

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 2 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510241

研究課題名(和文)ヒトの癌細胞における遺伝子増幅領域のゲノム構造解析と疾患原因の解明

研究課題名(英文)Analyses of genomic structure of gene amplification regions in human cancer cells and disease causation

研究代表者

佐藤 均(SATOH, HITOSHI)

東京大学・新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：70183829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：一般に癌細胞においては、様々な遺伝子の増幅や欠失が認められ遺伝子発現および発現制御機構が乱されている。本研究においては、ヒトの乳癌細胞株や特殊なリンパ腫細胞株に見いだした染色体上の遺伝子が増幅している領域に注目して、分子レベルではどのような構造になっているのか明らかにして疾患原因を解明することを目的としてFISH法による解析を試みた。その結果、乳癌細胞株HCC1143株においてNOTCH3遺伝子コピー数増加と遺伝子増幅を明らかにした。原発性体腔内リンパ腫(PEL)細胞株において癌細胞の浮遊性細胞増殖に関わる共通増幅領域をゲノム上で絞り込んだ。まだ疾患原因候補遺伝子の特定には至っていない。

研究成果の概要(英文)：In general, it happened apparently that a variety of gene amplification and deletion may interfere its expression and regulation. In the present study, I applied FISH technique to detect how the NOTCH3 gene is amplified in a mammary gland ductal carcinoma cell line of HC1143 and to narrow down a possible amplified genomic region commonly found in two of cell lines derived from primary effusion lymphomas. As a result, amplification of NOTCH3 gene was certified in HC1143 cells and a possible amplified region was narrowed down within the 1q25 region in PEL cell lines. However, disease causing candidate genes are not yet identified.

研究分野：ゲノム科学

科研費の分科・細目：ゲノム医科学

キーワード：染色体 FISH 遺伝子増幅 癌 ゲノム構造

1. 研究開始当初の背景

一般に癌細胞においては、様々な遺伝子の増幅や欠失が認められ遺伝子発現および発現制御機構が乱されていることが報告されている。この遺伝子増幅は単独の遺伝子増幅だけではなく染色体上のあるゲノム領域の重複ユニットとして見つかることが多い。癌細胞特異的な遺伝子異常の蓄積を大量の患者検体を用いたアレイ解析など網羅的に解析して病因解明に迫ろうとするアプローチに対して、本研究では、個々の癌細胞に起こった染色体上の遺伝子増幅領域のゲノム構造に注目して細胞遺伝学的な解析を進めることで、個別の症例で起こっている遺伝子増幅を含めたゲノム構造破綻による遺伝子発現制御の異常を明らかにできれば、病因の解明、さらには遺伝子増幅現象に共通するメカニズムの理解につながる成果が得られるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、当初 ErbB2 非発現型乳癌細胞株と原発性体腔内リンパ腫(PEL)細胞株に認められた染色体上の遺伝子増幅領域に注目し、細胞遺伝学的に詳細な解析をしてゲノム構造変化を明らかにし遺伝子増幅ユニットの範囲を特定することで、疾患原因を解明することを目的とした。さらに、非小細胞肺癌細胞株における染色体上の DNA 挿入部位のゲノム構造を明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

(1) ErbB2 非発現型乳癌細胞株 HCC1143 株では、NOTCH3 遺伝子発現の高いことが先行研究で明らかにされたので、異数性に伴い遺伝子コピー数の増加が起こっているのか遺伝子増幅なのか確かめるために、NOTCH3 遺伝子を含む BAC クローンを用いて FISH 解析を施行した。

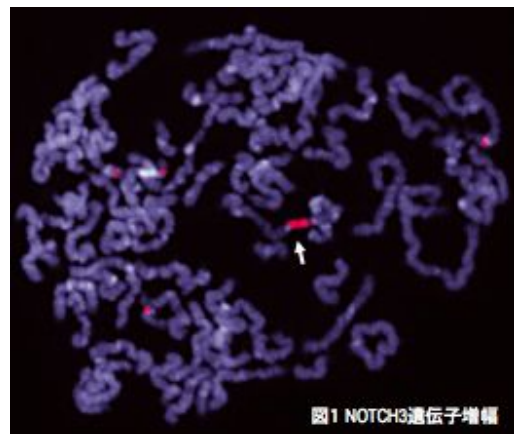
(2) 原発性体腔内リンパ腫(PEL)患者から樹立した 2 つの細胞株 OS-1 株と PSu 株において、様々な DNA クローンをプローブとして FISH 解析を施行した。また、CGH 法による解析も行った。

