

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07158

研究課題名(和文)紡錘体チェックポイントからG1期にスリップした四倍体細胞でおこる新規の細胞死経路

研究課題名(英文)A novel pathway of cell death in tetraploid generated after mitotic slippage

研究代表者

井上 敏昭(Toshiaki, Inoue)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：80305573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：紡錘体チェックポイントを発動させる薬剤の抗癌作用は、第一にM期停止中の細胞死、第二にM期完了せぬままG1期にスリップした四倍体細胞での細胞死(Post-slippage cell death; PSCD)にある。PSCDが基底オートファジーレベルに依存していたことから、本研究でその機序を探った。PSCD回避の機序として四倍体細胞で2箇所同時に起こる細胞分裂による二倍体回帰を想定していたが、起きていなかった。抗がん薬耐性細胞で第一の細胞死の起こすM期停止が長引くのは、この第一の細胞死が阻害されている「結果」であると修正し、その機序を探り、新たにp53とアポトーシス制御因子Aによる制御を同定した。

研究成果の概要(英文)：The action of anti-cancer drug such as microtubule inhibitors targeting spindle assembly checkpoint depends on mitotic cell death and cell death after mitotic slippage. This study focused the latter cell death that has been reported to be involved in basal autophagy level by our study. As a pathway escaping from the cell death, we assumed double mitosis in tetraploid cells, which allows re-diploidization, since surviving cells after microtubule inhibitors are diploid cells. However, double mitosis were not observed in the tetraploid cells in microtubule inhibitor-resistant cells, thus we newly generated our working hypothesis that abnormally prolonged mitotic arrest observed are due to escape from mitotic cell death. We tried to identify the responsible molecules for the process, whose expression depends on the basal autophagy level. We identified two possible molecules, p53 and apoptosis-regulating molecule A.

研究分野：細胞生物学

キーワード：SIRT2 オートファジー 紡錘体チェックポイント 細胞死 四倍体

1. 研究開始当初の背景

微小管阻害剤など紡錘体チェックポイントを発動させる薬剤の抗癌作用は、第一にM期停止中に起こる細胞死、第二としてM期完了せぬままG1期にスリップした四倍体細胞での細胞死(Post-slippage cell death; PSCD)にある。二つの細胞死で決まる微小管阻害剤感受性が基底オートファジーレベルに依存することから、その機序を探ることを目指した。

2. 研究の目的

本研究では脱アセチル化酵素 SIRT2 発現低下で起こる基底オートファジー異常亢進をもたらす微小管阻害剤耐性の機序として、第二の細胞死、PSCD 回避を想定した。SIRT2 発現低下では、第一の細胞死である M 期停止中の細胞死が起きやすくなる M 期停止時間が異常に長引くこと、そして微小管阻害剤処理で生存したコロニー細胞は二倍体であったことから、四倍体で double mitosis (四倍体細胞で 2 箇所同時に起こる細胞分裂) による二倍体回帰に求め、その分子機序をオートファジーに着目して探ることを目的とした。

3. 研究の方法

主な方法は、(1)オートファジー亢進が PSCD 不全をもたらす仲介経路を、酸化ストレス防御に働く転写誘導系、特に Keap1-Nrf2 に求め検証する。(2)オートファジーレベル変化に伴う経路の活性変化、経路を人為的に On/Off した時の PSCD 変化で判断する。(3)

その経路下流で働くキー分子を転写標的分子から同定する。(4) PSCD の制御機構を、これに先行する上記二つの現象に求め、ライブセルイメージングでの時系列解析で三者の因果関係を検証する。二倍体回帰は染色体動態解析でその機序を知る。(5)。(1)-(3)で同定したキー分子が(4)の現象にも関与するかどうか知る。

4. 研究成果

SIRT2 発現低下で Keap 1 の発現低下、Nrf2 の核移行を認め、また酸化ストレス耐性も亢進していた。このことから、Nrf2 の活性化とそれによる PSCD 回避が期待された。しかし、SIRT2 発現低下細胞で Nrf2 を siRNA でノックダウンしても微小管阻害剤感受性は回復しなかったこと。したがって、Keap1-Nrf2 経路は SIRT2 やオートファジー配下で働く可能性がある経路であるものの、本研究で着目している PSCD 回避や微小管阻害剤耐性に関与するものではないと考えられた。

