

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650616

研究課題名(和文)細胞分裂期に作用する抗がん剤に対する耐性克服のための基礎的研究

研究課題名(英文)Basic research to overcome resistance to anti-mitotic drugs

研究代表者

田中 耕三(Tanaka, Kozo)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：00304452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗がん剤により細胞周期停止が持続した後に起こる細胞死に関与する分子を同定することを目的とした。我々が発見した新規分子CAMPをノックダウンした細胞を微小管阻害剤で処理したところ、がん細胞特異的に細胞周期停止持続後の細胞死の促進が観察された。がん細胞株ではCAMPの発現が高い傾向が見られ、がん細胞の生存がCAMPに依存している可能性が考えられた。またCAMPをノックダウンした細胞ではアポトーシスを抑制する機能をもつBcl-2ファミリー分子であるMcl-1およびBcl-xLの発現が低下していることがわかり、CAMPが抗がん剤治療のターゲットとなる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We aimed to identify molecules involved in cell death after prolonged mitotic arrest by anti-cancer drugs. When cells depleted of CAMP, a novel molecule we identified, were treated with microtubule inhibitors, we found the acceleration of cell death after mitotic arrest specifically in cancer cell lines. There was a tendency that cancer cell lines showed higher expression of CAMP than normal cell lines, implying that cancer cell survival is dependent on CAMP. Expression of Mcl-1 and Bcl-xL, anti-apoptotic Bcl-2 family members, was decreased in CAMP-depleted cells, suggesting that CAMP can be a target for anti-cancer therapy.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：がん治療 抗がん剤耐性 細胞死 細胞周期

## 1. 研究開始当初の背景

抗がん剤の多くが DNA に作用するのに対し、vinca alkaloid や taxol は微小管に作用するユニークな抗がん剤であり、乳がんやリンパ系腫瘍などの治療に広く用いられている。これらの薬剤は紡錘体チェックポイントを活性化させるため、細胞は分裂期で停止する。この細胞周期停止が長時間持続するとアポトーシスによる細胞死が誘導されるが、その機構については不明な点が多い。また一部の細胞では細胞死に至る前に細胞周期停止から逸脱する現象が認められ (mitotic slippage)、これが抗がん剤耐性の一因であると考えられる。そのため、いかに mitotic slippage を防ぐかが抗がん剤耐性克服のポイントである。我々は最近、染色体分配に参与する新規分子 CAMP を同定したが (EMBO J, 30, 130-144, 2011)、この CAMP をロックダウンした細胞では、染色体整列異常により分裂期で停止した細胞が早期に死滅した (未発表)。そこでこの知見を手がかりに、細胞周期停止の持続による細胞死の機構を解明し、抗がん剤耐性の原因となる細胞死のタイミングに参与する分子を同定するという着想に至った。

## 2. 研究の目的

Vinca alkaloid や taxol といった抗がん剤は、細胞分裂期に作用する抗がん剤として広く用いられている。これらの薬剤は細胞周期を長時間停止させることにより細胞死を誘導するが、その機構については不明な点が多い。また細胞死に至る前に細胞周期停止から逸脱する細胞が存在することが、抗がん剤耐性の要因となっている。本研究では、抗がん剤により細胞周期停止が持続した後に細胞死が起こる機構を明らかにし、細胞死が起きるタイミングに参与する分子を同定することを目的とする。応募者が最近報告した新規分子 CAMP (EMBO J, 2011) は、このような分子の候補である。細胞死のタイミングに参与する分子が明らかになれば、個々のがん症例での抗がん剤感受性の予測や、より有効な抗がん剤治療の開発が可能になることが期待される。

Vinca alkaloid (微小管重合阻害剤) や taxol (微小管脱重合阻害剤) は、作用は異なるものの、いずれも正常な紡錘体形成を妨げ、紡錘体チェックポイントを活性化させる。その結果、細胞周期が長時間停止することにより効果を発揮する。最近これらに加え、紡錘体の形成に関係するモーター分子 Eg5 の阻害剤など新たな抗がん剤の治験が行われている。しかし、これまでのところ従来の薬剤に比べ著明な効果は見られておらず、その大きな原因として前述した mitotic slippage による抗がん剤耐性が考えられる。Mitotic slippage は、細胞分裂期の維持に必須な Cyclin B が徐々に分解していくために起こる (Curr Biol 16, 1194-1200, 2006)。細胞死に至るか mitotic slippage に至るかは、アポトーシス活性の上

