

表 題 satellite alpha transcripts 高発現と
両側乳癌、他臓器癌合併発症の関連についての検討

論 文 の 区 分 博士課程

著 者 名 柿澤 奈緒

担当指導教員氏名 力山 敏樹 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系 専攻
総合医学 分野
外科系総合医学

2019 年 1 月 10 日申請の学位論文

目次

はじめに	p. 1-5
第 1 部	
対象と方法	p. 6-18
結果	p. 19-35
考察	p. 36-39
第 2 部	
方法	p. 40-43
結果	p. 44
考察	p. 45-46
おわりに	p. 47
謝辞	p. 48
参考文献	p. 49-55

はじめに

乳癌は世界中の女性が罹患する癌の中で、最多の悪性腫瘍である。近年その罹患率は増加傾向にあり、日本人女性についても同様に、1960年から2000年の間の上昇率は、欧米に比してより急激であり、増加傾向が急速に進んでいることが分かる(1)。ここには、乳癌の罹患リスクとして知られる食生活や体重の増加などの生活習慣や環境要因の関与が考えられるが、最もよく知られた乳癌のリスク因子は、早期初潮、晩期閉経といった長期間の女性ホルモン曝露と、乳癌の家族歴である(2, 3, 4, 5)。さらに、乳癌既往のある女性では、両側乳癌を発症するリスクが、既往のない女性に対して2から6倍といわれている(6-10)。特に *BRCA*(breast cancer susceptibility) 1 や *BRCA2* 遺伝子変異と乳癌家族歴は、両側乳癌のリスク因子としてよく知られている(11)。

しかし、両側乳癌症例の中で *BRCA* 変異が認められたのは、16%に過ぎないという報告もある(12)。また *BRCA* 変異を有していなくても、第1度近親（母・姉妹・娘）に両側乳癌の家族歴を持つ患者では、両側乳癌の10年累積罹患リスクは、*BRCA* 変異を持つ女性と同等となる(11)。これらのことは両側乳癌の発症には、*BRCA* 変異以外の因子が関与していることを示している。加えて、乳癌既往のある女性は、他臓器癌（卵巣、膵、皮膚）を発症するリスクも高いといわれている(13)。

乳癌の治療は、手術に加えて放射線治療や化学療法、ホルモン療法を含んでおり、患者はボディイメージの変化に悩まされることとなる。最近では単発乳癌であるにもかかわらず、縮小手術よりも乳房切除や予防的対側乳房切除、さらにその後の乳房再建手術を希望する患者が増えており(14)、予防的両側乳房切除 (contralateral prophylactic mastectomy; CPM) を選択する乳癌患者数が6年間で2倍になるほどの急増をみせている(15, 16)。この手術には患者の予後を改善する科学的証拠がない。にもかかわらず、希望する患者が増加している背景には、乳癌の再発や対側乳癌発症への強い不安、また外見やボディイメージを重視する現代の思考傾向が見て取れる(14, 17-19)。

悪性腫瘍の多発発症を考えるとときに重要な概念が、field cancerization である。当初は、口腔内・咽喉頭の連続する領域で、連続した領域が癌原物質によってダメージを受けているかのように、癌近傍組織においても異形成や上皮内癌が認められたことから、この概念が提唱された(20)。現在では、頭頸部、尿路、呼吸器、消化器、乳腺など多岐にわたって、この概念が当てはまる悪性腫瘍があることが報告されている。分子生物学的な研究が進み、遺伝子異常、遺伝子修飾異常を含んだ正常組織から癌が出現することも分かっており、発生学的に同じ領域における悪性新生物の複数発生に通じるものである。遺伝子変異は正常組織（非癌部組織）で観察されることは少ないが、遺伝子修飾異常は、

癌近傍の正常組織で認められることが様々な文献で報告されている(20-28)。乳癌でも、女性ホルモンのように、組織環境の長期間にわたる変化が、癌の発生に関与すると考えられていて、このような環境に曝露された領域では、様々な遺伝子異常や遺伝子修飾異常などの変化が、field cancerization を形成して、多発癌の発生機序に深くかかわっていると推察される(22, 29)。遺伝子異常として多く研究されているのが、癌抑制遺伝子などのプロモーター領域で生じた DNA メチル化異常であり、癌化のプロセスに関わっていると考えられている(24)。乳癌では、*BRCA1* プロモーターのメチル化異常が、家族歴を持たない乳癌患者でも確認されており、論文報告も多数存在する(30-34)。

その一方で、遺伝子修飾異常は、染色体の中央部分に存在するセントロメアを研究ターゲットとしており、論文報告数は少ないが、この領域の反復配列が低メチル化する現象が、様々な癌種で観察されている。当研究室では過去に DNA 全ゲノムのメチル化レベルや散在性反復配列である long interspersed nucleotide element-1 (LINE-1) を対象とした研究を行い、LINE-1 の低メチル化が大腸癌患者の多発癌で上昇していることを発表した(35)。一方で、LINE-1 の低メチル化は癌化との関連は不明瞭であり、我々は同様の反復配列である Satellite DNA に焦点をあてた研究を行い、成果を報告した。Satellite DNA は高度に反復した non-coding 配列からなり、ヒトセントロメアは 171bp の縦列型

反復配列である satellite alpha で構成され、ここから転写されるのが satellite alpha transcripts (SAT)である。これらの non-coding 領域は、ヘテロクロマチンの構造上、転写されにくいという理由で特に役割がないと考えられていた。しかし、Satellite DNA が正常に発現することは正確な染色体分離に不可欠であり(36-39)、Satellite RNA の過剰発現が染色体異常分裂を誘導したことも報告されている(40, 41)。Satellite DNA の高発現は、様々な癌種で観察されており(42)、当研究室からは、正常胃粘膜を用いた Satellite DNA の測定を行い、胃癌の多発癌の傾向を導き出した(43)。このように、癌部だけでなく非癌部でも Satellite DNA の高発現が確認されており、このようなエピゲノムの変化が field cancerization を形成する鍵になると考えられる。当研究室ではこのセントロメアの低メチル化に注目して今まで継続して研究を行っており、すでに胃癌、大腸癌の多発症例で、またその非癌部において、反復配列の低メチル化異常について報告を行った(35, 43, 44)。また SAT の高発現は、乳癌患者の癌部、非癌部組織において、SAT 配列の低メチル化の進行と相関していたことを示した(45)。さらに Satellite alpha 配列を強制発現させたヒト乳腺上皮細胞において、細胞分裂時の有糸分裂異常の増加を示すことで、低メチル化異常と染色体不安定性の関連を証明した(45)。これらのことから、Satellite DNA は癌化において重要な役割を果たし、field cancerization の結果としての

多発癌発生の機序に関与している可能性がある。

今回の研究では、SAT が両側乳癌や他臓器癌合併につながる field cancerization に関与するかどうかを調べるために、臨床検体を用いて解析を行った（第 1 部）。また、マウスの乳癌モデルを作成し、マウスの Satellite DNA である major Satellite 配列を導入したレンチウイルスベクターを作製して、マウスの乳管に投与し、乳癌の発癌時期や形態に違いが生じるかどうか、観察を行った（第 2 部）。

略語一覧

SAT	satellite alpha transcripts
BBC	bilateral breast cancer
SBC	single breast cancer
MPC	multiple primary cancer
BMI	body mass index
ER	estrogen receptor
HER2	human epidermal growth factor
TNBC	triple-negative breast cancer
CPM	contralateral prophylactic mastectomy
BRCA	breast cancer susceptibility gene
rSAT	relative expression level of satellite alpha transcripts
RDL	relative demethylation level
ROC	receiver operating characteristic
AUC	area under the curve
LINE-1	long interspersed nucleotide element-1
CNV	copy number variant
DMBA	7,12-dimethylbenz(a)anthracene
EGFP	enhanced green fluorescent protein
IVIS	in vivo Imaging System

第 1 部

対象と方法

臨床検体採取

自治医科大学附属さいたま医療センターの一般・消化器外科において、2015 年 7 月から 2017 年 7 月の期間に、診断・治療を行った乳癌患者のうち、遺伝子解析研究の同意が得られた 167 例を臨床検体の対象症例とした。組織標本の採取方法については、癌部の場合は術前針生検または切除手術時に、自動生検針エースカット (TSK laboratory, Japan) 14G 針を用いて、超音波検査で腫瘍部を確認しながら確実に採取した。非癌部は、切除手術時に癌部から少なくとも 3 cm離れた非乳頭方向の組織を採取した。切除標本を Hematoxylin Eosin 染色の後に顕鏡し、癌の存在はないと確認された部位を検討に用いた。すべての標本は、採取後速やかに核酸保存液である RNAlater™ (Ambion 社製) に浸し、24 から 48 時間後に取り出して-80℃で保存した。この方法によって、癌部(tumor tissue: TT) 165 検体、非癌部(normal tissue: NT) 109 検体を得た。

患者の臨床病理学的背景は、各患者の診療録、病理診断書から得た情報をもとにした。ホルモンレセプターについては、ER(estrogen receptor)を組織標本の免疫組織化学法で検出し、J-score 分類 (日本乳癌学会) を用いて判定した。J-Score 分類は、陽性細胞の比率による評価方法であり、10%以上の腫瘍細胞が陽性の場合を、陽性と判定した (46, 47)。

HER2(human EGFR (epidermal growth factor receptor)-related 2)の検査法には、免疫組織化学法 (IHC) と蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法 (FISH) がある。まず IHC により HER2 の癌細胞の細胞膜の染色程度によってスコア 0 から 3+の 4 段階に分類し、3+は陽性、0 と 1+を陰性とする。IHC で 2+となった症例においては、FISH を行い、HER2 遺伝子の増幅が検出されたものは HER2 陽性、それ以外を陰性とした(48)。

家族歴については、第 1 度近親 (母、姉妹、娘) と第 2 度近親 (祖母、叔母、孫、姪) に乳癌患者がいる場合に、家族歴ありと判定した。TNM 分類は American Joint Committee on Cancer and the International Union For Cancer Control (AJCC/UICC) 分類 (第 8 版 2017 年) に従った。*BRCA1/2* 変異検索については全例施行していない。

本研究は、自治医科大学遺伝子解析倫理委員会において、承諾を得た。またこの研究において使用した検体を提供する全ての患者に対して、研究内容について書面と口頭で説明を行い、研究に関する同意を書面で得た。

RNA 抽出

臨床検体からの total RNA の抽出は、Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare UK 社) を用いてそのプロトコルに従って抽出した。RNA の品質および収穫量を評価するために、抽出後にサンプルの吸光度 A260/A280 比

を Nano-Drop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies 社)で分析した。A260/A280 比が 1.8 以上の RNA サンプルのみ、以降の実験に使用した。

DNA 抽出

臨床検体からのゲノム DNA の抽出は、核酸自動精製装置 EZ1®Advanced XL (プログラムカード: EZ1 Advanced XL DNA Tissue Card, Qiagen 社) を用いて、EZ1 DNA Tissue Kit (Qiagen 社) を使用して行った。DNA の品質と収量を評価するために、抽出後にサンプルの吸光度 A260/A280 比を Nano-Drop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies 社)で分析し、A260/A280 比が 1.8 以上のサンプルのみ、これ以降の実験に使用した。

cDNA 作成

RNA サンプルからの逆転写反応は High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems 社) を用いて、プロトコルに従って行った。

反応溶液

2X RT Buffer	10.0 μ l
20X RT Enzyme Mix	1.0 μ l
Nuclease free H ₂ O	7.0 μ l
Sample	2.0 μ l
合計	20.0 μ l

逆転写反応

	Step1	Step2	Step3
温度 °C	37	95	4
時間 分	60	5	∞

リアルタイム PCR (RT-qPCR) (SYBR Green 法)

SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus)を使用して、作成した cDNA 溶液を用いて、下記の反応条件のもとに QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR system (Applied Biosystems 社)を使用して PCR 反応を行った。

反応溶液

SYBR Premix Ex Taq	10 μ l
PCR Forward Primer 20 μ M	0.2 μ l
PCR Reverse Primer 20 μ M	0.2 μ l
ROX Reference Dye	0.4 μ l
Template	2 μ l
H ₂ O	7.2 μ l
合計	20 μ l

反応条件

	Stage1 初期変性	Stage2 PCR 反応		Stage3 Melt Curve		
温度 °C	95	95	58	95	60	95
時間 秒	30	15	60	15	60	15
サイクル数	1	40		1	1	1

