

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462398

研究課題名(和文) 精巣腫瘍の組織分化におけるエピジェネティクス制御の解明

研究課題名(英文) The role of epigenetic change in human testicular germ cell tumors

研究代表者

河合 弘二 (Kawai, Koji)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：90272195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：DNA methyltransferase 3-like (DNMT3L) は生殖細胞の発生分化において重要な役割を果たすことが知られている。本研究では精巣腫瘍におけるDNMT3Lタンパクの発現について検討を行った。免疫組織化学的染色では86例の精巣腫瘍組織について解析し、胎児性癌の他にも卵黄嚢腫瘍や一部の奇形腫にも認められ、絨毛癌では高率に陽性を示した。セミノーマでは局所的に陽性を示したが、これらの症例は進行例であった。胚細胞腫瘍細胞株を用いた検討では胎児性癌由来細胞株だけでなく、絨毛癌細胞株でも発現しており、胎児性癌以外の組織型においても重要な役割を果たしていることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：DNA methyltransferase 3-like (DNMT3L) plays an important role in germ cell development. The aim of this study was to analyse the DNMT3L expression in testicular germ cell tumors(TGCT).

The immunohistochemical expression of DNMT3L was examined in 86 TGCT specimens. DNMT3L expression was observed in all 4 pure yolk sac tumors, of which 3 were prepubertal yolk sac tumors. In mixed GCT, DNMT3L protein was expressed in elements of the embryonal carcinoma (14/18), seminoma (4/11), teratoma (4/7) and choriocarcinoma (3/3) but not in the yolk sac tumors (0/4). When DNMT3L expression was analyzed according to stages, it was significantly correlated with advanced seminoma rather than Stage I seminoma (P = 0.019). And also DNMT3L were expressed not only in embryonic carcinoma cell lines but also in choriocarcinoma. Our findings suggest that DNMT3L may play roles not only in the development of embryonal carcinoma but also in the development of advanced pure seminoma and pure yolk sac tumor.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：泌尿器科 精巣腫瘍

1. 研究開始当初の背景

精巣腫瘍の組織発生は未分化型である上皮内癌、セミノーマおよび胎児性癌と、分化型サブタイプである卵黄嚢腫瘍、絨毛癌および奇形腫に2大別される。このうち前3者は幹細胞マーカーである OCT3/4 及び Nanog を発現している点で共通するが、これらとともに山中因子として iPS 細胞に用いられる SOX2 を合わせて発現するのは多分化能を有する胎児性癌のみであり、胎児性癌は胚性幹細胞 (ES 細胞) に類似した遺伝子プロファイルを持つことが知られている。一般にセミノーマは最も未分化であるが最も抗がん剤感受性が高く、この点が一般の癌と大きく異なる。胎児性癌の組織発生に関しては上皮内癌からの進展 (図1) とセミノーマからの re-programming (図1) の2経路が存在するとされているが、その詳細は明らかではなかった。しかし、近年、セミノーマでは DNA が高度に脱メチル化されていることがわかり、DNA メチル化の胚細胞腫組織発生への関与が明らかになりつつある。その一つとして、DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMT) の一つである DNMT3L が胎児性癌に特異的に発現することが報告された (Minami K et al, Clin Cancer res 2010)。そこで、我々は特にセミノーマからの組織分化におけるエピジェネティクス制御、特に経路における DNMT3L の発現に着目し、DNA メチル化がセミノーマから胎児性癌、さらに分化型サブタイプへの分化に関与している可能性について検討す

