

研究終了報告書

「染色体不安定性形質の細胞間伝播機構の解明」

研究期間：2021 年 10 月～2024 年 3 月

研究者：家村 顕自

1. 研究のねらい

本研究は、細胞外液性因子を介した染色体不安定性形質の拡散伝播機構を明らかにし、異数性パラドックスの解消を目指すことを目的とする。

正常な細胞はがん化する過程において、染色体不安定性を高頻度に誘発する形質を獲得し、その表現型が細胞集団内で蓄積する段階が存在すると考えられる。一方で、染色体不安定性を呈した細胞は、遺伝情報を娘細胞に等しく伝播できず、その結果、増殖が著しく抑制される。したがって、がん細胞集団が有する遺伝的多様性の背景として、染色体不安定性を呈した細胞が増殖することで遺伝的多様性が蓄積していくとは考えにくい。染色体不安定性による増殖抑制とがん細胞集団内における遺伝的多様性の蓄積の間に存在する矛盾点は、異数性パラドックスと呼ばれ現在も議論されている。このパラドックスを解消するためには、染色体不安定性の表現型が、何らかの機構で細胞集団内に急速に伝播する過程を考慮することで可能となる。

研究提案者はこれまでに、がん細胞が有する染色体分配異常の素地として Hec1 のリン酸化の減弱が存在することを明らかにした。また、Hec1 のリン酸化の程度が高い正常二倍体細胞をがん細胞の培養上清で培養すると、Hec1 のリン酸化が著しく減弱することを見いだした。この結果は、染色体不安定性の素地となる細胞形質が、培地中の細胞外液性因子によって誘導される可能性を示している。この結果を踏まえて、染色体不安定性の素地となる Hec1 のリン酸化の減弱を誘導する液性因子の同定を行い、染色体不安定性の誘導機構及び遺伝的多様性の構築過程に対する関与を検証する。

2. 研究成果

(1) 概要

がん細胞培養上清により染色体不安定性形質が誘導されることについて、様々ながん種より単離したがん細胞株の培養上清で検討することにより、当該形質の誘導が異数性がん細胞培養上清によって生じることを明らかにした。また、異数性がん細胞の培養上清を用いたメタボローム/プロテオーム解析により、当該培養上清では抗酸化物質が増加しており、細胞分裂期における一過的な ROS の産生を抑制することで、染色体不安定性形質を誘導していることを明らかにした。異数性がん細胞やその培養上清における抗酸化活性の上昇には、ストレス応答転写因子が寄与しており、当該因子を調節することにより、染色体不安定性形質の誘導を制御できることがわかった。加えて、異数性がん細胞培養上清で増加していた抗酸化分子の発現が、特定のがん種において患者の予後不良と関連していることを明らかにした。以上の結果より、腫瘍細胞が獲得した高い抗酸化能は、腫瘍細胞のストレス耐性獲得に寄与する一方で、腫瘍細胞集団内に染色体不安定性を惹起することで、多種多様な環境下でも増殖優位性細胞の出現に寄与している可能性が示唆された(図 1)。

