

令和元年6月7日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05542

研究課題名(和文) 染色体パッセンジャー複合体タンパクの分解とその破綻による口腔発癌機構の解明と制御

研究課題名(英文) Clarification of the mechanism of oral carcinogenesis by the defect of degradation of chromosome passenger complex protein

研究代表者

工藤 保誠 (KUDO, Yasusei)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・准教授

研究者番号：50314753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞分裂において複製した染色体を正確に分配することは、個体の発生や生命の次代への継承にとって必須である。染色体分配異常により生じる染色体数の過不足は染色体不安定性とよばれ、癌化を引き起こす重要なステップであるが、その原因は未だ明らかにされていない。本研究では染色体分配制御に必要不可欠な役割を果たす染色体パッセンジャー複合体の構成因子であるBorealinに着目し、その分解制御機構とその制御機構の破綻がもたらす口腔発癌機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、染色体分配という生命を根本で支える極めて重要なイベントの詳細なメカニズムをユビキチン分解に着目して明らかにし、その制御異常による口腔発癌機構を解明することを目的としている。本研究成果は、ユビキチン分解制御の破綻が染色体分配異常を介して癌化を引き起こすという新たな癌化機構を提唱するものと考えられる。本研究で着目する染色体分配異常は、癌で必須の異常であることから、特異性の高い分子標的治療薬の開発のみならず、口腔癌の新規診断マーカーとしての応用にも繋がり、新たな診断・治療戦略に発展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Accurate distribution of replicated chromosomes in cell division is essential for the development of an individual and the inheritance of life to the next generation. The excess or deficiency of the number of chromosomes caused by chromosomal segregation abnormality is called chromosomal instability and is an important step to cause carcinogenesis, but the cause has not been clarified yet. In this study, we focused on Borealin, a component of the chromosome-passenger complex that plays an essential role in controlling chromosome segregation. We clarified its mechanism of degradation and its mechanism of oral carcinogenesis.

研究分野：口腔病理学

キーワード：細胞周期 染色体パッセンジャー複合体 ユビキチン分解

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞分裂において複製した染色体を正確に分配することは、個体の発生や生命の次代への継承にとって必須である。染色体分配異常により生じる染色体数の過不足は染色体不安定性とよばれ、癌化を引き起こす重要なステップであるが、その原因は未だ明らかにされていない。組織学的にも癌細胞では、染色体数の過不足による核の大型化や異型核分裂像が高頻度に観察される(図1参照)。染色体分配制御に必要な不可欠な役割を果たすものとして染色体パッセンジャー複合体

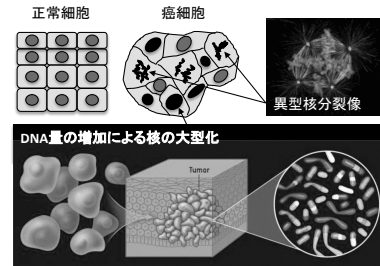


図1. 正常では、同じ大きさの核を持つ細胞が極性を保っているのに対して、癌細胞では、核/細胞質比(N/C比)の増大、核クロマチンの増強(hyperchromatism)や異型核分裂像(atypical mitosis)の出現が認められる。

(Chromosome Passenger Complex: CPC) が知られており、酵母からヒトまで高度に保存されている。CPCは、その活性の中心となる Aurora-B キナーゼ、その活性を制御する Survivin や Borealin、複合体の足場として働く INCENP の4つのタンパクより構成されている(Nat Rev Mol Cell Biol, 2007)(図2参照)。CPCタンパクは、細胞分裂を終えるとユビキチン分解され、その機能を終わると考えられているが、未だその機構は明らかにされていない。興味深いことに、これらのCPCタンパクは、種々の癌組織で高発現が報告されており、癌化への関与や治療の標的分子として近年注目されている。申請者らも Aurora-B と Survivin が口腔癌組織において共発現し、癌の悪性度とよく相関することを報告している(Virchows Arch, 2007; Oral Oncol, 2010)。CPCタンパクの過剰発現は、染色体分配異常を引き起こし、染色体不安定性を介して癌化に関与すると考えられるが、これらタンパクの過剰発現が起こる機序やそれによる癌化機構は未だ明らかにされていない。

