

令和 5 年 6 月 14 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：20K09109

研究課題名(和文) 染色体不安定性を標的とした診断、治療アプローチの確立

研究課題名(英文) Diagnostic and therapeutic approaches targeting chromosomal instability

研究代表者

鈴木 浩一 (SUZUKI, KOICHI)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：70332369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌細胞にDNA脱メチル化剤を投与し染色体不安定生(CIN)を誘導すると、浸潤性の高い表現型に変化することを明らかにしました。また、脱メチル化の程度が高い膵癌患者は術中occult metastasisが発見される事が多く、予後も不良で転移形成に関わる生物学的悪性度の指標になる事を示しました。

薬剤感受性への影響も明らかになりました。マウスのmajor satellite RNAを組み込んだレトロウイルスベクターを構築し、マイクロサテライト安定性を有するマウスの大腸癌細胞株に感染させCINを誘導させると、トポイソメラーゼ I 阻害剤の感受性を高めCINによる薬剤耐性の克服の可能性を示しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、SatAが誘導する染色体不安定性が癌の進展、特に転移形成にどのように関わるのか我々のこれまでの研究課題を発展させると共に、染色体不安定性の臨床的意義を異なる視点から見直す事で、診断や治療の新たなアプローチに展開しようとするものです。染色体不安定性という生物学的悪性度から評価する転移・再発の診断アプローチへの応用に加えて、免疫チェックポイント阻害剤の効果予測因子の確立、感受性亢進、耐性の克服といった新たな治療アプローチに展開できると期待されます。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that chromosomal instability (CIN) induced by an administration of DNA demethylating agent made pancreatic cancer cells to be more invasive phenotype. Occult metastasis is often identified during surgery in pancreatic cancer patients whose tumor specimens show high degree of demethylation, and these patients show poor prognosis. In addition, we verified that CIN was involved in drug sensitivity. We constructed retroviral vectors expressing major satellite, infected a microsatellite stable mouse colon cancer cell line to induce CIN. Induction of CIN led to increased sensitivity to topoisomerase I inhibitors, indicating its potential to overcome drug resistance.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：染色体不安定性 セントロメア Satellite transcript 薬剤感受性 大腸癌

## 1.研究開始当初の背景

正常な染色体分配には染色体のセントロメア領域のメチル化が必須です。セントロメア領域は反復配列である **Satellite** 配列より構成され、そこから転写される **non-coding RNA** である **Satellite transcript** (**SatA**) が正常な染色体分配を司ります。我々はこれまで、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、特定の染色体を標的として数的異常を惹起する事を明らかにし、**SatA** による染色体不安定性の誘導は多発癌の発生に関わる事を示しました。さらに最近、染色体不安定性により転移形成に関わる報告がなされました。

## 2.研究の目的

本研究では、**SatA** が誘導する染色体不安定性が癌の進展、特に転移形成にどのように関わるか我々のこれまでの研究課題を進展させると共に、染色体不安定性の臨床的意義を異なる視点から見直す事で、診断や治療の新たなアプローチに展開しようと考えます。染色体不安定性という癌の発生や進展に与する因子を逆手に取り、免疫チェックポイント阻害剤の標的として捉え、診断や治療に応用します。

## 3.研究の方法

【脱メチル化剤誘導による染色体不安定性と癌の浸潤、転移】

<細胞株>

膵癌細胞株（低転移株：**Panc-1**（**primary**）高転移株：**Capan-1**（**liver meta**））に脱メチル化剤を用いて強制的に脱メチル化を誘導し、染色体不安定性、浸潤・転移能を評価します。

- (1) **MTT** 細胞生存アッセイ
- (2) **MethyLight** 法を用いた **DNA** メチル化レベルの定量
- (3) 免疫細胞染色：有糸分裂異常の観察
- (4) アレイ **CGH** 解析：染色体不安定性の評価（**DNA** コピー数異常など）
- (5) **Marigel** 浸潤能アッセイ