(3) 非小細胞肺癌細胞株 NCI-H1299 細胞株に導入されたプラスミド DNA の挿入部位解析には、Fiber-FISH 法を用いた。

4. 研究成果

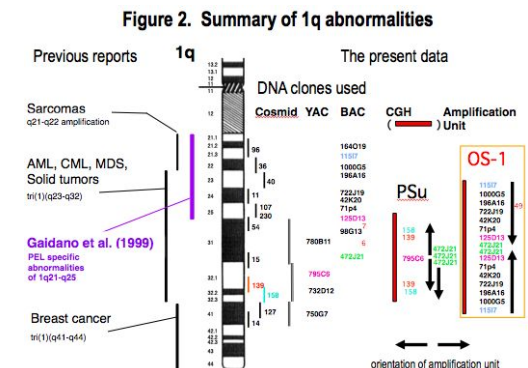
(1) ErbB2 非発現型乳癌細胞 HCC1143 株では、仙波、渡辺らの先行研究(Yamaguchi et al., 2008)により、NOTCH3 遺伝子発現の高いことが Southern Blot 解析や Western

Blot 解析により明らかにされていた。また、RNAi により NOTCH3 の発現を抑制すると細胞増殖阻害を示すことも見出された。本研究では、NOTCH3 遺伝子コピー数の増加が培養細胞が異数性を示すようになった結果なのか NOTCH3 遺伝子自体の増幅による結果なのか明らかにすべく FISH 解析を行った。その結果、正常コピーの他に染色体転座に伴った再構成染色体が生じたことによる遺伝子コピー数の増加と NOTCH3 遺伝子座位である 19p13.1-13.2 を含む特定の染色体上での遺伝子増幅の、どちらも生じていたことを明らかにした(図 1: NOTCH3 遺伝子を含む BAC クローン FISH)。



遺伝子増幅が起こっている特定染色体上のゲノム領域から転写、翻訳されたタンパク質進がこの細胞株における癌細胞としての特徴であると推測されるが、今後 *in situ* PCR 法あるいは Sequential FISH 法 (RNA-DNA FISH) を適用して証明したい。

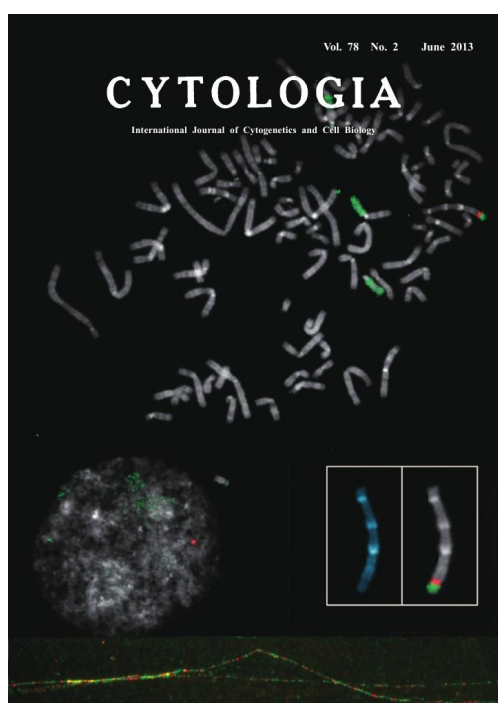
(2) 悪性リンパ腫のうち、腫瘍細胞が腫瘍を形成せず体腔液中で増殖する原発性体腔内リンパ腫(Primary Effusion Lymphoma)に特異的な染色体異常についてはいくつかの共通異常が報告されている(Drexler et al., 1998; Gaidano et al., 1999; Satoh et al., in preparation)ものの未だに分子レベルでの病因解明には至っていない。各種の DNA プローブを用いた一連の FISH 解析と CGH 解析から第 1 染色体長腕上の 1q25 周辺のゲノム



