

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08940

研究課題名(和文)染色体不安定性が関わる多発癌発生の機序の解明

研究課題名(英文)Chromosomal instability and its relation to the mechanism underlying multiple development of cancer

研究代表者

野田 弘志(Noda, Hiroshi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：00382937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウスMajor SatA(mSatA)配列を搭載したレンチウイルスベクターを作成し、マウス生体の乳管内に投与したところ、介入群および対象群とも乳癌の発生は見られませんでした。そこで、ベクターをレトロウイルスに変更しました。レトロウイルスベクターによるmSAT 過剰発現により、Abnormal segregation、Micronucleiやanaphase bridgeなど有糸分裂異常を持つ細胞の割合がコントロールと比較して増加しました。今後、このベクターをマウスに投与し、乳がんの発生時期や数、多発及び多臓器発生の頻度、染色体コピー数の変化や遺伝子発現に及ぼす影響を評価します。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、多発癌発生のメカニズムを、脱メチル化異常を背景としたSatAが誘導する「field cancerization」と関連づけて検証する独創的な研究課題です。昨今の縮小手術の普及は異時性発癌のリスクをさらに助長すると懸念されます。「field cancerization」という腫瘍学的な視点から、術式の選択を再考する重要な転機になると考えられます。多発癌発生の頻度や時期、さらに他の異時性発癌の標的臓器を明らかにする事ができれば、スクリーニングの時期や対象臓器を含めた検査方法の決定など、臨床応用への貢献が期待されます。

研究成果の概要(英文)：We constructed a lentiviral vector containing Major SatA (mSatA) sequence of the mouse and used it in a mouse model of mammary carcinogenesis. When DMBA (7,12-Dimethylbenz(a)anthracene) was administered orally and lentivirus was administered into the mammary ducts of mice to promote mammary cancer development, it was not observed macroscopically in either the intervention group or the control group within the observation period. Therefore, we discontinued to use a lentiviral vector carrying the mouse mSatA sequence and created a retroviral vector. A retroviral vector led to overexpression of mSAT, which increased the percentage of cells with mitotic defects such as abnormal segregation, micronuclei and anaphase bridges compared to controls. We are preparing to administer this vector to mice and evaluate how long and how many breast cancer occurs, the frequency of multiple and multi-organ development, changes in copy number of chromosome, and gene expression.

研究分野：腫瘍外科

キーワード：多発癌 染色体不安定性 セントロメア Satellite transcript 脱メチル化異常

## 1. 研究開始当初の背景

癌患者は、術後の残存臓器に新たな腫瘍性病変を高率に生じます。その機序は明らかではありませんが、発癌の母地「field cancerization」の関与が考えられます。「field cancerization」には、さまざまな遺伝子の異常が報告されていますが、我々はメチル化修飾に注目してきました。正常な染色体分配にはセントロメア領域のメチル化が必須で、そこから転写される non-coding RNA である Satellite transcript(SatA)により染色体の均等分配が司られます。我々はセントロメア領域のメチル化異常により SatA が過剰発現し、特定の染色体に数的異常が生じる事を明らかにしました。この変化は癌部のみならず癌の背景粘膜でも認められ、特に多発癌の背景粘膜で高値を示すことから、SatA は多発癌の「field cancerization」に関わると考えています。昨今の縮小手術の普及は異時性発癌のリスクをさらに助長すると懸念され、その機序の解明は喫緊の課題です。本研究では SatA が関わる多発癌発生の機序を明らかにします。

## 2. 研究の目的

SatA は染色体分配の制御に関わり、その破綻は染色体不安定性を引き起こします。SatA は癌組織のみならず非癌部組織でも亢進しています。単発癌に比べて多発癌の非癌部背景組織で有意に高い事より、SatA は「field cancerization」に働き、大腸癌、乳癌の多発発生に関わっている可能性が考えられます。本研究では SatA が関わる多発癌発生の機序を明らかにします。

## 3. 研究の方法

### 実験手順 (in vitro)

正常組織に対する SatA の過剰発現の影響を検証するために、レンチウイルスを用いて SatA を乳腺上皮細胞株に遺伝子導入します。CGH で染色体不安定性を DNA コピー数の変化を評価し、発現アレイを用いて遺伝子発現の網羅的解析を行い、責任遺伝子の同定を試みます。セントロメア関連蛋白の発現変化とキネトコア形成への影響を免疫組織染色法及び FISH で観察します。さらに脱メチル化剤 (5-Aza-dC) を加えて脱メチル化異常の影響を評価します。