各 RNA の転写レベルは QuantStudio 12K Flex Data Analysis ソフトウェアの蛍光強度測定値を用いて決定した。各プライマーの塩基配列を下記に記す。内因性コントロールとして、GAPDH を用いた。

Target	Sequence (5' -3')	
Satellite alpha	Forward	AAGGTCAATGGCAGAAAAGAA
Satellite alpha	Reverse	CAACGAAGGCCACAAGATGTC
GAPDH	Forward	GAAGGTGAAGGTCGGAGT
GAPDH	Reverse	GAAGATGGTGATGGGATTTTC

スタンダードサンプルを用いて検量線を作成し、検量線法を用いてそれぞれの Ct 値から対象の濃度 (Quantity mean) を測定した。これを用いて下記のよう計算し、relative expression level of SAT (rSAT) とした。

$$r\text{ SAT} = \log_{10} (\text{SAT 濃度} / \text{GAPDH 濃度})$$

array CGH

アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション (array comparative genomic hybridization: aCGH) は、コピー数多型をはじめとする数キロベース (kb) 程度の微細なゲノム異常をも探索できる解析方法であり、ゲノムの gain や loss を調べるために広く使用されている。今回の解析には SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit 8x60K (Agilent 社) を用いた。プロトコール (ver7.3, 2015 年 10 月) に従い、SureTag DNA Labeling Kit (Agilent 社)、Oligo aCGH/ChIP-on-chip Hybridization Kit (Agilent 社) を用いて標識反応、ハイブリダイゼーション反応を行った。

臨床検体の癌部組織から、前述した方法 (EZ1 DNA Tissue Kit (Qiagen 社)) で DNA を抽出した。30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 以上の濃度が得られたものを以降の実験に使用した。コントロール DNA は Universal Human Reference DNA (Agilent 社) を用いた。DNA に制限酵素 Alu I と Rsa I を加えて、ダイレクト法で 37°C で 2 時間反応させたのち、サンプル DNA を Cy5-dUTP、コントロール DNA を Cy3-dUTP で標識した。Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-30 membrane (Millipore 社) を用いて精製し、至適濃度に濃縮した。Nano-Drop ND-1000 spectrophotometer を用いて、標識色素の取り込み率、DNA 収量を測定した。規定された基準値以上であるサンプルのみ以降の実験に使用した。ハイブリダイ

ゼーション緩衝液に溶解したヒト Cot-1 DNA (Agilent 社)と標識後の DNA 溶液を混合し、CGH アレイスライドにアプライし、67°Cで 24 時間のハイブリダイゼーションを行った。その後アレイスライドを取り出し、Oligo aCGH/ChiP-on-chip Wash Buffer (Agilent 社)で洗浄した。Agilent Technologies Microarray スキャナー、Feature Extraction ver12.0.3.1 (Agilent 社)でスキャンと解析を行った。得られたデータを CytoGenomics ver5.0 (Agilent 社)ソフトウェアにインポートし、可視化した。

バイサルファイト変換

ゲノム DNA のバイサルファイト変換は EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen 社)を用いた。バイサルファイト処理でメチル化されていないシトシン (C) がウラシル (U) に変換され、その後の PCR 中にチミジン (T) に変換される。このプロセスによりメチル化 DNA と非メチル化 DNA との間で、配列の相違が現れることになる。

MethyLight 法 (TaqMan プローブ法)

DNA の全体的な低メチル化は 5-メチルシトシン含有量によってではなく、反復配列のメチル化を評価することで代替できるとされているため、今回の研究でも反復配列のメチル化異常を検出することとし、メチル化特異的定量 PCR 法の一つである MethyLight 法を施行した。この手法は 2005 年に Weisenberger らによって報告された方法であり (49)、前述したバイサルファイト処置ののち、

DNA 配列に特異的な TaqMan probe を用いることにより、高い特異性をもってメチル化レベルの定量が可能である。TaqMan probe は、5' 末端を蛍光物質で、3' 末端をクエンチャー物質で修飾した、オリゴヌクレオチドである。TaqMan probe は、アニーリングステップで鋳型 DNA に特異的にハイブリダイズするが、probe 上にクエンチャーが存在するため、励起光を照射しても蛍光の発生は抑制されている。その後の伸長反応ステップで、TaqMan ポリメラーゼの持つ 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性により、鋳型にハイブリダイズした TaqMan probe が分解され、蛍光色素が probe から遊離してクエンチャーによる抑制が解除されて蛍光を発するようになる。我々はその手法をもとに、若干の probe 配列デザインを改変して、定量 PCR を行った。プライマー及びプローブの詳細は表に記す。

MGB (Minor Groove Binder) を probe に導入することにより、ターゲット配列へのハイブリッドを安定化させた。

評価方法として、相対的脱メチル化レベル (relative demethylation level: RDL) を算出するために、ヒト female コントロール DNA (Agilent 社) を用いて、全ゲノム増幅法により完全に脱メチル化された DNA を作成し (Whole Genomic Amplification 法)、スタンダードサンプルとした。すなわち、DNA 1 μ l (10 ng/ μ l) と sample buffer 9 μ l を混和して 95°C で 3 分間インキュベートしたのち、氷上へ静置した。Reaction buffer 9 μ l enzyme mix 1 μ l を混和したのち、氷

上の DNA 溶液へ添加して、30℃で 2 時間インキュベートした。TE buffer 70 μ l を添加し、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。DNA ペレットを TE buffer 20 μ l で懸濁し、DNA を定量して 10 ng/ μ l に希釈した。再度増幅操作から同行程を施行し、最終的に TE buffer 30 μ l で溶解し-20℃に保存した。

MethyLight 反応条件とプロトコルを下記に示す。1 μ l のバイサルファイト変換後 DNA 液を使用し、PCR は Premix Ex Taq (タカラバイオ社)、各プライマー 600 nM、プローブ 200 nM を含有する 25 μ l の最終反応容量で、QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System を用いて施行した。反応条件は、95℃ 10 秒ののち、95℃ 5 秒、60℃ 3 秒を 50 サイクルとした。

MethyLight 法に用いたプライマーと TaqMan プローブ

Target	Sequence (5' -3')	
Alu-C	Forward	GGTTAGGTATAGTGGTTTATATTTGTAATTTTAGTA
	Reverse	ATTAACATAAACTAATCTTAACTCCTAACCTCA
	Probe	FAM-CCTACCTTAACCTCCC-MGB
satellite alpha	Forward	TTGATGGAGTATTTTTAAATATATGTTTTGTAGT
	Reverse	AAATTCTAAAAATATTCCTCTTCAATTACATAAA
	Probe	FAM-TTTATCCCATTTCCAACAAA-MGB

反応溶液

Premix Ex Taq	12.5 μ l
Forward Primer 600 nM	0.15 μ l
Reverse Primer 600 nM	0.15 μ l
Probe	0.5 μ l
ROX Reference Dye	0.5 μ l
Template DNA	1 μ l
H ₂ O	10.2 μ l
合計	25 μ l

反応条件

	変性	PCR	
温度 $^{\circ}$ C	95	60	95
時間 秒	10	30	5
サイクル数	1	50	1

スタンダードサンプルを用いて検量線を作成し、検量線法を用いてそれぞれの Ct 値から対象の濃度を測定した。補正はメチル化の程度に左右されない、メチル化内在性コントロールとして、Alu-C 配列による反応をリファレンスとした。

相対的脱メチル化率（RDL）を下記のように定義した。

RDL =

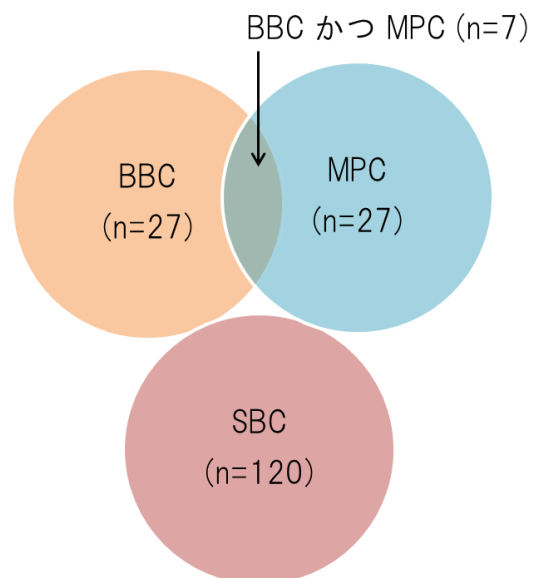
サンプル DNA: (satellite alpha の Ct 値) / (Alu-C の Ct 値)

スタンダード DNA: (satellite alpha の Ct 値) / (Alu-C の Ct 値)

統計解析

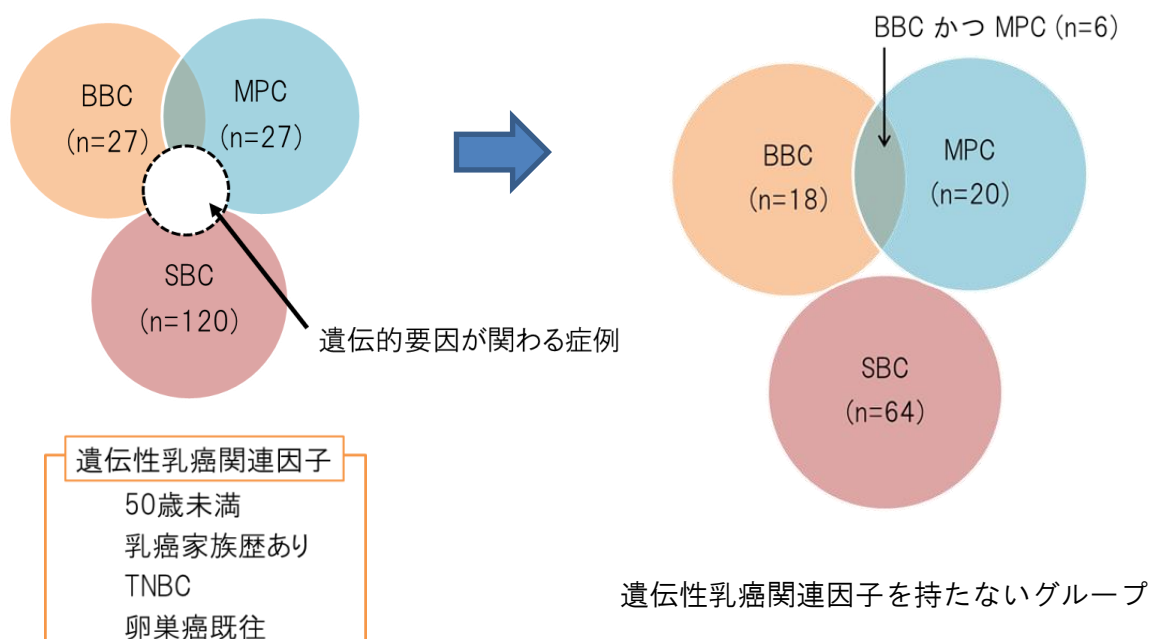
患者の臨床的背景をもとに、3 群に分けて解析を行った（単発乳癌（single breast cancer; SBC）、両側乳癌(bilateral breast cancer; BBC)、他臓器癌合併(multiple primary cancer; MPC)）。

図 1 患者のグループ分け



乳癌には、遺伝子異常、遺伝子修飾異常を考慮に入れると、*BRCA* 変異を代表とする遺伝的要因が強く関わる乳癌と、SAT が強く関係する乳癌に分けられると考えられた。本研究に参加した患者には、遺伝的要因が関わる症例が含まれていると推測される。今回の検討では、遺伝的要因ではなく、SAT の乳癌発生への関与をより明確にするために、167 人の患者から遺伝的要因が関わる症例を除いて解析を行うこととした。遺伝的要因として取り上げたのは、特に *BRCA* 変異乳癌患者に多いとされる、発症年齢 50 歳未満、乳癌家族歴を有する、TNBC、卵巣癌既往あり、の 4 つの因子である（乳癌診療ガイドライン（日本乳癌学会）、NCCN ガイドライン参考）。これらを遺伝性乳癌関連因子と規定した。

図 2 遺伝性乳癌関連因子の有無による分類



Fisher's exact test を行うに当たり、2通りの年齢カットオフ値を用いた。まず単発乳癌と両側乳癌の比較には 50 歳を用いた。これは 50 歳以下の初発乳癌患者では対側乳癌発症率が高いという報告に基づいた(11)。単発乳癌と他臓器癌合併の比較と、後半のサブグループ解析には、年齢の中央値である 63 歳を用いた。また他の因子も同様に中央値をカットオフとした。またリアルタイム PCR の結果から得られる SAT の発現レベル (relative expression level of SAT; rSAT) の解析をするために、ROC 曲線を用いて、カットオフ値を決定した。

