

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03219

研究課題名(和文)染色体倍加に伴う慢性的な中心体異常の発生原理と細胞不均一性への寄与

研究課題名(英文)Principle of chronic centrosome aberrations in whole-genome duplicated cells and its contribution to cellular heterogeneity

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がんの3割に共通する細胞異常「染色体倍加」に伴う中心体活性亢進の原理と意義の解明を目的とした。我々はこの現象が染色体倍加に伴う中心体足場遺伝子のコピー数増加に起因する中心体因子集積亢進によって引き起こされることを明らかにした。さらに、この中心体活性亢進を人為的にキャンセル手法を開発し、この現象が染色体倍加細胞の生存増殖性に適応的な役割をもたない一方、当初の予想に反して染色体倍加細胞の中心体構造制御を脆弱化させる要因になっていることを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

染色体倍加は個体発生、疾病、進化など多様なプロセスを駆動する細胞現象であり、染色体倍加が細胞機能を変化させる過程とその原理の解明は、これら広範な生命プロセスを理解し制御するために欠かすことができない。本研究は、染色体倍加細胞が引き起こす具体的細胞制御変化として中心体構造制御の脆弱化を突き止め、その分子基盤を明らかにした点に学術的意義がある。さらに、この脆弱性を標的とすることで、疾病の要因となりうる染色体倍加細胞の選択的な細胞分裂阻害が可能であることを示した点に医学面での社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the principle and significance of centrosome hyperactivation associated with whole-genome duplication (WGD), a cellular abnormality common in 30% of cancers. We found that this phenomenon is caused by an increase in the accumulation of centrosomal proteins resulting from the doubling of the gene dosage of a centrosome scaffolding gene upon WGD. By developing a method to cancel this centrosome hyperactivation artificially, we found that this phenomenon does not play an adaptive role in the proliferation control of WGD cells. However, contrary to our initial expectation, we found that the centrosome hyperactivation made WGD cells more fragile in centrosomal structural homeostatic regulation, suggesting the feasibility of WGD cell-selective suppression through targeting their fragility.

研究分野：細胞生物学

キーワード：染色体倍加 中心体 倍数性

1. 研究開始当初の背景

ヒト正常細胞は23本の染色体を2コピーずつ保有する二倍体で、各細胞周期に染色体複製と染色体分配を1回ずつ行うことで、二倍体状態を保持したまま増殖する。細胞分裂制御の異常により複製染色体の分配をスキップしたまま細胞周期を終えた細胞は「染色体倍加」を引き起こす。染色体倍加は固形がんの3割超で観察される細胞異常で¹、特有のゲノム不安定性や細胞形質変化を通してがん病態形成に重大な寄与を果たすと考えられている。このため、染色体倍加細胞と正常二倍体細胞の生存増殖制御における差異を分子レベルで理解することにより、病態形成のメカニズムを知り、さらに染色体倍加細胞特異的な攻撃を可能にする新しい介入法の樹立に資する知見を得ることができると期待される。

中心体は二対の中心小体とそれを取り囲む中心小体周辺物質 (Pericentriolar Material; 以下 PCM) から構成される細胞内構造で、PCM に微小管細胞骨格の生成を司るタンパク質 γ -チューブリンが集積し、微小管ネットワーク形成の足場を提供する役割を果たす。細胞分裂期には二対の中心体が双極性の紡錘体を形成することで、複製染色体を一つ一つ捕捉して、2つの娘細胞に均等分配する機能を果たす。

我々は本研究開始に先立ち、複数のヒト培養細胞種において染色体倍加に伴って細胞分裂期の中心体に集積する γ -チューブリン量が、二倍体細胞に比べて有意に増加し、より多くの分裂期微小管を形成することを見出した²。このような中心体制御変化は、染色体倍加細胞特有の細胞分裂制御、ひいてはゲノム不安定性に関わることが予想されたが、この中心体制御変化が起こる原理やその生理・病理的意義は全く明らかでなかった。

