

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07677

研究課題名(和文)がん細胞におけるセパレーズ活性制御異常の分子基盤

研究課題名(英文)Molecular mechanism of separase deregulation in cancer cells

研究代表者

進藤 軌久 (SHINDO, Norihisa)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 実験病理部・研究員

研究者番号：00512253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：セパレーズのバイオセンサーで正常二倍体細胞株のセパレーズ活性を測定したところ、染色体分離時に急激で強い活性化が起きていた。一方、がん細胞株では染色体分離のはるか以前に活性の漏洩が起き、染色体分離時にも弱い活性しか検出されなかった。この傾向は分裂期の長いがん細胞株で顕著であり、低濃度の微小管重合阻害剤によって分裂期中期させると悪化する。セパレーズの抑制機構には真核生物全体で保存されているSecurinによる抑制と、主に脊椎動物で保存されているCyclin B1-Cdk1による抑制があるが、我々の見出した長い分裂期中期がセパレーズ制御異常につながる原因は、後者による抑制の減衰であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞を特異的に死滅させるにはがん特有の弱点を標的とすることが重要である。そのため、がん特有の染色体不安定性を増大させる方法が注目され、紡錘体チェックポイントなどを標的とする基礎研究は行われてきたが、いずれの研究もまだ萌芽段階にある。本研究で、がん特有のセパレーズ制御異常の原因がcyclin B1-cdk1による抑制の減衰であることが見いだされたことで、染色体不安定性を増大させる新たな治療法の開発の端緒とすることができる。セパレーズとcyclin B1-cdk1の結合様式に関する理解も進んできており、治療標的として今後飛躍的に開発が進む可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Separase biosensor revealed that separase was sharply activated at the onset of anaphase in normal diploid cell lines. In multiple types of cancer cell lines, however, separase was precociously activated long before the onset of anaphase and only weak activity was detected during chromosome segregation. This separase deregulation was more pronounced in cancer cell lines with longer mitosis and was exacerbated when anaphase delay was induced by low dose of microtubule polymerization inhibitors. There are two well-known separase inhibitors, securin and cyclin B1-cdk1. Regulation by securin is widely conserved among eukaryotes whereas regulation by cyclin B1-cdk1 complex is rather vertebrate specific. Our results indicated that the separase deregulation caused by delayed anaphase was due to attenuation of the latter mechanism.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：セパレーズ 活性制御 バイオセンサー 染色体不安定性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

染色体分配異常により染色体数が増減する染色体不安定性は、がん特有の細胞病態である。セパレーズは染色体分配時に姉妹染色分体間の接着因子を切断するプロテアーゼであり、その活性化は早すぎても遅すぎても染色体不安定性を引き起こすため、厳格に制御されなくてはならない。セパレーズは様々ながんで過剰発現していることが報告されており、特に乳がんではその過剰発現が原因で染色体不安定性が生じ、それによって腫瘍形成が進行していることが報告されている (Zhang et al., PNAS, 2008)。セパレーズのバイオセンサー (Shindo et al., Dev Cell, 2012; 国際特許出願:PCT/JP2013/068894) を用いて複数のがん細胞株におけるセパレーズ活性化プロファイル調べたところ、時期尚早の活性化が観察された。この現象はセパレーズを過剰発現していないがん細胞株でも観察されており、セパレーズ制御異常がより広範ながん細胞で生じているものと考えられた。セパレーズにはセキュリンとサイクリン B1 の 2 つの制御因子が直接結合していることが知られており (Gorr et al., Mol Cell, 2005)、セパレーズ活性化直前にセキュリンから解離したセパレーズがサイクリン B1 と一過的に結合することを発見しているが、そのセパレーズ制御機構における意義は不明であった (Shindo et al., Dev Cell, 2012)。

がん細胞株ではなぜセパレーズ制御異常が生じるのだろうか？この問題に答えるためには、正常細胞では何がセパレーズの時期尚早の活性化を抑えているのだろうか？という問題を考える必要があった。

