

機関番号：15401
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008 ～ 2010
 課題番号：20590061
 研究課題名 (和文) ゲノム不安定性の増大が誘導する癌細胞選択的細胞死の機構解明と
 癌治療への応用
 研究課題名 (英文) Mechanism of cancer-selective cell death induced by increased genomic
 instability and application of the cell death mechanism to cancer therapy
 研究代表者
 嶋本 顕 (SHIMAMOTO AKIRA)
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
 研究者番号：70432713

研究成果の概要 (和文) : スピンドルチェックポイント (SAC) はがん細胞選択的に分裂期細胞死を誘導することができる。SAC の活性化により M 期に停止したがん細胞は細胞死を引き起こすが、M 期停止から細胞死に至るメカニズムは不明である。本研究では shRNA ライブラリーを用いたスクリーニングにより、分裂期細胞死に関与する候補遺伝子群を見いだした。そして、これらを特異的に抑制する siRNA を用いて、7 つの遺伝子を同定した。

研究成果の概要 (英文) : Spindle assembly checkpoint (SAC) can induce cancer-selective mitotic cell death. Although the cell death is induced after M-phase arrest by SAC activation, the mechanism behind mitotic cell death is unclear. In this study, I discovered candidate genes associated with mitotic cell death by shRNA screening. Further, seven genes were identified by using siRNAs that specifically suppress the candidate genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：がん細胞選択的細胞死，分裂期細胞死，スピンドルチェックポイント，ゲノム不安定性，shRNA スクリーニング，

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物細胞は紫外線、放射線や化学物質、また代謝による活性酸素などの外的・内的要因からゲノムを保護するため、複数の DNA 修復経路やチェックポイント機構を備え、高度に制御された DNA トランスアクションネットワークを形成している。我々はがん分子標的という独自の観点からがん細胞におけるゲノムホメオスタシスの重要性に着目し、RecQL1 ががん治療の優れた分子標的候補で

あることを見出した。RecQL1 の抑制は S 期に DNA 損傷を引き起こす。正常細胞では DNA 損傷はチェックポイントを活性化し、p53 に代表される癌抑制経路が細胞周期にブレーキを掛け損傷が修復される。しかし、がん細胞は癌抑制経路やチェックポイント機構に異常があるために、細胞周期のブレーキが掛かりにくい状態である。したがって、がん細胞では DNA 損傷が生じても細胞周期は進行し、G2 チェックポイントを乗り越えて

M 期に侵入する。DNA 損傷を有したままゲノム不安定性が増大した状態で M 期に進入すると、スピンドルチェックポイント (SAC) が活性化され M 期停止を誘導して分裂死を引き起こす。

化学療法剤によるゲノム不安定性の増大が分裂死を誘導するメカニズムの一端は、佐谷らのグループによって明らかにされ、申請者らも同様の結果を確認している。しかし、M 期停止から細胞死に至る分子メカニズムは明らかではない。

一方、化学療法剤に耐性のがん細胞には、ゲノム不安定性が増大した状態で M 期を乗り越え、悪性化へ進むものもある。したがって、分裂死制御のメカニズムの解明は、副作用のより少ない癌治療薬の開発に重要であり、また適切な治療法を選択する判定法を確立することが可能となる。

2. 研究の目的

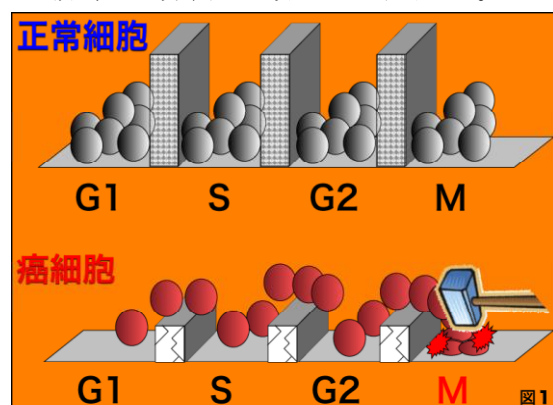
本研究は分裂死の誘導に働く遺伝子群を同定し、M 期停止から細胞死に至る分子機構を明らかにする。具体的には、

(1)shRNA ライブラリーを用いて、分裂死の誘導経路に働く遺伝子群のスクリーニングを行い、ノックダウンが分裂死誘導剤による細胞死を阻害する遺伝子群を同定する。

(2)同定した分裂死誘導遺伝子について遺伝学的、生化学的手法を用いて、M 期停止から細胞死に至るメカニズムを解析する。

3. 研究の方法

がん細胞では DNA 損傷応答が機能せずに細胞周期が進行し、G2 チェックポイントを乗り越えて M 期に侵入した結果、スピンドルチェックポイント (SAC) が活性化され M 期停止を誘導して分裂死を引き起こす(図 1)。こ



の一連の反応のうち、SAC の活性化が引き起こす M 期細胞死の機構を明らかにするために、以下の手順で研究を行った。

(1) ヒト全遺伝子に対する shRNA 発現レンチウイルスライブラリー発現細胞の樹立
shRNA Lentivirus vector plasmid 及びウイルス産生に必要な gag-pol, VSV-G, rev 遺伝

子をそれぞれ発現する plasmid を 293T 細胞にトランスフェクションし、トランスフェクション後 48 時間から 72 時間の培養上清をウイルス液として回収した。Polybrene を加えたウイルス液を HeLa 細胞の培地と交換してウイルス感染を行い、感染 2 日後にウイルスベクター導入選択薬である puromycin 存在化で選択培養を行った。

(2) monastrol 選択濃度の決定

DNA 損傷を経ず直接スピンドルチェックポイントを活性化し、分裂死を誘導する薬剤 monastrol を用いて分裂死の誘導経路に働く遺伝子群のスクリーニングを行うため、本研究では分裂死誘導剤として有糸分裂期に働くキネシン Eg5 の特異的阻害剤 monastrol を用いた。ヒト全遺伝子に対する shRNA 発現レンチウイルスライブラリー発現細胞を用いて、monastrol 存在化で monastrol 耐性コロニーが出現する濃度を検討した。

(3) 分裂死誘導 shRNA 配列の決定と遺伝子の同定

monastrol 耐性のコロニーそれぞれを 24 穴プレートに植え継ぎ、増殖した細胞からゲノム DNA を調製した。染色体 DNA に組込まれたレンチウイルスベクターの shRNA 領域を増幅可能なプライマーを用いて PCR を行い、増幅された DNA 断片を pGEM-T プラスミドにサブクローニングし塩基配列を決定した。得られた塩基配列をデータベースで検索し、対応する分裂死誘導遺伝子候補を同定した。

(4) 12 候補遺伝子からの分裂死誘導遺伝子の同定

得られた 12 遺伝子候補は一種類の shRNA によって同定された遺伝子であり、off-target などの擬陽性を含んでいる可能性がある。これら遺伝子が分裂死の誘導に働いており、ノックダウンが真に分裂死を抑制しているかどうかを、これら 12 遺伝子それぞれに対する複数のノックダウン配列で確認する必要がある。monastrol が HeLa 細胞に対して誘導する分裂死は、monastrol 処理後およそ 48 時間以内に誘導されることから、確認実験には数日間の一過的なノックダウンで十分であると考えられる。そこで shRNA ではなく siRNA を用いて確認実験を行った。遺伝子あたりそれぞれ独立した配列としてデザインされた 3 種類の siRNA を HeLa 細胞にそれぞれ導入し、標的遺伝子の発現が効率的に抑制されるかどうかを、RT-PCR により確認した。36 種類の siRNA とコントロール siRNA を HeLa 細胞にそれぞれトランスフェクションし、24 時間後に 50 μ M の monastrol を含む培地に交換した。培地交換 48 時間後に MTT アッセイを行い、細胞の増殖状況を評価した。コントロール siRNA を導入し、monastrol 未処理のコントロール細胞のアッセイ値を 100% とし、各 siRNA 導入細胞の monastrol 存在下における

アッセイ値を評価した。

4. 研究成果

(1) ヒト全遺伝子に対する shRNA 発現レンチウイルスライブラリー発現細胞の樹立
本研究で標的とする遺伝子群は分裂死誘導遺伝子であるから、shRNA の発現によって抑制されても細胞の増殖には影響を与えないことが予想されたため、shRNA 発現細胞の樹立には十分な期間の薬剤選択を行った。およそ 1 週間でレンチウイルスに感染していない HeLa 細胞は死滅し、ヒト全遺伝子に対する shRNA 発現レンチウイルスライブラリー発現細胞が樹立された。

(2) monastrol 選択濃度の決定

ヒト全遺伝子に対する shRNA 発現レンチウイルスライブラリー発現細胞を Monastrol 存在化で培養を続けたところ、HeLa 細胞を M 期で完全に死滅させる 200 μ M では monastrol 耐性コロニーを得ることができなかった。そこで様々な濃度の monastrol をコントロール及び shRNA 発現細胞に処理して、コントロール細胞が死滅して shRNA 発現細胞は生存してコロニーを形成する濃度の検討を行った結果、50 μ M で長期間暴露した場合に monastrol 耐性のコロニーを形成することが明らかとなった。

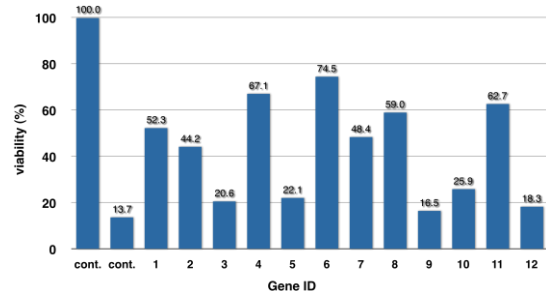
(3) 分裂死誘導 shRNA 配列の決定と遺伝子の同定

50 μ M monastrol 存在化で shRNA 発現レンチウイルスライブラリー感染 HeLa 細胞の培養を続けたところ、monastrol 耐性の独立したコロニーとして 42 クローンを得ることができた。Monastrol は Eg5 キネシンを阻害することによって有糸分裂を阻害しスピンドルチェックポイント(SAC)を活性化する。その結果、Monastrol 感受性の HeLa 細胞は分裂死を誘導するので、得られたクローンは shRNA によってノックダウンされた遺伝子が分裂死の誘導に働いている可能性が考えられる。そこで、42 クローンそれぞれが発現する shRNA を同定するため、42 個のコロニーをそれぞれ独立に培養してクローン化した。そしてゲノム DNA を調製し、shRNA 領域を特異的に増幅可能なプライマーを用いて PCR を行い、ゲノム DNA にインテグレートされた shRNA 領域を増幅したところ、全てのクローン由来ゲノム DNA から shRNA 領域を増幅することができた。これらの DNA 断片を pGEM-T プラスミドにサブクローニングし塩基配列を決定し、得られた塩基配列をデータベースで検索したところ、分裂死誘導遺伝子候補として独立した 12 遺伝子を同定した。

(4) 12 候補遺伝子からの分裂死誘導遺伝子の同定

shRNA ライブラリーを用いたスクリーニングから monastrol 耐性を与える遺伝子として得られた 12 の候補遺伝子に関して、あらたに

デザインした siRNA を用いてこれらの遺伝子発現を抑制し、monastrol 耐性が再現されるかどうかを確認する実験を行った。まず 12 の候補遺伝子が HeLa 細胞で発現していることを、これらの遺伝子 mRNA に特異的なプライマーセットを用いて RT-PCR を行い確認した。次に、各遺伝子について、それぞれ配列の異なる 3 種類の siRNA をデザインして HeLa 細胞にトランスフェクションし、標的遺伝子の発現が特異的に抑制されることを RT-PCR で確認した。何れの siRNA も内在性の標的遺伝子の発現を 80%以上の効率で抑制した。これらの siRNA を用いて候補遺伝子のノックダウンが、HeLa 細胞における monastrol 誘導性分裂死を抑制するかどうかを検証した。siRNA 導入 24 時間後に HeLa 細胞を monastrol 存在化で 48 時間培養し、細胞の生存活性を MTT アッセイにて測定した。その結果、12 の候補遺伝子のうち 7 遺伝子に対する siRNA (計 21 siRNA) が、HeLa 細胞において monastrol が誘導する分裂死を抑制した(グラフ参照)。



グラフが示す生存率は、各遺伝子に対する 3 つの siRNA の生存率の平均として示した。これら 7 つの遺伝子と機能は表に示す通りである。

Gene ID	Gene name	Function
1	BUB3	スピンドルチェックポイントのシグナル伝達
2	TRIM28	HP1との相互作用による遺伝子発現抑制
4	MAD2L1	スピンドルチェックポイントの構成因子
6	NPC2	エンドソーム/リソソーム系を通じたコレステロール輸送
7	BUB1B	スピンドルチェックポイント、有糸分裂の必須因子。
8	TTK	スピンドルチェックポイントに働くキナーゼ
11	EFTUD2	mRNA前駆体のスプライシングに働く U5 snRNPの構成因子

これらの 7 遺伝子のうち、BUB3、MAD2L1、BUB1B、TTK の 4 遺伝子はスピンドルチェックポイントに重要な役割を果たすタンパク質をコードしており、Monastrol が HeLa 細胞に引き起こす分裂死にスピンドルチェックポイントの活性化が働いていることが改めて示されたと同時に、この実験系が分裂死の機構解明において正しく機能していることを示している。残りの 3 つの遺伝子 RIM28、NPC2、EFTUD2 はそれぞれ、HP1 との相互作用による遺伝子発現抑制、エンドソーム/リソソーム系を通じたコレステロー

ル輸送,そして mRNA 前駆体のスプライシングに働く U5 snRNP の構成因子として働くことが知られているが,有糸分裂やスピンドルチェックポイントに関与することは知られていない。本研究の結果はこれら 3 つの遺伝子が有糸分裂やスピンドルチェックポイントにおいて機能を有することを示唆しており,今後の新たな研究課題となる。本研究で明らかとなった 7 つの分裂系抑制遺伝子の発現と, monastrol や Eg5 inhibitor の効果との関連を明らかにすることにより,これら阻害剤がどのようながん種に対して治療に応用できるかの指標となると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Dan Xu, Fumitaka Takeshita, Yumiko Hino, Saori Fukunaga, Yasusei Kudo, Aya Tamaki, Junko Matsunaga, Ryou-u Takahashi, Takashi Takata, Akira Shimamoto, Takahiro Ochiya, Hidetoshi Tahara miR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence. Journal of Cell Biology 193, 2, 409-424, 2011 (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

1. 嶋本 颯, 世良行寛, 禅正和真, 田原栄俊 ヒト iPS 細胞の発生におけるテロメラーゼ遺伝子 hTERT の役割, 第 10 回日本再生医療学会総会, 2011 年 3 月 1-2 日, 東京

2. Yukihiro Sera, Kazumasa Zensho, Akira Shimamoto and Hidetoshi Tahara, TERT promotes generation of induced pluripotent stem cells from senescent fibroblasts. The 33rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 7-10 Dec 2010, Kobe Japan

3. Dan Xu, Fumitaka Takeshita, Yumiko Hino, Saori Fukunaga, Yasusei Kudo, Aya Tamaki, Takashi Takata, Akira Shimamoto, Takahiro Ochiya, and Hidetoshi Tahara, miR-22 provides a direct link between cellular senescence and tumorigenesis, 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010 年 9 月 22-24 日, 大阪国際会議場

4. Aya Kikitsu, Hiroto Morita, Akira Shimamoto, Hidetoshi Tahara, Establishment of novel method for the evaluation of DNA binding activity of telomere binding protein by DNA strand exchange. EMBO Conference/Telomere and the

DNA Damage Response, 14-17 Sep, 2010 the Hotel Pullman at Marseille

5. Akira Shimamoto, Yukihiro Sera, Kazuma Zensho, Yumiko Hino, Hidetoshi Tahara, Forced expression of telomerase catalytic subunit gene negatively regulates generation of induced pluripotent stem cells. 第 8 回幹細胞シンポジウム, 2010 年 5 月 13-15 日, 淡路夢舞台国際会議場

6. Akira Shimamoto, Yukihiro Sera, Kazuma Zensho and Hidetoshi Tahara, Forced expression of TERT negatively regulates generation of induced pluripotent stem cells. The 32rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 9-12 Dec 2009, Yokohama Japan

[その他]

ホームページ等

<http://cell.pharm.hiroshima-u.ac.jp/TaharaLAB/Welcome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋本 颯 (SHIMAMOTO AKIRA)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 70432713

(2) 研究分担者

田原 栄俊 (TAHARA HIDETOSHI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 00271065

(3) 連携研究者

()

研究者番号: