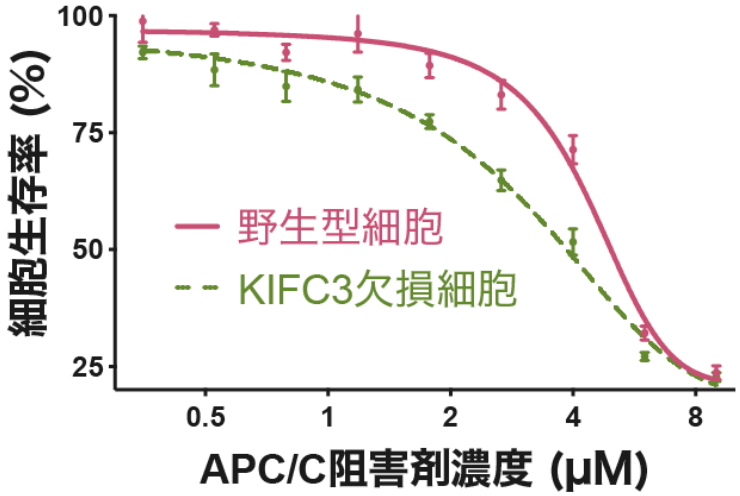
159　中心体分離を標的とした新規抗がん剤の創薬基盤の確立	畠　星治

【目的】紡錘体が担う染色体の正確な伝達は、生物における根源的な生命現象である。このため、細胞分裂機構は高い頑健性を有するように進化してきた。その一方で、がん細胞はこの頑健性を失うことにより染色体分配異常を引き起こし、悪性化が進行していく。このため、この頑健性の違いを利用して、がん細胞において頑健性の低い分裂期素過程を標的とすることで、正常細胞には影響を与えずにがん細胞を選択的に駆逐できる可能性がある。これまでの我々の研究により、中心体分離という分裂期素過程が、ある種のがん細胞に特有の脆弱部位であることが示唆されている。そこで本研究では、中心体分離を標的とした副作用の少ない新規抗がん剤の創薬基盤を確立するために、中心体分離がこのようながん細胞の脆弱部位となっている原因を解明することを目的とした。

【方法】中心体の分離タイミングの異常を示す *KIFC3*（kinesin family member C3）欠損正常細胞を対象とし、細胞生存率を指標とすることで、細胞分裂機構の様々な制御分子を標的とする阻害剤のスクリーニングを行った。また、中心体の分離タイミングに異常を示すがん細胞株を探索した。

【結果】中心体の早期分離を示す *KIFC3* 欠損正常細胞株は、分裂期の制御に重要な役割を果たす後期促進複合体 APC/C の阻害剤を処理すると、その細胞生存率が野生型と比べて顕著に低下することを見出した（図）。また、この原因として、分裂期を完了させるのにより長い時間を必要とするためであることが示唆された。このことから、中心体が早期に分離した際に APC/C が適切に分裂期を進行させることで、細胞分裂機構の頑健性を担保していると考えられる。さらに、中心体の分離タイミングが異常となっているがん細胞として、ヒト大腸がん由来の HCT116 細胞を同定した。中心体分離が遅延したこの HCT116 細胞に分裂期キナーゼの 1 つである Aurora A の阻害剤を処理することで、このがん細胞の細胞分裂に顕著な異常が生じることを見出した。