### 2. 研究の目的

本研究では、がん細胞株でみられるセパレーズ活性制御異常の分子基盤を解明することを目的とした。そのためにまず、がん細胞株におけるセパレーズ活性制御異常を調べ、がん細胞株と似たようなセパレーズ活性制御異常を示すセパレーズ変異体発現細胞株を利用してセパレーズを厳格に制御する機構の理解を深め、さらに、そこで得られた知見をもとにがん細胞株における異常を明らかにすることとした。以下の 2 つの課題を大枠として設定した。

- (1) がん細胞におけるセパレーズ活性制御異常の実態を明らかにするために、複数のがん細胞株におけるセパレーズ活性化プロファイルを解析する。そして、それらのがん細胞株の分裂期の特徴 (染色体分配異常、分裂期の長さ、分裂期チェックポイントの異常 etc.) とセパレーズ活性制御異常との関連を調べる。さらに、正常二倍体細胞株の細胞周期制御機構を段階的に破壊して形質転換させた細胞株においても同様のセパレーズ活性制御異常がみられるか検討する。
- (2) がん細胞株とよく似たセパレーズ活性制御異常が見られるセパレーズ変異体発現細胞株は、セパレーズの自己切断部位に非切断型変異を導入したものであり (非切断型変異体発現細胞株) この変異体発現細胞株におけるセパレーズ活性制御異常の原因として以下の 3 点が考えられた。1. PP2A の結合異常。2. サイクリン B1 の結合異常。3. セキュリンの結合異常。これらの 3 つの可能性を検討していく。

### 3. 研究の方法

本研究では、がん細胞におけるセパレーズ活性制御異常の分子基盤を解明するために、セパレーズセンサーを駆使してがん細胞におけるセパレーズ活性制御異常の実態を解明し、セパレーズ変異体解析によってその分子背景を明らかにすることを計画した。すなわち、セパレーズセンサーと生細胞顕微鏡観察によるセパレーズ活性の可視化を行い、さらにセパレーズ変異体発現細胞株を用いてセパレーズとセパレーズ制御因子の生化学的な相互作用を解析する。そして、これらの情報を統合することにより、がん細胞の染色体不安定性の背景にある病理変化の理解につなげることを試みる。具体的には以下の研究項目を設定した。

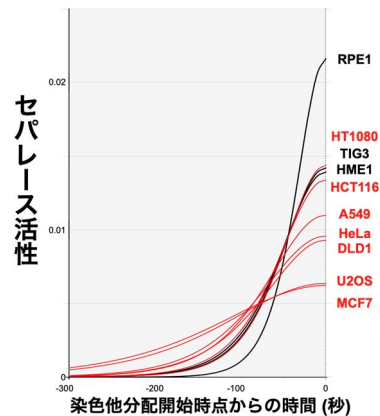
- (1) がん細胞株として以下の 7 種類 (HCT116, HT1080, A549, DLD1, HeLa, U2OS, MCF7)、正常二倍体細胞株として以下の 3 種類 (RPE1, HME1, TIG3) の細胞株のセパレーズ活性プロファイルを明らかにする。
- (2) 上記のそれぞれの細胞株の染色体分配異常の頻度、分裂期の長さ、分裂期チェックポイント異常、細胞質分裂の異常を明らかにする。
- (3) 正常二倍体細胞株である網膜色素上皮細胞 (RPE1 細胞) にごん遺伝子を導入・破壊することで形質転換を誘導し、その細胞株のセパレーズプロファイルならびに細胞分裂異常を明らかにする。

- (4) 自己切断部位に非切断型変異を導入したセパレーズ変異体を安定発現する細胞株では、がん細胞によく似たセパレーズ活性制御異常が生じているので、この細胞株を用いてセパレーズ変異体とセパレーズ制御因子の相互作用を解析する。

#### 4. 研究成果

- (1) がん細胞株におけるセパレーズ活性化プロファイル異常

調べた7種のがん細胞株のうちそのすべてでセパレーズ活性の早期漏洩が検出された。特に、HeLa と U2OS と MCF7 においてその異常は顕著であった(右図、Shindo et al., Cell Reports, 2021)。



