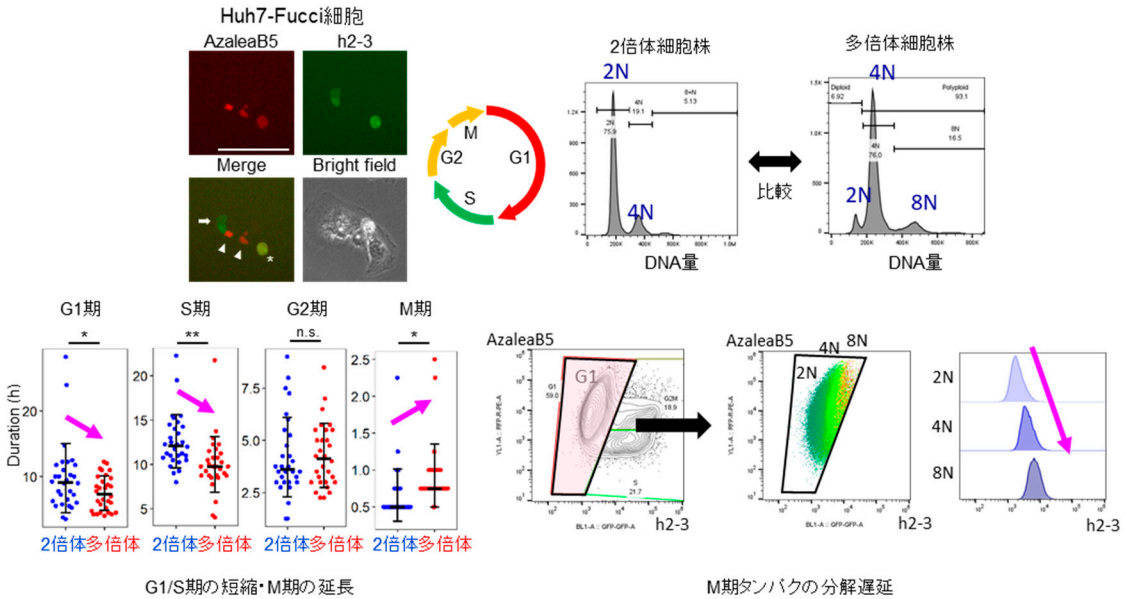
137　ユビキチン化変容に着目した多倍体癌抑止療法の探索	松本　知訓

【目的】がんではゲノムの倍加（多倍体化）がしばしば認められ、多倍体化は染色体不安定性を惹起し、がんのクローン進化と予後不良につながるとされる。このため、ゲノムの多倍体化に着目し、多倍体がん細胞の特に細胞増殖の弱点を標的とした治療を確立することができれば、予後不良な多倍体がん、染色体不安定性を示すがんに特異的な治療戦略となることが期待されるが、未だ多倍体がん、染色体不安定性を示すがんに特異的な治療法は確立されていない。我々は、増殖する多倍体がん細胞では特にUBE2Cという細胞周期進行に関わるユビキチンE2結合タンパク質が高発現していることを先行研究において見出した。そこで本研究では、多倍体がん細胞がその増殖過程においてユビキチン・プロテアソームシステムに何らかの変化を生じている可能性に着目し、同システムを多倍体がんの治療標的とするための基礎的検討として、倍数性の違いに伴う細胞周期の進行とUPS制御の変化について検討することを目的とした。
【方法】ヒト肝がん細胞株Huh7を用いてFucciを安定的に発現する細胞Huh7-Fucciを作製した。2倍体細胞または4倍体細胞を主として構成される、異なる倍数性プロファイルを示す細胞株（2倍体株、多倍体株）を樹立し両者をタイムラプス解析することにより、倍数性に伴う細胞周期の進行やタンパク質のユビキチン化分解動態の変化を評価した。また、細胞周期進行過程でのユビキチン化に重要な役割を果たすUBE2Cやそのドミナントネガティブ変異体を発現誘導することにより、UBE2C自体が治療標的となりうるのかどうかについて評価した。
【結果】複数のHuh7-Fucci株を作製し、そのG1期細胞の倍数性をフローサイトメトリーにより評価することで、2倍体細胞または4倍体細胞を主として構成する、2倍体細胞株、多倍体細胞株を得た。両者の細胞周期の進行をタイムラプス観察により評価したところ、多倍体細胞株は2倍体細胞株に比べ、細胞周期全体の長さ、およびG1期、S期の時間が有意に短かった。一方、多倍体細胞株はM期において染色体が赤道面に並ぶためにかかる時間が長く、M期全体の長さも2倍体細胞株より優位に長かった。特に多倍体細胞株は、M期終了後のG1期、S期への進行が早く、この移行中におけるGeminiの分解をFucciの蛍光タンパクの輝度によりモニターしたところ、倍数性が高い細胞ほどGeminの分解が遅延していることが示唆された。多倍体化することによる、細胞周期中のタンパク質のユビキチン化・分解の遅延が示唆されたため、UBE2Cを過剰発現、あるいはドミナントネガティブ体の発現により阻害することで、多倍体細胞の減少が認められるか検討したが、これらの処理ではHuh7細胞における多倍体細胞の出現は抑止されなかった。