名義変数の解析は Fisher's exact test を用い、連続変数は非正規分布であったため Mann-Whitney's U test を用いた。連続変数の解析の際には、中央値と範囲を示した。多変量解析にはロジスティック回帰分析を用いた。Fisher's exact test の際に、HER2、ER、TNBC、T、N、ly、v については、得られた標本ごとに結果をまとめているため、合計数は母集団数とは異なる。両側で P value < 0.05 となるものを統計学的に有意と定義し、単変量解析において P value < 0.1 となった因子を用いて、多変量解析を行った。すべての統計学的解析には、EZR ver2.4 (自治医大さいたま医療センター) を用いた(50)。

結果

患者の臨床病理学的特徴と satellite alpha transcripts 発現レベル

我々の研究に参加した 167 人の患者を、3 つのグループ、すなわち単発乳癌患者（SBC）120 人、両側乳癌患者（BBC）27 人（同時性両側乳癌 13 人、異時性両側乳癌 14 人）、他臓器癌合併（MPC）27 人に分類して解析した（表 I -a、図 1）（MPC の内訳：子宮頸癌 4 人、胃癌 4 人、大腸癌 3 人、膵癌（IPMN 含む）3 人、子宮体癌 2 人、卵巣癌 2 人、MDS・リンパ腫 2 人、肺癌、甲状腺癌、胆管癌、舌癌、腎癌、後腹膜肉腫各 1 人）。Satellite alpha transcripts（SAT）の発現レベルはリアルタイム PCR で測定し、癌部、非癌部の relative expression level of SAT（rSAT）を算出した。連続変数で解析した結果、癌部 rSAT では、単発乳癌に対して、両側乳癌で有意に高値（SBC : 1.20 (−0.0139–3.44) vs. BBC: 1.89 (0.201–3.28), $P=0.0149$)（図 3-a, b）、他臓器癌合併で有意に高値(1.20 (−0.0139–3.44) in SBC vs. 1.79 (0.690–2.60) in MPC, $P=0.00665$)であった（図 3-c, d）。

図 3-a, b 単発乳癌（SBC）と両側乳癌（BBC）の癌部(a)、非癌部(b)rSAT の比較

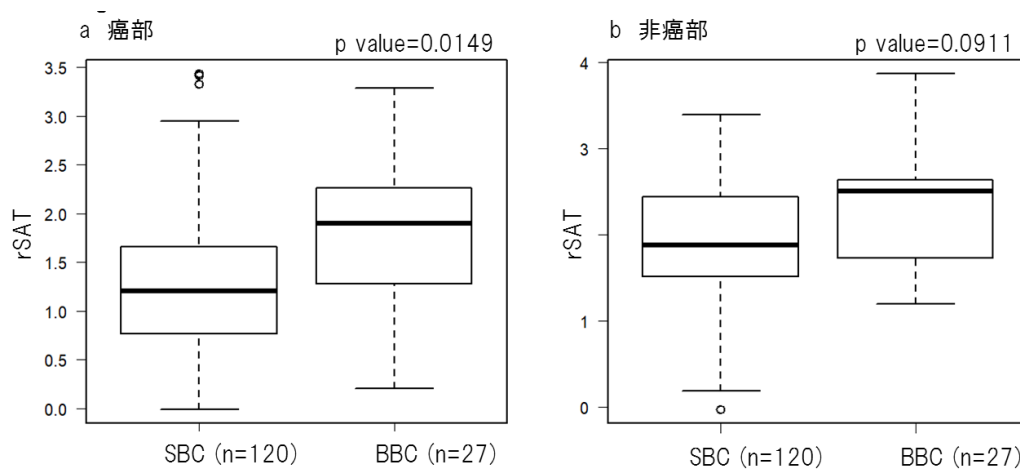
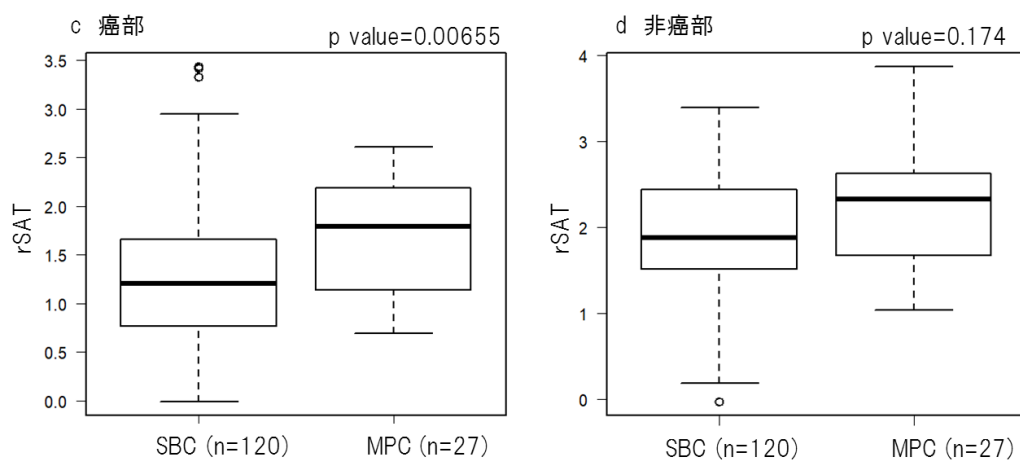


図 3-c, d 単発乳癌（SBC）と他臓器癌合併例（MPC）の癌部(c)、非癌部(d)rSAT の比較



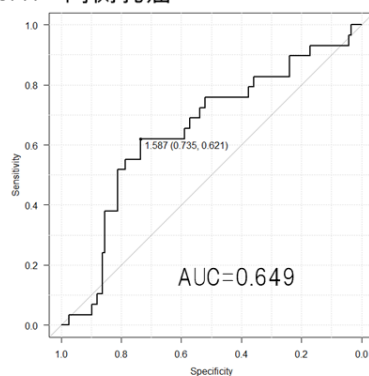
カットオフ値の設定のために、ROC (receiver operating characteristic) 解析を行った (図 4)。BBC の癌部 r SAT のカットオフ値は 1.58 (AUC 0.649, 95% CI 0.534-0.764, sensitivity 0.735, specificity 0.621)、MPC の癌部 rSAT のカットオフ値は 1.54 (AUC 0.679, 95% CI 0.578-0.780, sensitivity 0.709,

specificity 0.615) となったため、癌部 rSAT のカットオフ値は 1.5 と設定した。

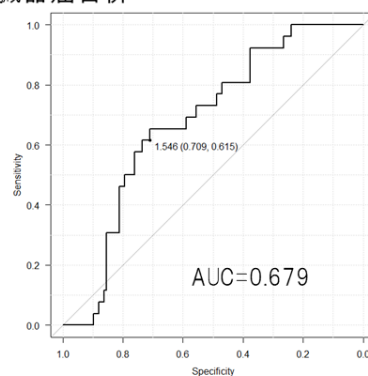
同様にして BBC の非癌部 rSAT のカットオフ値は 2.47 (AUC 0.615, 95% CI 0.481–0.750, sensitivity 0.770, specificity 0.542)、MPC の非癌部 rSAT のカットオフ値は 2.32 (AUC 0.559, 95% CI 0.406–0.713, sensitivity 0.689, specificity 0.421) となったため、癌部 rSAT のカットオフ値は 2.4 と設定した。

図 4 rSAT ROC 解析によるカットオフ値の決定

癌部rSAT 両側乳癌

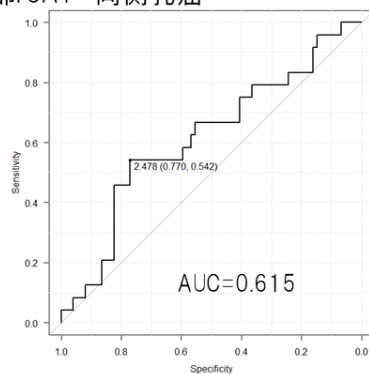


他臓器癌合併

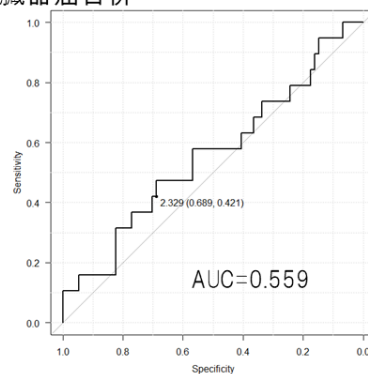


癌部rSAT
カットオフ値: 1.5

非癌部rSAT 両側乳癌



他臓器癌合併



非癌部rSAT
カットオフ値: 2.4

BBC、MPC の臨床病理学的特徴

両側乳癌と他臓器癌合併の症例の特徴を検討するため、単変量解析を行った（表 I -a）。まず単発乳癌（SBC）と両側乳癌（BBC）の比較を行ったところ、単変量解析では、両側乳癌で有意に T 低値（ $P=0.0427$ ）、癌部 rSAT 高値（ $P=0.0101$ ）、非癌部 rSAT 高値（ $P=0.0240$ ）であった。次に単発乳癌（SBC）と他臓器癌合併（MPC）の比較を行ったところ、単変量解析では他臓器癌合併で有意に T 低値（ $P=0.00110$ ）、癌部 rSAT 高値（ $P=0.00714$ ）であった（表 I -a）。

単発乳癌（SBC）と両側乳癌（BBC）の比較において、単変量解析で $P < 0.1$ となった年齢、T（腫瘍の大きさ）、癌部 rSAT、非癌部 rSAT を用いて多変量解析を行ったところ、非癌部 rSAT 高値が統計学的に有意な両側乳癌のリスク因子であると判明した（表 I -b）。

表 I -a 単発乳癌（SBC）、両側乳癌（BBC）、他臓器癌合併（MPC）の

臨床病理学的特徴

variables		SBC (n=120)	BBC (n=27)	<i>P</i> value	MPC (n=27)	<i>P</i> value
age	<50 / ≥50	33 / 87	3 / 24	0.0861		
age	<63 / ≥63	61 / 59			11 / 16	0.398
BMI	≥25 / <25	37 / 83	9 / 18	0.821	6 / 21	0.485
家族歴	なし / あり	104 / 16	23 / 4	0.764	25 / 2	0.528
HER2	陰性 / 陽性	69 / 37	16 / 9	1.00	10 / 10	0.216
ER	陰性 / 陽性	29 / 77	5 / 20	0.613	6 / 14	0.791
TNBC	no / yes	88 / 18	21 / 4	1.00	18 / 2	0.738
T	0, 1 / ≥2	74 / 53	25 / 7	0.0427	23 / 2	0.00110
N	0 / 1, 2	87 / 39	25 / 9	0.678	21 / 5	0.342
M	0 / 1	113 / 6	25 / 2	0.641	27 / 0	0.593
ly	0 / ≥1	35 / 59	8 / 11	0.797	9 / 8	0.283
v	0 / ≥1	50 / 44	11 / 8	0.803	10 / 7	0.793
癌部 rSAT	≤1.5 / >1.5	77 / 40	11 / 18	0.0101	9 / 16	0.00714
非癌部 rSAT	≤2.4 / >2.4	54 / 20	11 / 13	0.0240	12 / 7	0.408

表 I-b 両側乳癌（BBC）のリスク因子 多変量解析結果

variables		Multivariate analysis			Stepwise multivariate analysis		
		OR	95% CI	<i>P</i> value	OR	95% CI	<i>P</i> value
age	<50 vs ≥50	0.319	0.0836	1.21	excluded		
T	0, 1 vs 2, 3, 4	2.48	0.762-8.09	0.131	excluded		
癌部 rSAT	>1.5 vs ≤1.5	2.42	0.751-7.79	0.139	excluded		
非癌部 rSAT	>2.4 vs ≤2.4	4.51	1.35-15.1	0.0143	3.70	1.27-10.8	0.0164

単発乳癌（SBC）と他臓器癌合併（MPC）の比較において、単変量解析で $p < 0.1$ となった T（腫瘍の大きさ）と癌部 rSAT で多変量解析を行ったところ、両方の因子が統計学的に有意な他臓器癌合併のリスク因子であると判明した（表 I-c）。

