

学位論文

Doctor's Thesis

グリオーマ細胞株において、微小管重合阻害剤による M 期の遷延は
hyperploidy および染色体不安定性を誘導する

(Prolonged mitotic checkpoint by drugs that inhibit formation of microtubule
induces hyperploidy and chromosome instability)

著者名： 新田 雅之
Masayuki Nitta

指導教官： 腫瘍医学講座
佐谷 秀行 教授
脳神経外科講座
生塩 之敬 教授

審査委員名： 組織制御分野担当教授 山泉克 教授
微生物学講座担当教授 前田 浩 教授
外科学第二講座担当教授 小川 道雄 教授
産婦人科学講座担当教授 岡村 均 教授

2002 年 3 月

学位論文

Doctor's Thesis

グリオーマ細胞株において、微小管重合阻害剤による M 期の遷延は
hyperploidy および染色体不安定性を誘導する

(Prolonged mitotic checkpoint by drugs that inhibit formation of microtubule
induces hyperploidy and chromosome instability)

新田 雅之

Masayuki Nitta

指導教官

佐谷 秀行 教授

熊本大学大学院医学研究科腫瘍医学講座

生塩 之敬 教授

熊本大学大学院医学研究科脳神経外科講座

2002 年

目次

1. 要旨	4
2. 発表論文リスト	6
3. 謝辞	7
4. 略語一覧	8
5. 研究の背景と目的	
5-1 細胞周期チェックポイント	9
5-2 抗癌剤とチェックポイント	10
5-3 紡錘体チェックポイント	10
5-4 癌細胞と hyperploidy	10
5-5 微小管阻害剤による hyperploidy 形成と mitotic slippage	11
5-6 p53 と紡錘体チェックポイント	13
5-7 本研究の目的	13
6. 実験方法	
6-1 細胞培養	14
6-2 フローサイトメトリー	14
6-3 免疫染色	14
6-4 ウェスタンブロット	14
6-5 染色体解析	15
6-6 Comparative Genomic Hybridization (CGH)法	15
6-7 Spectral Karyotyping (SKY)法	15
6-8 Cdc2 kinase assay	16
7. 実験結果	
7-1 Antimicrotubule drug (AMD)による hyperploidy の形成	17
7-2 Mitotic slippage 後の DNA 合成による hyperploidy 形成	18
7-3 AMD 処理後の hyperploidy の形成における p53 の役割	19
7-4 G1/S チェックポイントの破綻が AMD 処理後の hyperploidy を引き起 こす。	21
7-5 Staurosporine は AMD 処理後の mitotic slippage を促進す る	22

7-6	Mitotic slippage には Cdc2 活性の低下は関与しない	24
7-7	ノコダゾール処理によって hyperplod となり生存した細胞のクローニング	25
7-8	CGH 法によるクローン細胞の染色体解析	26
7-9	SKY 法によるクローンに生じた染色体構造変化の解析	29
7-10	hyperplod クローンは染色体分離異常を有する	30
7-11	hyperplod クローンは染色体の数的不安定性を有している	31
7-12	hyperplod クローンは染色体構造異常が増加している	33
8. 考察		
8-1	微小管重合阻害剤 (AMD) による hyperploidy 形成のメカニズム	35
8-2	Mitotic slippage の分子メカニズムについて	35
8-3	Hyperploidy であることの生物学的意義	36
8-4	クローンにおける染色体変化の意義	36
8-5	hyperplod クローンの染色体数的不安定性のメカニズムについて	37
8-6	クローンにおける染色体構造異常の意義	37
9.	結語	39
10.	参考文献	40

1. 要旨

細胞周期において、正確なゲノムの複製と染色体の娘細胞への分配を監視する、チェックポイントとよばれるシステムが存在している。チェックポイントの破綻は、遺伝子変異や欠損、増幅、あるいは染色体損傷、異数体などを引き起こし、それらの異常がひいては細胞の癌化につながると考えられている。最近、多くの抗癌剤が、チェックポイントをターゲットとしていることが分かってきた。Taxol や vincristine などの微小管作用薬 (anti-microtubule drug [AMD]) は抗癌剤として広く用いられている。この薬剤は、微小管機能を阻害することによって、紡錘体チェックポイントを活性化することで抗腫瘍効果が得られると理解されているが、同時に hyperploidy を誘導することが知られている。本研究では、hyperploidy を一つの特徴とする glioblastoma の細胞株を用い、AMD 処理にて紡錘体チェックポイントが活性化された後に hyperploidy が生じる分子メカニズムを検討した。その結果、AMD 処理された細胞は一時的に分裂期に停止した後、mitotic slippage により細胞分裂しないまま G1 期に入りさらに新たな DNA 合成を行うことにより hyperploidy となること、p53 および G1 チェックポイントの破綻が hyperploidy 形成に重要であることがわかった。また、hyperploidy が生じる際に起こる mitotic slippage は、broad kinase inhibitor である staurosporine によって促進されるが、cdc2 を抑制しても促進されないことを見出した。従って、staurosporine によって抑制される、cdc2 以外の kinase が AMD 処理後の M 期停止の維持に必要と考えられた。さらに、hyperploidy が持つ生物学的意義を明らかにするため、AMD 処理後に hyperploidy となった後生存したクローンを樹立した。G1 チェックポイント機能が比較的保たれている U87MG から得られたクローンは、主に染色体数の変化しか観察されなかったのに対し、G1 チェックポイントが破綻している U251MG から得られたクローンでは、染色体の数のみならず著明な構造変化が観察された。また、クローン細胞は染色体分離異常を示し、染色体数的不安定性が増大していることが分かった。AMD による抗癌治療は、チェックポイントが破綻した癌細胞において効果的に細胞死を誘導することができるが、生存した細胞では逆に染色体性不安定性が増大し、癌細胞の形質変化を誘導する可能性があることが示唆された。

The mammalian cell cycle progression is strictly monitored by the checkpoint system to accomplish the faithful DNA replication and chromosome segregation. Therefore, impairment of checkpoint function induces genetic and chromosomal instability that result in the development and progression of malignant tumors. Most of the chemotherapeutic agents are known to activate the checkpoint function and are expected to induce the apoptosis or cell cycle arrest in cancer cells. However, since the checkpoint function is impaired in most of the cancer cell, the activation of checkpoint by the drugs possibly generates critical genetic and chromosomal abnormalities. In this study, we investigated the effect of mitotic checkpoint activation on genomic instability in human cancer cells. We treated human glioma cells with anti-microtubule drugs (AMDs), nocodazole or vincristine. Flow cytometric analysis revealed that nocodazole-treated glioma cells transiently arrested at prometaphase and subsequently exited from mitotic arrest (termed 'mitotic slippage') followed by DNA replication without cytokinesis, resulting in hyperploidy. We found that p53 mutation and/or loss of G1 checkpoint function are crucial factor for the hyperploidy formation after nocodazole treatment. Staurosporine, an inhibitor for a broad range of serine/threonine kinases including cdc2, was found to enhance hyperploidy formation in U251MG cells by accelerating the induction of mitotic slippage. Interestingly, inhibitors specific for cdc2 kinase prevented the G2 to M transition but did not accelerate mitotic slippage, suggesting that staurosporine sensitive kinases other than cdc2 are required for maintenance of spindle assembly checkpoint. Furthermore, we established hyperploidy clones that escaped from cell death after AMD treatment from two glioma cell lines, U251MG and U87MG. The subtractive comparative genomic hybridization (CGH) analysis revealed that clones derived from U87MG had mainly chromosome number changes but that those from U251MG showed both numerical and structural chromosomal changes. Furthermore, numerous aberrations identified in U251MG clones were remarkably chromosome-specific, which may have been due to clonal selection for cells that have an advantage in growth and/or survival. All clones derived from both cell lines had abnormalities in chromosome segregation, and karyotypes of clones were more heterogeneous than those of parental cells, suggesting that clone cells acquired chromosome number instability. AMD therapy may enhance chromosome instability in cells having cell-cycle checkpoint malfunction and induce phenotypic changes in surviving tumor cells.

2. 発表論文リスト

1. Nitta M, Tsuiki H, Arima Y, Harada K, Nishizaki T, Sasaki K, Mimori T, Usio Y, and Saya H
Hyperploidy induced by drugs that inhibit formation of microtubule promotes chromosome instability.
Genes to Cells. 7: 151-162, 2002
2. Tsuiki H, Nitta M, Tada M, Inagaki M, Usio Y, and Saya H.
Mechanism of hyperploid cell formation induced by microtubule inhibiting drugs in glioma cell lines.
Oncogene. 20: 420-429, 2001

3. 謝辞

本研究を行うにあたり御指導、御支援下さいました熊本大学大学院医学研究科腫瘍医学講座 佐谷 秀行教授、同脳神経外科学講座 生塩 之敬教授、並びに両教室の皆様に深く感謝致します。また、研究を遂行するにあたり、山口大学 佐々木功典 博士並びに研究室の皆様に、CGH 法および SKY 法を御指導、御依頼させて頂きました事、北海道大学 多田光宏 博士より、LN382 細胞を、愛知癌センター 稲垣昌樹 博士より、TA22 抗体を、御供与、また使用に伴う御指導頂きました事を厚く御礼申し上げます。

4. 略語一覽

BSA : bovine serum albumin

BrdU : bromodeoxyuridine

CGH : comparative genomic hybridization

CREST : calcinosis cutis、Raynaud's phenomenon、esophagus dysmotility、
scleroderma、telangiectasias

DAPI : 4' - 6-Diamidino-2-phenylindole·2HCl

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

FITC : fluorescence isothiocyanate

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MEF : mouse embryonic fibroblast

PBS : phosphate·buffers saline

PI : propidium iodine

PI3K : phosphatidyl-inositol-3-kinase

SDS : sodium dodecyl sulfate

SKY : spectral karyotyping

Tris : tris(hydroxymethyl)aminomethane

5. 研究の背景と目的

5-1 細胞周期チェックポイント

細胞は細胞周期において、ゲノムの複製と染色体の娘細胞への分配を正確に行うことが必要とされる。これを監視するチェックポイントとよばれるシステムが存在する。チェックポイントの概念はHartwellらにより出芽酵母の研究により提唱された(1)。チェックポイントとは、「細胞周期が回るのに必要な個々の事象が正常に完了することが、次に起こる事象の開始の必要条件になっている場合に、これら2つの事象をつなぐ別の独立した制御機構」と定義されている。すはわち、次の phase に入る前にその phase が完了しているかどうかを監視するシステムである。具体的には DNA に損傷が認められた場合や、染色体の分離が正確に行われえない場合、その他様々な細胞ストレスなどによってチェックポイントが作動し細胞周期が停止する。損傷の修復が終わると、細胞は再び細胞周期が進行するが、修復できなかった場合や損傷が大きい場合は、細胞死が誘導される。チェックポイントの破綻は、遺伝子変異や欠損、増幅、あるいは染色体損傷、異数体などを引き起こし、それらの異常がひいては細胞の癌化につながると考えられている。癌細胞は何らかのチェックポイント異常を有していると考えられている。したがって、癌細胞では遺伝子や染色体の損傷や異常を無視して細胞周期が回ることとなり、致命的異常が生じたものは細胞死が誘導されるが、細胞増殖や生存に有利な遺伝子を獲得した場合は、より悪性な癌へと変異するところが可能となる。

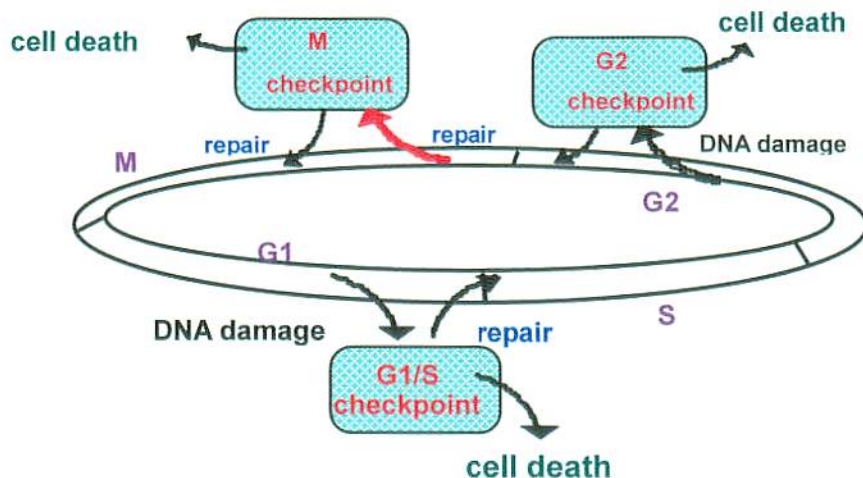


図1：細胞周期チェックポイントの概略

細胞周期には、DNAを複製するS期、細胞分裂するM期があり、その間に間期としてG1およびG2期が存在する。細胞周期は、カーレースに例えることができる。何も問題がなければそのままコースを回りつづけることができるが、損傷が加わると一時的にレースを中断し、ピットに入って修復する。修復が終わると再びレースに復帰できるが、損傷が大きければリタイヤすることになる。

5-2 抗癌剤とチェックポイント

化学治療に用いられる薬剤は、癌細胞を正常細胞に比べて有意に殺す効果をもつ物質をスクリーニングする過程で得られたものが多い。結果的にスクリーニングで選ばれた抗癌剤は細胞周期チェックポイントを活性化する（チェックポイント作動性）薬剤（分子）であることが分かってきた。