倍数性の違いに伴う細胞周期進行とユビキチン化タンパク分解の変化



137. ユビキチン化変容に着目した多倍体癌抑止療法の探索

松本　知訓

*大阪大学 微生物病研究所 遺伝子生物学分野

Key words：多倍体化，ユビキチン，Fucci，染色体不安定性，ゲノム倍加

緒　言

細胞分裂の度に、染色体の数的な異常や構造異常が生じやすい状態を染色体不安定性（CIN）と呼ぶ。CIN は多様な染色体異常を持つ癌細胞を生み出すことでがんの heterogeneity 亢進の基盤となり、ひいては発がん、転移、薬剤耐性化といったがんのクローン進化の促進につながると考えられている。このため CIN 陽性であるがんは一般に悪性度が高く予後不良である。近年、がんゲノム解析が進み原発臓器によらずがんゲノムの異常に基づいて臓器横断的にがんを治療することも可能となってきたが、CIN 陽性であるがんは様々な臓器のがんに高頻度に認められるにも関わらず未だ特異的な治療法はない取り残された難治がんである。

哺乳類の体細胞は通常、ハプロイドゲノムを 2 セット保有する 2 倍体である。しかし、様々な臓器のがんではゲノムの倍加（多倍体化）がしばしば認められる［1］。最近の臓器横断的な大規模がんゲノム解析では、固形腫瘍の約 38%がゲノム倍加を経ており、ゲノム倍加を経たがんは染色体異常を多く持ち有意に予後不良であることが明らかとなっている［1, 2］。個別の臓器のがんにおいて多倍体化がもたらす影響については依然十分には明らかとなっていないが、我々が染色体 FISH によりヒト肝がんの倍数性を検討したところ、肝細胞癌のうち約 36%が多倍体化していること、多倍体化した肝がんは特徴的な組織像を呈し予後不良であることが明らかとなった［3］。また興味深いことに、多倍体肝がんでは特徴的なマーカーとして UBE2C というユビキチン E2 結合タンパクを高発現していることも明らかとなった［3］。タンパク質のユビキチン化とそれを目印としたプロテアソームによるタンパク分解は、細胞周期を円滑に進行するために必須の遺伝子発現制御機構である。そして UBE2C は、M 期の進行と終了、G1 期の維持で中心的な役割を果たす APC/C ユビキチンリガーゼ複合体の一員である。また重要なことに、多倍体がん細胞の増殖は 2 倍体がん細胞に比べ、ユビキチン・プロテアソームシステム（ubiquitin proteasome system：UPS）の阻害に脆弱であることも最近示されている［1］。これらの事実より、多倍体がん細胞はその増殖過程において UPS に何らかの変化を生じており、それが多倍体がん細胞の特異的な治療標的となる可能性が推察される。

そこで本研究では、倍数性の異なるがん細胞株を樹立し、倍数性の違いに伴う細胞周期の進行と UPS 制御の変化について検討した。さらに UBE2C の過剰発現あるいは阻害が多倍体化の阻害に寄与するのかどうかについて検討した。その結果、多倍体細胞では、染色体分離が遷延することによる M 期の延長が認められた一方、G1 期および S 期は短縮し、M 期タンパク質の十分な分解がないまま細胞周期が進行している可能性が示唆された。一方、このような M 期から G1 期への移行に重要な UBE2C を過剰発現あるいは阻害することは、倍数性の有意な変化にはつながらず、UPS を標的として多倍体がん細胞の特異的な抑止を目指すには、さらなる治療標的の探索が必要であると考えられた。

