

表 題 染色体不安定性と関連する non-coding RNA と薬剤感受性についての検討

論文の区分 博士課程

著 者 名 田巻 佐和子

担当指導教員氏名 力山 敏樹 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系 専攻
総合医学 専攻分野
外科系総合医学 専攻科

2022年1月7日申請の学位論文

目次

はじめに	p.2-5
研究対象と方法	p.6-14
結果	p.15-27
考察	p.28-31
終わりに	p.32
略語一覧	p.32
謝辞	p.33
参考文献	p.34-36

はじめに

正常細胞では、細胞分裂の際に均等に染色体を分配することで染色体数を維持するための機構がある。染色体には、セントロメア領域にキネトコア（動原体）と呼ばれるタンパク質複合体が形成され、紡錘体と呼ばれる分裂装置が結合して、正常な染色体の分配が行われる¹。一方でがん細胞の多くは、細胞内に異常な数の染色体が存在する「異数性」を示すことが知られている^{2,3}。これは正常な染色体の分配ができないことで、染色体の数に変化が起きるためである。染色体不安定性(chromosomal instability: CIN)は、染色体の全体または大きな領域の増減(異数性)、構造的な再配列、増幅や欠失などの局所的な異常といった染色体異常の頻度が高いことを特徴としている^{4,5,6}。がんの 70-95%は CIN に起因する染色体異常を有すると推定されている^{7,8}。

多くの研究で、CIN と薬剤感受性との関係性が検討されてきたが、一定の知見は得られていない。CIN によって、がんの多様性や不均一性が進むことで、がんの悪性度が増し、様々な抗がん剤やホルモン剤などの薬剤耐性に強く関与しているという報告がある⁹。パクリタキセルのような抗がん剤に対する耐性と相関することは、がん細胞株などによる基礎研究や臨床研究でも多く報告されている^{9,10,11,12}。一方で、卵巣癌、直腸癌、乳癌では、過剰な CIN がシスプラチ

ンや 5-FU などの殺細胞性抗がん剤の感受性を高めることも報告されている^{12,13,14,15}。染色体異常の誘発は、マウス皮下に移植されたヒト膠芽腫腫瘍の放射線治療に対する感受性を高め¹⁶、セントロメアやキネトコアを構築する遺伝子の発現異常は、がん患者の予後や放射線治療、化学療法への反応と関連することが報告されている¹⁷。

正常な染色体分配において重要な働きをしているものの一つに、セントロメア領域から転写されるノンコーディング RNA がある。ヒトのセントロメアにはサテライトアルファと呼ばれる主に 171bp を 1 単位とする繰り返し配列が存在する。サテライトアルファの転写産物(satellite alpha transcripts: SAT)はサテライト RNA と呼ばれ、様々な繰り返し配列の長さを持つノンコーディング RNA である^{18,19,20}。サテライトアルファの遺伝子は、分裂酵母から哺乳動物まで広く保存されており、RNA ポリメラーゼ II により双方向に転写が促される²¹。染色体のセントロメアと呼ばれる領域は、染色体の安定性を保つために重要な役割を担っており、その機能低下は染色体の分離異常を促進する。ヒトやマウスの様々な種類のがんにおいて、このセントロメア領域からサテライト RNA が広範に転写されていることが知られている²²。このことからサテライト RNA の発現は、がんの発生に関与していることが指摘されている。

培養細胞にサテライト RNA を過剰発現させると、DNA 損傷応答の誘導、細胞周期チェックポイントの阻害、染色体分配の異常などを引き起こすことが報

告している²³。これまでに当教室でも、正常ヒト乳腺上皮細胞において、レンチウイルスを用いた SAT の過剰発現が染色体不安定性を誘導し、特定の染色体数の変化をもたらすことを報告した²⁴。これらの結果は、がん細胞内におけるサテライト RNA の発現増加が CIN に関与することを示唆する。

CIN への関与に加えて、SAT を過剰発現させた細胞では DNA 損傷応答が亢進し、DNA 合成阻害剤に対する感受性が上がることが報告されている²⁵。トポイソメラーゼ I は DNA の複製や転写の際に DNA-トポイソメラーゼ I 複合体を形成し、DNA の一本鎖状態を作ることで DNA の二重らせん構造を緩め、その後 DNA を再結合する²⁶。トポイソメラーゼ I 阻害剤は、DNA-トポイソメラーゼ I 複合体を安定化させることで DNA の組み換えを阻害し、最終的に二本鎖切断と細胞死を引き起こす抗がん剤である^{27,28}。Zhang らは、セントロメアおよびキネトコアを構成するタンパク質の遺伝子変異の発現が高いがん細胞株は、低いものに比べてトポイソメラーゼ I 阻害剤に対する感受性が高いことを報告している¹⁷。現在、切除不能進行再発大腸癌において、化学療法の進歩とともに生命予後は延長してきている^{29,30}。トポイソメラーゼ I 阻害剤であるイリノテカンは大腸癌の治療において重要な抗がん剤の一つである^{31,32}。抗がん剤の治療選択において、マイクロサテライト不安定性(microsatellite instability: MSI)かどうかは重要な要素となる。マイクロサテライト不安定性とは、DNA にマイクロサテライトという数塩基からなる繰り返し領域があり、DNA ミスマッチ修復遺伝子

の機能の低下が起こることで、繰り返し配列の回数に異常が出る。この異常が蓄積することで DNA 修復やアポトーシスなどに影響を及ぼし発癌に至ると考えられており、実際、大腸癌では 10-20%を占めている^{33,34}。大腸癌はこのマイクロサテライト不安定性の高いものと、マイクロサテライト安定性とで大別される。大腸癌でマイクロサテライト不安定性が高い場合は、免疫チェックポイント阻害剤の適応となっている³⁵。

本研究では、マイクロサテライト安定性とマイクロサテライト不安定性のマウスの大腸癌細胞株を用いて、ヒトのサテライトアルファに相当する、マウスのメジャーサテライトから発現するメジャーサテライト転写産物 (mSAT) の過剰発現細胞を作成し、トポイソメラーゼ I 阻害剤の感受性を高めるかどうかを検討することとした。