表 I-c 他臓器癌（MPC）のリスク因子 多変量解析結果

variables		Multivariate analysis			Stepwise multivariate analysis		
		OR	95% CI	<i>P</i> value	OR	95% CI	<i>P</i> value
T	0, 1 vs 2, 3, 4	7.65	1.70-34.5	0.00812	7.65	1.70-34.5	0.00812
癌部 rSAT	>1.5 vs ≤1.5	2.76	1.06-7.16	0.0368	2.76	1.06-7.16	0.0368

次に、前述したように遺伝性乳癌関連因子の有無で患者を 2 群に分けた（図 2、表 II）。関連因子あり群では有意に若年、HER2 陰性、ER 陰性が多かった。

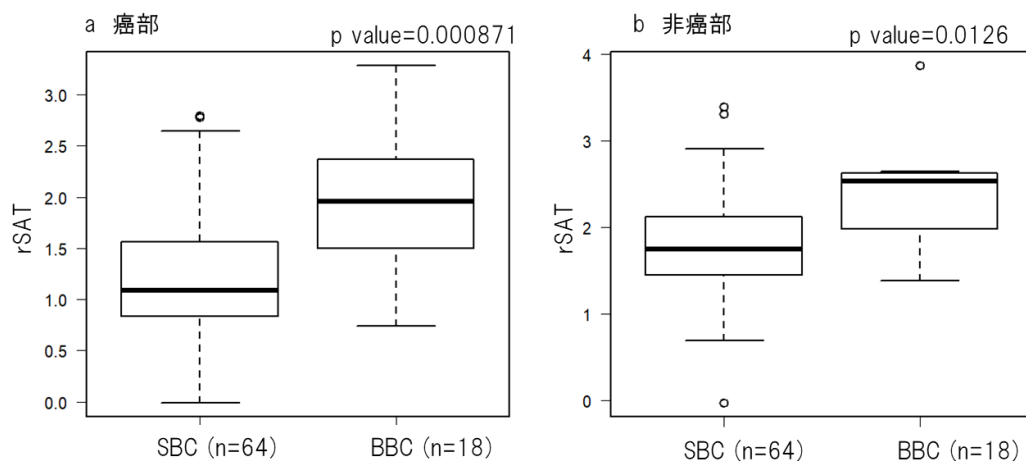
表 II 遺伝性乳癌関連因子の有無によるグループ分け

		関連因子なし (n=96)	関連因子あり(n=71)	P value
age	中央値	66	49	<0.001
BMI	中央値	23	22	0.283
観察期間	中央値(月)	25.5	23.5	0.282
両側乳癌	なし / あり	78 / 18	62 / 9	0.396
HER2	陰性 / 陽性	46 / 37	47 / 16	0.0236
ER	陰性 / 陽性	10 / 73	28 / 35	<0.001
他臓器癌	なし / あり	76 / 20	65 / 6	0.0320
T	0 / 1 / 2 / 3 / 4	19 / 49 / 23 / 6 / 4	14 / 33 / 23 / 1 / 5	0.407
N	0 / 1 / 2	76 / 24 / 2 / 1	52 / 24 / 0 / 0	0.375
M	0 / 1	92 / 4	67 / 4	0.725
ly	0 / 1 / 2 / 3	28 / 40 / 1 / 3	21 / 30 / 1 / 1	0.947
v	0 / 1 / 2	39 / 32 / 1	28 / 24 / 1	1
再発	なし / あり	84 / 6	62 / 5	1

今回は遺伝性乳癌関連因子を持たない群（表Ⅱ左）に注目し、SBC(n=64)、BBC(n=18)、MPC(n=20)の3群に分けて統計学的解析を行った（図2，表Ⅲ-a）。

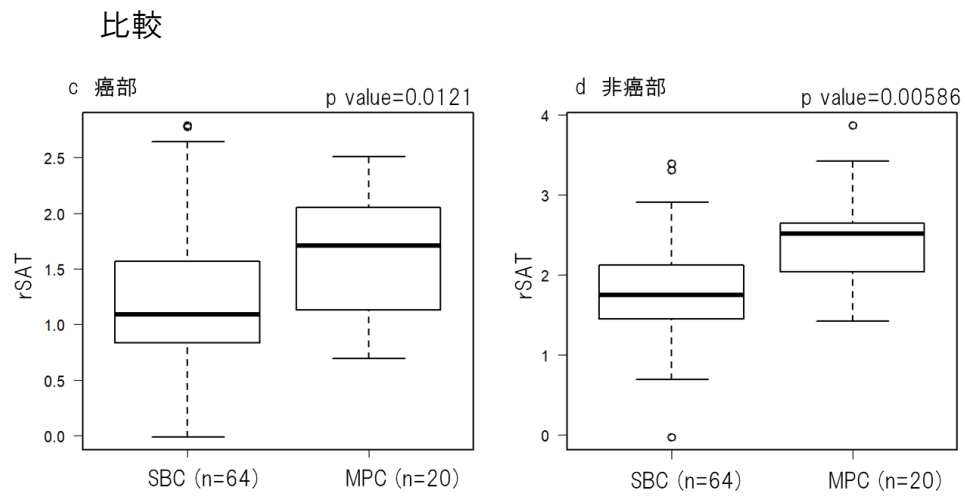
まず単発乳癌（SBC）と両側乳癌（BBC）の比較においては、両側乳癌で、癌部 rSAT（SBC:1.08（-0.0139-2.79）vs. BBC:1.95（0.736-3.28）， $P=0.000871$ ）、非癌部 rSAT（SBC:1.74（-0.0331-3.38）vs. BBC: 2.53（1.38-3.87）， $P=0.0126$ ）ともに有意に高値であった。（図5-a, b）

図5-a, b 単発乳癌（SBC）と両側乳癌（BBC）の癌部(a)、非癌部(b) rSAT の比較



他臓器癌との比較においても同様に、癌部 rSAT（SBC:1.08（-0.0139-2.79）vs. MPC:1.71（0.693-2.50）， $P=0.0121$ ）、非癌部 rSAT（SBC:1.74（-0.0331-3.38）vs. MPC:2.51（1.41-3.87）， $P=0.00586$ ）ともに他臓器癌合併例において有意に高値であった（図5-c, d）。

図 5-c, d 単発乳癌（SBC）と他臓器癌合併（MPC）の癌部(c)、非癌部(d)rSAT の



カットオフ値は前述と同様に癌部 rSAT を 1.5、非癌部 rSAT を 2.4 として、他の因子とともに単変量解析を行った（表Ⅲ-a）。

表Ⅲ-a 遺伝性乳癌関連因子を持たない群における単発乳癌（SBC）、両側乳癌

（BBC）、他臓器癌合併（MPC）の臨床病理学的特徴

variables		SBC (n=64)	BBC (n=18)	<i>P</i> value	MPC (n=20)	<i>P</i> value
age	<63 / ≥63	22 / 41	11 / 7	0.0593	9 / 14	0.801
BMI	≥25 / <25	26 / 38	9 / 8	0.783	7 / 13	0.795
HER2	陰性 / 陽性	31 / 25	9 / 7	1.00	7 / 8	0.574
ER	陰性 / 陽性	8 / 48	1 / 15	0.673	2 / 13	1.00
T	0, 1 / ≥2	38 / 28	17 / 4	0.0699	19 / 1	0.00223
N	0 / 1, 2	44 / 21	19 / 4	0.281	4 / 19	0.284
M	0 / 1	61 / 2	17 / 1	0.535	19 / 1	0.547
ly	0 / ≥1	18 / 35	5 / 5	0.438	7 / 6	0.214
v	0 / ≥1	28 / 25	6 / 4	0.783	8 / 5	0.758
癌部 rSAT	≤1.5 / >1.5	43 / 17	5 / 14	0.000856	7 / 12	0.0124
非癌 rSAT	≤2.4 / >2.4	30 / 4	6 / 9	0.000955	8 / 7	0.0215

単発乳癌（SBC）と両側乳癌（BBC）の比較では、単変量解析において有意に、両側乳癌で癌部 rSAT 高値 ($P=0.000856$)、非癌部 rSAT 高値 ($P=0.0000955$) であった。単発乳癌（SBC）と他臓器癌合併（MPC）の比較では、他臓器癌合併で有意に T 低値 ($P=0.00223$)、癌部 rSAT 高値 ($P=0.0124$)、非癌部 rSAT 高値 ($P=0.0215$) であった（表Ⅲ-a）。

単発乳癌（SBC）と両側乳癌（BBC）の比較において、単変量解析で $P < 0.1$ となった年齢、T（腫瘍の大きさ）、癌部 rSAT、非癌部 rSAT を用いて多変量解析を行ったところ、非癌部 rSAT 高値が、統計学的に有意な、高オッズ比の両側乳癌のリスク因子であると判明した (OR: 22.7, 95% CI: 3.43-151, $P=0.00120$)（表Ⅲ-b）。

表Ⅲ-b 多変量解析による両側乳癌のリスク因子の同定

（遺伝性乳癌関連因子を持たない群）

variables	Multivariate analysis			Stepwise multivariate analysis		
	OR	95% CI	<i>P</i> value	OR	95% CI	<i>P</i> value
age <63 vs ≥63	0.394	0.0414-3.74	0.417	excluded		
T 0, 1 vs 2, 3, 4	2.81	0.368-21.4	0.320	excluded		
癌部 rSAT >1.5 vs ≤1.5	8.82	0.721-108	0.0885	excluded		
非癌部 rSAT >2.4 vs ≤2.4	10.7	1.22-92.7	0.0321	22.7	3.43-151	0.00120

同様に、単発乳癌（SBC）と他臓器癌合併（MPC）の比較において、単変量解析で $P < 0.1$ となった T（腫瘍の大きさ）、癌部 rSAT、非癌部 rSAT を用いて多変量解析を行ったところ、非癌部 rSAT 高値が、統計学的に有意な高オッズ比の他臓器癌合併のリスク因子であると判明した（OR: 13.0, 95% CI: 2.09-81.0, $P = 0.00601$ ）（表Ⅲ-c）。

表Ⅲ-c 多変量解析による他臓器癌合併のリスク因子の同定

（遺伝性乳癌関連因子を持たない群）

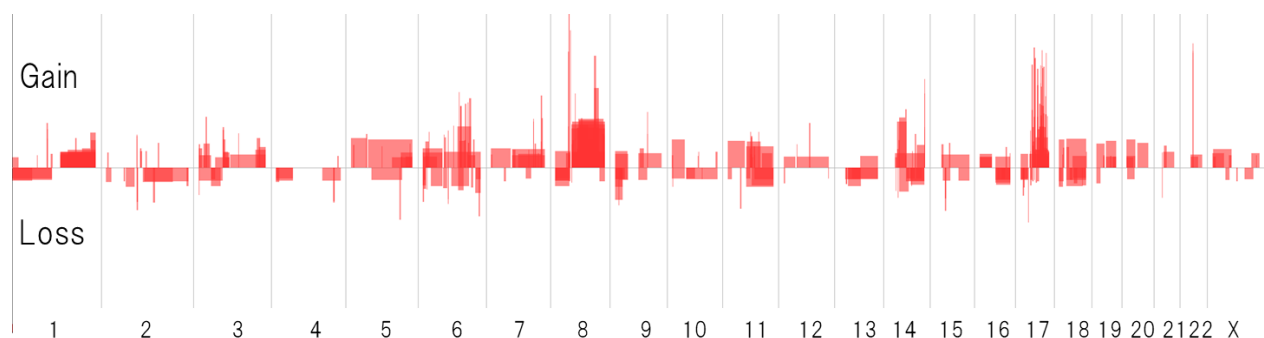
variables	Multivariate analysis			Stepwise multivariate analysis		
	OR	95% CI	<i>P</i> value	OR	95% CI	<i>P</i> value
T 0, 1 vs 2, 3, 4	–	0.00–inf	0.994	excluded		
癌部 rSAT >1.5 vs ≤1.5	1.20	0.164–8.80	0.858	excluded		
非癌部 rSAT >2.4 vs ≤2.4	10.0	0.777–129	0.0774	13.0	2.09–81.0	0.00601

