

機関番号：32409

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590373

研究課題名（和文） 核内染色体高次構造の異常がもたらす核酸転写環境の変化と新しい発癌・進展メカニズム

研究課題名（英文） Relation between cell morphology and higher-order or angstrom level alteration of chromosomes and DNA architecture

研究代表者

村田 晋一（MURATA SHIN-ICHI）

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：20229991

研究成果の概要（和文）：

(1) 高次染色体構造の解析では、①甲状腺癌における10, 18, 19番染色体のchromosome territoryの変化, ② 尿路上皮癌細胞における細胞異型と染色体数の相関, ③ 扁平上皮化生に伴うEDC遺伝子のsubchromosomal positioningの変化, が認められた。

(2) DNAの微細構造の解析では、扁平上皮化生に伴いEDC遺伝子の周囲でのDNAの凝集の低下が示された。

以上より、核内染色体・遺伝子の高次構造の変化が、悪性腫瘍を含む様々な疾患に認められる細胞形態の変化を引き起こすメカニズムの1つになっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we present that

i) abnormal chromosome territories (CTs) of the CS10, CS18, and CS19 in thyroid carcinomas.

ii) relation between of nuclear atypia and number of chromosomes/genes in urothelial carcinomas of the urinary bladder.

iii) change of subchromosomal positioning (SCP) of epidermal differentiation complex (EDC) gene in CT of chromosome 1 in squamous cell metaplasia of the uterine cervix.

iv) less condensation of DNA around EDC gene in chromosome 1 of squamous cell metaplasia of the uterine cervix.

From the above results, we concluded that higher-order or angstrom level alteration of chromosomes and DNA architecture could be related to cell morphology through RNA transcription activity change.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：Chromosome territory, Subchromosomal positioning, Microscopic FRET, FISH, Epidermal differentiation complex, DNA

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞の遺伝子発現を制御するメカニズムの1つとして、細胞核内の染色体構造、特に高次構造が注目を浴びている。特に23対の染色体は chromosome territory といわれる特定の核内部位に配置する。さらに、染色体領域内での特定遺伝子の存在部位 (subchromosomal positioning) の変化が、転写活性亢進を引き起こすことが報告されている。以上、細胞内の染色体構造の変化が RNA 転写の制御を通して、細胞機能を制御していることが明らかにされてきた。一方、癌細胞を含めて様々な疾患における細胞内の染色体構造の解析はほとんど行われておらず、新たな研究分野と考えられる。本研究では、下記に述べるような染色体構造を解析する様々な手法を用いることにより、細胞の染色体構造と細胞学的特性の関係を明らかにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、染色体の高次構造および微細構造の異常の解析を行い、ヒト細胞核における DNA の様々な構造異常が、癌化、悪性度、細胞増殖、RNA 転写制御、核クロマチン形態および化生に与える影響を解析することを目的とする。

具体的には、腫瘍性疾患では染色体増幅を起こすことがまれなヒト甲状腺癌と染色体転座や増幅を高頻度を起こすヒト膀胱癌より得た組織を、また、良性疾患では子宮頸部の扁平上皮化生組織から得た間期癌細胞を対象として、

(1) 甲状腺腫瘍では10番、18番、19番の、膀胱癌では3番、7番、9番、17番染色体の増幅や核内配置 (chromosome territory, CT) を解析する。

(2) 扁平上皮化生細胞において、1番染色体の chromosome territory 内における特定遺伝子 (EDC 遺伝子) の位置 (subchromosomal positioning, SCP) の変化や異常を検討し、RNA 転写への影響を解析する。

(3) Microscopic FRET (fluorescence

resonance energy transfer) 法を用いて、細胞核内におけるクロマチン凝集の程度をオングストロームレベルで解析する。

3. 研究の方法

(1) Multi-color FISH (fluorescence in situ hybridization) 法；

甲状腺腫瘍の解析では、10、18、19番染色体全体を認識する painting probes を、また膀胱癌の解析では3、7、9、17染色体のセントロメア領域と9p21領域を認識する領域 probes をそれぞれ異なった蛍光色素でラベルし、Multi-color FISH 法にて間期細胞核内の複数の染色体・遺伝子の数や位置および染色体領域 (chromosome territory) を同時に視覚化した。

