

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005 ～ 2009

課題番号：17013070

研究課題名（和文） 細胞分裂の制御とその破綻による発がん機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of role of mitotic regulation and its abnormalities in carcinogenesis

研究代表者

佐谷 秀行 (SAYA HIDEYUKI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：80264282

研究成果の概要（和文）：細胞周期 G2 期から M 期進行の調節機構の破綻は、細胞の形質にドラスティックな変化を引き起こし、ゲノムの不安定化を誘発する。G2 期から M 期の進行はタンパク分解、タンパクリン酸化という 2 つの生化学的イベントによって制御されていることが明らかにされ、その主たる調節因子の異常と腫瘍形成・悪性化の関係が注目されている。本研究はこれら G2/M 期における細胞周期進行制御の分子機構の解析とその破綻による腫瘍化のメカニズムを明確にし、最終的にはがん治療のための標的を見出すことを目的としておこなった。その結果、Aurora-A、WARTS、Cdh1、Mklp2 などの分子の新たな機能を明らかにすることができ、更に癌細胞が抗がん剤によって処理されると、分裂期において停止し、酸化ストレスが上昇することによって分裂期崩壊に陥ることを明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：Abnormal regulation of G2/M progression induces the drastic phenotypic changes and the genomic instability in cells. The G2/M progression is controlled by two biochemical events, protein degradation and protein phosphorylation. Therefore, regulatory factors of these two biochemical events are considered to play a critical role in development and progression of tumors. Specific aims of our project were i) to analyze molecular mechanisms regulating the transition of G2/M phase, ii) to clarify the role of abnormal regulation of the mitotic molecules and iii) to identify the targets for cancer therapies. As the results, we could elucidate the novel functions of mitotic regulating molecules including Aurora-A, WARTS, Cdh1 and Mklp2 and, furthermore, clarify the molecular mechanism of mitotic catastrophe induced by conventional chemotherapeutic agents.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	24,000,000	0	24,000,000
2006年度	26,000,000	0	26,000,000
2007年度	26,000,000	0	26,000,000
2008年度	29,500,000	0	29,500,000
2009年度	29,500,000	0	29,500,000
総計	135,000,000	0	135,000,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：癌 遺伝子 細胞・組織 細胞分裂 細胞骨格 チェックポイント
細胞運動 タンパク質分解

1. 研究開始当初の背景

増殖能を持つ正常細胞は、複製・分裂の途上において遺伝子や染色体の異常が生じると、一時的に細胞周期を停止しその異常を修正する（あるいは異常細胞を除去する）能力があり、組織内に異常細胞が出現することを防いでいる。この機構をチェックポイントと呼ぶ。細胞周期の各フェーズに設定されたチェックポイントは、様々な細胞内分子が関係することにより制御されており、それらの分子自身あるいは関係に異常が生じることにより、多発性の遺伝子変異や染色体の不均衡分配など「ゲノム不安定化」が発生し、細胞の腫瘍化ならびに悪性化が生じてくると考えられていた。

細胞分裂は染色体と細胞質内の要素を正確に二分する重要なステップである。したがって細胞分裂をひかえたG2期からM期進行の調節機構破綻は細胞の形質にドラスティックな変化を引き起こし、ゲノムの不安定化を誘発する。G2期からM期の進行はタンパク分解、タンパクリン酸化という2つの生化学的イベントによって制御されていることが多くの先達の研究により明らかにされてきた。主として、前者においてはanaphase promoting complex (APC)と呼ばれるユビキチンリガーゼ、後者では分裂期キナーゼと呼ばれる一群のリン酸化酵素が重要な役割を演じていることが酵母などを用いた研究によって明らかにされていた。つまりAPC、分裂期キナーゼ分子自身あるいは関連分子との関係の破綻が分裂期の異常を引き起こし、腫瘍形成・悪性化に働く可能性が考えられていた。またG2及びMチェックポイントの制御異常は抗癌剤や放射線の感受性にも重要な要素となっていることが明らかにされていた。