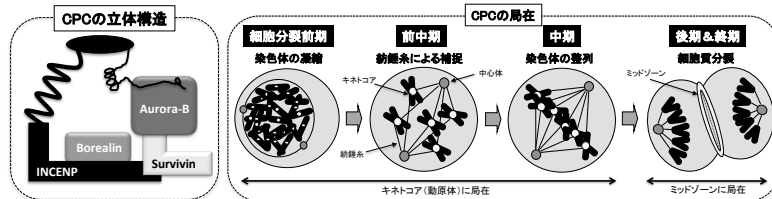


図2. CPCタンパクは、Aurora-B、Borealin、Survivin、INCENPからなる複合体で、Aurora-Bは活性中心として、INCENPは足場として働くことが知られている。CPCは、細胞分裂期において、下図に示すような局在を示し、染色体分配を制御する。具体的には、CPCは動原体とスピンドル微小管との結合を不安定化する活性を持ち、分裂期に姉妹動原体(スピンドル微小管の結合部位)のあいだに位置するセントロメア領域に局在するため、間違った結合を特異的に不安定化する。染色体の2方向性が確立するとセントロメアと動原体の距離が離れるため、動原体とスピンドル微小管との結合が安定化され、正常に染色体が分配されると考えられている。染色体の2方向性を確立する(正常な染色体分配)ためにはCPCがセントロメアに局在し、染色体とスピンドル微小管との間違った結合を修正することが重要である。

が口腔癌組織において共発現し、癌の悪性度とよく相関することを報告している(Virchows Arch, 2007; Oral Oncol, 2010)。CPCタンパクの過剰発現は、染色体分配異常を引き起こし、染色体不安定性を介して癌化に関与すると考えられるが、これらタンパクの過剰発現が起こる機序やそれによる癌化機構は未だ明らかにされていない。

申請者らは、CPCタンパクの構成因子の1つである Borealin のノックダウンが、他の CPC 構成タンパク(INCENP、Aurora-B、Survivin)の安定性を低下させることを見出した(図3参照)。これは、Borealin タンパクの安定性が CPC タンパクの安定性を制御することを示唆している。そこで、申請者は、Borealin タンパクのユビキチン分解異常による安定化が他の CPC タンパクのユビキチン分解を阻害し、過剰発現を引き起こすのではないかと考えた。さらに、予備実験ではあるが、Borealin タンパクが APC/C<sup>Cdh1</sup>(Anaphase Promoting Complex/Cyclosome)によりユビキチン分解されることを見出した。APC/Cは複合体型ユビキチンリガーゼで、co-activator である Cdh1 と結合し、細胞分裂後期から G1 期に活性化される。活性化した APC/C<sup>Cdh1</sup>は、細胞分裂に関わる Cyclin A, Cyclin B, Aurora-A, さらに CPC タンパクの1つである Aurora-B をユビキチン化する。本研究では APC/C<sup>Cdh1</sup>による Borealin のユビキチン分解機構に着目し、その染色体分配制御における役割とその破綻がもたらす口腔発癌機構を解明する研究を着想した。

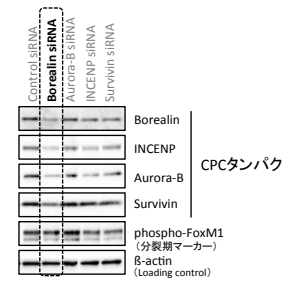


図3. CPCタンパクをそれぞれsiRNAによりノックダウンし、分裂期に同調した細胞では、Borealinのノックダウンした細胞で、他のCPCタンパクであるINCENP、Aurora-B、Survivinの発現が低下している。

### 2. 研究の目的

本研究では、染色体分配を制御する CPC に着目し、その安定性を司ると考えられる Borealin のユビキチン分解制御機構とその破綻による口腔発癌機構について、①Borealin タンパクの安定性がもたらす CPC タンパクのユビキチン分解制御と染色体分配制御機構の詳細、②Borealin のユビキチン分解制御機構の破綻がもたらす染色体分配異常の口腔発癌への関与、③口腔癌症例における Borealin の発現と他の CPC タンパクの発現や臨床病理学的事項との関連を明らかにすることを目的としている。本研究成果は、口腔癌発生機構の理解と分子標的療法の開発や診断への応用につながる事が期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) Borealin のユビキチン分解制御機構の解明