array CGH による DNA コピー数変化の解析

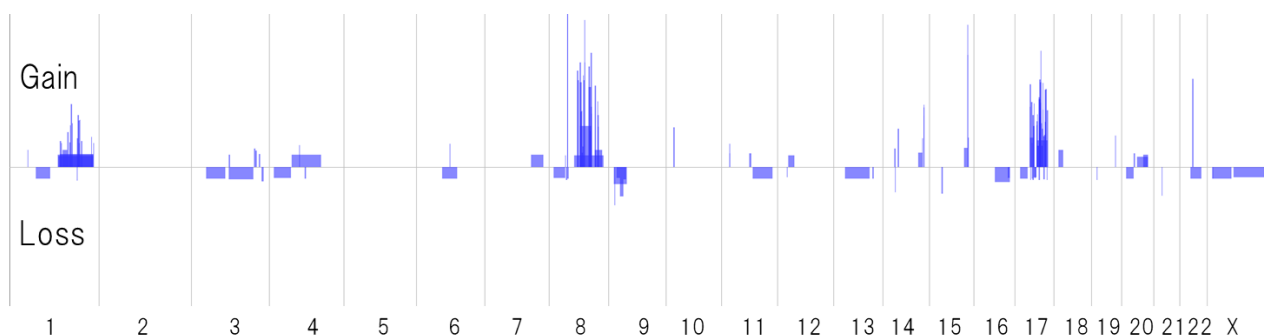
BRCA 変異などの遺伝子変異が強く関わる乳癌と、SAT が強く関係する乳癌において、DNA コピー数の変化に違いが生じるかどうかの検討を、array CGH (aCGH) の解析を用いて行った。解析ソフト CytoGenomics により指摘された外れ値 3 例を除去し、最終的な解析に用いたのは両側乳癌 (BBC) の症例の癌部組織 計 21 検体で、遺伝性乳癌関連因子ありが 8 例 (38.1%)、なしが 13 例 (61.9%) であった。年齢中央値は 63 歳 (range: 39-84)、rSAT 中央値は 1.83 (range: 0.200-3.28) であった。次に各染色体におけるコピー数変化を表すグラフを示す (図 6a, b)。横軸は各染色体番号順で、左方に短腕、右方に長腕の変異を示す。縦軸は上方にコピー数増幅 (Gain)、下方にコピー数欠失 (Loss) を示す。増幅や欠失は解析ソフトで $\log \text{ratio}$ として計算され、 $\log \text{ratio} > 0$ を Gain、 $\log \text{ratio} < 0$ を Loss とした。また Gain、Loss を合わせたものを Copy Number Variation (CNV) として算出した。

図 6-a aCGH による解析結果

a 遺伝性乳癌関連因子なし (n = 13)

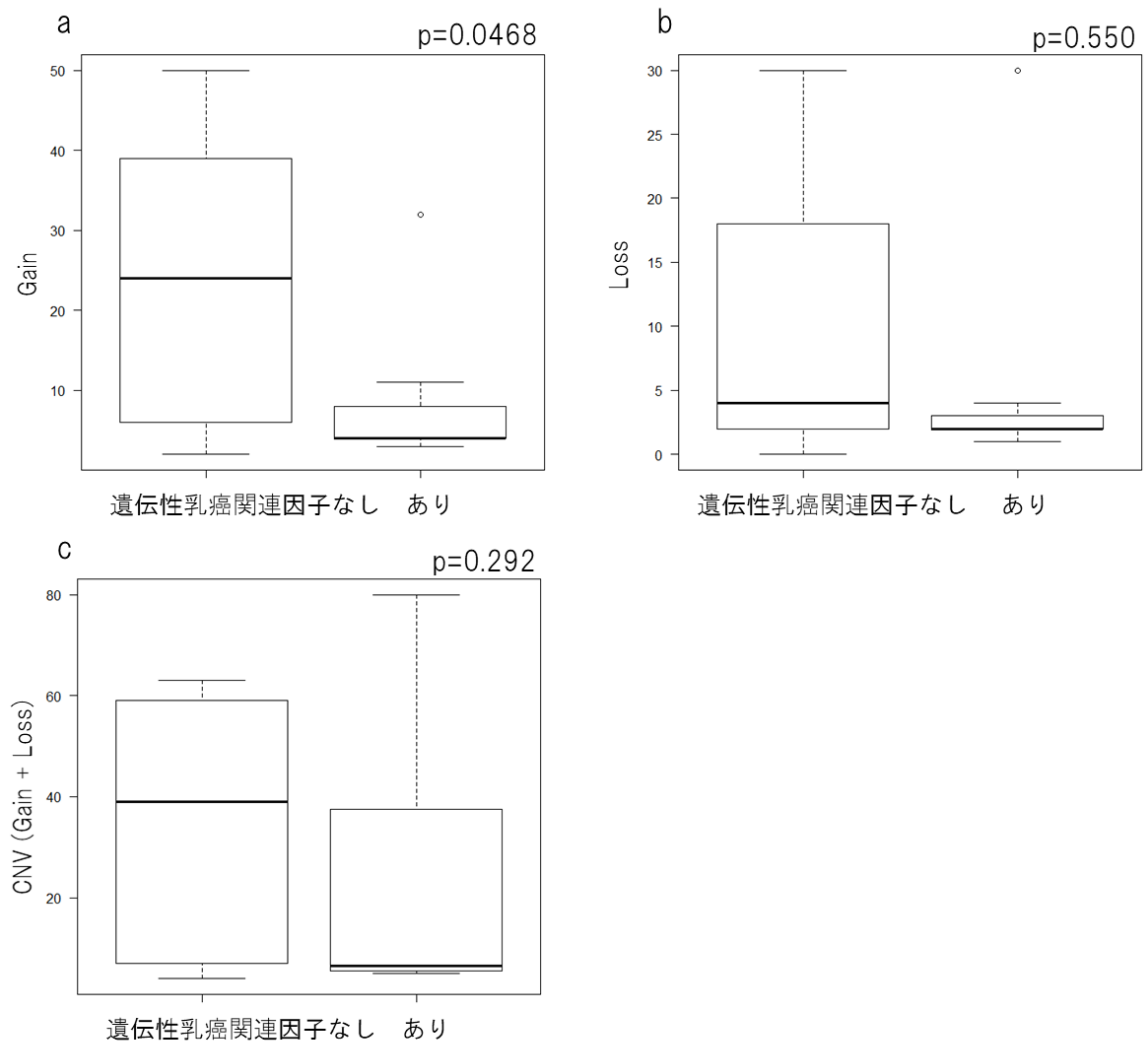


b 遺伝性乳癌関連因子あり (n = 8)



遺伝性乳癌関連因子の有無による比較では、因子なし群（図 6-a）では、因子あり群（図 6-b）に比較して、様々な染色体でのコピー数変化が多く認められた。次に、このコピー数変化を数値化して比較したところ、因子なし群で Gain が有意に多く（図 7-a; 因子なし: 24 (2-50) vs 因子あり: 4 (3-32); $P=0.0468$ ）、Loss（図 7-b; 因子なし: 4 (0-30) vs 因子あり: 2 (1-30); $P=0.550$ ）と CNV（図 7-c; 因子なし: 39 (4-63) vs 因子あり: 6.5 (5-80); $P=0.292$ ）についても多い傾向が認められた。

図 7-a, b, c 遺伝性乳癌関連因子有無による Gain(a)、Loss(b)、CNV(c) の比較



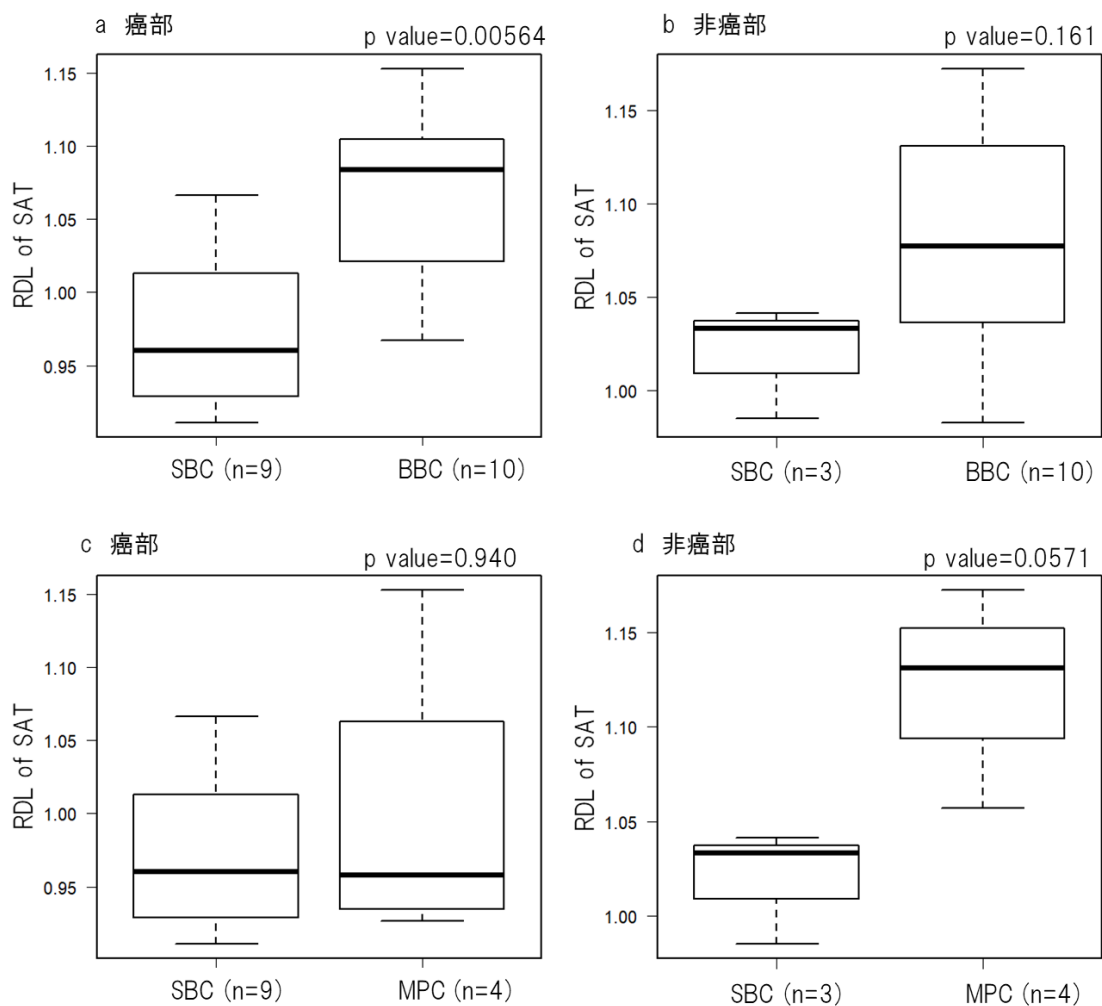
MethyLight 法による低メチル化レベルの検討

両側乳癌、他臓器癌合併例と、単発乳癌症例との間に、低メチル化レベルに違いがあるかを検討するために、MethyLight 法を用いて SAT の relative hypomethylation level (RDL)を算出した。以前の報告において、SAT の低メチル化レベルと SAT 発現レベル(rSAT)の相関が判明しており(45)、ここから染色体不安定性を推測することができる。RDL が高値の場合、低メチル化が進行していることを示す。本研究に参加した患者の乳腺組織のうち、十分な DNA 抽出が可能であった、癌部 21 例と非癌部 13 例をこの検討に用いた。

単発乳癌 (SBC) と他臓器癌合併 (MPC) の癌部における比較では、有意差はみられなかったが (図 8-c; SBC: 0.960 (0.910-1.06) vs. MPC: 0.957 (0.926-1.15), $P=0.940$)、両側乳癌 (BBC) の癌部 RDL は単発乳癌 (SBC) と比較して有意に高値であった (図 8-a; SBC: 0.960 (0.910-1.06) vs. BBC: 1.08 (0.967-1.15), $P=0.00564$)。また非癌部 RDL は両側乳癌、他臓器癌合併ともに単発乳癌よりも高値である傾向がみられた (図 8-b; SBC: 1.03 (0.980-1.04) vs. BBC: 1.07 (0.982-1.17), $P=0.160$, 図 8-d; SBC: 1.03 (0.980-1.04) vs. MPC: 1.13 (1.05-1.17), $P=0.0571$)。

図 8 単発乳癌（SBC）と両側乳癌（BBC）の癌部(a)、非癌部(b)