<臨床検体>

臨床検体で転移の有無と脱メチル化、染色体不安定性との関係を解析し、膵癌細胞株での実験より得られた結果との関連性を検討します。

【**SatA** が誘導する染色体不安定性と薬剤感受性】

マウスの **major satellite RNA (mSAT)** を組み込んだレトロウイルスベクターを構築し、マウスの大腸癌細胞株 **CT26**（マイクロサテライト安定性大腸癌）及び **MC38**（マイクロサテライト不安定性大腸癌）に感染させます。**In vitro** で **SatA** が誘導する染色体不安定性が薬剤耐性にどのように関与するのか評価します。その後マウス生体の皮下に移植し、転移形成の獲得の有無を評価します。

- (1) **major satellite RNA (mSAT)**を組み込んだレトロウイルスベクターの構築
- (2) 細胞増殖への影響：**Soft agar assay**
- (3) 有糸分裂異常：免疫細胞染色
- (4) **DNA** 損傷応答：**H2AX** (リン酸化 **H2AX**)
- (5) 免疫細胞染色：有糸分裂異常の観察
- (6) **Satellite RNA** 過剰発現細胞の薬剤感受性の検討：**WST-1** アッセイ
- (7) 細胞死関連タンパクの検討：**Western blotting**

#### 4. 研究成果

##### 【脱メチル化剤誘導による染色体不安定性と癌の浸潤、転移】

膵癌細胞株にアザシチジンを用いて脱メチル化誘導を行い、染色体不安定性をもたらす有糸分裂異常を免疫細胞化学によって調べたところ、**Abnormal segregation**、**Micronuclei** および **Anaphase bridge** といった有糸分裂異常の頻度がコントロールと比較して有意に増加していることを明らかにしました(図1)。CGHアレイの結果から特定の染色体領域でコピー数異常が認められました(図2)。また、脱メチル化誘導による染色体不安定性により、細胞浸潤能は有意に上昇しました(図3)。

臨床検体で検討すると、組織で脱メチル化が亢進している症例は、術前画像で同定できない **occult metastasis** が、術中高頻度に認められるといった結果が得られました(図4)。

図1 アザシチジンによるゲノム全域のDNA脱メチル化誘導と有糸分裂異常

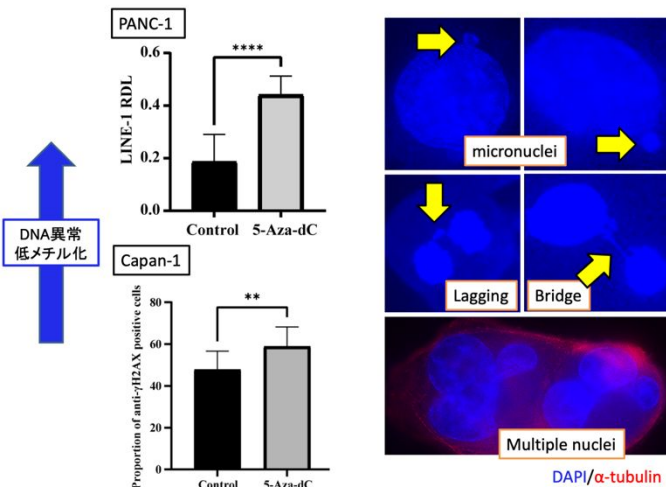
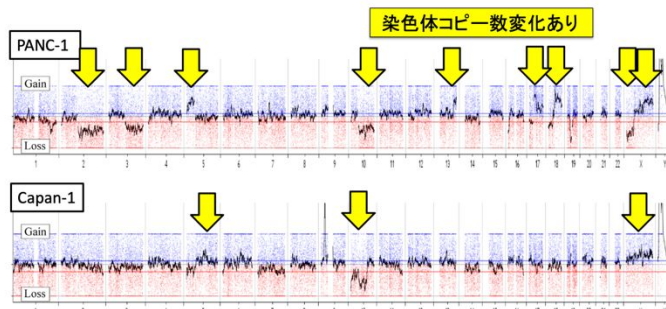


図2 アザシチジンによる染色体不安定性の誘導

Array CGH (comparative genomic hybridization analysis)



