

X 染色体ヒト精巣腫瘍感受性遺伝子の同定と X 染色体
不活化機構の関与についての研究

(課題番号: 13671647)

平成13年度～平成14年度科学研究費補助金 基盤研究(C)(2)研究

成果報告書

平成15年6月

研究代表者 岡田 裕作

(滋賀医科大学泌尿器科教授)

X染色体ヒト精巣腫瘍感受性遺伝子の同定とX染色体
不活化機構の関与についての研究

(課題番号: 13671647)

平成13年度～平成14年度科学研究費補助金 基盤研究(C)(2)研究

成果報告書

平成15年6月

研究代表者 岡田 裕作

(滋賀医科大学泌尿器科教授)

滋賀医科大学附属図書館



2002018565

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。しかしながら、精巣腫瘍の分子遺伝学的発生メカニズムについては家族性の精巣腫瘍がきわめてまれであることや染色体異常の範囲が多彩で多岐にわたることよりこれまで明確な癌遺伝子、癌抑制遺伝子の同定がなされていないのが現状である。われわれはこれまで精巣腫瘍の染色体異常として染色体付加が多いことに着目し、この中で特に X 染色体の関与に注目して研究を行うこととした。今回の研究では精巣腫瘍における X 染色体の倍数体とそれを不活化する XIST の存在という X 染色体をとりまく複雑な制御機構を念頭に X 染色体上に存在する精巣胚細胞腫瘍の感受性遺伝子が gene dosage にしたがって働く癌遺伝子的分子なのかまた癌抑制遺伝子的分子であるのかを中心に明らかにした。

研究組織

研究代表者 岡田 裕作(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)

杉原洋行(滋賀医科大学病理学)

吉貴 達寛(滋賀医科大学泌尿器科)

研究協力者 川上享弘(滋賀医科大学泌尿器科)

研究経費

平成13年度 2,100,000 円

平成12年度 2,000,000 円

総額 4,100,000 円

研究発表

(1) 英文原著

1. Kawakami T, Okamoto K, Kataoka A, Koizumi S, Iwaki H, Sugihara H, Reeve AE, Ogawa O, Okada Y.; Multipoint methylation analysis indicates distinctive patterns of methylation among testicular germ cell tumors and testicular malignant lymphomas. *Genes, Chromosomes and Cancer*. in press.
2. 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.
3. Kawakami T, Okamoto K, Ogawa O, Okada Y; Multipoint methylation and expression analysis of the tumor suppressor genes in human RCC derived cell lines. *Urology* 61: 226–230. 2003
4. Nishikawa Z, Okamoto K, Kataoka A, Soga H, Wakabayashi Y, Kushima R, Okada Y. Transitional cell carcinoma in a single ectopic ureter opening into the ejaculatory duct. *Urology* 60: 912. 2002.
5. Takimoto Y, Okamoto K, Wakabayashi Y, and Okada Y; Torsion of a spermatocele: A rare manifestation of the spermatocele. *Urol Int* 69: 164–65, 2002.
6. Yuasa T, Okamoto K, Kawakami T, Mishina M, Ogawa O, Okada Y.; Expression patterns of cancer/testis antigens in testicular germ cell tumors and in adjacent testicular tissues. *J Urol* 165: 1790–94, 2001.

(2) 口頭発表

1. 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
2. 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
3. 岡本圭生、川上享弘、岡田裕作 DNA メチル化をもちいたヒト精巣腫瘍の新しい診断法の開発 第3回滋賀医科大学・京都工芸繊維大学ジョイントセミナー「遺伝

子診断と治療の最前線 (大津) 2002

4. 川上享弘、岡本圭生、岡田裕作、小川修:精巣腫瘍発生において X 染色体数の増加とX染色体不活化機構の果たす生物学的意義についての検討. 第 90 回日本泌尿器学会総会(東京)2002
5. 岩城 秀出洙、岡本圭生、川上享弘、岡田裕作、小川修:精巣腫瘍における methylation profile の検討. 第 90 回日本泌尿器学会総会(東京)2002
6. 岡本圭生、川上享弘、岡田裕作、小川修:腎細胞癌における VHL 遺伝子と E-cadherin 遺伝子メチル化制御の相関 第 90 回日本泌尿器学会総会(東京) 2002
8. 加藤研次郎、小泉修一、岡本圭生、岡田裕作. 父子に発生した精巣腫瘍 第 175 回日本泌尿器科学会関西地方会 西宮市 2001
9. 岡本圭生、湯浅 健、岡田裕作、三品睦輝、小川 修. 精巣腫瘍における Cancer Testis Antigen 遺伝子の包括的発現解析. 第 88 回日本泌尿器科学会総会、2000. (札幌)