抗癌剤による細胞死のメカニズムは、1) チェックポイントが作動することによって起こる細胞死（アポトーシス）、2) チェックポイント非依存性に誘導される細胞死に分けることができる。ほとんどの癌細胞はチェックポイント異常を有しているので、抗癌剤で処理された癌細胞は、チェックポイントを乗り越えることによって細胞死が誘導されるが、一部の癌細胞は細胞死を逃れて表現形を変えた細胞として生存する可能性があると考えられる。

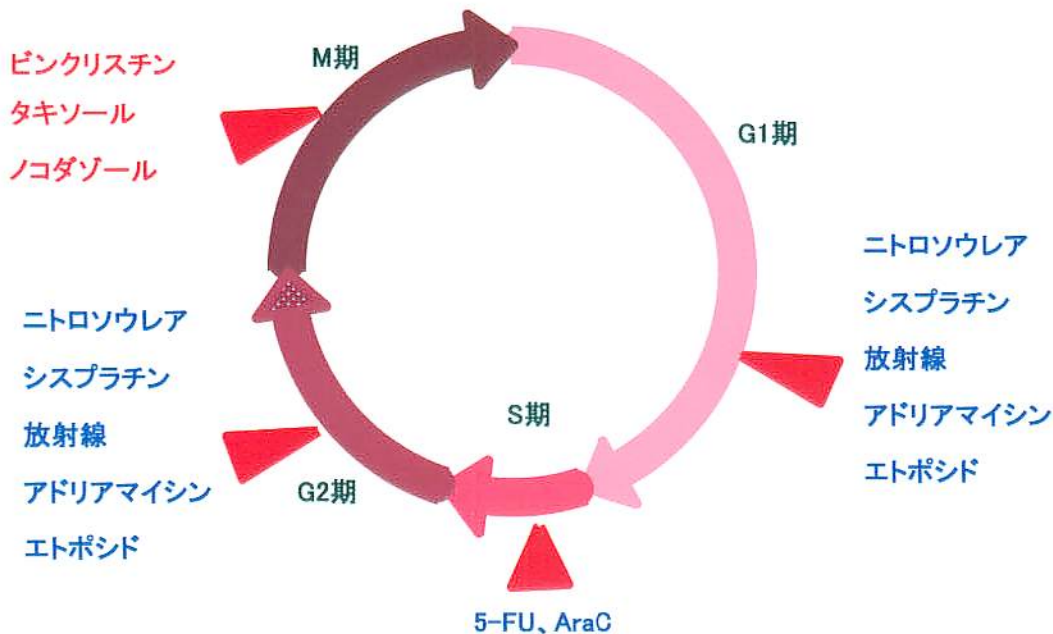


図2: 抗腫瘍剤の細胞周期作用ポイント

抗腫瘍剤の多くが細胞周期チェックポイントをターゲットとしていることが分かってきた。DNA損傷を与えるような薬剤はG1およびG2期を、DNA複製を阻害する薬剤はS期を、微小管を阻害する薬剤はM期をそれぞれターゲットとしている。

5-3 紡錘体チェックポイント

分裂期は1) prophase: 二極の中心体(centrosome)を結ぶ紡錘糸(mitotic spindle)が形成され、2) prometaphase: 染色体の凝集が起こり、3)

metaphase : 1 対の染色体が紡錘糸と付着し赤道面上に並び、 4) anaphase : 染色体が両極に引っ張られ、 5) telophase : 核膜の再構成が起こり、細胞質分裂が終了して 2 つの細胞となる、という一連の過程が正確に遂行される、極めてダイナミックな時期である。Prometaphase~metaphase にかけて、両極の中心体から伸びたスピンドルは、各染色体のセントロメア部分の動原体に付着し、染色体を両極に引っ張るが、動原体へのスピンドルへの付着およびスピンドルの張力をモニターしているのが紡錘体チェックポイントである(2)。スピンドルの形成不全や、張力不足、あるいはスピンドルを形成する微小管の重合や脱重合を阻害する薬剤などによって、紡錘体チェックポイントが惹起されることが知られている。紡錘体チェックポイントの破綻はすなわち多倍体や異数体を引き起こすことになる。微小管阻害剤（タキソール、ビンクリスチンなど）は、紡錘体チェックポイントをターゲットとする薬剤であり、実際抗癌剤として広く用いられている。

5-4 癌細胞と hyperploidy

多くの固形癌は、hyperploidy を含む染色体数の異常 (aneuploidy) を有していることが知られている。このような染色体数の異常は、癌の悪性化や転移に深く関わっていると考えられている。特に、グリオブラストーマでは高頻度に多核細胞や巨核細胞が観察され、また染色体解析においてもおおくが hyperploidy であることが知られている。しかしながら、癌細胞において、hyperploidy がどのようなメカニズムで形成あるいは維持されるかはよく分かっていない。可能性として、S 期あるいは G2 期から分裂期に入らずに DNA 複製を行う場合ことによって(endoreduplication)、あるいは分裂期における染色体分離や細胞分裂がうまく起こらないまま分裂期を脱することによって生じると考えられている(3)。最近、p53 の異常と hyperploidy が相関する(4)、あるいは p53 ノックアウトマウスの繊維芽細胞において tetraploidy が増加するといった報告が散見され(5)、hyperploidy の形成における p53 の関与が示唆されている。また、癌細胞において hyperploidy であることがどのような生物学的意義を持つのかも明らかではない。すなわち、hyperploidy は癌の悪性化の結果であるのか、hyperploidy になることが悪性化の原因であるのかは未だよく分かっていない。

5-5 微小管阻害剤による hyperploidy 形成と mitotic slippage

近年、癌細胞において、種々の抗癌剤や kinase inhibitor により hyperploidy が誘導されることが分かってきた(6, 7)。タキソールやビンクリスチンといった微小管阻害剤で処理された細胞は、紡錘体チェックポイントが活

性化されるため分裂期に停止するが、それが遷延すると細胞分裂しないまま分裂期を終了し、これは‘mitotic slippage’あるいは‘adaptation’と呼ばれている(8, 9)。その結果、癌細胞は新たな DNA 合成を行うために hyperploidy が生じると理解されている (図 3)。最近、広範囲な kinase inhibitor である、staurosporine によって、ノコダゾール処理にて M 期に停止した細胞が速やかに mitotic slippage を生じるという報告があり(7)、staurosporine の紡錘体チェックポイントの関与が強く示唆される。しかしながら、staurosporine による mitotic slippage の分子メカニズムは明らかにされていない。また、微小管阻害剤による殺細胞効果のメカニズムはよく分かっていないが、癌細胞では、微小管重合阻害処理後、mitotic slippage により hyperploidy になることで細胞死が誘導されるという報告が散見される(10, 11, 12)。

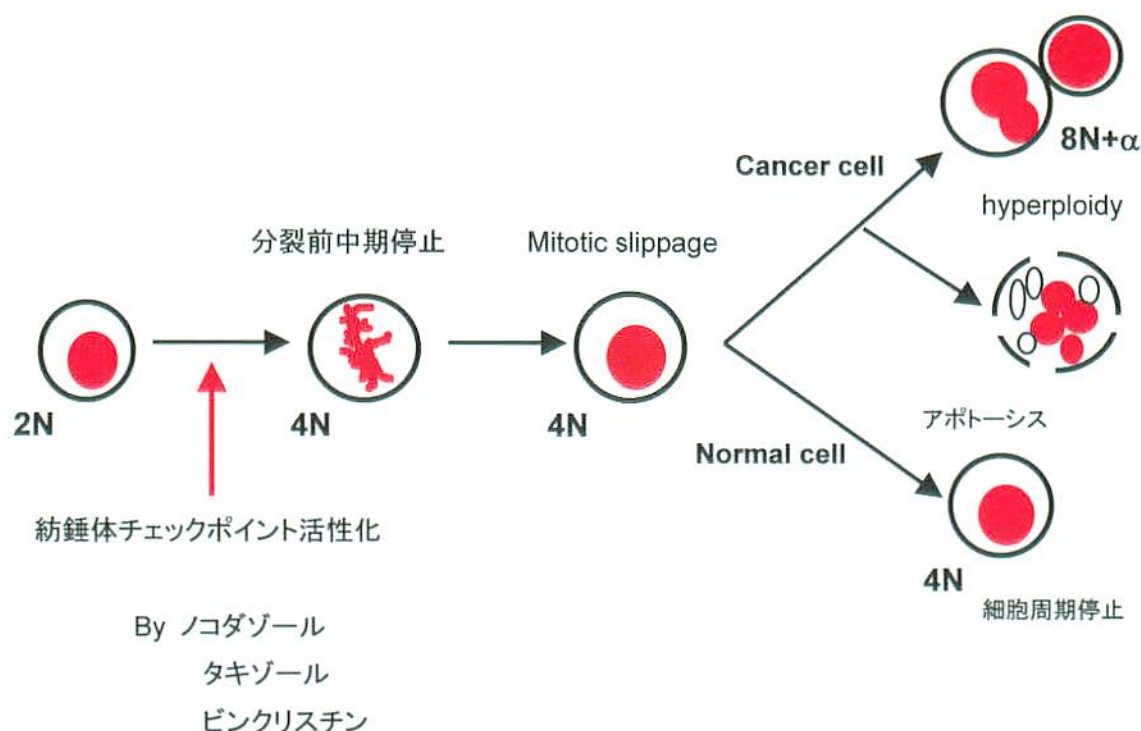


図3: 紡錘体チェックポイント遷延によるhyperploidyの形成

微小管阻害剤(anti-microtubule drug[AMD])で処理された細胞は、分裂前中期に停止する。しかしそれが遷延すると分裂中期停止を維持できず、細胞質分裂しないまま、G1期にはいる。正常細胞はそこで停止するが、癌細胞はhyperploidyとなる。

5-6 p53 と紡錘体チェックポイント

p53 は、‘ゲノムの守護神’とも言われているように、最も代表的な癌

抑制遺伝子の一つであり、DNA 損傷 (X 線、UV) だけでなく、細胞における様々なストレスに対して活性化され、転写因子として p21 などの kinase inhibitor や bax などのアポトーシス遺伝子の転写を活性化し、G1/S および G2 チェックポイントおよびアポトーシスにおいて極めて重要な役割を果たしている。

最近、マウスの繊維芽細胞を用いた研究で、p53 の不活化が微小管重合阻害剤であるノコダゾール処理による hyperploidy が形成に重要な役割を持つことが示された(9,13)。また、ノコダゾール処理にて M 期に停止した後、mitotic slippage にて G1 期に入った際に p53 が活性化することが報告されている(14)。このことは、紡錘体チェックポイントの活性化に引き続いて起こる G1/S チェックポイントがゲノムの安定性に深く関わっていることを強く示唆する。実際、p53 の異常と染色体不安定性は強く相関すると考えられている(15)。しかしながら、hyperploidy が癌細胞の悪性化の結果であるのか、あるいは hyperploidy が悪性化の原因となるのかは、いまだ明らかにされていない。

5-7 本研究の目的

hyperploidy を一つの特徴とする悪性脳腫瘍において、p53 を含む G1/S チェックポイント機能が hyperploidy の形成にどのように関わっているかを検討した。また、微小管阻害剤処理後の mitotic slippage における cdc2 活性の関与を検討した。さらに、微小管阻害剤によって生じる hyperploidy が癌細胞にとって生物学的にどのような意義を持っているのかを検討した。

実験方法

6-1 細胞培養

全ての培養細胞は RPMI1640 培地、DMEM F-12 培地(いずれも GIBCO BRL 社)に最終濃度 10%の牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum, BLOWITTAKER 社)と抗菌剤(100U/ml の penicillin, 100U/ml の streptomycin, いずれも GIBCO BRL 社)を加えたもので、37°Cの 5% CO₂培養器にて継代培養した。実験には、WI38 細胞、MRC-5 細胞 (いずれもヒト正常繊維芽細胞)、U87MG 細胞、U251MG 細胞、LN382T 細胞 (いずれもヒトグリオーマ細胞)を使用した。

6-2 フローサイトメトリー

細胞周期の解析には、FACScan (Becton Dickinson 社)を用いたフローサイトメトリー法を行った。解析は Cell Quest ソフト (Becton Dickinson 社)を使用した。各培養細胞を 35mm あるいは 60mm culture dish で 24 時間培養後、各種薬剤で処理した。細胞は、トリプシン/EDTA にて回収後、PBS にて洗浄し、70%エタノールで固定した。固定後、細胞を PBS で洗浄し、RNase A (100 μ g/ml) にて 30 分間処理後、propidium iodine (PI: 25 μ g/ml) で 5 分間染色した。分裂期の細胞の検出には、1 次抗体として TA22 モノクローナル抗体で 1 時間処理後、PBS で洗浄し、2 次抗体には fluorescein をコンジュゲートした抗ラット IgG を用い 1 時間処理した。BrdU の取り込みの検出には、細胞を回収する前に BrdU (1 μ M) で 30 分間処理した。細胞を固定後、4N HCl で 15 分間処理し DNA を denature し、fluorescein をコンジュゲートした抗 BrdU 抗体 (Becton Dickinson 社) で 1 時間処理した。

6-3 免疫染色

細胞を Labtec chamber(Nalge Nunc 社)あるいは 35mm dish で培養し、各種処理後、4%パラホルムアルデヒドで 15 分間固定し、0.2% Triton X - 100 で 5 分間処理した。PBS で洗浄後、細胞を各種抗体で室温にて 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、1 次抗体に適応する FITC 標識 2 次抗体にて 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、PI にて核を染色し、80%グリセロールでマウントした。観察には Olympus 社の共焦点レーザー顕微鏡を用い、画像処理は Fluoview を用いた。

6-4 ウェスタンブロット

p21、cyclin B および Rb 蛋白の解析に、ウェスタンブロットを用いた。等量 (10 μ g) の細胞抽出液を SDS 化した後、15%、12%あるいは 6%のポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、ニトロセルロースメンブレンに 140mA で