## Receiver operating characteristics

図3 ゲノム全域のDNA脱メチル化誘導と浸潤能

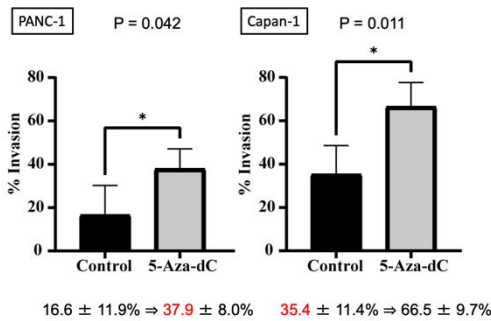
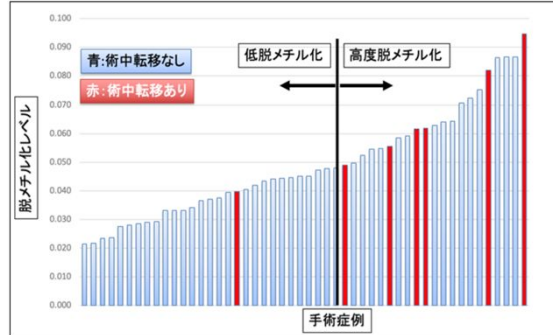
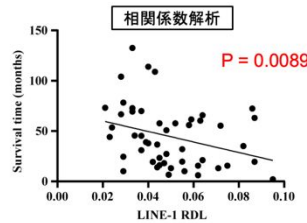


図4 術前生検検体の脱メチル化レベルとoccult metastasis

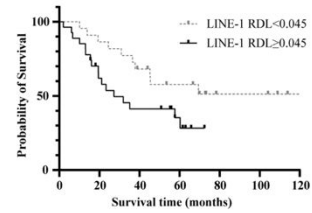


解析から得られた閾値をもとに検討を進めると、脱メチル化レベルが高値を示す症例では **occult metastasis** が有意に多く認められました ( $P=0.035$ )。さらに脱メチル化レベルは全生存期間との相関が認められ ( $P=0.0089$ )、脱メチル化レベルが高い症例の予後は不良でした (図5)。脱メチル化レベルを評価する事により、膵癌患者

図5 脱メチル化レベルと生存期間



LINE-1 RDL高い症例 予後不良



	Median	95% CI	P-value
LINE-1 RDL < 0.045 (n=22)	NA	36.5-NA	0.048
LINE-1 RDL ≥ 0.045 (n=27)	27.2	16.0-60.3	

の **occult metastasis** や予後バイオマーカーになると期待されます(1)。

### 【SatA が誘導する染色体不安定性と薬剤感受性】

マウスの **major satellite RNA (mSAT)** を組み込んだレトロウイルスベクターをマウスの大腸癌細胞株に感染させると、**mSAT** の発現量は上昇し (図6) **Abnormal segregation**、**Micronuclei** や **anaphase bridge** など有糸分裂異常を持つ細胞の割合が増加しました (図7)。さらに、**mSAT** 過剰発現細胞では **H2AX** 陽

図6 major satellite transcriptsの過剰発現

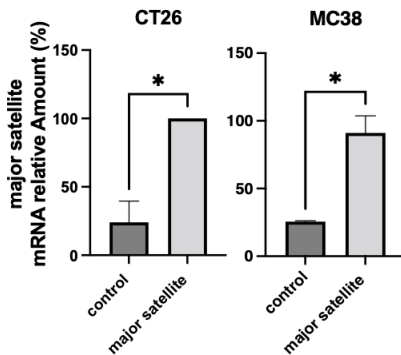
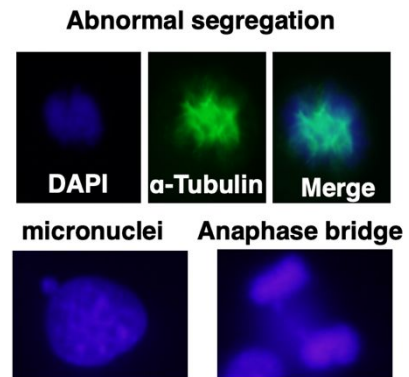


図7 mSAT 過剰発現細胞における有糸分裂異常



性の細胞を多く認め、DNA 損傷への応答が高まることが確認されました（図 8）。薬剤感受性に対する影響を調べるため、トポイソメラーゼ I 阻害剤（CPT）をマウス大腸癌細胞株に投与し WST-1 assay を用