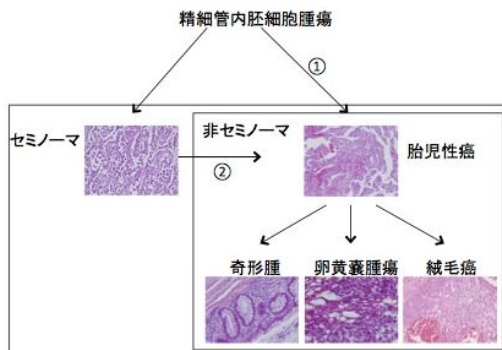


図1 精巣腫瘍の組織型

ることとした。

2. 研究の目的

DNA メチル化はセミノーマから非セミノーマへの進展カスケードに重要な役割を果たしていると考えられる。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、その増殖に必須であると報告されている。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発現していることが示されていた。この乖離の要因は明らかではないが、現状では DNMT3L のさまざまな病型や病期の精巣腫瘍での網羅的な発現解析が十分ではないことも事実である。そこで、本研究では、セミノーマの病期1症例と転移例での発現の違いや単一組織型のセミノーマと混合型として他の組織型と混在して存在するセミノーマ成分での発現の違い、さらに、頻度は少ないものの血清 AFP 上昇を伴うセミノーマでの DNMT3L 発現、成人例と思春期前精巣腫瘍の違いを明らかにし、さらに、組織分化や悪性度との関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 各々の組織型について単一型/混合型、局所性/進行性、あるいは青壮年期/思春期前発症などの種々の病型を考慮にいたした組織マイクロアレイ (TMA) 及び新規精巣摘出標本を用いて精巣腫瘍における DNMT3L 蛋白や分化に関連する分子の発現について免疫組織化学染色にて検討し、臨床情報も含めて分析した。

(2) 胚細胞腫瘍由来細胞株を用いて DNMT3L の発現とその機能について、RNA 干渉法 (RNAi) を利用して解析を行った。

4. 研究成果

(1) 免疫組織化学染色

過去の報告と同様、胎児性癌では高率に陽性を示した (図2)。しかし、DNMT3L は単一型セ

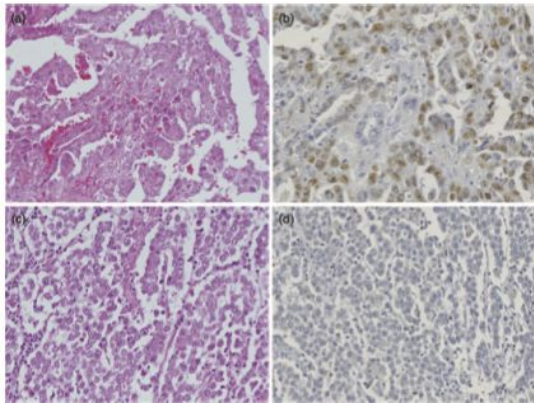


図 2 胎児性癌(a:H&E、b:DNMT3L)、セミノーマ(c:H&E、d:DNMT3L)

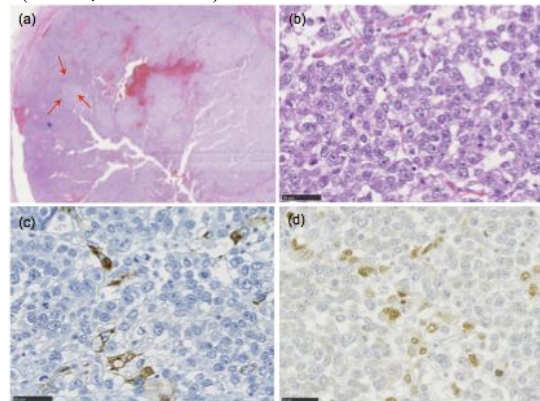


図 3 血清 AFP 高値のセミノーマ
(a)(b)HE 染色では形態的にセミノーマと診断したが、腫瘍のごく一部に AFP(c)および DNMT3L(d)陽性部位が存在した

ノーマの 26.1% (6/23)においても局所的に陽性を示した(図 3)。DNMT3L が陽性であるセミノーマは進行例に限られ、病期 I では認められなかった。また、単一型卵黄嚢腫瘍や絨毛癌でも高率に陽性であった(図 4)。(2) 胚細胞腫瘍細胞株における DNMT3L タンパクの発現とその機能についての検討

胚細胞腫瘍細胞株の DNMT3L タンパクの発現はウェスタンブロットにて検討した。胎児性癌細胞株では NEC8 細胞、NEC14 細胞で高発現していた。また胎盤由来の絨毛癌細胞株である JEG-3 細胞でも高発現していた(図 5)。

次に NEC8 細胞を用いて DNMT3L の RNAi による一時的な発現抑制細胞を作製した。RNA を抽出し、定量 PCR にて多分化能を示す SOX2、NANOG や分化マーカーである AFP の mRNA の発現量をコントロールと比較したが、変化は認められなかった。また、増殖能や、これまでに精巣腫瘍でメチル化が報告されている癌