方　法

1. 培養細胞実験

ヒト肝がん培養細胞 Huh7 に、細胞周期依存的なユビキチン化・タンパク質分解の動態を蛍光タンパク質の発現で可視化する系である Fucci システムを導入した［4］。導入は我々の既報に則り［3］、遺伝子組換え法としては Sleeping Beauty トランスポゾンとトランスポゼースシステムを活用し、安定的に Fucci を発現する細胞株 Huh7-Fucci 細胞を

*現在の所属：大阪大学 大学院生命機能研究科 細胞ネットワーク講座

樹立した。安定細胞株の樹立においてはブラストサイジンによる薬剤選択を行い、いくつかの Fucci 発現細胞株を樹立した。樹立した Fucci 細胞株の倍数性をフローサイトメトリーおよびギムザ染色により評価し、2 倍体 Huh7-Fucci 細胞株と安定多倍体 Huh7-Fucci 細胞株を得た。UBE2C をドキシサイクリン依存性に発現する細胞株も Sleeping Beauty トランスポゾンシステムにより樹立した。

2. フローサイトメトリー

細胞を TrypLE Express（ThrmoFisher Scientific）でディッシュより剥離、分離した後、培地を加えて中和し、遠心により上清を吸引除去した。FACS Buffer（3%FBS/PBS）により細胞を懸濁した上で、Vybrant Dye Cycle Violet Stain（Thermo Fisher、V35003）を加え 37℃で 30 分間インキュベートし DNA 染色を行った。死細胞を除去するために、PI を加えた上で Attune NxT フローサイトメーター（ThrmoFisher Scientific）を用いてフローサイトメトリーを行った。フローサイトメトリーのデータ解析は FlowJo を用いて行った。

3. ギムザ染色

細胞をコルセミド（FUJIFILM Wako Pure Chemical）で 30 分処理した後に細胞を回収した。引き続き KCl 低張液（0.075 mol/L）で 20 分インキュベートし、カルノア固定液で細胞を固定した。細胞をスライドガラスに滴下後に 4%ギムザ染色液（KaryoMax Giemsa Stain Solution、Thermo Fisher Scientific）で染色し、DP-27 顕微鏡（エビデント）を用いて観察した。

4. タイムラプス解析

Huh7-Fucci 細胞を、10%FBS を添加した FluoroBrite DMEM 培地（Thermo Fisher Scientific）で維持し、37℃、5% CO_2環境下で培養を維持した。タイムラプス撮影は BZ-X 810 顕微鏡（キーエンス社）を用いて行い、Fiji ソフトウェアを用いて解析した。

結　果

1. 倍数性と細胞周期進行、ユビキチン化タンパク分解との関連についての検討

細胞周期の進行状態と倍数性を正確に評価するため、まずヒト肝がん細胞株 Huh7 を用いて Fucci を安定的に発現する細胞 Huh7-Fucci を作製した（図 1a）。DNA を染色し、フローサイトメトリーを用いて G1 期の細胞の倍数性を評価したところ、2 倍体細胞が主で構成される Huh7-Fucci-2N 細胞株と 4 倍体細胞を主に構成される Huh7-Fucci-4N 細胞株が得られた（図 1b）。Huh7-Fucci-2N 細胞および Huh7-Fucci-4N 細胞がそれぞれ 2 倍体細胞、4 倍体細胞の増殖により維持されていることはギムザ染色で確認できた（図 1c）。

次に、樹立した倍数性の異なる Huh7-Fucci 細胞の細胞周期の進行をタイムラプス観察により評価した。その結果、Huh7-Fucci-4N 細胞は Huh7-Fucci-2N 細胞に比べ、有意に細胞周期が短く、特に G1 期、S 期の時間が有意に短かった（図 1d）。一方、M 期の時間については Huh7-Fucci-4N 細胞のほうが、2 倍体細胞に比べ有意に長かった（図 1d）。多倍体細胞では染色体数が多いため、全ての染色体が赤道面に並ぶのに時間がかかることが想定される。そこで、各細胞における M 期の開始から M 期中期に染色体が赤道面に並ぶまでの時間を比較したところ、想定通り多倍体細胞では M 期中期までの時間の延長傾向を認めた（図 1e）。以上により、多倍体細胞では染色体の整列の困難さにより M 期の時間が延長する一方、M 期終了後の G1 期、および S 期への進行は 2 倍体に比べ速やかに進行することが明らかとなった。