研究対象と方法

細胞培養

マウス大腸癌細胞株の MC38 細胞は Kerafast 社から入手し、マウス大腸癌細胞株の CT26 細胞(CRL-2639)は American Type Culture Collection (ATCC)より入手した。ヒト胎児腎細胞由来 HEK293T 細胞は奈良先端科学技術大学院大学 伊東広先生から譲渡していただいた。MC38 細胞はマイクロサテライト不安定性(MSI)の大腸癌細胞株で CT26 細胞はマイクロサテライト安定性の大腸癌細胞株である。MC38 細胞と HEK293T 細胞の培養には、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM, D6429, Sigma-Aldrich, St. Louis, U S A)を使用し、CT26 は RPMI-1680 (30264-85, Nacalai tesque, Kyoto, Japan)を使用した。それぞれ 10% ウシ胎児血清(FBS, 172012, Sigma-Aldrich, St. Louis, U S A)、100 U/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシンを添加して使用した。

発現ベクターとインフェクション

マウスの major satellite RNA (mSAT)を過剰発現させるためにレトロウイルスベクターを作製した。mSAT を発現するプラスミドベクターp156RRL-EF1a-GFPU3H1MajSat(Addgene, #41796)²⁵を鋳型として、mSAT の領域を表 1 のプライマーセットで増幅した。pEF6/V5-His TOPO (ThermoFisher, MA, USA)を鋳型として、EF1 α プロモーター領域と SV40 poly A シグナルの領域を表 1 のプライマーセットで増幅した。PCR には PrimeSTAR GXL DNA polymerase (TAKARA-Bio, Shiga, Japan)を用いた。pSuper.retro.puro (OligoEngine, WA, USA)を *EcoR* I および *SaI* I で切断した断片に対して、EF1 α プロモーターの *EcoRI*/*Bam*HI 断片、SV40 poly A シグナルの *Bam*HI/*SaI*断片を挿入し、コントロールベクター(pEF1a-SV40polyA-control)を作製した。PCR で増幅した mSAT とコントロールベクターの *Bam*HI サイトを blunting して mSAT を挿入し、mSAT 過剰発現レトロウイルスベクター(pEF1a-SV40polyA-mSAT)とした。このプラスミドからは、RNA ポリメラーゼ II による転写により 2 リピートの mSAT RNA を発現する(図 1)。

表1 レトロウイルスベクター作製に用いたプライマー

primer	sequence
EF1 α Forward Primer (<i>Eco</i> R I)	5'-TTT <u>GAATTC</u> GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAG-3'
EF1 α Reverse Primer (<i>Bam</i> H I)	5'-TTTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTACCTAGC-3'
SV40 poly A Forward Primer (<i>Bam</i> H I)	5'-TTTGGATCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATG-3'
SV40 poly A Reverse Primer (<i>Sal</i> I)	5'-TTT <u>GTCGAC</u> CAGACATGATAAGATACATTGATGAG-3'
Major satellite Forward Primer (<i>Bgl</i> II)	5'-TTT <u>AGATCT</u> TTATGGCGAGGATAACTGAAAAAG-3'
Major satellite Reverse Primer (<i>Hind</i> III)	5'-TTT <u>AAGCTT</u> GTACAAGCAAAAAGCAGCATAACTTC-3'