図8 mSAT 過剰発現細胞における有糸分裂異常

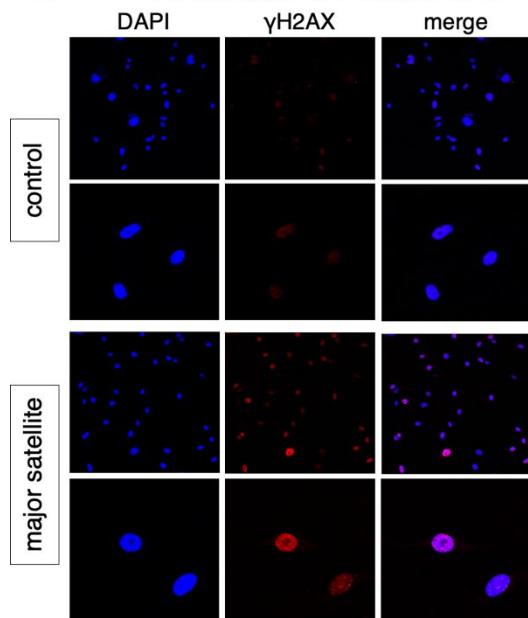
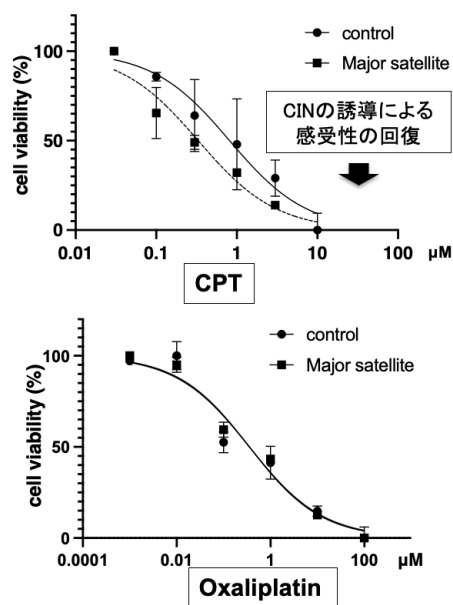


図9 薬剤感受性の評価



いて生存率を確認しました。CPT の感受性は CT26 で

は変化がなかったものの、MC38 で上昇しました（図 9：MC38 のみ）。CT26 はマイクロサテライト安定性であり、染色体不安定性のない MC38 の方が、mSAT による染色体不安定性の誘導により CPT の薬剤感受性が高まったと考えられます。CIN の誘導による薬剤耐性の克服です（2）。トポイソメラーゼ I 阻害剤は DNA 複製フォークの停止を介してアポトーシスを誘導しますが、CIN の導入によりそれが増強されたと考えます。白金製剤であるオキサリプラチン(Oxaliplatin)では感受性に変化が認められなかったことから、CIN の誘導はオキサリプラチンによる DNA の架橋形成は感受性への影響は少なく、トポイソメラーゼ阻害剤のような replication stress を惹起する薬剤に相加的に働く事が考えられました。

<引用文献>

1. Yuhei Endo, **Koichi Suzuki**, Yasuaki Kimura, Sawako Tamaki, Hidetoshi Aizawa, Iku Abe, Fumiaki Watanabe, Takaharu Kato, Masaaki Saito, Kazushige Futsuhara, Hiroshi Noda, Fumio Konishi, Toshiki Rikiyama Genome-wide DNA hypomethylation drives a more invasive pancreatic cancer phenotype and has predictive occult distant metastasis and prognosis potential. *Int J Oncol.* 2022;60: 61
2. Sawako Tamaki, **Koichi Suzuki**, Iku Abe, Yuhei Endo, Nao Kakizawa, Fumiaki Watanabe, Masaaki Saito, Shingo Tsujinaka, Yasuyuki Miyakura, Satoshi Ohta, Kenji Tago, Ken Yanagisawa, Fumio Konishi & Toshiki Rikiyama Overexpression of satellite RNAs in heterochromatin induces chromosomal instability and reflects drug sensitivity in mouse cancer cells *Sci Rep.* 2022;12:10999.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6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 Tamaki Sawako, Ishikawa Hideki, Suzuki Koichi, Kimura Yasuaki, Maemoto Ryo, Abe Iku, Endo Yuhei, Kakizawa Nao, Watanabe Fumiaki, Futsuhara Kazushige, Saito Masaaki, Tsujinaka Shingo, Miyakura Yasuyuki, Rikiyama Toshiki	4. 巻 16
2. 論文標題 Prophylactic use of pegfilgrastim enables the management of severe neutropenia without dose delays in patients with metastatic colorectal cancer treated with TAS?102 plus bevacizumab	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical 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/mco.2022.2536	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 Machida Erika, Tsujinaka Shingo, Kakizawa Nao, Miyakura Yasuyuki, Suzuki Koichi, Rikiyama Toshiki	4. 巻 71
2. 論文標題 Early peritoneal metastasis after laparoscopic incisional hernia repair secondary to colon cancer resection: A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Medicine and Surgery	6. 最初と最後の頁 103000 ~ 103000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.amsu.2021.103000	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 11
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 20797
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 -

