学内グラント 終了時報告書

平成19年度 学内グラント報告書

# 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

研究代表者 村田 晋一(埼玉医科大学 医学部 病理学)

### 緒言

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.すなわち,正常細胞において は,23対の染色体は核内にランダムに存在するので はなく,遺伝子濃度に準じて,核内の一定部位に配置 (chromosome territory)している.また,各染色体領 域での短腕・長腕,セントロメア,テロメアの位置は, 無秩序に形成されているのではなく,一定の規則性の もとに形成されていることが明らかになってきた<sup>13</sup>.

さらに、特定の遺伝子はchromosome territoryの範 囲から外へ出て (subchromosomal positioning), 微小 環境を変化させることにより, RNA転写をより容易に 行うシステムが存在することが明かになってきた<sup>4,5</sup>. 例えば, Epidermal differentiation complex (EDC)は, 1番染色体上に存在する遺伝子で, small proline-rich proteins (SPRRs), Loricrin, Involucrin, S100Aなど 扁平上皮細胞の分化やcornified envelopeに関与する 蛋白をコードしている. EDC 遺伝子は, 培養リンパ 球では1番染色体のchromosome territory内に存在 するのに対して、培養扁平上皮細胞では1番染色体 のchromosome territoryの外に存在することが多い. このことから, EDC遺伝子は, 染色体領域内での存在 部位 (subchromosomal positioning)を変化させること によって, 転写活性亢進を引き起こし, タンパク発現 を制御していると考えられている.

以上のように培養正常細胞では、細胞核内の染色体 構造、特に高次構造がRNA転写制御に関わることが明 かされつつあるものの、腫瘍を含む病的状態にある細 胞における細胞形質の変化と核内染色体の高次構造の 解析はいまだ報告がほとんどなく、不明な点が多い. 本研究では、1)悪性甲状腺腫瘍における10番、18番 および19番のchromosome territory、2)扁平上皮化生 におけるEDC 遺伝子の subchromosomal positioningを 解析し,腫瘍細胞および化生細胞におけるRNA転写制 御に関わる染色体高次構造の変化を検討した.

### 材料と方法

対象は,正常甲状腺組織(4例),乳頭癌(6例),未 分化癌(2例),慢性子宮頸管炎(1例)で,いずれも外 科的に摘出された材料から得た. 凍結置換法(表1)に て材料を固定,パラフィン包埋した後,4 µmの切片 標本を作製した<sup>6)</sup>.1番,10番,18番,19番染色体 および Epidermal differentiation complex (EDC) 遺伝 子の視覚化には, Multicolor FISH 法(表2)を用いた (図1, 図2)<sup>7)</sup>. 用いたprobes は1番(biotinラベル), 10番(biotinラベル), 18番(FITCラベル), 19番(Cy3 ラベル) 染色体に対する painting probes (Cambio 社) とEDCに対応するPAC clone (P1-derived artificial chromosome; RP1-148L21と RP1-13P20)から作成した probe (digoxigenin ラベル) を用いた. FISH 染色標本 は、蛍光顕微鏡 (Olympus BX50) 下に観察した後、白 黒 CCD カメラ (Olympus, DP30BW)を使って, 染色 体およびEDC遺伝子染色像を別々の白黒デジタル画 像を採取した後,疑似カラーを付け,重ね合わせ, FISH 染色画像とした. 図3に示されるように, 10番, 18番, 19番染色体のchromosome territory を, 染色 体数と核縁からの直径比で10%の領域に存在するか 否かによって,4つのパターンに分類し,それぞれ のパターンを示す細胞の頻度をカウントした. EDC 遺伝子のsubchromosomal positioningに関しては, EDC 遺伝子が、1番染色体のchromosome territory の内部 (center),内部辺縁 (periphery),外部近傍 (neighborhood), 外部 (outside) のいずれに位置する かによって分類し、それぞれのパターンを示す細胞 の頻度をカウントした.切片標本のため、EDC遺伝 子からのシグナルが1つの細胞と2つの細胞が認めら れたが、1つのシグナルを持つ細胞のみについて検討 した.