ヒト乳腺上皮細胞株にレンチウイルスを導入する。

染色体コピー数の変化を CGH アレイで評価する。

遺伝子発現の変化を発現アレイで評価する。

セントロメア関連蛋白の発現変化とキネトコア形成への影響を免疫組織染色及び FISH で評価します。

脱メチル化剤投与によるメチル化異常の影響を評価する。

### 実験手順 (in vivo)

マウスの乳癌発生モデルを用いて in vivo での検証を行います、

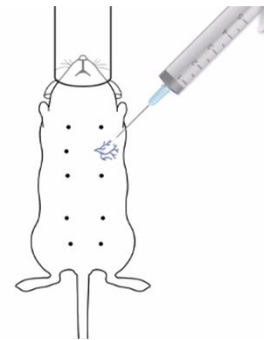
#### (1) マウスへのレンチウイルスの投与

C3H/HeOs 系雌マウスを使用します。マウスの乳房は左右 10 箇所存在しますが、そのうち左右 2 箇所の

乳頭からレンチウイルスを投与して体内の分布を評価します。

分布の評価にはレンチウイルスに組み込まれている GFP の蛍光イメージより評価します ( 図 1 )。乳頭からのレンチウイルスの投与量は  $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ /ml を 0.1-0.5ul とします。

図1:マウスの乳房内遺伝子導入



### (2) マウス乳癌発生モデルの作成

発癌誘発物質として 7, 12-dimethylbenzoanthracene

(DMBA) 10mg をゴマ油 0.5ml に溶解した DMBA 溶液を 4 週齢の C3H/HeOs 系雌マウスに胃チューブで経口的に一回投与します。このモデル系では投与後約 35 週で 85% のマウスに乳癌が形成されます。

### (3) マウス乳癌発生モデルにおける SatA 遺伝子導入の影響の評価

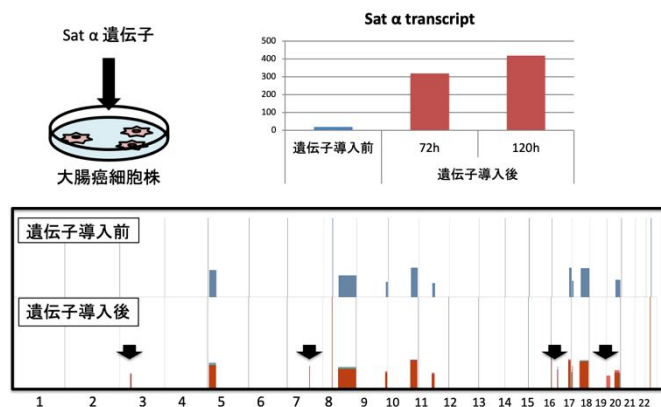
マウス乳癌発生モデル 40 匹を用いて、左右 2 箇所乳頭からレンチウイルスを投与します。20 匹には mock レンチウイルス、残りの 20 匹には SatA レンチウイルスを投与します。乳癌の発生時期や数、多発発生を頻度を検討します。また切除標本からは染色体数の変化や遺伝子発現に及ぼす影響を評価します。特に染色体コピー数の変化に注目しています。SatA を介する遺伝子不安定性の誘導には標的遺伝子があると考えています。プレリミナリーなデータでは、SatA を乳腺上皮細胞株に導入すると 8 番及び 20 番染色体の長腕に増幅が認められました。これらの染色体の変化が in vivo でも認められるか注目しています。さらに多臓器多発の標的臓器として、卵巣癌の出現頻度も検討します。

## 4. 研究成果

( in vitro )

大腸癌細胞株に対してリポフェクション法を用いて SatA をトランジェントに遺伝子導入しました。その CGH アレイの結果を図 2 に示します。矢印の 3、7、16 番染色体の増幅は SatA の遺伝子導入によるものと考えられます。7 番染色体の増幅は臨床検体を用いた結果と一致しています ( 図 3 )。遺伝子導入に用いるレンチウイルスを作成し、乳腺上皮細胞株でその発現を確認してました ( 図 4 )。

