

令和元年6月11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15613

研究課題名(和文)オートファジーによる中心体数制御破綻と発がんメカニズムの解明及び抗がん剤開発研究

研究課題名(英文) Analysis of tumorigenesis by autophagy failure and centrosomal dysregulation.

研究代表者

本田 真也 (HONDA, Shinya)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：90532672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：中心体数の制御は主にユビキチン-プロテアソーム系により行われていることが知られているが、近年我々は新たに中心体数の制御にオートファジーが関与していることを報告した。本研究では、オートファジーによる中心体数制御の破綻ががんに関与するかについて解析を行った。発がんモデルマウスや移植実験を行った結果、オートファジーによる中心体制御機構の破綻は発がんや腫瘍の悪性化に貢献することが明らかになった。またヒトがん細胞株においても同様の中心体数増加がみられるかを解析したところ、ある種のがん細胞群において顕著な増加が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

半数を超えるがんが中心体を過剰に有していると考えられる為、がん化の過程における中心体数の制御破綻の解明は発がん抑制や腫瘍の悪性化、増大化を妨げる事ができると考えられる。本研究は、申請者のグループが発見したオートファジーによる中心体数の制御機構が、がんに関与することを明らかにした研究であり、オートファジーによる中心体制御機構の破綻が発がんや腫瘍の悪性化に貢献することを明らかにした。本研究結果からオートファジー不全が腫瘍の悪性化に関与することが明らかになったため、オートファジー活性の惹起によりがん抑制効果が得られると考えられ、創薬の基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：An abnormal centrosome number causes genomic instability, which leads to tumorigenesis. Recently, we showed that autophagy also regulates the number of centrosomes in a cell, via the degradation of Cep63. Thus, a defect in autophagy causes Cep63 accumulation, which in turn forms multiple centrosomes (Nat. Commun., 2016).

In this study, we analyzed whether the failure of centrosome regulation by autophagy is related to tumorigenesis. As a result of carrying out tumorigenesis model mice and xenograft experiments, it has become clear that disruption of the centrosome control mechanism by autophagy contributes to tumorigenesis and tumor malignancy. In addition, analysis of whether a similar increase in the number of centrosomes was also observed in human cancer cell lines showed a significantly increase in certain cancer groups.

研究分野：医師薬学

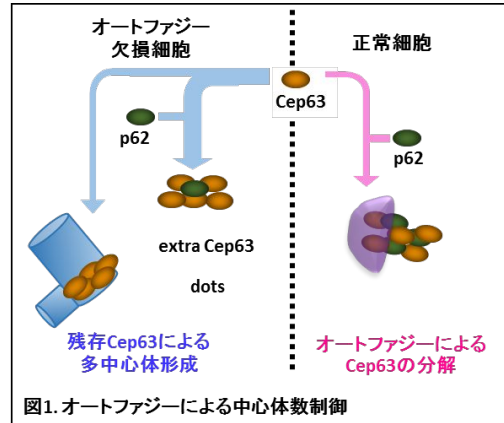
キーワード：オートファジー がん 中心体

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

1. 研究開始当初の背景

細胞分裂において染色体を二つに均等に分配することは最も必要な事象であり、これが損なわれると、染色体が不安定になり、発がんの誘因となる。染色体を均等に分配する為には、紡錘体の極が正しく二つに限定されることが必要であり、哺乳動物細胞では中心体が紡錘体の極として機能している。多くのがん細胞の特徴の1つに、過剰な中心体の存在が知られている。中心体が過剰に存在すると、染色体の分離異常を促し、染色体の不安定性を介して発がんや腫瘍の悪性化が惹起される。この為、中心体数の制御機構が破綻するメカニズムの解明と中心体を過剰に有する細胞の処理が可能であれば、発がん抑制や腫瘍の悪性化、増大化を妨げる事ができる。

中心体数の制御は主にユビキチン-プロテアソーム系により行われている。しかしながら、申請者は新たに中心体数の制御にオートファジーが関与していることを明らかにした(図1、Nat. Commun. 2016)。オートファジーを欠損した細胞では、過剰な中心体を持つ細胞が多数みられ、この結果からオートファジー不全により中心体数が増え腫瘍の増悪化につながる可能性が考えられた。実際にオートファジー不全が腫瘍の悪性化に関与するならば、オートファジー活性の惹起によりがん抑制効果が得られると考えられる。



2. 研究の目的

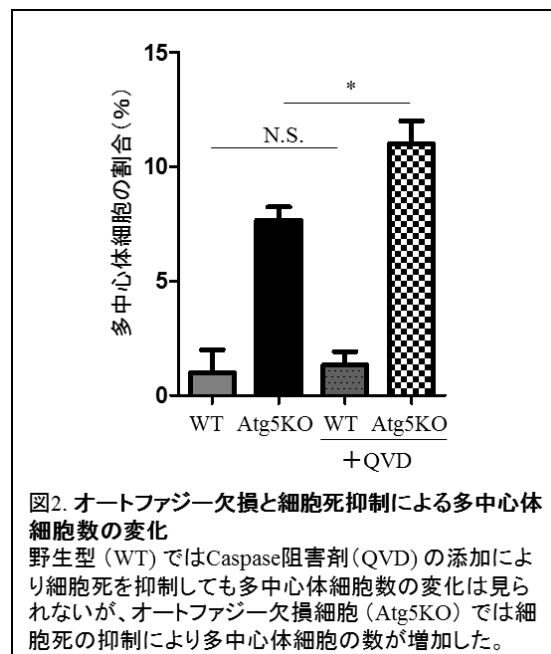
本研究の目的は、オートファジーによる中心体数制御の発がん・腫瘍の悪性化への関与を解明することである。さらに、同様の関連性がヒトがん細胞株においてもみられるかについて解明する。

3. 研究の方法

オートファジー欠損、オートファジー欠損・p53欠損細胞として、それぞれ Atg5KO 胎仔線維芽細胞 (MEF)、Atg5/p53DKO MEF を用いた。細胞死の阻害剤として、Caspase 阻害剤である QVD-OPh を用いた。オートファジーによる中心体数制御の破綻が発がんを促進するかを明らかにするために、発がんモデルマウスとオートファジー不全マウスの交配を行い腫瘍の発生に変化が生じるかを解析した。また、オートファジー不全による中心体数の増加が腫瘍の悪性化を引き起こすかに関して、腫瘍化 MEF 細胞を用いマウスへの移植実験を行い解析した。さらに、ヒトがん細胞株においてもオートファジーによる中心体数制御が関与するかについて免疫染色により解析を行った。

4. 研究成果

オートファジーは中心体タンパク質 Cep63 を分解することで中心体数の制御を行っている。オートファジーの不全は Cep63 の異常な蓄積を引き起こし、結果として中心体数の増加につながる。しかしながら、オートファジー欠損細胞において継代を重ねても多中心体細胞の割合は一定数以上には増加しないこと・オートファジー不全マウスでは多中心体細胞の増加は認められるものの、がんの発生は認められなかったことから、オートファジー不全により生じた多中心体細胞は、その後細胞死を起こしていることが考えられた。そこで、オートファジー欠損細胞に細胞死を抑制することで多中心体細胞数に変化が生じるかについて解析を行った。その結果、もともと多中心体細胞がほとんど存在しない野生型の細胞ではその割合に変化は見られなかったが、多中心体細胞の多い Atg5KO 細胞では Caspase 阻害剤を添加し細胞死を抑制することで、多中心体細胞の割合のさらなる増加が認められた(図2)。同様の結果は、オートファジーと p53 を両欠損させた場合においても観察された。これらの結果から、多中心体細胞の一部は細胞死を引き起こしていることが明らかになった。



オートファジー不全マウスではがんの発生は認められなかったことから、上記で明らかになった多中心体細胞の一部は細胞死を起こしているということから、発がんモデルマウスとオートファジー不全マウスを交配し、新たな系統のマウスを作製した。このマウスを用い、オートフ

ァジーによる中心体数制御の破綻が発がんを促進するかについて解析を行った。これらマウスにおいて腫瘍の発生を解析したところ、オートファジー不全マウスとの交配により、通常よりはるかに早くがんが形成されることが明らかになった（図3）。またそれらの腫瘍において多中心体細胞が観察された。このことから、オートファジーによる中心体数制御の破綻が発がんを促進することが明らかになった。

さらに、オートファジー不全による中心体数の増加が腫瘍の悪性化を引き起こすかについて、マウスへの移植実験を用い解析を行った。腫瘍化 MEF 細胞に対して中心体タンパク質の発現抑制を行い、Xenograft 後に形成される腫瘍を解析した。その結果、中心体タンパク質の発現を抑制することで形成される腫瘍の大きさが小さくなるだけでなく、腫瘍の形成率も低下することが明らかになった（図4）。

これらの結果から、オートファジーによる中心体制御機構の破綻は発がんや腫瘍の悪性化に貢献することが明らかになった。最後に、ヒトがん細胞株においても同様の中心体数増加がみられるかについて解析を行った。様々ながん細胞株を用い中心体数を計測したところ、ある種のがん細胞群において中心体数の顕著な増加が認められた。さらにそれらにおいて中心体タンパク質の発現抑制を行うと Xenograft 後の腫瘍形成が抑制されることが確認された。この結果から、ヒトにおいても腫瘍形成・悪性化にオートファジーによる中心体数制御が関与していることが明らかになった。

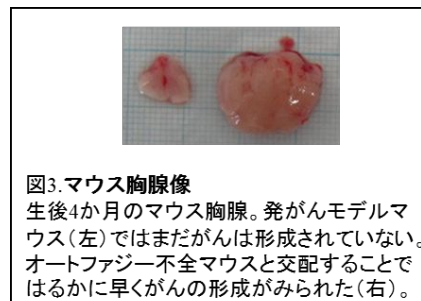


図3.マウス胸腺像

生後4か月のマウス胸腺。発がんモデルマウス(左)ではまだがんは形成されていない。オートファジー不全マウスと交配することで、はるかに早くがんの形成がみられた(右)。

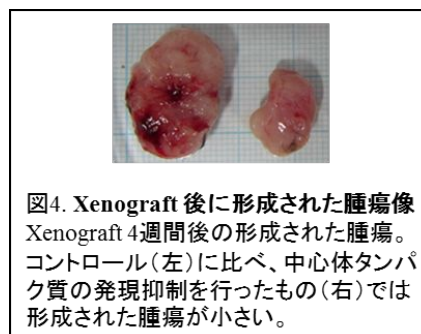


図4. Xenograft 後に形成された腫瘍像

Xenograft 4週間後の形成された腫瘍。コントロール(左)に比べ、中心体タンパク質の発現抑制を行ったもの(右)では形成された腫瘍が小さい。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Noguchi S, [Honda S](#), Saitoh T, Matsumura H, Nishimura E, Akira S, Shimizu S.
Beclin 1 regulates recycling endosome and is required for skin development in mice.
Commun. Biol.
査読有
2 巻、2019、 -
DOI : 10.1038/s42003-018-0279-0.

Sugimoto Y, Murohashi M, Arakawa S, [Honda S](#), Shimizu S.
Prediction of intracellular targets of a small compound by analyzing peptides presented on MHC class I.
Biochem. Biophys. Res. Commun.
査読有
508 巻、2019、 480-486
DOI : 10.1016/j.bbrc.2018.11.089.

Nagata M, Arakawa S, Yamaguchi H, Torii S, Endo H, Tsujioka M, [Honda S](#), Nishida Y, Konishi A, Shimizu S
Dram1 regulates DNA damage-induced alternative autophagy.
Cell Stress
査読有
2 巻、2018、 55-65
DOI : 10.15698/cst2018.03.127

Arakawa S, [Honda S](#), Torii S, Tsujioka M, Shimizu S
Monitoring of Atg5-Independent Mitophagy
Methods Mol. Biol.
査読有
-巻、2017、 -
DOI : 10.1007/7651_2017_16

Arakawa S, [Honda S](#), Yamaguchi H, Shimizu S.
Molecular mechanisms and physiological roles of Atg5/Atg7-independent alternative autophagy.
Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.
査読有
99 巻、2017、 378-385

DOI : 10.2183/pjab.93.023

〔学会発表〕(計 2 件)

本田真也・清水重臣

オートファジーは中心体数を制御することで腫瘍形成を抑制する

第 41 回日本分子生物学会年会

2018 年

本田真也・清水重臣

オートファジーは中心体数を制御することで腫瘍形成を抑制する

2017 年度生命科学系学会合同年次大会

2017 年

〔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〕

病態細胞生物学分野ホームページ

<http://www.tmd.ac.jp/mri/pcb/index.html>

6 . 研究組織

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。