1.5 時間転写した。メンブレンを 5% スキムミルクを含む PBS にてブロッキングし (over night)、0.03% Tween 20 を含む PBS で 1000 倍希釈した抗 p21 抗体、抗 Rb 抗体および抗 cyclin B 抗体にて室温で 1 時間反応させた。0.3% Tween 20 を含む PBS で 3 回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗マウス 2 次抗体にて、室温で 1 時間反応させた。洗浄後、Amersham 社の ECL 化学蛍光発色システムを用いて、各蛋白の発現を調べた。

6-5 染色体解析

各細胞株を 10cm dish にて培養し、コルセミド (1 μ M) で 3 時間処理した。トリプシン/EDTA にて回収後、PBS にて洗浄し、低張液 (0.075M KCl) にて処理した (37 $^{\circ}$ C、30 分)。その後、カルノア液 (メタノール: 酢酸=1:3) にて固定し、スライドガラス上に滴下した後、蒸気固定を行った。ギムザ染色を行った後、封入剤にて封入し、光学顕微鏡にて観察し染色体数を調べた。

6-6 Comparative Genomic Hybridization (CGH) 法

U87MG および U251MG の親株、各クローン細胞、およびヒト正常リンパ球のゲノム DNA は DNA 抽出キット (セパジーン: 三光純薬社) を用いて抽出した。腫瘍細胞の DNA は Spectrum Green-dUTP (Vysis 社) で、正常細胞の DNA は Spectrum Red-dUTP にてニック・トランスレーション法にてラベルした。ラベルした各 DNA (200ng) を Cot-1 DNA (10mg) と共に正常分裂中期染色体上でハイブリダイズさせた (48 時間、37 $^{\circ}$ C)。その後、染色体を 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI: 0.15mg/ml) で染色した。画像イメージは、BX50 fluorescence microscope (オリンパス社) にて、100X UplanApo 対物レンズ、CCD カメラ (SenSys1400, Photometrics 社) を用いて取り込み、DIA システム (QUIPSTM XL, Vysis 社) にて解析を行った。少なくとも 5 回の画像を平均して average fluorescence ratio を作成し、tumor / reference ratio が 1.2 以上を gain、0.8 以下を loss と定めた。Subtractive CGH には、reference として各細胞株の親株の DNA を用いた。繰り返し配列は、Cot-1 DNA にてブロックした。

6-7 Spectral Karyotyping (SKY) 法

クローンにおける染色体構造異常を調べるため、Spectral Karyotyping (SKY) 法を用いた。U87MG および U251MG の各クローン細胞および親株細胞の染色体展開スライドを 6-5 で述べた方法にて作成した。染色体を 5 種類の蛍光 (Spectrum Orange, Texas Red, Cy5, Spectrum Green, Cy5.5) およびその組み合わせにてプローブし、DAPI にて染色した。検出は ASI 社の SKY 検出キッ

トを用いて行い、解析は、同社の分光システム SD200 にて行った。

6-8 Cdc2 kinase assay

cdc2 蛋白のキナーゼ活性の測定には、Promega 社の SignaTECT cdc2 protein assay system を用いた。回収した細胞を、TNN buffer (50mM Tris pH 7.4、150mM NaCl、0.5% NP-40、protease inhibitor) で可溶化し、biotin 化した cdc2 特異的ペプチドおよび $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ と共に 30°C の条件で 10 分間インキュベートした。ラジオリラベルされた substrate を streptavidin matrix (SAM™ biotin captured membrane) に反応させた。Scintillation counter にて活性を測定した。

結果)

7-1 Antimicrotubule drug (AMD)による hyperploidy の形成

ヒトグリオーマ細胞株 U251MG をノコダゾール(100ng/ml)で処理し、細胞周期の変化を調べるため、蛍光顕微鏡で細胞形態を観察したところ、18 時間後ではほとんどの細胞がクロマチンの凝縮が観察され、分裂期 (prometa phase) に集積していたが、60 時間後ではほとんどの細胞で核膜の再構成が起こっていた (図 4A)。またこの時の mitotic Index を調べたところ、約 24 時間でピークを迎えた後、経時的に速やかに減少した (図 4B)。以上より、U251MG ではノコダゾール処理にて一時的に分裂期に停止するが、時間が経つとそれを維持できずに分裂期を終了することが示された。次に、U251MG およびヒト正常繊維芽細胞である WI38 を、ノコダゾールおよびビンクリスチン (data not shown) にて処理し、細胞周期の変化をフローサイトメトリーにて解析した。WI38 はノコダゾール処理後、G1 期および G2/M 期に停止したままであった (図 5)。一方 U251MG は、24 時間後では分裂期に停止していたが、72 時間後では、多数の 8N の細胞が出現していた。以上より、U251MG では、ノコダゾール処理によって一時的に分裂期に停止するものの、それを維持できずに G1 期に入り、hyperploidy となることが示された。

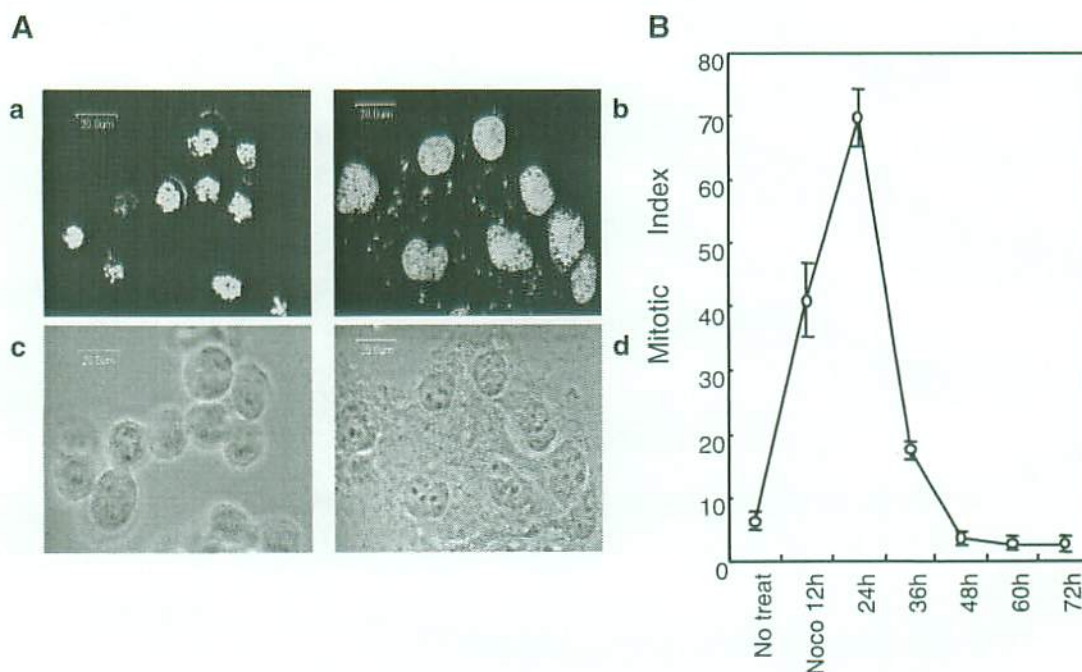


図4: U251MGにおける、nocodazole処理によるM期停止とmitotic slippage

U251MGをnocodazole (50ng/ml) で処理した。A) 18時間後 (a, c) および60時間後に細胞を固定し、共焦点顕微鏡にて観察した。DNAはPIで染色した (a, b)。c, dは位相差レンズによる観察。 B) 細胞を各時間で回収し、核をPIで染色して顕微鏡下にM期の細胞の割合を数えた。

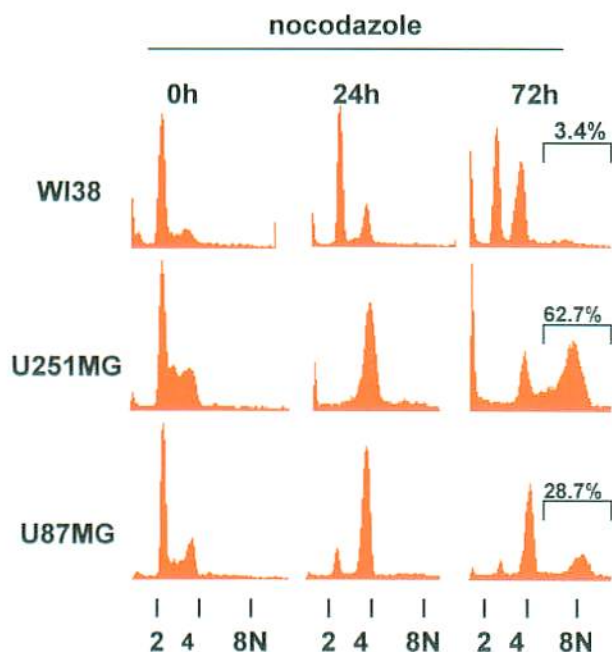


図5： FACSscanによる、グリオーマ細胞株におけるnocodazole処理による細胞周期変化の検討

WI38、U251MGおよびU87MGをnocodazole（100ng/ml）で処理し、細胞を回収、固定後核をPIで染色して、細胞周期の変化をFACSscanにて観察した。DNA contentをx軸に、細胞数をy軸に示している。G1期のDNA contentを2Nに合わせた。

7-2 Mitotic slippage 後の DNA 合成による hyperploidy 形成

次に、ノコダゾール処理後の hyperploidy の形成が、新たな DNA 合成によるものかどうかを調べるため、ノコダゾール処理された細胞の BrdU 取り込みをフローサイトメトリーにて観察した。未処理の細胞では S 期の細胞は、2N と 4N の間に BrdU の取り込み陽性群として観察される（図 6A）。ノコダゾール処理後 24 時間以降において WI38 では BrdU の取り込みは観察されなくなったのに対し、U251MG では 4N と 8N の間に BrdU の取り込みが見られ（図 6A）、mitotic slippage 後に新たな DNA 合成が生じていることが分かった。また、Histone H3 の 28 番目のセリンのリン酸化を認識し、M 期クロマチンの特異的に認識することができる TA22 抗体を用いて(16)、ノコダゾール処理後の細胞周期変化をフローサイトメトリーにて観察した。未処理の細胞では、M 期の細胞は 4N のところに TA22 陽性細胞が観察される（図 6B）。ノコダゾール処理後 72 時間では、U251MG では 8N のところに TA22 陽性細胞群が観察され（図 6B）、mitotic slippage 後 DNA 複製を行い、さらに次の M 期に入っていることが分かった。

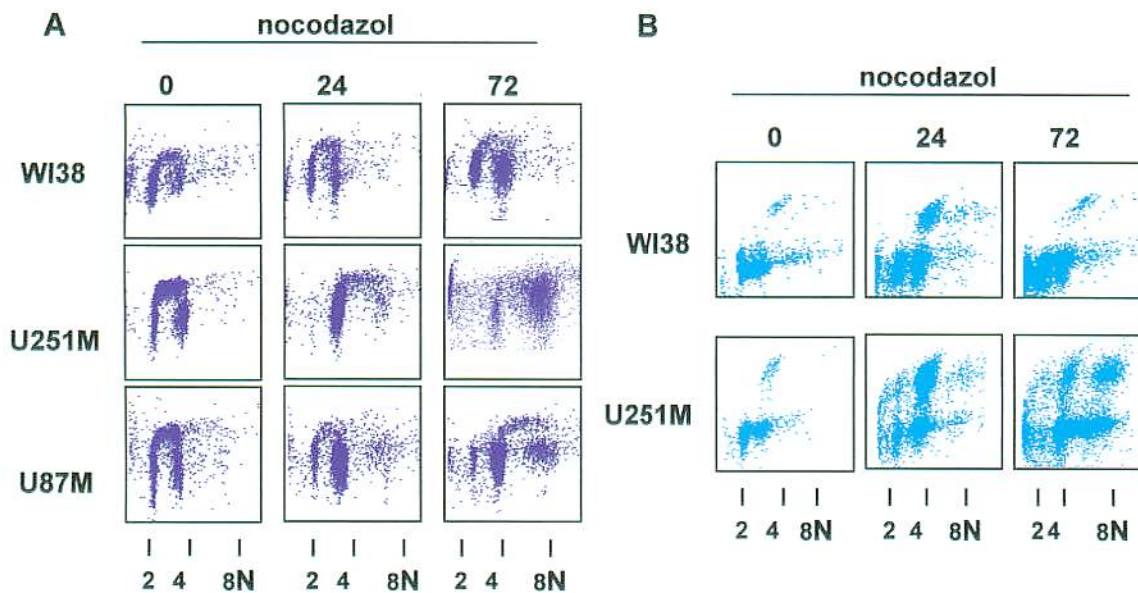


図6： FACSscanによる、nocodazole処理によるhyperploidyの形成がDNA合成によるものかどうかの検討

WI38、U251MGおよびU87MGをnocodazole (100ng/ml) で処理し、細胞周期の変化をFACSscanにて解析した。DNA contentをx軸に、BrdU(A)およびTA22(B)の蛍光強度をlog scaleにてy軸に示した。

7-3 AMD 処理後の hyperploidy の形成における p53 の役割

Nocodazole で処理された細胞が hyperploidy となることは、すでに 95 年に p53 deficient MEF を用いた実験で示されている(13)。我々は、ノコダゾール処理後の hyperploidy 形成に p53 がどのように関わっているかを調べるため、温度感受性 p53 変異を持つヒトグリオーマ細胞株、LN382T を用いた。この細胞株は、p53 遺伝子のコドン 197 の Valine が Leucine に変異しており、37°C で培養すると p53 は mutant として機能するが、34°C で培養すると p53 が wild type として機能する(17)。このメカニズムは明らかではないが、おそらく温度によって conformation change が生じると考えられている。温度変化によって確かに p53 が wild type として機能するかを確かめるため、LN382T 細胞を 37°C から 34°C に変えて培養すると、細胞周期は G1 および G2 期に停止し (図 7A)、p21 蛋白量が経時的に上昇した (図 7B)。次に、p53 によって hyperploidy の形成を抑制できるかを検討するため、LN382T を S 期