① Borealin の APC/C<sup>Cdh1</sup> によるユビキチン分解 申請者らの予備実験において、Borealin が APC/C<sup>Cdh1</sup>により G1 期においてユビキチン分解される可能性があることを見出した。そこで、その詳細を明らかにするために、以下の解析を行う。

① Cdh1 の過剰発現による Borealin の分解 APC/C<sup>Cdh1</sup>の基質タンパクが Cdh1 の過剰発現により分解されることから、HeLa 細胞に HA タグを付与した Cdh1 (HA-Cdh1) および FLAG タグを付与した Borealin (FLAG-Borealin) を遺伝子導入し、HA-Cdh1 の過剰発現による FLAG-Borealin タン

パクの発現低下を検討する。

② Cdh1 siRNA 導入および Cdh1 ノックアウト細胞における Borealin タンパクの安定化 Cdh1 siRNA を HeLa 細胞に導入し、細胞をノコダゾールで分裂期に同調させ、そこから G1~S 期へリリースして経時的に細胞を回収し、Borealin の発現を検討する。また、Cdh1 のノックアウトマウスから採取した胎児線維芽細胞 (Mef) を用いて、同様の検討を行う。

③ Borealin と Cdh1 の結合 FLAG-Borealin と HA-Cdh1 をともに遺伝子導入し抗 FLAG 抗体あるいは抗 HA 抗体で免疫沈降し、Borealin と Cdh1 の結合を検討する。さらに、Borealin あるいは Cdh1 の抗体で免疫沈降し、内在性の結合も検討する。

④ APC/C<sup>Cdh1</sup> による Borealin の *in vitro* および *in vivo* ユビキチン化解析 Borealin の APC/C<sup>Cdh1</sup> によるユビキチン化を *in vitro* および *in vivo* で解析する。具体的には、HA タグを付与したユビキチン (HA-Ub) と FLAG-Borealin を共発現させ、抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、SDS-PAGE にて抗 HA 抗体で blot することにより、*in vivo* でのユビキチン化を検討する。また、*in vitro* translation により作成した FLAG-Borealin タンパクを用いて、E1 ユビキチン結合酵素、E2 ユビキチン活性化酵素、HeLa 細胞から免疫沈降により精製した APC/C<sup>Cdh1</sup> 複合体および ATP を加えて、*in vitro* でユビキチン化反応をさせ、SDS-PAGE によりユビキチン化バンドを検出する。

⑤ Borealin の分解ドメインの検索 APC/C<sup>Cdh1</sup> は RxxL や KEN といったアミノ酸配列を分解ドメインとして認識し、ユビキチン分解することが知られている。実際に、Borealin タンパクは、KEN の配列は有さないが、3つの RxxL 配列を有している。そこで Borealin に存在する RxxL の配列を AxxA に変異させ、変異体でユビキチン分解の抑制がみられるかを検討する。もし、これらの分解ドメインが Borealin における APC/C<sup>Cdh1</sup> による認識配列ではない場合は、種々のアミノ酸配列を欠損させた欠失変異体 (例えば、N 末端の 50 アミノ酸、C 末端の 50 アミノ酸など) を作成し、HA-Cdh1 との結合を指標に免疫沈降により分解に重要な配列を特定する。

## (2) CPC タンパクによる染色体分配制御における Borealin タンパクのユビキチン分解の役割

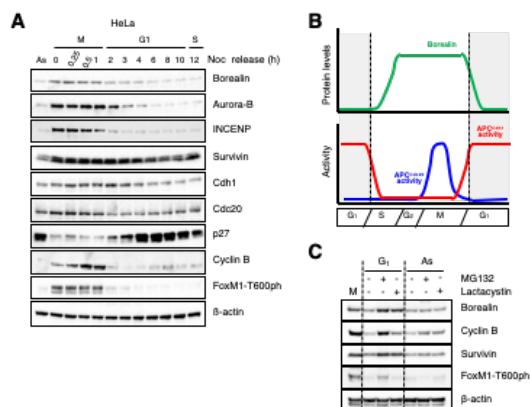
① Borealin の野生型および分解抑制変異体の染色体分配における局在の解析 上記検討で明らかにした Borealin のユビキチン分解に重要な配列を変異させ、ユビキチン分解されない変異体を用いる。Borealin 変異体の細胞周期における局在と G1 期における安定化を検討する。