(2) 細胞核の形態測定；

膀胱癌の解析では、(1)でMulti-color FISH 法にて染色され、3、7、9、17染色体9p21領域の解析が行われた同じ細胞について、DAPI で染色された核の面積および、“最大径 / 2)² × 3.14 / 核面積” で計算される形状係数の測定を行った。(1)の解析結果と合わせて、同一細胞の染色体／遺伝子異常と核面積と形状係数で表される細胞異型を関連付けた解析を行った。

(3) Microscopic FRET (fluorescence resonance energy transfer) 法；

FRET は、適切な2種類の蛍光分子ペアが100 Å以下の距離に近接し時に生じる donor 蛍光分子と acceptor 分子の間にかかるエネルギー移動で、2つの蛍光分子間の距離が近づくと FRET 量は大きくなる。本研究では、2種類の蛍光色素 (FITC と Alexa Fluor546) でラベルした1番染色体の全体を認識する painting probe と EDC 遺伝子領域を認識する領域 probe (Alexa Fluor647 ラベル) を用いて、FISH 法にて間期細胞を染色後に、EDC 遺伝子領域における FITC と Alexa Fluor546 の蛍光色素間の FRET 量を測定した。EDC 遺伝子領域の FITC と Alexa Fluor546 間の FRET 量を測定することによって、細胞核内の EDC 遺伝

子領域におけるクロマチン凝集の程度を
オングストロームレベルで定量的に解析
した。

4. 研究成果

本研究の結果は、以下の4点にまとめられ
る。

- (1) 10, 18, 19 番染色体の chromosome
territory (CT) の解析： 甲状腺乳頭癌
では CT の変化は正常甲状腺細胞に類似
し、10 番および 18 番染色体は核内内側
に、19 番染色体は核内外側に位置した。
一方、未分化癌では各染色体の数の増加
とともに CT に大きな変化が認められ、
正常細胞に存在したような CT の位置に
一定の傾向は認められなかった。
- (2) 尿路上皮癌細胞の中で強い細胞異型
(大型核や形状係数の異常) を示す癌細
胞では、核内の 3, 7, 17 染色体のうち 2
つ以上の染色体の増加が認められ、細胞
異型の程度と染色体数の間に関連が見
られた。一方、9p21 遺伝子欠失と細胞核
の面積や形状係数の間には相関が認め
られなかった。
- (3) 子宮頸部の扁平上皮はリンパ球に比し
て、EDC 遺伝子が 1 番染色体の
chromosome territory の外部に位置
(subchromosomal positioning) する細胞
がより頻度多く認められた。腺上皮では、
EDC 遺伝子が 1 番染色体の chromosome
territory の外部に位置する細胞の頻
度は、扁平上皮とリンパ球の場合の中間
の頻度を示した。腺上皮は、扁平上皮化
生に伴い、EDC 遺伝子の subchromosomal
positioning が腺細胞よりも扁平上皮細
胞に近いパターンを示した。
- (4) 扁平上皮化生に伴い subchromosomal
positioning の変化を示した EDC 遺伝子
の周囲では FRET 量が低く、DNA の凝集の
低下が示唆された。

以上より、

- (1) 悪性腫瘍において、
 - ①高悪性度化に伴い、 chromosome
territory の変化が起こっている。
 - ②細胞異型は染色体の増加と関連してい

る。

(2) 扁平上皮化生において、

①EDC 遺伝子は 1 番染色体の chromosome
territory の外へ移動する。

②EDC 遺伝子領域では DNA の凝集が少ない。
ということが明かにされた。この結果は、腫
瘍および非腫瘍性疾患において、染色体や遺
伝子のマイクロメータレベルの高次構造の
変化あるいはオングストロームレベルの微
細構造の変化が起こっており、これらの変化
が RNA 転写、ひいてはタンパク質合成の変化
を引き起こしている可能性が示唆した。

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 20 件)

- ① Kawasaki T, Kondo T, Nakazawa T,
Mochizuki K, Yamane T, Murata S, Inoue
S, Tsunoda H, Katoh R*. Is CD56 a
specific and reliable neuroendocrine
marker for discriminating between
endocrine/neuroendocrine ductal
carcinoma in situ and intraductal
papilloma of the breast?: Pathology
international, 査読有り, 61, 2011:
49-51.
- ② Murata S, Iseki M, Kinjo M, Matsuzaki
O, Moriuchi A, Ohtani H, Sakurai T,
Satake T, Tsuzuki T. Molecular and
immunohistologic analyses cannot
reliably solve diagnostic variation of
flat intraepithelial lesions of the
urinary bladder. Am J Clin Pathol, 査
読有り, 134, 2010: 862-72.
- ③ Yamane T, Mitsumata M, Yamaguchi N,
Nakazawa T, Mochizuki K, Kondo T,
Kawasaki T, Murata S, Yoshida Y, Katoh
R*. Lamina high shear stress
up-regulates type IV collagen synthesis
and down-regulates MMP-2 secretion in
endothelium. A quantitative analysis.
Cell and tissue research, 査読有り, 340,
2010: 471-9.