#### 表 1. 凍結置換法のプロトコール

- Preparation of isopentane-propane cryogen (-193°C) by air propane in isopentane cooled in liquid nitrogen
- 2) Plunging the tissue samples into the cryogen
- Preparation of chilled freeze-substitution solution (-80°C) of pure acetone containing 2% paraform aldehyde
- 4) Moving the frozen tissue samples to the freezesubstitution solution (48 hrs)
- 5) Gradual elevation of the temperature to room temperature
- 6) Incubation in acetone, ethanol and xylene
- 7) Embedding in paraffin

#### 表 2. Multicolor FISH 法のプロトコール

- Pretreatment

   0.3% pepsin / 0.01N HCl (37°C, 30 min)
   4% PFA/0.1M PBS RT, 5 min)
   0.1% NP-40/2xSSC (37°C, 30 min)
   denature (85°C, 5 min)
- 2) Hybridization (37°C, overnight) PAC probes for EDC (RP1-13P20 or RP1-148L21) Whole chromosome No 1 painting probe (Cambio)
- 3) Washes
  50% Formamide + 0.1% Tween20/2xSSC (45°C, 10 min, twice)
  1×SSC (65°C, 10 min, twice)
- 4) Visualization using fluorescence (FITC, Cy3, Alexa Fluor 647)



🗌 type 1 🔲 type 2 🔀 type 3 🔳 type 4

図 1. 甲状腺の正常組織,乳頭癌症例,未分化癌症例それぞれのHE 組織像 (a, b, c),10番 (CT10;赤擬似色),18番 (CT18;緑擬似色), 19番 (CT19;青擬似色)染色体のmulticolor FISH像 (d, e, f),および chromosome territoryの分布 (g, h, i).

# 結果

# 1) 甲状腺病変における 10 番, 18 番, 19 番染色体の chromosome territory

図1は代表的甲状腺病変における10番,18番,19番 染色体の代表的FISH 画像と各染色体のchromosome territory 分布パターンである.また,正常甲状腺,乳 頭癌および未分化癌における10番,18番,19番染色 体のchromosome territoryの分布パターンの解析結果



図 2. 子宮頸部の扁平上皮, 腺細胞, 扁 平上皮化生細胞およびリンパ球における 1番 染 色 体 内 のEpidermal differentiation complex (EDC)遺伝子のsubchromosomal positioning. HE組 織 像(a, b)とmulticolor FISH像 (棘細胞 (c), 基底細胞 (d), 腺細胞 (e), 扁平上皮化生細胞 (f)およびリンパ球 (g). Multicolor FISH染色にはBACから作成 したprobes (RP1-148L21 c, d); RP1-13P20 e, f, g)を用いた. 1番染色が赤擬似色で, RP1-148L21およびRP1-13P20が緑擬似色で示さ れている.

を図4に示す.正常甲状腺では,10番染色体は約60% 以上の細胞で核縁に,18番染色体は約80%以上の細 胞で核縁に,19番染色体は約80%以上の細胞で核中 央に存在した.乳頭癌においても,正常甲状腺と類似 した傾向が見られたが,19番染色体が核縁に存在する 細胞が増加した.未分化癌においては,染色体増幅を 示す細胞やchromosomal territoryの乱れを示す細胞が 多数認められた.

# 2) 子宮頸部組織におけるEDCのsubchromosomal positioning

子宮頸部組織における1番染色体とEDC 遺伝子の代 表的 FISH 画像を図2に示す.内部 (center),内部辺縁 (periphery),外部近傍 (neighborhood),外部 (outside) に分類されたEDCの subchromosomal positioningの解 析結果が図5に示されている.どの種類の細胞におい ても,1番染色体のchromosome territoryの内部辺縁 と外部近傍 (periphery and neighborhood) にEDC 遺伝 子が存在する細胞の頻度が最も高かった.正常の扁平



図 3.10番, 18番, 19番染色体のchromosome territory分 布パターン分類. 直径比で核縁側10%領域にchromosome territoryの少なくとも一部が含まれるものをCTp, それ以 外をCTcと定義した. Type 1-3は含まれる染色体数が4個 以下のもの, type 4は5個以上のもので, type 1は全ての 染色体がCTp, type 2は全ての染色体がCTc, type 3と4は CTpとCTcが混在するものである.



