

氏名	松岡 妙子			
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	博甲第 7868 号			
学位授与年月	平成 28年 3月 25日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
審査研究科	人間総合科学研究科			
学位論文題目	精巣胚細胞腫瘍の各組織型と病型における DNMT3L タンパクの発現についての研究			
主査	筑波大学教授	博士(医学)	原 尚人	
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	高屋敷 典生	
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	松本 光司	
副査	筑波大学講師	博士(医学)	後藤 行延	

論文の内容の要旨

(目的)

精巣胚細胞腫瘍(以下、精巣腫瘍)は青壮年期の男性においては最も頻度が高い悪性腫瘍である。病理学的に精巣腫瘍は、セミノーマ、胎児性癌、卵黄嚢腫瘍、絨毛癌、奇形腫などの主な組織型に分類され、臨床的には単一組織型のセミノーマと、それ以外の組織型のいずれかの成分を含む非セミノーマに大きく分類され、その鑑別は予後や治療方法が異なるため重要である。近年、精巣腫瘍の発生や組織分化においてエピジェネティックの重要性が注目されており、特にセミノーマと非セミノーマの各組織型ではDNAメチル化パターンが異なることが明らかにされてきた。DNAのメチル化に関わる分子のうち、DNA methyltransferase 3-like (DNMT3L)の発現やその役割については胎児性癌での研究が先行し、胎児性癌に特異的に発現しているという報告がある。一方で、マイクロアレイ解析データベースではDNMT3Lがセミノーマや卵黄嚢腫瘍などにも発現していることが示されている。しかし、DNMT3Lのさまざまな病型や病期を層別化した網羅的な発現解析やその機能に関する検討は十分ではなかった。本研究では、精巣腫瘍におけるDNMT3L蛋白の発現について各々の組織型について種々の病型を考慮し、臨床情報も含めて分析した。また、胚細胞腫瘍細胞株におけるDNMT3Lの発現とその機能についてRNA干渉法を用いて検討を行った。

(対象と方法)

筑波大学附属病院腎泌尿器外科あるいは関連施設で高位精巣摘除術が行われ、パラフィンブロックが保存されている67患者の病理材料を用いて86例を解析対象とした。単一型セミノーマ23例のうち、3例は血清AFP陽性であるが、原発精巣の病理診断はセミノーマであった。DNMT3L、CD30、SOX2、AFPおよびc-kitの抗体を用いて免疫化学組織染色を行い、陽性判定は染色強度と範囲によって陰性、弱陽性、

強陽性の三段階とした。進行度との関連については、単一型セミノーマと混合型精巣腫瘍において、それぞれ病期 I と病期 II 以上の進行例との比較を行った。また、胚細胞腫瘍由来細胞株 (NEC8、NEC14、NCCIT、NT2、JEG-3、Hs38. T) についてタンパク発現をウエスタンブロット法で検討した。NEC8 細胞に対して RNA 干渉法による DNMT3L 発現抑制を行い、増殖能、遊走能、浸潤能を検討し、分化マーカーおよび癌抑制遺伝子の発現を定量 PCR にて解析した。

(結果)

DNMT3L は、胎児性癌の単一型では 87.5% (7/8)、混合型では 88.9% (16/18) の症例で陽性を示し、陽性例の 91.3% (21/23) は強陽性であった。単一型セミノーマでは 73.9% (17/23) で陰性であり、強陽性を示す症例は認めず、6 例で局所的あるいは散在性に腫瘍細胞が染色され部分的陽性を示した。血清 AFP 高値であったセミノーマは 3 例とも部分的陽性を示した。一方混合型のセミノーマ成分では 36.4% (4/11) の症例で弱陽性を示した。単一型卵黄嚢腫瘍では 4 例全例が陽性であり、混合型の卵黄嚢腫瘍成分では陽性例は認めず、絨毛癌症例は 4 例とも陽性であった。単一型セミノーマにおいて、DNMT3L は病期 I の症例ではすべて陰性であった。一方で病期 II 以上の症例で 46.2% (6/13) で陽性を示し、病期 I と比較し、有意に高率であった ($p=0.019$)。胚細胞腫瘍由来細胞株では胎児性癌細胞株の他に、絨毛癌細胞株でも DNMT3L タンパク発現を認めた。DNMT3L 高発現株である NEC8 細胞に DNMT3L 発現抑制を行っても SOX2、NANOG、AFP の分化マーカーや、癌抑制遺伝子 APC、BRCA1、MGMT の mRNA 発現量には変化は認めず、増殖能への影響も見られなかった。

(考察)

本研究では精巣腫瘍の各組織型における DNMT3L タンパクの発現を解析し、胎児性癌は高率に強陽性を示し、過去の報告と一致した。単一型セミノーマでは進行例でのみ局所的な陽性像が認められ、血清 AFP 陽性のセミノーマでは高率に DNMT3L 陽性であったことは、DNMT3L がセミノーマの進展や分化と関わっている可能性が考えられる。絨毛癌でも高率に陽性を示したが、胎盤由来の絨毛癌細胞株 JEG-3 細胞において DNMT3L が高発現していたことは、今回の我々の結果を支持するものと考えられる。DNMT3L の一時的な発現抑制では形質変化や分化マーカー、癌抑制遺伝子の mRNA レベルの変化は認めなかった。精巣腫瘍における DNMT3L の役割を明らかにするには、恒常的な発現抑制および強制発現による検討が有用である可能性が考えられた。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究は精巣腫瘍の各組織型における DNMT3L タンパクの発現に着目している。病型や病期を層別化した網羅的な発現解析やその機能に関する検討もを行い、DNMT3L がセミノーマの進展や分化と関わっている可能性が考えられるという結果は非常に高く評価できる。さらなる段階の実験が開始されており、将来的に臨床応用できうる可能性があることも評価できる。

平成 28 年 1 月 7 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。