多倍体細胞では G1 期が短縮しており比較的短い時間で M 期から G1 期、S 期へと移行することから、この時相でユビキチン化・プロテアソーム分解をうけるべきタンパク質の分解が不十分になっている可能性がある。そこで、G1 期への移行時に生じる Geminin の分解を Fucci の h2-3 蛍光タンパクの輝度によりモニターした。細胞株のロットによる蛍光輝度差の影響を排除するため単一の Huh7-Fucci-2N 細胞株を用いて検討したところ、G1 期細胞内において、

倍数性が高い細胞ほど h2-3 蛍光タンパクの輝度が高かった（図 1f）。このことは、多倍体細胞では M 期から G1 期への移行時に Geminin の分解が不十分となっている可能性があることを示唆していた。

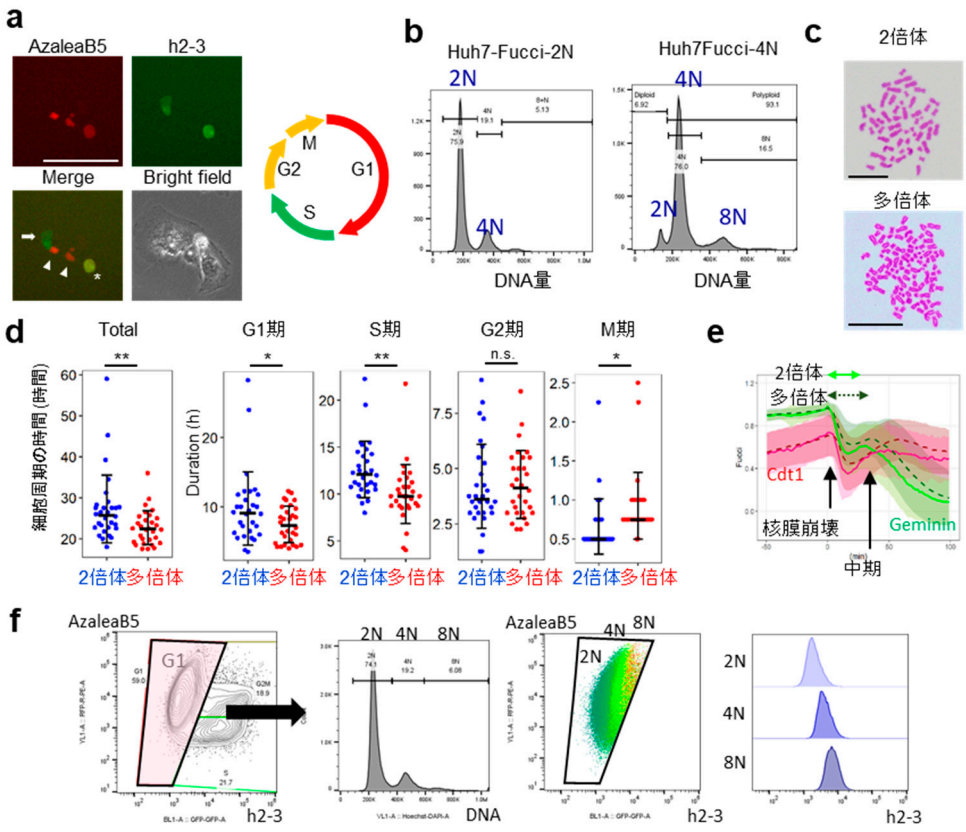


図 1. 倍数性の違いに伴う細胞周期の進行とユビキチン化タンパク分解の変化

a) Huh7-Fucci 細胞の顕微鏡像と模式図（スケールバー：100μm）。

b) Huh7-Fucci-2N 細胞と Huh7-Fucci-4N 細胞のフローサイトメトリーの代表的ヒストグラム図。G1 期細胞の DNA 量について示す。

c) 2 倍体、多倍体 Huh7 細胞のギムザ染色像（スケールバー：10μm）。

d) Huh7-Fucci-2N 細胞と Huh7-Fucci-4N 細胞の細胞周期の時間。* $p<0.05$、** $p<0.01$（t test）

e) Huh7-Fucci-2N 細胞と Huh7-Fucci-4N 細胞の M 期における蛍光輝度の推移。

f) Huh7-Fucci-2N 細胞の DNA 量と h2-3 蛍光との相関。

2. 多倍体がん細胞の治療標的としての UBE2C の有効性の評価

UBE2C の高発現が多倍体肝がんで特異的に認められることから、UBE2C が多倍体がんの治療標的となりうるのかについて検討した。Huh7-Fucci-2N 細胞株にさらに、UBE2C または UBE2C の dominant-negative 変異体［5］をドキシサイクリン依存性に発現誘導する遺伝子改変を導入した。樹立した細胞は定常状態において、G1 期細胞のうち約 10%が多倍体化していた（図 2）。この細胞にドキシサイクリンを処理し UBE2C を高発現させたところ、G1 期細胞の倍数性に有意な変化を認めなかった（図 2）。次に、UBE2C が結合する APC/C の活性を阻害する UBE2C の dominant-negative 変異体をドキシサイクリン依存性に発現誘導した。UBE2C、あるいは APC/C の阻害により多倍体細胞割合が減少することを期待していたが、残念ながら本実験においても G1 期細胞の倍数性に有意な変化を認めなかった（図 2）。

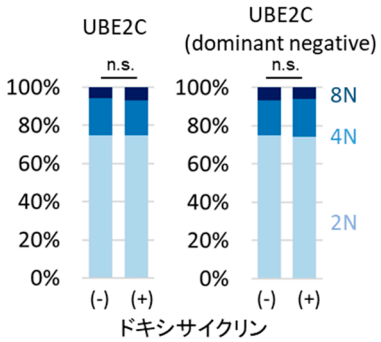


図 2. UBE2C の発現・機能変化に伴う倍数性変化

ドキシサイクリン依存性に UBE2C もしくはその dominant negative 変異体を発現する Huh7-Fucci 細胞のフローサイトメトリー解析。G1 期細胞の倍数性の構成を示す。

n.s.：not significant。

考　察