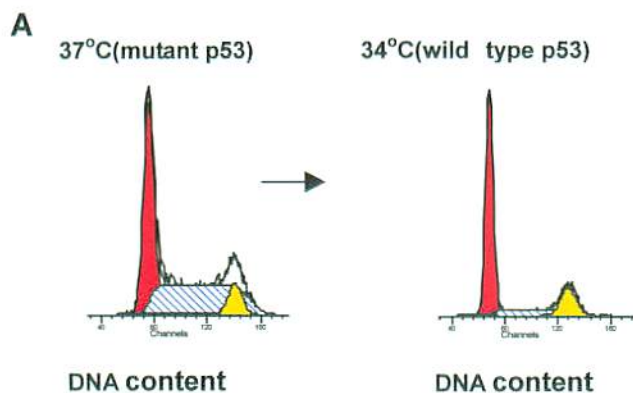


図7： 温度感受性 p53 変異株 LN382Tにおける、温度変化による細胞周期変化とp21発現の検討

LN382Tの培養条件を37°Cから34°Cに変化させ、細胞周期の変化をFACScanで (A)、p21蛋白の発現をwestern blotにて検討した (B)。

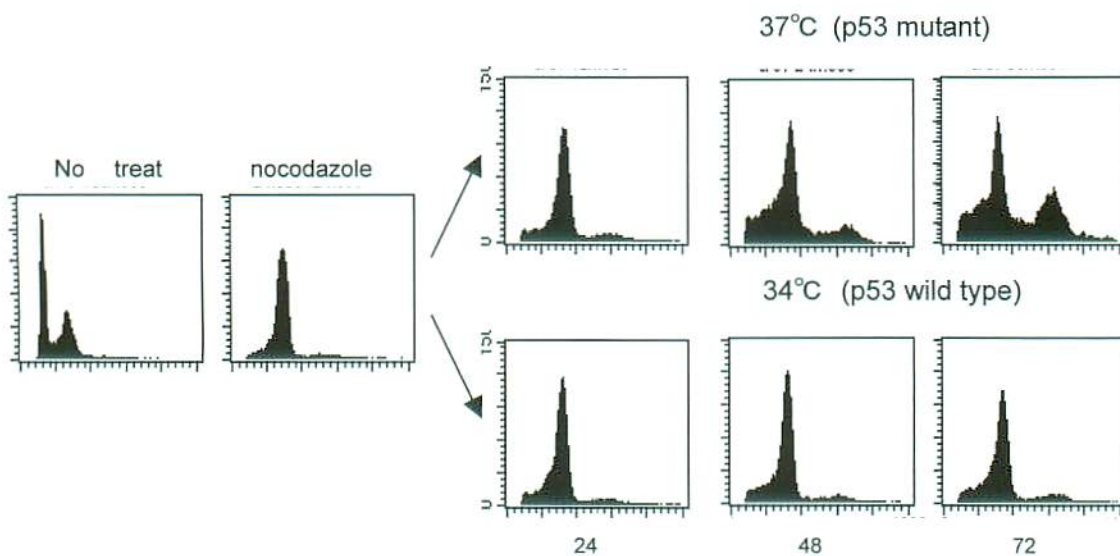


図8： p53によりノコダゾール処理後のhyperploidy形成が抑制されるかの検討

U251MGをaphidicolinでS期に同調させた後、nocodazole (50ng/ml)で処理し、12時間後より34°Cおよび37°Cにて培養を継続した。細胞を各時間で回収、固定し、核をPIで染色して細胞周期変化をFACScanにて解析した

に同調させた後、ノコダゾールで処理し、34℃および37℃で培養して、細胞周期の変化をフローサイトメトリーで解析した。その結果、図8に示す通り、37℃では、8Nの細胞群が多数出現したのに対し、34℃では、8N細胞群はほとんど出現しなかった。以上より、wild typeのp53はノコダゾール処理後のhyperploid形成を抑制することが示された。

ここで、p53の発現がmitotic slippageに影響を及ぼしている可能性、すなわちp53がmitotic slippageを抑制する可能性が否定できないため、LN382をノコダゾールで12時間処理後、37℃および34℃で培養を続け、mitotic indexの推移を観察した。その結果、p53のstatusに関わらずmitotic indexは同様に減少し(図9)、p53はmitotic slippageには直接関与していないと考えられた。

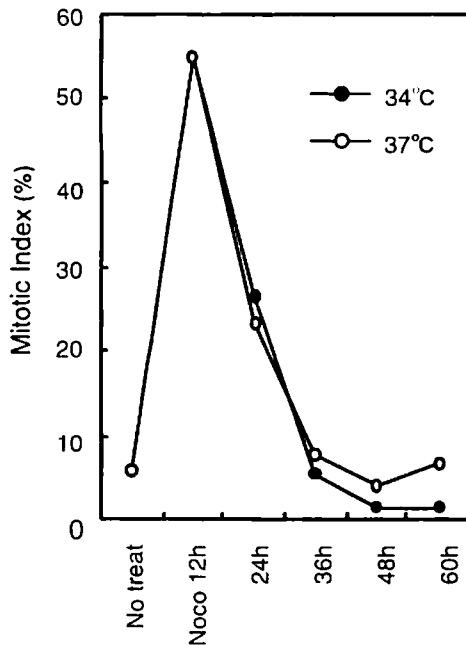


図9 : p53がnocodazole処理後のmitotic slippageに影響するかの検討

LN382TをaphidicolinにてS期に同調させ、その後nocodazoleで処理した。12時間後にそれぞれの温度条件に変え、経時的なmitotic indexの変化を調べた。

7-4 G1/S チェックポイントの破綻がAMD処理後のhyperploidyを引き起こす。

次に、p53の不活化のみがAMD処理後のhyperploid形成に関わっているかを調べるため、wild typeのp53を発現しているヒトグリオーマ細胞株であるU87MGを用いてノコダゾール処理後の細胞周期変化をU251MGの時と同じように解析した。その結果、ノコダゾール処理によってhyperploidyが出現したが(図5)、その程度(28.7%)はU251MGに比べ少なかった。U251MGはp53がmutantであり、U87MGはwild typeのp53を発現しているが、p16 locusの欠失があるため、p14を発現しない。p14が機能しないとmdm2によるp53蛋白の分解を十分に抑制することができず、p53依存性のG1/Sチェックポイントが完全には機能しないと考えられている(18)。U87MGおよびU251MGの

G1/S チェックポイント機能を調べるため、各細胞を DNA 二重鎖損傷を与える抗癌剤であるアドリアマイシンで処理し、細胞周期変化をフローサイトメトリーにて解析した。その結果、図 10 に示す通り、正常細胞ではアドリアマイシン処理にて細胞周期は G1 および G2 期に停止するが、U251MG は完全に G1/S チェックポイントが破綻しており、G2 期に停止していた。一方 U87MG は G1 期停止した細胞群も観察され、G1/S チェックポイントは部分的に保たれていた。以上より、p53 不活化だけでなく、G1/S チェックポイントの破綻が AMD 処理後の hyperploid 形成に関わっていると考えられた。

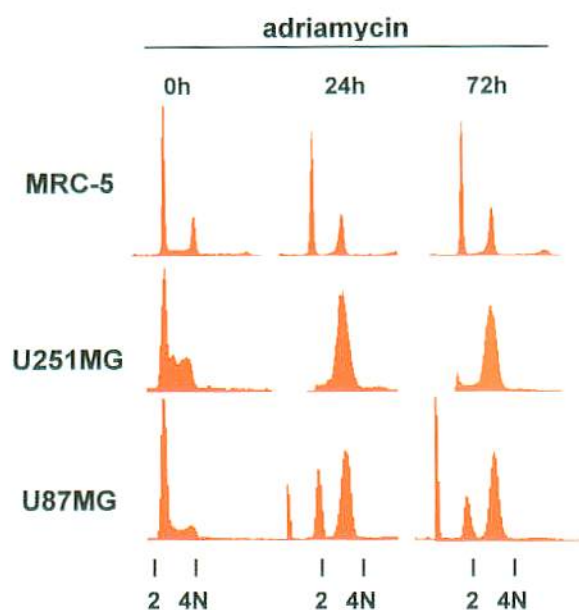


図10： U87MGおよびU251MGにおけるG1/Sチェックポイント機能の検討

各細胞を、adriamycin (100ng/ml) で処理し、細胞周期の変化をFACScanにて解析した。X軸にDNA量を、y軸に細胞数を示した。MRC5では、G1、G2期で停止しているのに対し、U87MGでは部分的に、U251MGでは完全にG1期停止が起こらない。

7-5 Staurosporine は AMD 処理後の mitotic slippage を促進する

次に、mitotic slippage を制御する分子メカニズムについて検討した。staurosporine は broad spectrum な protein kinase inhibitor である。Staurosporine の target には cdc2 も含まれており、ノコダゾール処理で M 期に停止した細胞を staurosporine で処理すると、hyperploidy が生じることが報告されている(Hall, et al. 1996)。

まず、グリオーマ細胞株において staurosporine が mitotic slippage を促進するかどうかを調べるため、U251MG をノコダゾールで処理し、12 時間後に staurosporine を培養上清に加え mitotic index の変化を調べたところ、速やかに mitotic index は減少した (図 11)。Staurosporine 処理の 2 時間後に細胞を固定し、蛍光顕微鏡で細胞形態を観察すると、細胞は速やかに底面に再付着し、核膜の再構成およびクロマチン凝集の消失が観察され、これは図 4 に示した mitotic slippage と同様の所見であった。さらに、図 12 に示すように、staurosporine 処理によって hyperploidy の形成は促進された。

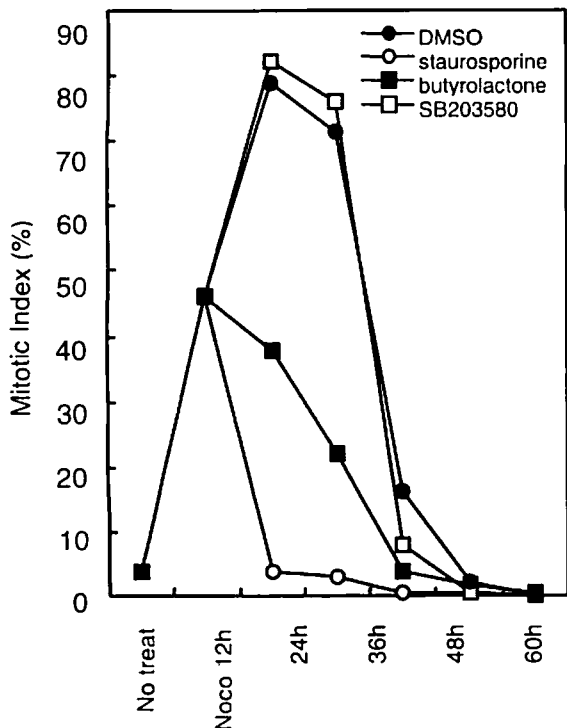
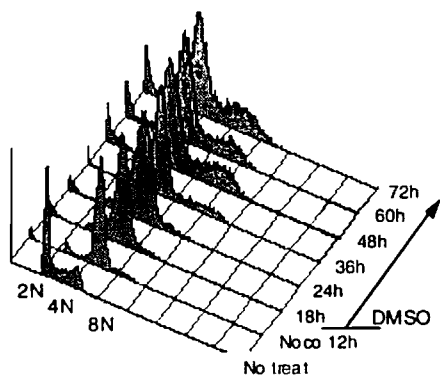
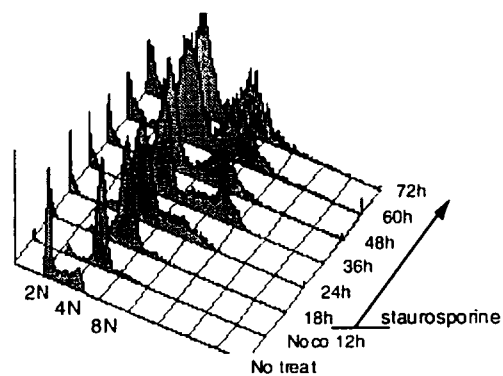


図11: staurosporineによるnocodazole処理後のmitotic slippageの促進作用の検討

U251MGをnocodazole (50ng/ml)で処理し、12時間後に各種薬剤をmedium中に加え、経時的なmitotic indexの変化を調べた。
 (staurosporine: 100nM, ○、
 butyrolactone: 50μM, ■、SB203580: 20μM, □、DMSO: ●)



Nocodazole with DMSO



Nocodazole with staurosporine

図12: staurosporineによるnocodazole処理後のhyperplod形成の促進作用の検討

U251MGをnocodazole (50ng/ml)で処理し、12時間後にstaurosporine (100nM)をmedium中に加えた。各時間に細胞を回収、固定し、核をPIで染色して、細胞周期の経時的变化をFACScanにて解析した。

次に、staurosporineによるmitotic slippageの促進作用を生化学的にとらえるため、ノコダゾール処理によるcyclin B蛋白量およびRB蛋白のリン酸化状態の経時的变化がstaurosporine処理によってどのような影響を受けるかを検討した。細胞周期において、cyclin BはG2期からM