また微小管阻害剤処理した SIRT2 発現低下細胞で四倍体でライブセルイメージング解析したが、double mitosis は認められなかった。一部の細胞で三極分裂が見られ、これが二倍体回帰する可能性はあるが、SIRT2 発現低下細胞の微小管阻害剤耐性を説明できる

頻度ではなかった。これまで SIRT2 発現低下細胞で M 期停止時間が異常に長引くこと、さらにこの細胞でオートファジー実行因子をノックダウンしてオートファジーレベルを回復させると、微小管阻害剤感受性を回復するとともに M 期停止時間も短縮されることから、PSCD 回避による二倍体回帰に微小管阻害剤耐性を求めた。しかしこの結果を受け、この作業仮説を修正し、新たに、(1)第一の細胞死である M 期停止中の細胞死を回避した「結果」として M 期停止時間の異常な延長が起こる、(2)オートファジーは第一の細胞死を制御する、とした。

そこで第一の細胞死でのオートファジー制御配下の経路を探ることにした。我々と同じ視点で微小管阻害剤耐性に関与する分子としてゲノムワイドスクリーニングを用いて同定されたアポトーシス関連分子群を制御する分子 A が報告され、その分子発現低下細胞では、SIRT2 発現低下細胞と同じく、M 期停止期間が延長されていた。このことから分子 A と SIRT2 との関係を探り、分子 A は SIRT2 制御配下にあることを突き止め、その発現制御の機序を探っている。

さらに野生型 p53 を持つ HCT116 と HCT116(p53-/-)とで SIRT2 発現低下による微小管感受性が異なることから、SIRT2 と p53 シグナリング経路と関係、そして p53 シグナリング経路と微小管阻害剤との関係を探った。その結果、SIRT2 が p53 発現制御する機序を突き止め、p53 シグナリング経路が第一の細胞死を不全に招くという負の側面があることを明らかにした。これは 4 月中に投稿予定である。

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 6 件)

(1) Naoki Wada, Yasuhiro Kazuki, Kanako Kazuki, Toshiaki Inoue, Kiichi Fukui, Mitsuo Oshimura
Production of a Human Cell line with a Plant Chromosome.
Methods Mol Biol. 2018, 1772:289-296. doi: 10.1007/978-1-4939-7795-6_16. 査読なし.

(2) Wada N, Kazuki Y, Kazuki K, Inoue T, Fukui K, Oshimura M.: Maintenance and Function of a Plant Chromosome in Human Cells.
ACS Synth Biol. 2017, 6:301-310. doi: 10.1021/acssynbio.6b00180. 査読あり

(3) Nakayama Y, Inoue T. : Antiproliferative Fate of the Tetraploid

Formed after Mitotic Slippage and Its Promotion; A Novel Target for Cancer Therapy Based on Microtubule Poisons. *Molecules*. 2016 May 19;21(5). pii: E663. doi: 10.3390/molecules21050663. 査読あり

(4) 中山 祐二、井上 敏昭:
微小核の生成と微小核形成細胞の運命
Radiation Biology Research Communications
(放射線生物研究) 2017, 52(3), 263-276.
doi: なし. 査読あり

(5) Nakayama Y, Uno N, Uno K, Mizoguchi Y, Komoto S, Kazuki Y, Nanba E, Inoue T, Oshimura M:
Recurrent micronucleation through cell cycle progression in the presence of microtubule inhibitors.
Cell Struct Funct, 2015, 40:51-59. doi: 10.1247/csf.14005. 査読あり

(6) Narai T, Katoh M, Inoue T, Taniguchi M, Kazuki K, Kazuki Y, Sato K, Kodani I, Ryoike K, Oshimura M:
Construction of a luciferase reporter system to monitor osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by using a mammalian artificial chromosome vector.
Yonago Acta Med, 2015, 58:23-29. doi: なし. 査読あり

