

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：82606

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23929

研究課題名（和文）遺伝的多様性を有する癌細胞間の環境適応勝者の決定機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism for determining the winner of cell competition among cancer cells with genetic diversity

研究代表者

山盛 智子（森田智子）（Yamamori Morita, Tomoko）

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・特任研究員

研究者番号：10767750

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究実施期間中に染色体不安定順応性モデルとして異数体化細胞を樹立した。異数体化細胞は樹立過程で約90%の細胞が死滅し、異数体化には大きな細胞ストレスを伴うことを示した。約10%の生存細胞は主に4倍体の核型で存在し、親細胞と同等の増殖能を有する。異数体化細胞は親細胞と比較して、老化細胞の特徴的な形態を示し、SA-b-galactosidaseの陽性率も高かった。また、特定の条件下で異数体化細胞は顕著なATP量の減少を示した。各種オミックス解析の結果から、異数体化細胞は、遺伝子変異や転写活性化領域の構造変化は起こさずに、アミノ酸・脂質代謝経路を変化させることで環境に適応していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究対象はがん細胞が持つ特徴の一つ、染色体不安定性です。

染色体不安定性は細胞にとってストレスが大きい現象で、約9割の細胞が死んでしまう事を明らかにしました。一方、約10%の細胞はストレスを克服して生き残り、増殖します。生き残った細胞が持つ特徴や個性を特定し、がん治療の標的にすることを目的としています。

今回の研究成果は染色体不安定性を持つ異数体化細胞が、親細胞と同じように増殖する一方、細胞老化の特徴を併せ持つことを明らかにしました。また、特定の条件下では細胞が脆弱性を示すことが分かりました。各解析結果を統合すると、異数体化細胞は代謝経路を変化させることで周囲の環境に適応していると推測できます。

研究成果の概要（英文）：As a model of chromosomal instability adaptability, we established a cell line that is stably aneuploid. During the establishment of the cell line, about 90% of cells died, indicating that being aneuploid is highly stressful to the cells. Approximately 10% of surviving cells are mainly tetraploid and have the same proliferative capacity as the parent cells. As compared to the parent cells, the aneuploid cells showed a characteristic morphology similar to senescent cells and high positive rate of SA-b-galactosidase. In addition, under certain conditions, aneuploid cells showed a marked decrease in ATP levels. From the results of various omics analysis, it is considered that aneuploid cells adapt to the environment by changing amino acid / lipid metabolism pathways without causing gene mutations or structural changes in transcriptional activation regions.

研究分野：染色体不安定性

キーワード：がん 染色体不安定性 細胞競合

1. 研究開始当初の背景

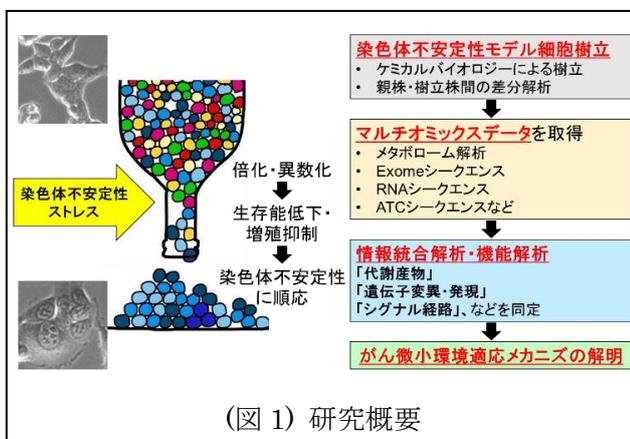
染色体の不均衡分配と発癌の関与は 1914 年に Theodor Boveri により「癌の染色体異常説」として示唆されていた。近年になり、染色体不安定性に関連する因子として細胞周期チェックポイント・有糸分裂制御・DNA 修復機構が明らかにされてきており、これらの機能不全を標的とした治療法の開発が国内外で進められている。しかしながら、癌細胞が遺伝的多様性を活用して環境に適応する機構は解明されていない。染色体不安定性に順応した癌細胞は、高度な環境適応能力を備え細胞競合に打ち勝っていると考えられ、その機構の解明は、癌の進展や治療抵抗性を理解し、新たな癌治療法を開発する上で極めて重要と思われる。本研究では、癌細胞の環境適応能力の解明における重要な「問い」である遺伝的多様性を有する癌細胞間の競合勝者決定機構の解明に取り組む。

