

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15099

研究課題名(和文) イメージサイトメトリーを用いたコピー数多型解析のための細胞調整法の開発

研究課題名(英文) Development of a cell preparation method for CNV analysis

研究代表者

佐々木 功典 (SASAKI, Kohsuke)

山口大学・その他部局等・名誉教授

研究者番号：80116722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：最近になってがん発症感受性の信頼できるマーカーとしてCNV(コピー数多型)が注目されるようになってきている。実際、ある種のCNVが個人におけるがん発症感受性に影響しているとの証左が蓄積されてきた。異なったCNVが異なった種類のがん発症に関連しており、がん発症感受性に関するCNVが次々に報告されるようになってきている。しかしながら、簡単かつ安価なCNV解析法はない。この研究では、この問題に 대응べく、新しい間期細胞遺伝学的手法の開発を行った。ホルムアミドの長時間処理とペプシン処理がこれを可能とした。この方法は各人のがん感受性の推定に利用できる。

研究成果の概要(英文)：CNVs (copy number variations) have recently drawn attention as a reliable marker of cancer susceptibility. Indeed, it has been accumulated as evidence that certain CNVs affect cancer susceptibility in individuals. Different CNVs are associated with different cancers and at present, CNVs associated with cancer susceptibility are successively reported. However, simple and inexpensive methods for analyzing CNVs in individuals are not yet available. In this project, we tried to develop a new interphase cytogenetic method to meet these requests. An analysis of CNVs in individuals becomes very simple and easy if CNV signals in FISH (fluorescence in situ hybridization) are larger and brighter than those in conventional FISH preparations. The long treatment with formamide followed by treatment with pepsin made FISH signals large and bright. This method can be applied to practical use for estimation of cancer susceptibility in individuals.

研究分野：病理学

キーワード：がん発症感受性 コピー数多型 細胞遺伝学 FISH 散发性がん

1. 研究開始当初の背景

ゲノムにはコピー数多型 (CNV) のような大規模な構造的多型が存在することが2004年にSebat とIafate とによってほぼ同時に明らかにされた。その後、がんを含む各種疾患感受性と関連しているCNVが次々と報告されてきている。それぞれの疾患に関連するCNVが一旦同定されれば、そのCNVのコピー数を測定することにより、その人の当該疾患に対する感受性を知る事ができる。我々はアレイCGHにより、乳がんの発症感受性と関連するCNVを明らかにした。オッズ比は22.3、感度、特異度とも80%を報告している (Tumor Biol 2013) (国際特許出願: PCT/JP2011/005983)。

近年、がん感受性CNVの研究が盛んになっている。そこで問題となるのが、当該CNVの検出 (解析) 方法である。期待される技術は、遺伝子コピー数の自動解析であり、FISHとICMとが理想的な組み合わせである (特開2013-153704)。我々は、最近ICMによりFISHのシグナル蛍光の定量が行え、遺伝子の複製を細胞周期との関係で十分に観察できることを報告した (Cell Prolif 2013, JHC 2013, Cytometry A. 2014)。とはいえ疾患感受性CNVの自動解析には、越えなければならない課題が2点存在する。一つは、高精度のICM自体の開発である。これは、我々の要望を取り入れて企業が開発を始めている。もう一点は、そのための細胞調整法の開発である。スライド上でCNVのシグナル蛍光を安定的に増幅し、観察できる大きさにすることが必要とされる。

新しい研究分野の発展には、新しい技術の開発が必要となるが、新しい研究分野である疾患感受性CNVの研究に大きく貢献するという学術的な面は強調してもよいであろう。欧米を含めて、この分野は始まったばかりであり、そのための技術も極めて未熟である。当該CNVを各人で解析することにより、そ