図 4. 甲状腺の正常 (NM) 組織群,乳頭癌 (PC) 症例群,未 分化癌 (UC) 症例群の10番 (a),18番 (b),19番 (c) 染色体の chromosome territoryの分布解析結果.

上皮では、基底層、中層および表層においてやや異 なるものの、38-54%の細胞において、EDC 遺伝子は 1番染色体のchromosome territoryの外側(外部近傍と 外部)に存在した.一方、腺上皮では26-32%の細胞に おいて、リンパ球では28%の細胞において、また、腺 上皮から扁平上皮への形質変換である扁平上皮化生細 胞では38-42%の細胞において、EDC 遺伝子は1番染 色体の外側に存在した.

# 考察

核内で染色体 DNAが形成する最も大きな高次構造 である染色体領域 (chromosome territory)が,遺伝子 発現と密接に関係し,細胞の機能や分化を制御するメ カニズムの1つとして働いていることが明らかにされ はじめた<sup>3,810</sup>.染色体の構造は,オングストロームレ ベルの微細構造およびマイクロメータレベルの高次 構造の観点から論じられる.いずれのレベルの構造の 異常も RNA 転写の制御,ひいてはタンパク発現の制



図 5. 棘細胞 (a, b), 基底細胞 (c, d), 腺細胞 (e, f), 扁平 上皮化生細胞 (g, h) およびリンパ球 (i, h) における1番染 色体内のEpidermal differentiation complex (EDC) 遺伝子の subchromosomal positioning 解析結果. RP1-148L21による 解析結果 (a, c, e, g, i) と RP1-13P20 による解析結果(b, d, f, h, j).

御を通じて,発癌メカニズムや癌細胞の細胞生物学的 特性の発現に大きな影響を与えていると考えられる. 我々は,ヒト甲状腺癌を中心とした癌細胞の細胞生 物学的特性および発癌メカニズムについて,Texture analysisやMicroscopic FRET(fluorescence resonance energy transfer) 法の技術を応用し,染色体の微細構 造の解析を行ってきた<sup>11-17)</sup>.本研究では,我々が従来 行ってきた研究成果に,染色体の高次構造の解析を加 え,癌細胞核や化生細胞などの形質変換を来した細胞 核における染色体高次構造の変化と,悪性度,細胞増 殖,RNA転写制御,核クロマチン形態などの細胞特 性との関係を解析した.

染色体の高次構造の1つであるchromosome territory は、間期細胞核における各染色体の核内配置である. 正常細胞では18番染色体と19番染色体はほぼ同じ大 きさの染色体であるが、遺伝子を多く含む19番染色 体は核の中心部に,遺伝子の少ない18番染色体は核 辺縁に存在するというように、染色体は含まれる遺 伝子の密度に従って一定の規則性をもって核内に存 在することが明らかにされている.一方,核クロマ チン分布異常を示す腫瘍細胞におけるchromosome territoryを解析した報告はほとんど見られない. 本研 究では, 正常甲状腺および乳頭癌の大部分の細胞で は、18番染色体は核縁に、10番および19番染色体は 核中央部に配置した.ただし,乳頭癌細胞では,正常 甲状腺細胞と比較して、核中央部に配置する18番染色 体や核縁に配置する10番および19番染色体を持つ細 胞が増加した.未分化癌では,各染色体の数が増加し, かつ, chromosome territoryの規則性が失われていた. これらの結果より、甲状腺の腫瘍化において、細胞異 型に乏しく悪性度の低い高分化癌では多くの細胞で chromosome territoryの基本的規則性は保たれるもの の、一部に乱れが生じている.一方、細胞異型が強く 悪性度の高い未分化癌では多くの細胞でchromosome territoryの乱れが顕著になることが示された.