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。

われわれは精巣腫瘍における染色体異常としてX染色体の増加に着目して研究を進めているが、その理由として1) 精巣腫瘍の核型分析でX染色体において二倍体、三倍体といったコピー数の増加が顕著であること、2) XXY 核型を示す Klinefelter syndrome でも胚細胞腫瘍の発生頻度が高いこと3) X染色体上には精巣特異的抗原が数多く存在することがあげられる。さらに Xq27 上に家族性精巣腫瘍の候補遺伝子座 (TGCT1) が Xq27 にマッピングされたこと (Rapley et al., 2000) があげられる。これらの事象は精巣腫瘍発生におけるX染色体の関与を強く裏付けるものと考えられるが、その一方でX染色体には正常女性核型 XX にみられるように XIST を介した X 染色体不活化機構 (X inactivation) が存在しいわゆる余剰 X の不活化というユニークな機能が存在する。さらに男性 XY においても精巣胚細胞にだけは XIST の発現がみられる (McCarrey & Dilworth, 1992) (Richler et al., 1992) (Salido et al., 1992)。しかし精巣における XIST の生物学的意義については不明である。これら X 染色体の倍数

体とそれを不活化する XIST の存在という X 染色体をとりまく複雑な制御機構を考えると X 染色体におそらく存在すると思われる精巣胚細胞腫瘍の感受性遺伝子が gene dosage にしたがって働く癌遺伝子的分子なのかまた癌抑制遺伝子的分子であるのかは極めて興味深い問題点であると考えられる。今回の申請ではこの点を明らかにすることに特に力点を置き研究を進めた結果以下の新しい知見を得ることが出来た。

1. 精巣胚細胞腫瘍 (Testicular germ cell tumor:: TGCT) においてはセミノーマ、非セミノーマの如何を問わず X 染色体の増加が恒常的にみられることが確認された。X 染色体には正常女性核型 XX にみられるように XIST を介した X 染色体不活化機構 (X inactivation) 存在しいわゆる counting mechanism による余剰 X の不活化というユニークな機能が存在するが、男性 XY においても精巣胚細胞にだけは XIST の発現がみられる。このことを反映して精巣腫瘍でも特にセミノーマにおいて高頻度に XIST の発現がみられることが判明した。さらに精巣および精巣腫瘍における XIST の生物学的意義について以下の知見を得た。

すなわち、精巣腫瘍および精巣胚細胞における XIST の転写産物は女性 XX における不活化 X とは異なり、X 染色体遺伝子 (GPC3, FMR および AR 遺伝子) のメチル化を介した不活性化には繋がっていないことを明らかにした。このことから精巣腫瘍における X 染色体の増加は XIST の発現にも関わらず Inactivation を受けないことが想定され、精巣腫瘍における XIST の発現は女性 XX における余剰 X 染色体の不活化 (いわゆる counting mechanism) とは異なるものと考えられた。このことは Marahrens らによる Xist ノックアウトマウスで雄の精巣には異常がおこらず、精巣における Xist 発現は機能的意義を持たないと仮説に合致するものであった (Marahrens et al., 1997)。

2. 1. の結果より、精巣腫瘍における余剰 X 染色体は XIST の発現にも関わらずすべて非メチル化であり活性型 X 染色体であると考えられた。

C Brown らのグループによる、mouse/human cell hybrids のデータ (Brown et al., 1997) から個々の X 染色体上の遺伝子が X inactivation の制御を受けているか否かが詳細に報告されているが、いくつかの癌原遺伝子は厳格に X 染色体不活化の制御を受けていることがわかっている。このことは通常的女性由来の体細胞では癌遺伝子のような増殖に直接関わるような遺伝子は確実に gene dosage を x1 に設定する必要があるのではないかと考えられ興味深い事象である。そこでわれわれは X 染色体上の癌遺伝子のうち X 染色体の不活化の制御下にあるとされる 2 つの癌原遺伝子 (ELK-1, ARAF1) に着目し、X 染色体の増加を認める 4 つの精巣腫瘍由来細胞株と通常女性型核型 (XX) を示し活性型 X 染色体と不活化型 X 染色体を各々 1 個ずつもつ乳がん由来細胞株 MCF-7 との間で ELK-1, ARAF1 の発現を定量的に解析した。その結

