

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07172

研究課題名(和文)細胞分裂を完了させる新規切断因子の分子制御機構

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of cytokinesis completion and cell fate decision after cytokinesis failure

研究代表者

飯森 真人 (Imori, Makoto)

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：20546460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：有糸分裂期の最終行程である細胞質分裂の異常は四倍体細胞を誘導して染色体不安定性につながると考えられている。本研究ではsiRNAライブラリーを用いたスクリーニングより、OGG1遺伝子ノックダウンが細胞質分裂での二細胞への切断遅延を誘導することを見いだした。さらに細胞質分裂を阻害して誘導した四倍体細胞では、Eg5など複数の分裂期キネシンの張力バランスによりスピンドル極性が制御されており、その破綻が多極性スピンドルの形成とそれにもなう異数性獲得につながった。この異数性細胞集団は染色体数の不均一性を有しており、四倍体を經由した異数性獲得はがんの悪性化や抗がん剤耐性に寄与することが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんにおける最も顕著な特徴のひとつである染色体不安定性はがん化の過程における悪性形質の獲得や抗がん剤耐性の獲得の要因であると考えられている。しかし四倍体細胞を中間体とした異数性形成メカニズムは十分に理解されていない。

本研究結果として、まず細胞質分裂に関与する新規因子として同定したOGG1の関与する生物学的意義と分子機構のさらなる解析は、細胞質分裂の研究分野における学術的基盤の確立に役立つことが期待される。さらに四倍体細胞を中間体とした異数性形成分子モデルは、がんの不均一性およびそれにもなうがん悪性化や抗がん剤耐性獲得などがん病態を根幹的に理解することにつながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Chromosomal instability, one of the most prominent features of tumour cells, causes aneuploidy. Cytokinesis failure leads to production of tetraploid cells, which is thought to be an intermediate on the path to aneuploidy.

In this study, we found that knockdown of OGG1 induced a delay in abscission during cytokinesis. Next, we showed that the mitotic kinesin Eg5 plays an important role in determining spindle polarity (e.g., multipolarity vs. bipolarity) in tetraploid cells and demonstrated that spindle multipolarity and subsequent cell behaviour decisions are determined by the balance between forces generated by mitotic kinesins, including Eg5, Kif15 and HSET. Our data provide a novel possible explanation for the mechanistic relationship between Tetraploidisation and chromosomal instability; a high level of Eg5 can accelerate the acquisition of aneuploidy and chromosomal heterogeneity in tetraploid parental cells, contributing to tumour progression and resistance to anti-tumour drugs.

研究分野：細胞生物学

キーワード：染色体不安定性 四倍体細胞 heterogeneity

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

染色体不安定性はがん細胞に広く見られる染色体分配異常である。有糸分裂期における染色体分配異常による染色体数の変化が、がん化の過程における悪性形質の獲得や抗がん剤耐性の獲得の要因であると考えられている。近年、染色体不安定性が有糸分裂期の進行過程における姉妹染色体対合の異常、スピンドルチェックポイント機構異常、あるいは異常な多極性紡錘体の形成などに起因する不均等な染色体分配が原因であることが示されている。これらに加え申請者は、紡錘体を構成する微小管の伸長・短縮ダイナミクスが、微小管結合タンパク質のリン酸化修飾によって制御されていること (Iimori et al. *Exp Cell Res.* 2012) またそのリン酸化制御により微小管ダイナミクスを保證することが染色体の安定性維持に重要であることなどを示してきた (Iimori et al. *Nat Commun* 2016)。

一方で、有糸分裂期の最終ステップである細胞質分裂の異常による二細胞への切断不全は、四倍体細胞や多核細胞を誘導することが知られており、前述した不均等な染色体分配とは異なるメカニズムで染色体不安定性につながると考えられるが、その原因は多岐にわたりいまだ全てが明らかにされていない。細胞質分裂の維持因子および機構とその破綻による染色体不安定性を理解することは、がんの不均一性およびそれともなうがん悪性化や抗がん剤耐性獲得などがん病態を根幹的に理解することにつながると考えられる。