2. 研究の目的

正常組織では有糸分裂期 (M 期) の染色体分配は厳密に制御されており、有糸分裂チェックポイント (Spindle Assembly Checkpoint; SAC) と呼ばれるチェック機構によって染色体安定性が維持されている。しかし一方で、多くの癌細胞では染色体多倍性や異数性などの染色体不安定性が観察される。癌細胞の染色体不安定性は、正常細胞から癌細胞に形質転換する過程で SAC の監視をすり抜けて獲得した「遺伝的多様性の獲得形質」であり、この「遺伝的多様性」によって、低酸素や栄養飢餓など癌細胞を取り巻く過酷な環境変化に対して癌細胞がうまく順応しうると考えられる。本研究では、染色体不安定性による癌細胞の遺伝的多様性が、遺伝子変異などの癌細胞の内的要因、又は栄養飢餓などの外的要因の変化によって、どのように競合し競合の勝者になるのかを分子レベルで明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

染色体が比較的安定で二倍体の核型を有している HCT116 細胞 (MSI 型ヒト大腸癌細胞株) を親細胞として用いる。親細胞に対し Aurora-B キナーゼ阻害剤 AZD-1152 を用いて倍化異数体モデル細胞を樹立する。一般的に、倍化異数体細胞は肥大化することから、その肥大化した細胞サイズを維持するために、栄養の取込みや代謝、タンパク質合成などを活性化して、細胞内ホメオスタシスを再構築していることが予想される。癌微小環境を模した培養条件下での細胞の挙動を、メタボローム解析、RNA-seq、Exome-seq、ATAC-seq など多角的アプローチを用いて解析する。得られた情報について、生物情報学 (BI) 的手法を用いて統合解析し、親細胞と倍化異数体細胞で異なる発現パターンを示す遺伝子群・シグナル経路・代謝産物を同定する (図 1)。



(図 1) 研究概要

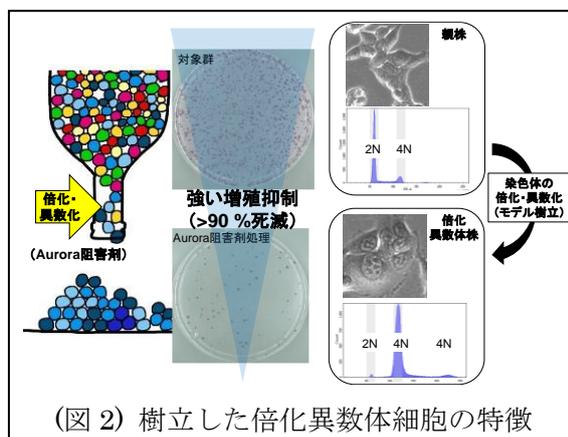
4. 研究成果

本研究の独自性と創造性は以下の 2 点である。1 点目は、Aurora-B キナーゼ低分子阻害剤 (Aurora-B i) を用いたケミカルバイオロジーにより異数体化モデル細胞を簡易に作製した点にある。本作製法を用いれば、理論的には「いかなる癌細胞や正常細胞の異数体化モデル」も簡易に作製可能となる。2 点目は、上記オリジナルモデルを用いたマルチオミクス解析・統合解析を行い、「染色体不安定性の環境適応ネットワーク」を俯瞰的に捉えようとする点にある。前述したように、「異数体化癌細胞の環境適応能力における網羅的ネットワーク解析」に焦点を当てており、申請者の知る限り先行論文の報告はない。以上のことから、本研究は非常に独創的で新規性に富む研究であると考えられる。

