

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06488

研究課題名（和文）ヒト環状染色体の維持に関わる因子の同定とそのがん治療への応用

研究課題名（英文）Identification of factors involved in the maintenance of circular chromosomes and applications for cancer therapy

研究代表者

上野 勝（Ueno, Masaru）

広島大学・統合生命科学研究科（先）・准教授

研究者番号：90293597

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）：環状染色体を持つヒト培養細胞を用いて、環状染色体を持つヒト細胞の生育を阻害する化合物としてカンプトテシンが得られた。さらに、分裂酵母においては、Gsk3とGsk31が環状染色体を持つ細胞の形の維持に必要であることを発見した。また、ヒストンH2AZをコードするPht1は環状染色体を持つ分裂酵母の生育に重要であることがわかった。さらに、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるロミデプシンが環状染色体を持つ分裂酵母の生育を阻害することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、環状染色体を持つヒト細胞の生育を阻害する化合物候補としてカンプトテシンが得られた。ある種のがんは高い頻度で環状染色体を持つことから、カンプトシンはこれらのがんの治療に使える可能性がある。分裂酵母においては、Gsk3とGsk31が環状染色体を持つ細胞の形の維持に必要であることを発見した。また、Pht1が環状染色体を持つ分裂酵母の生育に重要であることがわかった。さらに、ロミデプシンが環状染色体を持つ分裂酵母の生育を阻害することを発見した。今後は、これらの発見がヒト細胞においても保存されていれば、環状染色体を持つがんの治療に使えることが期待できる。

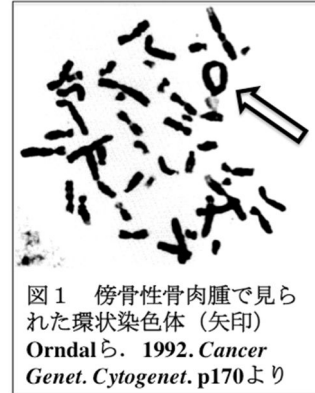
研究成果の概要（英文）：Using cultured human cells with circular chromosomes, camptothecin was obtained as a compound that inhibits the growth of human cells with circular chromosomes. Furthermore, in fission yeast, we found that Gsk3 and Gsk31 are necessary for maintaining the shape of cells with circular chromosomes. We also found that Pht1, which encodes histone H2AZ, is important for the growth of fission yeast with circular chromosomes. Furthermore, we discovered that romidepsin, a histone deacetylase inhibitor, inhibits the growth of fission yeast with circular chromosomes.

研究分野：分子生物学

キーワード：環状染色体 抗がん剤 分裂酵母 テロメア

1. 研究開始当初の背景

がんは加齢に伴って増える病気であり、日本は今後ますます高齢化が進むことから、がんの予防や治療に関する研究は必要不可欠である。ヒトの染色体は線状であるが、ある種のがんでは高い頻度(異型脂肪腫様腫瘍で 85%など)で環状染色体が見つかる(Trombetta ら、Genes. Chromosomes. Cancer. 2009) (図 1)。環状染色体をもつがん細胞のみを選択的に死滅させることができれば、新しい作用機構を持つファーストインクラスの抗がん剤が開発できる。また、先天的に環状染色体を持つ遺伝病患者が存在する。これらの患者の環状染色体は不安定で、欠失などが起こりやすく、がんのリスクが高い(Zirn ら、Clin.

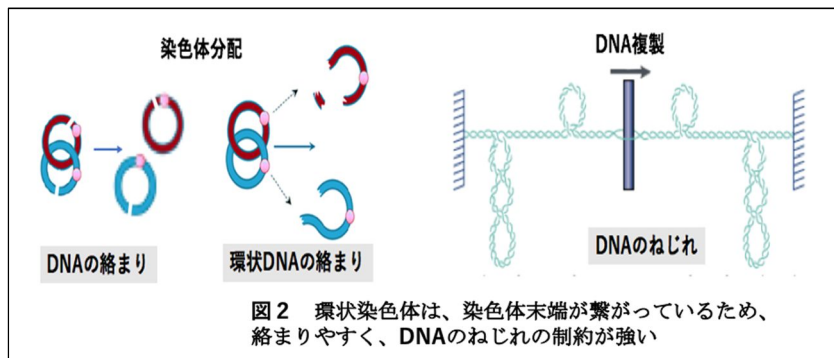


Genet. 2012)。これらの患者の環状染色体を安定化することができれば、がんのリスクを軽減できる。そこで、ヒト環状染色体の安定性に関する遺伝子や薬物を発見できれば、a) 環状染色体を安定化することで、環状染色体を持つ遺伝病患者のがんのリスクを軽減したり、b) 環状染色体を不安定化することで、環状染色体をもつがん細胞のみを選択的に死滅させたりする可能性がある。しかし、ヒトが環状染色体を持つことで、どのような不都合が生じ、その不都合をどのような因子が克服しているのかについては、これまで一切報告されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、分裂酵母やヒト細胞株を用いて、環状染色体の維持に関する遺伝子や薬剤を発見することである。さらに、環状染色体の維持に関する因子の解析を行うことで、線状、環状にかかわらず、染色体のねじれや絡まりの制御に関する新しい因子を発見することも本研究の目的である。線状染色体において、DNAの絡まりやねじれは、トポイソメラーゼなどによって解消され

ると考えられる。しかし、細胞内で DNA のねじれや絡まりを評価することが困難であることから、DNA のねじれや絡まりの解消に関わる因子の研究は、あまり進んでいない。環状染色体は、染色体末端



が繋がっているため、絡まりやすく、DNA のねじれの制約が強い(図 2)。従って、本研究で発見した環状染色体の維持に関する因子は、線状染色体においてもねじれや絡まりの制御に関係することが期待できる。このように応募者独自の実験系(環状染色体)を用いて、線状、環状に関わらず、染色体のねじれや絡まりに関する新しい因子を発見することも、本研究の重要な目的である。

3. 研究の方法

本研究では、分裂酵母とヒト培養細胞を用いて、環状染色体の維持に関する薬剤や遺伝子を発見することを試みた。

(1) ヒト環状染色体を持つ細胞の生育を阻害する因子の探索

本研究では、ヒトの環状17番染色体を安定に維持する細胞株を用いてヒトの環状染色体の維持に関する薬剤の探索を行う。ヒト17番環状染色体を持つ不死化血液細胞を96wellプレートで培養し、化合物ライブラリーを添加して、生育を阻害する化合物を探索する。次に、得られた薬剤が、線状染色体を持つ不死化血液細胞の生育を阻害しないことを確認する。ケミカルライブラリーとしては、文部科学省化学療法基盤支援活動の化学療法パイロットライブラリーなどを用いる（すでに入手済み）。これらに加えて、かずさDNA研究所の舛本寛博士から入手した人工環状染色体を持つヒト培養細胞も用いて、環状染色体の維持に関する薬剤を探索する。

(2) 環状染色体を持つ分裂酵母の生育を阻害する因子の探索

環状染色体を持つ分裂酵母を用いて、環状染色体の維持に関する薬剤の探索を行う。環状染色体を持つ分裂酵母を96wellプレートで培養し、化合物ライブラリーを添加して、生育を阻害する化合物を探索する。次に、得られた薬剤が、線状染色体を持つ分裂酵母の生育を阻害しないことを確認する。ケミカルライブラリーとしては、文部科学省化学療法基盤支援活動の化学療法パイロットライブラリーなどを用いる（すでに入手済み）。さらに、得られた候補薬剤が標的としているタンパク質の探索も試みる。

