

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16727

研究課題名(和文)オーロラキナーゼ制御システムの破綻による染色体不安定性獲得機構の解明

研究課題名(英文)Defective system-level regulation of Aurora B underlies chromosomal instability

研究代表者

趙 民知 (JO, Minji)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 実験病理部・研究員

研究者番号：80808866

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)：私たちは先行研究で、細胞の正確な染色体の分配を保證する染色体パッセンジャー複合体(CPC)は、HP1との結合でその活性が強化されることと、がん細胞ではCPCに対するHP1の結合量が減少していることを報告した。本研究では、染色体異数体化と転写がHP1のセントロメア集合程度を変化させることを見出し、がん細胞の染色体不安定性獲得機構について新たな知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞分裂期における頻繁な染色体分配の失敗は染色体不安定性と呼ばれ、がんの治療抵抗性や予後と関連する。また、がんの進展とともに多く見られる特徴であることから、このがんの性質に着目した研究成果は、進行がんの診断・治療への応用が強く期待される。本研究によって、正確な染色体分配を維持する染色体パッセンジャー複合体(CPC)の機能制御において、染色体異数体化と転写の関連性が見出され、がん細胞の染色体不安定性を引き起こす機構を理解する手がかりとなる知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Chromosomal passenger complex (CPC) ensures accurate chromosomal segregations during mitosis through releasing incorrect attachments of kinetochores and centromeres. We previously reported that the function of CPC is allosterically increased by interaction with heterochromatin protein 1 (HP1) and the amount of HP1-bound CPC is decreased in a wide of cancer cells. Here, we aimed to understand the reduction of HP1-involvement in cancer cells and found that the extent of HP1 assembly at centromeres is closely related to ploidy alteration and transcriptional regulation, affecting chromosomal instability in cancer cells.

研究分野：細胞生物学、腫瘍生物学

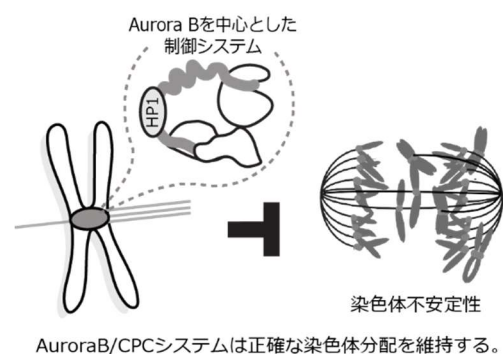
キーワード：染色体異数体化 染色体不安定性 Aurora Bキナーゼ non-coding RNA HP1

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞分裂期における正確な染色体分配は、母細胞から娘細胞への遺伝情報伝達に必須な細胞機能である。その機能の破綻は、細胞の不均一性を増幅させる原因であり、多くのがん細胞で共通して見られる特徴である。この細胞病能は「染色体不安定性(Chromosomal instability: CIN)」と呼ばれているが、この病理機構は未だによく分かっていない。

(2) 染色体パッセンジャー複合体(Chromosomal passenger complex: CPC)は分裂期中、染色体のセントロメアに局在し、正確な染色体分配を維持するマスターコントローラーである。CPCはAurora B キナーゼを含み、INCENP、Survivin、Borealinの4つのサブユニットから形成されて、その機能はAurora Bを中心として、微小管と動原体の正確な結合を保つことである。具体的には、Aurora Bは動原体分子をリン酸化して、微小管との結合エラーを解除することで染色体分配の失敗を防いでいる(Carmena et al. 2012)。つまり、細胞は、Aurora Bを中心とするCPCを染色体のセントロメアに備えることにより、正確な染色体分配を維持していると言える。

(3) 研究代表者の趙の研究室では、CPCの新たなサブユニットとしてHeterochromatin protein 1 (HP1)を位置付けた。具体的には、HP1はCPCのINCENPに結合し、Aurora Bの活性を強化するアロステリックな因子であることと、がん細胞では正常細胞に比べ、CPCに結合するHP1の量が著しく減少し、Aurora Bの活性は低下していることを報告した(Abe et al. 2016 *Dev Cell*)。興味深いことに、このセントロメアへ局在するAurora Bの活性維持には、複数のポジティブ・フィードバック機構が存在していることが明らかになりつつあり、システム的な観点よりAurora Bの機能を捉える必要があることが示唆されていた(Abe et al. 2016 *Cell cycle*)。



