

受賞者

田中 耕三

東北大学加齢医学研究所遺伝子機能研究分野

研究テーマ

微小管に作用する抗がん剤による細胞死機構の解明

1. はじめに

本研究は、微小管に作用する薬剤による細胞死の機構を解明し、抗がん剤の作用機序や抗がん剤耐性の機構の理解に貢献することを目的とする。Vinca alkaloid や taxol といった薬剤は、種々のがんには有効な抗がん剤として広く用いられている。これらの薬剤は微小管に作用し、細胞分裂期における染色体と微小管の正しい結合を阻害する。その結果紡錘体チェックポイントが活性化され、細胞周期が分裂期で停止する。この細胞周期の停止が持続すると細胞死が起こり、これにより抗がん作用が発揮される。しかし細胞死に至る過程の多くは不明であり、この解明はより有効ながん治療のために重要である。

ヒト細胞でのこれまでの知見から、微小管に作用する薬剤は主にアポトーシスを誘導することにより細胞死をひきおこすと考えられている。この過程には、細胞分裂期で停止したまま細胞死に至る mitotic cell death と、細胞周期停止から逸脱して次の G1 期へと移行した後死に至る mitotic slippage と呼ばれる現象が知られている。しかしアポトーシスの誘導に関与するこれらの現象の詳細については未解明の点が多い。そこで本研究では、遺伝学的解析の容易な出芽酵母をモデルとして用いてこの点を明らかにしようとする点を特色とする。染色体と微小管の結合の機構や紡錘体チェックポイントの機構は酵母からヒトにいたるまでよく保存されている（参考文献 1）。またこれまで多細胞生物にのみ認められると考えられていたアポトーシスが酵母でも認められることが明らかになっている。細胞死の経路が酵母とヒト細胞でどの程度保存されているかは不明であるが、酵母でこの経路が同定されれば、ヒト細胞で細胞死の経路を明らかにする手がかりとなると考えられる。

微小管に作用する抗がん剤による細胞死の経路に関する遺伝子が明らかになれば、その遺伝子機能の制御により、抗がん剤の作用を必要に応じて増強あるいは抑制し、より効果的ながん治療を行える可能性がある。またがん細胞におけるこれらの遺伝子の変異を調べることは、抗がん剤耐性を予想するのに役立つと考えられる。抗がん剤による細胞死の経路の解明は、作用機序の違いを生かしてより有効な多剤併用療法を開発するためにも重要である。さらに、抗がん剤治療等で認められる免疫不全状態において、真菌感染症が重大な問題であるが、酵母の細胞死に関する遺伝子の同定は、抗真菌剤の開発や治療法の改善にも寄与することが期待される。

2. 方法

1. 細胞株・培養法

用いた出芽酵母のバックグラウンドは W303 あるいは S288C である。培養には通常の YPAD 培地を用いた。G1 期への同調は α -factor により行った。微小管脱重合阻害剤である nocodazole は DMSO に 10 mg/ml で溶解した溶液を YPAD で最終濃度 15 μ g/ml に希釈して使用した。

2. 細胞死の評価

G1 期での同調から release した出芽酵母を 15 μ g/ml の nocodazole で処理し、2 時間おきに 10 時間後までサンプリングし、methylene blue で染色される死細胞の割合を検討した。

3. 活性酸素 (Reactive oxygen species: ROS) 産生の評価

酸化されると蛍光を発する基質である H2DCF-DA で細胞を処理し、蛍光を発する細胞を観察した。

4. Caspase 活性の評価

Caspase 活性により分解されて蛍光を発する基質である D2R で処理し、蛍光を発する細胞を観察した。

3. 結果

1. Nocodazole 持続処理による出芽酵母の細胞死の検討

まず出芽酵母を微小管重合阻害剤である nocodazole で長時間処理した際に細胞死が見られるかど

うかを検討した。FACS 解析の結果、nocodazole を 15 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で加えると細胞は分裂期で停止するが、これが持続すると 2C のピークが低下して、1C 以下を含む広い範囲に広がることがわかった。これは DNA 含量が 1C 以下の死細胞が出現したことを示唆している。そこで死細胞を識別する methylene blue により細胞を観察したところ、図 1 に示すように nocodazole で長時間処理した細胞の中には、細胞死を起こしているものが認められた。Nocodazole 処理後の時間による細胞死の割合をグラフにしたものが図 2 であり、nocodazole 処理後 10 時間で 4 割程度の細胞で細胞死が認められた。この細胞死は蛋白合成阻害剤である cycloheximide により抑えられることから、この細胞死は蛋白合成を伴う active な過程であることが示唆された。