- ④ Motosugi U, Murata S, Shimizu M, Yasuda M, Sakurai T, Shimizu Y, Ban S, Nagata K, Yamaguchi H, Sannohe S. Extranodular background liver parenchyma of focal nodular hyperplasia: histopathological characteristics. *Virchows Arch*, 査読有り, 454, 2009: 557-62.
- ⑤ Nakazawa K, Murata S, Yuminamochi T, Ishii Y, Ohno S, Nakazawa T, Kondo T, Katoh R. p16(INK4a) expression analysis as an ancillary tool for cytologic diagnosis of urothelial carcinoma. *Am J Clin Pathol*, 査読有り, 132, 2009: 776-84.
- ⑥ Niu D, Murata S, Kondo T, Nakazawa T, Kawasaki T, Ma D, Yamane T, Nakamura N, Katoh R. Involvement of centrosomes in nuclear irregularity of thyroid carcinoma cells. *Virchows Arch*, 査読有り, 455, 2009: 149-57.
- ⑦ 村田晋一. 発癌および化生における RNA 転写制御に関わる染色体高次構造の解析. 埼玉医科大学雑誌, 査読無し, 36, 2009: 36-41.

[学会発表] (計41件)

- ① 村田晋一. 新しい腎盂・尿管・膀胱癌取扱い規約と尿細胞診. 日本臨床細胞学会 石川県支部総会. 金沢. 2011. 1. 30.
- ② 村田晋一. 新しい腎盂・尿管・膀胱癌取扱い規約 ー病理の立場からー. 泌尿器病理勉強会. 東京. 2011. 1. 23.
- ③ 村田晋一. 尿細胞診の診断アプローチ. 2010年度細胞検査士講習会. 伊勢原. 2010. 7. 18.
- ④ 村田晋一. 内分泌および泌尿器領域の非腫瘍性疾患. 第9回彩の国さいたま病理診断セミナー. さいたま. 2010. 6. 8.
- ⑤ 村田晋一. マクロ所見と細胞診～泌尿器領域～. 日本臨床細胞学会関東連合会. 宇都宮. 2009. 9. 18.
- ⑥ 村田晋一. 低異型度尿路上皮癌の特徴と尿細胞診. 近畿臨床検査技師会. 高槻. 2009. 8. 10.
- ⑦ 村田晋一. より精度の高い尿細胞診を目指して ～診断アプローチと問題点～.
- 日本臨床細胞学会京都府支部総会. 京都. 2009. 7. 23.
- ⑧ 村田晋一. 尿細胞診の診断アプローチと細胞生物学的背景. 平成20年度埼玉県細胞診講習会. おおみや. 2009. 1. 24.

[図書] (計8件)

- ① 瀬山 敦, 村田晋一. DNA-FISH 法～プローブ作製から染色、応用まで～, 組織細胞化学2011, in print, 日本組織細胞化学会, 東京, 2011.
- ② 日本泌尿器学会・日本病理学会編, 森永正次郎, 金城満, 都築豊徳, 村田晋一. 腎盂・尿管・膀胱癌取扱い規約, 第2部病理学的事項, 金原出版, 東京, 2011.
- ③ 村田晋一, 第4部 臨床との連携 「VII 病理診断報告書の記載」, 腫瘍病理鑑別診断アトラス 甲状腺癌, pp226-235, 文光堂, 東京, 2011.
- ④ 村田晋一編, 病理診断アトラス ー臨床医のための病理診断アトラス. “彩の国さいたま” 病理診断セミナーからのメッセージ 第2巻, 総198頁, ベクトル・コア, 東京, 2010.
- ⑤ 村田晋一, 第4章 尿細胞診に際して知っておくべき泌尿器疾患の病理形態像, スキルアップサイトロジー, pp27-52, 武藤, 東京, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 晋一 (MURATA SHIN-ICHI)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号: 20229991