氏　名(本籍)	川　上　享　弘(滋賀県)
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士第425号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成15年3月27日
学位論文題目	The roles of supernumerical X chromosomes and XIST expression in testicular germ cell tumors. （精巣腫瘍における余剰X染色体とXIST発現の腫瘍生物学的意義について）

審査委員　主査　教授　木　村　　博
　　　　　副査　教授　佐　藤　　浩
　　　　　副査　教授　野　田　洋　一

論 文 内 容 要 旨

【目　的】

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から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）Xq27上に家族性精巣腫瘍の候補遺伝子座 (TGCT1)がマッピングされたこと (Rapley et al., Nature Genetics 2000)、4) Cancer Testis antigensなど精巣特異的抗原が数多くX染色体上に存在することより、精巣腫瘍発生に関わる重要な遺伝子座としてX染色体に着目した。

一方、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。興味深いことに、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(Salido et al., Nature Genetics 1992)。しかし精巣におけるXISTの発現および、その生物学的意義については不明の点が多い。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。以上のことを踏まえ、X染色体が精巣腫瘍感受性遺伝子座としてどのように機能するかについて、精巣胚細胞におけるXIST発現の生物学的役割も念頭におきながら解析を行った。

【方　法】

①精巣腫瘍由来細胞株4株、滋賀医科大学泌尿器科で手術時採取された精巣腫瘍組織(seminoma 12例、non-seminoma 8例）を用いた。解析に用いたサンプルについては全て文書で患者の同意を得たもののみを使用した。②全サンプルから、単離核標本を作製しFISH法をもちいてX染色体数を検討した。全サンプルよりDNA、 RNAの抽出をおこなったのち③RT-PCRにてXIST、AR、FMR1、GPC3遺伝子の発現を検討した。④Bisulfite genomic sequencing法を用いてX-linked

genes（AR、FMR1およびGPC3遺伝子）のプロモーター領域のメチル化を検討した。⑤さらに活性型Ｘ染色体のみに発現することが知られている癌遺伝子ARAF1、ELK1のmRNA発現量をcompetitive PCR法を用いて半定量した。

【結　果】

①XISTの発現はseminomaにおいては高頻度で、non-seminomaでは低頻度であり、組織型に依存した発現パターンを示した。一方、Ｘ染色体数は組織型、XISTの発現とは無関係に増加していた。②精巣腫瘍、正常精巣組織において、XISTの発現にも関わらずAR、FMR1、GPC3遺伝子プロモーターは非メチル化を示した。③さらに精巣腫瘍において、XISTが発現しているにもかかわらず、AR、FMR1、GPC3の発現は維持されていた。④精巣腫瘍では、非メチル化X染色体の増加(gene dosage)に比例して癌遺伝子ARAF1、ELK1の発現量が増加していた。

【考　察】

①精巣腫瘍におけるXISTは女性ＸＸにおけるXISTの発現とは異なり、Ｘ染色体遺伝子のメチル化、Ｘ染色体不活化には繋がっていないことが明らかとなった。すなわち、精巣腫瘍におけるXISTの発現は女性ＸＸにおいて余剰Ｘを不活化するいわゆるcounting　mechanismとしてのXISTの発現とは明らかに異なっていると考えられた。すなわち精巣腫瘍に存在する複数個のＸ染色体はXISTの発現の如何に関わらずすべて活性型Ｘ染色体であると推測された。
②精巣腫瘍細胞株において活性型Ｘ染色体の増加に従ってARAF1、ELK1の過発現がみられたことより、精巣腫瘍においては活性型Ｘ染色体の集積が精巣腫瘍発生に関与している可能性が示唆された。また、Ｘ染色体上に存在すると考えられる精巣腫瘍感受性遺伝子は癌抑制遺伝子よりは癌遺伝子的分子を念頭におくべきではないかと考えられた。

学位論文審査の結果の要旨

精巣腫瘍は、年齢が20から40才の青壮男子に好発し、近年の化学療法の急速な進歩にもかかわらず、治癒率の低い悪性腫瘍となっている。また、発生原因もいまだに明らかではない。精巣腫瘍では高頻度で余剰Ｘ染色体が観察され、またＸ染色体を不活化するXISTの発現がおこる。そこで、XIST発現と腫瘍の余剰Ｘ染色体の活性との関係を調べた。その結果、精巣腫瘍ではXISTの発現にもかかわらずＸ染色体上の遺伝子(AR、FMR1、GPC3)のメチル化（CpG配列）がみられず、遺伝子発現が維持されていることが判明した。これは、女性の細胞での２つのＸ染色体の一方がXISTによって不活化されることと異なっている。以上のように、活性型である余剰Ｘ染色体が存在することでＸ染色体上のがん遺伝子ARAF1とELK1の過剰発現が起こり、それが精巣腫瘍の原因になっている可能性が示唆された。

本研究は、XISTの発現にもかかわらず余剰Ｘ染色体が活性型であり、そこに存在するがん遺伝子が精巣腫瘍の発生に関与している可能性を示したものであり、博士（医学）の学位論文として価値あるものと認められる。