1. 著者名 TAKAHASHI JUN, TSUJINAKA SHINGO, MAEMOTO RYO, MIYAKURA YASUYUKI, SUZUKI KOICHI, FUKUDA RINTARO, SAKIO RYOTARO, MACHIDA ERIKA, RIKIYAMA TOSHIKI	4. 巻 34
2. 論文標題 Tolerability and Adverse Events of Adjuvant Chemotherapy for Rectal Cancer in Patients With Diverting Ileostomy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 In Vivo	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) 10.21873/invivo.12178	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 Akahane Keiko, Shirai Katsuyuki, Wakatsuki Masaru, Ogawa Kazunari, Minato Kyosuke, Hamamoto Kohei, Takahashi Satoru, Suzuki Koichi, Takahashi Jun, Rikiyama Toshiki, Matsumoto Keita, Mashima Hiroosato	4. 巻 8
2. 論文標題 Severe esophageal stenosis in a patient with metastatic colon cancer following palliative radiotherapy, ramucirumab, and chemotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Case Reports	6. 最初と最後の頁 919 ~ 922
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ccr3.2751	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10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 柿澤奈緒、鈴木浩一、田巻佐和子、石川英樹、菊地 望、福井太郎、辻仲真康、宮倉安幸、力山敏樹.
2. 発表標題 大腸癌患者の化学療法中の血漿中VEGF-A値の変動とその意義
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 木村恭彰、鈴木浩一、田巻佐和子、阿部 郁、遠藤裕平、齊藤正昭、力山敏樹
2. 発表標題 血中循環血液腫瘍細胞CTCを用いた次世代シーケンサー解析とNivolumabの効果についての検討
3. 学会等名 第25回日本外科病理学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 遠藤裕平、鈴木浩一、田巻佐和子、阿部 郁、齊藤正昭、力山敏樹.
2. 発表標題 ゲノムワイドなDNA異常低メチル化は染色体不安定性を介した膀胱癌の浸潤・転移を促進する
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術集会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿部 郁、鈴木浩一、田巻佐和子、遠藤裕平、渡部文昭、齊藤正昭、力山敏樹
2. 発表標題 食道胃接合部癌細胞における胃酸胆汁酸によりもたらされるメチル化異常と染色体不安定性について
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術集会総会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 田巻佐和子、鈴木浩一、石川英樹、遠藤裕平、阿部 郁、齊藤正昭、清_浩一、力山敏樹
2. 発表標題 循環腫瘍細胞のゲノム情報に基づく血中モニタリングシステムの実用化
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tamaki S, Suzuki K, Kimura Y, Abe I, Endo Y, Saito M, Rikiyama T
2. 発表標題 Overexpression of satellite RNAs induces chromosomal instability and reflects on drug sensitivity in mouse cancer cells
3. 学会等名 第19回自治医科大学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田巻佐和子、鈴木浩一、阿部 郁、遠藤裕平、齊藤正昭、力山敏樹
2. 発表標題 satellite RNAの過剰発現は染色体不安定性を誘導し、薬剤感受性に影響を与える
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術集会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 15)宮倉安幸、田巻佐和子、町田枝里華、前本遼、高山裕司、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 薬ペムブロリズマブの治療状況
3. 学会等名 第26回日本遺伝性腫瘍学会学術集会
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 胆と臍	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	力山 敏樹  (Rikiya 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
---------	---------