(4) がん細胞の染色体不安定性は、広く普遍的に見られる特性であるにもかかわらず、その分子背景の理解は未だに乏しい。Aurora B機能の低下は、染色体のセントロメアの機能や構造に欠陥を招き染色体の分配異常を起こすので、少なからず重要であると推察される。したがって、「Aurora B/CPCシステムの破綻から、実際に細胞が染色体不安定性を獲得するまでには、どのような過程を経るのか」を明らかにすることは、がんの病理機構を理解するための本質的な課題であると考えられた。さらに「Aurora B/CPCシステム機能の変化とがん細胞の生物学的悪性度とがどのように関連しうるのか」、そもそも「なぜ細胞の悪性化形質転換がAurora B/CPCシステム機能の低下をきたすのか」を解明することは、がんの発生から進展における染色体不安定性の病理学的意義を示すだけでなく、染色体不安定性に着眼した治療薬の開発にもおいて不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、「CPCシステムの崩壊が細胞の染色体不安定性を誘導し、がんの進行を悪化させている」可能性を検討し、がん細胞の染色体不安定性獲得過程を明らかにするため、次の課題を設定した。

(1) CPCシステムの破綻による染色体分配異常が、逆にCPC機能の低下を誘導するという「負のサイクル」により、がん細胞の染色体不安定性獲得が起こるのではないかと考えられた。この

作業仮説に沿って、染色体異数体化による CPC 機能の変化を検討し、がんで染色体不安定性の背景機構を解明する。

(2) 続いて、「負のサイクル」ががんの悪性化にどのように関連するのかを明確にするため、がんの悪化に伴う CPC システムの変化を検討する。

(3) さらに、CPC 機能の維持にセントロメアの局在や他の因子が必須であって、がんの進行に従って CPC 機能の低下が誘導されているのではないかと考えられる。そのため、転写による CPC 制御の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 染色体異数体化と Aurora B の脆弱化の関連の解明

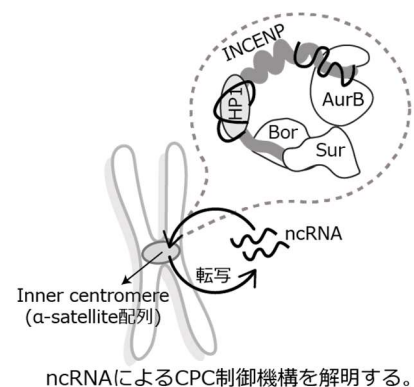
Aurora B 機能の低下による染色体異数体化が CPC 機能にどのような変化を誘導するのかを検討する。そのために、トリソミーの細胞で CPC のサブユニットである INCENP の抗体による免疫沈降法を用いて CPC に対する HP1 の結合量を検討する。それと共に、免疫染色法で CPC と HP1 または、Aurora B の活性の変化を解析する。これにより、トリソミー細胞で CPC 機能の低下や HP1 の結合量の減少が見られた場合には、先行研究で見出させた結果と合わせ、HP1-CPC の相互作用と染色体異数体化とが相互に関連していることが示唆される。すなわち、がんでは「染色体不安定性への負のサイクル」を持つという可能性が支持される。

(2) がん細胞の悪性化における Aurora B/CPC システムの重要性の解明

上記の「負のサイクル」ががん細胞の悪性化過程でどのような変化を起こすのかを検討する。この課題では、がん細胞の生物学的悪性度の一つの指標としてがん細胞のステムネスに着目する。そのために、マウスのグリオーマのがん幹細胞系において、Aurora B/CPC システムの変化を解析し、染色体不安定性との関連を検討する。具体的には、マウス脳の神経幹細胞と、それに H-Ras^{G12V} タンパク質を含むレトロウイルスを感染させた Glioma Initiating Cells、さらに腫瘍を形成した Glioma Stem Cells を用いて、がん進行の悪化過程で起こり得る染色体分配エラー、CPC 機能の低下、HP1-CPC の相互作用の減少などを検討し、がんの悪化に関する Aurora B/CPC システムの制御の重要性を明らかにする。

(3) 非コード RNA による CPC のセントロメア局在化機構の解明

そもそもなぜがん細胞で CPC 機能の低下が起きるのか。この根本的な疑問の解答を探求すべく、分裂期中 CPC が局在するセントロメアには α -satellite という繰り返し DNA 配列が盛んに転写されていることに着目し、その転写産物である非コード RNA (ncRNA; non-coding RNA) がセントロメアにおける CPC の活性や動能制御に関与する可能性を検討する。まずは細胞に RNA Polymerase II の障害剤を処理し、RNA の産生を中止し、CPC のセントロメア局在への影響を解析する。CPC のセントロメア局在に RNA の影響が示唆される場合には、RNA がどのように CPC と相互作用するについて解析する。



4. 研究成果

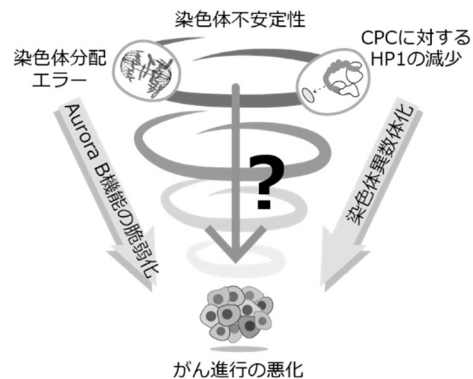
(1) 染色体異数体化と Aurora B の脆弱化の関連の解明

染色体異数体化が CPC 機能にどのような変化を誘導するのかを検討するために、正常二倍体

細胞とその細胞由来のトリソミー細胞（特定の染色体を三本もつ細胞）で免疫染色法により CPC と Aurora B 活性の変化を解析するとともに、免疫沈降法で CPC に対する HP1 の結合量を検討した。その結果、HP1-CPC の相互作用と染色体異数体化との関係が相互に関連していることを見出し、がん細胞での染色体不安定性を導くシステム「負のサイクル」の存在が示唆された。