期に特異的に上昇し、RB 蛋白は M/G1 移行時に脱リン酸化されることが知られている。ノコダゾール処理によって、cyclin B 蛋白量および RB 蛋白のリン酸化フォームは 18 時間後をピークに上昇した後、経時的に減少するが、12 時間後に staurosporine で処理すると両者共に速やかに減少し、RB の脱リン酸化フォームが増加した (図 13)。これらの結果より、U251MG において、staurosporine は AMD 処理後の mitotic slippage を促進させ、その後の hyperploidy 形成をも促進することが示された。

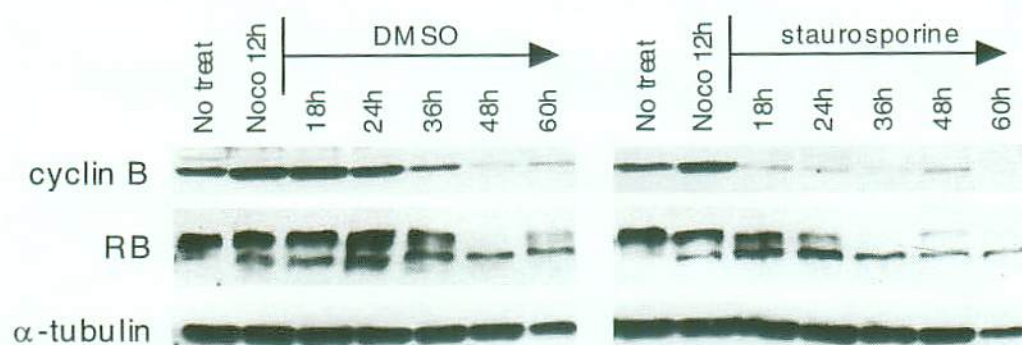


図13 : staurosporineによるnocodazole処理後のcyclin B蛋白量およびRBリン酸化状態の変化の検討

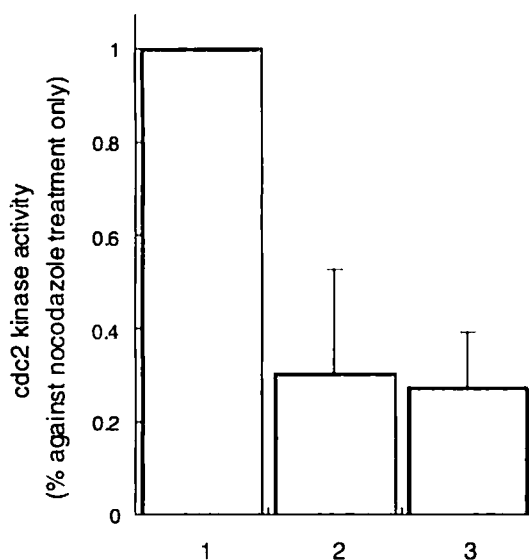
U251MGをaphidicolinにてS期に同調させた後、nocodazole (50ng/ml)を加えた。12時間後にstaurosporine (100nM)あるいはDMSO (control)をmedium中に加えた。各時間帯に細胞を回収し、SDS化した後western blotにて蛋白量を検討した。

7-6 Mitotic slippage には Cdc2 活性の低下は関与しない。

分裂期の進行に cyclin B/cdc2 の活性が重要であることは周知の事実であり、分裂期の終了と共に、cyclin B/cdc2 の活性が低下することもよく知られている。そこで、staurosporine による mitotic slippage の促進作用は cdc2 活性を抑制することによるものなのかどうかを検討した。U251MG をノコダゾールで処理した後、12 時間後に staurosporine および cdc2 の特異的 inhibitor である butyrolactone を加え、cdc2 活性の抑制効果および mitotic index の経時的变化を調べた。その結果、図 14 に示すように、staurosporine および butyrolactone は共に cdc2 活性を同様に抑制した。しかしながら、butyrolactone 処理によって、その後の M 期への集積は抑制されたが、staurosporine 処理時の様な mitotic index の速やかな減少は見られなかった (図 11)。従って、cdc2

活性の抑制は、G2 期から M 期への移行を押さえることは出来ても、mitotic slippage を促進させる作用はないと考えられた。その他の分裂期に関わっているキナーゼである、p38、MAPK、PI3K の各阻害剤である、SB203580、PD98059 および LY294002 を、ノコダゾール処理した U251MG に作用させても、staurosporine 処理時のような mitotic slippage 促進作用は見られなかった。以上より、staurosporine は、cdc2、p38、MAPK、PI3K 以外のキナーゼを抑制することによって分裂期を解除していると推測された。

図 14 : staurosporine および butyrolactoneによるnocodazole処理でM期に停止した細胞のcdc2活性抑制の検討



U251MGをaphidicolinでS期に同調させた後、nocodazoleで処理し、12時間後に各薬剤をmediumに加えた。6時間後に細胞を回収し、cdc2活性はSignaTECT cdc2活性測定システムを用い、histone H1を基質にして測定した。結果は、DMSOを加えた時の活性を100%として、各薬剤処理時のcdc2活性をグラフ化した。

1. nocodazole 処理
2. nocodazole + staurosporine 処理
3. nocodazole + butyrolactone処理

7-7 ノコダゾール処理によって hyperplod となり生存した細胞のクローニング

過去の報告では、AMD 処理で処理された細胞は hyperplod になることで、細胞死が誘導されると言われている(10,11,12)。Glioblastoma を含む多くの悪性固形癌が hyperplod を一つの特徴とし、また DNA ploidy の変化が大きい癌細胞ほど悪性度が高いといった報告が見られる。我々は、hyperplod が持つ生物学的意義、すなわち癌細胞にとって hyperploidy は悪性化の結果であるのか、あるいは hyperploidy が悪性化の原因となるのかを検討するため、AMD 処理によって hyperplod となって生存した細胞のクローニングを行った。U87MG および U251MG 細胞を、ノコダゾール (500ng/ml) あるいはビンクリスチン (1μM) で 72 時間処理後、薬剤を除いた medium で培養を続けた。ほとんどの細胞は細胞死に至ったが、一部生存した細胞がコロニーを形成したので、そ

れらを pick up し継代した。

クローン細胞の DNA ploidy をフローサイトメトリーで調べると、親株を 2N base とした時、クローンはいずれも 4N base であり、クローン細胞は hyperplod の状態で増殖していることが分かった (図 15A)。細胞形態を蛍光顕微鏡で観察したところ、親株は比較的丸く、小さな核を有しているのに対し、クローンでは多核や分葉核、巨核といった形態異常が観察され、この形態は培養を続けても変化しなかった (図 13B)。細胞の増殖率は、ややクローンの方が遅かったが、有意差はなかった。

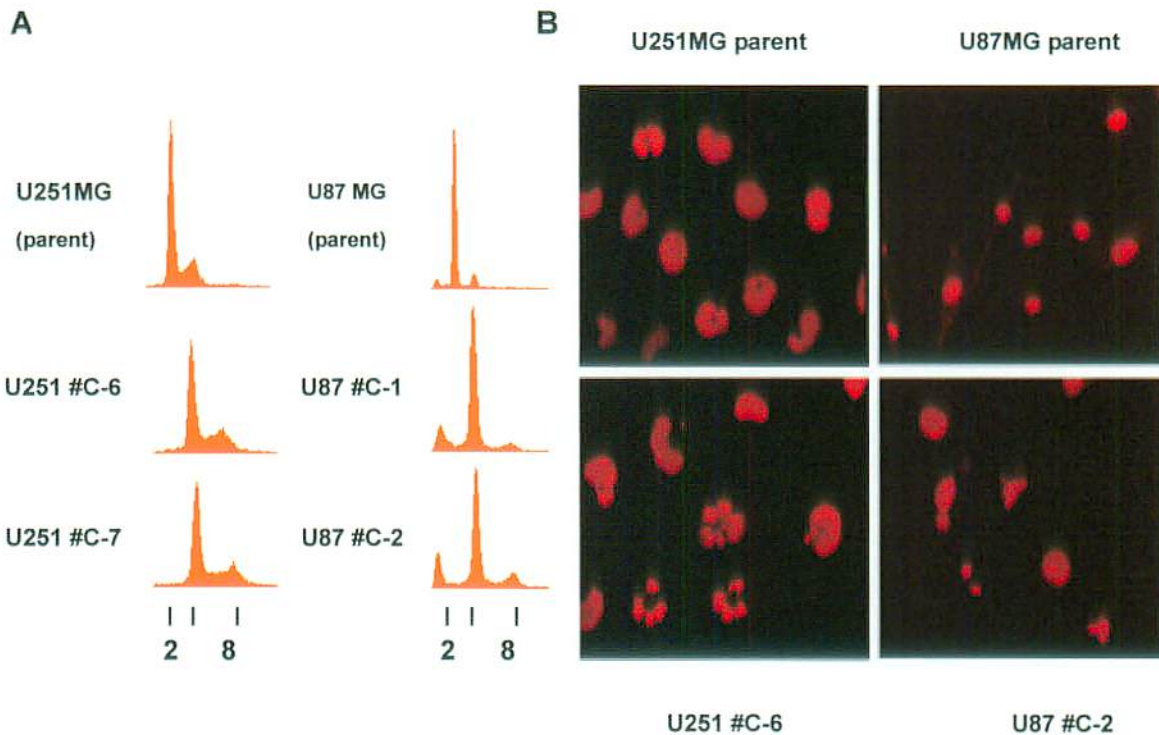


図15： nocodazole処理後、生存したクローン細胞のDNA contentおよび細胞形態の観察

各細胞を、35mm dishあるいはLabtec chamberで培養した。A: 細胞を回収後、70% ethanolで固定し核をPIで染色し、DNA contentをFACScanで解析した。各親株のG1期のDNA contentを2Nに合わせた。B: 細胞を4% paraformaldehydeで固定し、核をPIで染色し、細胞形態を共焦点顕微鏡で観察した。

7-8 CGH法によるクローン細胞の染色体解析

次に、hyperploid となったクローン細胞が単に染色体が倍加したものなのか、染色体変化を伴ったものなのかを調べるため、CGH法を用いた染色体解析を行った。図16 A, Bに示す通り、U251MG および U87MG の親株自体が、いくつかのコピー数の変化を示していた。我々は、親株とクローン間に生じた染色体変化を直接比較するために、subtractive CGH法を用いた。Subtractive CGH法は、正常リンパ球 DNA の代わりに親株の DNA を reference として用いることにより、クローンにおけるコピー数の異常と親株におけるコピー数の異常の差を直接とらえることが可能である。その結果、U87 クローンでは、親株と比較してコピー数の変化がほとんどなかったのに対し、U251 クローンでは、著明なコピー数の増減が観察された(図16 C, D, 図17)。その変化は染色体全体の増減だけでなく、構造変化も伴っており、しかも5つのクローンで、共通の



図16: CGH法によるクローン細胞の染色体変化の検討

A: U87MGのCGHファイル。Chromosome 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 18, 20およびXにcopy number変化を示した。 B: U251MGのCGHファイル。Chromosome 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 22およびXにcopy number変化を示した。 C: U87 #clone1と親株間のsubtractive CGHファイル。親株と比較して、2ヶ所の変化しか認められなかった。 D: U251 #clone 7と親株間のsubtractive CGHファイル。親株と比較して多数の染色体変化を認めた。

部分が増幅あるいは欠失していた (図 17)。例えば、7p、10p、21 番染色体は、5 つのクローン全てにおいて増幅しており、8p、13q、15q は 5 つのクローン全てにおいて欠失していた。また、8q、10q、20q の増幅および 9p の欠失は 5 つのうち 3 つのクローンに共通して観察された。この構造変化は、別の時期に確立した U251 クローンにおける CGH 解析にて、同様に観察された。以上より、U251MG においては、ノコダゾール処理によって生存したクローンが確立される際に、特異的な染色体構造変化が生じていることが示唆された。

