

氏 名	牛 田 博
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 6 5 4 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 4 年 3 月 9 日
学 位 論 文 題 目	Methylation Profile of DNA Repetitive Elements in Human Testicular Germ Cell Tumor (ヒト精巣胚細胞腫瘍における DNA 反復配列のメチル化プロフィール)
審 査 委 員	主 査 教 授 遠 山 育 夫 副 査 教 授 小 笠 原 一 誠 副 査 教 授 村 上 節

論文内容要旨

*整理番号	659	(ふりがな) 氏名	うしだ ひろし 牛田 博
学位論文題目	Methylation Profile of DNA Repetitive Elements in Human Testicular Germ Cell Tumor (ヒト精巣胚細胞腫瘍における DNA 反復配列のメチル化プロフィール)		
<p>研究の目的</p> <p>エピジェネティクスとは遺伝子配列の変化を伴わない情報記憶と発現調節のメカニズムであり X 染色体の不活化、ゲノム刷り込みをはじめ、個体の発生・分化において重要な役割を担っている。エピジェネティクスの中で DNA のメチル化はもっともよく研究されているものであるが、DNA メチレーションは発生の過程で脱メチル化、メチル化というダイナミックな変化を呈する。精巣腫瘍は始原生殖細胞にその起源をもつとされ、胎生期細胞から体細胞(奇形腫)まで多彩な組織型を呈する。この点から精巣腫瘍は癌化と発生のクロスロードにある興味深い腫瘍といえる。われわれのグループは精巣腫瘍のエピジェネティクスとその制御機構について研究を進め、精巣腫瘍ゲノムでは(1)体細胞由来の癌にみられるような癌抑制遺伝子の異常メチル化がみられず、(2) 正常細胞でメチル化を受けている CTA 遺伝子や刷り込み遺伝子 H19 遺伝子や XIST 遺伝子も脱メチル化を受けていることを報告した。これらの研究成果より精巣腫瘍には体細胞由来の癌とは異なる興味深いエピジェネティクスの特性が存在し、性染色体、常染色体を問わず、さまざまな遺伝子のプロモーターが脱メチル化されていると結論付け、その生物学的意義について考察してきた (J.Urol 2001, J.Urol 2003, Genes Chromosome and Cancer 2003, LANCET 2004, ONCOGENE 2004, Genes Chromosome and Cancer 2005, ONCOGENE 2006, Int J Androl 2007)。</p> <p>散在性反復配列はゲノム領域の大半を占め、通常は強固にメチル化されている領域であるが、その機能についてはよくわかっていない。一方、癌細胞では散在性反復配列において脱メチル化がみられることが報告されている。そこで申請者は精巣腫瘍におけるエピジェネティクスに関する更なる知見を得るために、精巣腫瘍ゲノムにおける散在性反復配列のメチル化プロフィールとその意義について検討することとした。</p> <p>研究方法</p> <p>精巣腫瘍ゲノムにおける散在性反復配列のメチル化プロフィールを検討した。得られた</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

結果を正常細胞および体細胞由来の癌と比較検討した。さらに精巣腫瘍が発生した残存周囲精巣組織についても検討し、精巣腫瘍発生の場合としてメチル化の異常が存在するかについても検討した。また精巣腫瘍特異的に発現し、散在性反復配列のメチル化制御に関与している DNMT3L について精巣腫瘍細胞株で発現抑制を行い、その影響を検討した。

(1) 精巣腫瘍組織 14 例 (セミノーマ 5 例、非セミノーマ 9 例)、精巣腫瘍の発生した周囲精巣組織 10 例、正常精巣組織 2 例、正常ヒト末梢血リンパ球 2 例、精巣悪性リンパ腫組織 3 例から DNA を抽出した。

(2) 2 種類の精巣腫瘍 (胎児性癌) 細胞株 (NEC8、NEC14)、2 種類の腎細胞癌細胞株 (CAK11、VMRC-RCW) からも同様に DNA を抽出した。

(3) LINE1 配列のメチル化について TA cloning 法を用いた Bisulfite Genomic Sequencing (BGS) および Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) にて解析した。

(4) 同様に E-cadherin、XIST 遺伝子上流の Alu 配列のメチル化について TA cloning 法を用いた Bisulfite Genomic Sequencing (BGS) および Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) にて解析した。

(5) 胎児性癌由来細胞株 NEC8、14 において siRNA による DNMT3L の発現抑制を行い、同様に LINE1 配列、Alu 配列のメチル化の変化について TA cloning 法を用いた Bisulfite Genomic Sequencing (BGS) および Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) にて解析した。

結 果

(1) リンパ球 DNA、正常精巣 DNA は散在性反復配列の種類を問わず LINE1 配列、Alu 配列の全てにおいて高度にメチル化されていた。

(2) これに対しセミノーマ DNA では散在性反復配列の種類を問わず LINE1 配列、Alu 配列の全てにおいて脱メチル化されていた。

(3) 一方、非セミノーマ DNA では Alu 配列は、正常組織同様のメチル化を呈していたが、LINE1 配列では高度な脱メチル化クローンが存在した。

(4) 精巣腫瘍の発生した周囲精巣 DNA では LINE1 配列、Alu 配列ともに正常精巣 DNA よりも脱メチル化クローンの増加傾向が認められた。

(5) 胎児性癌由来細胞株 NEC8、14 での siRNA による DNMT3L の発現抑制によって LINE1 配列のみ BGS の day6 でメチル化クローンの増加傾向が認められた。しかし COBRA ではメチル化の増加は認めなかった。