4. 研究成果

ヒト環状染色体を持つ細胞の生育を阻害する因子の探索を行うためのアッセイ系の確立を目指した実験を行った。まず、ヒト17番染色体が環状化した遺伝病患者由来の血液をEBウイルスによる不死化した細胞をCoriell Instituteから入手し、解析を行ったところ、不死化した細胞において、環状化したヒト17番染色体が安定に維持されることを発見した。しかし、この細胞と同じ遺伝的背景で、しかも17番染色体は2本とも線状のコントロール細胞は、入手できていない。Coriell Instituteから入手した、ヒト17番染色体が環状化した不死化細胞において、環状化したヒト17番染色体失った細胞が存在することから、この細胞を単離することで、上記のコントロール細胞となるのではないかと考えた。そこで、環状化したヒト17番染色体を持つ不死化細胞を1wellあたり1から6細胞くらいになるように薄めて、96wellプレートにまき、上記のコントロール細胞のクローニングを試みた。しかし、どのwellについても希釈前とほぼ同じ頻度の環状染色体を持った集団しか得ることができなかった。このことから、上記のコントロール細胞の入手は一旦保留にした。

次に、Coriell Instituteから入手した、ヒト17番染色体が環状化した不死化細胞を用いて、この細胞の生育を阻害する薬剤の探索を行った。その結果、トポイソメラーゼIの阻害剤であるカントプテシンが、環状染色体保有患者の血液中のB細胞をEBウイルスによって不死化した細胞の生育を強く阻害することを発見した。一方、カントプテシンは、線状染色体保有健常者の血液中のB細胞をEBウイルスによって不死化した細胞の生育は、強く阻害しなかった。この原因として、上記の2つの細胞株の遺伝的背景の違いが原因である可能性は否定できないが、少なくとも、タンパク質合成を阻害するG418については、線状染色体保有健常者の血液中のB細胞をEBウイルスによって不死化した細胞の方が、環状染色体保有患者の血液中のB細胞をEBウイルスによって不死化した細胞よりも感受性が高かった。これらのことから、少なくとも環状染色体保有患者の血液中のB細胞をEBウイルスによって不死化した細胞は、どのような薬剤に対しても、線状染色体保有健常者の血液中のB細胞をEBウイルスによって不死化した細胞よりも感受性が高いという可能性は否定できた。

次に、かずさDNA研究所の舛本寛博士から入手した人工環状染色体を持つヒト培養細胞

も用いて、この環状人工染色体を失う頻度を測定することで、環状染色体の安定性を評価することを試みた。人工環状染色体上には、ゲノムに発現している蛍光たんぱく質が特異的に結合する配列が組み込まれている。それにより蛍光画像上では光点として人工環状染色体を確認することが出来る。この細胞から候補化合物処理群とコントロール群を作成し、各群の人工環状染色体を保有する細胞の比率を比較するアッセイ系の確立を試みた。しかし、人工環状染色体を不安定化させる可能性がある化合物を加えても、人工環状染色体を不安定化させたことを示す優位なデータが得られなかった。

環状染色体をもつ分裂酵母を用いた研究では、トポイソメラーゼ阻害活性を持つと考えられる抗癌剤の類似化合物とヒト Gsk3 阻害剤が、環状染色体をもつ分裂酵母の生育を強く阻害することを発見した。さらに、ヒト Gsk3 阻害剤が、環状染色体をもつ分裂酵母の生育を阻害する機構について解析を行った。その結果、分裂酵母の Gsk3 と Gsk31 の両方が機能しないと環状染色体を持つ分裂酵母が生育できないことを発見した。これらのことから、ヒト Gsk3 阻害剤は、分裂酵母の Gsk3 と Gsk31 の両方を阻害することで、環状染色体を持つ細胞の生育を阻害している可能性が示唆された。次に、分裂酵母の Gsk3 と Gsk31 の両方が機能しないと環状染色体を持つ分裂酵母が生育できない機構の解明を試みた。gsk31 遺伝子や gsk3 遺伝子の下流に改良された aid タグシステムを導入した株を作成し、pot1 が破壊されたことで、環状染色体を持つ分裂酵母において、gsk31 遺伝子や gsk3 遺伝子が機能しなくなった直後の表現型を解析した。その結果、分裂酵母の Gsk3 と Gsk31 の両方が機能しないと環状染色体を持つ分裂酵母の細胞において、細胞の形が異常になる割合が増加することを発見した。このことから、環状染色体を持つ分裂酵母において、Gsk3 や Gsk31 は細胞の形を正常に保つために重要な役割を果たすことがわかった。Gsk3 と Gsk31 は、共にリン酸化酵素であることから、これらの酵素によってリン酸化されるタンパク質が環状染色体を持つ分裂酵母の生育や細胞の形の維持に関与する可能性が考えられる。現在、pot1 gsk3 gsk31-aid 三重変異株を用いて、その生育阻害を抑圧するマルチコピーサプレッサーを探索することで、Gsk3 や Gsk31 の下流の因子を発見することを試みている。

また、環状染色体を持つ分裂酵母において、ヒストン H2AZ をコードする Pht1 の機能についても解析を行った。まず、pot1 遺伝子に aid タグを導入した株を用いて pht1 が破壊された分裂酵母の pot1 の機能をシャットオフしたところ、pht1 が破壊されていない分裂酵母に比べて、極端な生育の減少が見られた。この結果は、Pht1 が染色体の環状化に関与するか、あるいは環状染色体を持つ分裂酵母の生育に Pht1 が関与する可能性が考えられた。そこで、環状染色体を持つ pot1pht1 二重破壊株と pot1 破壊株の生育速度を比べたところ、pot1pht1 二重破壊株の方が、pot1 破壊株よりも生育速度が遅いことがわかった。このことから、Pht1 は環状染色体を持つ分裂酵母の生育に重要であることがわかった。次に、Pht1 が染色体の環状化に関与するかどうかを調べるために、pot1 遺伝子に aid タグを導入した株を用いて pht1 が破壊された分裂酵母の pot1 の機能をシャットオフしたところ、染色体が環状化したときに得られる末端融合のバンドが、pht1 が破壊されていない時に比べて、減少することを発見した。このことから、Pht1 は染色体の環状化にも関与することがわかった。

さらに環状染色体を持つ分裂酵母の生育を阻害する新規薬剤の探索も行った。その結果、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるロミデプシンが環状染色体を持つ分裂酵母の生育を阻害することを発見した。その他にも、環状染色体を持つ分裂酵母の生育を阻害する薬剤を複数発見したが、現在それらの化合物の機能については、解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yasuda Misaki, Habib Ahmed G K, Sugiura Kanako, Shamim Hossain Mohammad, Ueno Masaru	4. 巻 86
2. 論文標題 The fission yeast bromodomain protein Bdf2 is required for the growth of cells with circular chromosomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 224 ~ 230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab215	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 上野 勝	4. 巻 50
2. 論文標題 環状染色体を持つ細胞の弱点の解明とそのがん治療への応用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 月刊 細胞	6. 最初と最後の頁 45 - 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Ueno Masaru	4. 巻 13
2. 論文標題 Exploring Genetic Interactions with Telomere Protection Gene pot1 in Fission Yeast	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 370 ~ 370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom13020370	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 上野 勝
2. 発表標題 Fission yeast Pht1 is required for efficient intra-chromosomal end to end fusion
3. 学会等名 Telomeres & Telomerase Cold Spring Harbor Laboratory (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上野 勝
2. 発表標題 ヒストンバリエーションH2A.Zのpot1破壊株における機能解析
3. 学会等名 日本分子生物学会第44回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上野 勝
2. 発表標題 アントラサイクリン系抗がん剤類似体による環状染色体を持つ分裂酵母の生育阻害
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部 第58回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村洸斗、上野 勝
2. 発表標題 分裂酵母を用いたアッセイ系による環状染色体をもつ分裂酵母のみ生育阻害する化合物、テロメア維持を阻害する化合物のスクリーニング
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部 第63回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村洸斗、上野 勝
2. 発表標題 分裂酵母を用いた染色体を標的とする抗がん剤候補化合物のスクリーニング系の構築
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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