本研究により、多倍体細胞の細胞周期では M 期は延長する一方、G1 期・S 期は短縮し、特に M 期タンパク質のユビキチン化・分解遅延が生じている可能性があることが示唆された。しかし、多倍体細胞で高発現し、M 期タンパク質のユビキチン化に重要な役割を果たす UBE2C を高発現、あるいは dominant negative 変異体により阻害することによっては、多倍体細胞割合を減少させることはできなかった。ユビキチン化・タンパク分解経路に着目した、多倍体癌細胞特異的な治療標的のさらなる探索が必要である。

共同研究者・謝辞

本研究は、大阪大学微生物病研究所遺伝子生物学分野の原英二教授研究室において行った。

文　献

1) Quinton RJ, DiDomizio A, Vittoria MA, Kotýnková K, Ticas CJ, Patel S, et al. Whole-genome doubling confers unique genetic vulnerabilities on tumour cells. Nature 2021 May;593(7860):E15. PMID: 33976417. doi: 10.1038/s41586-021-03591-3.

2) Bielski CM, Zehir A, Penson AV, Donoghue MTA, Chatila W, Armenia J, et al. Genome doubling shapes the evolution and prognosis of advanced cancers. Nat Genet 2018 Aug;50(8):1189-1195. Epub 2018 Jul 16. PMID: 30013179. doi: 10.1038/s41588-018-0165-1.

3) Matsuura T, Ueda Y, Harada Y, Hayashi K, Horisaka K, Yano Y, et al. Histological diagnosis of polyploidy discriminates an aggressive subset of hepatocellular carcinomas with poor prognosis. Br J Cancer 2023 Oct;129(8):1251-1260. Epub 2023 Sep 15. PMID: 37715023. doi: 10.1038/s41416-023-02408-6.

4) Ando R, Sakaue-Sawano A, Shoda K, Miyawaki A. Two coral fluorescent proteins of distinct colors for sharp visualization of cell-cycle progression. Cell Struct Funct 2023 Jul 29;48(2):135-144. PMID: 37394513. doi: 10.1247/csf.23028. Epub 2023 Jul 30.

5) Townsley FM, Aristarkhov A, Beck S, Hershko A, Ruderman JV. Dominant-negative cyclin-selective ubiquitin carrier protein E2-C/UbcH10 blocks cells in metaphase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Mar 18;94(6):2362-7. doi: 10.1073/pnas.94.6.2362.