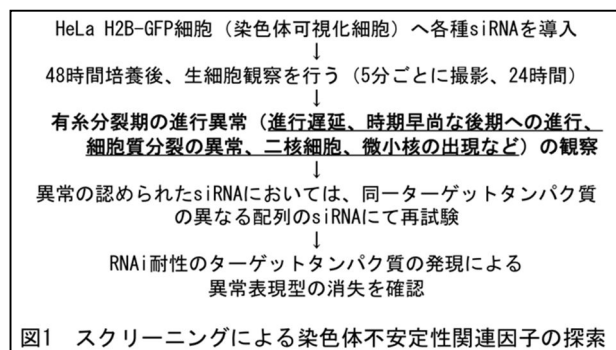
2. 研究の目的

細胞質分裂を正常に完了させるのに必要な新規遺伝子を同定し、新たな細胞質分裂機構の分子メカニズムを解明する。さらに細胞質分裂が不完全に完了した四倍体細胞におけるその後の細胞運命と染色体不安定性の関連性を明らかにする。これらの新規メカニズムを臨床的見地から検証し、細胞質分裂不全の分子病態と染色体不安定性およびがんの悪性度の全体像を明らかにすることで、盛んに議論される染色体不安定性を標的としたがん治療の可能性にアプローチするための学術的基盤を確立する。

3. 研究の方法

(1) 細胞質分裂の正常な進行に関する新規因子の解析

有糸分裂期の進行にともなう染色体分配を生きたまま観察できる実験系を構築し、siRNA ライブラリーを用いた遺伝子ノックダウン実験から細胞質分裂の異常が寄与する染色体不安定性に関する新規原因遺伝子をスクリーニング (図 1) する。見いだした新規因子の遺伝子ノックダウンが細胞質分裂におけるどのステップが影響を受けているかを観察して、さらに細胞質分裂における同在性を明らかにすることで、新規因子の細胞質分裂における機能を推察していく。



(2) 細胞質分裂不全により誘導される四倍体細胞の解析

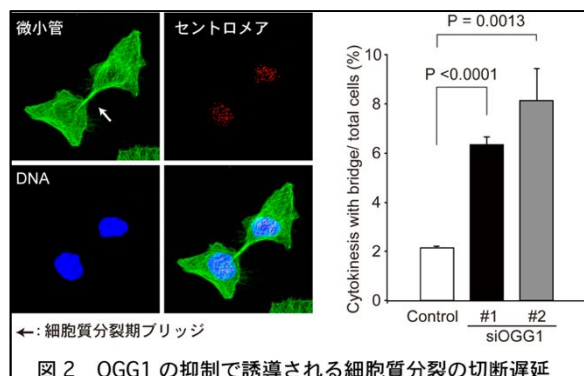
細胞質分裂の異常による二細胞への切断不全は、四倍体細胞を誘導する。チミジンによる細胞同調の後に Aurora B 阻害剤を併用することで、高効率かつ同調的な四倍体細胞集団を作製した。四倍体細胞がしめす染色体不安定性は、四倍体細胞を誘導した後の最初の有糸分裂期を観察することで解析した。有糸分裂期の進行はライブセルイメージングにより観察を行い、染色体や紡錘体の形態観察は免疫染色により行った。細胞株を用いた染色体不安定性の評価は、Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) 解析により行い、胃がん臨床検体を用いた解析では核 DNA 含量は Laser-scanning cytometry により解析し、特定のタンパク質の発現量は免疫組織染色により行った。

4. 研究成果

細胞質分裂における新規因子に関する成果

(1) 有糸分裂期の正常な進行に関する新規因子のスクリーニング

染色体構造を可視化することのできる Histone H2B-GFP 安定発現株を作製した。この細胞株を用いた生細胞タイムラプス観察を利用して、siRNA ライブラリーを用いた遺伝子ノックダウン実験から細胞質分裂の異常が寄与する染色体不安定性に関する新規原因遺伝子をスクリーニングした。その結果、OGG1 遺伝子のノックダウンが細胞質分裂での二細胞への切断遅延を誘導した。非同調細胞において OGG1 遺伝子をノ



ックダウンしたところ、細胞質分裂での二細胞への切断完了直前である細胞質分裂ブリッジ構造を示す細胞が有意に上昇した(図2)。

(2) 細胞質分裂における OGG1 の局在観察

OGG1 遺伝子のノックダウンは細胞質分裂ブリッジ構造の切断を抑制していることが示されたため、OGG1 の局在性を確認したところ、細胞質分裂ブリッジ構造の切断領域(ミッドボディ)への OGG1 タンパク質の局在も確認された(図3)。さらに、既知のミッドボディ局在因子である CEP55 あるいは RacGAP1 との共免疫染色を行ったところ、OGG1 のそれらミッドボディ局在因子と共局在した(図4)。さらに HeLa 細胞と HCT116 細胞の異なるがん細胞種において、あるいは抗原性の異なる 3 種類の OGG1 抗体を用いた免疫染色において、OGG1 はミッドボディ局在を示した。加えて、OGG1-FLAG タンパク質を発現させた細胞の FLAG 抗体による免疫染色においても同様の局在性が観察された(データは示さない)。以上の結果は細胞質分裂期において OGG1 がミッドボディ因子の一員として細胞質分裂期ブリッジの切断への関与の可能性を示唆するものである。現時点では OGG1 ノックダウンの表現型が酸化ストレスの亢進による二次的な影響による可能性を否定できていない。今後ミッドボディ因子の一員としての OGG1 の役割と共に、細胞質分裂期の安定性維持機構モデルを検証していきたい。

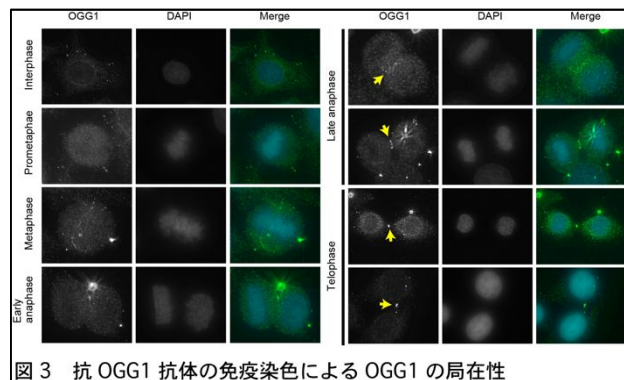


図3 抗 OGG1 抗体の免疫染色による OGG1 の局在性

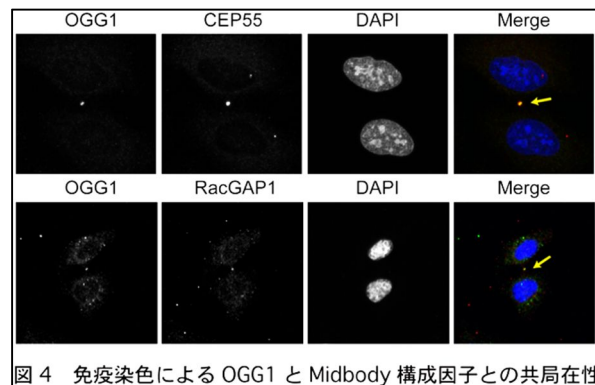


図4 免疫染色による OGG1 と Midbody 構成因子との共局在性

細胞質分裂不全により誘導される四倍体細胞の染色体不安定性に関する成果

(1) 有糸分裂期進行阻害剤に対する四倍体細胞の細胞応答

同調した HeLa 細胞に一定時間 Aurora B 阻害剤を作用させ、同調した四倍体細胞集団を調製した。有糸分裂期進行阻害剤である微小管ダイナミクス阻害剤(パクリタキセル, ノコダゾール)や Eg5 キネシン阻害剤(モナストロール)への四倍体細胞の増殖抑制効果を観察すると、モナストロールのみが四倍体細胞において細胞増殖抑制効果の減弱が認められた。これは、四倍体細胞がモナストロール存在下でも有糸分裂が阻害されず細胞増殖しているためであった。どのようなメカニズムでモナストロール存在下において四倍体細胞が有糸分裂期を進行できるのかを詳細に解析したところ、四倍体細胞の分裂期はその約半数が多極性のスピンドル構造を示したが、モナストロール存在下においてはほとんどの細胞のスピンドル構造が二極性であった(図5)。以上の観察結果より、有糸分裂期において多極性のスピンドルを形成する HeLa 四倍体細胞は、Eg5 キネシン阻害によって二極性のスピンドル構造に転換されるためモナストロール存在下においても分裂期が進行することが考えられた。

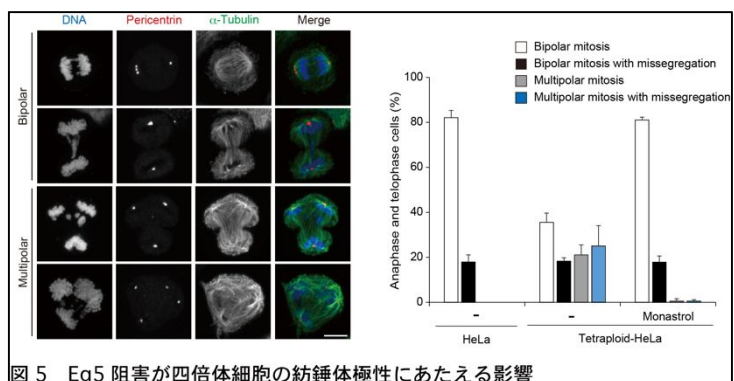


図5 Eg5 阻害が四倍体細胞の紡錘体極性に与える影響

(2) リン酸化 Eg5 のスピンドル局在性が決定するスピンドル極性

四倍体化した HeLa 細胞はその約半数が多極性のスピンドル構造を示したが、一方で四倍体化した HCT116 細胞は HeLa 細胞とは異なり、半数以上が二極性スピンドルを形成した。この両細胞種間では有糸分裂期におけるスピンドル極周辺への活性型リン酸化 Eg5 の局在強度に違いがあり(図6)、多極性スピンドル形成はリン酸化 Eg5 の強い局在性に依存すると考えられた。この仮説は四倍体化した HCT116 あるいは HeLa 細胞に対してそれぞれ野生型あるいは非リン酸化 Eg5 を強制発現し、Eg5 のリン酸化状態を変化させたことや、Eg5 と類似した機能をもつ Kif15 や逆方

向へのキネシンモーター活性をもつ HSET (KIFC1) の強制発現によりスピンドル極性の変化を誘導できたため立証した。この結果から、四倍体細胞におけるスピンドル極性はキネシンによる張力バランスにより制御されると考えられた。

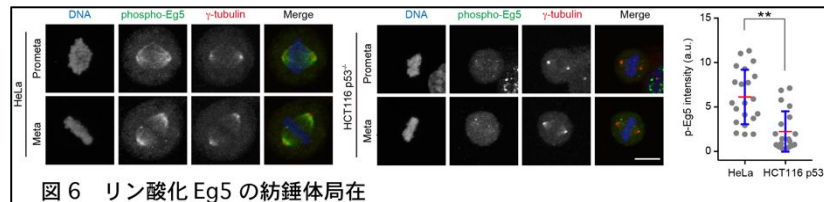


図 6 リン酸化 Eg5 の紡錘体局在

(3) 四倍体細胞の長期培養における Eg5 活性依存的な運命決定

四倍体細胞の長期培養による細胞運命を観察したところ、多極性スピンドルを優位に形成する細胞では二倍体に近く不均一性をもつ異数性細胞の集団が出現したのに対し、Eg5 阻害剤存在下あるいはリン酸化 Eg5 のスピンドル局在レベルの低い細胞では長期培養後も四倍体状態を維持していた (図 7)。さらに胃がん臨床検体を用いた解析では、腫瘍部における Eg5 の発現レベルには多様性があり、Eg5 高発現と DNA 異数性ステータスに正の相関が認められた。以上の結果より、四倍体細胞を中間体とした異数性形成モデルにおいて、四倍体細胞のスピンドル極性の決定とその後の細胞運命は、Eg5 をはじめとする分裂期キネシンの張力バランスにより決定されることが示された。さらに四倍体を経由した異数性獲得経路は、がんの悪性化や抗がん剤耐性に寄与するがんの不均一性獲得に有利であることが考えられた (図 8)。