2. 研究の目的

本研究はG2/M期における細胞周期進行制御の分子機構の解析とその破綻と腫瘍化、あるいは腫瘍の性質を修飾するメカニズムを明確にし、最終的にはがん治療のための標的となりうる分子あるいはシグナルを見出すことを目的として実施した。

3. 研究の方法

1) Aurora-A キナーゼの腫瘍形成における役割:

G2/M期制御破綻の腫瘍化における意義を明確にするために、Aurora-A 乳腺特異的過剰発現マウスを作製した。更にAurora-A 乳腺特異的過剰発現マウスとp53欠損マウスを交

配することにより、その腫瘍形成における役割を解析した。

2) 分裂期キナーゼ WARTS の機能解析:
細胞分裂後期に活性化される WARTS キナーゼは癌抑制作用をもつことが、ショウジョウバエやマウスを用いた実験で明らかにされている。WARTS の結合分子を同定することにより、その癌抑制作用を分子レベルで説明しようと試みた。

3) 分裂期崩壊の分子メカニズムの解明:
癌細胞がアドリアマイシンやタキソールなど抗がん剤によって特異的に死滅するメカニズムについて、タイムラプス顕微鏡、細胞内キナーゼアレイなどを用いて解析を行った。

4) Cdh1 の機能解析:
APCの活性化分子であるCdh1の分裂期および間期における機能を明らかにする目的で、Cdh1 遺伝子トラップマウスを作製し、同時にCre-loxPシステムによってON/OFFを行うことができるマウスの作製をおこなった。更に得られた形質変化から、その機能について生化学的、および分子細胞生物学的手法を用いて解析を行った。

5) Mklp2 の機能解析:
分裂期チェックポイントの最も重要な機能分子であるMad2の結合分子を同定する作業を行ったところ、細胞質分裂を行うモータータンパク質であるMklp2を同定することに成功した。そこでMad2とMklp2の結合が分裂期の進行においてどのような意義があるかについて、細胞生物学的手法を用いて詳細に解析した。

4. 研究成果

1) Aurora-A キナーゼ過剰発現の発がんにおける役割:

分裂異常の癌化に対する影響を調べる目的で、Aurora-A の過剰発現マウスを用いた実験系を2つ確立した。一つはcre-loxPシステムを用いて乳腺上皮細胞に高発現する系であり、もう一つは造血幹細胞にレトロウイルスを用いてAurora-A及びその変異体を導入してin vitroとin vivoの双方で発癌に対する影響を観察するシステムである。乳腺上皮では、Aurora-A 過剰発現による分裂異常(細胞質分裂障害)はp53遺伝子の発現を上昇させるためアポトーシスが誘導され、腫瘍が出

来ないことが分かった。そこで p53 遺伝子の欠損マウスと交配したところ、腫瘍性変化は生じたが悪性像は見られなかった。これらの腫瘍では SA- β -galactosidase が陽性で、p16 たんぱく質の核内貯留が見られ、細胞老化が誘導されていることが分かった。p53 が欠損しているバックグラウンドでは Aurora-A 発現によって DNA 損傷が有意に増加することがわかり、それが p16 の発現を上昇させて老化を誘導している可能性が示唆された (Zhang et al. *Oncogene* 27: 4305-4314, 2008)。

造血幹細胞に Aurora-A を過剰発現し骨髄移植する実験では、遺伝子導入した細胞が最初は末梢血において大半を占めていたが、時間と共に減少し、約 2 ヶ月で全て消失することが分かった。このことから、造血系細胞では Aurora-A の過剰発現による細胞分裂障害は早期に増殖障害を誘導することはないが、幹細胞のレベルで障害を誘導することが示唆された。これらの所見から、当初の大きなテーマであった「分裂異常はそれだけで癌を形成する原因になるか」という質問に対しては、「分裂異常をきたした細胞は細胞死や老化などの防御機構によって排除されるために腫瘍を誘発する主たる原因とはなりにくい、p53 遺伝子や p16 遺伝子に異常が生じている場合は、腫瘍発生に寄与する可能性がある」という一つの結論を提示することが出来た。

