

ヒト精巣腫瘍のエピジェネティクス制御機構の解明とその臨床応用

(課題番号:16390462)

平成16年度～平成18年度科学研究費補助金 基盤研究(B)

研究成果報告書

平成19年9月

研究代表者 岡本 圭生

(滋賀医科大学泌尿器科講師)

滋賀医科大学附属図書館



2006016664

## 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、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。化学療法の進歩より、転移性精巣腫瘍患者においても80%以上の治癒率が安定して得られるようになってきたことは幸いであるが、逆に本疾患の病態解明への関心が、前立腺癌などの頻度の高い泌尿器科腫瘍にくらべて希薄となっている印象が否めない。一方、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) 未だ非治癒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、あるいは化学療法感受性を上げる薬剤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、平成16年度より基盤研究(B)を受けて、精巣腫瘍には固有のエピジェネティクスがみられ、ゲノムが広範な脱メチル化を受けていることを報告した。さらに精巣腫瘍の転写メカニズムにおいてDNAのメチル化以外のものが重要であることを示唆するデータを示した。また精巣腫瘍の脱メチル化を腫瘍マーカーとして臨床応用する試みを発表した(Lancet 2004, Genes Chromosome Cancer 2005, ONCOGENE 2004, ONCOGENE 2006, Hum Mol Genet 2006)。これら一連の精巣腫瘍研究の成果は世界からも高く評価をされ、申請者は平成18年10月に、精巣腫瘍唯一の国際学会である、コペンハーゲン国際精巣腫瘍ワークショップで、招請講演を行った。またその成果を総説としてまとめた(Int J Androl 2007)。

## 研究組織

研究代表者 岡本 圭生(滋賀医科大学泌尿器科)

研究分担者 川上享弘(滋賀医科大学臨床検査部)、  
小川 修(京都大学大学院医学研究科)、  
岡田裕作(滋賀医科大学泌尿器科)

## 研究経費

平成16年度 5,900,000 円

平成17年度 4,100,000 円

平成18年度 4,100,000 円

総額 14,100,000 円

## 研究発表

### (1) 学会誌等

1. Epigenetic profile of testicular germ cell tumours.

Okamoto K and Kawakami T: *Int J Androl* 30: 385-392. 2007

2. Imprinted DLK1 at 14q32 is a putative tumor suppressor gene and inactivated by epimutation of a differentially methylated region upstream of GTL2 in human renal cell carcinoma. Kawakami T, Chano T, Minami K, Okabe H, Okada Y, and Okamoto K: *Hum Mol Genet* 15: 821-830. 2006

3. Erasure of methylation imprint at the promoter and CTCF-binding site upstream of H19 in human testicular germ cell tumors of adolescents indicate their fetal germ cell origin. Kawakami T, Zhang C, Okada Y, and Okamoto K\*. *ONCOGENE* 25: 3325-3326. 2006

4. 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 Cancer*. 43:104-12. 2005

5. Detection of XIST unmethylated DNA fragments in male derived plasma: a potential tumor marker for testicular germ cell tumors. Kawakami T, Okamoto K\*, Ogawa O, Okada Y. *LANCET* 363: 40-42. 2004.

6. Characterization of loss-of-inactive X in Klinefelter syndrome and female derived cancer cells. Kawakami T, Zhang C, Taniguchi T, Kim CJ, Okada Y, Sugihara H, Hattori T, Reeve AE, Ogawa O, Okamoto K\*. *ONCOGENE* 23: 6163-6169. 2004.

7. The MET proto-oncogene is not a major target for the gain of chromosome 7 in Testicular Germ Cell Tumors of adolescents. Kawakami T, Okamoto K\*, Reeve AE, Ogawa O, Koizumi S, Okada Y. *Virchows Archive* 444: 480-481. 2004

(2) 口頭発表

招請講演 (国外)

**1. The 6th Copenhagen Workshop on Carcinoma in situ Testis and Germ Cell Cancer. Copenhagen, Denmark, 26-29 October 2006**

**Invited Speaker for Lecture: Epigenetic profile of testicular germ cell tumors: a potential for clinical application.**

**2. 2006 AACR Annual Meeting. Washington, DC, 1-4 April 2006.**

**Invited Speaker in a Minisymposium Session. 1-4: Imprinted DLK1 at 14q32 is a tumor suppressor gene and inactivated by epimutation of a differentially methylated region upstream of GTL2 in human renal cell carcinoma.**

招請講演 (国内)

第 93 回日本泌尿器学会総会(東京)2005 年 4 月

特別講演 精巣腫瘍のエピジェネティクスとその臨床応用

一般演題 (国内)

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. 川上享弘、岡本圭生、杉原洋行、小川修、岡田裕作:第 92 回日本泌尿器学会総会(大阪)2004

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

精巣腫瘍における Cancer Testis Antigen (CTA) 遺伝子の発現制御機構

川上享弘、岡本圭生、張 誠、岡田裕作 第 93 回日本泌尿器学会総会(東京)2005. 4 月

第 14 番染色体長腕上の刷り込み遺伝子 DLK1 はヒト腎細胞癌の癌抑制遺伝子である。南佳ほり、川上享弘、茶野徳宏、井上寛一、寺下隆夫、岡部英俊、岡田裕作、岡本圭生 第 28 回日本分子生物学会年会(福岡) 2005