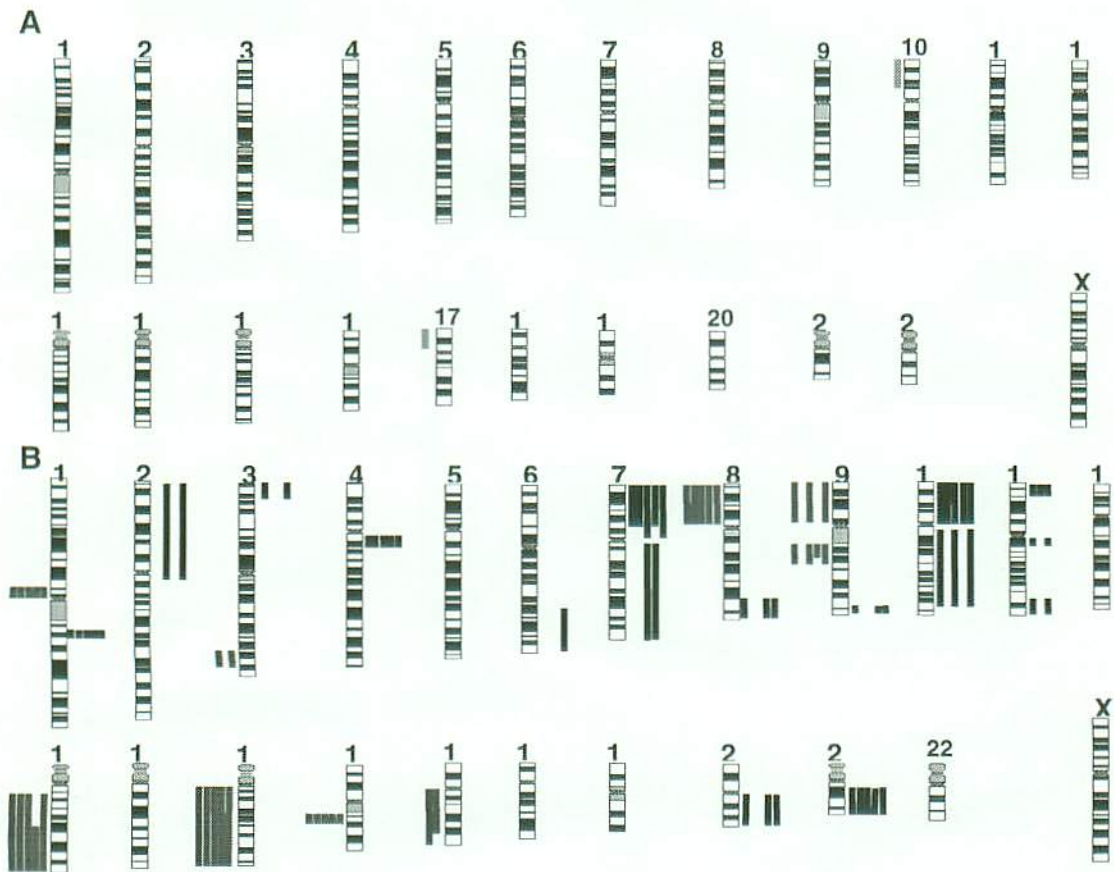
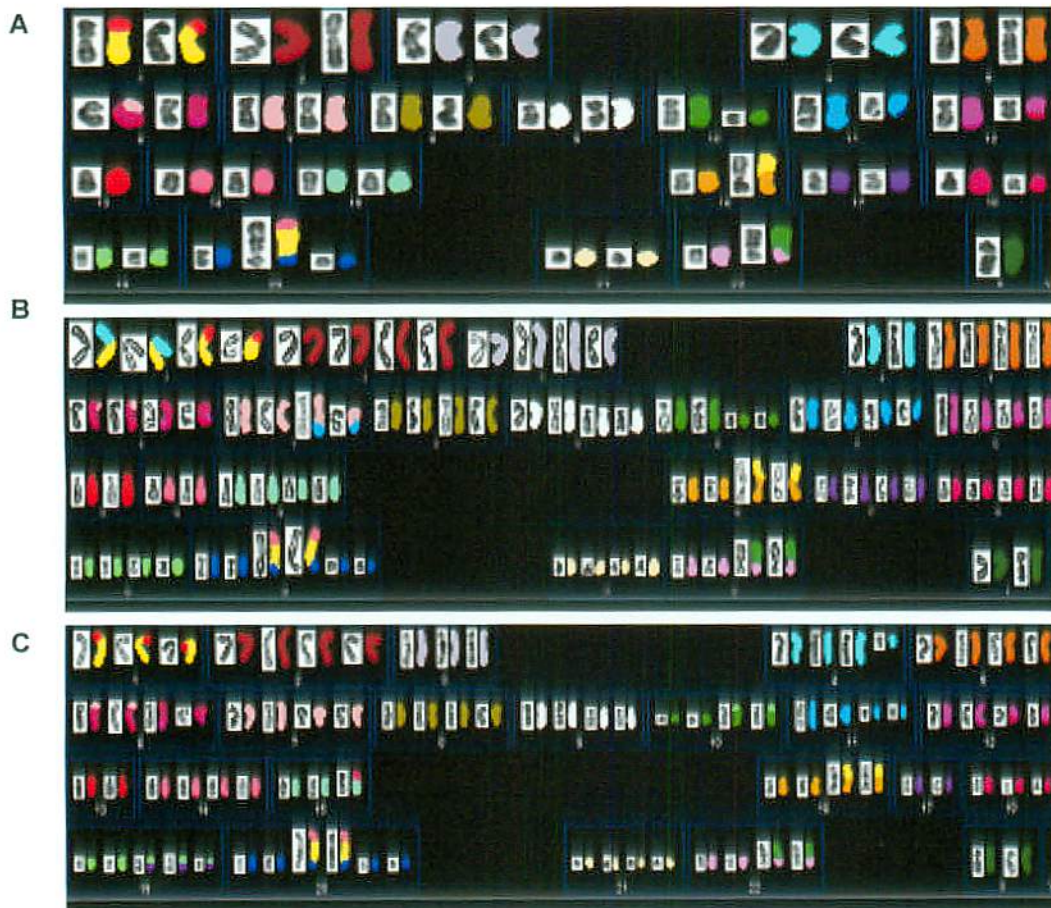


図17： Subtractive CGH法にて解析した、各クローンに生じた染色体変化のサマリー

Subtractive CGH法にて、U87およびU251クローンに生じたコピー数の変化を各5 cell lineづつ解析し、summarizeした。各染色体の右側に増加した部分が、左側に欠失した部分がそれぞれ示されている。 A: U87クローンでは、わずか2ヶ所の染色体変化があるのみで、ほとんど染色体が倍化したのみであった。 B: U251クローンでは、多くの、しかも各クローンで共通した場所に染色体変化が生じていた。

7-9 SKY 法によるクローンに生じた染色体構造変化の解析

CGH 法は、DNA のコピー数の変化を示すものであり、実際に生じている構造変化をとらえているものではない。そこで、クローン細胞で実際に構造変化が生じたかを調べるために、Spectral Karyotyping (SKY)法を用いた全染色体の painting を行った。図 18 に示す通り、U87 クローンでは、親株に見られたほとんどの異常染色体がそのまま倍化しており、新たな構造変化はわずかしか観察されなかった。一方、U251 クローンでは親株に見られた異常染色体の倍化も観察されたが、多数の新たな異常染色体の出現、既存の異常染色体の消失が観察された。以上の結果より、AMD 処理によって生存した hyperplloid クローンには、U87MG ではおもに数的変化が、U251 クローンでは数的および構造変化が生じていることが分かった。



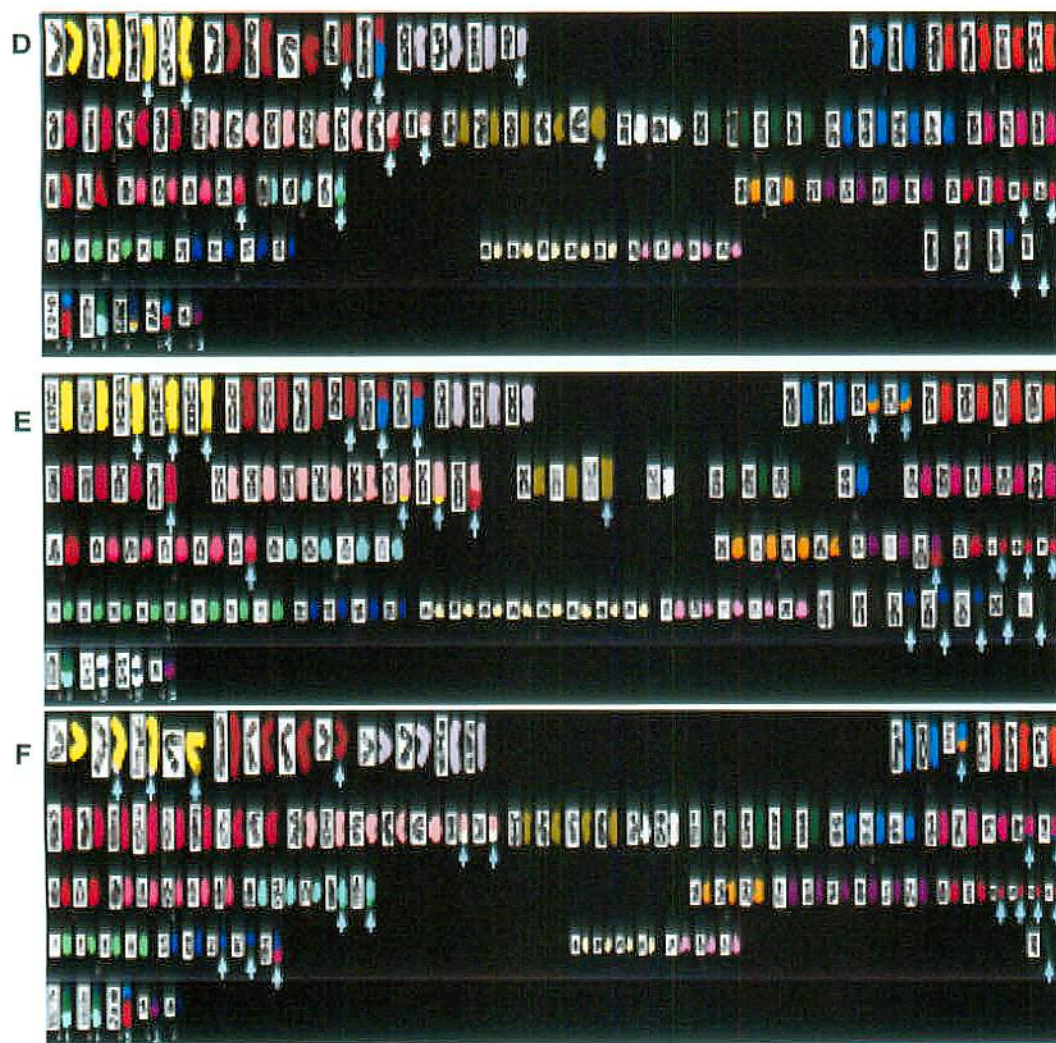


図18： Spectral Karyotyping (SKY)法による、クローン細胞に生じた構造変化の解析

U87MG parent (A)、U87 #clone 1 (B)、U87 #clone-2 (C)、U251MG parent (D)、U251 #C-6 (E)、U251 #C-7 (F)の各細胞の染色体展開スライドを作成し、SKY法による染色体解析を行い、親株とクローン間の染色体異常を比較した。

U87クローンでは、親株と異なる染色体異常はわずかであったが、U251クローンでは、多くの構造変化を伴う異常染色体の出現および既存の染色体異常の消失を認めた。

7-10 hyperploid クローンは染色体分離異常を有する

AMD 処理によって生存した細胞は、単に染色体が倍化しているのではなく、数的あるいは構造変化が生じていることが分かった。このことは、クローン細胞が hyperploid になったことにより、染色体不安定性を有している可能性を示唆する。そこで、クローン細胞の分裂期を confocal microscopy にて詳細に観察した。その結果、図 19A に示す通り、U87 クローン、U251 クローンのいずれにおいても、lagging chromosome や anaphase bridge、multipolar spindle といった、染色体分離異常が多数観察された。図 19B に示す通り、abnormal mitosis の出現率は、U87MG で 8.6%、U251MG で 20.1%であるのに対し、U87 クローンでは $34.4 \pm 5.6\%$ 、U251 クローンでは $46.2 \pm 5.4\%$ と、著明に増加していた。この結果より、hyperploid となったクローン細胞は、染色体分離異常を生じていると考えられた。

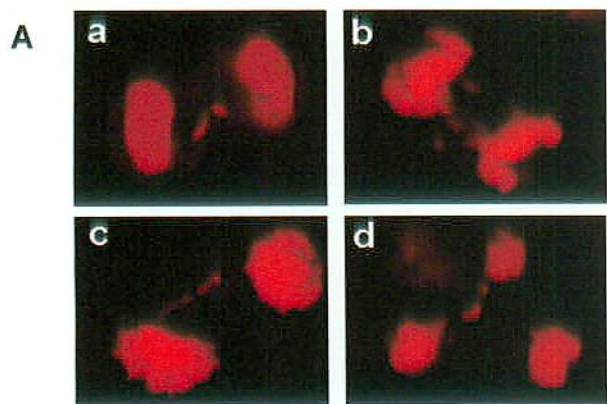
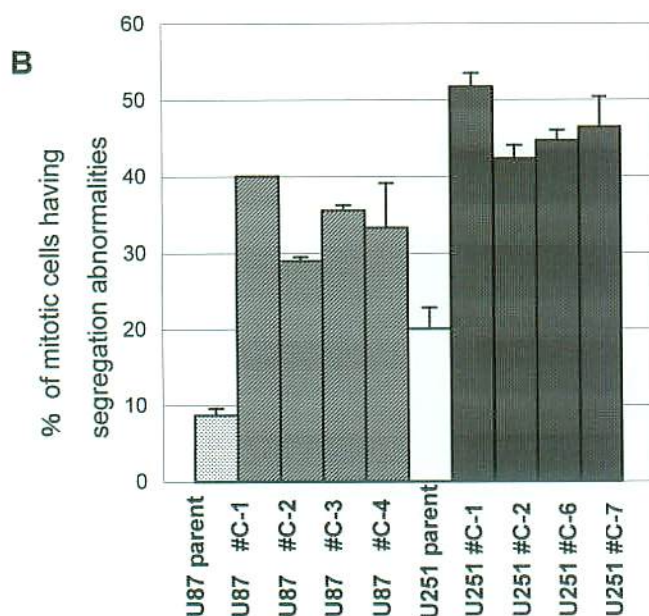


図19： クローン細胞における mitosisの異常

各細胞を35mm dishで培養し、核をPIで染色し共焦点顕微鏡にて分裂期の形態を観察した。A: U87 #clone 1(a)およびU251 #clone 6(b)において観察された lagging chromosome。U251 #clone6において観察された anaphase bridge (c) および multipolar spindle(d)



B: 各細胞において、分裂期における染色体分離異常を示した細胞の割合をグラフ化した。
n>50

7-11 hyperplod クローンは染色体の数的不安定性を有している。

染色体不安定性は、大きく2つに分類することができる。染色体数の異常および染色体構造異常である。前者はおもに mitosis における染色体分離異常や細胞質分裂の異常によって生じると考えられる。一方、染色体構造異常はおもに DNA 損傷に対する修復異常によって生じると考えられる。

そこで、クローン細胞が染色体の数的不安定性を有していることを確認するため、各細胞におけるカリオタイプ解析により染色体数の分布を調べた。U87MG は nearly diploid で、modal chromosome number は 45 本であり、染色体数は極めて安定していた (図 20)。それに対し、U87 クローンでは、modal chromosome number は 84~88 本で、ほぼ親株の染色体が倍化したものであったが、染色体数の分布は、親株と比較してばらつきが多く見られた。U251MG は modal chromosome number が 94 本で親株自体が数的不安定性を有しているが、U251 クローンは親株に比べさらに染色体数のばらつきが増大していた (図 20)。以上より、hyperplod クローンは、染色体数的不安定性を獲得あるいは増大したと考えられた。

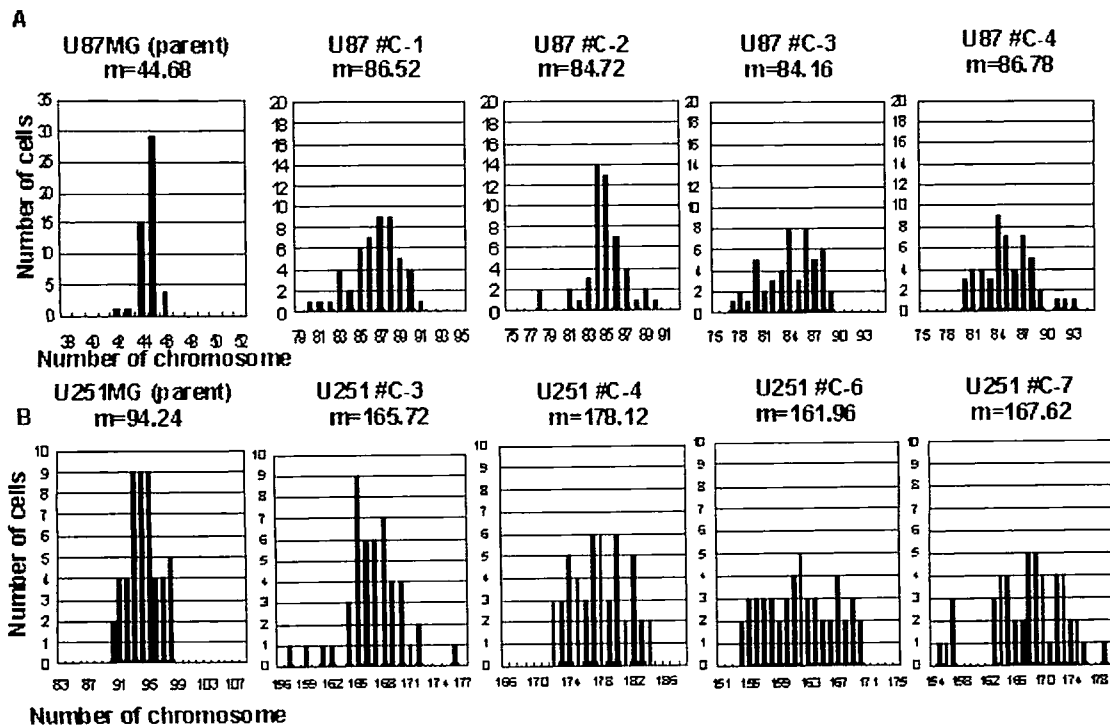


図20： クローン細胞の染色体数的不安定性の検討

U87MGおよびU251MGのクローンおよび親株を培養し、染色体展開スライドを作成、ギムザ染色を行い、顕微鏡下に染色体数を調べた。染色体数の分布をヒストグラムに示した。n=50

7-12 hyperploid クローンは染色体構造異常が増加している

染色体分離異常により、両極にうまく分離できなかった染色体あるいは染色体断片は、核膜再構成時に取り残され、核周囲の小さな核として観察されることがあり、これは Micronuclei(MN)と呼ばれている。そこで、クローン細胞では異常な染色体分離に伴ってMNが増加していると考え、MNの出現率を confocal microscopy にて MN を数えることにより調べた。その結果、U87、U251 いず

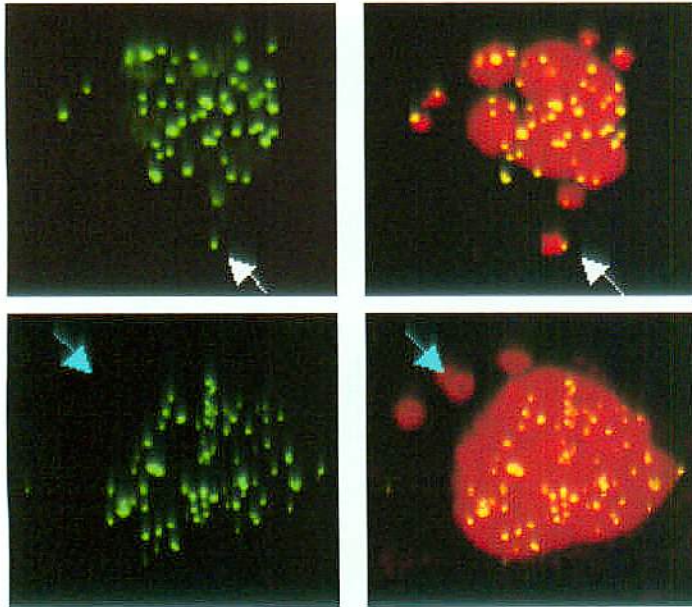
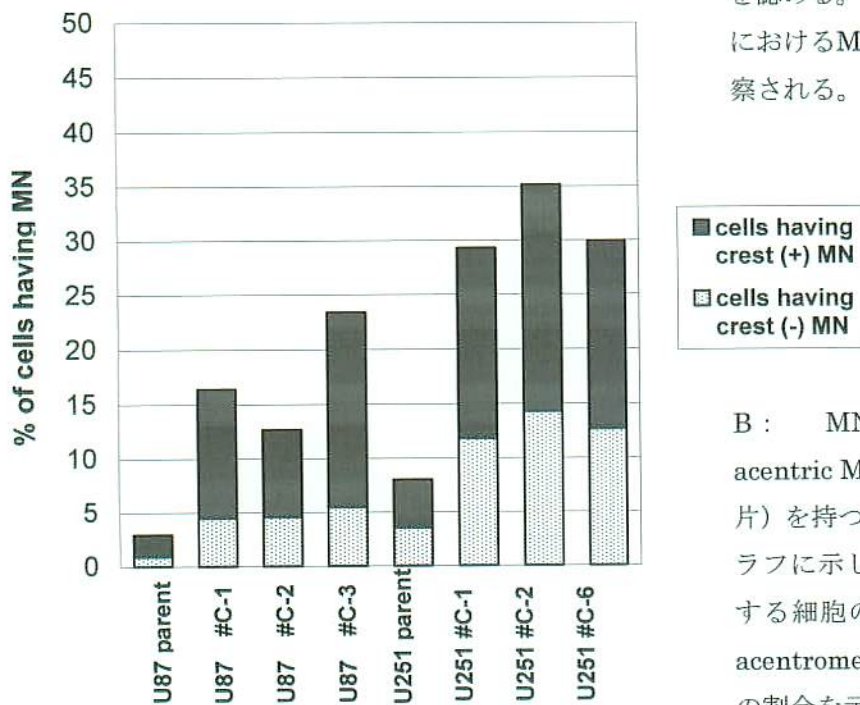


図 21 : クローンにおける micronuclei (MN) および、染色体断片 (acentric MN) の検討

各細胞を培養し、4% paraformaldehyde にて固定し、核をPIで染色し、共焦点顕微鏡にてMNを検出した。また抗CREST抗体でセントロメアを染色し、centromeric MNとacentromeric MNを鑑別した。

A: 上段; U87 #Clone-1におけるMN。おもにcentromeric MNを認める。下段; U251 #clone-6におけるMN。acentric MNが観察される。



B: MNを有する細胞の中でacentric MN (すなわち染色体断片)を持つ細胞の割合を調べ、グラフに示した。y軸は、MNを有する細胞の割合を示し、さらにacentromeric MNを有する細胞の割合を示している。

れも親株に比べクローンにおいてMNが多く出現していた。図 21B に示す通り、micronuclei を持つ細胞の割合は、親株と比べ U87 クローンでは 5 倍、U251 クローンでは 3.7 倍に増加していた。

染色体全体で構成される Micronuclei はセントロメアを持つが、染色体断片の場合はセントロメアを持たないものが観察される。染色体断片は、DNA の 2 重鎖損傷の修復ができなかった場合や、mitosis において染色体が両極から引っ張られて引きちぎられることにより生じると考えられている。したがって、セントロメアを持たない micronuclei (acentric MN) が観察される場合は、染色体断片の存在、すなわち染色体構造異常の存在を示唆する。我々は、クローン細胞が染色体構造不安定性を有しているかどうかを検討するため、セントロメアを特異的に認識する、ヒト CREST 症候群患者血清を用いて、micronuclei を有する細胞の中で、acentric MN を有する細胞の割合を調べた。その結果、acentric MN を持つ細胞の絶対数は増加しており、クローンでは染色体構造変化が増加していると考えられた (図 21B)。しかしながら、micronuclei を持つ細胞の中で、acentric MN を持つ細胞の割合は、いずれのクローンでも親株と比べ有意差はなかった (図 21B)。したがって、クローン細胞は、染色体構造異常は増加しているが、構造異常を生じるような不安定性自体は変化していないと考えられた。すなわち、染色体数が増加することによって、染色体構造変化が生じる機会が増加したと考えられた。

8. 考察

8-1 微小管重合阻害剤 (AMD) による hyperploidy 形成のメカニズム

我々は、ヒトグリオーマ細胞株において、微小管重合阻害剤処理によって hyperploidy が生じることを示した。AMD で処理された細胞は、一時的に M 期に停止するが、AMD 処理が遷延すると、mitotic slippage により分裂しないまま G1 期に入る。この時、正常細胞は G1 期に停止するが、G1/S チェックポイントが破綻したグリオーマ細胞株では、新たな DNA 合成が起こり hyperploidy となる。Hyperploidy の形成には、p53 の不活化が極めて重要であるが、p53 だけでなく、G1/S チェックポイントの破綻が深く関わっていることが示された。U87MG は wild type の p53 を発現しているが、p16 locus が欠失しているために、p14 が発現していない。p14 は p53 蛋白を分解する mdm2 を sequestrate することで p53 蛋白の安定化に関わっていることが示されており (18)、U87MG では、p14 による p53 の安定化が不十分なために、G1/S チェックポイントが不十分であると考えられる。図 5、10 に示した通り、G1/S チェックポイントの破綻の程度と、AMD 処理後の hyperploidy 形成の度合いは相関すると考えられる。

また、AMD による細胞死のメカニズムとして、hyperploidy になることで細胞死が誘導されるという報告が散見される(10,11,12)。しかしながら、今回我々は AMD 処理によって、多くの細胞死が誘導されると共に、hyperploidy 細胞として生存することを見出した。ほとんどの癌細胞は、G1/S チェックポイントに何らかの異常を有しているため、mitotic stress を与える抗癌剤は hyperploidy として生存する細胞を生むリスクを持っていると考えられる。

AMD 処理の遷延により、mitotic slippage が生じ、p53 依存性の G1 チェックポイントが惹起されることが分かってきているが、この時 p53 を活性化させる上流因子は同定されていない。我々は、少なくとも AMD 処理が DNA 損傷を生じないことを見出しており、DNA 損傷以外のメカニズムにより p53 が活性化されていると推測される。

8-2 Mitotic slippage の分子メカニズムについて

M 期の進行はとりもなおさず、cyclinB/cdc2 の活性に依存している。Cdc2 の活性は 13 番目のセリンの抑制的リン酸化がはずれることにより活性化され、cyclinB/cdc2 複合体が、核内に入ることにより M 期が開始する。Cdc2 活性は metaphase から anaphase へ進行すると急速に低下する。AMD 処理後の mitotic slippage は prometaphase から、metaphase や anaphase を介さず直接 G1 期へ移行するため、この時 cdc2 活性が急速に低下していると考えられる。実際、

cyclin B の蛋白量は staurosporine 処理後速やかに減少していたため (図 13)、mitotic slippage の際には確かに cdc2 活性は低下していると考えられる。しかしながら、butyrolactone により cdc2 活性を選択的に抑制させても、mitotic slippage は起こらなかった (図 11)。この結果は、AMD 処理による M 期停止の維持には、cdc2 活性以外の因子が必要であることを示唆する。

8-3 Hyperploidy であることの生物学的意義

Glioblastoma を含む悪性固形癌の多くは aneuploidy や hyperploidy といった染色体数の異常を示す。癌細胞において、hyperploidy が生じるメカニズムは不明であるが、今回の結果は、異常な mitosis によって分裂できなかった癌細胞が、次の G1/S チェックポイントを乗り越えることによって hyperploidy が導かれている可能性を示唆すると考えられる。癌細胞にとって hyperploidy であることが生物学的にどのような advantage を有するのかは興味深い点である。Hyperploidy になることによって染色体不安定性が生じると、癌において genetic heterogeneity が生じることとなる。その結果、種々の抗癌治療や生体内ストレスに対してより耐性をもつ細胞を生み易くなると考えられる。実際、glioblastoma は同一癌のなかで genetic heterogeneity を有することが報告されており(19)、抗癌治療がさらに癌の多様性を増幅させる可能性があることを示唆すると思われる。また、hyperploidy であることによって、染色体分離異常が増加すると、細胞増殖や生存に必要な遺伝子が娘細胞に不均等に分配されることによりそれらの遺伝子が増幅される可能性、逆に癌抑制遺伝子などが失われる可能性も考えられる。

