

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640062

研究課題名(和文) Chromothripsis、その新たなゲノム構造異常の生成機構の解明

研究課題名(英文) Chromothripsis-like pattern in cancer-cell genome after irradiation by a focused vertical micro-beam system, SPICE

研究代表者

稲澤 譲治 (Inazawa, Johji)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：30193551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：がんの全ゲノムシーケンス解析によりchromothripsis(染色体粉碎)という新たなゲノム構造異常が発見された。その生成機構を知るため、口腔がん株細胞核にマイクロビーム照射装置(SPICE)で陽子線照射しchromothripsisの誘発を調べた。特定染色体に局限した構造異常が観察されDNA二重鎖切断の頻度増加と連続する異常修復の関与が示唆された。

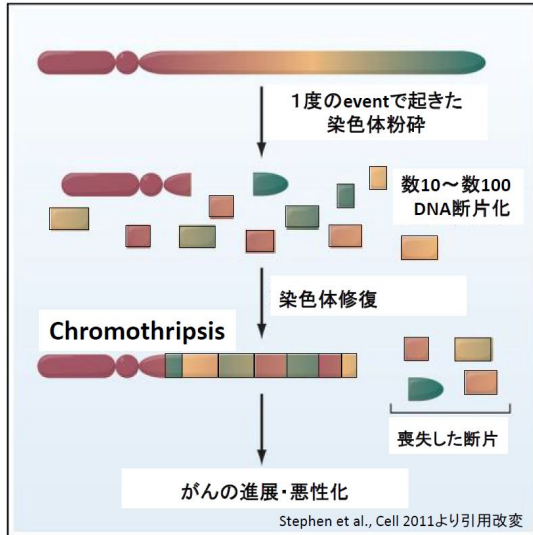
研究成果の概要(英文)：Chromothripsis is a catastrophic cellular event in cancer, in which chromosomes undergo localized massive copy number alterations and rearrangements. However the causes and consequences of chromothripsis are almost unclear. We investigated whether chromothripsis was artificially induced by irradiation with the Single Particle Irradiation system to Cell (SPICE), a focused vertical micro-beam system designed to irradiate the nuclei of adhesive cells. Multiple chromosomal alterations involved in chromosome 7 with a complex translocation, suggesting chromothripsis to be induced in part by irradiation.

研究分野：分子細胞遺伝学

キーワード：Chromothripsis 染色体粉碎 ゲノム再構成 ゲノム不安定性 マイクロビーム照射装置 DNA二重鎖切断 口腔がん 次世代シーケンサー

## 1. 研究開始当初の背景

2011年、次世代シーケンサー(NGS)を用いたがんゲノム解析データに基づき、新しいゲノム再構成異常の chromothripsis(染色体粉砕)が報告された。chromothripsisは、染色体異数性や遺伝子増幅などの既知ゲノム構造異常とは異なる。



上図に示すように、(1)特定の染色体の限られたゲノム領域 DNA が数十～数百個の DNA 断片に粉砕され、(2) ひき続きこれら断片が再配列化される複雑なゲノム異常である。

従来、がんのゲノム異常は、ゲノム不安定性を背景に、分裂と増殖を繰り返す過程で多段階的に進展すると考えられていた。例えば、遺伝子増幅は、Break-Fusion-Bridge (BFB) サイクルで細胞周期を経て生成されると考えられている。

一方、chromothripsis は図の one-off event (一度の出来事) で粉砕・断片化・修復・再配列化が起こるとの仮説が提唱されている新しい現象である。現在までに、chromothripsis に関し以下が論じられている。(1) chromothripsis は、全がん種の 2-3% に出現し、その現象は予後不良と相関する。(2) 先天異常症の複雑な染色体異常の一部に chromothripsis が検出される。(3) chromothripsis の生成には、DNA 二重鎖切断を起こす局所的ストレスの関与、例えば電離放射線の暴露による局所的 DNA 障害や微小核 (micronuclei) の生成を否定できない。(4) TP 53 変異は細胞の文脈依存的 (context dependent) に chromothripsis 現象に関与し、double minute 染色体を生成して遺伝子増幅を惹起する。(Rausch et al., Cell 2012) したがって、chromothripsis 生成機構の解明は、がん化における新しいゲノム不安定性機構の解明ならびにがんの新しい診断バイオマーカーや治療標的分子の開発に寄与する。

## 2. 研究の目的

口腔がん、食道がん細胞株から、それぞれ「細胞文脈的」にゲノム不安定性が異なる親

株・亜株のペアを樹立している。遺伝的同一性 (isogenic) でありながら、細胞文脈的にゲノム不安定性に差異を認める二組の親株・亜株ペアを用いて、電離放射線照射後に獲得されるゲノム構造異常の差を詳細に比較解析して chromothripsis 生成機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

二種類のがん細胞株単一コロニー由来のペア細胞親株・亜株に関して電離放射線照射による DNA 二重鎖切断を起こさせゲノム不安定性を誘発する。継代培養後に親株・亜株由来細胞をクローン増殖させ、その複数において細胞遺伝学的解析を行い、小核・染色体異常を指標にそれら親株・亜株間においてゲノム不安定性を比較する。さらに、それら親株・亜株において array CGH 解析を行い「chromothripsis」に特徴的なコピー数異常の出現の有無を確認する。chromothripsis 現象と判断できる染色体コピー数異常を検出する亜株 (あるいは親株) に限り次世代型シーケンサーによる全ゲノム領域 DNA シーケンスを実施する。chromothripsis 領域の再構成部位の塩基配列を決定し DNA 修復機構を明らかにする。次年度には、chromothripsis 生成機構において「DNA 二重鎖切断 微小核出現 chromothripsis」axis 成立の可能性を追究した。具体的には、口腔扁平上皮がん細胞株である HOC313、およびその高転移性株である HOC313-LM に対し、マイクロビーム細胞照射装置 SPICE (The Single Particle Irradiation system to Cell) により DNA の二重鎖切断を誘導した。放射線照射後、多数のモノクローナル細胞亜株を樹立し、それらの細胞株において生じている染色体構造変化について、SNP アレイおよび Multi-color FISH を用いて解析を行った。