2. 研究の目的

本研究では、我々が独自に発見した染色体倍加に伴う中心体制御変化(分裂期中心体の活性亢進現象)の実態と、原理を明らかにし、染色体倍加細胞の生存増殖における意義を明らかにすることを目的とした。さらに、これらの検証で得られる知見をもとに、染色体倍加細胞の生存増殖を選択的に抑制可能にする遺伝子操作法を特定することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 細胞株の作製

ヒト大腸がん由来二倍体細胞株 HCT116、ヒト白血病由来 HAP1 および、それらの染色体倍加誘導細胞株を比較検証に用いた。二倍体細胞を微小管脱重合剤のノコダゾールで4時間処理し、Shake-off 法によって分裂期細胞を濃縮後、アクチン繊維重合阻害剤のサイトカラシン処理もしくは anillin 遺伝子の RNAi による発現抑制により細胞質分裂を阻害することで染色体倍加を誘導した。さらに倍加細胞を限界希釈法でクローン化し、およそ2週間の継代培養において安定増殖してくるクローンを細胞株として単離した。フローサイトメトリーにより、二倍体の倍の染色体量を保有することを確認して、これを染色体倍加細胞株として実験に使用した。なお、染色体倍加により、中心体数も一旦倍加されるが、それに引き続く継代培養の過程で余剰中心体が排除されるため、染色体倍加細胞株の多くの細胞が正常数(=2)の中心体を保有する状態で実験を行った。染色体倍加直後の細胞における中心体を解析する場合には、上記のサイトカラシン処理による染色体倍加後最初の分裂期に細胞を同調させて解析を行った。さらに、中心体を倍加させずに染色体だけを倍加させる場合には、上記サイトカラシン処理の前に中心体複製を抑制する centrinone B (Plk4 阻害剤) を処理することで、中心体を2つもつ染色体倍加細胞を作製した。いずれの方法も、処理後に中心体および中心小体、染色体量を定量することで、操作が正常に行われたことを確認して実験に用いた。

分裂期中心体の微小管形成活性を定量するために、伸長微小管端に特異的に集積する EB3-EGFP を安定発現する細胞株を作製し、ライブイメージングにより EB3 コメット構造の生成頻度を計測することで、各細胞の中心体活性の相対評価を行った。この際、centrin2-mCherry を共発現し、中心小体を2つ保有する中心体のみを解析対象とすることで、余剰中心小体による影響を排除した。

(2) 細胞イメージング

中心体タンパク質の細胞内局在・集積量を解析するために間接蛍光抗体法を行った。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% Triton 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-20℃に冷却した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。

固定細胞および生細胞観察は、20x 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、落射蛍光顕微鏡、および北海道大学グローバルファシリティセンター所有のレーザースキャン型コンフォーカル顕微鏡を用いて行った。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 DMEM 培地に交換し、ステージインキュベーター内で 37 °C、5% CO₂ 環境下で観察した。

(3) 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。より長期の遺伝子発現阻害は、shRNA をコードするプラスミドを作製し、その安定発現株を単離樹立することで実施した。各種外性遺伝子をコードするプラスミドの導入には JetPEI (Polypius science)を使用した。

4. 研究成果

(1) 染色体倍加細胞における中心体タンパク質集積の解析

まず、我々が先行研究で見出した染色体倍加細胞株における分裂期中心体への γ -チューブリンの集積亢進の実態を理解するために、PCM の足場を形成する主要因子 (GCP4, PCNT, Cep215 および Cep192) の局在を、間接蛍光抗体法を用いて二倍体コントロールおよび染色体倍加細胞株と比較した。この結果、いずれの因子も染色体倍加細胞の分裂期中心体への集積が有意に増加していることを明らかにし、 γ -チューブリン集積亢進が PCM 構成因子の一般的増加を伴って生じる現象であることがわかった。さらに上述の EB3-EGFP コメットの定量により、分裂期中心体の微小管生成能を比較すると、染色体倍加細胞では二倍体細胞に比べて微小管生成能が二倍程度増加していることがわかった。これらの結果をもとに、今後、染色体倍加に伴う PCM 集積亢進および微小管形成能の増加を「分裂期中心体の活性亢進」と呼称することとした。