② Borealin の分解抑制が他の CPC タンパクの安定性や染色体分配に及ぼす影響 Borealin 変異体による他の CPC タンパク (Survivin, Aurora-B, INCENP) の安定性を検討する。さらに、Borealin のユビキチン分解異常が染色体分配に及ぼす影響を検討する。FLAG タグを付与した Borealin の野生型あるいは変異体を発現させた細胞で、①分裂期~G1 期における内在性の Survivin, Aurora-B, INCENP の発現動態をウェスタンブロット法により解析、②Survivin, Aurora-B, INCENP の抗体で蛍光免疫染色を行い、発現と局在を蛍光顕微鏡により観察、③分裂期~G1 期における細胞分裂動態を蛍光顕微鏡によりタイムラプス観察する。

## (3) 口腔癌における Borealin と他の CPC タンパクの発現との関連や悪性度との相関

我々は、これまでに口腔扁平上皮癌組織における Aurora-B と Survivin の核内での共発現が、悪性度とよく相関することを報告している。そこで、本研究では口腔扁平上皮癌の生検症例における Borealin および INCENP の発現を免疫組織化学的染色法により検討し、Aurora-B や Survivin の発現と比較検討するとともに、癌の分化度、ステージ分類、リンパ転移の有無などの臨床病理学的事項との関連も検討する。

図 4



## 4. 研究成果

CPC の構成因子である Borealin は、図 4A, B に示すように、細胞分裂期において発現し、G1 期でその発現が低下する。G1 期の細胞に、プロテアソーム阻害剤である MG132 および Lactacystin を投与すると、その発現が上昇する (図 4C)。Borealin の発現低下は、ユビキチンリガーゼである APC/C<sup>Cdh1</sup> の活性と負の相関があることから (図 4B)、Borealin が G1 期において APC/C<sup>Cdh1</sup> によりユビキチン分解される可能性があることを見出した。そこで、まず、Cdh1 と Borealin の結合を免疫沈降および GST プルダウンアッセイにより検討した (図 5A, B)。次に、Cdh1 の過剰発現による Borealin の発現を検討したところ、Cdh1 の過剰発現による Borealin の発現低下を確認した (図 5C)。さらに、Cdh1 のノックダウンは G1 期において Borealin タンパクを安定化させた (図 5D)。実際に、Borealin の APC/C<sup>Cdh1</sup> によるユビキチン化を *in vivo* で解析したところ、Cdh1 のノックダウンはユビキチン化を阻害した (図 5E)。In vitro のユビキチン化に関しては、技術的に困難であった。以上より、G1 期において Borealin タンパクが APC/C<sup>Cdh1</sup> によりユビキチン分



解されることを明らかにした。

次に、APC/C<sup>Cdh1</sup> は RxxL や KEN といったアミノ酸配列を認識し、ユビキチン化することが知られているため、Borealin の分解ドメインの検索を行った。まず、Borealin タンパクは、3つの RxxL 配列を有していたが、いずれも分解ドメインではなかった (data not shown)。そこで、種々のアミノ酸配列を欠損させた欠失変異体を作成し、HA-Cdh1 との結合を指標に免疫沈降により分解に重要な配列の特定を試みた。その結果、N 末端に存在する 5つのアミノ酸が Cdh1 との結合に必須であることが明らかとなった (図 6A)。その変異体である Borealin 5E は、Cdh1 と結合できない (図 6B)。さらに、ユビキチン化も阻害されることを確認した (図 6C)。ノコダゾールで M 期に同調し、G1 期に進行させた際に、野生型 Borealin (WT) は分解により発現低下が見られたが、5E 変異体は分化されずに安定化していた (図 6D)。Borealin 5E を過剰発現した細胞では、他の CPC タンパクである Survivin、Aurora-B、INCENP の G1 期における発現低下が阻害された (data not shown)。さらに、Borealin をテトラサイクリン誘導性に shRNA によりノックダウンさせたところ、他の CPC タンパクの発現も低下することを見出した。すなわち、Borealin タンパクの分解が引き金となって、CPC の機能が終わるのではないかと考えられた。癌細胞では、Borealin タンパクの過剰発現により、他の CPC タンパクを安定化させることが示唆された。しかしながら、Borealin 5E の過剰発現は、細胞分裂には影響を与えなかった。現在、Borealin 分解欠失変異体における細胞分裂以外の phenotype を解析中である。

