

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15234

研究課題名(和文) がんのヘテロジェナイエティ構築における染色体不安定性の寄与の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of chromosomal instability in cancer heterogeneity

研究代表者

家村 顕自 (Iemura, Kenji)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：50778058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍内不均一性と染色体不安定性(CIN)との関連性は実証されていない。本研究では、CINの発生頻度が異なるクローン(High-/Low-CIN)を単離培養し、細胞増殖に対する染色体不安定性の影響を検証した。通常培養下のHigh-CIN細胞は増殖抑制がみられたが、スフェロイド形成培養下にはHigh-CIN細胞の増殖が亢進した。また、High-CIN細胞群は高い染色体数不均一性を有していたが、スフェロイド形成培養により均一性の高い細胞群となることが分かった。以上の結果から、染色体不安定性はがん細胞集団に不均一性をもたらし、選択圧が生じた際の増殖優位性細胞の発生に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年積極的に行われているがんゲノムの大規模解析から、がん組織を構成する細胞においてヘテロジェナイエティが存在していることや、がんの発生初期段階で染色体不安定性がみられること、より悪性度の高いがんにおいて染色体不安定性が高頻度に発生していることが報告されている。一方で、実験系においては染色体不安定性が、がん細胞の増殖や腫瘍の形成に不利に働くことが分かっており、理論と実験の間で矛盾が生じている。染色体不安定性細胞を用いてヘテロジェナイエティ構築過程を観察した本研究成果は、これまでの研究にて生じた食い違いを是正し、がん組織のヘテロジェナイエティ構築における染色体不安定性の意義について理解につながる。

研究成果の概要(英文)：Chromosomal instability (CIN) in cancer cells is widely known to be related to the acquisition of the heterogeneity. However, there are many conflicting experimental results showing that CIN is detrimental for cell proliferation. Therefore, whether CIN plays a causative role in the development of cancer heterogeneity remains unclear. In this study, we isolated clones from cancer cell line showing either high or low CIN depending on the rate of chromosome missegregation, and examined the proliferation and karyotype heterogeneity of these clones. In normal culture condition, high-CIN clones showed growth disadvantage and promotes karyotype heterogeneity compared to low-CIN clones. However, in spheroid culture condition, high-CIN clones formed bigger cell spheres than low-CIN clones, and karyotype heterogeneity was reduced. These results suggest that CIN contributes to the generation of cancer heterogeneity, and it is required for the growth advantage, when selective pressure occurs.

研究分野：細胞生物学

キーワード：染色体不安定性 細胞増殖 腫瘍内不均一性 増殖優位性 クローン進化 染色体分配 分裂期 スフィアアッセイ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまで、がん組織は悪性度の高いクローナルな細胞で形成されていると考えられてきたが、近年、広域ながん組織の全ゲノムシーケンス解析から、がん組織は染色体構造や染色体数、生物学的特性の異なる不均一な細胞集団(ヘテロジェナイティ)からなりたっていることが明らかにされた。がん組織におけるヘテロジェナイティは個々の細胞間で形質や増殖能、薬剤感受性の違いが生じるため、がん治療において治療抵抗性をうみだす原因となることが示唆されている。細胞分裂を経るごとに染色体数や染色体構造が変化する染色体不安定性は、染色体の欠失及び増加をもたらすことから、がん組織のヘテロジェナイティを促進することが予想されており、実際に、腫瘍形成の数値モデルでは増殖の過程で一定頻度のゲノム不安定性を考慮することで腫瘍内にヘテロジェナイティが構築できることが示されている。このように、染色体不安定性はヘテロジェナイティを構築する上で細胞の多様性を促進する最たる要因として考えられている。しかし、実験レベルで細胞に染色体不安定性を誘導すると細胞増殖が著しく阻害されることや、腫瘍が縮小することが報告されており、理論と実験の間で矛盾が生じている。また、これまでのヘテロジェナイティに関する研究は、臨床検体の複数箇所より採取したサンプルについて遺伝子発現解析やゲノム変異解析を行い、クローン進化の系譜を明らかにすることで行われてきた。これは、ヘテロジェナイティ構築後の形質を解析し、その解析結果から、その構築過程を推定することでヘテロジェナイティの発生原因を探究する試みであるが、複雑なクローン進化カスケードが明らかにされていないことから未だ明確な理解にいたっていない。このような現状から、がん化や腫瘍形成に伴うヘテロジェナイティの構築と染色体不安定性との関連性は十分に実証されていない。

### 2. 研究の目的

染色体不安定性は細胞分裂を経るごとに染色体数や染色体構造が変動する形質であることからがんのヘテロジェナイティ構築に関与していることが示唆されているが、染色体不安定性をもつ細胞の動態について細胞から組織レベルまで一貫して解析された例は少なく、その寄与については議論がなされている。

そこで本研究では、染色体分配の失敗による染色体不安定性ががんにおけるヘテロジェナイティの構築にどのように寄与しているのかという点について明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