図2:satellite  $\alpha$  遺伝子導入による標的染色体の同定



SatA を乳腺上皮細胞株に導入すると 8 番及び 20 番染色体の長腕に増幅が認められました ( 図 5 )。癌細胞株の実験では、癌細胞株自体がすでに 8 番染色体の増幅を有していたために、8 番染色体の新たな変化は

分かりませんでした。正常組織に遺伝子導入することで、SatA の標的染色体が明らかになってきています。興味深いことに 8 番及び 20 番染色体の増幅は多くの癌で認められており、発癌に関わる責任遺伝子が存在すると考えられます。

(in vivo)

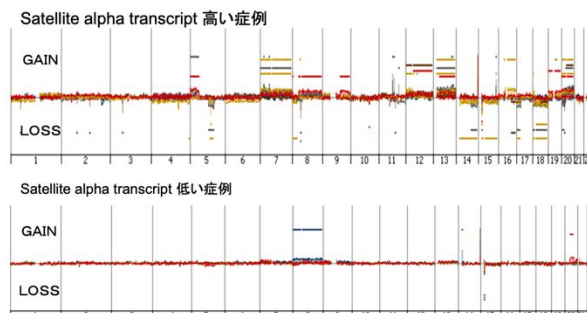
マウス Major SatA(mSatA)配列を搭載したレンチウイルスベクターを作成し、マウスの乳癌発生モデルを用いました。乳癌発生を促進するため DMBA を経口投与し、マウス生体の乳管内にレンチウイルスを投与したところ、観察期間内では介入群および対象群とも肉眼的には乳癌の発生は見られませんでした。そこで、マウス mSatA 配列を搭載したレンチウイルスベクターでの検討を中止して、レトロウイルスベクターを作製しました。

このレトロウイルスベクターを用いてマウス大腸癌細胞株である CT26 細胞および MC38 細胞株に mSatA を遺伝子導入しました。レトロウイルスの感染後、ピューロマイシン耐性となった細胞群から RNA を抽出し、mSatA 発現量を RT-qPCR で確認したところ、mSatA を導

入した細胞では、コントロールベクター導入細胞群に比べて mSatA 発現量が有意に高いことを確認しました。mSAT 過剰発現によって細胞増殖への影響はありませんでしたが、有糸分裂異常が惹起されました。染色体不安定性の誘導に関わる有糸分裂異常を検出するために、細胞の蛍光免疫染色を行いました。Abnormal segregation、Micronuclei や

図3: Satellite alpha transcriptと染色体コピー数異常

【CGHアレイ】:



SatAの発現亢進と染色体分配の異常(染色体不安定性)の因果関係を明らかにするために、大腸癌患者の臨床検体を用いてCGHアレイでDNAコピー数の変化(染色体不安定性)を評価しました。SatAの発現が高い患者では7,12,13,20番染色体で増幅が、14,15,18番染色体で欠失が高頻度に認められる一方、発現亢進がない症例では染色体数の変化はほとんど認められませんでした。

図4: レンチウイルスによるSatellite alpha transcript遺伝子導入

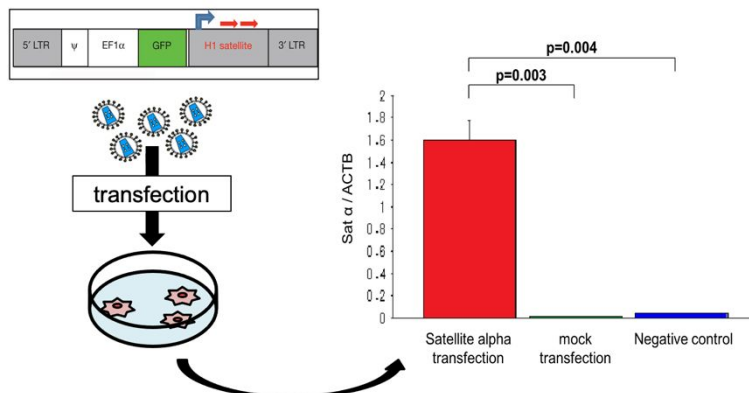
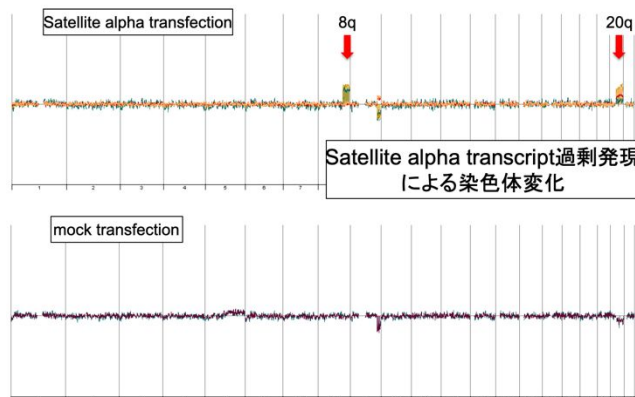