領域が2種類の PEL 細胞株 OS-1 と PSu で共通したゲノム増幅領域であることを突き止めた。また、この領域の BAC クローンによる FISH 解析は複雑な染色体再構成が生じていることを示した(図 2 : OS-1 細胞株と PSu 細胞株の共通増幅領域, unpublished data)。今後、増幅ユニットを絞り込んで特定しゲノム構造変化を DNA 配列レベルで明らかにして浮遊性の癌細胞増殖をするに至った原因の解明に迫りたい。1q ゲノム領域の増幅現象は他の血液腫瘍や固形癌においても報告があり、この領域の共通増幅ユニット、共通重複起点、Amplicon junction(増幅領域境界)等の詳細な解析により多くの成果を期待できると考えている。これまで得られた成果については、2015 年 4 月の ACC5 (Asian Chromosome Colloquium 5, Bangkok, Thailand) 国際会議において報告を予定している。

(3) 一方、非小細胞肺癌細胞株 NCI-H1299 細胞株に導入された pIRES-TK-GFP プラスミド DNA (7.2kb) の挿入部位について通常の FISH 解析で 1 クローンにおいて、single integration site であることを示した。さらに Fiber-FISH 法を用いて詳細な解析を行った結果、このプラスミド DNA が一カ所の挿入部位に多コピーが増幅して挿入されていることを明らかにした(図 3: CYTOLOGIA Vol. 78, 2013 大扉カバー)。

また挿入が認められたマーカー染色体は 5 種類の染色体からなる複雑な再構成染色体であることを明らかにした(現在論文執筆中)。遺伝子増幅メカニズムの仕組みを考える上でヒントになる有用かつ貴重なデータが得られたと考えている。



当初の細胞株を用いた研究では、未だに疾患原因遺伝子候補の特定に至っていないが、共通増幅領域をゲノム上のある程度の範囲内に絞り込むことはできた。しかしながら、物理的距離としては依然として数 Mb~数十 Mb の可能性の幅が存在している現状である。今後、NCBI で公表されているヒトゲノム配列ドラフトや日進月歩で集積される DNA 塩基配列情報のビッグデータ等を有効活用することでこのギャップを埋め、増幅ユニットあるいは重複セグメントの基本的な配列を見だして、疾患原因の解明や遺伝子増幅・ゲノム重複メカニズムを解明するという当初の研究課題を進展させることができると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

① Yokomi, I., Ogiwara, H., Kohno, T., Yokota, J. and Satoh, H.: Two color fluorescence in situ hybridization analysis of the transfected plasmid DNA in human lung cancer cell line, H1299. **Cytologia 78 (2)**: 121-122, 2013.

② Satoh, H. and Yokomi, I.: A study of karyotypic characteristics in various number of the established stem cell lines. **Chromosome Science 14**: 93, 2012.

③ Ogiwara, H., Ui, A., Otsuka, A., Satoh, H., Yokomi, I., Nakajima, S., Yasui, A., Yokota, J. and Kohno, T.: Histone acetylation by CBP and p300 at double-strand break sites facilitates SWI/SNF chromatin remodeling and the recruitment of non-homologous end joining factors. **Oncogene 30**: 2135-2146, 2011.

④ Zhang, X., Hirai, M., Cantero, S., Ciubotariu, R., Dobrila, L., Hirsh, A., Igura, K., Satoh, H., Yokomi, I., Nishimura, T., Yamaguchi, S., Yoshimura, K., Rubinstein, P. and Takahashi, T.A.: Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: Reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. **J. Cell. Biochemistry 112**: 1206-1218, 2011.

〔学会発表〕(計 3 件)

佐藤均、Sanaz Firouzi、渡邊俊樹、矢持忠徳：免疫不全マウスに連続継代移植されたヒト腫瘍細胞の継代5代目における染色体解析 一般財団法人染色体学会 第64回(2013年度)年会、2013年11月8日～11月10日、富山市富山大学五福キャンパス黒田講堂

佐藤均：アフリカライオンの染色体解析(ポスター カレンダー掲載) 財団法人染色体学会 第63回(2012年度)年会、2012年10月5日～10月7日、旭川市大雪クリスタルホール国際会議場

佐藤均、横見出：樹立幹細胞の染色体に関する一考察 財団法人染色体学会 第62回(2011年度)年会、2011年11月11日～11月13日、神奈川大学湘南ひらつかキャンパス

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

東京大学大学院新領域創成科学研究科広報誌「創成21号」VOL. 21, 2013年:p8 FRONTIER SCIENCES

「温故(染色体)知新」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 均 (SATO Hitoshi)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・
准教授
研究者番号：70183829

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：