下線は制限酵素部位を示す。

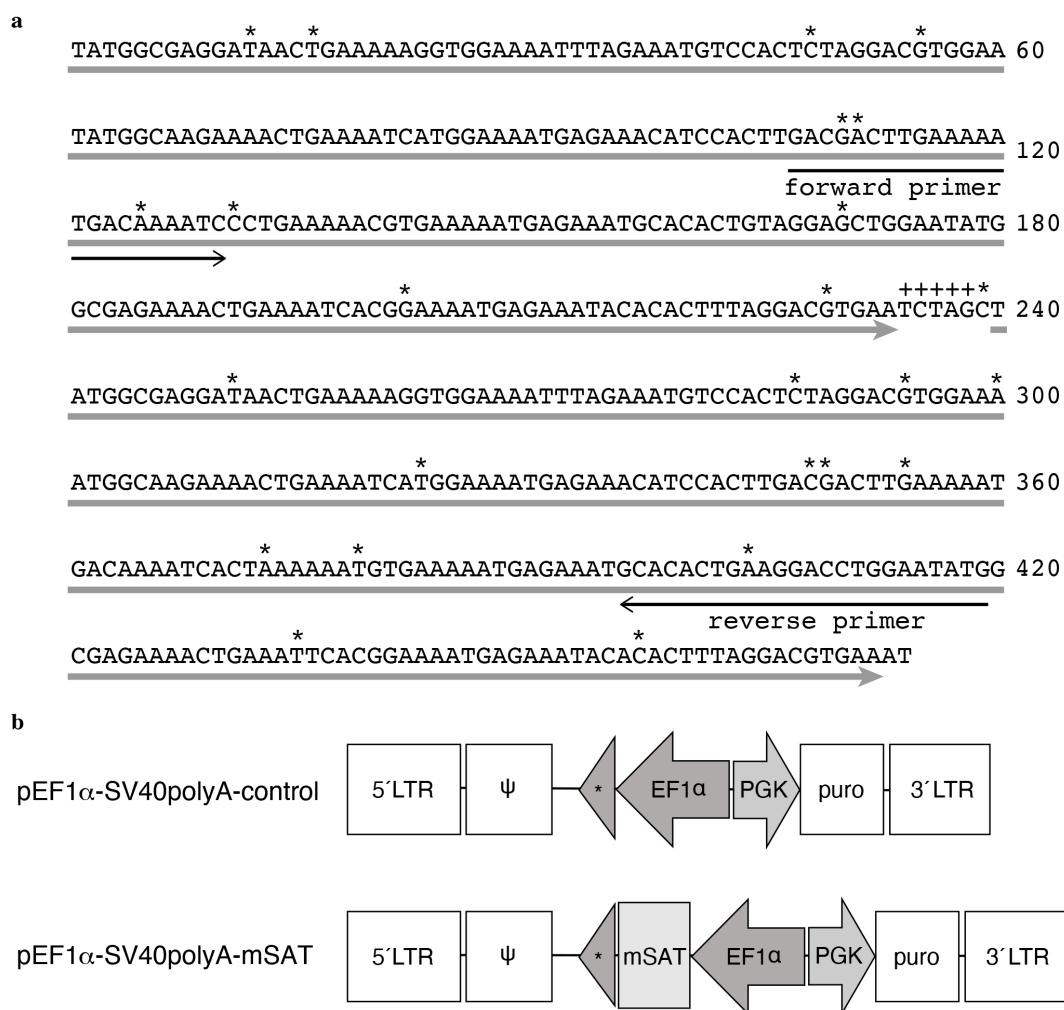


図1 mSAT 配列と mSAT RNA を発現するレトロウイルスベクター

a 実験に用いたマウス major satellite (mSAT) のタンデムリピート配列。灰色の矢印は mSAT の単一ユニット (234 bp)、矢印は発現解析に用いたプライマー配列を表す。マウスゲノム (GRCm39) の chr9:3025983-3025516 領域との違いを* (塩基置換) と+ (挿入配列) で示す。**b** mSAT 発現レトロウイルスベクターとコントロールベクターの模式図。*: LTR: long terminal repeat, Ψ : extended packaging signal, PGK: PGK promoter, puro: puromycin resistance gene, *: SV40 polyA signal

作製したレトロウイルスベクターを、pE-Eco(*env*発現ベクター, Takara-Bio)と pGP(*gag-pol*発現ベクター, Takara-Bio)とともに HEK293T 細胞(直径 60mm ディッシュあたり 1×10^6 細胞)にトランスフェクションした。24 時間後、培地を 1.6 mL の新しい培地に交換した。トランスフェクション後 24-60 時間の間、4 時間ごとに生成されたレトロウイルスを採取し、氷上で保存した。 $1.0 \mu\text{g/mL}$ の ポリブレン(Merck Millipore)を添加した 2mL のウイルス含有培養液を用いて、細胞(直径 60mm ディッシュあたり 1×10^5 細胞)を感染させた。24 時間後、ピューロマイシン(CT26 では $6 \mu\text{g/mL}$ 、MC38 では $4.5 \mu\text{g/mL}$)を含む培地に交換し、3 日間培養した。ピューロマイシン存在下で生存する細胞をレトロウイルス感染細胞と判断し、実験に用いた。

RNA 抽出とリアルタイム PCR

トータル RNA は、TRIzol (Life Technologies, Waltham, MA, USA)を用いて抽出した。 $2 \mu\text{g}$ のトータル RNA を、100 ユニットの ReverTra Ace、1 mM dNTPs、5 pmol のオリゴ(dT)₂₀ プライマー(東洋紡績)を含む $20 \mu\text{L}$ の反応混合物に加え、

42°Cで 60 分間、cDNA 合成を行った。95°Cで 5 分間加熱して反応を終了し、80 μ L の TE バッファーで希釈した。合成した cDNA の 1 μ L を、KAPA SYBR[®] FAST qPCR Kit (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA)を用いて 20 μ L の容量で PCR を行い、LightCycler 96(Roche diagnostics 社)で反応を解析した。

内因性のコントロールとして、Ubiquitin を用いて³⁶、相対量を解析した。使用したプライマーの配列を表 2 に記す。

表 2 リアルタイム PCR で使用したプライマー

primer	sequence
Ubiquitin Forward Primer	5'-TGGCTATTAATTATTCGGTCTGCAT-3'
Ubiquitin Reverse Primer	5'-GCAAGTGGCTAGAGTGCAGAGTAA-3'
Major satellite Forward Primer	5'-GACGACTTGAAAAATGACAAAATC-3'
Major satellite Reverse Primer	5'-CATATTCCAGGTCCTTCAGTGTGC-3'

細胞増殖曲線

直径 60mm ディッシュあたり 1×10^5 細胞を播種し、2 日目と 4 日目に細胞数を計測した。細胞数の計測は、PBS で洗浄したディッシュにトリプシン添加して細胞を剥がし、2 mL の培地で懸濁したものをを用いた。同量のトリパンブルーで染色して、Countess automated cell counter (Invitrogen 社)で計測した。

軟寒天培地コロニー形成アッセイ

直径 35mm デイッシュに 0.5% noble agar (Invitrogen 社)を含む DMEM 軟寒天培地を固めた。次に 0.3% noble agar を含む DMEM 培地と 1×10^4 細胞を懸濁して、0.5% noble agar の上に 0.3% noble agar と混ぜた細胞懸濁液を乗せて培養した。培養 2~3 週間後、コロニーを 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) (Sigma) で染色し、コロニーを ImageJ ソフトウェア (NIH, Bethesda, MD, USA; Wayne Rasband 博士より無償提供: <https://imagej.nih.gov/ij/>)を用いて計測した。

免疫細胞染色

細胞は 12 ウェルプレート内のカバーガラス上で培養した。ウェルからカバーガラスを取り出し、PBS で 3 回洗浄した。室温で 15 分間 4%パラホルムアルデヒド/PBS に浸すことによって細胞を固定した。その後 PBS で 3 回洗浄した。膜透過とブロッキングを行うために、細胞を室温で 60 分間 0.3% Triton X-100 (Agilent Technologies 社製)と 5% FBS/PBS でインキュベートした。細胞を PBS で 3 回洗浄した後、一次抗体として、抗 alpha-tubulin 抗体(1:1000 希釈, #T6199, Sigma-Aldrich 社)と抗 γ H2AX 抗体 (1:500 希釈, #9718, Cell Signaling Technology 社)を用いて 4°Cで一晩インキュベートした。PBS で洗浄した後、二次抗体として、細胞を室温で 60 分間 Alexa-594 結合抗 rabbit IgG 抗体 (1:500

希釈, #A11001, Life technologies 社)と Alexa-488 結合抗 mouse IgG 抗体 (1:500 希釈, #A11072, Life technologies 社)で遮光してインキュベートした。PBS で 3 回洗浄した後、カバーガラスはスライドガラス上で VECTASHIELD Mounting medium for fluorescence (Vector Laboratories 社)を用いてマウントして核を染め、乾燥の後マニキュアで密封した。OLYMPUS FSX100 蛍光顕微鏡 (OLYMPUS 社)を用いて観察した。