染色体不安定性を有するがん細胞株より単一細胞をクローニングすることで、細胞増殖性や染色体不安定性の出現頻度が異なる亜種を複数種単離し、細胞増殖性と染色体不安定性の出現頻度を検証した。次に、各々の細胞を生体内の細胞増殖を一部模倣した三次元培養環境下で培養し、得られる細胞塊のサイズを計測することで、染色体不安定性が三次元培養環境下の細胞増殖能に与える影響を検討した。また、各々の細胞をヌードマウス皮下注射によって移植し、各々の細胞の *in vivo* における造腫瘍性を解析した。加えて、各々の細胞の染色体と微小管を可視化し、生細胞観察することで各々の細胞の細胞増殖過程に違いがみられるかどうか、染色体分配時にどのような表現型がみられるのかを確認した。更に、通常培養および三次元培養環境下で培養した各々の細胞について、一細胞全ゲノムシーケンスを行い、染色体コピー数を推定し、各々の細胞群における核型のヘテロジェナイティを検討した。

### 4. 研究成果

(1) 染色体不安定性は増殖優位性がん細胞の出現と造腫瘍能の亢進に寄与する。

染色体不安定性を有するがん細胞株より単一細胞をクローニングし、微小核の発生頻度及び染色体分配異常の発生頻度を指標に、染色体不安定性の程度が異なる亜種(High-CIN, Low-CIN)を取得した(図 1A, B)。各々の細胞増殖能を検証したところ、通常培養環境下では、Low-CIN 細胞に比べて High-CIN 細胞の増殖が抑制されていることがわかった(図 1C)。一方で、これらの細胞を生体内の環境を一部模倣する三次元培養環境下や低酸素状態で培養したところ、High-CIN 細胞の増殖が Low-CIN 細胞に比べて亢進することがわかった(図 1D)。

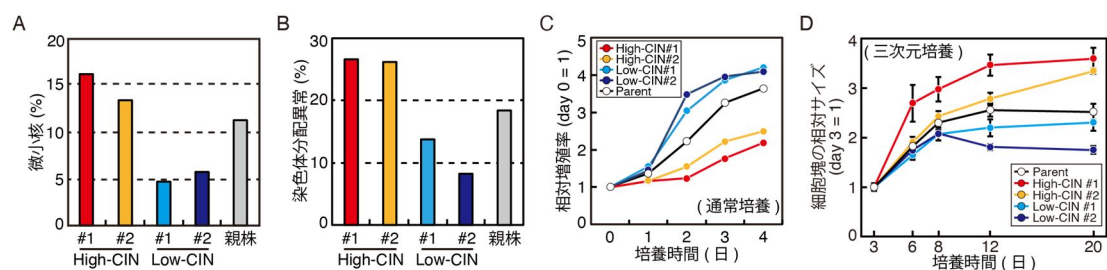


図 1. 染色体不安定性の発生頻度と細胞増殖速度の比較

次に、High-CIN 細胞と Low-CIN 細胞を通常培養環境及び三次元培養環境にて培養し、得られた細胞集団をヌードマウスに皮下移植することで各々の細胞の造腫瘍能を評価した。その結果、通常培養環境下で培養した High-CIN 細胞は同じ培養環境下で培養した Low-CIN 細胞に比べ大きな腫瘍を形成することがわかった (図 2)。

以上の結果から、染色体不安定性は通常培養環境下ではがん細胞の増殖を抑制するが、増殖抑圧が生じるような培養環境下では増殖優位性細胞の出現に寄与している可能性が示唆された。

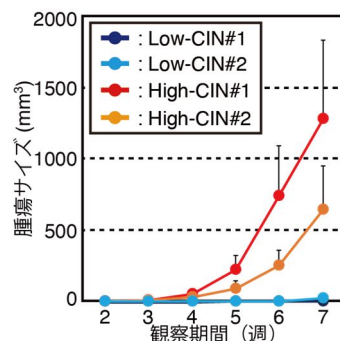


図 2. 染色体不安定性細胞の造腫瘍性

(2) 高頻度染色体不安定性細胞では分裂期の進行が遅延がする。

染色体不安定性は主に分裂期における染色体分配の失敗によって生じる。そこで、High-CIN 及び Low-CIN 細胞の染色体分配過程を詳細に解析するために、各々の細胞の染色体と微小管を可視化し生細胞観察を行った。その結果、染色体分配異常の発生に関わらず、High-CIN 細胞では分裂期の時間が恒常的に延長していることがわかった。特に、High-CIN 細胞では分裂期中期の延長が顕著にみられた (図 3A)。次に、三次元培養環境下で生細胞観察を行い、通常培養環境下でみられた分裂期の延長に変化がみられるかどうかを検証した。その結果、三次元培養環境下では染色体不安定性の発生頻度に関わらず通常培養環境下と比して分裂期の時間が延長することがわかった。このとき、High-CIN 細胞ではより顕著な分裂期中期延長がみられた (図 2B)。