8-4 クローンにおける染色体変化の意義

Subtractive CGH および SKY の結果、U87 クローンは染色体の数的異常が主で、構造異常はわずかであった。一方、U251 クローンは数的異常および構造異常の両者を示した。さらに、U251 クローンで見られた構造変化は、複数のクローンにおいて共通した領域が増加あるいは欠失していた。これは、AMD 処理によって生存した細胞は、ランダムに生存したのではなく、特定の染色体変化を生じたものが選択された可能性がある。多くの癌細胞は、癌化あるいは悪性化の過程で一定の染色体変化を示す傾向があることが示されている(20,21,22,23)。U251MG においては、単に染色体が倍加しただけでは生存できず、AMD 処理によって特定の染色体変化を生じた細胞のみが選択的に生存した可能性が考えられる。

8-5 Hyperploidy クローンの染色体数的不安定性のメカニズムについて

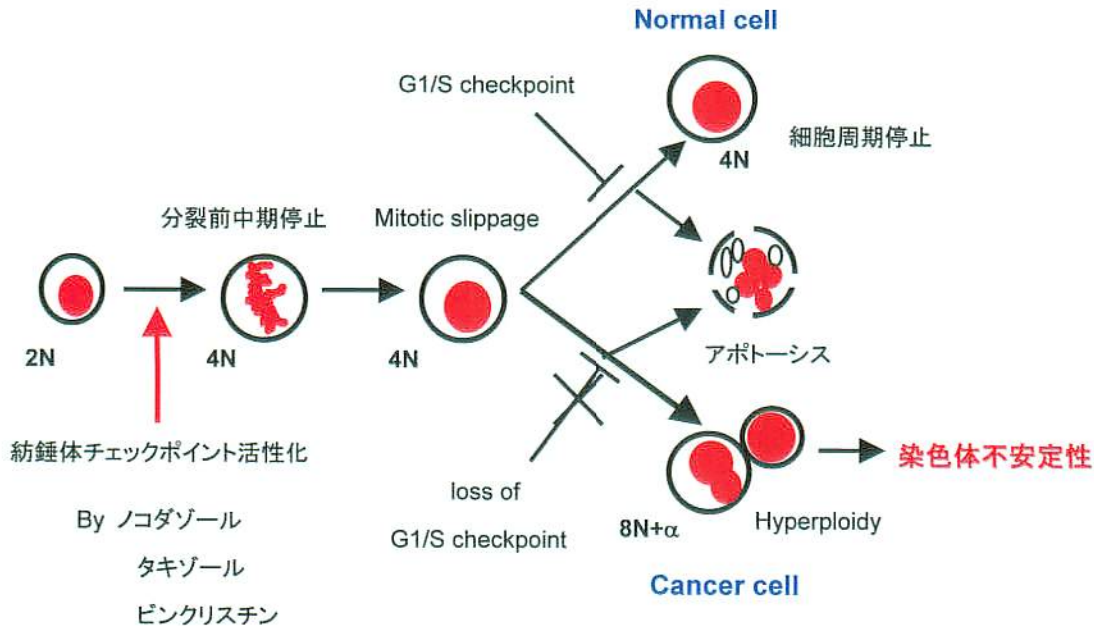
U87 および U251 クローンは、いずれも mitosis における染色体分離異

常と染色体数的不安定性を有していた。染色体分離異常があると、細胞は mitosis の度に染色体の増加あるいは欠失を生じることから、クローンは染色体分離異常に起因する染色体数の不安定性を有していると考えられた。クローンにおいて、なぜ染色体分離異常が生じるかの原因はよく分からない。可能性として、クローンが紡錘体チェックポイントの異常を有している可能性が挙げられる。しかし、全てのクローン細胞をノコダゾールで処理し細胞周期変化を調べたところ、親株と同様に M 期で停止したため、クローンにおける紡錘体チェックポイントは正常に機能していると思われ、この可能性は否定的と考えられる。次に、染色体数の増加すること自体が、染色体分離の正確さを低下させる可能性が考えられる。染色体数の増加に比例して染色体不安定性が増大する、という報告が散見される(24,25)。すなわち、染色体数が多いほど染色体分離が不均等になり、染色体数が不均一になる、と考えられ、これは我々の結果と一致する。したがって、染色体数の増加により染色体分離異常が増加することが染色体数不安定性の原因の一つであると推測される。

8-6 クローンにおける染色体構造異常の意義

Micronuclei(MN)は centromere を持つものと持たないものがあり、centromere を有する MN はおもに染色体分離異常により、centromere を持たない MN すなわち染色体断片は、主に放射線などによって DNA 損傷が生じ、それが修復されないことによって生じると考えられる。すなわち、acentric MN の存在は染色体構造異常の存在を示唆する。図 21 に示すように、U87、U251 いずれのクローンでも親株に比べ acentromeric MN が増加しており、染色体構造変化も増加していると考えられた。しかしながら、acentromeric MN と centromeric MN の比は、親株とクローン間で差がなかった。すなわち、クローンは必ずしも新たに染色体構造異常を生じるような性質を獲得したわけではない、と考えられる。

クローンで、実際に染色体構造変化が多く生じるメカニズムは不明である。染色体構造異常は、DNA 損傷の修復されないためか、あるいは分裂期において 1 本の染色体が両極に引きちぎられることなどで生じると考えられる(26)。U87MG および U251MG は共に G1/S チェックポイントの破綻があるために、DNA 損傷を許容してしまう可能性があると思われる。そこに染色体数の増加による染色体分離異常が加わることによって、fusion event が起こりやすくなって



いる可能性が推測される。したがって、hyperploidy であることと、G1/S チェックポイントが機能しないことの両者が存在することで、染色体数の変化だけでなく、構造変化をも生じる機会が増加すると考えられる。

図22: 紡錘体チェックポイント遷延によるhyperploidy形成のメカニズムおよびhyperploidy細胞の生物学的特徴

AMDで処理された細胞は、一時的な分裂前中期停止の後mitotic slippageによって、分裂しないままG1期に入る。正常細胞はG1/Sチェックポイントによって細胞周期が停止するが、G1/Sチェックポイントが破綻している癌細胞はhyperploidyとなる。Hyperploidyとなって生存した細胞は、染色体分離異常によって染色体不安定性が増大する。

9. 結語

本研究において、グリオーマ細胞において AMD 処理により分裂期チェックポイントが誘導されることによって、hyperploidy 細胞が生じること、それは p53 あるいは G1/S チェックポイントの破綻によって生じることが示された。Hyperploidy となった細胞は生存可能であり、染色体不安定性が増大していることが分かった。分裂期をターゲットとする抗癌治療は癌細胞に多くの細胞死を誘導すると同時に、染色体不安定性を持つ生存細胞を生み出すため大きな形質変化を生む可能性があることを考慮する必要があると考えられる。

今後の課題として、グリオーマが AMD 処理による細胞死からどのようにして逃れているかを解明することが重要と思われる。その分子メカニズムを解くことにより、分裂期をターゲットとした治療をより効果的に行うことが可能となると考えられる。したがって、AMD 処理などの分裂期チェックポイントの遷延によって、mitotic slippage やその後の細胞死がどのような分子メカニズムで起こっているかを明らかにしていくことが、グリオーマを含めた抗癌治療において、基礎研究と臨床応用の橋渡しになるのではないかとと思われる。

10. 参考文献

1. Hartwell, L. H. & Weinert, T. A. (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*. 246, 629-634.
2. Straight, A. F. (1997) Cell cycle: checkpoint proteins and kinetochores. *Curr Biol*. 7, R613-616.
3. Andreassen, P. R., Martineau, S. N. & Margolis, R. L. (1996) Chemical induction of mitotic checkpoint override in mammalian cells results in aneuploidy following a transient tetraploid state. *Mutat Res*. 372, 181-194.
4. Galipeau, P. C., Cowan, D. S., Sanchez, C. A., Barrett, M. T., Emond, M. J., Levine, D. S., Rabinovitch, P. S. & Reid, B. J. (1996) 17p (p53) allelic losses, 4N (G2/tetraploid) populations, and progression to aneuploidy in Barrett's esophagus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93, 7081-7084.
5. Fukasawa, K., Wiener, F., Vande Woude, G. F. & Mai, S. (1997) Genomic instability and apoptosis are frequent in p53 deficient young mice. *Oncogene*. 15, 1295-1302.
6. Kung, A. L., Sherwood, S. W. & Schimke, R. T. (1990) Cell line-specific differences in the control of cell cycle progression in the absence of mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87, 9553-9557.
7. Hall, L. L., Th'ng, J. P., Guo, X. W., Teplitz, R. L. & Bradbury, E. M. (1996) A brief staurosporine treatment of mitotic cells triggers premature exit from mitosis and polyploid cell formation. *Cancer Res*. 56, 3551-3559.
8. Rieder, C. L. & Palazzo, R. E. (1992) Colcemid and the mitotic cycle. *J Cell Sci*. 102, 387-392.
9. Di Leonardo, A., Khan, S. H., Linke, S. P., Greco, V., Seidita, G. & Wahl, G. M. (1997) DNA rereplication in the presence of mitotic spindle inhibitors in human and mouse fibroblasts lacking either p53 or pRb function. *Cancer Res*. 57, 1013-1019.
10. Hong, F. D., Chen, J., Donovan, S., Schneider, N. & Nisen, P. D. (1999) Taxol, vincristine or nocodazole induces lethality in G1-checkpoint-defective human astrocytoma U373MG cells by triggering hyperploid progression. *Carcinogenesis*. 20, 1161-1168.
11. Verdoodt, B., Decordier, I., Geleyns, K., Cunha, M., Cundari, E. & Kirsch-Volders, M. (1999) Induction of polyploidy and apoptosis after

- exposure to high concentrations of the spindle poison nocodazole. *Mutagenesis*. **14**, 513-520.
12. Stewart, Z. A., Mays, D. & Pietsenpol, J. A. (1999) Defective G1-S cell cycle checkpoint function sensitizes cells to microtubule inhibitor-induced apoptosis. *Cancer Res.* **59**, 3831-3837.
 13. Cross, S. M., Sanchez, C. A., Morgan, C. A., Schimke, M. K., Ramel, S., Idzerda, R. L., Raskind, W. H. & Reid, B. J. (1995) A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science*. **267**, 1353-1356.
 14. Minn, A. J., Boise, L. H. & Thompson, C. B. (1996) Expression of Bcl-xL and loss of p53 can cooperate to overcome a cell cycle checkpoint induced by mitotic spindle damage. *Genes Dev.* **10**, 2621-2631.
 15. Tarapore, P. & Fukasawa, K. (2000) p53 mutation and mitotic infidelity. *Cancer Invest.* **18**, 148-155.
 16. Goto, H., Tomono, Y., Ajiro, K., Kosako, H., Fujita, M., Sakurai, M., Okawa, K., Iwamatsu, A., Okigaki, T., Takahashi, T. & Inagaki, M. (1999) Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J Biol Chem.* **274**, 25543-25549.
 17. Ikeda, J., Tada, M., Ishii, N., Saya, H., Tsuchiya, K., Okaichi, K., Mishima, K., Sawamura, Y., Fulci, G., Liu, T. J. & Van Meir, E. G. (2001) Restoration of endogenous wild-type p53 activity in a glioblastoma cell line with intrinsic temperature-sensitive p53 induces growth arrest but not apoptosis. *Int J Cancer.* **94**, 35-43.
 18. Weber, J. D., Taylor, L. J., Roussel, M. F., Sherr, C. J. & Bar-Sagi, D. (1999) Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol.* **1**, 20-26.
 19. Harada, K., Nishizaki, T., Ozaki, S., Kubota, H., Ito, H. & Sasaki, K. (1998) Intratumoral cytogenetic heterogeneity detected by comparative genomic hybridization and laser scanning cytometry in human gliomas. *Cancer Res.* **58**, 4694-4700.
 20. Ried, T., Knutzen, R., Steinbeck, R., Blegen, H., Schrock, E., Heselmeyer, K., du Manoir, S. & Auer, G. (1996) Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Genes Chromosomes Cancer.* **15**, 234-245.

21. Schrock, E., Blume, C., Meffert, M. C., du Manoir, S., Bersch, W., Kiessling, M., Lozanowa, T., Thiel, G., Witkowski, R., Ried, T. & Cremer, T. (1996) Recurrent gain of chromosome arm 7q in low-grade astrocytic tumors studied by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*. **15**, 199-205.
22. Marchio, A., Meddeb, M., Pineau, P., Danglot, G., Tiollais, P., Bernheim, A. & Dejean, A. (1997) Recurrent chromosomal abnormalities in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*. **18**, 59-65.
23. Guan, X. Y., Fu, S. B., Xia, J. C., Fang, Y., Sham, J. S., Du, B. D., Zhou, H., Lu, S., Wang, B. Q., Lin, Y. Z., Liang, Q., Li, X. M., Du, B., Ning, X. M., Du, J. R., Li, P. & Trent, J. M. (2000) Recurrent chromosome changes in 62 primary gastric carcinomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*. **123**, 27-34.
24. Duesberg, P., Rausch, C., Rasnick, D. & Hehlmann, R. (1998) Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**, 13692-13697.
25. Duesberg, P., Stindl, R. & Hehlmann, R. (2000) Explaining the high mutation rates of cancer cells to drug and multidrug resistance by chromosome reassortments that are catalyzed by aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 14295-14300.
26. Gisselsson, D., Pettersson, L., Hoglund, M., Heidenblad, M., Gorunova, L., Wiegant, J., Mertens, F., Dal Cin, P., Mitelman, F. & Mandahl, N. (2000) Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 5357-5362.