#### 各種細胞株におけるセパレーズ活性化プロファイル

正常二倍体細胞株を黒線、がん細胞株を赤線で示した。多くのがん細胞株では染色体分配開始時点(0秒)より200秒から300秒以上前にすでに活性が検出されていた。

- (2) がん細胞株における細胞分裂異常とセパレーズ活性化プロファイル異常の関係

細胞分裂期の異常のなかで、セパレーズ活性化プロファイル異常と最も相関の強かったのは分裂期の長さであり、特に分裂期中期の長さが重要であった。分裂期中期の長い細胞ほどセパレーズ活性が早期に漏洩する傾向が認められた。

- (3) 形質転換した正常二倍体細胞株におけるセパレーズ活性化プロファイルについて

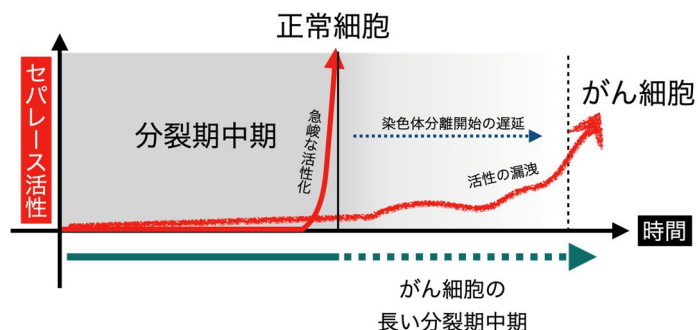
がん遺伝子の導入・破壊によって形質転換した細胞株は染色体分配異常の頻度が上がり、がん細胞株のような染色体不安定性の性質を持つようになっていた。この細胞においてセパレーズ活性化プロファイル調べたところ、がん細胞株で見られたような早期の漏洩が確認された。この形質転換細胞の分裂期の長さは約6分長く、その大半は分裂期中期の延長であった(Shindo et al., Cell Reports, 2021)。

- (4) がん細胞株における分裂期の長さの延長について

分裂期チェックポイント機構の中心的役割を果たす動原体のストレッチングの解析を通じて、がん細胞株における動原体ストレッチングの異常を見出した。そして、がん細胞株における分裂期チェックポイント解除機構の遅延によって分裂期中期が長くなるという知見を得た(Uchida et al., Current Biol., 2021)。

- (5) がん細胞株におけるセパレーズ活性化プロファイル異常の原因について

これまでの解析により、一貫して分裂期中期の長さがセパレーズ活性化プロファイル異常と関連があるということが明らかになった。そこで、分裂期チェックポイント解除機構に介入することで分裂期中期の長さを変化させ、セパレーズ活性化プロファイルがどのような変化するか調べることでその因果関係を明らかにすることにした。正常二倍体細胞株において、低用量微小管毒で分裂期中期の延長を引き起こすとセパレーズ活性の早期漏洩がおきた。一方で、正常二倍体細胞株を形質転換した細胞株の分裂期中期を低用量のMPS1阻害剤(Reversine)によって5~6分短縮したところ、セパレーズ活性化プロファイルは正常二倍体細胞株と同等に急峻な活性化を示すようになった。同様に、特にセパレーズ活性制御異常が強かったHeLa、U2OS、MCF7においても同様のReversine処理を行うと、急峻なセパレーズ活性化が見られるようになった(Shindo et al., Cell Reports, 2021)。がん細胞では分裂期中期が長いために、セパレーズ活性が染色体分離より早く漏洩してしまつて短時間の急峻な活性化が不可能になり、その結果、姉妹染色分体間のコヒーシオンが残存して染色体分配異常が生じていると考えられた。



- (6) 非切断型変異体発現細胞におけるセパレーズ活性化プロファイル

Mouseのセパレーズ遺伝子領域を含むBAC cloneを用いてセパレーズの自己切断部位3ヶ所すべてに非切断型変異(活性はあるが自己切断部位が切断されない変異)を導入した。この変異体を安定発現するhuman細胞株を樹立して、内在性のセパレーズをRNAiにより除

去し表現型を観察したところ、染色体分配異常とその後の細胞質分裂失敗が認められた。セパレーズ活性化プロファイル調べたところ、早期の漏洩が認められた ( **Shindo** et al., under review )。

( 7 ) 非切断型変異体と制御因子の結合異常

セパレーズの非切断型変異体と制御因子の結合を調べたところ、セキュリンや PP2A の結合に異常は認められなかったが、セパレーズ活性化直前に一過的に結合するサイクリン B1 の結合量の低下が認められた

< 引用文献 >

Zhang, N., Ge, G., Meyer, R., Sethi, S., Basu, D., Pradhan, S., Zhao, Y.-J., Li, X.-N., Cai, W.-W., El-Naggar, A.K., et al. (2008). Overexpression of Separase induces aneuploidy and mammary tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 13033–13038.