## 4. 研究成果

細胞 1 核あたり陽子線 200 発照射して得られた LM200-#25 細胞亜株において、7 番染色体に限局性に複数の染色体構造変化が生じており、陽子線照射後に HOC313-LM より単離した亜株 LM200-#25 において DNA 二重鎖切断/修復による Chromothripsis の誘導の可能性が見出された。全ゲノムシーケンス解析により、LM200-#25 において Chromothripsis を示唆する非相同末端ゲノム DNA 組換えの複数箇所を検出した。

## 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 7 件)・全て査読有り

1. Iwate R, Inoue J, Tsuda H, Takano H, Furuya K, Hirasawa A, Aoki D, Inazawa J: High expression of p62 protein is associated with poor prognosis and aggressive phenotypes in endometrial

- cancer. Am J Pathol. In press
2. Nishimura J, Yamamoto M, Hayashi S, Ohyashiki K, Ando K, Brodsky AL, Noji H, Kitamura K, Eto T, Takahashi T, Masuko M, Matsumoto T, Wano Y, Shichishima T, Shibayama H, Hase M, Li L, Johnson K, Lazarowski A, Tamburini P, Inazawa J, Kinoshita T, Kanakura Y: Genetic variants in C5 and poor response to eculizumab. N Engl J Med. 370:632-9. 2014
  3. Iwadate R, Inoue J, Tsuda H, Takano M, Furuya K, Hirasawa A, Aoki D, Inazawa J. High Expression of SQSTM1/p62 Protein Is Associated with Poor Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer. Acta Histochem Cytochem. 2014;47:295-301.
  4. Yamamoto S, Inoue J, Kawano T, Kozaki K, Omura K, Inazawa J: The impact of miRNA-based molecular diagnostics and treatment of NRF2-stabilized tumors. Mol Cancer Res. 12:58-68. 2014
  5. Harazono Y, Muramatsu T, Endo H, Uzawa N, Kawano T, Harada K, Inazawa J, Kozaki K: miR-655 is an EMT-suppressive microRNA targeting ZEB1 and TGFBR2. PLoS One. 8:e62757. 2013
  6. Furuta M, Kozaki K, Tanimoto K, Tanaka S, Aii S, Shimamura T, Niida A, Miyano S, Inazawa J: The tumor-suppressive miR-497-195 cluster targets multiple cell-cycle regulators in hepatocellular carcinoma. PLoS One. 8:e60155. 2013
  7. Endo H, Muramatsu T, Furuta M, Uzawa N, Pimkhaokham A, Amagasa T, Inazawa J, Kozaki K: Potential of tumor-suppressive miR-596 targeting LGALS3BP as a therapeutic agent in oral cancer. Carcinogenesis. 34:560-9. 2013

〔学会発表〕(計8件)

1. Morishita M, Muramatsu T, Hayashi S, Hirai M, Suto Y, Konishi T, Moriyama K, Inazawa J: Exploration of mechanisms for chromothripsis by irradiation. 106th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research 2015. Philadelphia, USA. 18-22/April/2015
2. Muramatsu T, Kozaki K., Imoto S, Yamaguchi R, Tsuda H, Kawano T, Morishita M, Miyano S, Inazawa J: The hypusine cascade promotes cancer progression and metastasis through the regulation of RhoA in squamous cell carcinoma. 106th Annual Meeting of the American Association for Cancer

- Research 2015. Philadelphia, USA. 18-22/April/2015
3. Inazawa J: Function-based screening of cancer-related miRNAs. 2015 SNUCRI Cancer Symposium. Hwasun Kunho Resort, Korea. 3/April/2015
4. Inazawa J: Exploring cancer-related miRNAs by function-based screening. International conference on the 19th Annual Meeting of Korean Society of Cancer Prevention. Seoul, Korea. 12/December/2014
5. Inazawa J: Exploring Tumor suppressor microRNAs silenced by tumor-specific DNA hyper-methylation in cancer. 2014 17th Annual Conference Asia-Pacific International Molecular Biology Network. Taguig, Philippines. 1-2/December/2014
6. Uehara DT, Hayashi S, Mizuno S, Inazawa J: De novo heterozygous deletion involving NF1X in a Japanese subject with severe intellectual disability, postnatal growth delay and relative macrocephaly. 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics 2014. San Diego, USA. 18-22/October/2014
7. Uehara DT, Hayashi S, Inazawa J: Pathogenic CNVs and causative gene analysis by SNP arrays as the third screening for 646 patients with intellectual disability and multiple congenital anomalies of unknown etiology. American Society of Human Genetics 63th annual meeting. Boston, USA. 22-26/October/2013
8. Inazawa J: Genetic and epigenetic aberrations of autophagy-related genes in human cancers. 2013 SNUCRI & SNUCH Cancer Symposium. Phoenix Island, Jeju, Korea. 2/May/2013

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.tmd.ac.jp/mri/cgen/framepage.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
 稲澤 譲治 (INAZAWA, Johji)  
 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授  
 研究者番号: 30193551

(2) 連携研究者

井上 純 (INOUE, Jun)  
 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・講師  
 研究者番号: 50568326

(3)連携研究者

谷本 幸介 (TANIMOTO, Kosuke)  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教  
研究者番号：60611613