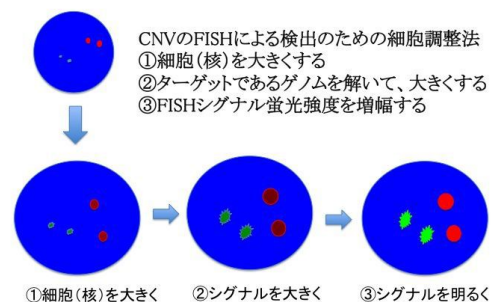
れぞれのがんに対する発症感受性が予測可能となるので、現在注目の健康産業にも活用される世界に通用する技術と考えている。

2. 研究の目的

現在、各人のがん感受性と密接に関係する特定のコピー数多型 (copy number variation; CNV) が次々と同定されており実用化に向けての研究開発が進められている。実用化に向けては同定されたCNVの臨床的有用性を大規模試験で確認すると同時に、CNVの簡便かつ精度の高い検出法の開発が不可欠である。CNVの検出法には様々な方法があるが、申請者らはFISHとイメージサイトメトリー (ICM) との組み合わせが精度の高いCNV検出に理想的であると考えている。ICMを利用したCNVを細胞ごとに自動解析するシステムの開発には機器開発と細胞調整技術の開発が揃って必要であるが、前者は機器開発企業が担当し、本研究課題では後者の細胞調整技術の確立をめざす。

3. 研究の方法

(1) FISHによって5 kb 以下のCNVが蛍光顕微鏡下で視認できるとともにICMによっても安定的に解析できる方法を当面の目標点とするが、それ以下の小さなサイズのCNVが解析できるようにさらなる改良をおこなっていく。すなわち、FISHシグナルサイズを大きく、かつ蛍光強度を増幅することが必要である。



(2) 対象標本: Vysis (アボット) 46XY メタフェーズスライドを用いてスライドグラスの2か所にプローブ添加して実施。

(3) 検討方法：前処理および検出法

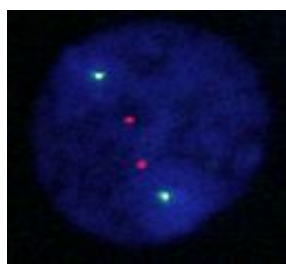
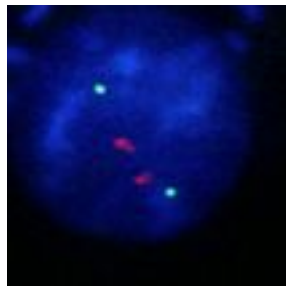
(4) 使用プローブ：CEP7(G) CEP11(R)にて、以下の8通り実施。
9-9p21 (1、3)とHER2 (2、4)を実施。

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 加液 4 10min 後、乾燥								
1 10%ホルムアミド 15min, 乾燥								
2 0.01M ケン酸緩衝液 MW 処理 80 10min								
2 70%ホルムアミド 2×SSC 4 over night								
3 0.01% NP40 in 2×SSC 37 30min								
4 0.3% ペプシン 0.01N-HCl 37 5min								
5 PBS 5min								
6 4%ホルムアミド in 0.02M MgCl 5min								
7 PBS 5min								
8 70,80,100% EtOH								
9 風乾								
10 80 ヒートショック 60min								
11 フォーブ調整 new hibri bauffer (アボット)								
従来品								
12 熱変性 75 5min								
13 hybri.37 over night								
14 洗浄								

4. 研究成果

今回実施した8通りの結果は、RS100による撮像データで、test3のシグナルareaが大きく従来行っているtest2の方法より安定していた。70%ホルムアミドに反応させることは、シグナル改善方法として1週間程度行うことで効果があるとの報告もあるが、今回は1晩で明らかかな効果を認めた。同様、特異的領域プローブを含むHER2およびp16についても同様の撮像結果が得られた。さらに、vysis® IntelliFISH Hybridization Bufferの使用は効果を高めた(粘調性が強くprobe調整の際注意が必要)。