得られた結果は大きく 4 つに分類できる。

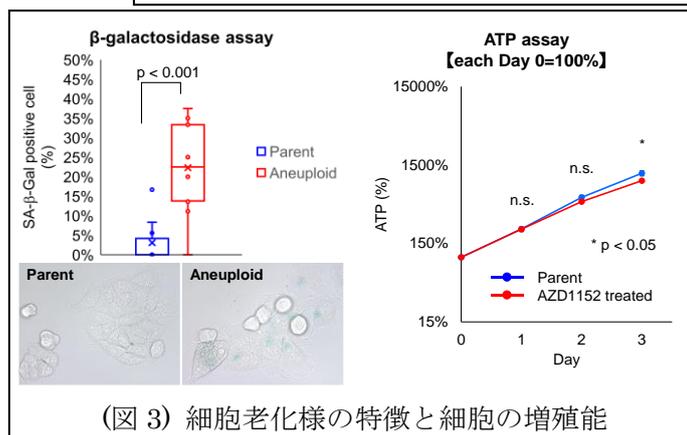
(1) 倍化異数体細胞の樹立 : Aurora-B i (AZD-1152, 100 nM) は細胞周期 1 サイクル間 (24 時

間)のみ処理を行い、その後は Aurora-B i 無添加培地で 10 日間培養し、倍化異数体細胞を樹立した。樹立時には約 90%の細胞が死滅したことから (図 2 左)、染色体の異数化は細胞に大きなストレス (染色体不安定性ストレス) を与えること、またこれら「倍化異数体細胞」は染色体不安定性ストレスにうまく順応し、増殖能を維持していることが明らかとなった。樹立した倍化異数体細胞は主に 4 倍体の核型で存在しながら分裂・増殖している (図 2)。



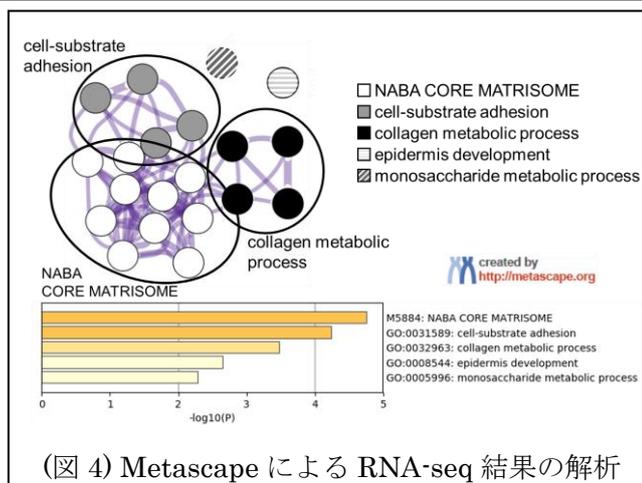
(図 2) 樹立した倍化異数体細胞の特徴

(2) 倍化異数体細胞の特徴：老化細胞の表現型である扁平・肥大化した細胞形態をとることから、SA- β -galactosidase の活性評価を行った。倍化異数体細胞で有意に SA- β -galactosidase 陽性細胞率が高く、細胞老化様の特徴を示すことを明らかにした (図 3 左)。また、細胞の増殖能を比較するために、ATP assay を行ったところ、倍化異数体細胞は親細胞と同等の増殖能を示した (図 3 右)。



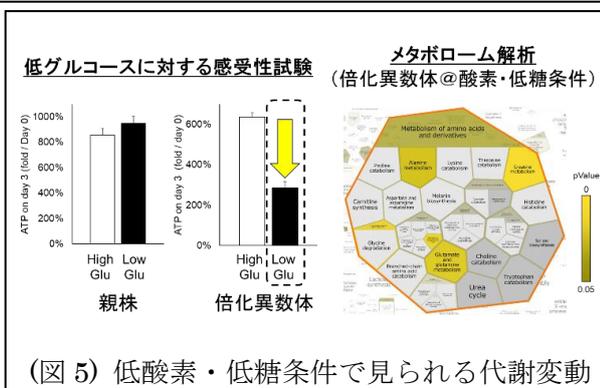
(図 3) 細胞老化様の特徴と細胞の増殖能

(3) 親細胞と倍化異数体細胞の RNA 発現レベルの比較：染色体不安定性の環境適応ネットワークを調べるため、RNA-seq による親細胞と倍化異数体細胞間の遺伝子発現比較を行った。親細胞と比較して、倍化異数体細胞で RNA 発現量が 2 倍以上に変動した遺伝子を抽出し、ネットワーク解析を行った。倍化異数体細胞では細胞外マトリクスやコラーゲン代謝に加え、単糖代謝経路の関連遺伝子の発現量が亢進していることが明らかになった。(図 4)。これらの結果は、「細胞内の糖代謝経路の変動」と「染色体不安定性ストレス順応性」の関連性を示唆している。