Subchromosomal positioningは、間期細胞核における 遺伝子のchromosome territory内あるいは外での位置 であり、染色体の高次構造の1つである.先に述べた ように、細胞はある種の遺伝子のsubchromosomal positioningを変化させることによって、RNA転写 活性、引いてはタンパク発現や細胞形質発現をコン トロールしていると考えられている.ほどんどの subchromosomal positioningの研究は培養細胞を 用いた研究であり、実際のヒト組織内で形質変換 を示した細胞のsubchromosomal positioningを解析 した報告はまれである.本研究では、ヒト子宮頸部 組織において扁平上皮の分化と関連するEDC 遺伝 子のsubchromosomal positioningが、細胞の種類お よび分化によって変化することが示された.すなわ ち、扁平上皮細胞では、腺上皮細胞やリンパ球と比 較して、1番染色体のchromosome territoryの外側 (外部近傍と外部)にEDC遺伝子が存在する細胞の頻 度が高かった.さらに、腺上皮からの形質転換した 扁平上皮化生細胞では、腺上皮よりも1番染色体の chromosome territoryの外側にEDC遺伝子が存在する 細胞の頻度が高かった.以上より、腺上皮が扁平上 皮化生に際しては、EDC遺伝子のsubchromosomal positioningが変化しており、EDC遺伝子周囲のDNA 環境を変化させることによって、EDC遺伝子の発現 (RNA転写)亢進、引いてはEDCタンパクの産生亢進 を来すことによって、化生が起こされている可能性が 示唆された.

以上,1) 癌細胞における chromosome territoryは, 高分化癌では正常細胞に類似するものの,遺伝子異 常が高頻度に認められる甲状腺未分化癌では高度な 変化が見られること,2) chromosome territoryを始 めとする染色体の高次構造の異常は核形態の異常(核 異型)をもたらすこと,3) 腺上皮における扁平上皮 化生では,扁平上皮分化と関係するEDC遺伝子の subchromosomal positioningを変化させること,が明 らかとなった.すなわち,chromosome territoryや subchromosomal positioningといった染色体高次構造 の変化が,遺伝子発現(RNA転写)に影響し,蛋白発現 の制御を通して,細胞の形態・機能といった形質変化 や腫瘍化に関与している可能性が示唆された.

## 文 献

- Boveri T. Die Blastomerenkerne von Ascaris megalocephala und die Theorie der Chromosomenindividualitat. Archiv fur Zellforschung. 1909;3:181-268.
- Cremer T, Kurz A, Zirbel R, Dietzel S, Rinke B, Schrock E, et al. Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1993;58:777-92.
- Tanabe H, Kupper K, Ishida T, Neusser M, Mizusawa H. Inter- and intra-specific genedensity-correlated radial chromosome territory arrangements are conserved in Old World monkeys. Cytogenet Genome Res. 2005;108:255-61.
- Williams RR. Transcription and the territory: the ins and outs of gene positioning. Trends Genet. 2003;19:298-302.
- 5) Williams RR, Fisher AG. Chromosomes, positions please! Nat Cell Biol. 2003;5:388-90.
- 6) Ohno N, Terada N, Murata S, Katoh R, Ohno S. Application of cryotechniques with freezesubstitution for the immunohistochemical demonstration of intranuclear pCREB and

chromosome territory. J Histochem Cytochem. 2005;53:55-62.