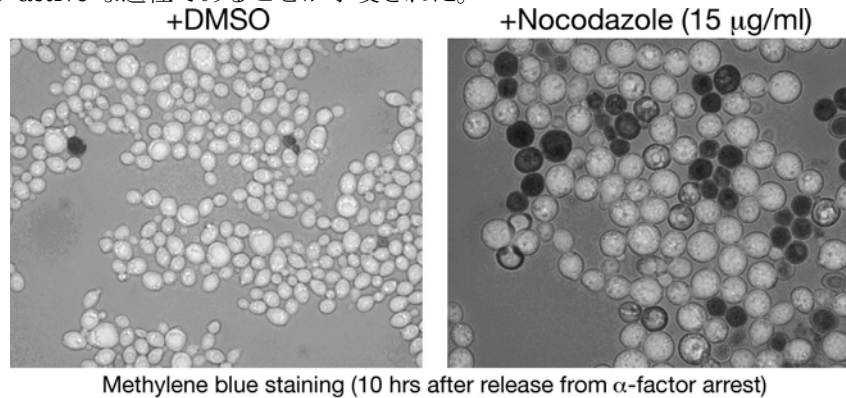


図1 Methylene blue染色による nocodazole 処理細胞での死細胞の検出

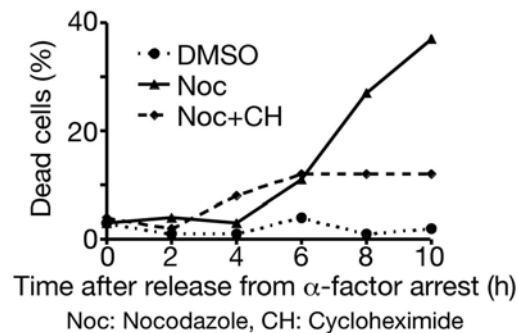


図2 Nocodazole持続処理による死細胞の割合の変化

2. Nocodazole 持続処理時の細胞周期の検討

動物細胞では、細胞分裂期での細胞周期停止が持続すると、mitotic slippage と呼ばれる現象により G1 期へ移行し、4 倍体の細胞が生じることが知られている。そこで nocodazole で長時間処理した酵母細胞でも、動物細胞のような mitotic slippage が起こっているかどうかを検討した。指標として Clb2 (Cyclin B に相当し、分裂期に発現が増加し、G1 期には低下する)および Sic1 (CDK inhibitor で、その発現は CDK 活性と拮抗して G1 期に増加する)の発現を調べた。その結果 Sic1 の発現は G1 期から S 期を経て分裂期に入るにつれて減少した後、nocodazole 処理の時間中ほとんど認められなかった。一方、Clb2 の発現は、分裂期に増加した後、nocodazole 処理の時間中持続していた。これらの結果は、nocodazole 処理した酵母が mitotic slippage ではなく、mitotic cell death に至ることを示唆している。細胞分裂期の進行に必要な anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C)の変異体では細胞分裂期から G1 期へ移行することができないが、このような変異体でも野生型の細胞株を nocodazole で処理した時と同様の時間経過をとる細胞死が認められた。このことより細胞分裂期で停止した細胞は共通の細胞死を示すものと考えられた。これに対し、*MAD2* や *BUB1* といった紡錘体チェックポイントに関与する遺伝子の欠損株では、nocodazole 存在下でも細胞分裂期での停止が起らず、細胞は染色体の不均衡分配により死に至る。この時の細胞死の割合は、時間とともに直線的に増加する。一方野生株を nocodazole で処理した場合には、分裂期で一旦停止した後に細胞死の割合が増加する。これは野生株での細胞死に染色体の不均衡分配以外の機構が関与している可能性を示唆している。これをさらに検討するために、一倍体と二倍体の細胞での nocodazole による細胞死を比較した。もし nocodazole 持続処理による細胞死が、分裂期での細胞周期停止からの逸脱による染色体の不均衡分配に起因するとすれば、一倍体の方が相同染色体が存在する二倍体よりその影響を受けやすいと考えられる。しかし実際には同程度の細胞死が認められ、不均衡分配が細胞死の主な原因で