**Shindo**, N., Kumada, K., and Hirota, T. (2012). Separase sensor reveals dual roles for separase coordinating cohesin cleavage and cdk1 inhibition. *Dev Cell* 23, 112–123.

Gorr, I.H., Boos, D., and Stemmann, O. (2005). Mutual inhibition of separase and Cdk1 by two-step complex formation. *Molecular Cell* 19, 135–141.

**Shindo**, N., Otsuki, M., Uchida, K.S.K., and Hirota, T. (2021). Prolonged mitosis causes separase deregulation and chromosome nondisjunction. *Cell Rep* 34, 108652.

Uchida, K.S.K., Jo, M., Nagasaka, K., Takahashi, M., **Shindo**, N., Shibata, K., Tanaka, K., Masumoto, H., Fukagawa, T., and Hirota, T. (2021). Kinetochore stretching-mediated rapid silencing of the spindle-assembly checkpoint required for failsafe chromosome segregation. *Curr Biol* 31, 1581-1591.e3.

**Shindo**, N., Kumada, K., Yasuda, J., and Hirota, T. (2022). Autocleavage of Separase Suppresses its Premature Activation by Promoting Binding to Cyclin B1. (under review)

Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=4125670> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4125670>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Rii Junryo, Sakamoto Shinichi, Sugiura Masahiro, Kanesaka Manato, Fujimoto Ayumu, Yamada Yasutaka, Maimaiti Maihulan, Ando Keisuke, Wakai Ken, Xu Minhui, Imamura Yusuke, Shindo Norihisa, Hirota Toru, Kaneda Atsushi, Kanai Yoshikatsu, Ikehara Yuzuru, Anzai Naohiko, Ichikawa Tomohiko	4. 巻 112
2. 論文標題 Functional analysis of LAT3 in prostate cancer: Its downstream target and relationship with androgen receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3871 ~ 3883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14991	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 Shindo Norihisa, Otsuki Makoto, Uchida Kazuhiko S.K., Hirota Toru	4. 巻 34
2. 論文標題 Prolonged mitosis causes separase deregulation and chromosome nondisjunction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108652 ~ 108652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108652	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 Uchida Kazuhiko S.K., Jo Minji, Nagasaka Kota, Takahashi Motoko, Shindo Norihisa, Shibata Katsushi, Tanaka Kozo, Masumoto Hiroshi, Fukagawa Tatsuo, Hirota Toru	4. 巻 -
2. 論文標題 Kinetochore stretching-mediated rapid silencing of the spindle-assembly checkpoint required for failsafe chromosome segregation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2021.01.062	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 進藤 軌久、豊柴 博義
2. 発表標題 AI創薬の現状と展望
3. 学会等名 第29回日本胎盤学会学術集会・第39回日本絨毛性疾患研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 進藤 軌久、広田 亨
2. 発表標題 セバレース制御異常が誘導するがん細胞の染色体分配異常
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 進藤 軌久、広田 亨
2. 発表標題 セバレース活性制御機構と染色体分配の異常について
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 進藤 軌久、豊柴 博義
2. 発表標題 AIシステムを用いたCOVID-19に対するドラッグリポジショニング研究
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 進藤 軌久、広田 亨
2. 発表標題 厳格なセバレース制御機構により保証される正確な染色体分配
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 進藤 軌久、広田 亨
2. 発表標題 がんにおけるセパレーズ活性制御異常とその分子背景
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 進藤 軌久、広田 亨
2. 発表標題 がん細胞におけるセパレーズ活性制御異常の分子背景
3. 学会等名 第37回染色体ワークショップ・第18回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

公益財団法人がん研究会がん研究所広田研究室 <a href="https://www.jfcr.or.jp/tci/exppathol/resarch_index.html">https://www.jfcr.or.jp/tci/exppathol/resarch_index.html</a>
--

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

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
---------	---------