[学会発表] (計 10 件)

(1) Naoki Wada, Yasuhiro Kazuki, Kanako Kazuki, Toshiaki Inoue, Keishi Osakabe, Kiichi Fukui and Mitsuo Oshimura :
Maintenance and Function of a Plant Chromosome in Human Cells
第 59 回植物生理学会、2018 年 3 月 28 日-30 日、札幌

(2) 奈良井 節, 綿世 諒平, 加藤 基伸, 井上 敏昭, 古倉 健嗣, 小谷 勇, 押村光雄:
骨分化の新規ハイスループットスクリーニング系樹立の試み
第 17 回日本再生医療学会総会 2018 年 3 月 21-23 日、パシフィコ横浜

(3) 和田 直樹、香月 康宏、香月 加奈子、井上 敏昭、福井 希一、押村 光雄
ヒトと植物細胞の部分的な細胞融合株の樹立-進化を超えた染色体機能保存性の解明を目指して-
第 5 回 細胞凝集研究会 (Cell Aggregation Meeting 2017)
2017 年 11 月 17 日、岡山県倉敷市・倉敷アイ

ビースクエア (招待講演)

(4) 奈良井 節, 加藤 基伸, 井上 敏昭, 小谷 勇, 押村 光雄, 領家 和男:
ヒト間葉系幹細胞における副甲状腺ホルモンの間歇的投与による最適な骨形成条件の検索
第 16 回日本再生医療学会総会 2017 年 3 月 7-9 日、仙台国際センター

(5) 大平 崇人、小島 裕正、黒田 悠子、稲岡 大悟、森脇 鏡后、春日 健人、片岡 美喜、井上 敏昭、押村 光雄、久郷 裕之:
PITX1 タンパク質は hTERT 発現を制御するために ZCCHC10 と相互作用する
第 39 回日本分子生物学会 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、パシフィコ横浜

(6) 和田 直樹、香月 康宏、香月 加奈子、井上 敏昭、福井希一、押村 光雄:
ヒト細胞における植物染色体の維持と機能
第 39 回日本分子生物学会 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、パシフィコ横浜

(7) 中山 祐二、井上 敏昭、押村 光雄:
微小管阻害剤の長期曝露によって倍数体化を伴って繰り返し起きる微小核誘導
第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 6-8 日、パシフィコ横浜

(8) 井上 敏昭、李 艶沢、久郷 裕之、押村 光雄:
SIRT2 による BubR1 のリジン 250 の脱アセチル化と BubR1 の安定性に及ぼす効果
第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8-10 日、名古屋国際会議場

(9) 中山 祐二、宇野 愛海、宇野 勝洋、古本 真也、香月 康宏、難波 栄二、井上 敏昭、押村 光雄:
微小管阻害剤存在下における倍数体化を伴って段階的に進む微小核誘導
第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会合同大会、2015 年 12 月 1-4 日、神戸ポートアイランド

(10) 山本 加奈恵、楠瀬 未菜、中山 祐二、井上 敏昭、押村 光雄、加藤 基伸:
ミクロセル融合を介した染色体ベクター移入法の改良
第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会合同大会 2015 年 12 月 1-4 日、神戸ポートアイランド

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

主宰研究室ホームページ
<https://www.facebook.com/genoiko>

2016 年および 2017 年度
夢ナビライブ大阪会場で高校生に模擬講義
で本研究内容を解説。講義名「細胞分裂と染
色体分配から制がん法を探る」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 敏昭 (INOUE, Toshiaki)
鳥取大学・医学部・准教授
研究者番号：80305573

(2) 研究分担者

中山 祐二 (NAKAYAMA, Yuji)
鳥取大学・生命機能研究支援センター・助
教
研究者番号：40432603

古倉 健嗣 (KOKURA, Kenji)

鳥取大学・医学部・助教
研究者番号：30344039
(平成 28 年度より研究分担者として加入)

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

Li, Yanze