(2) 染色体倍加細胞の中心体活性亢進の原理の探索

次に染色体倍加に伴う中心体活性亢進の原理を調べた。先行研究および上述の実験では、クローン株として取得した準安定的な染色体倍加細胞を材料に用いた (株取得法は 3. 研究の方法を参照)。このため中心体活性亢進現象が、i)染色体倍加によって直ちに引き起こされる現象か、ii)染色体倍加細胞株を取得する過程で、細胞生存・増殖性に有利な形質として選択された結果見られる適応的現象かを区別する必要があると考えた。そこで、染色体倍加を誘導した直後の細胞分裂期の中心体を解析した。この条件では、染色体倍加とともに中心体数も倍加して 4 つになったが、中心体 1 つあたりの中心体構成タンパク質の集積量を解析すると、二倍体コントロールと同程度であることがわかった。次に、染色体倍加細胞における中心体数が中心体構成因子の集積量に与える影響を調べるために、染色体倍加の際に中心体は倍加させずに 2 つのままにする細胞同調法を確立したところ (3. 研究の方法に詳述) この条件では、染色体倍加細胞株と同様に、中心体構成因子の集積量が二倍体細胞に比べて顕著に増加することがわかった。これらの結果から、中心体 1 つあたりの構成因子集積量は、倍数性 (全染色体のコピー数) と細胞内中心体数の比によって決定していることが明らかになった。さらに、染色体倍加誘導直後でも、細胞が中心体を 2 つしか保有しない条件では、染色体倍加細胞株で見られるのと同程度の構成因子集積亢進が観察されたことから、中心体活性亢進が染色体倍加そのものによって直ちに引き起こされる現象であり、適応的現象ではないことがわかった。

さらに染色体倍加回数と中心体構成因子集積の関係性を調べるために、染色体倍加 HCT116 細胞株において上述の方法で (中心体数は 2 つにしたまま) 再び染色体倍加を誘導した。この結果、一回染色体倍加細胞に比べ、二回倍加細胞ではさらに有意に中心体構成因子の過剰集積が起こった。興味深いことに、二回染色体倍加細胞では高頻度で分裂期中心体の PCM の一部が断片化して紡錘体極から乖離する現象が観察された。このことから、中心体因子集積亢進は染色体倍加回数と正の相関をもって発生し、少なくとも HCT116 細胞株においては二回倍加後には、中心体の PCM を安定保持できない程度にまで集積亢進が起こることが明らかになった。

(3) 染色体倍加細胞の中心体活性亢進の抑制法の樹立

染色体倍加細胞では文字通り染色体数が正常二倍体に比べて二倍になるため、細胞分裂期の染色体捕捉にかかる制御の負担の増加が予想される。そこで我々は染色体倍加細胞における分裂期中心体活性亢進が、この負担増に対応するための役割を果たす可能性を検証することにした。このためには、染色体倍加細胞において中心体活性亢進を実験的にキャンセルし、中心体構成因子集積および微小管形成能をそれぞれ二倍体コントロールと同程度に低下させる操作が必要となる。まず当初計画に従って、中心体構成因子および細胞分裂制御因子を中心としたターゲット RNAi スクリーンにより中心体活性亢進をキャンセルする条件を探索した。しかし、発現阻害により中心体構成因子の集積を抑制できるターゲットが複数同定できたものの、RNAi 法による発現抑制では、抑制レベルを定量的かつ高い再現性で調整することが困難なため、中心体活性亢進の細胞分裂・増殖制御における意義を正確に評価することができなかった。

そこで、オーキシン誘導デグロン法 (Auxin-inducible degron; 以下 AID 法) を用いることで、中心体タンパク質集積の調整因子の発現量をより正確に制御し、中心体活性レベルを調整す