(図 4) Metascape による RNA-seq 結果の解析

(4) 低酸素・低糖条件下での倍化異数体細胞の代謝産物解析：次に、糖代謝の影響を調べるために、低酸素・低糖条件下での細胞増殖能を調べた。遺伝子発現データが示唆したように、倍化異数体細胞が低酸素、低糖に対し強い脆弱性を示した (図 5 左)。低酸素・低糖条件下での倍化異数体細胞の代謝産物の挙動について、メタボローム解析を用いて調べたところ、倍化異数体細胞は低酸素・低糖条件下で特異的に脂質代謝・アミノ酸代謝の代謝産物が有意に変化していることが明らかになった (図 5 右)。



(図 5) 低酸素・低糖条件で見られる代謝変動

以上の研究成果から、倍化異数体細胞は染色体不安定性ストレスを介した抗増殖圧を克服し、親株と同等の増殖速度を有する事を明らかにした。一方、低酸素・低糖条件下では脆弱性を示し、細胞の ATP 量が顕著に減少することを見出した。また、メタボローム解析では倍化異数体細胞の低酸素・低糖条件下特異的に脂質代謝・アミノ酸代謝系の変化があるという結果を得た。これは低酸素・低糖条件下では倍化異数体細胞内のアミノ酸・脂質代謝経路のシグナル伝達ネットワークを再構築していることを示唆しており、染色体不安定性ストレス条件下で生き残るために重要な役割を果たしていることが推測できる。今後の課題としては、脂質代謝・アミノ酸代謝系の変化に関与する因子を同定し、倍化異数体細胞の分子メカニ

ズムとシグナルネットワークの全容理解を目指すことである。染色体不安定性から環境適応に至るプロセスの重要な因子を特定し、薬物スクリーニングを実施することで倍化異数体細胞特異的に攻撃するシステムを構築し、癌の新規治療法を確立することを最終目標として今後も研究を進めていく。

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Maruyama Takeshi, Sasaki Ayana, Iijima Sayuri, Ayukawa Shiyu, Goda Nobuhito, Tazuru Keisuke, Hashimoto Norikazu, Hayashi Takashi, Kozawa Kei, Sato Nanami, Ishikawa Susumu, Morita Tomoko, Fujita Yasuyuki	4. 巻 23
2. 論文標題 ZAK Inhibitor PLX4720 Promotes Extrusion of Transformed Cells via Cell Competition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101327 ~ 101327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101327	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 -

1. 著者名 Fujimoto Yumi, Morita Tomoko Yamamori, Ohashi Akihiro, Haeno Hiroshi, Hakozaiki Yumi, Fujii Masanori, Kashima Yukie, Kobayashi Susumu S., Mukohara Toru	4. 巻 10
2. 論文標題 Combination treatment with a PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitor overcomes resistance to anti-HER2 therapy in PIK3CA-mutant HER2-positive breast cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-020-78646-y	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 T. Y. Morita, H. Haeno, H. Makinoshima, A. Suzuki, S. S. Kobayashi, A. Ohashi.
2. 発表標題 Multi-omics approaches to clarify adaptive mechanisms of cancer cells to antiproliferative effects by chromosomal instability
3. 学会等名 32nd EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 . M. Yamamori, A. Ohashi, H. Haeno, H. Makinoshima, A. Suzuki, S. S. Kobayashi.
2. 発表標題 Adaptation to chromosomal instability-mediated antiproliferative stresses causes metabolic modification in cancer cells.
3. 学会等名 The 79th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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