(2) がん細胞の悪性化における Aurora B/CPC システムの重要性の解明

「負のサイクル」ががん細胞の悪性化過程でどのような変化を起こすのかを検討するため、マウスのグリオーマのがん幹細胞系において、Aurora B/CPC システムの変化と分裂期染色体の動態を解析した。その結果、細胞の悪性化に伴って、CPC のセントロメア局在が減少し、Aurora B 活性が低下することを見出した。また、がん幹細胞では、体分配異常の頻度が増加し、染色体異数体化細胞の割合が増えていることから、がんの悪化において Aurora B/CPC システム制御の関与が示唆された。



(3) 非コード RNA による CPC のセントロメア局在化機構の解明

セントロメアから転写される非コード RNA (ncRNA; non-coding RNA) が、セントロメアにおける CPC の活性や動能制御に関与する可能性を検討した。RNA polymerase II の障害剤を処理した細胞で、CPC のセントロメアへの局在が減少していることと、Aurora B 活性増強に必要である HP1 がセントロメアに集合しないことを観察し、セントロメア由来の ncRNA が HP1 を介して CPC をセントロメアに集めることに関与していることを見出した。

また、HP1 ヒンジ領域の正電荷アミノ酸を不電荷アミノ酸に置換するとセントロメア局在ができなくなることを見出し、「セントロメアへの HP1 の集合には、ヒンジ領域の正電荷アミノ酸と RNA の静電相互作用に依存する」ことが示唆された。

5. まとめ

本研究では、染色体不安定性の獲得機構とがん細胞の悪性化との関連性を見出し、「CPC システムの脆弱化による染色体不安定性への負のサイクルががんの悪性化に関与する」可能性を示した。また、RNA の関与による CPC のセントロメア局在機構の手掛かりを得ることができ、将来的に、がん細胞での CPC 機能低下の理由に答えることが期待される。

<引用文献>

Abe Y, Sako K, Takagaki K, Hirayama Y, Uchida KSK, Herman J, DeLuca JG and Hirota T. (2016) HP1-associated Aurora B kinase activity prevents chromosome segregation errors. *Dev Cell*. 36: 487-497.

Abe Y and Hirota T. (2016) System-level deficiencies in Aurora B control in cancers. *Cell Cycle*. 15:16, 2091-2092.

Carmena M, Wheelock M, Funabiki H and Earnshaw WC. (2012) The chromosome passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat Rev Cell Biol*. 13: 789-803.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Negoto Tetsuya, Jo Minji, Nakayama Izuma, Morioka Motohiro, Takeuchi Kengo, Kawachi Hiroshi, Hirota Toru	4. 巻 113
2. 論文標題 Profiling chromosomal level variations in gastric malignancies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3864 ~ 3876
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15544	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 該当する

1. 著者名 Jo Minji, Kusano Yoshiharu, Hirota Toru	4. 巻 112
2. 論文標題 Unraveling pathologies underlying chromosomal instability in cancers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2975 ~ 2983
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14989	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Minji Jo
2. 発表標題 Chromosome-level variations shape the malignant phenotypes in gastric tumors
3. 学会等名 12th AACR-JCA Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 趙民知
2. 発表標題 がん細胞における染色体動態の可塑的制御とその病理学的意義
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Minji Jo
2. 発表標題 The plastic regulation of mitotic chromosome segregation in cancer cells facilitates acquisition of malignant phenotypes
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Minji Jo
2. 発表標題 Aurora Bキナーゼの可塑的制御によるがん幹細胞の核型変動
3. 学会等名 第38回染色体ワークショップ&第19回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 趙民知
2. 発表標題 がん幹細胞の核型変動を誘導する染色体動態制御の可塑性
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 趙民知
2. 発表標題 The plastic regulation of chromosome segregation in cancer stem cells
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Minji Jo
2. 発表標題 Defective mitotic regulation facilitates karyotypic evolution of cancer stem cells
3. 学会等名 The 79th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 趙民知
2. 発表標題 がん細胞の悪性化における染色体不安定性の病理機構
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 PIK1キナーゼの染色体動態制御を標的としたがん細胞の増殖制御法	発明者 広田亨、高橋元子、 趙民知、加藤詩子、 鎌倉奈々、河北暢佳	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-156506	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

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

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
---------	---------