単発乳癌（SBC）と他臓器癌合併（MPC）の癌部(c)、非癌部(d)RDL の比較



考察

今回の検討において、乳癌患者 167 人の全体の解析では非癌部 rSAT が両側乳癌の、癌部 rSAT が他臓器癌合併のリスク因子となることを示したが、他臓器癌合併においては、非癌部 rSAT の意義は示せなかった。ここには、患者の選択バイアスが介入している可能性があり、今回 SAT が癌に関わる意義を明確にするために、乳癌の発症に深く関わっているとされる *BRCA* 変異を代表とするような遺伝性乳癌の特徴を持った患者を除外して検討することとした。その結果、非癌部における SAT 高発現症例が、低発現症例に比較して 22 倍の両側乳癌のリスクを持ち、さらに 11 倍の他臓器癌合併のリスクを持つという結果を導き出すことができた。このような非癌部組織の変化は field cancerization に深く関わっていると予測され、非癌部 rSAT のリスク因子としての意義が明確に示された。一方で、このことは、単に非癌部 SAT 発現の重要性を述べただけではない。今まで両側乳癌のリスクは低いとされていた遺伝性乳癌関連因子を持たない集団の中にも、両側乳癌や他臓器癌合併のリスクが高い患者がいることを指摘したという重要な意義がある。また、aCGH による解析から、遺伝性乳癌関連因子を持たない、すなわち SAT が強く関わる乳癌においては、様々な染色体にわたって、より多くのコピー数変化が生じていることが明らかになった。これは SAT が染色体不安定性を通して癌化に関与することの裏付けになると考えられる。

両側乳癌のリスク因子としてよく知られているのは、若年、乳癌家族歴、TNBC

であり、これらは *BRCA* 変異による遺伝性乳癌と関連があるとされている(6-11)。

しかしながら、*BRCA* 変異を持たない乳癌患者もあり、家族歴があれば対側乳癌発症の10年累積罹患リスクは、変異を有する患者と同等であるという報告もある(11)。また *BRCA* 変異は両側乳癌患者の16%にしか認められないという報告もあり、*BRCA* 変異検索のみでは両側乳癌の予測には不十分であるといえる(12)。

癌部以外の、癌組織周辺の正常組織でもエピジェネティックな変化は認められており、これが field cancerization を形成すると考えられている。この変化は、ヒトの様々な癌種において、遺伝子変異を伴わない癌化に関与していると判明しており(51-54)、染色体不安定性に関与していると考えられる。我々の研究室では、DNAの低メチル化、さらにそのターゲットとなる LINE-1 や SAT を研究対象としてきた。そして胃の正常粘膜における SAT の低メチル化が胃癌の多発発症のリスク因子であることを証明し、また LINE-1 の低メチル化を多発大腸癌患者の正常粘膜で証明してきた(35, 43)。これらの結果は、Satellite DNA が field cancerization の形成に重要な役割を持ち、その結果として多発癌が発症していることを示している。我々は今までに、SAT の発現が SAT の低メチル化と相関することを示しており(45)、SAT の発現が、低メチル化を通して多発癌の発症に関与していると推測される。さらにはヒト正常乳腺細胞株に SAT 配列を遺伝子導入し、SAT を高発現させたところ、染色体分離不全が生じたことを報

告した(45)。今までの結果を総合すると、DNA の低メチル化が SAT の高発現を誘導し、染色体不安定性へとつながり、その結果 field cancerization、癌の多発発症として表出していると結論付けられる。

最近数年の間に、対側乳癌の予防的切除希望する患者が増加している(55)。

しかしながら、予防的両側乳房切除術は予後を改善しないと報告されている(56-60)。予防的両側乳房切除は *BRCA* 変異を有する患者では、90%で将来の乳癌リスクを軽減するとされており(61)、NCCN ガイドラインでは予防的両側乳房切除術は *BRCA* 変異陽性例や強い家族歴を有する症例に限定する検討がなされるべきとしている(62)。しかし現状では、予防的両側乳房切除術は *BRCA* 変異陰性の患者の多くに施行されている(18, 63)。ここには、両側乳癌発症のリスク因子が未だ不明瞭であるという背景がある。今回の結果では、*BRCA* 関連因子を持たなくとも、非癌部 SAT 発現(rSAT)が 2.4 を超えた症例では両側乳癌の発症が 22 倍となることを示した。このデータは、患者に治療法の選択における重要な情報を提供していると考ええる。

他臓器癌合併については、剖検による検体を用いて、乳癌に合併する他臓器癌についての解析が行われており、乳癌に合併する癌として、卵巣癌(OR [95 % (CI)]=1.464 [1.03, 2.08])、膀胱癌(1.414 [1.08, 1.85])、皮膚癌(2.092 [1.28, 3.41])が高リスクとして、また大腸癌(0.732 [0.60, 0.90])や子宮頸癌(0.605

[0.38, 0.96]) は低リスクとして挙げられている。一方、今回の我々の検討では、8 例の婦人科領域癌（他臓器癌症例中 29.6%）、10 例の消化器癌（同 37%）が指摘されている。また当研究室は以前に、大腸癌患者の 7.58%に乳癌が合併していたと報告している(64)。この結果から、乳癌に合併する他臓器癌としては婦人科癌や消化器癌が多いことが分かり、特に非癌部 SAT 高値の症例では、この領域の検索を十分に行うべきであるといえる。

今回の研究では非癌部組織の重要性を示したが、非癌部の SAT 発現程度は術前には検索できないという限界がある。なぜならば、非癌部組織の正確な採取は術前の針生検では困難であるからであり、よって非癌部 SAT の発現程度は術後に確認することしかできない。この問題は、今回のような検討を、患者血漿を用いて術前に行うことで解決できる可能性がある。大腸癌患者と非癌患者の血漿を用いて Satellite DNA を測定したところ、両群間で有意差があったという報告がある(65)。同様にして、乳癌においても血漿中の SAT を測定し、両側癌・多発癌患者では、単発癌患者より高値であるという結果が導かれる可能性がある。この血漿中の SAT によって、両側癌、他臓器癌合併のリスクを術前に判明させることができれば、術式決定やサーベイランス方法の決定などの治療方針に大きく寄与し、乳癌治療に大きく貢献できる。

第2部

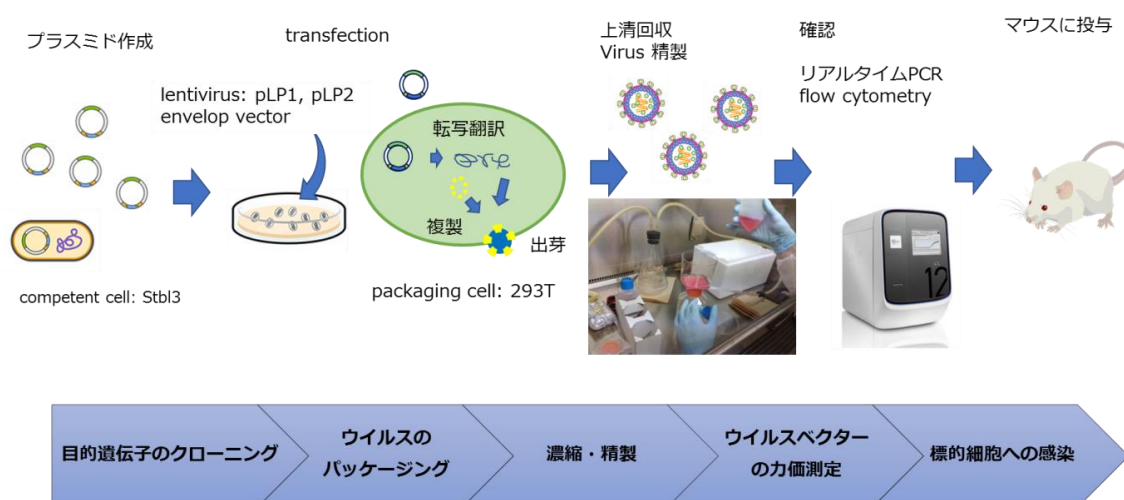
方法

SAT 配列導入レンチウイルスベクターの作製

今まで様々な癌種の臨床検体を用いた実験を通して、SAT が他臓器癌や多発癌で上昇していることを示し、SAT 導入細胞株を用いた実験から、SAT が染色体不安定性にかかわっていることを示してきた(35, 43, 45)。しかし実際に SAT が癌化にどのように作用しているかは未知の部分であり、これを解明するためにマウスを用いた実験系を計画した。

マウスの Satellite DNA は major Satellite と minor Satellite であり、major Satellite はペリセントロメアに存在し、マウスの様々な癌種で発現が上昇していることが確認されている(42)。この Major Satellite 配列を強発現するレンチウイルスベクターを乳腺に投与するマウスモデルを作製した(図9)。

図9 レンチウイルスベクター作製の流れ



過去の文献において使用された(41)、major Satellite と enhanced green fluorescent protein (EGFP) を発現するプラスミドベクター (P156RRL-EF1a-GFPU3H1MajSat) を Addgene 社から購入した。このプラスミドには EGFP 配列が挿入されているが、マウス投与後の確認時にはルシフェラーゼの発現が必要であったため、EGFP をルシフェラーゼ配列に置換したプラスミドも作製した。また対象として major Satellite 配列を除外したプラスミドも作製した (計 4 種類; pHIV-major Satellite + EGFP, pHIV-major Satellite - EGFP, pHIV-major Satellite + Luciferase, pHIV-major Satellite - Luciferase) (図 10)。

図 10 プラスミド

pHIV major Satellite+ EGFP



pHIV major Satellite- EGFP



pHIV major Satellite+ Luciferase



pHIV major Satellite- Luciferase



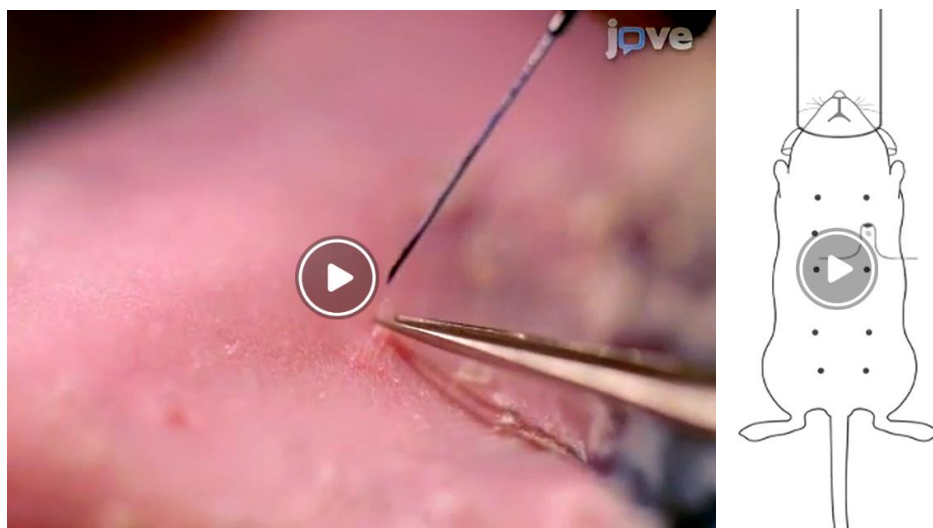
HEK293T 細胞に上記のプラスミドとパッケージング用の 3 種のプラスミド (PLP1、PLP2、PVSV-G) をトランスフェクションし、レンチウイルスベクターを作製した。トランスフェクション翌日から 48 時間後の上清を 0.45 μm フィルターで濾過後に濃縮し、-80℃で保存した。ウイルスベクターのタイターは UT7/TP0 にトランスフェクションし、EGFP 発現をフローサイトメトリー (BD LSRFortessa™, BD Biosciences) で測定した。major Satellite を含むウイルスベクターのタイターは低い傾向があり、major Satellite を含むウイルスベクターの投与量は 3 倍とした。

乳癌マウスモデルの作製

マウスの乳腺は左右 5 対の計 10 か所ある。乳管内投与は、右側のみ 5 か所とし、33G 針とハミルトンシリンジを用いて、顕微鏡視下に投与した。投与方法は (66) を参考にした。

図 11 マウス乳腺と投与方法

参考：J. Vis. Exp. (80), e50692, doi:10.3791/50692 (2013).

