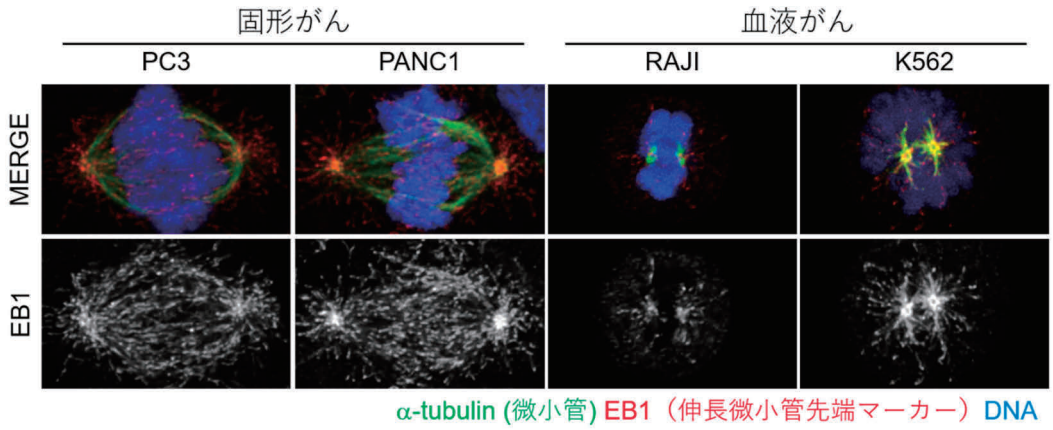
127　血液がん細胞の紡錘体脆弱性の理解と創薬応用	知念　拓実

【目的】血球細胞の分化過程で生じる染色体分配エラーが血液がんの発症や予後不良に繋がる可能性が示唆されている。しかし、血液がんの分裂システムはよく理解されていない。血液がんの分裂システムの理解は、血液がんの発症機構の理解や治療薬開発に繋がる可能性がある。これまでに我々は血液がんでは短い脆弱な紡錘体が形成されることを見出した（下図）。そのため、血液がん細胞は何らかの分裂期のシステムが脆弱な可能性がある。上記の背景の基、本研究では血液がん細胞の細胞分裂システムの理解を目的とする。中心体の詳細な顕微鏡観察と、DepMap に登録された CRISPR/Cas9 ゲノムワイドスクリーニングのデータを活用した情報解析を行う。それにより、血液がん細胞の分裂システムの特徴を理解する。また血液がんの分裂様式の解析において有効なライブセルイメージングの手法を開発する。以上のアプローチにより、血液がんの細胞分裂の特殊性・脆弱性を標的とする創薬基盤の確立を目指す。

【方法】分裂期における中心体の詳細な顕微鏡観察と、DepMap に収容された CRISPR/Cas9 ゲノムワイドスクリーニングのデータを活用した情報解析を行った。また血液がんの分裂様式の解析において有効なライブセルイメージングの手法を開発した。

【結果】血液がん細胞は分裂期中心体への中心体マトリクスの集積が脆弱であった。そのため、血液がんは中心体の微小管形成能が低い可能性が示唆された。また DepMap を活用した、網羅的ながん細胞比較解析により、染色体異数性を示す血液がんは動原体–微小管結合や姉妹染色体接着に脆弱性が生じている可能性を見出した。さらに、マイクロウェルを応用することで、血液がんの観察に適したイメージングシステムの開発に成功した。本研究成果は、血液がんの分裂機構の理解に寄与し、新たな創薬につながるものである。

血液がんの脆弱な紡錘体



127. 血液がん細胞の紡錘体脆弱性の理解と創薬応用

知念　拓実

東京大学 大学院薬学系研究科 薬科学専攻 生理化学教室

Key words：血液がん，分裂期紡錘体，紡錘体脆弱性，中心体，DepMap

緒　言

血球細胞は造血幹細胞が分裂や分化を繰り返すことで、日々我々の体内で生み出されている。その過程で生じる染色体分配エラーが血液がんの発症や予後不良に繋がる可能性が示唆されている。しかし、細胞分裂研究において標準的に使用されてきた固形がんの細胞とは異なり、血液がん細胞の分裂システムはよく理解されていない。血液がんの分裂システムの理解は、血液がんの発症機構や治療薬開発に繋がるため、医学・薬学における重要な課題である。