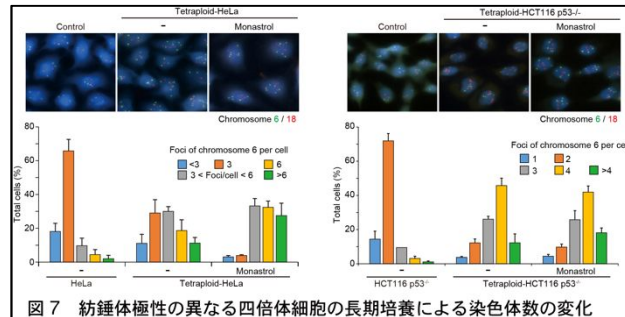


図 7 紡錘体極性の異なる四倍体細胞の長期培養による染色体数の変化

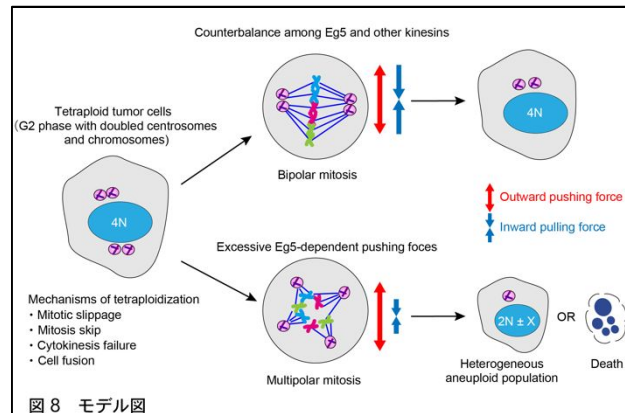


図 8 モデル図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Sei Shu, Makoto Imori, Takeshi Wakasa, Koji Ando, Hiroshi Saeki, Yoshinao Oda, Eiji Oki and Yoshihiko Maehara	4. 巻 132
2. 論文標題 The balance of forces generated by kinesins controls spindle polarity and chromosomal heterogeneity in tetraploid cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 231530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.231530	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sei Shu, Makoto Imori, Hiroshi Saeki, Eiji Oki, Yoshihiko Maehara
2. 発表標題 Eg5 activity regulates cell division property in tetraploid-induced tumor cells
3. 学会等名 ASCB EMB0 Meeting 2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Makoto Imori, Hiroshi Saeki, Eiji Oki, Yoshihiko Maehara
2. 発表標題 Transition from tetraploidy to aneuploidy is determined by Eg5-dependent spindle pole positioning
3. 学会等名 第70回 日本細胞生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯森 真人, 佐伯 浩司, 沖 英次, 前原 喜彦
2. 発表標題 四倍体細胞から異数性への遷移はEg5依存的なスピンドル極の形成位置により決定される
3. 学会等名 第30回 高遠シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯森 真人, 周 正, 佐伯 浩司, 沖 英次, 前原 喜彦
2. 発表標題 四倍体細胞から異数性への遷移はEg5依存的な紡錘体極の形成位置により決定される
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯森 真人, 周 正, 佐伯 浩司, 沖 英次, 前原 喜彦
2. 発表標題 四倍体細胞から異数性への遷移はEg5依存的な紡錘体極の形成位置により決定される
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Makoto Iimori, Sei Shu, Eiji Oki, Hiroshi Saeki, Yoshihiko Maehara
2. 発表標題 The balance of counteracting forces via mitotic kinesins controls spindle multi-polarization in tetraploid cells and its subsequent heterogeneity
3. 学会等名 ASCB EMBO Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯森 真人, 沖 英次, 前原 喜彦
2. 発表標題 四倍体細胞のスピンダル極性と染色体不均一性はキネシンによる張力バランスによって決定される
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯森 真人, 沖 英次, 前原 喜彦
2. 発表標題 四倍体細胞のスピンデル極性と染色体不均一性はキネシンによる張力バランスによって決定される
3. 学会等名 第37回染色体ワークショップ
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学 - 研究者情報 http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K004727/research.html ORCID https://orcid.org/0000-0003-1697-0178

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
研究分担者	北尾 洋之 (Kitao Hiroyuki) (30368617)	九州大学・薬学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	沖 英次 (Oki Eiji) (70380392)	九州大学・大学病院・准教授 (17102)	
研究分担者	佐伯 浩司 (Saeki Hiroshi) (80325448)	群馬大学・医学系研究科・教授 (12301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	周 正 (Shu Sei)		