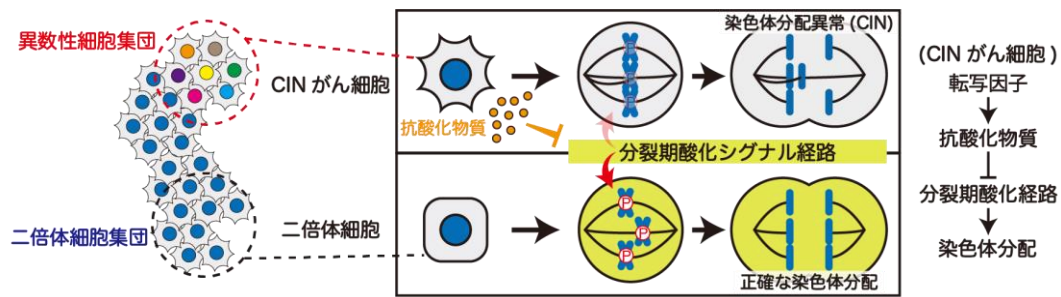


図1. 本研究成果の概要：異数性がん細胞が分泌する抗酸化物質は染色体不安定性を惹起する

(2) 詳細

1. がん細胞培養上清は染色体不安定性形質を誘導する

がん細胞培養上清の染色体不安定性形質に対する影響を検証するために、二倍体がん細胞株3種類（HCT-15細胞、DLD-1細胞、HCT116細胞）と異数性がん細胞株5種類（HeLa細胞、DU145細胞、A549細胞、U2OS細胞、MCF-7細胞）、二倍体正常細胞株RPE-1細胞を培養した培養上清を用いて、二倍体正常細胞株RPE-1細胞を培養し、リン酸化Hec1量を定量した。その結果、異数性がん細胞株の培養上清を処理した全てのサンプルでリン酸化Hec1の減弱が確認できた。一方、二倍体正常細胞株や二倍体がん細胞株の培養上清ではリン酸化Hec1の減弱はみられなかった。次に、Hec1のリン酸化に必要な染色体動態（染色体オシレーション）を生細胞観察にて確認したところ、異数性がん細胞の培養上清で処理したRPE-1細胞において、染色体オシレーション運動活性が減弱していることがわかった。また、異数性がん細胞の培養上清を処理したRPE-1細胞の遺伝子発現解析を行ったところ、細胞の異数体化に関わる分子経路の亢進と、細胞増殖の抑制に関わる分子経路の抑制がみられ、実際に、異数性がん細胞の培養上清を処理したRPE-1細胞では核型が異常になっていることがわかった（図2）。以上の結果から、異数性がん細胞の培養上清には染色体不安定性形質を誘導し、二倍体正常細胞株を異数体化する因子が普遍的に含まれていることが明らかになった。

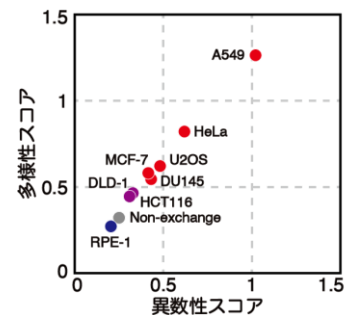


図2. がん細胞培養上清を処理したRPE-1細胞の核型解析結果
赤丸：異数性がん細胞の培養上清処理
紫丸：二倍体がん細胞の培養上清処理

2. がん細胞培養上清中には抗酸化物質が多量に存在する

染色体不安定性形質を誘導する培養上清成分を同定するために、異数性がん細胞株HeLa細胞、A549細胞及び二倍体正常細胞株RPE-1細胞の培養上清を用いたプロテオーム・メタボローム解析を行なった。また、染色体不安定性形質の誘導は細胞老化の初期過程でも観察され、その培養上清を用いても誘導されることから、継代培養に伴って細胞老化を呈する初代培養線維芽細胞TIG-3細胞について、細胞老化を呈する前（PDL30）及び細胞老化初期過程（PDL60）の培養上清について同様に実施した。

メタボローム解析の結果におけるHeLa/RPE-1、A549/RPE-1での比較の和集合のうち、入手可能な化合物31種類（がん細胞で増加18種類、がん細胞で減少13種類）につ

いて、分裂期中期における Hec1 のリン酸化への効果を検証した。その結果、3 種類の代謝産物がリン酸化 Hec1 の減弱を誘導し、1 種類の代謝産物がリン酸化 Hec1 の減弱を抑制することがわかった。これらの化合物のうち、リン酸化 Hec1 の減弱を誘導した 2 種類は抗酸化活性を有する化合物であった。

プロテオーム解析の結果において、HeLa/RPE-1、A549/RPE-1 での比較の和集合から得られたタンパク質群について gene ontology 解析を行なった結果、抗酸化活性を有するタンパク質が有意に濃縮していることがわかった。また、それらのタンパク質の転写に関わる転写因子を探索したところ、細胞増殖に関わる基本転写因子に加えて、ストレス応答に関わる転写因子が寄与していることがわかった。

3. 細胞分裂期では一過的に活性酸素種が産生される

抗酸化物質は活性酸素種 (ROS) の消失に寄与する。2 の結果から、がん細胞の培養上清では抗酸化物質の含有量が上昇しており、二倍体正常細胞を抗酸化代謝物で処理すると染色体不安定性形質が誘導されたことから、染色体分配過程における ROS の発生状況