我々は、血液がんと固形がんの分裂期紡錘体を詳細に比較したところ、血液がんでは有意に短い紡錘体が形成されることを見出した（未発表データ）。このことから、血液がんは微小管形成を始めとする何らかの機能が脆弱である可能性が示唆される。そのため、血液がんの微小管ネットワークの詳細解析は新たながんの特性の理解に繋がる。

血液がんの特性を理解するためには、全遺伝子の要求性を他のがんと比較するアプローチが有効である。遺伝子の要求性は CRISPR/Cas9 ゲノムワイドスクリーニングにより解析が可能であり、既に 1,000 種類以上のがん細胞のスクリーニングデータが統合された DepMap（https://depmap.org/portal/）が公開されている。本データベースを有効活用することで血液がん細胞の分裂システムの特性を抽出することが可能である。

細胞分裂は30～60分程度の時間を要するプロセスである。また細胞分裂のエラーの影響を観察するためには、長期にわたり、細胞周期を解析する必要がある。そのため、血液がんの特性の理解には、詳細なライブセルイメージングの活用が必要である。しかし、血液がん細胞は浮遊しているため、液中で移動しやすく、一細胞を長期にわたり解析することが困難である。そのため、血液がん細胞の観察に適したライブセルイメージング手法の確立が必要である。

上記の背景の基、本研究では血液がん細胞の細胞分裂システムを解析する。中心体の詳細な顕微鏡観察と、DepMap に登録された CRISPR/Cas9 ゲノムワイドスクリーニングのデータを活用した情報解析を行う。それにより、血液がん細胞の分裂システムの特徴を理解する。また血液がんの分裂様式の解析において有効なライブセルイメージングの手法を開発する。これらのアプローチにより、血液がんの細胞分裂の脆弱性を理解し、それを標的とする創薬基盤の確立を目指す。

方　法

1. 血液がん細胞の分裂期中心体の解析

中心体マトリクス分子である CEP192 や PCNT に対する特異的抗体を用いて細胞を染色した。蛍光顕微鏡を用いて中心体の画像を取得し、ImageJ ソフトウェアを用いて中心体上の CEP192 や PCNT の蛍光輝度を定量解析した。

2. DepMap を活用した、血液がん細胞の分裂システムの解析

遺伝子コピー数から染色体異数性を示す細胞を抽出する Python コードを作成した。さらに抽出した細胞群における遺伝子要求性を全がん細胞と比較する Python コードを作成した。作成したコードを用いて、血液がんである急性骨髄性白血病（AML）や急性リンパ性白血病（ALL）から染色体異数性を示す群を抽出し、それらの細胞において生育に重要な遺伝子群を網羅的に比較解析した。

3. 血液がん細胞のライブセルイメージング法の開発

複数の合成樹脂を用いて直径が 50μm のマイクロウェルを作製した。最適化した条件においてライブセルイメージングを行い、AML 細胞株の細胞分裂や細胞周期進行の観察を行った。

結　果

1. 血液がん細胞の分裂期中心体の解析

血液がん細胞（K562、RAJI）の分裂期中心体を詳細に解析した結果、固形がん細胞（PC3、PANC-1）と異なり、中心体マトリクスの集積が弱いことを見出した（図 1）。このことから、血液がん細胞は固形がん細胞と比較して、脆弱な分裂期中心体を形成することが示唆される。続いて、上記の知見をベースに、複数の固形がん細胞において中心体マトリクスの集積を抑制して紡錘体を解析したところ、中心体マトリクスの集積は紡錘体の長さの維持に重要であることを見出した［1］。以上より、血液がん細胞は分裂期の中心体の機能が低下しており、それにより脆弱な紡錘体を形成することが示唆された。

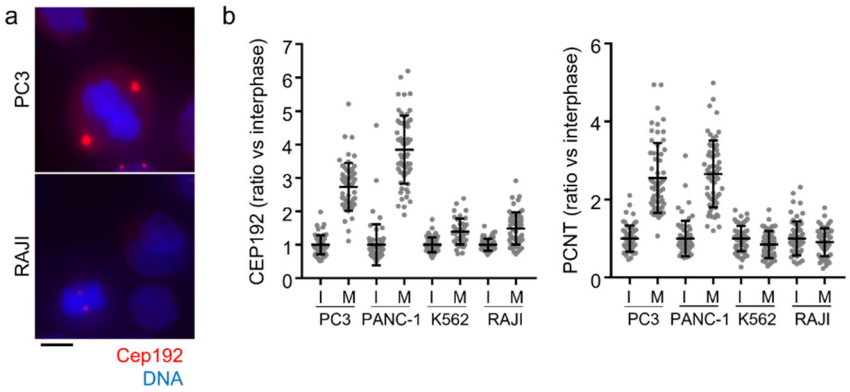


図 1. 血液がん細胞は分裂期における中心体マトリクスの集積が脆弱である

a) 固形がん細胞（PC3）と血液がん細胞（RAJI）において、CEP192 特異的抗体を用いて中心体を免疫蛍光染色した。また、Hoechst33258 を用いて DNA を染色した。スケールバー：5μm。

b) 固形がん細胞（PC3、PANC-1）と血液がん細胞（RAJI、K562）において、中心体上の CEP192 と PCNT の蛍光輝度を測定した。間期（Interphase：I）と分裂期（Mitosis：M）における CEP192 と PCNT の蛍光輝度を測定し、間期の輝度との比を示した。

2. DepMap を活用した血液がん細胞の分裂システムの解析

血球細胞の分裂マシナリーの特殊性を解析するために、染色体異数性を示す血液がん細胞群に着目した。染色体異数性は特定の分裂マシナリーの破綻により生じる可能性がある。すなわち、染色体異数性が生じたがん細胞

の特徴を解析することで、当該がん細胞種の分裂マシナリーの脆弱性を解析できると考えた。DepMap（https://depmap.org/portal/）に登録されている遺伝子コピー数を統合して、急性骨髄性白血病（AML）や急性リンパ性白血病（ALL）の細胞群において、染色体異数性を示す群を抽出した。続いて、染色体異数性を示す群と示さない群を比較し、染色体異数性を示す群において生育に重要な分裂期因子の抽出を試みた。DepMap に登録されている CRISPR/Cas9 ゲノムワイドスクリーニングのデータを用いて解析した結果、異数性を示す AML は動原体–微小管結合に関与する因子（AURKB や CENPE）に、異数性を示す ALL は姉妹染色体接着に関与する因子（SGO1 や RAD21L1）に強く依存して生育することが示唆された。このことから、AML は動原体-微小管結合が、ALL は姉妹染色体接着が脆弱である可能性が示唆された。

3. 血液がん細胞のライブセルイメージングシステムの構築

液中を漂う血液がん細胞の詳細な分裂様式を観察するためには、一細胞ずつ分画して培養する必要がある。そのため、マイクロウェルを作製し、ライブセルイメージングを行った。AML 細胞株である THP-1 に Fucci のシステムを導入し、細胞周期の進行を解析した（図 2a、b）。その結果、複数回の細胞分裂を解析できることを確認した。

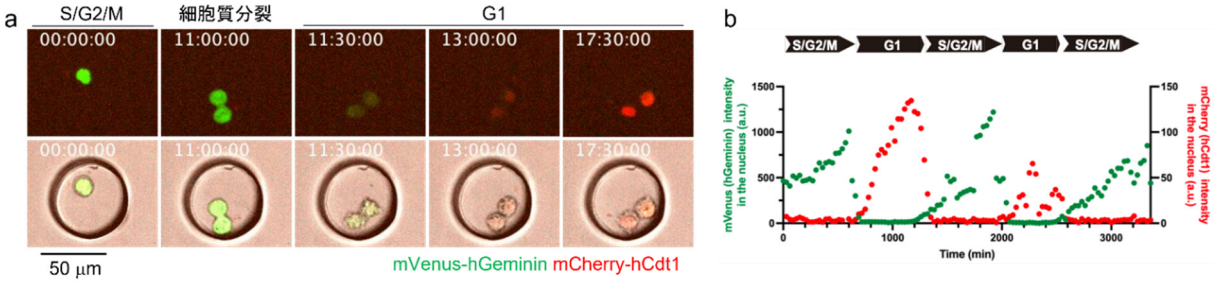


図 2. マイクロウェルを用いた血液がん細胞のイメージングシステムの構築

a） AML 細胞株である THP-1 に Fucci（mVenus-hGeminin、mCherry-hCdt1）のシステムを導入し、細胞周期の進行を観察した。30 分毎に画像を取得し、56 時間連続撮影を行った。スケールバー：50 μm。