以上の結果から、染色体不安定性を高頻度に有する細胞は、分裂期の正常な進行が恒常的に妨げられている可能性が示唆された。

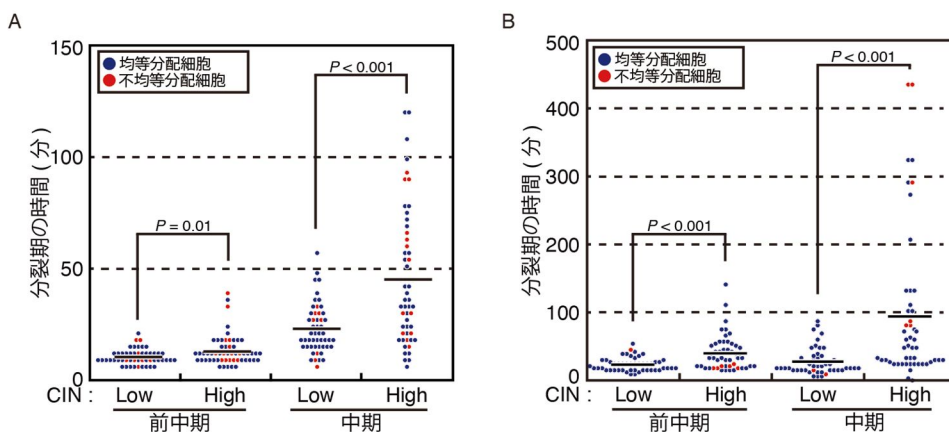


図 3. 通常培養環境下 (A) 及び三次元培養環境下 (B) における分裂期の時間

(3) 高頻度染色体不安定性細胞は三次元培養環境下においてクローン選択される。

High-CIN 及び Low-CIN 細胞の核型不均一性を評価するために、通常培養環境及び三次元培養環境で培養した各細胞群より一細胞を単離し、全ゲノムシーケンズにより一細胞コピー数解析を行った。その結果、通常培養環境下では、Low-CIN 細胞に比べて High-CIN 細胞では核型不均一性が高いことがわかった。三次元培養環境下では、Low-CIN 細胞の核型不均一性は変化しなかったが、High-CIN 細胞では通常培養環境下でみられていた核型不均一性が抑制されており、Low-CIN 細胞より均一度の高い細胞集団であることがわかった。

以上の結果から、染色体不安定性は核型多様性の形成に寄与しており、この多様性を有する細胞集団は三次元培養環境で培養することでクローン選択されることが示唆された。

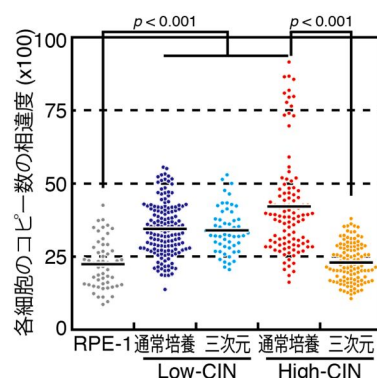


図 3. 一細胞コピー数解析より算出した各細胞間のコピー数の相違度

これらの結果を踏まえると、がん細胞における染色体不安定性はがん細胞集団に対して核型のヘテロジェニティをもたらし、選択圧が生じる環境下において増殖優位性細胞を効率よくクローン選択する過程に寄与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kuniyasu Kinue, Iemura Kenji, Tanaka Kozo	4. 巻 9
2. 論文標題 Delayed Chromosome Alignment to the Spindle Equator Increases the Rate of Chromosome Missegregation in Cancer Cell Lines	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 10~10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom9010010	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 家村顕自, 田中耕三
2. 発表標題 染色体オシレーション運動は染色体均等分配の堅牢性に寄与する
3. 学会等名 第84回日本生化学会東北支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 家村顕自, 田中耕三
2. 発表標題 分裂期染色体動態による染色体安定性の維持機構
3. 学会等名 第90回日本遺伝学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenji Iemura, Kozo Tanaka
2. 発表標題 The role of chromosomal instability in cancer cell proloferation
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 家村顕自, 田中耕三
2. 発表標題 中心体キナーゼAurora Aによる染色体振幅運動は染色体均等分配の堅牢性に寄与する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 家村顕自, 田中耕三
2. 発表標題 がん細胞における染色体不安定性は増殖選択圧を受けた際の増殖優位性獲得に寄与する
3. 学会等名 第36回染色体ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 家村顕自, 田中耕三
2. 発表標題 小胞体ストレス応答経路は染色体不安定性がん細胞のクローン進化に寄与する
3. 学会等名 第37回染色体ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 家村顕自, 田中耕三
2. 発表標題 分裂期染色体動態による染色体安定性の維持機構
3. 学会等名 第1回癌学会若手の会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----