薬物感受性と WST-1 アッセイ

96 ウェルマイクロプレート (3881-096, IWAKI, Shizuoka, Japan)に 5×10^3 cells/well で細胞を播種し、100 μ L の培地を加え、37°C、5% CO₂ でインキュベートした。24 時間後に培地を除去し、最終濃度が 0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0 μ M のイリノテカン(CPT-11; I6932, Funakoshi, Tokyo, Japan, DMSO 溶解液)を含む培地に交換した。CPT-11 添加 48 時間後に Cell Growth Reagent Assay WST-1 (10 μ L/well, Roche, Basel, Switzerland)を添加して、37°C、5% CO₂ で 30 分インキュベートした。その後、マイクロプレートリーダー iMARK Microplate Reader (Bio-Rad 社)を用いて、サンプル波長は 450 nm、対照波長 620 nm を用いて吸光度を測定した。

統計学的解析

すべての統計分析は、GraphPad Prism バージョン 9(GraphPad Software、San Diego、CA、USA)を使用しておこなった。解析には、スチューデントの t 検定を用いた(*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$)。50%阻害濃度(IC50)は、4パラメーターのロジスティックモデルを使用して求めた。用量反応曲線は、二乗和 F 検定を使用して統計的に比較した。

結果

mSAT 過剰発現による細胞増殖への影響

がん細胞におけるマウスのメジャーサテライト RNA(mSAT)の過剰発現の影響を明らかにするため、レトロウイルスベクターを用いて mSAT をマウス大腸癌細胞株である CT26 細胞および MC38 細胞株に導入した。レトロウイルスの感染後、ピューロマイシン耐性となった細胞群から RNA を抽出し、mSAT 発現量を RT-qPCR で確認した。その結果、mSAT を導入した細胞では、コントロールベクター導入細胞群に比べて mSAT 発現量が有意に高いことを確認した(図 2)。

次に、mSAT の過剰発現による細胞増殖への影響を調べた。CT 26 細胞と MC38 細胞において、それぞれ mSAT を過剰発現させた細胞とコントロール細胞を播種させて 2 日目と 4 日目に培養した細胞数を比較した。いずれの細胞株でも mSAT 導入細胞とコントロール細胞の間で細胞増殖に有意な差は見られなかった(図 3)。

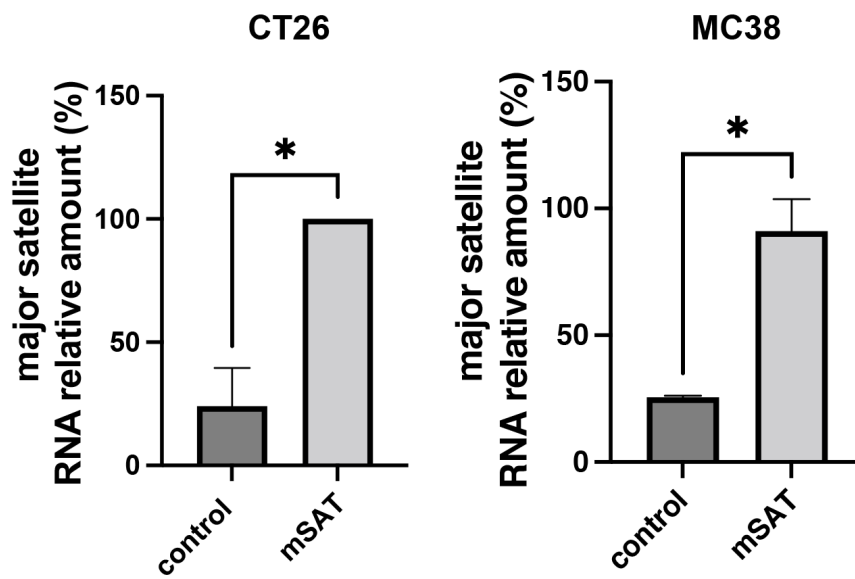


図2 mSAT 発現ベクター導入細胞とコントロールベクター導入細胞の mSAT 発現レベルの比較。

mSAT 発現レトロウイルスベクターまたはコントロールベクターを導入した CT26 細胞(左)と MC38 細胞(右)から RNA を回収し、RT-PCR により mSAT 発現量を測定した。スチューデントの t 検定 (*, $p < 0.05$)。エラーバーは標準偏差を示す。(n=2)

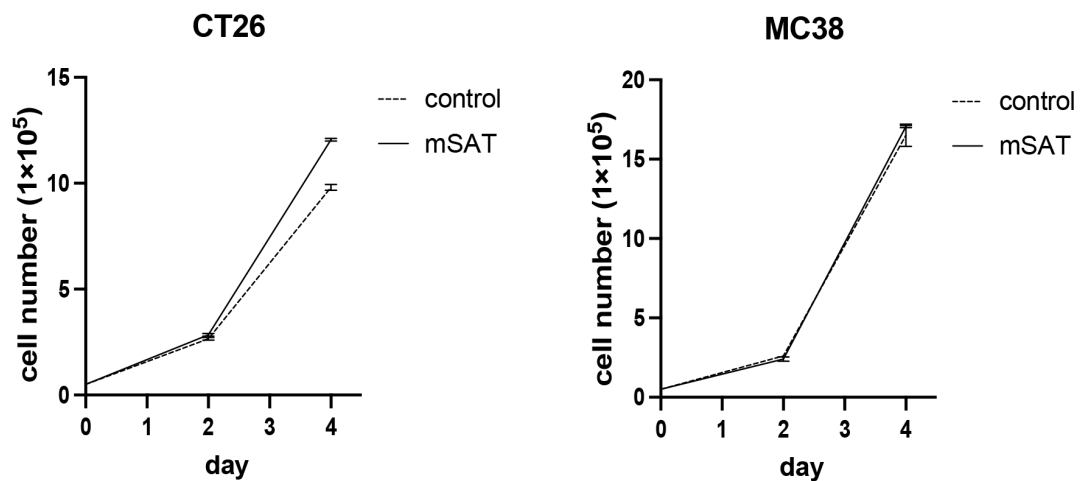


図3 mSAT 過剰発現細胞とコントロール細胞の細胞増殖の比較

mSAT 発現ベクターまたはコントロールベクターを導入した CT26 細胞(左)と MC38 細胞(右)を 1×10^5 細胞播種し、2 日目と 4 日目の細胞数を計測した。スチューデントの t 検定では、CT26 細胞と MC38 細胞は増殖に有意な差を示さなかった。エラーバーは標準偏差を示す。(n=2)