中心体の早期分離を示す *KIFC3* 欠損細胞は APC/C の阻害剤に対して高い感受性を示す



159. 中心体分離を標的とした新規抗がん剤の創薬基盤の確立

畠　星治

東京大学 大学院薬学系研究科 生理化学教室

Key words：細胞分裂，紡錘体，中心体，中心体分離，抗がん剤開発

緒　言

分裂期に形成される紡錘体は、染色体を 2 つの娘細胞へと正確に分配する役割を担っている。この紡錘体の正常な機能は、がんなどの疾患の原因となる染色体異常を防ぐために必要不可欠である［1］。微小管を基盤とする双極性の紡錘体は、分裂期開始前に分離する 2 つの中心体が起点となって形成される。紡錘体形成を始動させるこの中心体分離が生じるタイミングは、様々な機構によって厳密に制御されていることが知られている。これまでのがん細胞などを用いた研究により、中心体の早期分離および分離遅延のどちらも染色体分配異常を引き起こすことから、中心体の分離タイミング制御は正確な染色体分配を保証する機構の一端を担うと考えられている［2］。しかしながら、我々の最新の研究成果により、染色体の安定性が高い正常二倍体細胞においては、中心体の分離タイミングが異常となっても染色体は正確に分配されることが明らかとなった［3］。これは、正常細胞では、中心体の分離タイミングを脆弱部位とさせない機構が存在するためだと考えられる。また、中心体の分離タイミング異常が、がん細胞の分裂機構に特有の脆弱部位であることを示唆している。よって、中心体の分離タイミングを阻害することで、正常細胞には影響を与えずに、がん細胞を選択的に駆逐できる可能性がある。そこで、本研究では、中心体分離を標的とした新規抗がん剤の創薬基盤を確立することを念頭に、がん細胞で破綻していると考えられる中心体の分離タイミングを脆弱部位とさせない未知の機構の分子実体を明らかにすることを目的とした。様々な解析の結果、中心体の分離タイミング異常によって分裂期異常が引き起こされてしまうのを抑制している分子を同定することに成功した。

方　法

1. 阻害剤処理による細胞生存能の評価

野生型および *KIFC3*（kinesin family member C3）を欠損した正常二倍体 RPE1 細胞を 96 well plate に播種し、翌日に分裂期制御分子に対する阻害剤を段階的な濃度で処理した。その 72 時間後の細胞生存能を MTT アッセイにて定量的に評価し、得られた値をもとに用量反応曲線を作成した。

2. ライブセルイメージングによる分裂期の細胞動態の観察

染色体と中心体を可視化するコンストラクト（ヒストン H2B-mNeonGreen および γ-tubulin-mRuby2）を恒常的に発現する野生型および *KIFC3* を欠損した RPE1 細胞を、レトロウィルスによる遺伝子導入系を用いて作製した。それらの細胞をライブセルチャンバーに播種し、DeltaVision Elite 蛍光顕微鏡を用いて 3 分間隔でライブセルイメージングを行った。取得画像は Fiji により解析し、各処理群における核膜崩壊から染色体分配までの時間を比較する統計解析を行った。

3. 免疫蛍光染色

HCT116 細胞に DMSO または Aurora A 阻害剤を処理し、4 時間後に固定して GT335 抗体と α-チューブリン抗体を用いて中心体と微小管の免疫蛍光染色を行った。その後、蛍光顕微鏡を用いて紡錘体の画像を取得し解析した。

結果および考察

1. 中心体が早期に分離する *KIFC3* 欠損細胞は APC/C 阻害剤に対して高い感受性を示す

我々のこれまでの研究成果により、2 つの中心体を接着させる力を生み出して中心体の早期分離を抑制する分子として、逆行性キネシンの KIFC3 が同定された［3］。この KIFC3 を正常二倍体細胞株である RPE1 細胞で遺伝子破壊すると、中心体が早期に分離するようになるものの、染色体分配は正常に行われる。そこで、中心体の早期分離を染色体分配異常へと直結させない役割を果たしている未知の分子を同定するために、*KIFC3* 欠損細胞の細胞生存能に特異的に寄与する分裂期制御分子を探索した。野生型および *KIFC3* 欠損細胞に様々な分裂期制御分子の阻害剤を処理し、その後の細胞生存能を定量的に評価した。その結果、処理した様々な阻害剤の中でも、後期促進複合体である APC/C の阻害剤である proTAME［4］を処理した *KIFC3* 欠損細胞において、野生型と比べて細胞生存能が顕著に低下することを見出した（図 1）。このことから、APC/C は中心体の早期分離によって生じる何らかの異常を顕在化させない役割を果たすことが示唆された。