考 察

(1) セミノーマでは散在性反復配列の種類を問わず LINE1 配列、Alu 配列の全てにおいて脱メチル化を示したことより配列特異的でない、ゲノム全体の強力な脱メチル化機構の存在が示唆された。

(2) 非セミノーマでは Alu 配列でメチル化を受けている一方、LINE1 配列では脱メチル化傾向を示し、非セミノーマにおける散在性反復配列のメチル化に関しては正常精巣やリンパ球とセミノーマの中間に位置するプロフィールを示した。このことは高度に脱メチル化を受けて

いる始原生殖細胞にほぼ近似するセミノーマに対し、胎児性癌を経て形成される非セミノーマは LINE1 配列で始原生殖細胞の形質を維持しながら、一方 Alu 配列では分化に応じてメチル化を獲得しているものと考察された。

(3) これまで体細胞由来の癌でも LINE1 配列の脱メチル化が報告されているが、今回の解析結果より、体細胞由来の癌での LINE1 配列の脱メチル化は斑状であり、明らかに精巣腫瘍とは異なっていた。以上から、体細胞由来の癌における散在性反復配列の脱メチル化はもともと正常体細胞で高度にメチル化されている領域から斑状に脱メチル化が獲得されたものであるのに対し、精巣腫瘍のそれは腫瘍細胞の起源細胞である始原生殖細胞のエピジェネティクスであるメチル化の消去を反映していると思われた。

(4) 周囲精巣では LINE1 配列、Alu 配列においても脱メチル化クローンの増加がみられ、これはセミノーマ、非セミノーマのいずれの周囲精巣でも同様であった。採取された組織には CIS 病変は検出されなかったことから、この事象は周囲精巣における精子形成の不全状態を表す、もしくは胃癌で報告されているような腫瘍間質細胞におけるエピジェネティクスの異常を反映していることが考察された。精巣腫瘍発生との関連は今後の検討課題であると考えられる。

(5) DNMT3L はわれわれのグループが精巣胎児性癌のマーカーであることを証明した胎生期特異的メチルトランスフェラーゼである (Clin Cancer Res 2010)。DNMT3L は胎生期の de novo メチル化、特に散在性反復配列のメチル化獲得に関わる分子と考えられている。そこで精巣腫瘍細胞における散在性反復配列のメチル化に DNMT3L の果たす役割を検討することとした。胎児性癌由来細胞株で DNMT3L 発現抑制を試み、抑制前後での散在性反復配列のメチル化プロファイルの解析を行った。その結果、胎児性癌由来細胞株では DNMT3L の抑制は散在性反復配列のメチル化に影響を与えなかった。

結 論

精巣腫瘍は散在性反復配列にも特異的なメチル化プロファイルを有しており、体細胞由来の癌とは異なる起源細胞を反映したメチル化樹立、維持機構が存在すると思われる。こういったエピジェネティクスの違いが精巣腫瘍の特異的抗がん剤感受性などを規定している可能性があり、この点から精巣腫瘍ゲノムを脱メチル化に維持している因子を同定することは、重要な課題であると考えられる。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	659	氏名	牛田 博
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>エピジェネティクスは、個体の発生・分化のみならず癌化においても重要な働きをしていると考えられている。本研究では、ゲノム領域の大半を占める散在性反復配列におけるメチル化プロファイルについて、セミノーマ、非セミノーマ、腫瘍周辺組織、体細胞由来癌とで比較検討するとともに、胎児性癌由来細胞株で胎生期特異的メチルトランスフェラーゼである DNMT3L の発現抑制実験を行った。その結果、</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) セミノーマでは、LINE1 配列でも Alu 配列でも高度の脱メチル化が見られ、ゲノム全般の脱メチル化維持機構の存在が考えられた。 2) 非セミノーマでは、LINE1 配列は脱メチル化が認められたが、Alu 配列は高度にメチル化されており、配列依存的な脱メチル化が生じていた。 3) 腫瘍周囲精巣では、LINE1 配列、Alu 配列ともに脱メチル化クローンの増加が認められた。 4) 体細胞癌では部分的な脱メチル化が認められた。 5) 胎児性癌由来細胞株での DNMT3L の発現抑制は、散在性反復配列のメチル化に影響を与えなかった。 <p>以上の結果は、精巣腫瘍は散在性反復配列においても体細胞由来の癌とは異なる特異的なメチル化樹立・維持機構を有することを示している。</p> <p>本論文は、精巣胚細胞腫瘍のエピジェネティクスについて新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 598 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 24年 1月24日)</p>			

最終試験の結果の要旨

整理番号	659	氏名	牛田 博
論文審査委員			
(最終試験の結果の要旨)			
<p>最終試験において以下の試問を行なった。</p> <ol style="list-style-type: none">1. 精巣腫瘍周囲組織におけるメチル化の乱れには、どのような病理学的意義があるか2. DNMT3L の発現の意義はどう考えるか。3. セミノーマに認められた脱メチル化の維持機構は、どのようなものか。4. 精巣腫瘍以外の胎児性癌におけるメチル化プロファイルは、どうであったか。5. メチレーションのパターン解析と Cobra 法とのとを比べると、Cobra 法の方が、感度が悪いように思われるが、それはなぜか。6. 精巣腫瘍の周囲でみられるメチル化の異常を引き起こす分子機構について。7. メチル化以外のエピジェネティクスの機構には、どのようなものがあるか。8. 精巣腫瘍に生じている脱メチル化の臨床的意義は。 <p>上記にいずれの質問に対しても的確な解答が得られた。</p>			
(平成 24年 1月24日)			