研究の過程で、APC/C が胚性幹細胞において、その活性が抑制されていることが報告された。そこで、胚性幹細胞モデルである胚性癌細胞株 (NCC-IT-A3 細胞) を用いて、Borealin の発現を検討した。NCC-IT-A3 細胞は、細胞周期を通じて、その活性を抑制する分子である Emi1 の発現が安定化している (図 7A)。これは、細胞周期を通じて APC/C の活性が低下していることを示している。

これにより、Borealin の発現が細胞周期を通じて安定化していることを見出した

(図 7A)。驚くべきことに、NCC-IT-A3 細胞における Borealin のノックダウンは、分化マーカーの発現上昇を引き起こした (図 7B、C)。この結果は、胚性幹細胞において Borealin が未分化能維持に関わることを示している。

さらに、Cdh1 のノックアウトマウス (FZR<sup>-/-</sup>マウス) の Mef を用いて、Borealin の安定化の影響を検討した。野生型 Mef (FZR<sup>+/+</sup>) では、G1 期に Borealin が分解されるのに対して、FZR<sup>-/-</sup> Mef は、細胞周期を通じて安定化していた (図 8A)。CPC は、分裂期に Aurora-B キナーゼ活性を介して様々な基質タンパクをリン酸化する。代表的な基質であるヒストン H3 Ser10 のリン酸化 (H3S10ph) を見ると、FZR<sup>-/-</sup> Mef では細胞周期を通じてリン酸化が認められた (図 8A)。さらに、間期の細胞で H3S10ph の foci が認められた (図 8B: 矢頭は分裂期の細胞を示し、矢印は間期の細胞を示す)。FZR<sup>-/-</sup> Mef では、G1 期の短縮 (S 期を示す BrdU 陽性細胞率のピークが早期におこる) が認められるが、Aurora-B キナーゼ阻害剤である Barasertib の投与により、

