss-of-inactive X in Klinefelter syndrome and female derived cancer cells. ONCOGENE 23: 6163 2004
3. Kawakami, T., Okamoto, K., Ogawa, O. Okada, Y.: XIST unmethylated DNA fragments in male-derived plasma as a tumour marker for testicular cancer. Lancet, 363: 40, 2004
4. Kawakami, T., Okamoto, K, Sugihara, H. Hattori, T. Reeve, A. E. Ogawa, O. Okada, Y.: The MET proto-oncogene is not a major target for the gain of chromosome 7 in testicular germ-cell tumors of adolescents. Virchows Arch, 444: 480, 2004
5. Kawakami, T., Okamoto, K., Kataoka A, Koizumi S, Iwaki H, Sugihara H, Reeve AE, Ogawa O, Okada Y.: Multipoint methylation analysis indicates a distinctive epigenetic phenotype among testicular germ cell tumors and testicular malignant lymphomas. Genes Chromosomes Cancer, 38: 97, 2003
6. Kawakami, T., Okamoto, K., Ogawa, O., Okada Y.: Multipoint methylation and expression analysis of tumor suppressor genes in human renal cancer cells. Urology, 61: 226, 2003
7. Kawakami T, Okamoto K, Sugihara H, Hattori T, Reeve AE, Ogawa O, Okada Y; The Roles of Supernumerical X chromosomes and XIST expression in Testicular Germ Cell Tumors. *J Urol* 169: 1546-52, 2003.

(2) 口頭発表

1. 岡本 圭生. 精巣腫瘍のエピジェネティックスとその臨床応用 (特別講演)
第 93 回日本泌尿器学会総会 (東京). 2005.
2. 川上享弘、岡本圭生、張誠、岡田裕作: 精巣腫瘍における Cancer Testis Antigen (CTA) 遺伝子の発現制御機構. 第 93 回日本泌尿器学会総会 (東京). 2005.
3. 川上享弘、岡本圭生、杉原洋行、小川修、岡田裕作: 精巣腫瘍における第 11 番染色体短腕の刷り込み遺伝子領域の脱メチル化とその意義. 第 92 回日本泌尿器学会総会(大阪) 2004.
4. Multipoint Methylation Analysis Indicates a Distinctive Epigenetic Phenotype Among Testicular Germ Cell Tumors and Testicular Malignant Lymphomas:
Okamoto K, Kawakami T, Sugihara H, Hattori T, Reeve A, E. Ogawa O, Okada Y.
第 92 回日本泌尿器学会総会(大阪) 2004
5. 川上享弘、岡本圭生、岡田裕作、杉原洋行、小川修: 精巣腫瘍における癌遺伝子 MCF2 (Xq27)の変異解析. 第 91 回日本泌尿器学会総会(徳島) 2003
6. 岡本圭生、川上享弘、岡田裕作、杉原洋行、小川修: 腎細胞癌における E-cadherin 遺伝子不活化機構についての検討. 第 91 回日本泌尿器学会総会(徳島) 2003