足場非依存性増殖能を検討するために、軟寒天培地コロニー形成アッセイを行なった。mSAT を過剰発現させた CT26 細胞と MC38 細胞、またはそのコントロール細胞を播種し、2～3 週間培養後のコロニー数を計測した。いずれの細胞株でも mSAT 導入細胞とコントロール細胞の間で形成されたコロニー数に有意な差は認められなかった(図 4)。

mSAT 過剰発現による有糸分裂異常

染色体不安定性につながる可能性のある有糸分裂異常を検出するために、細胞の蛍光免疫染色を行った。Abnormal segregation(染色体分配異常)(図 5)は、分裂期の細胞において、紡錘体による均等な分裂が行われていない状態であり、単極性紡錘体や多極性紡錘体の出現などがみられる。Micronuclei (微小核) (図 6) は染色体分配異常が起こり、染色体が断片化してしまうことで、出現する現象である。anaphase bridge(図 7)は、染色体分配異常によって、娘細胞間を DNA が架橋してしまう構造である。Abnormal segregation、Micronuclei や anaphase bridge など有糸分裂異常を持つ細胞の割合は、コントロールと比較して増加し

ていた。mSAT 過剰発現細胞の方がコントロール細胞に比べて Abnormal segregation と anaphase bridge の頻度は高く、有意差を認めた。Micronuclei はいずれの細胞株でも mSAT 過剰発現細胞とコントロール細胞との比較で有意差は認めなかったが、mSAT 過剰発現細胞で頻度が多い傾向であった。以上の結果から mSAT 過剰発現によって、染色体不安定性に関連する染色体分配異常の頻度が増加することが示唆された。

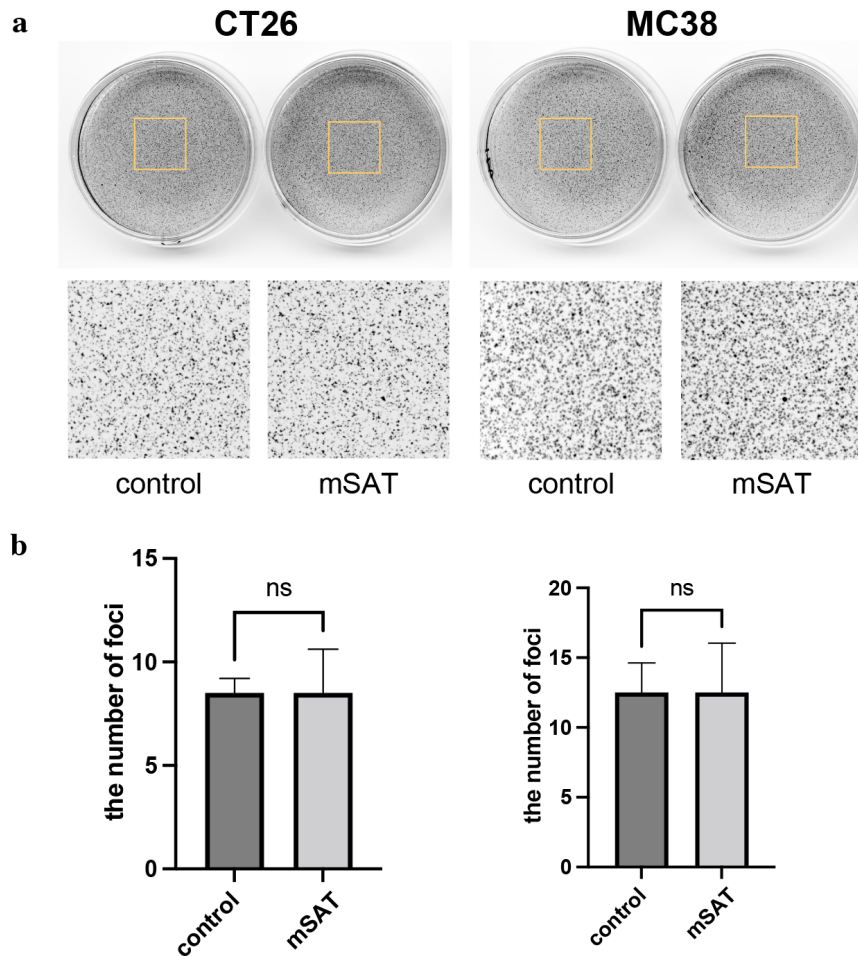


図4 Soft agar assay による mSAT 過剰発現細胞とコントロール細胞の足場非依存性細胞増殖能の比較

a mSAT 過剰発現ベクターまたはコントロールベクターを導入した CT26 細胞(左)と MC38 細胞(右)のコロニー形成プレートの写真。下部写真は四角で囲った領域の拡大図を表す。**b** CT26 細胞と MC38 細胞における mSAT 過剰発現細胞とコントロール細胞のコロニー数の比較。コロニーを foci として計測。CT26 細胞と MC38 細胞において、mSAT 過剰発現細胞とコントロール細胞との間に有意な差を示さなかった。スチューデントの t 検定を使用(ns, not significant)。(n=2)