2) 分裂期キナーゼ WARTS の機能解析：
Two-hybrid screening 法を用いて、WARTS は Omi の PDZ ドメインと結合し、それには WARTS の C 末 3 アミノ酸が必要であることを明らかにした (Kuninaka et al., *Oncogene* 24: 5287-5298, 2005)。さらに Omi 特異的抗体を作成し、両者の結合が実際の細胞内でも認められることを確認した。Omi は大腸菌の熱ショックタンパク htra と相同性が高い新規セリンプロテアーゼとして同定され、細胞死との関連を示す報告がなされていた。ヒト細胞で Omi は主にミトコンドリア内に存在し、細胞死刺激が加わるとアミノ末端が切断された成熟型としてミトコンドリアより流出する。RNAi を用いて、WARTS 発現を抑制した細胞に Omi を活性化させる細胞死刺激 (スタウロスポリン) を加えた所、有意に細胞死が抑制された。更に WARTS と Omi を細胞内に共発現させると Omi 単独に比べ細胞死が有意に増加した。この細胞死増強効果は Omi と結合できない C 端欠失 WARTS 変異体では認められなかった。立体構造の解析から、Omi のプロテアーゼ領域への基質のアクセスを PDZ ドメインが負に制御していることが示されていた。我々の実験結果より Omi PDZ ドメインに WARTS が結合することが、

そのプロテアーゼ活性増強に重要な役割を果たしていると考えられた。実際、WTS の C 端 20 アミノ酸だけを Omi と共発現させると細胞死が増強し、Omi のプロテアーゼ活性も上昇した。以上より WTS の癌抑制作用の一つとして Omi 誘導細胞死の活性化があると考えられた。

また私達は、WARTS が Omi と結合し、活性化した Omi により WARTS 自身も切断を受けることを明らかにした (Kuninaka et al., *Oncogene* 26: 2395-2406, 2007)。セリンプロテアーゼ阻害剤、プロテアーゼ活性を欠失させた変異型 Omi により WARTS が切断されないことや、上記研究で明らかにした Omi との結合部位を欠失させた変異型 WTS も切断を受けないことより、この WARTS 切断が Omi 自身によることを確認した。上述したように Omi は自身のプロテアーゼ活性のみでアポト-シスを促進出来ることが私達を含む国内外の多数のグループより報告されている。しかし、最近の Omi 変異 (mnd2) マウスの解析では Omi のプロテアーゼ活性喪失は細胞死を抑制せず、むしろ様々なストレスに対する感受性を亢進することが解った。この相反する結果は Omi が細胞死以外の機能を持ち、その破綻の結果アポト-シスが誘導される可能性を示すものである。私達はカスパーゼ 9 欠失線維芽細胞に内因性 Omi を活性化させるスタウロスポリン処理を施すと Omi により WARTS が切断を受けるが、細胞死が生じないことを見出した。すなわち Omi による WARTS 切断は、細胞死以外の機能を果たしている可能性が考えられた。また HeLa 細胞において、RNAi により Omi の発現を抑制すると細胞倍加時間が短縮することを見出した。さらに Omi の発現を抑制した細胞は WARTS 発現抑制時と同様に BrdU の取り込みが亢進していることも明らかになった。これらの結果より、WARTS と Omi は同じシグナル伝達系のもと、細胞周期進行を負に制御している可能性が考えられた。そこで Omi により切断を受けない C 端の欠失した変異型 WARTS と正常型 WARTS を発現させた線維芽細胞の細胞周期プロファイルをフローサイトメトリーで検討すると、変異型は正常型にくらべ S 期の細胞の割合が減少、すなわち正常型で見られる S 期進行の遅延が変異型では見られないことを見出した。これらのことより、WARTS の細胞周期制御に Omi による WARTS 切断断片が関与している可能性が示唆された。現在、Omi ノックアウトマウス、WARTS ノックアウトマウスを取得し、これら 2 つの分子の相互作用がもたらす生理現象について、個体を用いて現在更に解析を行っている。