- Murata S, Katoh R. Technique and application of FISH method In: Histochmistry 2008 ed.). Kyoto: Nakanishi Insatsu, 2008:59-66.
- Parada LA, McQueen PG, Misteli T. Tissue-specific spatial organization of genomes. Genome Biol. 2004;5:R44.
- Solovei I, Schermelleh L, During K, Engelhardt A, Stein S, Cremer C, et al. Differences in centromere positioning of cycling and postmitotic human cell types. Chromosoma. 2004;112:410-23. Epub 2004 Jun 2009.
- 10)Guasconi V, Souidi M, Ait-Si-Ali S. Nuclear positioning, gene activity and cancer. Cancer Biol Ther. 2005;4:134-8.
- 11)Murata S, Herman P, Lin H-J, Lakowicz J. Fluorescence lifetime imaging of nuclear DNA; Effect of fluorescence resonance energy transfer. Cytometry. 2000;41:178-85.
- 12)Murata S, Kusba J, Piszczek G, Gryczynski I, Lakowicz J. Donor Fluorescence Decay Analysis for Energy Transfer in Double-Helical DNA with Various Acceptor Concentration. Biopolymers. 2000;57:306-15.
- 13) Murata S, Herman P, Lakowicz J. Texture analysis of fluorescence lifetime images of nuclear DNA with effect of fluorescence resonance energy transfer. Cytometry. 2001;43:94-100.
- 14) Murata S, Herman P, Lakowicz J. Texture analysis of fluorescence lifetime images of at- and gc-rich regions in nuclei. J Histochem Cytochem. 2001;49:1443-52.
- 15) Murata S, Mochizuki K, Nakazawa T, Kondo T, Nakamura N, Yamashita H, et al. Detection of underlying characteristics of nuclear chromatin patterns of thyroid tumor cells using texture and factor analyses. Cytometry. 2002;49:91-5.
- 16) Murata S, Herman P, Mochizuki K, Nakazawa T, Kondo T, Nakamura N, et al. Spatial distribution analysis of AT- and GC-rich regions in nuclei using corrected fuorescence resonance energy transfer. J Histochem Cytochem. 2003;51:951-8.
- 17)Murata S, Herman P, Iwashina M, Mochizuki K, Nakazawa T, Kondo T, et al. Application of microscopic Forster resonance energy transfer to cytological diagnosis of the thyroid tumors. J. Biomedial Optics. 2005;10:034008(034001-6).

## 英語論文:

- 1: Shimizu Y, Jin L, Yamaguchi H, Motosugi U, Sannohe S, Nagata K, Sakurai T, <u>Murata S</u>, Yasuda M, Shimizu M. Detection of lymphatic invasion in resected cases of primary pancreatic cancer based on immunohistochemistry of D2-40. Ann Diagn Pathol. 2009 Jun;13(3):168-72.
- 2: Motosugi U, <u>Murata S</u>, 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. 2009 May;454(5):557-62.
- 3: Motosugi U, Kato T, Kamakura Y, Saze T, Suzuki T, Yajima S, Shimizu Y, <u>Murata S</u>, Shimizu M, Ichikawa T, Araki T. Radiology contributes to better cytological diagnosis of lung tumors. Lung Cancer. 2009 Feb 3. [Epub ahead of print]
- 4: Kawasaki T, Nakamura S, Sakamoto G, <u>Murata S</u>, Tsunoda-Shimizu H, Suzuki K, Takahashi O, Nakazawa T, Kondo T, Katoh R. Neuroendocrine ductal carcinoma in situ (NE-DCIS) of the breastcomparative clinicopathological study of 20 NE-DCIS cases and 274 non-NE-DCIS cases. Histopathology. 2008 Sep;53(3):288-98.
- 5: Inoue S, Inoue M, Kawasaki T, Takahashi H, Inoue A, Maruyama T, Matsuda K, Kunitomo K, <u>Murata S</u>, Fujii H. Six cases showing radial scar/complex sclerosing lesions of the breast detected by breast cancer screening. Breast Cancer. 2008;15(3):247-51.
- 6: Nakazawa T, <u>Murata S</u>, Kondo T, Nakamura N, Yamane T, Iwasa S, Katoh R. Histopathology of the thyroid in amiodarone-induced hypothyroidism. Pathol Int. 2008 Jan;58(1):55-8.
- 7: <u>Murata S</u>, Nakazawa T, Ohno N, Terada N, Iwashina M, Mochizuki K, Kondo T, Nakamura N, Yamane T, Iwasa S, Ohno S, Katoh R. Conservation and alteration of chromosome territory arrangements in thyroid carcinoma cell nuclei. Thyroid. 2007 Jun;17(6):489-96.
- 8: Kondo T, Nakazawa T, <u>Murata S</u>, Kurebayashi J, Ezzat S, Asa SL, Katoh R. Enhanced B-Raf protein expression is independent of V600E mutant status in thyroid carcinomas. Hum Pathol. 2007 Dec;38(12):1810-8.
- 9: Kondo T, Hashi A, <u>Murata S</u>, Fischer SE, Nara M, Nakazawa T, Yuminamochi T, Hoshi K, Katoh R. Gastric mucin is expressed in a subset of endocervical tunnel clusters: type A tunnel clusters of gastric phenotype. Histopathology. 2007 Jun;50(7):843-50.