はないことが示唆された。以上のことより nocodazole で処理した細胞は、分裂期にとどまったまま、不均等分配ではない原因により細胞死に至ることがわかった。

3. Nocodazole 持続処理によるアポトーシスの誘導の検討

Nocodazole 持続処理による細胞死の原因として、ヒト細胞同様アポトーシスが起きている可能性を検討した。Nocodazole で処理した細胞と APC/C の変異体を DAPI 染色したところ、通常の状態の核が均一な円形をしているのに対し、これらの細胞は形が不整であり、断片化しているものも認められた。このような異常は、アポトーシス様の細胞死を示す他の条件でも認められることが報告されており、アポトーシスが起きていることが示唆された。

酵母でのアポトーシスの誘導には主にミトコンドリアにより産生される活性酸素、すなわち ROS が重要である。そこで ROS によって緑色の蛍光を発する基質によって ROS の産生を見たところ、nocodazole で持続処理した細胞では ROS の産生が認められることがわかった。ROS が認められる細胞の多くは propidium iodide (PI)でも染色される死細胞であったが、一部は PI で染色されず、細胞死の過程の初期期であると考えられた。

活性酸素は主に細胞内のミトコンドリアで酸化的リン酸化に伴って産生される。ミトコンドリア遺伝子を欠損する *rho-zero* 変異では、nocodazole 処理あるいは APC/C の変異による細胞死の割合が減少することがわかった。またミトコンドリアの電子伝達系の遺伝子の変異でも、nocodazole による細胞死が抑制された。これらの結果は、ミトコンドリアで産生された活性酸素が細胞死に重要であることを示唆している。

動物細胞でのアポトーシスの誘導には caspase が重要であるが、酵母にも同様の活性があることが知られている。そこで caspase 活性により蛍光を発する基質により、nocodazole で処理した細胞での caspase 活性を検討した。その結果、nocodazole で処理した細胞では caspase 活性が認められ、その多くが PI でも染色されることから、細胞死を起こしていることがわかった。

4. 考察

これまで微小管に作用する薬剤による細胞死の機構を出芽酵母で解析した研究はほとんど行われていなかった。今回の我々の研究により、細胞分裂期での停止が持続するとミトコンドリアから ROS が産生され、caspase の活性化を通じてアポトーシスによる細胞死に至るという経路が考えられた (図 3)。その際ヒト細胞で見られるような mitotic slippage は見られず、主として細胞分裂期にとどまったまま細胞死に至る (mitotic cell death) こともわかった。そこで出芽酵母は、少なくともヒト細胞の mitotic cell death の機構のモデルとなることが期待される。現在出芽酵母の遺伝子欠失変異体のライブラリーのスクリーニングにより、nocodazole 持続処理による細胞死に関与する分子の同定を行っており、これにより細胞死の経路が明らかになることが期待される。

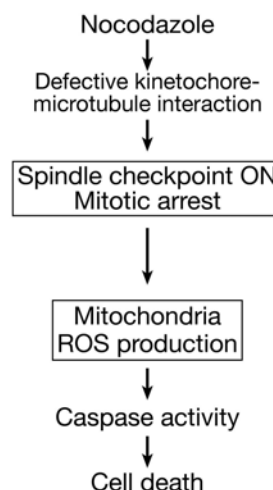


図3 Nocodazole持続処理による細胞死誘導機構のモデル

5. 発表論文、参考文献

参考文献 1 Tanaka, T, U, Stark, M, J, Tanaka, K. Kinetochore capture and bi-orientation on the mitotic spindle. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2005) 6, p929-942.