図5: 乳腺上皮細胞への遺伝子導入と染色体数の変化



anaphase bridge など有糸分裂異常を持つ細胞の割合は、コントロールと比較して増加しました。具体的には Abnormal segregation と anaphase bridge の頻度は有意に上昇し、Micronuclei では有意差はないものの、その頻度は増加しました。この mSatA 配列を搭載したレトロウイルスベクターを用いて in vivo での検証を、マウスの乳癌発生モデルを用いて行います。モデルマウスの乳房からレトロウイルスベクターを用いて mSatA の遺伝子導入を行い、発生時期や数、多発及び多臓器発生の頻度、染色体コピー数の変化や遺伝子発現に及ぼす影響を評価します。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Endo Yuhei, Suzuki Koichi, Kimura Yasuaki, Tamaki Sawako, Aizawa Hidetoshi, Abe Iku, Watanabe Fumiaki, Kato Takaharu, Saito Masaaki, Futsuhara Kazushige, Noda Hiroshi, Konishi Fumio, Rikiyama Toshiki	4. 巻 60
2. 論文標題 Genome-wide DNA hypomethylation drives a more invasive pancreatic cancer phenotype and has predictive occult distant metastasis and prognosis potential	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2022.5351	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Fumiaki, Suzuki Koichi, Tamaki Sawako, Abe Iku, Endo Yuhei, Takayama Yuji, Ishikawa Hideki, Kakizawa Nao, Saito Masaaki, Futsuhara Kazushige, Noda Hiroshi, Konishi Fumio, Rikiyama Toshiki	4. 巻 34
2. 論文標題 Optimal value of CA19-9 determined by KRAS-mutated circulating tumor DNA contributes to the prediction of prognosis in pancreatic cancer patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3399 ~ 3406
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-00060-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡部文昭、鈴木浩一、相澤栄俊、遠藤裕平、加藤高晴、野田弘志、力山敏樹。
2. 発表標題 リキッドバイオプシーから導き出したCA19-9の新しいカットオフ値で膵癌予後を予測する。
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡部文昭、鈴木浩一、相澤栄俊、遠藤裕平、加藤高晴、野田弘志、力山敏樹。
2. 発表標題 Liquid biopsyを用いたCA19-9のcutoff値で膵癌の予後を予測する。
3. 学会等名 第52回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相澤栄俊、野田弘志、高橋 洵、伊関雅裕、渡部文昭、加藤高晴、田中 亨、力山敏樹
2. 発表標題 癌原発大細胞神経内分泌癌の1切除例
3. 学会等名 第72回日本消化器画像診断会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野田弘志、力山敏樹
2. 発表標題 当科における膵癌術後長期成績と予後規定因子の検討
3. 学会等名 第54回大宮医学総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相澤栄俊、野田弘志、遠藤裕平、伊関雅裕、渡部文昭、加藤高晴、力山敏樹
2. 発表標題 残膵全摘術の術後栄養指標推移の比較と術後加療の留意点 - 膵全摘との比較 -
3. 学会等名 第37回日本胆膵病態・生理研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤原純一、関根匡成、三浦孝也、眞嶋裕聡、加藤高晴、野田弘志、力山敏樹、田中 亨
2. 発表標題 術前に確定診断が得られなかった胆管内乳頭状腫瘍の一切除例
3. 学会等名 第37回日本胆膵病態・生理研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野田弘志、柿澤奈緒、渡部文昭、加藤高晴、遠藤裕平、相澤栄俊、力山敏樹