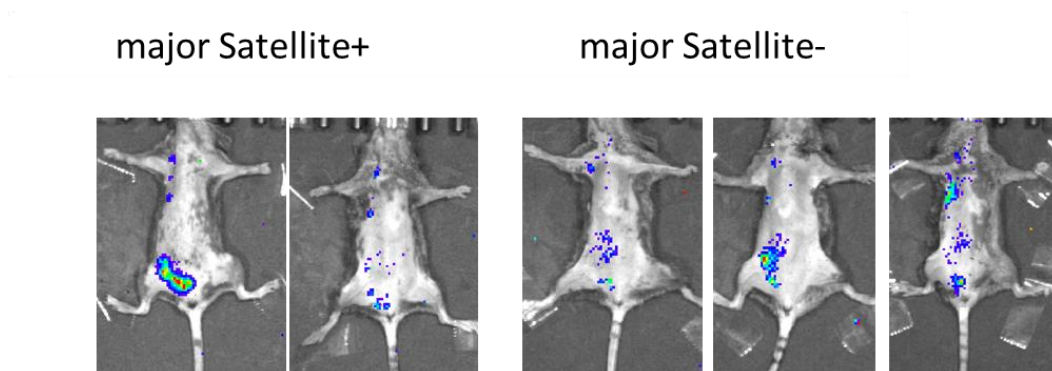


マウスは乳癌自然発症型モデルである C3H/HeNjc1 (41 週で 84%に乳癌を発症する)を用いた。乳管内投与の手技的な困難さを考慮して、10 週齢のマウスを用いた。飼育開始後 4 日目に、経口胃管を用いて DMBA (7, 12-dimethylbenz(a)anthracene) 2 mgを食用油 500 μ l に溶解して投与した。DMBA は発癌物質として様々な動物実験で使用されている、化学発癌誘発物質である(67, 68)。その 7 日後(生後 11 週)にマウスの乳管内にイソフルラン持続投与の全身麻酔下で、レンチウイルスベクターを投与した。投与の 24 時間後にルシフェリン 100 μ l (30 mg/ ml)と蒸留水 100 μ l を混和させて腹腔内に投与し、IVIS Imaging System (Perkin Elmer) (撮影時間 3 分)で撮影して遺伝子が導入されていることを確認した。レンチウイルスベクター投与後のマウスの飼育は P2 実験室で行った。

結果

数匹が DMBA 投与直後、または翌日に死亡したが、他のマウスはその後も生存した。ウイルス投与 24 時間後に IVIS で確認した（図 12）。

図 12 右側乳腺へのレンチウイルスベクター投与 24 時間後の IVIS 結果



pHIV major Satellite+ 投与群 10 匹、pHIV major Satellite- 投与群 11 匹を観察しているが、投与後 18 週と 19 週経過したところで、どちらの群にも肉眼、触診上で観察した結果、乳癌は発症していない。6 週でサクリファイスしたマウスの組織の HE 染色プレパラートにおいても、明らかな癌の所見はなかった。今後も観察を継続する予定である。

図 13 レンチウイルスベクター投与後 10 週を経過したマウス



考察

major Satellite 配列を導入したレンチウイルスベクターをマウス乳管に投与することで、乳腺に major Satellite を強制発現させるモデルマウスを作製した。SAT 配列を導入したレンチウイルスベクターをヒト正常乳腺細胞に感染させた実験においては、有糸分裂異常は認められたものの、癌化までは確認できなかった(45)。このため、major Satellite の導入だけでは、マウスに乳癌の発生は期待できないと考え、乳癌自然発生型マウスを選択し、さらに発癌物質である DMBA を投与して、実験系を計画した。このマウスに major Satellite を追加することで、より早期の乳癌発症や、癌個数の増加が予測された。乳癌が誘導されたのちには、その癌の発生時期、個数、大きさの差異や、組織系、脈管侵襲などを検討し、さらに遺伝子の増幅・欠失を検定する array CGH を用いて、Satellite DNA がターゲットとする遺伝子の同定を行う予定であった。しかし、乳癌の発症には至らなかった。今回の実験系において、予測通りの短期間での乳癌発症に至らなかった原因としては、作製したウイルスベクターの感染効率や、投与方法の困難さの問題が関与している可能性がある。major Satellite 配列が導入されたウイルスベクターが、導入されていないウイルスベクターに比較して感染効率が低いという問題は、この配列自体がパッケージング細胞や感染細胞のゲノムに作用して、アポトーシスを誘導するなどの理由が考えられる。

SAT を導入したプラスミドをヒト正常乳腺細胞株に感染させた実験では、SAT の有無によらず同様に細胞が生育していたことから(45)、今後は SAT と major Satellite をそれぞれトランスフェクションした細胞を培養して、生育状況に違いがあるのかを検討し、利用しやすい細胞を使った実験系の再構築が必要であると考えている。次に乳管内投与の困難性については、技術の修練に加えて、より高齢マウスに投与する（マウスの大きさによって、乳管投与の困難さが左右される）ことや、投与経路の変更などの検討が必要である。一方で、2018 年に報告された類似の実験の文献では、癌の発生までに 5 から 7 か月を要しており(69)、そもそも短期間での乳癌発症は難しく、長期間にわたる実験系の構築が必要であることも考慮に入れなければならない。

今回マウスを用いた実験系を作製し、Satellite DNA がどのように発癌に関わるのか、観察を試みた。予測通りには進行しなかったが、今後は乳癌に限らず、本実験系を改良し、Satellite DNA が癌の発生にどのようにかかわっているのか観察を継続する。この実験系が、ヒトにおけるエピジェネティックな変化に伴う発癌や癌の進行経路の解明につながるものと期待される。

おわりに

われわれは今回、*BRCA* 関連因子を持たない乳癌患者において、非癌部 SAT の高発現が、両側乳癌や他臓器癌合併のリスク因子となることを証明した。

従来、この患者群は両側乳癌の高リスク群とは考えられていなかったが、非癌部における SAT 発現の測定が、新たな高リスク群の同定につながり、治療選択肢を再考させられる可能性がある。今後は、術後患者を対象とした前向き研究や、他の癌種による臨床研究を行い、さらなる SAT 高発現の多発癌リスク因子としての意義を高めていきたいと考えている。

謝辞

本研究は、日本学術振興会科研費および財団法人日本自転車振興会からの助成を受けたものであり、ご支援を賜った関係各位に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、研究全般にわたりご指導賜りました自治医科大学附属さいたま医療センター外科系総合医学の力山敏樹教授、研究の考え方から微細な部分に至るまで懇切かつ情熱的なご指導を賜りました自治医科大学附属さいたま医療センター外科系総合医学の鈴木浩一准教授、そしてウイルスベクター作製、細胞への感染、マウスの実験等において、詳細かつ熱心なご指導を賜りました自治医科大学大学院細胞生化学の大森司教授に、深く感謝申し上げます。また、各実験の準備、実験手技のご指導から器具や試薬の準備、事務手続きに至るまで、本研究にご尽力いただいた、自治医科大学附属さいたま医療センター外科系総合医学研究補助員の石坂依津子様に、厚く御礼申し上げます。そして自治医科大学生化学講座病態生化学部門におけるウイルスベクター作製やマウスの実験において、多大なるご指導・ご尽力をいただいた、鴨下信彦講師、早川盛禎講師、平本貴史先生、客員研究員の早川裕子様、主任技師の尾崎裕美様、研究補助員の青木環様、岸本美華様、須藤八重子様、関谷良子様、林麻衣様に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Kawamura T, Sobue T. Comparison of breast cancer mortality in five countries: France, Italy, Japan, the UK and the USA from the WHO mortality database (1960-2000). *Japanese journal of clinical oncology*. 35(12):758-9, 2005
2. Bevier M, Sundquist K, Hemminki K. Risk of breast cancer in families of multiple affected women and men. *Breast cancer research and treatment*. 132(2):723-8, 2012
3. Nelson HD, Zakher B, Cantor A, Fu R, Griffin J, O'Meara ES, Buist DS, Kerlikowske K, van Ravesteyn NT, Trentham-Dietz A, Mandelblatt JS, Miglioretti DL. Risk factors for breast cancer for women aged 40 to 49 years: a systematic review and meta-analysis. *Annals of internal medicine*. 156(9):635-48, 2012
4. Ogawa H, Kato I, Tominaga S. Family history of cancer among cancer patients. *Japanese journal of cancer research : Gann*. 76(2):113-8, 1985
5. Washington, DC A. World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer : a Global Perspective. 2007 [www.aicr.org/assets/docs/pdf/.../Second_Expert_Report.pdf]
6. Beinart G, Gonzalez-Angulo AM, Broglio K, Mejia J, Ruggeri A, Mininberg E, Hortobagyi GN, Valero V. Clinical course of 771 patients with bilateral breast cancer: characteristics associated with overall and recurrence-free survival. *Clin Breast Cancer*. 7(11):867-74, 2007
7. Chen Y, Thompson W, Semenciw R, Mao Y. Epidemiology of contralateral breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 8(10):855-61, 1999
8. Hartmann LC, Schaid DJ, Woods JE, Crotty TP, Myers JL, Arnold PG, Petty PM, Sellers TA, Johnson JL, McDonnell SK, Frost MH, Jenkins RB. Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in women with a family history of breast cancer. *The New England journal of medicine*. 340(2):77-84, 1999
9. Kheirleseid EA, Jumustafa H, Miller N, Curran C, Sweeney K, Malone C, McLaughlin R, Newell J, Kerin MJ. Bilateral breast cancer: analysis of incidence, outcome, survival and disease characteristics. *Breast Cancer Res Treat*. 126(1):131-40, 2011
10. Li CI, Malone KE, Porter PL, Daling JR. Epidemiologic and molecular risk factors for contralateral breast cancer among young women. *Br J Cancer*. 89(3):513-8, 2003
11. Reiner AS, John EM, Brooks JD, Lynch CF, Bernstein L, Mellemkjaer L, Malone KE, Knight JA, Capanu M, Teraoka SN, Concannon P, Liang X, Figueiredo JC, Smith SA, Stovall M, Pike MC, Haile RW, Thomas DC, Begg CB, Bernstein JL. Risk of asynchronous contralateral breast cancer in noncarriers of BRCA1 and BRCA2 mutations with a family

history of breast cancer: a report from the Women's Environmental Cancer and Radiation Epidemiology Study. *J Clin Oncol*. 31(4):433-9, 2013

12. Kang E, Seong MW, Park SK, Lee JW, Lee J, Kim LS, Lee JE, Kim SY, Jeong J, Han SA, Kim SW. The prevalence and spectrum of BRCA1 and BRCA2 mutations in Korean population: recent update of the Korean Hereditary Breast Cancer (KOHBRA) study. *Breast Cancer Res Treat*. 151(1):157-68, 2015

13. Shibahara Y, Sugawara Y, Miki Y, Hata S, Takahashi H, Nakamura Y, Suzuki T, Ohuchi N, Tsuji I, Sasano H. Analysis of multiple primary cancer autopsy cases associated with breast cancer: 2002-2010. *Pathology international*. 66(12):695-700, 2016

14. Albornoz CR, Matros E, Lee CN, Hudis CA, Pusic AL, Elkin E, Bach PB, Cordeiro PG, Morrow M. Bilateral Mastectomy versus Breast-Conserving Surgery for Early-Stage Breast Cancer: The Role of Breast Reconstruction. *Plastic and reconstructive surgery*. 135(6):1518-26, 2015

15. Momoh AO, Cohen WA, Kidwell KM, Hamill JB, Qi J, Pusic AL, Wilkins EG, Matros E. Tradeoffs Associated With Contralateral Prophylactic Mastectomy in Women Choosing Breast Reconstruction: Results of a Prospective Multicenter Cohort. *Ann Surg*. 266(1):158-64, 2017

16. Tuttle TM, Habermann EB, Grund EH, Morris TJ, Virnig BA. Increasing use of contralateral prophylactic mastectomy for breast cancer patients: a trend toward more aggressive surgical treatment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 25(33):5203-9, 2007

17. Abbott A, Rueth N, Pappas-Varco S, Kuntz K, Kerr E, Tuttle T. Perceptions of contralateral breast cancer: an overestimation of risk. *Annals of surgical oncology*. 18(11):3129-36, 2011

18. Howard-McNatt M, Schroll RW, Hurt GJ, Levine EA. Contralateral prophylactic mastectomy in breast cancer patients who test negative for BRCA mutations. *Am J Surg*. 202(3):298-302, 2011

19. Rosenberg SM, Tracy MS, Meyer ME, Sepucha K, Gelber S, Hirshfield-Bartek J, Troyan S, Morrow M, Schapira L, Come SE, Winer EP, Partridge AH. Perceptions, knowledge, and satisfaction with contralateral prophylactic mastectomy among young women with breast cancer: a cross-sectional survey. *Annals of internal medicine*. 159(6):373-81, 2013

20. Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer research*. 63(8):1727-30, 2003