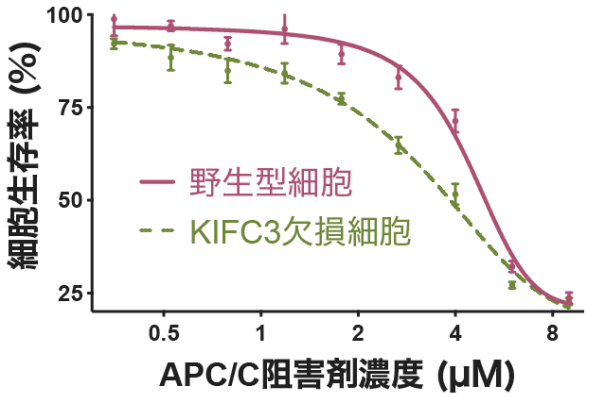


図 1. *KIFC3* 欠損細胞は APC/C の阻害剤に対して高い感受性を示す
野生型および *KIFC3* 欠損細胞に段階的な濃度の APC/C 阻害剤を処理し、72 時間後の細胞生存率を MTT アッセイにより評価した。阻害剤を未処理のサンプルの値を 100%とし、各サンプルにおける相対的な細胞生存率をグラフにプロットした。

2. APC/C の活性阻害によって *KIFC3* 欠損細胞における染色体分配が遅延する

そこで、次に、APC/C が防いでいるこの何らかの異常の実体を明らかにするために、APC/C 阻害剤を処理した *KIFC3* 欠損細胞の分裂期動態をライブセルイメージングにより詳細に解析した。APC/C は、分裂期の後期の開始、すなわち染色体分配の開始に重要な役割を果たしていることが知られている［3］。実際に、野生型細胞に APC/C 阻害剤を処理すると、核膜崩壊から染色体分配までの時間が延長していた。しかし、興味深いことに、APC/C 阻害剤を処理した *KIFC3* 欠損細胞では、この染色体分配の開始が更に遅延していることを見出した。また、この遅延に伴い、染色体の分配が異常になっている細胞も観察された。このことから、APC/C は中心体の早期分離によって染色体分配の異常が生じてしまうのを防いでいることが示唆された。

3. ヒト大腸がん HCT116 細胞は中心体の分離タイミングに異常をきたしている

本研究が目指す中心体分離を標的とした新規抗がん剤の創薬にとっては、中心体の分離タイミングを脆弱部位とさせない機構が破綻しているがん細胞において、中心体の分離タイミングを撹乱させることが重要である。これは、裏を返すと、中心体の分離タイミングが異常になっているがん細胞において、当該の機構を阻害することでも同様の作用が得られると期待できる。本創薬基盤の中核をなすこのコンセプトを実証するために、まず、中心体の分離タイミングが破綻しているがん細胞を探索した。様々ながん細胞の中心体動態を詳細に観察した結果、ヒト大腸がん由来の HCT116 細胞において、中心体の分離タイミングが遅延していることを見出した。

4. Aurora A の活性阻害によってヒト大腸がん HCT116 細胞は著しい分裂期異常を生じる

これまでの我々の研究成果によって、中心体の分離タイミング遅延によって引き起こされる染色体の分配異常を抑制している分子の候補として、分裂期キナーゼの Aurora A を見出している [3]。そこで、中心体分離遅延を示す HCT116 細胞に Aurora A の阻害剤である MK-5108 を処理し、紡錘体の様子を詳細に解析した。その結果、Aurora A 阻害剤の処理によって、片方の紡錘体極に 2 つの中心体が位置する異常な紡錘体が形成されることを見出した（図 2)。また、そのような細胞においては、染色体分配の著しい異常が観察された。これらの結果から、中心体の分離タイミングが遅延したがん細胞では、Aurora A の活性によって、紡錘体の形成ならびに染色体分配が正常に保たれていることが明らかとなった。