精巣腫瘍の新規腫瘍マーカー: XIST

川上享弘、岡本圭生、岡田裕作 第 94 回日本泌尿器学会総会(福岡)2006

## 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に記載する。

われわれのグループはこれまでの研究から精巣腫瘍ゲノムでは、体細胞由来の癌に比べて異常メチル化の頻度が低く、ゲノムが恒常的に低メチル化に維持されていることを見出した (J.Urol 2003, Gene Chromosome and Cancer 2003)。今回、平成 16 年度より基盤研究(B)を受けて「ヒト精巣腫瘍のエピジェネティクス制御機構の解明とその臨床応用」をテーマとしてさらに研究を進めた結果、以下の知見を得た。精巣腫瘍特異的非メチル化領域をさらに探索する目的で X 染色体を中心にクラスターを形成する Cancer Testis Antigen(精巣特異抗原)と呼ばれる遺伝子についてその発現制御機構を解析した結果、セミノーマのゲノムは DNA のリプログラミングを受ける始原生殖細胞 (PGCs)と同様と同様の非メチル化を示すが非セミノーマでは胎児胚細胞と体細胞の中間型のメチル化プロファイルを示すのではないかと考えられた (Gene Chromosome and Cancer 2005)また代表的な刷り込み遺伝子である第11番染色体上の H19, IGF2 遺伝子領域の遺伝子発現パターンと H19 上流の CTCF 結合領域、プロモータ領域のメチル化について精巣腫瘍における詳細な検討を加えた。その結果、精巣腫瘍では H19 上流のメチル化インプリントはセミノーマ、非セミノーマともに消去されており、この結果はマウスでの始原胚細胞のメチル化消去と一致する結果であった。一方、精巣腫瘍における H19, IGF2 の発現パターンは必ずしも H19 上流のジメチル化とは一致せず、他の遺伝子の結果同様、精巣腫瘍における遺伝子制御においては DNA のメチル化はプライマリーなものではないと考えられた。以上、H19 上流のメチル化インプリントの消去という点では、精巣腫瘍が始原胚細胞由来であるとする従来の仮説に一致するものであった (ONCOGENE 2006)。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 promoter 領域領域に注目することにより、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た (Lancet 2004)。本論文では「本来女性にしか存在しない X 染色体不活化遺伝子(XIST)の非メチル化 DNA がヒト精巣腫瘍組織遺伝子に恒常的に存在することを示した。さらに X 染色体不活化遺伝子(XIST)の非メチル化 DNA 断片が精巣腫瘍患者の血清で検出されることを示し、新たな腫瘍マーカーとしての意義を報告した。」本論文は世界で初めて DNA の非メチル化断片を腫瘍マーカーとして応用できる可能性を示したものである (Lancet 2004)。

これら一連の精巣腫瘍研究の成果は世界からも高く評価をされ、申請者は平成 18 年 10 月に、精巣腫瘍唯一の国際学会である、コペンハーゲン国際精巣腫瘍ワークショップ

ップで、招請講演を行い、さらに、これまでの研究成果を invited review としてまとめる機会を得た (Int J Androl 2007)。

上記以外にも X 染色体と癌化という観点から、乳癌、卵巣癌における解析結果も報告した。すなわち 1970 年代から女性の癌で予後不良因子とされた Barr body loss の本態を明らかにした。すなわち、Klinefelter 症候群由来の癌や、卵巣癌、乳癌で不活化 X 染色体の喪失がおきるとそれに引き続いて活性型 X 染色体の増幅がおこることを示した (ONCOGENE 2004)。

また、第 14 番染色体長腕に存在する位置する刷り込み遺伝子 DLK1 が腎細胞癌の癌抑制遺伝子としての機能を有すること、DLK1 の相補的刷り込み遺伝子と考えられる GTL2 遺伝子上流の CpG 領域の異常メチル化が腎細胞癌における DLK1 の不活化機構に重要であることを報告した (Hum Mol Genet 2006)。

現在は、精巣腫瘍への新規感受性薬剤の開発を念頭におきつつ、われわれのエピジェネティクス研究をクロマチン研究へと展開するため以下の実験を行っている。すなわち、精巣腫瘍の脱メチル化維持機構は腫瘍生物学的見地から重要な研究課題であると考えますが、これまでのわれわれの解析や、他のグループの解析でも精巣腫瘍固有のメチルトランスフェラーゼの機能異常は見つかっていない。われわれは各種の DNMT(DNA メチルトランスフェラーゼ)の発現について解析した結果、DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b などの主だった DNMT には異常はみられなかったが、唯一 DNMT3L だけが正常精巣や体細胞では発現を認めないものの、精巣腫瘍では高発現していることが確認された(unpublished data)。興味深いことに DNMT3L は胎生期の始原生殖細胞 (PGCs) の特定時期にのみ発現し、レトロエレメントやインプリンティング遺伝子のメチル化獲得に重要な役割を果たすことが知られている。平成 18 年度の実験では精巣腫瘍における DNMT3L 遺伝子配列変異はなかったため、現在精巣腫瘍由来細胞株 6 株において DNMT3L を siRNA により強制的にダウンレギュレーションした細胞株を作成して Growth assay を In vivo, vitro で行うことにより精巣腫瘍における DNMT3L が腫瘍増殖に果たす役割 (特に癌遺伝子的意義があるか否か) を検討している。