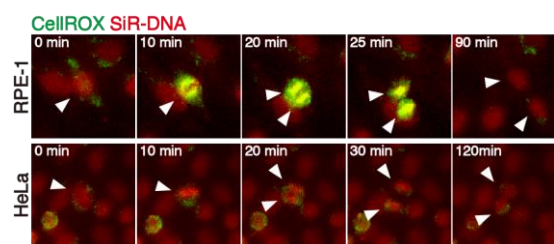


図 3. 分裂期における一過的な ROS 産生の比較

について、ROS と結合して蛍光を発する CellROX 試薬を用いて生細胞観察を行い検証した。その結果、RPE-1 細胞 (二倍体正常細胞株) では細胞分裂期に一過的に ROS 産生が増加することがわかった。一方、分裂期における一過的な ROS 産生は異数性がん細胞株ではみられなかった (図 3)。異数性がん細胞株の培養上清や、2 で同定した抗酸化代謝物で二倍体正常細胞を処理すると、分裂期での一過的な ROS 産生が抑制されるとともに、染色体分配異常を呈したことから、分裂期における一過的な ROS 産生により染色体の正しい分配が保障されており、がん細胞では細胞内や培養上清に含まれる抗酸化物質の上昇により当該機構が抑制されていることが示唆された。

4. ストレス応答転写因子は異数性がん細胞における抗酸化活性の上昇に寄与する

2 において、がん細胞培養上清の抗酸化分子の発現に関わる転写因子が見いだされたことから、がん細胞の当該転写因子を調節することで培養上清の抗酸化活性や、それに伴う染色体不安定性の誘導を制御できるかどうかを検証した。CRISPR/Cas9 により、異数性がん細胞株 HeLa 細胞の当該転写因子 X と当該転写因子の分解に関わる分子 Y を欠失させたところ、XKO-HeLa 細胞では培養上清中の抗酸化活性が減弱し、染色体不安定性が改善した。一方で、転写因子 X 活性が亢進している YKO-HeLa 細胞では、培養上清中の抗酸化活性が亢進し、染色体不安定性がより顕著に引き起こされた。加えて、XKO-HeLa の培養上清で処理した RPE-1 細胞は、分裂期における一過的な ROS 産生が維持されており、染色体分配が正常に進行することがわかった。以上の結果から、染色体不安定性を誘導に必要な培養上清中の抗酸化活性は転写因子 X による制御を受けていることを明らかにした。

5. 腫瘍組織における抗酸化分子の発現上昇はがん患者の予後不良と関連する

異数性がん細胞培養上清で増加しており、転写因子 X の標的分子として報告されている抗酸化分子について、腫瘍組織における遺伝子発現量とがん患者の予後不良との関連性をTCGA(The Cancer Genome Atlas)データを用いて検証した。その結果、5 種類の腫瘍組織で有意な高発現が認められ、これらのがん種においては、抗酸化分子が高発現である患者の方が予後不良であることがわかった(図 4)。以上の結果から、本研究で同定できた転写因子 X を介した抗酸化物質の増加は、実際の腫瘍

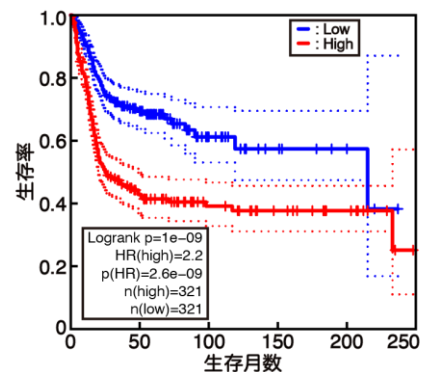


図 4. 本研究で同定した抗酸化分子の発現量と予後不良との関連性
青線：低発現、赤線：高発現

形成の過程においても腫瘍悪性化に寄与している可能性が示唆された。実際に、染色体不安定性が細胞増殖に有利に働き、生体内の腫瘍細胞増殖過程を一部模倣する三次元培養環境下において、XKO-及び YKO-HeLa を二倍体がん細胞株と共培養し、二倍体がん細胞株の増殖能を調べたところ、YKO-HeLa と共培養した二倍体がん細胞は三次元培養環境下における細胞増殖が亢進することがわかった。このことは、転写因子 X を介した腫瘍微小環境の抗酸化活性上昇が、腫瘍を形成している二倍体細胞に対して染色体不安定性を誘起し、増殖優位性をもたらす可能性を示唆している。