3) 分裂期崩壊の分子機構解析：

タキソールなど微小管重合に影響を与える薬剤は、分裂期紡錘体の動態に異常を引き起こすために紡錘体チェックポイントを活性化し、細胞を分裂期中期に停止させる作用を持つことはよく知られている。しかし、分裂期に停止することでなぜ細胞が死んでいくのか、またどのような過程で死ぬのかは、これまでよく分かっていなかった。タキソールで誘導される細胞死も長時間の分裂中期停止状態から直接に生じることが判明した。また、タキソールによる効果は、癌細胞自身が持つ紡錘体チェックポイント機能の強さに依存するというデータに基づき、RNA 干渉を用いて Mad2、BubR1 など紡錘体チェックポイントのキーとなる分子の発現を抑制したところ、タキソールによる細胞死誘導が回避されることが分かった。

次に、分裂期崩壊はどのような分子機構で生じるのか解析を行った。分裂中期に停止した細胞ではその停止時間に比例して細胞内の活性酸素が上昇することが分かり、活性酸素の上昇によって、caspase が活性化されて分裂中期から直接細胞がアポトーシスによって 30 ~ 50% の細胞が死滅することが分かった。しかし、残りの細胞は長い中期停止を経た後、mitotic slippage を生じて分裂期を脱出し、その直後にネクローシスによって死滅することが分かった。このネクローシスでは caspase は活性化されず、p38MAP キナーゼの活性化によって細胞死が誘導されるということが明らかになった。

正常の細胞は紡錘体チェックポイントが正常なので、癌細胞と同様にタキソールによって分裂中期に停止するが、癌細胞に比べて一般に抗酸化機能を持つ分子の発現レベルが高いことから、活性酸素レベルが癌細胞ほどは高くなり、それがタキソールによって正常細胞があまり傷害されない理由であると考えられる。

4) Cdh1 の細胞周期進行における役割の解析:

APC の活性化分子である Cdh1 の個体における役割について、Cdh1 の遺伝子トラップマウス (以下 gene-trap (GT) と呼ぶ) を用いて解析を行った。ヘテロ GT マウスを交配し、約 150 匹の出生胎児の遺伝子型を解析したところ、ホモマウスは得られず (Wt:Hetero:Homo=59:86:0) cdh1 ホモ GT は胎生致死であると考えられた。そこで胎死亡の時期を明らかにするため、交配後経時的に胎児を観察した。心拍動を基準に生死を判定すると、E11.5 では 75% (n=24)、E12.5 では 37.5% (n=32) が生存していたが、E13.5 では全例 (n=21) 死亡していることが明らかになった。実際に E13.5 のホモ GT 胎児は蒼白かつ体躯狭小で、循環器系の異常が示唆された。この

発生過程の異常が、Cdh1 の喪失によるものか否かを再確認するため、上記 GT マウスに外来性の Cdh1 cDNA を導入することで胎生致死の表現形に変化が生じるか否か検討してみた。Cdh1 GT ES 細胞において Cre リコンビナーゼを用いて mouse Cdh1 全長 cDNA を θ -geo 遺伝子と相同組み換えし、得られた ES 細胞を用いてキメラマウス、最終的に Cdh1 cDNA knock-in マウス (Cdh1 GT(ResP17)) を作成した。このマウスを交配し産子の遺伝子型を検討したところ、ホモ knock-in allele を持つ仔が期待されるメンデル則の割合で誕生したことから、GT のレスキューが成功したことが確認できた。この結果より Cdh1 喪失が胎児発生異常の原因であることが明らかになった。病理学的解析により心血管系に明らかな異常を認めなかったこと、造血系細胞の分化に異常がなかったことなどから、胎盤の異常が疑われた。現在、これらの GT マウスを用いて、Cdh1 の胎盤組織構築への関与、腫瘍形成への関与について検討を行っている。

5) Cdh1 の新規機能解析:

Cdh1GT/GT マウス胎児より線維芽細胞を樹立し、細胞骨格の解析を行った。また、線維芽細胞以外での機能を調べるために HeLa 細胞に siRNA を形質導入することで Cdh1 を欠損させ同様に解析した。その結果、Cdh1GT/GT マウスの線維芽細胞および Cdh1 ノックダウン HeLa 細胞では、免疫染色においてアクチン線維と接着斑の著名な減少を認めた。この結果を裏付けるようにアクチン線維の重合と接着斑点の形成を制御している RhoGTPase の活性が、Cdh1 ノックダウン細胞では有意に低下していた。

続いて、Rho 関連蛋白の発現をみると、Cdh1GT/GT マウス線維芽細胞では Rho の代表的な抑制因子である p190RhoGAP の発現が増加していた。siRNA で Cdh1 の発現を抑制した細胞と、ドミナントネガティブに作用する Cdh1 を過剰発現させた細胞を用いた実験においても同様の結果が得られた。Cdh1 を欠損した細胞にプロテアソーム阻害剤 MG132 処理すると、p190RhoGAP のユビキチン化が減弱し、反対に Cdh1 を過剰発現させた状態では p190RhoGAP のユビキチン化が増強した。in vitro でも Cdh1 存在下に p190 RhoGAP はユビキチン化され、免疫沈降で Cdh1 と p190 RhoGAP は共沈した。Cdh1 欠損細胞の運動能は低下しており、p190 RhoGAP を同時に欠損させることで運動能を戻すことができた。Cdh1GT/GT マウス胎児の解析では胎盤の血栓と開眼という所見を呈し、これらはそれぞれ Rho のエフェクターである ROCK II と ROCK I ノックアウトマウスの表現形と類似していた。

以上の結果より、細胞周期の進行に関連する既知の蛋白に加えて、Cdh1はp190RhoGAPを分解の標的としており、その結果Rhoの活性を調節し細胞骨格を制御していることが明らかとなった(Naoe et al., *Mol Cell Biol*, 2010, in press)

6) Mad2結合タンパク質Mklp2の機能解析: Mad2の結合分子を質量分析法によって同定したところ、分裂期後期に分裂溝にAurora Bを運ぶことによって、細胞質分裂を進行させる役割を担うモータータンパク質Mklp2と結合することが、明らかになった。さらに、Mklp2はMad2と分裂期チェックポイントにおいて結合している間は、微小管と結合することができず、この機構によって分裂期チェックポイントが活性化している間は、細胞質分裂が起こらないように調節されていることが明らかになった(Lee et al., 投稿中)

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]

英文論文(計66件)全件査読有

- 1) Naoe H, Araki K, Nagano O, Kobayashi Y, Ishizawa J, Chiyoda T, Shimizu T, Yamamura K, Sasaki Y, Saya H and Kuninaka S: The APC/C activator Cdh1 modulates Rho GTPase by targeting p190 RhoGAP for degradation. *Mol Cell Biol* 2010 (in press)
- 2) Mori D, Yamada M, Mimori-Kiyosue Y, Shirai Y, Suzuki A, Ohno S, Saya H, Wynshaw-Boris A and Hirotsune S: An essential role of the aPKC-Aurora A-NDEL1 pathway on neurite elongation by modulation of microtubule dynamics. *Nat Cell Biol* 11: 1057-1068, 2009
- 3) Nakai R, Iida S, Takahashi T, Tsujita T, Okamoto S, Takada C, Akasaka K, Ichikawa S, Ishida H, Kusaka H, Akinaga S, Murakata C, Honda S, Nitta M, Saya H and Yamashita Y: K858, a novel inhibitor of mitotic kinesin Eg5 and antitumor agent, induces cell death in cancer cells. *Cancer Res* 69: 3901-3909, 2009
- 4) Sampetean O, Iida S, Makino S, Matsuzaki Y, Ohno K and Saya H: Reversible whole-organism cell cycle arrest in a living vertebrate. *Cell*