ることを試みた。このために、倍数性依存的な中心体構成因子集積の制限要因の候補として、線虫初期胚で細胞サイズと相関した中心体因子の集積の制限要因となる Spd2 遺伝子³ のヒトオソログである Cep192 の量調整を試みた。具体的には二倍体 HCT116 の Cep192 遺伝子の片方の C 末端に AID タグを導入した細胞株(沖縄科学技術大学院大学の清光智美博士より分与)から染色体倍加細胞株を樹立し、オーキシン添加によって半数の遺伝子座から発現した Cep192 タンパク質を分解除去したところ、染色体倍加細胞において Cep192 の発現量を 50%に減少させ、二倍体コントロールの一細胞当たりの Cep192 の発現量と同等にすることに成功した。このことから、デグロン分解に際して、AID タグされていない Cep192 遺伝子座からの発現が相補的に増加することなく、狙い通りの発現制御が可能であることがわかった。

上記の手法で Cep192 を半減させた染色体倍加細胞では、Cep192 を含む中心体構成因子の集積量が二倍体コントロールレベルに減少し、EB3-EGFP コメットの定量で評価した分裂期中心体の微小管生成能も二倍体並みに減少(二倍体のレベルの活性は保持していた)することがわかった。このことから、倍数性依存的な中心体活性変化は、主に Cep192 遺伝子コピー数の変化に依存した中心体構成因子一般の集積量変化によって引き起こされていることがわかり、本研究の目的の1つである、染色体倍加に伴う中心体活性亢進の原理を理解することができた。

(4) 染色体倍加細胞における中心体活性亢進の意義の検証

次に、(3)で樹立した手法を用いて中心体活性亢進をキャンセルした染色体倍加細胞の細胞分裂制御を解析することで同現象の生物学的寄与を調べた。具体的には間接蛍光抗体法を用いて紡錘体形成能を調べたところ、中心体活性亢進をキャンセルした染色体倍加でも、コントロール染色体倍加細胞と同程度に正常な双極性紡錘体を形成し、同じ効率で染色体整列を制御することがわかった。さらに生細胞観察で細胞分裂の進行と分裂後の細胞運命を評価したところ、中心体活性亢進の有無が、細胞分裂の所要時間や成功率に影響を与えないことが明らかになった。これらの結果から、染色体倍加に伴って発生する中心体活性亢進は、染色体倍加細胞の分裂制御において、とくに適応的な機能を果たしていないことがわかった。

なお、本項の検証の過程で、上記の Cep192-AID 細胞株が相対的に過剰な量のオーキシン処理を受けた場合に、非特異的な細胞分裂異常を引き起こすことを副次的に発見した(2019 年度の研究実績報告の時点ではこの分裂障害の非特異性が明らかになっておらず、Cep192-AID の分解による作用とする解釈を報告した)。2020 年度の詳細な追加解析により、この現象は Cep192-AID を分解するのに必要な量よりも大過剰のオーキシンで処理した場合にのみ発生したことから、上記細胞株で特有に発生する非特異的反応であると結論付けた。この非特異的反応については本研究とは別途原因の究明を継続する予定である。

(5) 染色体倍加細胞の中心体制御における脆弱性の発見

(2)の検証から、染色体倍加に伴う中心体因子集積亢進は、分裂期中心体構造の安定な保持の仕組みを脆弱化させる可能性が示唆された。そこで、この可能性をさらに検証するために、近年中心体因子の集積を負に制御して中心体構造の恒常性維持に関わることが明らかにされたタンパク質ユビキチン化制御因子の TRIM37 の発現抑制の影響を染色体倍加細胞と二倍体コントロールで比較した。この結果、二倍体コントロールに比べて染色体倍加細胞では有意に高頻度かつ重篤な中心体断片化の異常が発生し、高頻度で多極紡錘体形成による染色体不等分配が引き起こされることがわかった。(3)で確立した手法で中心体因子集積亢進をキャンセルした染色体倍加細胞では、これらの中心体構造・分裂制御異常が二倍体コントロールレベルにまで緩和したことから、上記の染色体倍加細胞の脆弱化が中心体因子の集積亢進を原因として発生する現象であることがわかった。