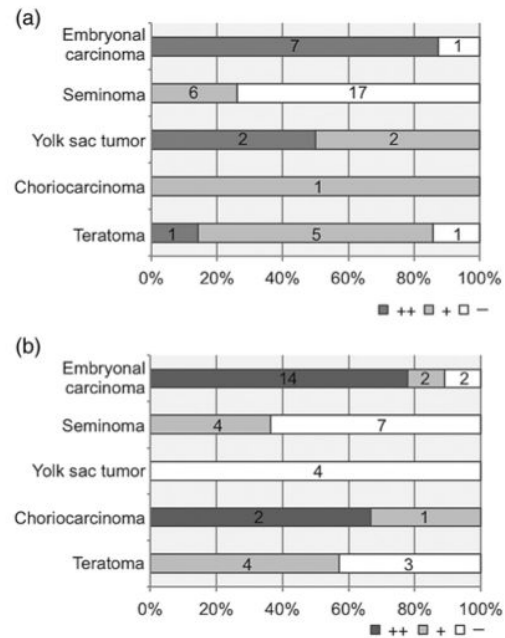


図 4 TGCT における DNMT3L 陽性率
(a:単一型、b:混合型)

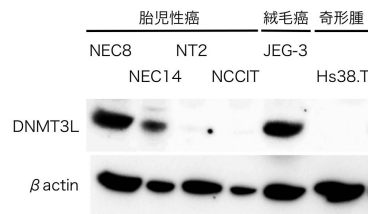


図 5 胚細胞腫瘍細胞株における DNMT3L タンパクの発現
抑制遺伝子である MGMT、APC、RASSF1A、HIC1、BRCA1 の発現量への影響は見られなかった。

(3) 考察

本研究では精巣腫瘍の各組織型における DNMT3L タンパクの発現を検討した。胎児性癌だけでなく、一部のセミノーマ、絨毛癌でも陽性を認めることを示した。また細胞株における検討では、胎児性癌細胞株だけでなく、絨毛癌細胞株である JEG-3 細胞でもウェスタンブロットで DNMT3L が発現していることが示された。これらは過去のデータベースと同様の結果であり、免疫染色の検討において絨毛癌でも DNMT3L が高発現していたことを支持するものと考えられる。さらに、胎児性癌と単一型卵黄嚢腫瘍では高率に陽性であり、単一型セミノーマでは進行例でのみ局所的に認められた。これら結果から DNMT3L は胎児性癌だけではなく、セミノーマの分化

進展や、単一型卵黄嚢腫瘍の発生においても必要な分子である可能性がある。これらの役割を明らかにすることで、メチル化の制御による治療への応用や化学療法耐性のメカニズムへの理解が進むことが期待されるため、更に分子生物学的意義を解明することが今後の課題とされる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Kawahara T, Kawai K, Yoshino T, Ikeda A, Ishizuka R, Kandori S, Takaoka EI, Kojima T, Joraku A, Suetomi T, Miyazaki J, Nishiyama H. The clinical presentation and favorable prognosis of patients with isolated metachronous brain metastasis from germ cell tumors. Jpn J Clin Oncol. 2016 Aug 27. [Epub ahead of print] 査読あり
2. Matsuoka T, Kawai K, Ando S, Sugita S, Kandori S, Kojima T, Miyazaki J, Nishiyama H. DNA methyltransferase-3 like protein expression in various histological types of testicular germ cell tumor Jpn J Clin Oncol. 2016 May;46(5):475-81 査読あり
3. Kojima T, Kawai K, Tsuchiya K, Abe T, Shinohara N, Tanaka T, Masumori N, Yamada S, Arai Y, Narita S, Tsuchiya N, Habuchi T, Nishiyama H. Identification of a subgroup with worse prognosis among patients with poor-risk testicular germ cell tumor. Int J Urol. 2015 Oct;22(10):923-7. 査読あり
4. Kurobe M, Kawai K, Oikawa T, Ichioka D, Kandori S, Takaoka E, Kojima T, Joraku A, Suetomi T, Miyazaki J, Nishiyama H. Paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin (TIP) as salvage and consolidation chemotherapy for advanced germ cell tumor. J Cancer Res

Clin Oncol. 2015 Jan;141(1):127-33 査読あり

5. Ando S, Matsuoka T, Kawai K, Sugita S, Joraku A, Kojima T, Suetomi T, Miyazaki J, Fujita J, Nishiyama H. Expression of the oncoprotein gankyrin and phosphorylated retinoblastoma protein in human testis and testicular germ cell tumor. Int J Urol. 2014 Oct;21(10):992-8. 査読あり

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河合 弘二 (KAWAI KOJI)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号: 90272195

(2)研究分担者

西山博之 (NISHIYAMA HIROYUKI)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号 : 20324642

末富 崇弘 (SUETOMI TAKAHIRO)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号 : 10574650

常楽 晃 (JORAKU AKIRA)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号: 60436277