前処理にMWによる熱処理を行ったが、解析シグナル数がほかの方法より減少しており、細胞融解や細胞剥離などが影響していると思われる。しかしながら、以下のような手法によって、FISHシグナルの増大が可能となった。特記すべきことは、長時間に及ぶホルムアミド処理とタンパク分解酵素処理である。この二つがハイブリダイゼーションシグナルの大きさの増大と明るさの増加には必要であった。この結果、通常では不可能であったイメージサイトメトリーによる計測が可能となった。更なる改良は必要かもしれないが、一応の成果が得られたといえる。これからのゲノムにおけるコピー数を疾患の診断に利用するのみではなく、health careへの適応といった新たな分野への途が拓かれたといえる。イメージとして確認できると同時に極めて安価に評価できる点は大きな利点である。



- ・加液 4 10分間, 風乾,
- ・70%ホルムアミド2×SSC 4 7日間,
- ・0.01%NP40 in 2XSSC 37、30分間,
- ・0.3%ペプシン pH2,37 5分間,
- ・PBS 5分間,
- ・1%ホルムアミド in 0.02M MgCl 5分間,
- ・PBS 5分間,
- ・EtOH 脱水, 風乾, 80 ヒートショック 60分間,
- ・熱変性 75, 5分間,

プローブ

・ hybridization at 37 一昼夜

・ プローブ： 9-9p21 (上段)

HER2 (下段)

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)

Yamamoto Y, Sasaki K (11 人中 10 番目) ,
Germline DNA copy number variations as
a potential prognostic marker for
progression of non-muscle invasive
bladder cancer. *Oncology Rep* , May 24,
2017;1193-1199

doi.org/10.3892/ol.2017.6233 査読有

Yanai H, Furuya T, Furuya T, Hayashi H,
Sasaki K. The estimation of gastric cancer
disease status using array-based

comparative genomic hybridization for
endoscopic biopsy specimens: preliminary
experience (CGH for gastric cancer
biopsy). *J Transl Med Res* 2016; 21(1):9 –
12. 査読有

佐々木功典、小賀厚徳。デジタルパソコ
ジの教育への応用。 *病理と臨床*
2016;34:61-67. 査読有

Nishijima J, Hara T, Ikemoto K, Oga A,
Kobayashi K, Kawai Y, Matsumoto H,
Nagao K, Sasaki K, Gkoleizakis V, Fichtner
J, Matsuyama H. Clinical significance of
ERG rearrangement subtype and its
association with increased p53 expression
in Japanese and German prostate cancer.
Neoplasma 2015;62(2):278-87. doi:

10.4149/neo_2015_033. 査読有

Furuya T, Suehiro Y, Namiki Y, Sasaki K.
CNVs associated with susceptibility to
cancers: A mini-review. *J Cancer Therapy*,
2015; 6: 413-422.

doi:10.4236/jct.2015.65044 査読有

Ito H, Oga A, Ikemoto K, Furuya T, Maeda
N, Yamamoto S, Kawauchi S, Itoh H, Oka
M, Sasaki K. Analysis of centromere signal
patterns in breast cancer cells with
chromosomal instability using image
cytometry combined with centromere
fluorescence in situ hybridization.

Cytometry A. 2014 Sep;85(9):809-16. doi:
10.1002/cyto.a.22502. 査読有

Matsuyama H, Ikemoto K, Eguchi S, Oga A,
Kawauchi S, Yamamoto Y, Kawai Y,
Matsumoto H, Hara T, Nagao K, Sakano S,
Sasaki K. Copy number aberrations using
multicolour fluorescence in situ
hybridization (FISH) for prognostication in
non-muscle-invasive bladder cancer
(NIMBC). *BJU Int*. 2014

Apr;113(4):662-7. doi: 10.1111/bju.12232.
査読有

[学会発表] (計 1 件)

古屋智子、佐々木功典 (7 人中 6 番目) イ
メージサイトメトリーを用いたインターフ
ェロンの細胞増殖抑制効果に関する研究。
第 25 回日本サイトメトリー学会学術集会
(2015, 7 月 12 日 : ソラシティカンファレ
ンスセンター、東京都千代田区)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 功典 (SASAKI, Kohsuke)
山口大学・その他の部局等・名誉教授
研究者番号：8 0 1 1 6 7 2 2

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし