

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16295

研究課題名(和文)染色体不安定性がん細胞の増殖優位性獲得機構に必要な分子基盤の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism required for the acquisition of growth advantage in CIN cancer cell

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):染色体不安定性によってもたらされた遺伝的多様性を有するがん細胞集団から、環境適応した細胞が如何に選択され増殖し、優位性を獲得するのかその機構については不明である。本研究では、染色体不安定性の発生頻度が異なるがん細胞の増殖過程、染色体コピー数、遺伝子発現解析を行い、染色体不安定性が、増殖優位性獲得に必要なKRAS経路の活性化と折りたたみ不全タンパク質を効率的に処理できる細胞の作出に寄与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんのクローン進化は最終的に構築された腫瘍組織を用いて変化の蓄積を類推することで立証されてきたが、分子レベルでその制御基盤を解析するためには、クローン進化過程を再現し検証することが必要である。本研究では、in vitro培養系を用いて、クローン進化に必要な増殖優位性獲得過程の経過を観察・解析し、染色体不安定性の増殖優位性に必要な分子経路の一端をみいだした。本研究により、増殖優位性クローン進化に対する本質的な意義を明示し、染色体不安定性がん細胞を標的とした新たながん治療方策を提示できる可能性があることから、学術的・社会的に高い意義を有していると予想される。

研究成果の概要(英文):The mechanisms underlying how environmentally adapted cells are selected from a genetically diverse cancer cell population caused by chromosomal instability are unknown. In this study, we analyzed the proliferation process, chromosome copy number and gene expression of cancer cells with different frequencies of chromosomal instability. It was found that chromosomal instability helps the generation of cells, which have activation of the KRAS pathway and clearance of unfolded protein. It has been suggested that these cells may play a role in supporting the growth advantage of CIN cancer cells.

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 細胞分裂 多様性 増殖優位性 がん

### 1. 研究開始当初の背景

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染色体不安定性は多くのがん細胞で見られる主たる表現型であり、がん細胞の多様性を構築する素因となる。がん細胞の多様性は、生体内の多様な環境やがん治療環境下において、適応し増殖する細胞の発生頻度を高めることから、悪性進展や治療抵抗性につながる。しかし、実験系において、がん細胞に染色体不安定性を導入すると、細胞増殖の停止や腫瘍の縮小化が引き起こされる。この結果は、染色体不安定性が抗腫瘍増殖に寄与していることを示唆しており、腫瘍内細胞で染色体不安定性が高頻度で見られる観察結果と矛盾する。

これまでに研究代表者は、染色体不安定性を高頻度に有するがん細胞を三次元培養すると、一部の核型を有する細胞群の増殖が亢進することを明らかにした。この結果は、三次元培養系を用いることで染色体不安定性がん細胞の増殖優位性獲得過程を *in vitro* で模倣することが可能であることを示唆している。

### 2. 研究の目的

これまでの研究において、がん細胞株 (HeLa 細胞) より染色体不安定性の発生頻度が異なる亜種を単離培養することに成功している。これらの細胞の増殖過程を観察した結果、染色体不安定性を高頻度に有する亜種は通常培養方法では増殖が抑制されていたが、三次元環境下で培養することで増殖能が亢進することを確認している。また、次世代シーケンサーを用いた一細胞染色体コピー数解析により、三次元培養した染色体不安定性がん細胞では核型の多様性が減少していることがわかっている。しかし、多様性を有するがん細胞集団から環境適応した細胞が如何に選択され増殖し、増殖優位性を獲得するのかその機構については不明である。

そこで本研究は、染色体不安定性を有するがん細胞が増殖優位性を獲得する際に必要な分子経路を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 (HeLa 細胞) よりクローニングした、染色体不安定性の発生頻度が異なる亜種株 (発生頻度が高い細胞: High-CIN 株、発生頻度が低い細胞: Low-CIN 株) を SiR-DNA 試薬を用いて核染色し、生細胞自動イメージングシステムを用いて 3 日間生細胞観察した。得られた画像について、オープンソース画像処理パッケージ (Fiji) に含まれる TrackMate プラグインにより視野内に含まれる全細胞核を追跡し、追跡過程で生じる細胞分裂の回数を定量した。また、これまでの結果の再現性を確認するために、限界希釈法により染色体不安定性の発生頻度が異なる新たな亜種株を単離した。これまでの High/Low-CIN 株に加えて新たに単離した亜種株より、ゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーにより全ゲノム解析を行なった。得られたシーケンスデータより、HMMcopy を用いて全染色体領域にわたるコピー数の推定を行なった。加えて、各亜種株より mRNA を単離し、次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を行なった。得られたシーケンスデータより、gene set enrichment analysis (GSEA) を実施し、各サンプル間の比較解析を行なった。増殖感受性については、各濃度の薬剤を添加した細胞に対して MTT アッセイにより定量した。

### 4. 研究成果

#### (1) 染色体不安定性を高頻度に誘発する細胞集団では細胞周期が遅延している

染色体不安定がん細胞の増殖優位性獲得過程を詳細に解析するために、染色体不安定性がん細胞 (HeLa 細胞) の増殖過程を 3 日間生細胞観察し、全細胞の増殖過程を追跡することで染色体不安定性が細胞増殖の系譜に与える影響を検証した (図 1A)。まず、親株について増殖回数を測定したらとところ、増殖抑制が抑制されている細胞が観察した細胞全体の約 30%を占めていることがわかった。一方で、観察した細胞全体の約 30%は、観察中に 8 回以上分裂 (細胞周期 3 周以上) していた。この結果から、HeLa 細胞は増殖速度が多様な細胞集団で構成されていることが示唆された (図 1B)。次に、染色体不安定性細胞の発生頻度が異なる HeLa 亜種株を用いて同様の解析を行なった。その結果、染色体不安定性の発生頻度が低い亜種株 (Low-CIN) では、3 日間のうち 1 回分裂もしくは分裂しなかった細胞が約 20%染色体不安定性の発生頻度が高い亜種株 (High-CIN) では約 40%存在していることがわかった (図 1C)。以上の結果から、染色体不安定性は細胞周期遅延を引き起こす可能性が示唆された。

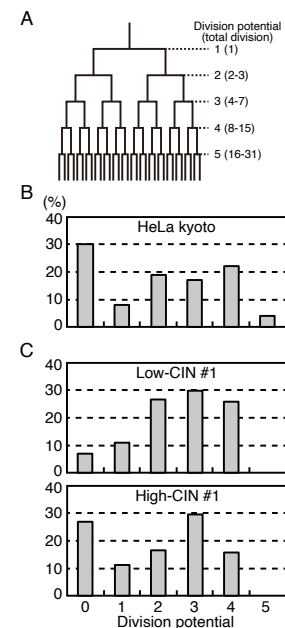


図 1. 生細胞観察時間中の分裂回数

- (2) 染色体不安定性が惹起する染色体コピー数の多様性はバルクシーケンスでは検出できない

これまでに実施した一細胞コピー数解析の結果を平均化し、Low-CIN 株と High-CIN 株、二次元培養と三次元培養それぞれにおける染色体コピー数の変化を比較すると、一部の染色体領域において特徴的なコピー数変動がみられることを確認している。この染色体領域のコピー数変動は、一細胞解析結果の平均値より推定できることから、全ゲノムバルクシーケンスによる染色体コピー数の推定によっても同様に検出可能であるか検証した。これまでの実験で取得していた Low-CIN 株と High-CIN 株に加え、更に 1 株ずつ新たに Low-CIN 株 (#2) と High-CIN 株 (#2) を単離し、全ゲノムシーケンスを実施した後、染色体コピー数を推定した。その結果、染色体不安定性の発生頻度の違いより、単離した時期 (クローン間) の違いの方が染色体コピー数に大きな変化をもたらすことがわかった (図 2)。一方で、一細胞解析結果の平均値から算出した染色体コピー数の変動はバルクシーケンスによっても一部確認することができた。この結果から、染色体不安定性によってもたらされる染色体コピー数の多様性は、バルクシーケンスによる解析では検出不可能ではあるが、特徴的なコピー数の変動については、バルクシーケンスでも検出可能であることが示唆された。