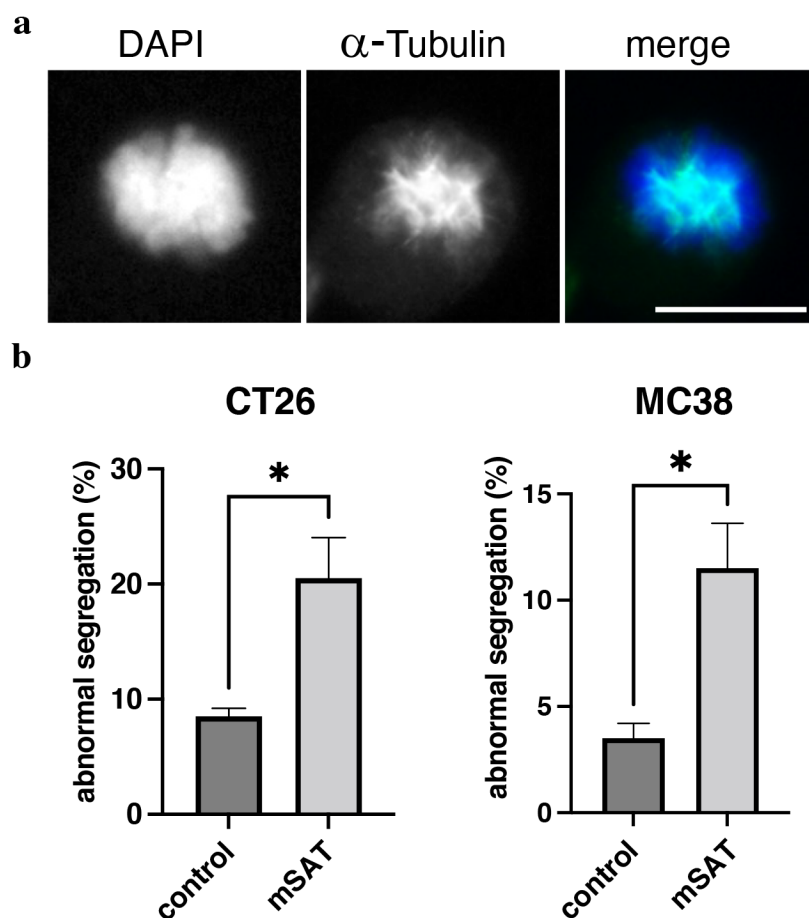


図5 mSAT 過剰発現細胞における有糸分裂異常の頻度

a mSAT 過剰発現により abnormal segregation を起こした CT26 細胞像。DAPI 染色(左、青)、 α tubulin 染色(中央、赤)、マージ像(右)。スケールバーは 10 μ m を示す。**b** CT26 細胞(左)と MC38 細胞(右)の mSAT 過剰発現細胞とコントロール細胞における有糸分裂異常の発生率。100 個の有糸分裂細胞を計測した。エラーバーは標準偏差を示し、スチューデントの t 検定の結果を示す(*, $p < 0.05$)。

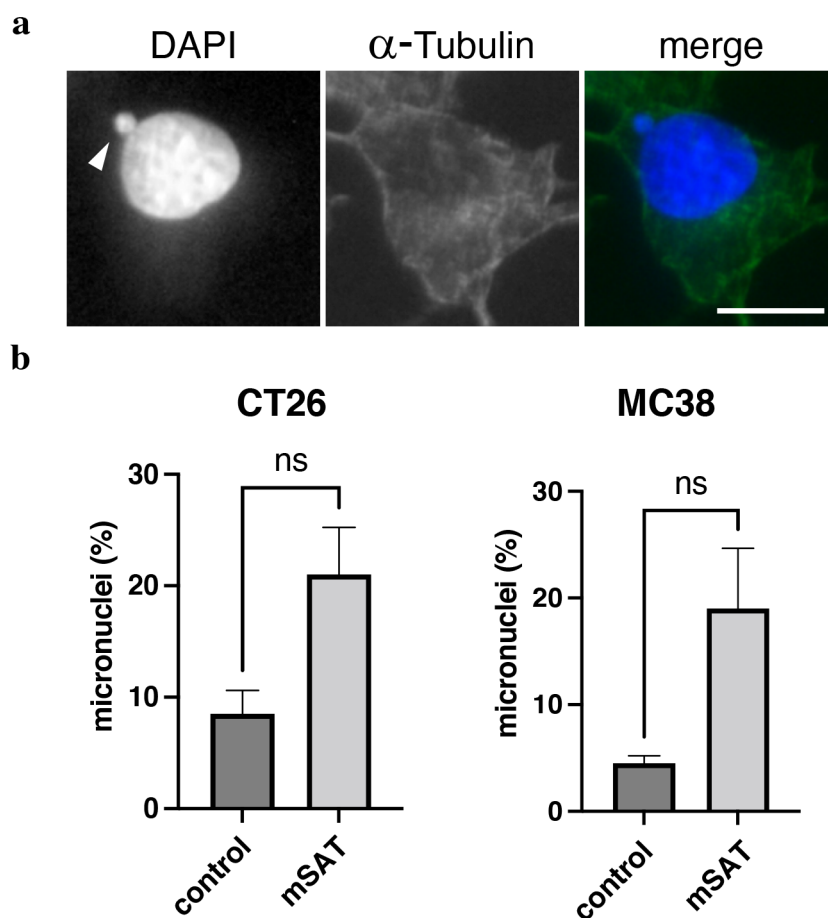


図6 mSAT 過剰発現細胞における Micronuclei の頻度

a mSAT 過剰発現により Micronucleus(微小核、矢頭)が形成された CT26 細胞像。DAPI 染色(左、青)、 α tubulin 染色(中央、緑)、マージ像(右)。スケールバーは 10 μ m を示す。**b** CT26 細胞(左)と MC38 細胞(右)の mSAT 過剰発現細胞とコントロール細胞における Micronuclei の発生率。100 個の有糸分裂細胞を計測した。エラーバーは標準偏差を示し、スチューデントの t 検定の結果を示す(ns, not significant)。

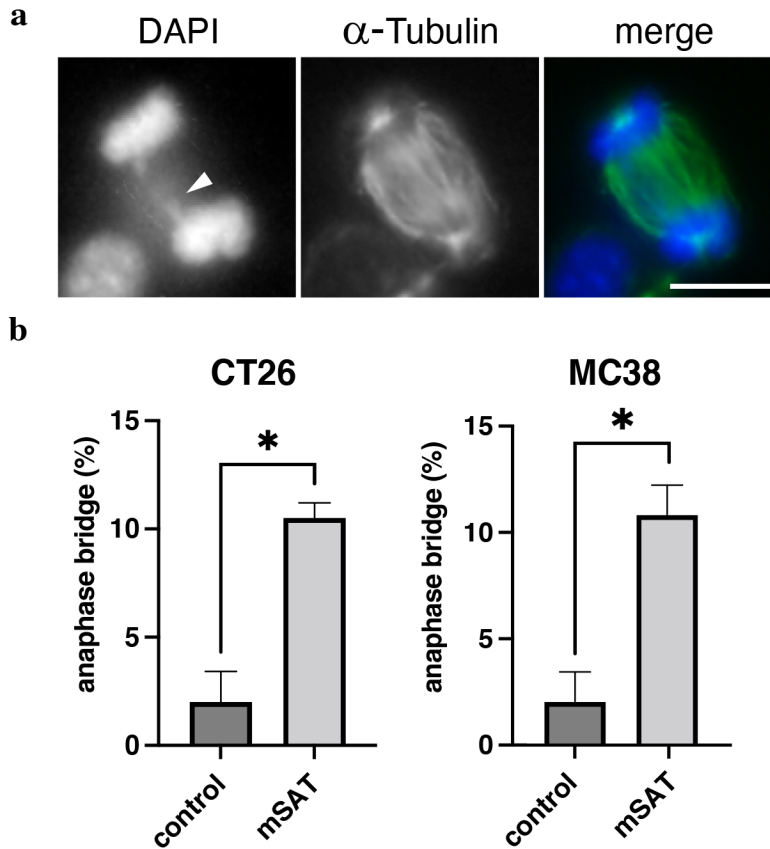


図7 mSAT 過剰発現細胞における anaphase bridge の頻度

a mSAT 過剰発現により anaphase bridge(矢頭)が形成された CT26 細胞像。DAPI 染色(左、青)、 α tubulin 染色(中央、緑)、マージ像(右)。スケールバーは 10 μ m を示す。**b** CT26 細胞(左)と MC38(右)細胞の mSAT 過剰発現細胞とコントロール細胞における anaphase bridge の発生率。100 個の有糸分裂細胞を計測した。エラーバーは標準偏差を示し、スチューデントの t 検定の結果を示す(*, $p < 0.05$)。

mSAT 過剰発現による DNA 損傷応答

DNA ダメージにより二重鎖 DNA に切断が生じると、ヒストン H2A タンパク質のバリエーションである H2AX において、139 番目のセリンがリン酸化される。このリン酸化 H2AX (γ H2AX) は、DNA ダメージの鋭敏なマーカーとして知られている。mSAT を過剰発現させた細胞において、DNA 二重鎖切断が生じているかどうかを確認するために、抗 γ H2AX 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。CT26 細胞と MC38 細胞ともに、mSAT 過剰発現細胞ではコントロール細胞と比較して、 γ H2AX 陽性となる細胞の数が有意に増加した(図 8)。この結果は、mSAT の過剰発現により DNA 二重鎖切断という DNA 損傷が誘導されることを示唆している。

mSAT 過剰発現細胞の薬剤感受性の検討

CT26 細胞、MC38 細胞の mSAT 過剰発現細胞およびコントロール細胞において、各種濃度(0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0 μ M)のイリノテカン(CPT-11)含有培地で培養し、48 時間後の生細胞数から IC₅₀ を決定した。CT26 細胞および MC38

細胞の細胞増殖は、それぞれ用量依存的に阻害された(図 9)。50%阻害濃度 IC_{50} を用量反応曲線より算出し、統計学的比較を行った。CT26 細胞では、コントロールと比較して mSAT の過剰発現は、CPT-11 薬剤感受性に影響を及ぼさなかった(IC_{50} : コントロール: $0.261 \mu M$ vs. mSAT: $0.256 \mu M$, $p = 0.955$)。一方で、MC38 細胞では、mSAT の過剰発現は CPT-11 の薬剤感受性を上昇させた(IC_{50} : コントロール: $0.814 \mu M$ vs mSAT: $0.332 \mu M$, $p = 0.003$)。MC38 細胞は、CIN はないがマイクロサテライト不安定性を有する細胞株、一方の CT26 細胞は CIN を有し、マイクロサテライト不安定性はない細胞株として知られている。MC38 細胞に mSAT 過剰発現による染色体不安定性ストレスを与えることで、メカニズムの異なるマイクロサテライト不安定性ストレスと組み合わせさせて CPT-11 薬剤感受性が高まっているのではないかと考えられた。