(6) まとめ・展望

上記の研究から、染色体倍加細胞における中心体活性亢進が、中心体足場タンパク質のコピー数倍増を原因とする中心体因子集積亢進によって引き起こされる現象であることを明らかにした。また、この中心体活性亢進は、当初の予想に反して染色体倍加細胞の増殖生存に対して適応的な役割をもたないことがわかった一方で、むしろ中心体構造制御を脆弱化させる要因になっていることが明らかになった。

本研究から、中心体構造維持機構を標的とした染色体倍加細胞に選択的な細胞分裂・増殖阻害の有効性が示唆された。今後は、この染色体倍加細胞が内包する中心体構造の脆弱性や、さらにその脆弱性への人為的介入が、染色体倍加細胞の長期的な細胞運命にもたらす作用を解明する研究を展開する。

引用文献

1. Bielski C.M., et al., 2018 Nature Genetics 50:1189-1195
2. Yaguchi et al., 2018 Journal of Cell Biology 217:2463-2483
3. Decker M., et al., 2011 Current Biology 21:1259-1267
4. Meitinger F., et al., 2021 Journal of Cell Biology 220:e202010180
5. Balestra F.R., et al., 2021 Elife 10:e62640

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mafy Noushaba Nusrat, Matsuo Kazuya, Hiruma Shota, Uehara Ryota, Tamaoki Nobuyuki	4. 巻 142
2. 論文標題 Photoswitchable CENP-E Inhibitor Enabling the Dynamic Control of Chromosome Movement and Mitotic Progression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 1763 ~ 1767
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.9b12782	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 -
1. 著者名 Yoshizawa Koya, Yaguchi Kan, Uehara Ryota	4. 巻 8
2. 論文標題 Uncoupling of DNA Replication and Centrosome Duplication Cycles Is a Primary Cause of Haploid Instability in Mammalian Somatic Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.00721	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yaguchi Kan, Sato Kimino, Yoshizawa Koya, Mikami Daisuke, Yuyama Kohei, Igarashi Yasuyuki, Banhegyi Gabor, Margittai Eva, Uehara Ryota	4. 巻 46
2. 論文標題 Mevalonate Pathway-mediated ER Homeostasis Is Required for Haploid Stability in Human Somatic Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.20055	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 該当する
1. 著者名 Yang Guang, Hiruma Shota, Kitamura Akira, Kinjo Masataka, Mishra Mithilesh, Uehara Ryota	4. 巻 403
2. 論文標題 Molecular basis of functional exchangeability between ezrin and other actin-membrane associated proteins during cytokinesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 112600 ~ 112600
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2021.112600	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 該当する

1. 著者名 Kamada Takafumi, Otomo Kohei, Murata Takashi, Nakata Kaito, Hiruma Shota, Uehara Ryota, Hasebe Mitsuyasu, Nemoto Tomomi	4. 巻 12
2. 論文標題 Low-invasive 5D visualization of mitotic progression by two-photon excitation spinning-disk confocal microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-04543-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kamasaki Tomoko, Uehara Ryota, Fujita Yasuyuki	4. 巻 in press
2. 論文標題 Ultrastructural characteristics of finger-like membrane protrusions in cell competition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfac017	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3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 上原亮太
2. 発表標題 Ploidy-linked alterations in mitotic spindle polarity impact the long-term ploidy dynamics in mammalian cells
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上原亮太
2. 発表標題 動物非二倍体細胞における細胞分裂障害の発生機序
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上原亮太
2. 発表標題 動物生活環を特徴づける”倍数性・中心体リンク”
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	塚田 祐基 (Tsukada Yuki) (80580000)	名古屋大学・理学研究科・助教 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ハンガリー	Semmelweis University		
インド	Tata Institute of Fundamental Research	Indian Institute of Technology Bombay	