2. 発表標題 膵頭十二指腸切除術前腹部動脈石灰スコア評価による高齢者ハイリスク症例の同定
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡部文昭、野田弘志、相澤栄俊、遠藤裕平、笠原尚哉、加藤高晴、齊藤正昭、辻仲眞康、宮倉安幸、力山敏樹
2. 発表標題 肝門部領域胆管癌切除限界への挑戦と治療成績
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相澤栄俊、野田弘志、遠藤裕平、渡部文昭、笠原尚哉、加藤高晴、力山敏樹
2. 発表標題 右冠動脈前後枝個別再建を伴う肝左葉切除・同門脈合併切除で根治切除し 得た関門部領域胆管癌の1例
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤高晴、野田弘志、笠原尚哉、渡部文昭、遠藤裕平、相澤栄俊、辻仲眞康、宮倉安幸、清崎清一、力山敏樹
2. 発表標題 0歳以上の高齢者に対する膵頭十二指腸切除術後の治療成績及び長期予後予測因子の検討
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 宮倉安幸、田巻佐和子、町田枝里華、前本遼、山裕司、石川英樹、福田臨太郎、齊藤正昭、辻仲真康、蓬原一茂、野田弘志、鈴木浩一、清崎浩一、力山敏樹
2. 発表標題 MSI-H 固形癌に対する抗 PD-1 抗体 薬ペムプロリズマブの治療状況
3. 学会等名 26回日本遺伝性腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相澤栄俊、野田弘志、遠藤裕平、伊関雅裕、渡部文昭、加藤高晴、力山敏樹
2. 発表標題 膵頭十二指腸切除後出血症例に対する治療成績の検討
3. 学会等名 第47回日本膵切研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤高晴、野田弘志、蓬原一茂、力山敏樹
2. 発表標題 腹痛を契機に指摘され腹腔鏡下に同時手術を施行した右副腎神経節細胞腫と右卵巢成熟嚢胞奇形腫の一例
3. 学会等名 第32回日本内分泌外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡部文昭、相澤栄俊、遠藤裕平、伊関雅裕、加藤高晴、野田弘志、力山敏樹
2. 発表標題 肝門部領域胆管がんに対するNo.13aリンパ節郭清の手術手技と重要性
3. 学会等名 第56回日本胆道学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊関雅裕、渡部文昭、加藤高晴、関根匡成、野田弘志、眞嶋裕聡、力山敏樹
2. 発表標題 腹腔鏡下胆嚢摘出後トラブルシューティングの自験例
3. 学会等名 第56回日本胆道学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相澤栄俊、野田弘志、高橋 洵、遠藤裕平、伊関雅裕、渡部文昭、加藤高晴、力山敏樹
2. 発表標題 臍頭十二指腸切除術後出血症例に対する治療成績の検討
3. 学会等名 第56回日本腹部救急医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡部文昭、相澤栄俊、遠藤裕平、伊関雅裕、加藤高晴、野田弘志、力山敏樹
2. 発表標題 肝門部領域胆管癌切除限界への挑戦と治療成績
3. 学会等名 第82回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤高晴、野田弘志、渡部文昭、力山敏樹
2. 発表標題 肝細胞癌術後早期再発のバイオマーカーとしてのPIVK-??/腫瘍容積比の有効性
3. 学会等名 第24回日本肝臓学会大会 (JDDW)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡部文昭、相澤栄俊、遠藤裕平、伊関雅裕、加藤高晴、野田弘志、力山敏樹
2. 発表標題 肝門部領域胆管がんに対するNo.13aリンパ節郭清の必要性
3. 学会等名 第18回日本消化器外科学会大会 (JDDW)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 渡部 文昭, 鈴木 浩一, 相澤 栄俊, 遠藤 裕平, 前田 晋平, 加藤 高晴, 野田 弘志, 力山 敏樹	4. 発行年 2021年
2. 出版社 胆と膵	5. 総ページ数 6
3. 書名 【Liquid biopsyは膵癌の診断・治療をどう変えるか?】切除不能膵癌におけるliquid biopsyの将来展望	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 浩一  (Suzuki Koichi)  (70332369)	自治医科大学・医学部・教授   (32202)	
研究分担者	力山 敏樹  (Rikiyama Toshiki)  (80343060)	自治医科大学・医学部・教授   (32202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------