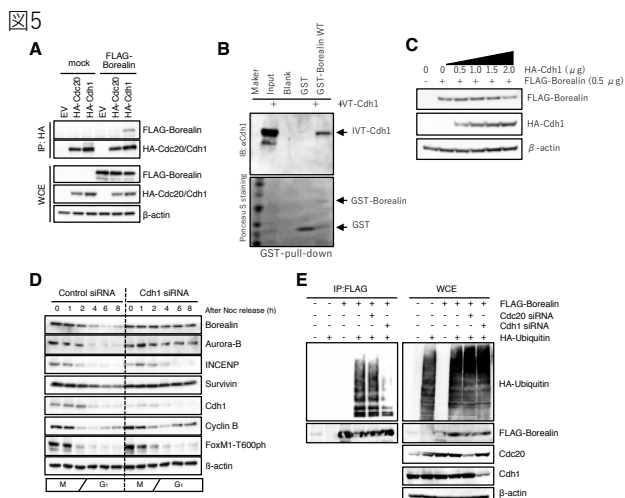


図 6

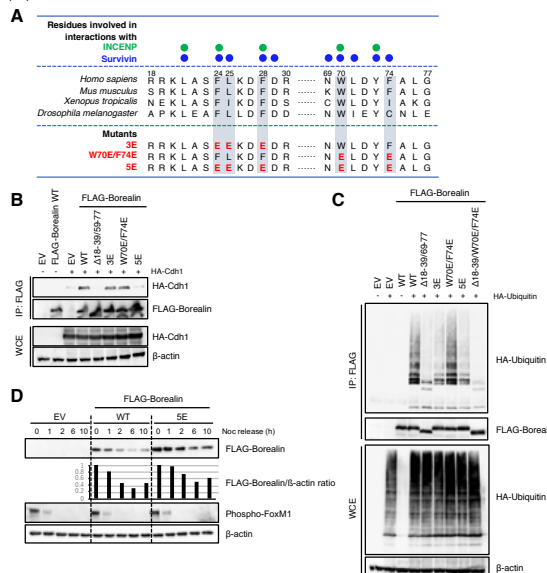
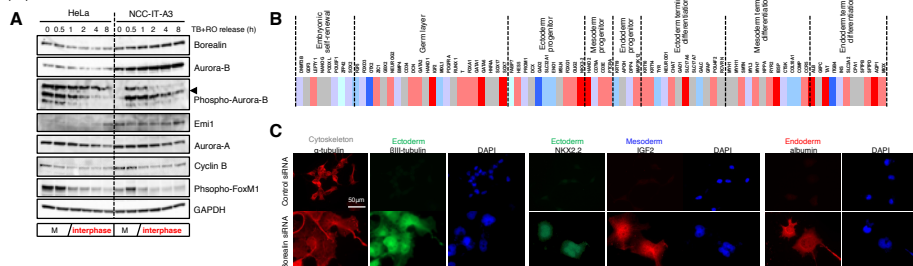
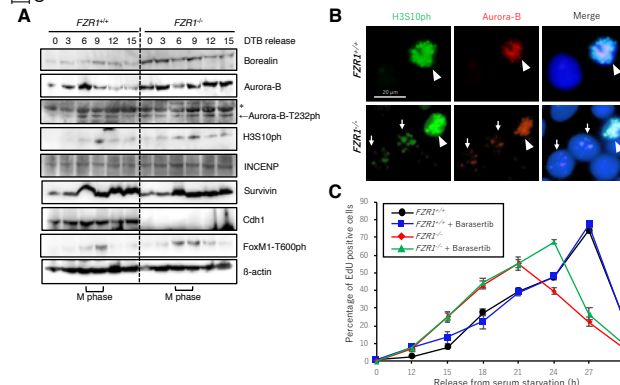


図 7



rdU 陽性細胞率のピークが FZR<sup>+/+</sup>と同様にまでレスキューされた (図 8C)。これは、Borealin の安定化が恒常的な CPC 活性を介して G1 期の短縮を引き起こし、胚性幹細胞でみられる細胞周期制御を引き起こすことを示唆している。また、胚性幹細胞においても FZR<sup>-/-</sup> Mef と同様に、細胞周期を通じた CPC 複合体の形成と H3S10ph を確認した (data not shown)。この結果は、胚性幹細胞において細胞周期を通じて CPC 活性が維持されていることを示している。さらに、胚性幹細胞における

図8



Borealin のノックダウンや Barasertib の投与は、分化マーカーの発現上昇を引き起こすことを見出し、CPC が胚性幹細胞の未分化能維持に関与するという新規メカニズムを発見した。

また、口腔癌組織で Borealin および INCENP の発現を免疫組織化学的染色法により検討し、Aurora-B や Survivin の発現と比較検討するとともに、癌の分化度、ステージ分類、リンパ転移の有無などの臨床病理学的事項との関連も検討したところ、Borealin の発現は、INCENP および Aurora-B の発現とよく相関していた。さらに、Borealin の発現は、癌の分化度、ステージ分類、リンパ転移を含めた悪性度ともよく相関していた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Liu T, Liu J, Chen Q, Jin S, Mi S, Shao W, Kudo Y, Zeng S, Qi G. Expression of USP22 and the chromosomal passenger complex is an indicator of malignant progression in oral squamous cell carcinoma. *Oncol. Lett.* 17(2):2040-2046, 2019. doi: 10.3892/ol.2018.9837. 査読あり
- ② Kudo, Y\*. Predicting cancer outcome: Artificial Intelligence vs Pathologists. *Oral Diseases* 25(3):643-645, 2019. doi: 10.1111/odi.12954. \*Corresponding author 査読あり
- ③ Siriwardena, B.S.M.S., Tsunematsu, T., Ishimaru, N., Kudo, Y\*. Invasion related factors as potential diagnostic and therapeutic targets in oral squamous cell carcinoma- A review. *Int. J. Mol. Sci.* 19:1462, 2018. doi: 10.3390/ijms19051462. \*Corresponding author 査読あり
- ④ Qi, G., Liu, J., Mi, S., Tsunematsu, T., Jin, S., Shao, W., Liu, T., Ishimaru, N., Tang, B., Kudo, Y.\* Aurora kinase inhibitors in head and neck cancer. *Curr. Top. Med. Chem.* 18(3):199-213, 2018. doi: 10.2174/1568026618666180112163741. \*Corresponding author 査読あり