Cycle 8: 620-627, 2009

- 5) Zhang D, Shimizu T, Araki N, Hirota T, Yoshie M, Ogawa K, Nakagata N, Takeya M and Saya H: Aurora-A overexpression induces cellular senescence in mammary gland hyperplastic tumors developed in p53-deficient mice. *Oncogene* 27: 4305-4314, 2008
 - 6) Kuninaka S, Iida S, Hara T, Nomura M, Naoe H, Morisaki T, Nitta M, Arima Y, Mimori T, Yonehara S and Saya H: Serine protease Omi/HtrA2 targets WARTS kinase to control cell proliferation. *Oncogene* 26: 2395-2406, 2007
 - 7) Takahashi A, Ohtani N, Yamakoshi K, Iida S, Tahara H, Nakayama K, Nakayama KI, Ide T, Saya H and Hara E: Mitogenic signalling and the p16^{INK4a}-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nat Cell Biol* 8: 1291-1297, 2006
 - 8) Kuninaka S, Nomura M, Hirota T, Iida S, Hara T, Honda S, Kunitoku N, Sasayama T, Arima Y, Marumoto T, Koja K, Yonehara S and Saya H: The tumor suppressor WARTS activates the Omi/HtrA2-dependent pathway of cell death. *Oncogene* 24: 5287-5298, 2005
 - 9) Arima Y, Nitta M, Kuninaka S, Zhang D, Fujiwara T, Taya Y, Nakao M and Saya H: Transcriptional blockade induces p53-dependent apoptosis associated with translocation of p53 to mitochondria. *J Biol Chem* 280:19166-19176, 2005
 - 10) Marumoto T, Zhang D and Saya H: Aurora A - A guardian of poles. *Nat Rev Cancer* 5:42-50, 2005
- 邦文総説(計13件)全件査読無
- 1) 佐谷秀行: 抗癌剤効果の分子機構、癌と化学療法 36: 1~5、癌と化学療法社、東京、2009
 - 2) 張東威、佐谷秀行: Aurora-Aの発がんにおける役割。実験医学増刊「シグナル伝達研究 2008-'09」26: 羊土社、東京、2008
 - 3) 佐谷秀行: Aurora キナーゼの機能と発

がんにおける役割。生化学 79: 131-139、
日本生化学会、東京、2007

- 4) 佐谷秀行：細胞分裂とその制御（特集監修）。分子細胞治療 4：465-466、先端医学社、東京、2005
- 5) 有馬好美、佐谷秀行：癌におけるゲノム不安定性。ゲノム医学 5：115-119、メディカルレビュー社、東京、2005

〔学会発表〕(計69件)

- 1) Saya H: Molecular mechanism of cell death induced by anti-cancer drugs. Invited speaker. The 15th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience. 12/02/2008. Sheraton Miyako Hotel Tokyo, Tokyo
- 2) Saya H: Molecular mechanism of anti-cancer therapies. Special Lecture. International Symposium on 50th Anniversary of Yonsei University. 5/18/2007-5/19/2007. Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea
- 3) Saya H: Molecular understanding and dynamic analysis of anti-cancer therapy. Special Lecture (Prof. Takao Hoshino's Memorial Lecture). 4th Meeting of the Asian Society of Neuro-Oncology, 11/04/2005-11/06/2005, Taipei, Taiwan.
- 4) Saya H: Role of Aurora kinases in mitotic regulation and tumorigenesis. Plenary Lecture. Annual meeting of the Korean Society of Medical Biochemistry and Molecular Biology, 10/26/2005-10/27/2005, Seoul, Korea.
- 5) Saya H: Dynamic analysis of mitotic catastrophe. International Symposium on "DNA replication and cell cycle". 10/10/2005-10/11/2005, Tokyo University, Tokyo, Japan

〔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
<http://www.genereg.jp/>

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
佐谷 秀行 (SAYA HIDEYUKI)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：80264282
 - (2) 研究分担者
該当なし
 - (3) 連携研究者
該当なし