

令和元年5月21日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15111

研究課題名(和文)紡錘体が極端な染色体数変動に順応する仕組みの解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of mitotic spindle adaptation to drastic chromosome number changes

研究代表者

上原 亮太(Uehara, Ryota)

北海道大学・先端生命科学研究院・准教授

研究者番号：20580020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：通常体細胞は父母方ゲノムを1セットずつ持つ二倍体であるが、ガンでは二倍体を劇的に逸脱した異常細胞が見られる。本研究では細胞、とくに染色体分配を司る紡錘体がどのように極端な染色体数異常に順応して細胞増殖を可能にしているのかを解明することを目的とした。細胞イメージングおよび網羅的遺伝子発現解析から、染色体数の劇的な変化が分裂期中心体構造や細胞周期制御因子cyclin D遺伝子の発現を変化させることを突き止めた。さらに、それらの細胞制御経路の特異的抑制が正常二倍体状態から逸脱した細胞で選択的な増殖抑制を起こすことを見つけ、劇的な染色体数変化に細胞が順応する分子機構の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

倍数性変化はガンに特徴的な細胞異常であり、倍数性変化に伴う細胞制御機構の変化を理解することは、倍数性変化に基づくガン細胞の特異的攻撃法の樹立につながると期待される。本研究で得られた知見は、倍数性変化による影響を受ける具体的な細胞プロセスを特定した点に学術的意義があり、これらのプロセスを標的とすることで倍数性異常細胞の選択的な攻撃を行える可能性を示した点に医学的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Animal somatic cells are usually in the diploid state, containing two copies of genomes. Abnormal changes in ploidy state (ie. drastic changes in chromosome number) are hallmarks of cancer cells, but it remains largely unknown how cells can manage to survive with abnormal chromosome numbers. In this research, I aimed to elucidate the molecular mechanism through which mitotic and cell cycle regulatory systems can adapt to drastic chromosome number changes. Through cell imaging and comprehensive gene expression analyses, we found characteristic changes in mitotic centrosome structure and cyclin D expression upon ploidy changes, which potentially contribute to cellular adaptation to drastic chromosome number changes.

研究分野：細胞生物学

キーワード：倍数性 細胞分裂 中心体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

通常体細胞は父方母方ゲノムを1セットずつ保有する二倍体(46本の染色体を保有する)であるが、広範なガン細胞において大幅な染色体数の異常が見られる。細胞が分裂増殖するためには、複製された染色体を微小管細胞骨格から形成される紡錘体構造が一つ一つ捕捉して整列・分配する必要がある。このため、ガン細胞などで見られる極端な染色体数の異常は、紡錘体による染色体の捕捉・分配過程に物理的な負荷を与える可能性があるが、多くの二倍体を逸脱したガン細胞株でも染色体分配過程は一見正常に行われ、細胞は増殖することができる。このことから、紡錘体による細胞分裂制御機構には、極端な染色体数変動に順応して安定な分裂増殖を可能にする未知の仕組みが備わっている可能性が示唆される。この仕組みを解明し、その人為的操作が可能になれば、極端な染色体数異常を持つガン細胞だけを選択的に増殖抑制する新しい細胞攻撃法を開発できることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、正常状態からの極端な染色体数の増減に順応して安定な細胞分裂増殖を可能にする未知の分子機構を明らかにし、その人為操作による細胞の選択的攻撃の実現可能性を実験的に検証することを目的とした。

3. 研究の方法

・実験材料

極端な染色体数の変動の影響を検証するために、ヒト白血病由来一倍体細胞株 HAP1 をゲノム倍加によって二、四倍体化した遺伝的背景が同一の細胞株を使用した。細胞は IMDM 培地に抗生物質および 10%ウシ胎児血清を添加したもので、5% CO₂、37 °C 環境下で培養した。一倍体細胞は通常培養で徐々に二倍体化してしまうため、常時フローサイトメトリー(北海道大学グローバルファシリティーセンター保有の JSAN, ベイバイオサイエンス社製を使用)によるサイズソートを行い、増殖・凍結保存したものを融解後 1 週間以内に実験に使用した。

・間接蛍光抗体法

細胞内における細胞骨格・細胞膜結合性因子の局在を解析するために間接蛍光抗体法を行った。具体的には細胞を 3.2%パラフォルムアルデヒド含有緩衝液で固定後、0.5%トライトン X100 含有緩衝液で透過処理し、蛍光抗体法によって標的遺伝子産物を染色することで観察した。パラフォルムアルデヒドにより抗原性が失われてしまう標的を染色する際には 100%メタノールを用いて細胞固定を行った。各種因子の抗体は、メーカーから購入して用いた。

・細胞イメージング

細胞観察は、60x および 100x 対物レンズを装着したスピニングディスク型コンフォーカル顕微鏡によって行った。生細胞観察の場合、観察の数時間前に細胞培養液をフェノールレッド不含の培地に交換し、ステージインキュベーター内で、摂氏 37 度、5% CO₂ 環境の下で、細胞をカバーガラスボトムチャンバー内に培養した状態で蛍光タンパク質によってタグした標的因子の細胞内動態を観察した。

・網羅的遺伝子発現比較解析

非同調培養した一、二倍体 HAP1 細胞から NucleoSpin RNA kit(Takara)を用いて total RNA を単離精製し、次世代シーケンシングによる differentially expressed gene(DEG)解析解析を、MacroGen Inc.への外注によって実施した。解析条件の詳細は下記発表論文 2 の *Materials and methods* に詳述した。

・RNAi による遺伝子発現抑制および cDNA 導入による外来遺伝子発現

遺伝子阻害実験には RNAi 法を用いた。具体的には、各標的遺伝子をコードする siRNA を、Lipofectamin RNAiMAX (invitrogen)により細胞内に導入し、1-4 日間培養することで、遺伝子発現阻害を行って下記の実験に供した。各種外性遺伝子の導入には JetPEI (Polypplus science)を使用した。

・細胞増殖・生存性比較実験

化合物の細胞増殖、生存性への影響を調べるために一、二、四倍体細胞を 96-well プレート培養皿にそれぞれ 9,000、4,500、2,250 細胞/ウェルの密度で播種し、24 時間後に様々な濃度の PD0332991 (PZ0199, シグマアルドリッチ)、LY2835219 (HY-16297, MedChemExpress) および doxorubicin hydrochloride (040-21521, 和光純薬工業)を添加した。48 時間後、5% Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所)を添加して 4 時間インキュベートした後、450 nm 吸光を Sunrise プレートリーダー (Tecan) を用いて定量した。

4. 研究成果

・染色体倍加に伴う分裂期中心体の増大

細胞分裂制御システムが極端な染色体数変動に順応する仕組みの手がかりを得るために、まず、ヒト白血病由来一倍体細胞を元に二、四倍体細胞株を作成し、染色体分配を司る細胞装置である紡錘体と中心体の構造を α -チューブリンおよび γ -チューブリン抗体を用いた間接蛍光抗体法により比較解析した。興味深いことに、染色体数が倍加するにつれ、中心体のサイズが増大し、そこから形成される星状体微小管の本数も倍以上に増加することが分かった（発表論文3の Figure 9）。同様の染色体数依存的な中心体増大は大腸ガン由来 DLD-1 細胞の二、四倍体細胞間でも観察されたが、正常網膜由来 hTERT-RPE-1 細胞の二、四倍体細胞間では観察されなかった。このことから、染色体数依存的な中心体増大は複数の由来組織の異なる細胞種で共通する現象であるとともに、細胞の種類に依存して生じる現象であることが分かった。

さらに現在、上記中心体増大現象を司る分子機構についての知見を得るために RNAi スクリーンによる責任因子の探索を進めている。これまでに同一の分子経路に属する紡錘体形成関連因子群が中心体増大に必要であることを見出し、それらの因子の抑制により染色体数が多大な四倍体細胞で二倍体細胞に比べてより甚大な増殖抑制が起こる傾向を突き止めている。今後はそれらの因子の細胞内機能のレベルが染色体数の変化に応じて増減するかどうかの検証を進め、染色体数変化に応じて紡錘体および中心体機能が変化し染色体数変化の負担に順応する分子機構の全容に迫りたい。

・非二倍体状態における中心体複製制御障害の発見

本課題推進の過程で、一倍体 HAP1 細胞の20%超の細胞で中心体喪失に伴う単極紡錘体形成とそれによる分裂異常が恒常的に発生していることを偶然発見した。二倍体化したコントロールでは中心体喪失は見られなかったことから上記中心体喪失が一倍体状態に特異的な現象であることが分かった。さらにこの現象の一般性を検証するためにマウス単為発生技術を用いて一、二倍体単為発生胚を作成し、中心体形成が起こる胚盤胞期の胚を観察したところ、HAP1細胞と同様一倍体特異的な中心体喪失が起こっていることが分かった。これらのことから哺乳類動物では種を超えて、一倍体状態特異的に中心体数維持に不全が生じていることが分かった。つぎに一倍体における中心体数異常の原因を探るために、ノコダゾール処理およびshake-off法により分裂期に同調、リリースした細胞を経時的に固定して中心小体数を計数する方法と中心小体マーカー centrin2-GFP安定発現株の live imaging によって中心小体複製の進行を追跡する方法で一、二、四倍体 HAP1 細胞における中心小体複製の進行を比較したところ、二倍体細胞に比べて、一および四倍体細胞では中心小体複製がそれぞれ大幅に遅延および加速していることが分かった（発表論文3の Figure 4および8）。これにより一、四倍体においては中心体がそれぞれ恒常的に喪失、過剰複製されることが明らかになった。さらに興味深いことに、上記で見出した染色体数依存的な星状体微小管の数の変化と相関して、分裂期終りに中心体を構成する二つの中心小体が引き離されて新しい中心小体の複製が可能になる「中心体ライセンス」のプロセスが起こるタイミングが変化し、一倍体、四倍体において中心体複製の速度がそれぞれ異常に減速、加速されていることが分かった（発表論文3の Figure 6および8）。これらの結果から哺乳類細胞では染色体複製サイクルと中心体複製サイクルが二倍体状態でのみ正確に噛み合うようにデザインされており、それが非二倍体細胞における細胞複製の安定性を破綻させる原因となっている可能性が示唆された。

・一倍体状態特異的な Cyclin D の発現抑制と Cdk4/6 阻害への感受性の増大

染色体数依存的な細胞分裂増殖に関わる遺伝子制御系の変化の有無とその意義について洞察を得るために、一、二倍体 HAP1 の比較トランスクリプトーム解析を行った。その結果、70以上の遺伝子について一倍体で二倍体と比べて有意に発現レベルが増減していることが分かった（発表論文2の Figure 1）。その中で、細胞周期制御に関わる Cyclin D2 が特に顕著に一倍体で発現低下していたことからウェスタンブロットによりタンパク質レベルの比較を行ったところ、タンパク質レベルでも一倍体で二倍体の半分程度まで減少が見られた。一方で Cyclin D 依存的経路の下流で制御される Rb のリン酸化や p27 の cdk2 からの隔離は一倍体と二倍体で同程度に起こっていたことから、一倍体では低い cyclin D レベルに順応してこれらの制御を正常に行うことができていることが示唆された（発表論文2の Figure 2）。興味深いことに、Cyclin D 依存的キナーゼの cdk4/6 の阻害剤（PD0332991、LY2835219）による細胞増殖抑制効果を一、二、四倍体細胞で比較したところ、一倍体ではこれらの薬剤への感受性が選択的に増大していることが分かった。このような倍数性依存性はコントロールとして用いたトポイソメラーゼ II 阻害剤の doxorubicin では見いだされなかったことから、上記経路の攻撃に特有の現象であると考えられる。上記の結果から、倍数性依存的な cyclin D の発現レベル変化が、活性型の cdk4/6 の細胞内プールのレベルを変化させて、これらのキナーゼ阻害剤に対する感受性を変化させている可能性が考えられる。Cdk4/6 は制ガンターゲットとして有望視される因子であることから、今後は cyclin D のレベルが倍数性依存的に変動する分子的な仕組みと、その変動がもたらす生理的影響をさらに検証していく。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件) *Corresponding author

1. Yaguchi, K., Yamamoto, T., Matsui, R., Tsukada, Y., Shibamura, A., Kamimura, K., Koda, T., and **Uehara, R.** *

Tetraploidy-associated centrosome overduplication in mouse early embryos

Communicative and Integrative Biology 11: e1526605-1526606 (2018) 査読あり

doi: 10.1080/19420889.2018doi: 10.1080/19420889.2018

2. Yaguchi, K., Yamamoto, T., Shimada, M., Sugimoto, R., Nakamura, K., Ayabe, T., and **Uehara, R.** *

Ploidy-dependent change in cyclin D2 expression and sensitization to cdk4/6 inhibition in human somatic haploid cells

Biochemical and Biophysical Research Communications 504: 231-237(2018) 査読あり

doi: 10.1016/j.bbrc.2018.08.160

3. Yaguchi, K., Yamamoto, T., Matsui, R., Tsukada, Y., Shibamura, A., Kamimura, K., Koda, T., and **Uehara, R.** *

Uncoordinated centrosome duplication cycle underlies the instability of non-diploid states in mammalian somatic cells.

Journal of Cell Biology 217: 2463-2483 (2018) (Article) 査読あり

doi: 10.1002/1873-3468.12844

4. Hiruma, S., Kamasaki, T., Otomo, K., Nemoto, T., and **Uehara, R.** *

Dynamics and function of ERM proteins during cytokinesis in human cells

FEBS Letters 591: 3296-3309 (2017) 査読あり

doi: 10.1002/1873-3468.12844

〔学会発表〕(計 5 件)

1. **Ryota Uehara** , Kan Yaguchi, and Takahiro Yamamoto

Novel link between ploidy and centrosome duplication

Polyploidy in Organ Development, Repair, and Disease, Mount Desert Island Biological Laboratory, Maine, the USA 2018. 10. 13

2. Kan Yaguchi , Takahiro Yamamoto, and **Ryota Uehara**

A novel link between ploidy level and centrosome homeostasis in human somatic cells

Joint Annual Meeting of JSDB 51st and JSCB 70th, Workshop, Tokyo 2018. 6. 7

3. Hiruma, S., and **Uehara, R.**

Molecular mechanism of the contractile ring-the plasma membrane interaction during cytokinesis in human cells

第69回日本細胞生物学会大会 シンポジウム 招待講演 2017. 6. 14 仙台市

4. Yaguchi, K., Matsui, R., Tsukada, Y., Koda, T., and **Uehara, R.**

Novel link between ploidy level and centrosome homeostasis in mammalian somatic cells

第69回日本細胞生物学会大会 ワークショップ 2017. 6. 15 仙台市

5. Yaguchi, K., Matsui, R., Tsukada, Y., Koda, T., and **Uehara, R.**

Novel link between ploidy level and centrosome homeostasis in mammalian somatic cells

Cold Spring Harbor Asia Meeting "Cilia and Centrosomes"

2017. 4. 28. Suzhou, China

〔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

研究室 HP

<https://tenure-track.cris.hokudai.ac.jp/lab/uehara/>

研究成果のプレスリリース

https://www.hokudai.ac.jp/news/180508_pr2.pdf

6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：矢口 完

ローマ字氏名：YAGUCHI, Kan

研究協力者氏名：山本 隆博

ローマ字氏名：YAMAMOTO, Takahiro

研究協力者氏名：島田 将矢

ローマ字氏名：SHIMADA, Masaya

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。