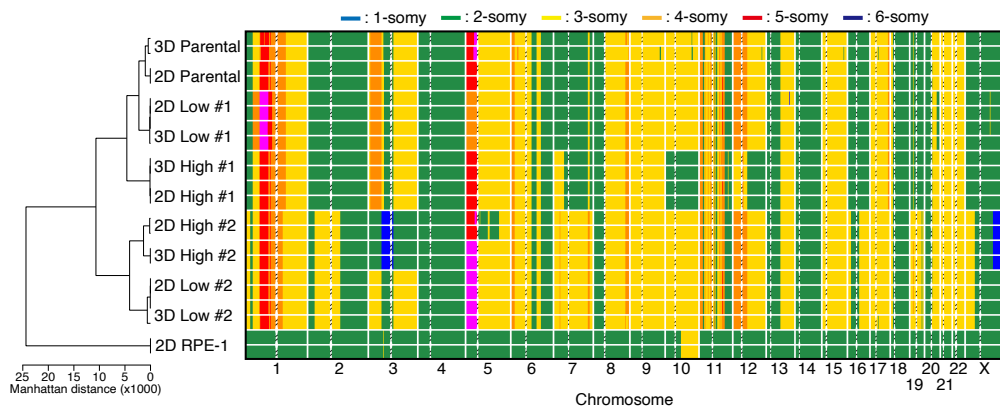


図 2. 全ゲノムバルクシーケンスにより推定した染色体コピー数

- (3) 染色体不安定性細胞における増殖優位性の獲得には KRAS 経路の活性化と UPR の減弱が寄与する

三次元培養環境下における増殖優位性獲得に必要な分子機構を明らかにするために、これまでに取得していた染色体不安定性の発生頻度が異なる HeLa 亜種株に加え、(2) において新たに単離した株について、それぞれ二次元培養及び三次元培養し、遺伝子発現 (RNA-seq) 解析を行なった。各々の条件における RNA-seq 解析結果より、gene set enrichment analysis (GSEA) を実施しその結果を比較解析したところ、High-CIN 細胞の三次元培養で特異的に変化した分子経路として、KRAS 経路の活性化と、unfolded protein response (UPR) の抑制が同定できた (図 3A)。そこで、KRAS 経路阻害剤及び、UPR 亢進薬を用いた細胞の増殖感受性試験を行なった。その結果、二次元培養条件下においては、両薬剤とも High-CIN 株、Low-CIN 株同程度に増殖を抑制することがわかった。一方、三次元培養条件下では、High-CIN 株において KRAS 経路阻害剤への感受性が亢進しており、UPR 亢進薬に対して抵抗性を示すことがわかった (図 3B)。KRAS 経路の活性化は折りたたみ不全タンパク質のクリアリングを促進することから、High-CIN 株の三次元培養における増殖亢進には、KRAS 経路活性による折りたたみ不全タンパク質の解消が寄与している可能性が示唆された。

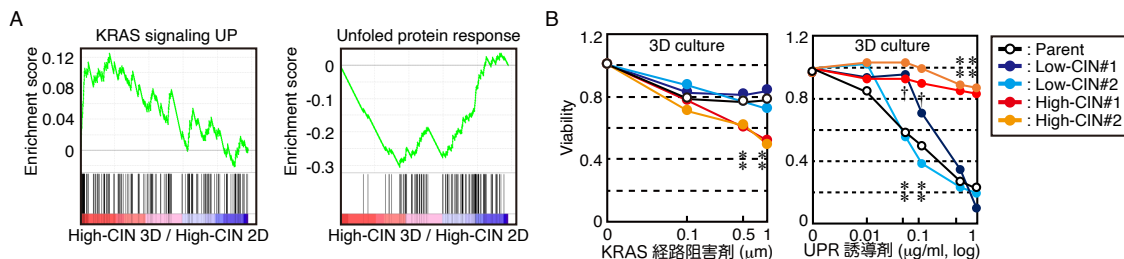


図 3. GSEA 解析で同定できた分子経路 (A) と薬剤を用いた増殖感受性試験 (B)

これまでの結果を総合すると、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、増殖選択圧が生じる環境下における増殖優位性獲得機構に必要な KRAS 経路の活性化し折りたたみ不全タンパク質を効率よくクリアリングできる細胞を生み出す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5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iemura Kenji, Natsume Toyoaki, Maehara Kayoko, Kanemaki Masato T., Tanaka Kozo	4. 巻 220
2. 論文標題 Chromosome oscillation promotes Aurora A-dependent Hec1 phosphorylation and mitotic fidelity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.202006116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hino Maho, Iemura Kenji, Ikeda Masanori, Itoh Go, Tanaka Kozo	4. 巻 112
2. 論文標題 Chromosome alignment maintaining phosphoprotein CHAMP1 plays a role in cell survival through regulating Mcl 1 expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3711～3721
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 CAMPOS MEDINA Manuel Alejandro, IEMURA Kenji, KIMURA Akatsuki, TANAKA Kozo	4. 巻 42
2. 論文標題 A mathematical model of kinetochore-microtubule attachment regulated by Aurora A activity gradient describes chromosome oscillation and correction of erroneous attachments	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 203～219
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2220/biomedres.42.203	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iemura Kenji, Yoshizaki Yujiro, Kuniyasu Kinue, Tanaka Kozo	4. 巻 13
2. 論文標題 Attenuated Chromosome Oscillation as a Cause of Chromosomal Instability in Cancer Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4531～4531
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13184531	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iemura Kenji, Anzawa Hayato, Funayama Ryo, Iwakami Runa, Nakayama Keiko, Kinoshita Kengo, Tanaka Kozo	4. 巻 -
2. 論文標題 High levels of chromosomal instability facilitate the tumor growth and sphere formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15457	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 家村顕白、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

1. 発表者名 家村顕白、田中耕三
2. 発表標題 増殖選択圧を受けたがん細胞の増殖優位性獲得過程における染色体不安定性の役割
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 家村顕白、田中耕三
2. 発表標題 分裂期中期のキネトコアにおける空間的制御は染色体分配の堅牢性に寄与する
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kenji Iemura, Kozo Tanaka
2. 発表標題 Metaphase chromosome dynamics ensures faithful chromosome segregation
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 家村顕自、田中耕三
2. 発表標題 増殖選択圧下のがん細胞増殖における染色体不安定性の役割
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第87回例会・シンポジウム
4. 発表年 2021年

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による染色体安定性の維持機構
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenji Iemura, Kozo Tanaka
2. 発表標題 Reduced mitotic chromosome dynamics causes chromosomal instability in cancer cells
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 家村顕白、田中耕三
2. 発表標題 がん細胞の増殖優位性獲得過程における染色体不安定性の役割
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 家村顕白、石川裕大、都築美香、國安絹枝、田中耕三
2. 発表標題 クロモキネシンは染色体腕部の早期分離を抑制する
3. 学会等名 第39回染色体ワークショップ・第20回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 家村顕白、田中耕三
2. 発表標題 染色体オシレーション運動による堅牢な染色体分配システムは細胞老化の進行とともに抑制される
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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