21. Ahlquist T, Lind GE, Costa VL, Meling GI, Vatn M, Hoff GS, Rognum TO,

- Skotheim RI, Thiis-Evensen E, Lothe RA. Gene methylation profiles of normal mucosa, and benign and malignant colorectal tumors identify early onset markers. *Molecular cancer*. 7:94, 2008
22. Belshaw NJ, Pal N, Tapp HS, Dainty JR, Lewis MP, Williams MR, Lund EK, Johnson IT. Patterns of DNA methylation in individual colonic crypts reveal aging and cancer-related field defects in the morphologically normal mucosa. *Carcinogenesis*. 31(6):1158-63, 2010
 23. Deng G, Lu Y, Zlotnikov G, Thor AD, Smith HS. Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas. *Science (New York, NY)*. 274(5295):2057-9, 1996
 24. Konishi K, Shen L, Jelinek J, Watanabe Y, Ahmed S, Kaneko K, Kogo M, Takano T, Imawari M, Hamilton SR, Issa JP. Concordant DNA methylation in synchronous colorectal carcinomas. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2(9):814-22, 2009
 25. Menigatti M, Truninger K, Gebbers JO, Marbet U, Marra G, Schar P. Normal colorectal mucosa exhibits sex- and segment-specific susceptibility to DNA methylation at the hMLH1 and MGMT promoters. *Oncogene*. 28(6):899-909, 2009
 26. Paun BC, Kukuruga D, Jin Z, Mori Y, Cheng Y, Duncan M, Stass SA, Montgomery E, Hutcheon D, Meltzer SJ. Relation between normal rectal methylation, smoking status, and the presence or absence of colorectal adenomas. *Cancer*. 116(19):4495-501, 2010
 27. Ushijima T. Epigenetic field for cancerization. *Journal of biochemistry and molecular biology*. 40(2):142-50, 2007
 28. Worthley DL, Whitehall VL, Buttenshaw RL, Irahara N, Greco SA, Ramsnes I, Mallitt KA, Le Leu RK, Winter J, Hu Y, Ogino S, Young GP, Leggett BA. DNA methylation within the normal colorectal mucosa is associated with pathway-specific predisposition to cancer. *Oncogene*. 29(11):1653-62, 2010
 29. Lochhead P, Chan AT, Nishihara R, Fuchs CS, Beck AH, Giovannucci E, Ogino S. Etiologic field effect: reappraisal of the field effect concept in cancer predisposition and progression. *Mod Pathol*. 28(1):14-29, 2015
 30. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, Bussaglia E, Prat J, Harkes IC, Repasky EA, Gabrielson E, Schutte M, Baylin SB, Herman JG. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst*. 92(7):564-9, 2000
 31. Jacot W, Thezenas S, Senal R, Viglianti C, Laberenne AC, Lopez-Crapez E, Bibeau F, Bleuse JP, Romieu G, Lamy PJ. BRCA1 promoter hypermethylation, 53BP1 protein expression and PARP-1 activity as biomarkers of DNA repair deficit in breast cancer. *BMC cancer*. 13:523, 2013
 32. Li Q, Wei W, Jiang YI, Yang H, Liu J. Promoter methylation and expression

changes of BRCA1 in cancerous tissues of patients with sporadic breast cancer. *Oncol Lett.* 9(4):1807-13, 2015

33. Zhang L, Long X. Association of BRCA1 promoter methylation with sporadic breast cancers: Evidence from 40 studies. *Sci Rep.* 5:17869, 2015

34. Zhu X, Shan L, Wang F, Wang J, Shen G, Liu X, Wang B, Yuan Y, Ying J, Yang H. Hypermethylation of BRCA1 gene: implication for prognostic biomarker and therapeutic target in sporadic primary triple-negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment.* 150(3):479-86, 2015

35. Kamiyama H, Suzuki K, Maeda T, Koizumi K, Miyaki Y, Okada S, Kawamura YJ, Samuelsson JK, Alonso S, Konishi F, Perucho M. DNA demethylation in normal colon tissue predicts predisposition to multiple cancers. *Oncogene.* 31(48):5029-37, 2012

36. Ideue T, Cho Y, Nishimura K, Tani T. Involvement of satellite I noncoding RNA in regulation of chromosome segregation. *Genes Cells.* 19(6):528-38, 2014

37. McNulty SM, Sullivan LL, Sullivan BA. Human Centromeres Produce Chromosome-Specific and Array-Specific Alpha Satellite Transcripts that Are Complexed with CENP-A and CENP-C. *Dev Cell.* 42(3):226-40.e6, 2017

38. Rosic S, Kohler F, Erhardt S. Repetitive centromeric satellite RNA is essential for kinetochore formation and cell division. *The Journal of cell biology.* 207(3):335-49, 2014

39. Ugarkovic D. Functional elements residing within satellite DNAs. *EMBO Rep.* 6(11):1035-9, 2005

40. Kishikawa T, Otsuka M, Yoshikawa T, Ohno M, Ijichi H, Koike K. Satellite RNAs promote pancreatic oncogenic processes via the dysfunction of YBX1. *Nature communications.* 7:13006, 2016

41. Zhu Q, Pao GM, Huynh AM, Suh H, Tonnu N, Nederlof PM, Gage FH, Verma IM. BRCA1 tumour suppression occurs via heterochromatin-mediated silencing. *Nature.* 477(7363):179-84, 2011

42. Ting DT, Lipson D, Paul S, Brannigan BW, Akhavanfard S, Coffman EJ, Contino G, Deshpande V, Iafrate AJ, Letovsky S, Rivera MN, Bardeesy N, Maheswaran S, Haber DA. Aberrant overexpression of satellite repeats in pancreatic and other epithelial cancers. *Science (New York, NY).* 331(6017):593-6, 2011

43. Saito M, Suzuki K, Maeda T, Kato T, Kamiyama H, Koizumi K, Miyaki Y, Okada S, Kiyozaki H, Konishi F. The accumulation of DNA demethylation in Sat alpha in normal gastric tissues with *Helicobacter pylori* infection renders susceptibility to gastric cancer in some individuals. *Oncology reports.* 27(6):1717-25, 2012

44. Suzuki K, Suzuki I, Leodolter A, Alonso S, Horiuchi S, Yamashita K, Perucho M. Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes

genomic damage. *Cancer cell*. 9(3):199-207, 2006

45. Ichida K, Suzuki K, Fukui T, Takayama Y, Kakizawa N, Watanabe F, Ishikawa H, Muto Y, Kato T, Saito M, Futsuhara K, Miyakura Y, Noda H, Ohmori T, Konishi F, Rikiyama T. Overexpression of satellite alpha transcripts leads to chromosomal instability via segregation errors at specific chromosomes. *International journal of oncology*. 2018

46. Umemura S, Kurosumi M, Moriya T, Oyama T, Arihiro K, Yamashita H, Umekita Y, Komoike Y, Shimizu C, Fukushima H, Kajiwarra H, Akiyama F. Immunohistochemical evaluation for hormone receptors in breast cancer: a practically useful evaluation system and handling protocol. *Breast cancer (Tokyo, Japan)*. 13(3):232, 2006

47. Umemura S, Kurosumi M, Moriya T, Oyama T, Arihiro K, Yamashita H, Umekita Y, Komoike Y, Shimizu C, Fukushima H, Kajiwarra H, Akiyama F. Recommendations for 'adequate evaluation of hormone receptors' a report of the task force of the Japanese Breast Cancer Society. *Oncology reports*. 24(2):299-304, 2010

48. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 31(31):3997-4013, 2013

49. Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, Kim M, Woods C, Fiala E, Ehrlich M, Laird PW. Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic acids research*. 33(21):6823-36, 2005

50. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone marrow transplantation*. 48(3):452-8, 2013

51. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*. 301(5895):89-92, 1983

52. Herrera LA, Prada D, Andonegui MA, Duenas-Gonzalez A. The epigenetic origin of aneuploidy. *Current genomics*. 9(1):43-50, 2008

53. Kawano H, Saeki H, Kitao H, Tsuda Y, Otsu H, Ando K, Ito S, Egashira A, Oki E, Morita M, Oda Y, Maehara Y. Chromosomal instability associated with global DNA hypomethylation is associated with the initiation and progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Annals of surgical oncology*. 21 Suppl 4:S696-702, 2014

54. Rodriguez J, Frigola J, Vendrell E, Risques RA, Fraga MF, Morales C, Moreno V, Esteller M, Capella G, Ribas M, Peinado MA. Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers. *Cancer research*.

66(17):8462-9468, 2006

55. Wong SM, Freedman RA, Sagara Y, Aydogan F, Barry WT, Golshan M. Growing Use of Contralateral Prophylactic Mastectomy Despite no Improvement in Long-term Survival for Invasive Breast Cancer. *Annals of surgery*. 265(3):581-9, 2017
56. Chung A, Huynh K, Lawrence C, Sim MS, Giuliano A. Comparison of patient characteristics and outcomes of contralateral prophylactic mastectomy and unilateral total mastectomy in breast cancer patients. *Annals of surgical oncology*. 19(8):2600-6, 2012
57. Kurian AW, Lichtensztajn DY, Keegan TH, Nelson DO, Clarke CA, Gomez SL. Use of and mortality after bilateral mastectomy compared with other surgical treatments for breast cancer in California, 1998-2011. *Jama*. 312(9):902-14, 2014
58. Lostumbo L, Carbine NE, Wallace J. Prophylactic mastectomy for the prevention of breast cancer. *The Cochrane database of systematic reviews*. (11):Cd002748, 2010
59. Peralta EA, Ellenhorn JD, Wagman LD, Dagis A, Andersen JS, Chu DZ. Contralateral prophylactic mastectomy improves the outcome of selected patients undergoing mastectomy for breast cancer. *Am J Surg*. 180(6):439-45, 2000
60. van Sprundel TC, Schmidt MK, Rookus MA, Brohet R, van Asperen CJ, Rutgers EJ, Van't Veer LJ, Tollenaar RA. Risk reduction of contralateral breast cancer and survival after contralateral prophylactic mastectomy in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. *British journal of cancer*. 93(3):287-92, 2005
61. Rebbeck TR, Friebel T, Lynch HT, Neuhausen SL, van 't Veer L, Garber JE, Evans GR, Narod SA, Isaacs C, Matloff E, Daly MB, Olopade OI, Weber BL. Bilateral prophylactic mastectomy reduces breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: the PROSE Study Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 22(6):1055-62, 2004
62. Bevers TB, Armstrong DK, Arun B, Carlson RW, Cowan KH, Daly MB, Fleming I, Garber JE, Gemignani M, Gradishar WJ, Krontiras H, Kulkarni S, Laronga C, Lawton T, Loftus L, Macdonald DJ, Mahoney MC, Merajver SD, Seewaldt V, Sellin RV, Shapiro CL, Singletary E, Ward JH. Breast cancer risk reduction. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. 5(8):676-701, 2007
63. Fu Y, Zhuang Z, Dewing M, Apple S, Chang H. Predictors for contralateral prophylactic mastectomy in breast cancer patients. *International journal of clinical and experimental pathology*. 8(4):3748-64, 2015
64. Kato T, Suzuki K, Muto Y, Sasaki J, Tsujinaka S, Kawamura YJ, Noda H, Horie H, Konishi F, Rikiyama T. Multiple primary malignancies involving primary sporadic colorectal cancer in Japan: incidence of gastric cancer with colorectal cancer patients may be higher than previously recognized. *World journal of surgical oncology*. 13:23, 2015

65. Kondratova VN, Botezatu IV, Shelepov VP, Likhtenshtein AV. [Transcripts of satellite DNA in blood plasma: probable markers of tumor growth]. *Mol Biol (Mosk)*. 48(6):999-1007, 2014
66. Krause S, Brock A, Ingber DE. Intraductal injection for localized drug delivery to the mouse mammary gland. *Journal of visualized experiments : JoVE*. (80), 2013
67. Kang HJ, Hong YB, Yi YW, Cho CH, Wang A, Bae I. Correlations between BRCA1 defect and environmental factors in the risk of breast cancer. *The Journal of toxicological sciences*. 38(3):355-61, 2013
68. Sung YM, He G, Fischer SM. Lack of expression of the EP2 but not EP3 receptor for prostaglandin E2 results in suppression of skin tumor development. *Cancer Res*. 65(20):9304-11, 2005
69. Zhu Q, Hoong N, Aslanian A, Hara T, Benner C, Heinz S, Miga KH, Ke E, Verma S, Soroczynski J, Yates JR, 3rd, Hunter T, Verma IM. Heterochromatin-Encoded Satellite RNAs Induce Breast Cancer. *Molecular cell*. 70(5):842-53.e7, 2018