# 研究成果リスト

- 10: Nara M, Hashi A, <u>Murata S</u>, Kondo T, Yuminamochi T, Nakazawa K, Katoh R, Hoshi K. Lobular endocervical glandular hyperplasia as a presumed precursor of cervical adenocarcinoma independent of human papillomavirus infection. Gynecol Oncol. 2007 Aug;106(2):289-98.
- 11: Liu YL, Matsuzaki T, Nakazawa T, <u>Murata S</u>, Nakamura N, Kondo T, Iwashina M, Mochizuki K, Yamane T, Takata K, Katoh R. Expression of aquaporin 3 (AQP3) in normal and neoplastic lung tissues. Hum Pathol. 2007 Jan;38(1):171-8.

### 日本語論文:

- 1. <u>村田晋一</u>, 廣川満良. 甲状腺微小癌 update. 病理と 臨床 2009;27(5):448-52.
- 大野四季音,<u>村田晋一</u>,弓納持勉,石井喜雄, 中澤久美子,岩佐敏,加藤良平 尿中に腫瘍細胞 が出現した乳頭状腎細胞癌の一例 日本臨床細胞 学会雑誌 2009;48(2):61-5.
- 3. <u>村田晋一</u> FISH法の実際と応用. 組織細胞化学 2008;59-66.
- 4. <u>村田晋一</u> 組織診および細胞診からみた尿路上皮 異形成の取り扱い 病理と臨床 2008 26巻2号 152-6.
- 5. 赤池英憲, 板倉淳, 大澤俊也, 藤井秀樹, 中澤匡男, <u>村田晋一</u>, 加藤良平 Granulocyte-colony stimulating factor(G-CSF) 産生膵腺扁平上皮癌の1 剖検例 膵 臓 2008 23巻4号 494-500
- 6. 石川めぐみ,安藤典子,岩本拓,原田和俊,古橋正男,

 ${\ensuremath{\mathbb C}}$  2009 The Medical Society of Saitama Medical University 川村龍吉,柴垣直孝,佐藤栄一,<u>村田晋一</u>,島田眞路 神経線維腫症1型に合併した悪性末梢神経鞘腫瘍 の姉弟例臨床皮膚科 2008 62巻7号 487-9.

- 7. 欧陽いく暉,上條篤,<u>村田晋一</u>,遠藤周一郎,加藤良平, 増山敬祐 好酸球性副鼻腔炎患者におけるシス ティニルロイコトリエンレセプターの発現 耳鼻咽 喉科免疫アレルギー 2007 25巻2号 150-1.
- 三井広, 柴垣直孝, 金重勝博, <u>村田晋一</u>, 加藤良平, 島田眞路 四肢の紫斑, 潰瘍で発症した多発性 骨髄腫皮膚病診療 2007 29巻10号 1157-60.

### 講 演

- <u>村田晋</u>・尿細胞診の診断アプローチとその細胞 生物学的背景 埼玉県細胞診講習会 埼玉 2009 年 1月24日
- 2. <u>村田晋一</u>. 尿細胞診の誤判定防止の要点 ~診断ア プローチと問題点~ 国立病院機構研修会 東京 2009年2月3日
- 3. <u>村田晋一</u>. 細胞診における細胞核異型の分子病 理学的背景 - 甲状腺と尿路上皮の病変を中心と して- 埼玉 埼玉県技師会
- 4. <u>村田晋一</u>. 尿路上皮病変における病理診断の問題 点と分子病理学的アプローチ 第12回泌尿器病理 研究会 小倉2008年6月25日
- <u>村田晋一</u>. 尿細胞診の診断アプローチと問題点. 日本臨床細胞診学会山形県支部総会 山形 2008 年 7月19日

http://www.saitama-med.ac.jp/jsms/