3. 今後の展開

これまでの研究で、異数性がん細胞から分泌される抗酸化物質が、分裂期酸化シグナルの抑制を介して、二倍体正常細胞に染色体不安定性を誘導することを明らかにした。一方で、当該経路が生体内における腫瘍形成過程にどの程度に寄与しているのかは検証できていない。そこで、抗酸化活性を人為的に操作した染色体不安定性がん細胞と二倍体がん細胞をマウスに移植し、その腫瘍組織について空間トランスクリプトーム解析を実施する。腫瘍組織内に存在する染色体不安定性細胞を空間トランスクリプトーム解析によって識別し、抗酸化物質を過剰に発現するがん細胞と、染色体不安定性が誘導された細胞との位置関係を明らかにすることで、抗酸化物質の効果が腫瘍形成細胞に対してオートクライン様に作用するか、もしくは周辺細胞に対してパラクライン様に作用するかを明らかにする。当該実験は ACT-X 加速フェーズで主に実施し、次年度中の実験完遂を目指す。

また、分裂期酸化シグナルがどのような分子を制御することで正確な染色体分配を保障しているのかといった点も明らかにできていない。そこで、分裂期特異的もしくは二倍体非がん細胞特異的に酸化される分子の同定することで、染色体均等分配が生じている細胞で高度に酸化されうる分子を見つける。分子が同定できた場合は、酸化アミノ酸変異体や酸化状態を模倣する変異体を用いた機能解析を行い、分裂期酸化シグナルの下流に存在する分子基盤を明らかにする。当該研究は、科研費基盤研究(C)にて実施予定であり、今後 2 年間での完遂を目指す。

これらの研究に加え、空間トランスクリプトーム解析において染色体不安定性細胞を識別するための染色体不安定性細胞識別分子マーカーの探索を行う。当該研究は ACT-X 生命

と化学領域にて共同研究として発展した内容である。染色体不安定性細胞識別分子マーカーが同定できた際には、当該マーカーを利用した染色体不安定性レポーター細胞、また、染色体不安定性レポーターマウスの作成を目指す。本研究により、腫瘍組織内に存在する染色体不安定性細胞を当該マーカーによって同定、操作することが可能になることが予想される。また、既存の一細胞 RNA-seq データや、空間トランスクリプトームデータから、染色体不安定性細胞の存在量や存在部位を類推することが可能となり、これまで解析がなされてこなかった希少な臨床検体における染色体不安定性細胞の役割解明を目指したい。

4. 自己評価

研究目的の達成状況(概ね達成できた)

本研究目標である、染色体不安定性形質を誘導する液性因子の同定に対しては、がん細胞で増加する抗酸化代謝物及び抗酸化分子を複数同定することができ、それらが染色体不安定性を惹起することを示すことができた。加えて、これらの抗酸化物質の上流因子を同定することができ、当該因子を調節することで、染色体不安定性を制御することが可能であることも示すことができた。一方で、得られた結果は in vitro で検証したものであり、in vivo における腫瘍組織においても同様の制御機構が存在しているのかは検証できなかった。

研究の進め方

研究実施体制について、所属研究室においては本研究に集中して取り組める環境を構築していただき、独立した環境・予算執行状況のもとで研究を遂行することができた。また、領域会議において形成した研究者ネットワークから共同研究に発展した実験では、これまで困難だと思っていた実験の実施に繋がり、研究期間終了後の新たな研究課題のシードとなりつつある。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