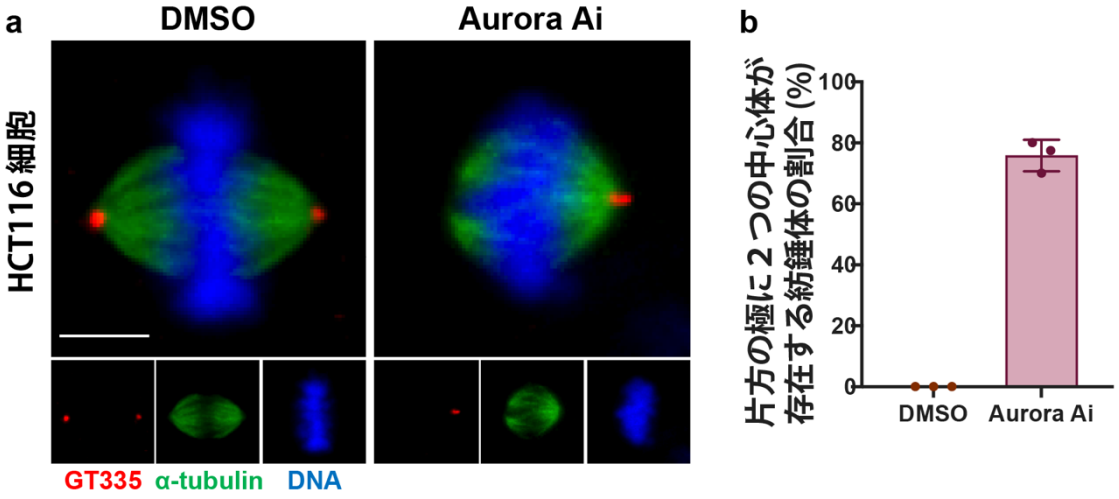


図 2. HCT116 細胞は Aurora A 活性の阻害により異常な紡錘体を形成する

a) HCT116 細胞に Aurora A の阻害剤を 4 時間処理した。固定したサンプルに対して GT335 抗体およびα-チューブリン抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、中心体と微小管を可視化した。また、Hoechst33258 を用いて DNA を染色した。スケールバー：5μm。

b) 各処理群における片方の極に 2 つの中心体が存在する紡錘体の割合をグラフにプロットした。各処理群につき 3 サンプルずつ、サンプルあたり 25 細胞を解析した。

考　察

本研究が新たに見出したこれらの知見は、中心体の分離タイミングとそれを脆弱部位とさせない機構を利用し標的とする新たな抗がん剤開発、という本創薬の基盤コンセプトを支持するものである。HCT116 がん細胞で見られた Aurora A 活性の阻害による顕著な分裂期異常は、正常二倍体 RPE1 細胞では観察されない [3]。このため、中心体分離が遅延したがん細胞に対して Aurora A 阻害剤を処理することで、正常細胞には大きな影響を与えずにこのがん細胞を選択的に駆逐できる可能性がある。また、Aurora A 活性が低下したがん細胞においては、中心体の分離タイミングを遅延させることで、同様の効果が生じると期待できる。

さらに、本研究によって、中心体の分離タイミングが早まった際の細胞分裂に重要となる分子として、後期促進複合体である APC/C を同定した。APC/C は E3 ユビキチンリガーゼとして機能することから [5]、APC/C の基質はこの中心体の早期分離を脆弱部位とさせない機構において主要な役割を果たす分子であると考えられる。従って、この機構の理解を深めるためには、APC/C の基質を同定する必要がある。さらに、APC/C やその基質に変異を有するがん細胞を探索することで、中心体の早期分離を標的とした創薬における適応がんを同定する必要がある。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院薬学研究科生理化学教室の原田知季である。

文　献

1） Gönczy P. Centrosomes and cancer: Revisiting a long-standing relationship. Nat Rev Cancer. 2015;15(11):639–52. PMID: 26493645 DOI: 10.1038/nrc3995

2） Kaseda K, McAinsh AD, Cross RA. Dual pathway spindle assembly increases both the speed and the fidelity of mitosis. Biol Open. 2012;1(1):12–8. PMID: 23213363 DOI: 10.1242/bio.2011012

3） Hata S, Pastor Peidro A, Panic M, Liu P, Atorino E, Funaya C, Jäkle U, Pereira G, Schiebel E.. The balance between KIFC3 and EG5 tetrameric kinesins controls the onset of mitotic spindle assembly. Nat Cell Biol 2019;21(9):1138–51. PMID: 31481795　DOI: 10.1038/s41556-019-0382-6

4） Zeng X, Sigoillot F, Gaur S, Choi S, Pfaff KL, Oh DC, Hathaway N, Dimova N, Cuny GD, King RW.. Pharmacologic inhibition of the anaphase-promoting complex induces a spindle checkpoint-dependent mitotic arrest in the absence of spindle damage. Cancer Cell 2010;18(4):382–95. PMID: 20951947 DOI: 10.1016/j.ccr.2010.08.010

5） Schrock MS, Stromberg BR, Scarberry L, Summers MK. APC/C ubiquitin ligase: Functions and mechanisms in tumorigenesis. Semin Cancer Biol. 2020;67(February):80–91. PMID: 32165320 DOI: 10.1016/j.semcancer.2020.03.001