[学会発表] (計 9 件)

- ① 染色体パッセンジャー複合体による多能性幹細胞の未分化能維持機構. 常松貴明, 河合秀彦, 石丸直澄, William C. Earnshaw, Michele Pagano, 工藤保誠(演者). 第36回染色体ワークショップ (宝塚市), 2009年1月23-25日.
- ② 多能性幹細胞において APC/C<sup>Cdh1</sup> による Borealin の分解は分化を誘発する. 常松貴明, 石丸直澄, 工藤保誠(演者). 第41回日本分子生物学会年会 (横浜市), 2018年11月28-30日.
- ③ 特別講演: 細胞周期調節を標的としたがん幹細胞の分化誘導とその臨床応用の可能性. 工藤保誠. 2018 先端医学研究交流セミナー「がん・白血病~先端研究の現状~」(徳島市), 2018年8月31日.
- ④ Takaaki Tsunematsu, Naozumi Ishimaru, and Yasusei Kudo(演者). APC/C<sup>Cdh1</sup>-mediated degradation of Borealin triggers differentiation of pluripotent stem cells. FASEB meeting "Ubiquitin and Cellular Regulation (Snowmass Village, CO, USA), June 17-22, 2018.
- ⑤ Chromosome passenger complex protein, Borealin is regulated by APC/C<sup>Cdh1</sup> ubiquitin ligase and maintains pluripotent state in pluripotent stem cells. Takaaki Tsunematsu, Naozumi Ishimaru, and Yasusei Kudo (演者). Gordon Research Conference: Cell Growth & Proliferation (Mount Snow, Vermont, USA), July 9-14, 2017.
- ⑥ 胎児性癌細胞におけるユビキチンプロテアソーム経路による未分化性維持機構. 常松貴明, 工藤保誠, 山田安希子, 新垣理恵子, 小川博久, 常山幸一, 石丸直澄. 第106回日本病理学会総会(東京都), 2017年4月27-29日.
- ⑦ Chromosome passenger complex protein, Borealin is regulated by APC/C<sup>Cdh1</sup> ubiquitin ligase complex. Takaaki Tsunematsu, Naozumi Ishimaru, and Yasusei Kudo (演者). Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: The Ubiquitin Family (Cold Spring Harbor, NY, USA), Apr. 20, 2017.
- ⑧ The APC/C<sup>Cdh1</sup>-Borealin axis has critical role in the maintenance of undifferentiated state in embryonal carcinoma cells. Takaaki Tsunematsu, Naozumi Ishimaru, Yasusei Kudo(演者). 8th International Conference SUMO, Ubiquitin, UBL Proteins- Implications for Human Diseases, Shanghai, October 21-23, 2016.

- ⑨ 基礎系教育講演「細胞周期制御異常とがん」：工藤保誠：四国歯学会第49回例会（徳島大学歯学部），2016年6月23日。

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

[http://yasusei.web.fc2.com/Yasusei\\_Kudo/Welcome.html](http://yasusei.web.fc2.com/Yasusei_Kudo/Welcome.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：石丸 直澄

ローマ字氏名：ISHIMARU, Naozumi

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部（歯学域）

職名：教授

研究者番号（8桁）：60314879

研究分担者氏名：岡本 哲治

ローマ字氏名：OKAMOTO, Tetsuji

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健康学研究科（歯）

職名：教授

研究者番号（8桁）：00169153

研究分担者氏名：宮本 洋二

ローマ字氏名：MIYAMOTO, Youji

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部（歯学域）

職名：教授

研究者番号（8桁）：20200214

研究分担者氏名：河合 秀彦

ローマ字氏名：KAWAI, Hidehiko

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健学研究科（薬）

職名：准教授

研究者番号（8桁）：30379846

研究分担者氏名：常松 貴明

ローマ字氏名：TSUNEMATSU, Takaaki

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部（医学域）

職名：助教

研究者番号（8桁）：70726752

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。