果、精巣腫瘍由来細胞株でX染色体が非メチル化であった3つの細胞株ではXISTの発現の有無に関わらずMCF-7に比べて両遺伝子の発現が数倍上昇していることが確認された。以上の結果は、精巣腫瘍においてX染色体の増加が癌遺伝子の gene dosage 上昇を通じて腫瘍化に関わっている可能性を示唆するものと考えた。これらの知見より、精巣腫瘍におけるX染色体上に存在する精巣腫瘍発生に関わる感受性遺伝子は癌抑制遺伝子よりは癌遺伝子的な分子を検討していくべきと考えられた。

3. ヒト X 染色体上には精巣の発生、分化に関与すると考えられる数多くの遺伝子が存在することが近年明らかとなったが、この中でX染色体上にクラスターとして存在するCancer Testis Antigen (CTA) 遺伝子群に注目し精巣腫瘍における発現パターンを包括的に検討した。X染色体上のCTA遺伝子としてMAGE (A), MAGE (B), GAGE, PAGE-1, HOM-MEL-40 (SSX2), NY-ESO-1, LAGE-1を選び精巣腫瘍組織および腫瘍周囲の残存腫瘍組織においてこれらの発現解析をおこなったところ、精巣腫瘍におけるCTA遺伝子群の発現は腫瘍の組織分化に依存していることが判明した。すなわちCTA遺伝子群の発現はセミノーマで高頻度であり、非セミノーマにおいて低頻度であった。また奇形腫組織ではCTA遺伝子群の発現は認められなかった。これらのことから精巣腫瘍におけるCTA遺伝子群の発現は腫瘍抗原としてではなく、むしろ胚細胞から体細胞への分化に依存した形を反映しているものと考えられた。さらに精巣腫瘍の残存精巣組織では通常正常精巣で恒常的に発現しているべきCTA遺伝子群の発現が欠落していることも確認された。

4. X染色体上の遺伝子プロフィールで精巣腫瘍ではXISTの発現の如何にかかわらず、またセミノーマ、非セミノーマの如何を問わず非メチル化に制御されているというわれわれのデータや Smigmalia らの RLGs を用いた精巣腫瘍のメチル化頻度の解析にもとづき、精巣腫瘍では他の常染色体上の遺伝子でも非メチル化状態が維持されているのではないかとの仮説を立て以下の検索を行った。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。その結果、精巣悪性リンパ腫では *E-cadherin*, *RASSF1A*, *RARβ* のメチル化が高頻度にみられるのに対し、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ことを示唆するものと考えられた。

われわれのデータにより精巣腫瘍のゲノムはX染色体上の遺伝子や刷り込み遺伝子のみならず常染色体上の癌関連遺伝子においても非メチル化を維持し、de novo methylation に対しても抵抗性を示す何らかの共通メカニズムが存在するのではないかと考えられた。

REFERENCES

- Brown, C. J., Carrel, L. & Willard, H. F. (1997). *Am J Hum Genet*, 60, 1333-43.
- Marahrens, Y., Panning, B., Dausman, J., Strauss, W. & Jaenisch, R. (1997). *Genes Dev*, 11, 156-66.
- McCarrey, J. R. & Dilworth, D. D. (1992). *Nat Genet*, 2, 200-3.
- Rapley, E. A., Crockford, G. P., Teare, D., Biggs, P., Seal, S., Barfoot, R., Edwards, S., Hamoudi, R., Heimdal, K., Fossa, S. D., Tucker, K., Donald, J., Collins, F., Friedlander, M., Hogg, D., Goss, P., Heidenreich, A., Ormiston, W., Daly, P. A., Forman, D., Oliver, T. D., Leahy, M., Huddart, R., Cooper, C. S., Bodmer, J. G. & et al. (2000). *Nat Genet*, 24, 197-200.
- Richler, C., Soreq, H. & Wahrman, J. (1992). *Nat Genet*, 2, 192-5.
- Salido, E. C., Yen, P. H., Mohandas, T. K. & Shapiro, L. J. (1992). *Nat Genet*, 2, 196-9.