本研究は、これまで細胞内における分子制御で完結していた染色体分配制御機構について、細胞外着目し、細胞生育環境を介した分子制御に拡大する試みである。生育環境内に存在する染色体不安定性誘導因子を同定できた本成果により、染色体不安定性の制御について遺伝子発現などの一細胞内からのアプローチに加えて、生育環境を制御する細胞集団を対象にしたアプローチが可能であることを示唆することができた。本研究成果で得られた、細胞外環境因子そのものや、その活性を亢進/阻害する化合物、その制御分子基盤を標的とした化合物は、がん細胞が有する染色体不安定性制御を介した、新たな創薬シードや既知抗がん剤の新たな作用機序を提案できる可能性が高く、基礎研究の場のみならず臨床研究においても重要な位置づけとなる成果であると考えられる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 3件

1. Kenji Iemura, Hayato Anzawa, Ryo Funayama, Keiko Nakayama, Kengo Kinoshita, Kozo

Tanaka, High levels of chromosomal instability facilitates the acquisition of tumorigenic potential under stress conditions, Cancer Science, 2022, 113, 8, 2727-2737

本研究では、染色体不安定性がん細胞株が、染色体不安定性(CIN)の程度が異なる複数の細胞集団によって構成されていることを見だし、当該細胞株より単離した高 CIN 細胞亜集団は低 CIN 細胞亜集団に比べて二次元培養下では細胞増殖が抑制されていたが、三次元培養下では増殖優位性を獲得することを示した。また、この増殖優位性獲得過程に、KRAS シグナルの活性化と unfolded protein response (UPR) 経路の抑制が関与していることを明らかにした。

1. Masayoshi Nagai, *Kenji Iemura, *Takako Kikkawa (* equal contribution), Sharmin Naher, Satoko Hattori, Hideo Hagihara, Koh-Ichi Nagata, Hayato Anzawa, Risa Kugisaki, Hideki Wanibuchi, Takaya Abe, Kenichi Inoue, Kengo Kinoshita, Tsuyoshi Miyakawa, Noriko Osumi, Kozo Tanaka, Deficiency of CHAMP1, a gene related to intellectual disability, causes impaired neuronal development and a mild behavioural phenotype, Brain Communications, 2022, 4, 5, fcac220

本研究では、染色体分配関連分子であり重度知的障害患者において変異が報告されている Champ1 のノックアウトマウスを作成しその表現型を解析した。Champ1 ノックアウトマウスは生後まもなく死亡することが明らかとなり、また、Champ1 ノックアウトマウスより神経幹細胞を単離し神経細胞への分化過程を解析することで、Champ1 が神経幹細胞への分化を制御している可能性をみいだした。加えて、詳細な行動実験により、Champ1 ヘテロノックアウトマウスが知的障害様の行動異常を呈することを明らかにした。

3. Guan Chen, Zhenhua Li, Kenji Iemura, Kozo Tanaka, Oxidative stress induces chromosomal instability through replication stress in fibroblasts from aged mice, Journal of Cell Science, 2023, 136, 11, jcs260688

本研究では、若齢マウスと老齢マウスより線維芽細胞を単離し、染色体分配の過程、DNA 複製ストレス、ミトコンドリアの機能活性、遺伝子発現プロファイルを比較解析し、老齢マウスより単離した線維芽細胞ではミトコンドリア由来の活性酸素種の産生行進を介して、DNA 複製ストレスが常態化しており、その結果として染色体分配異常に起因する染色体不安定性が誘導されていることを明らかにした。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

口頭発表 3 件

1. Kenji Iemura, Kozo Tanaka, Mechanisms of CIN induction via cancer extracellular factors, 第 82 回日本癌学会学術総会(2023 年 9 月 22 日)
2. 家村顕自、田中耕三、がん細胞の液性因子を介した染色体不安定性誘導機構の解明、第 75 回日本細胞生物学会大会(2023 年 6 月 28 日)
3. 家村顕自、田中耕三、異数性がん細胞液性因子による染色体不安定性の誘導機構、第 40 回染色体ワークショップ/第 21 回核ダイナミクス研究会

総説 1 件

家村顕自、田中耕三、染色体分配における染色体オシレーションの役割、Journal of Japanese Biochemical Society、2022 年

プレスリリース 1 件

東北大、染色体不安定性が腫瘍形成に有利にはたらくことを発見、日本経済新聞、2022 年 6 月 15 日掲載