b） a）で取得した画像から、各タイムポイントにおける mVenus-hGeminin と mCherry-hCdt1 の輝度を解析し、プロットした。

考　察

本研究により、血液がん細胞は分裂期の中心体マトリクスの集積が脆弱であると示された。中心体マトリクスは中心体の微小管形成に寄与する［2］。このことから、血液がんの中心体の微小管形成活性は脆弱であり、予備実験で見出されていた、血液がんで見られる短い紡錘体は中心体の機能低下により生じた可能性がある。これを実証するために、固形がん細胞において、中心体マトリクスの集積を抑制した結果、有意に紡錘体が短縮した［1］。中心体の微小管形成能は、迅速かつ正確な紡錘体形成に重要である。そのため、血液がんの紡錘体形成には、他のがんでは見られない脆弱性が内包されている可能性があり、その特性を標的とする抗がん薬開発を今後検討する。

また DepMap を活用した、網羅的ながん細胞比較解析により、染色体異数性を示す AML と ALL において、生育に必須な遺伝子群を抽出した。AML は動原体–微小管結合に関与する因子である AURKB や CENPE に対する依存性が高いことから、がんの発生過程において、動原体制御システムに異常が生じている可能性が高い。このことから、臨床試験段階にある AURKB や CENPE の阻害薬は AML に対して有効な可能性がある。他の

グループにおいても患者由来の AML を用いた解析により、AML は AURKB や CENPE 阻害薬に対する感受性が高いことが報告されており、当グループの解析結果と整合性がある［3]。ALL は姉妹染色体接着に関与する因子（SGO1 や RAD21L1）に強く依存して生育することから、染色体形成過程において、姉妹染色体接着不全が生じている可能性がある。姉妹染色体接着不全による染色体分配エラーは ALL の発症に寄与すると考えられる。本研究で提示された因子に対する阻害薬の抗がん活性の検討が今後必要である。

本研究では、マイクロウェルシステム［4］を応用することで、血液がんの観察に適したイメージングシステムの開発に成功した。本手法を用いることで、血液がん細胞の液中移動を抑制し、長期にわたり細胞周期・細胞分裂を観察することが可能である。本研究で得られた創薬標的因子を阻害し、マイクロウェルイメージングシステムで解析することで、血液がん細胞の脆弱性を詳細に解析可能である。

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系研究科生理化学研究室の山本昌平助教と新倉竜太である。

文　献

1） Chinen T, Yamazaki K, Hashimoto K, Fujii K, Watanabe K, Takeda Y, Yamamoto S, Nozaki Y, Tsuchiya Y, Takao D, and Kitagawa D. Centriole and PCM cooperatively recruit CEP192 to spindle poles to promote bipolar spindle assembly. J Cell Biol. 2021 Feb 1;220(2):e202006085. PMID: 33443571 DOI: 10.1083/jcb.202006085.

2） Woodruff J, Wueseke O, Hyman AA. Pericentriolar material structure and dynamics. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci . 2014 Sep 5;369(1650):20130459. PMID: 25047613 DOI: 10.1098/rstb.2013.0459.

3） Hashimoto M, Saito Y, Nakagawa R, Ogahara I, Takagi S, Takata S, Amitani H, Endo M, Yuki H, Ramilowski J, Severin J, Manabe R, Watanabe T, Ozaki K, Kaneko A, Kajita H, Fujiki S, Sato K, Honma T, Uchida N, Fukami T, Okazaki Y, Ohara O, Shultz L, Yamada M, Taniguchi S, Vyas P, de Hoon M, Momozawa Y, Fumihiko I. Combined inhibition of XIAP and BCL2 drives maximal therapeutic efficacy in genetically diverse aggressive Acute Myeloid Leukemia. Nat Cancer . 2021 Mar;2(3):340-356. doi: 10.1038/s43018-021-00177-w. Epub 2021 Mar 18. PMID: 35121960 DOI: 10.1038/s43018-021-00177-w.

4） Yamamoto S, Gaillard J, Vianay B, Guerin C, Orhant-Prioux M, Blanchoin L, Théry M. Actin network architecture can ensure robust centering or sensitive decentering of the centrosome. EMBO J. 2022 Oct 17;41(20):e111631. Epub 2022 Aug 2. PMID: 35916262 DOI: 10.15252/embj.2022111631.