昇と Cyclin B の減少のどちらが先に閾値に達するかによって個々の細胞ごとに決定されるものと考えられる。そこで最近 mitotic slippage を防ぐために、Cyclin B の分解に参与する APC/C (Anaphase promoting complex/cyclosome) を抑えてしまおうという戦略が提唱されている (Cancer Cell 16, 347-358, 2009)。本研究は、これとは逆に「Cyclin B が減少する前にアポトーシスの活性化が起これば mitotic slippage を防げるのではないか」という斬新なアイデアにもとづいている。これにはアポトーシスが細胞周期停止と共にではなく、長時間の停止後にはじめて起こるというタイミングを司る機構の理解が必要であるが、これについてはほとんど解明されていない。我々が最近発見し、その機能から CAMP (Chromosome alignment-maintaining phosphoprotein) と命名した (EMBO J, 30, 130-144, 2011) 分子をロックダウンした細胞では、染色体整列異常により分裂期で停止した細胞が早期に死滅した。このことは、CAMP が分裂期で停止した細胞のアポトーシスのタイミングに参与している可能性を示唆している。このことはまた CAMP を阻害して mitotic slippage を抑えることにより、抗がん剤耐性を克服できる可能性を示している。

近年がんの分子標的治療薬の開発が進んでいるが、いまだに大部分の抗がん剤は殺細胞効果により経験的にスクリーニングされたものであり、細胞自らが持つ機構を利用することにより作用している。それは、何らかの異常によりチェックポイントが活性化されて細胞周期が停止した場合、異常が解消されなければ自ら死を選ぶことにより個体の恒常性を保つという機構である。本研究の斬新な方法論は、従来のような、いかにチェックポイントを活性化させて細胞周期を止めるかではなく、細胞周期停止と細胞死の関係そのものに取り組むという点にある。細胞周期停止による細胞死の機構の解明は、抗がん剤耐性の理解につながり、抗がん剤によるがん治療に画期的な進展をもたらすことが期待される。例えば、この機構に参与する分子の変異や発現量を調べることにより、個々のがん症例における抗がん剤に対する感受性を予測することができる。また従来の抗がん剤に加え、この機構に参与する分子の活性を変化させることができれば、抗がん剤耐性の出現を抑え、より効果的な治療を行える可能性がある。

## 3. 研究の方法

本研究では、分裂期での細胞周期停止の持続ともなう細胞死誘導の機構について解析した。

(1) 細胞周期停止による細胞死と CAMP との関係の検討

細胞周期停止による細胞死と CAMP との関係を顕微鏡下での長時間のライブセルイメ

ージングにより検討した。種々のがんや正常細胞由来の細胞株を用いてこの現象の普遍性を検証した。また細胞死に係る CAMP の領域についても解析を行った。

#### (2) CAMPとBcl-2ファミリーの関心の検討

CAMP とアポトーシスに關与することが知られている Bcl-2 ファミリー分子との關連を 検討した。ミトコンドリアからの Cytochrome C などの放出によるアポトーシスの誘導には、Bcl-2 ファミリーと呼ばれる一群の分子が關与している。最近このうちアポトーシスの抑制にはたらく Mcl-1 の分解が、taxol などによる抗がん剤による細胞死に重要であることが報告されている (図; *Nature* 471, 110-114, 2011)。

#### (3) 細胞周期停止による細胞死に關与する分子ネットワークの解析

細胞周期停止による細胞死に關与する分子を同定するため、CAMP の結合分子スクリーニングを行った (連携研究者の安井明・菅野新一郎による)。

### 4. 研究成果

#### (1) 細胞周期停止による細胞死とCAMPとの關心の検討

CAMP ノックダウン細胞を微小管阻害剤である taxol で処理し、ライブセルイメージングで観察したところ、細胞周期停止持続後の細胞死の促進が観察された。染色体分配に關与する ch-TOG など他の分子の ノックダウンでは、細胞死の促進は観察されなかった。細胞周期停止持続後の細胞死の促進は、他の微小管阻害剤である vincristin でも認められ、また検討したほとんどのがん細胞株で観察された。一方 WI-38 など多くの正常線維芽細胞では、CAMP ノックダウンによる細胞死の促進は見られなかった。検討した細胞株について CAMP の発現量を調べたところ、がん細胞株で発現が高い傾向が見られ、がん細胞の生存が CAMP に依存している可能性が考えられた。これらのことから、CAMP の抑制は、がん細胞特異的に細胞周期停止持続後の細胞死を促進することがわかった。

CAMP のどの領域が細胞死と關連しているかを調べるために、CAMP の種々の欠失変異体を発現させて taxol による細胞死を観察したところ、N 末端側の領域で細胞死の遅延が認められた。

#### (2) CAMPとBcl-2ファミリーの關心の検討

HeLa 細胞と MCF-7 細胞で CAMP を ノックダウンし、Mcl-1 の発現を調べたところ、著明な発現の低下が認められた。またほかの Bcl-2 ファミリー分子である Bcl-xL についても発現が低下していた。

#### (3) 細胞周期停止による細胞死に關与する分子ネットワークの解析

CAMP 免疫沈降産物中に含まれる分子を質量分析により同定した。その結果 CAMP と結合する分子として HP1 (heterochromatin protein 1) が同定され、現

在その意義について解析している。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

田中耕三、Mad2/Mad2L2(Rev7)の構造と機能、生化学、査読無、85 巻、2013 年、629-637  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24050005>

田中耕三、Regulatory mechanisms of kinetochore-microtubule interaction in mitosis、Cellular and Molecular Life Sciences、査読有、70 巻、2013 年、559-579  
DOI:10.1007/s00018-012-1057-7

田中耕三、染色体分配を司る動原体と微小管の相互作用、細胞工学、査読無、32 巻、2013 年、291-296

<https://gakken-mesh.jp/journal/detail/9784780901405.html>

田中耕三、Dynamic regulation of kinetochore-microtubule interaction during mitosis、Journal of Biochemistry、査読有、152 巻、2012 年、415-424

DOI:10.1093/jb/mvs109

田中耕三、染色体分配の分子機構と關連分子を標的としたがん治療への展望、実験医学、査読無、30 巻、2012 年、3118-3124

<https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758100908/index.html>

[学会発表](計2件)

家村顕白、伊藤剛、田中耕三、染色体整列制御分子 CAMP は分裂期停止時における細胞の生存に關与する、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日、神戸

家村顕白、伊藤剛、田中耕三、分裂期での細胞周期停止持続による細胞死機構、第 46 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会、2013 年 9 月 10 日、仙台

[図書](計1件)

清木元治、秋山徹、石川冬木、内海潤、近藤豊、中山敬一、平尾敦、八尾良司、清宮啓之、久能樹、杉浦麗子、高久誉大、町田晋一、胡桃坂仁志、廣川高久、島田緑、竹山廣光、中西真、田中耕三、西尾美希ほか、南山堂、「分裂期チェックポイントアダプテーション阻害による抗がん剤耐性克服 次世代がん戦略研究 Update がん基盤生物学—革新的シーズ育成に向けて」く、2013、193-199 ページ

[その他]

ホームページ等

<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/molonc/index.html>

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 耕三 (TANAKA, KOZO)  
東北大学・加齢医学研究所・教授  
研究者番号：00304452

(2)連携研究者

伊藤 剛 (ITO, GO)  
東北大学・加齢医学研究所・助教  
研究者番号：60607563

広田 亨 (HIROTA, TORU)  
公益財団法人がん研究会・がん研究所・部長  
研究者番号：50421368

安井 明 (YASUI, AKIRA)  
東北大学・加齢医学研究所・教授  
研究者番号：60191110

菅野 新一郎 (KANNO, SHINICHIRO)  
東北大学・加齢医学研究所・講師  
研究者番号：10400417