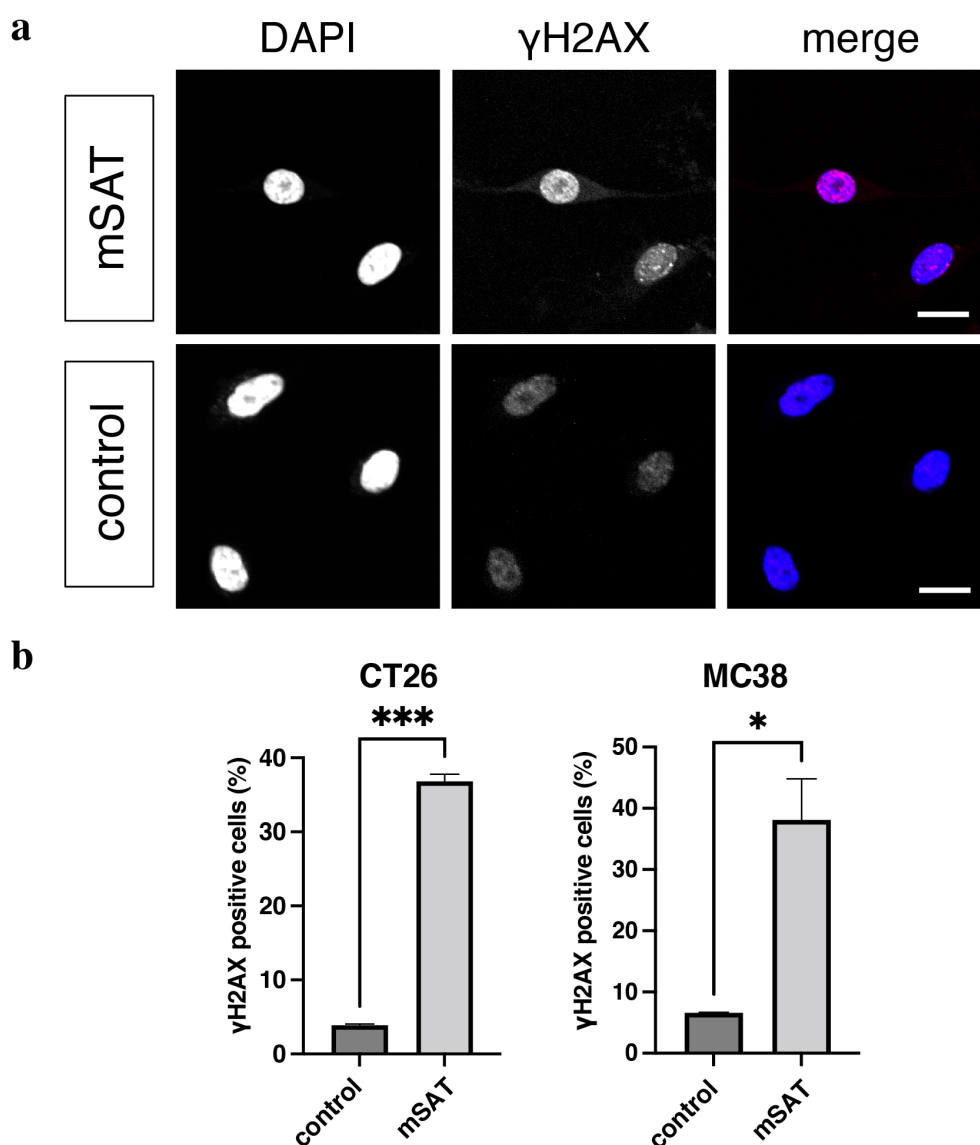


図 8 mSAT 過剰発現による DNA 二重鎖切断細胞の増加

a mSAT を過剰発現した CT26 細胞における γ H2AX 染色像。DAPI 染色(左、青)、 γ H2AX 染色(中央、赤)、マージ像(右)。コントロール細胞(下段)に比べて、mSAT 過剰発現細胞(上段)では DAPI 染色で示される核内に γ H2AX の強いドット状の染色が観察された。スケールバーは 10 μ m を示す。**b** CT26 細胞(左)と MC38 細胞(右)における γ H2AX 陽性細胞の割合。 γ H2AX の強い蛍光を発する細胞を DNA 二重鎖切断の生じている細胞として評価した。

1 視野中の約 30 個の細胞で計測。エラーバーは標準偏差を示し、スチューデントの t 検定の結果を示す(*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$)。

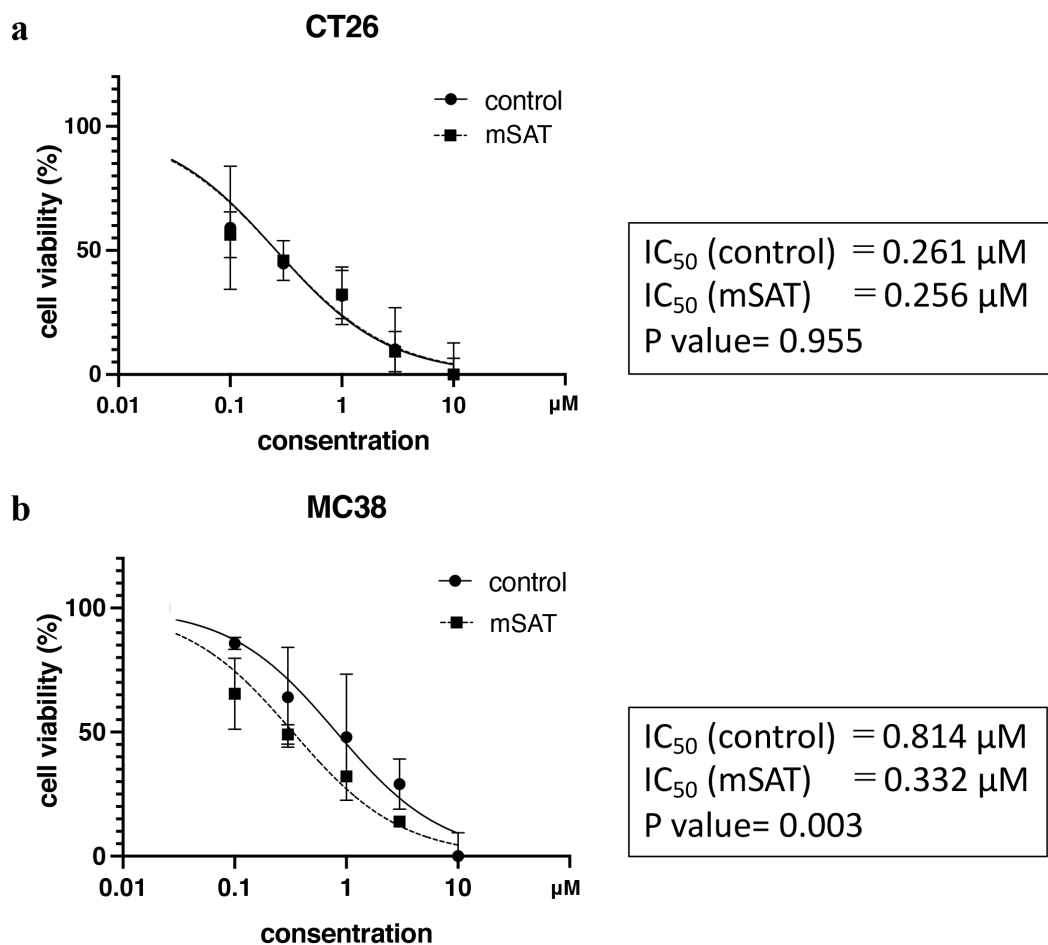


図9 CPT-11 投与による mSAT 過剰発現細胞とコントロール細胞の用量反応曲線の比較

aCT26 細胞における用量反応曲線。**b**MC38 細胞における用量反応曲線。細胞生存率は CPT-11(0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0 μM)含有培地で培養 48 時間後に測定した。 IC_{50} 値は 4 パラメータロジスティックモデルを用いて求め、用量反応曲線は二乗和の F 検定を用いて比較した。

考察

本研究では、マウス大腸癌細胞株である CT26 細胞と MC38 細胞に、レトロウイルスを用いてメジャーサテライト転写産物(mSAT)を過剰発現させ、mSAT のがんにおける機能を解析した。これまでの先行研究においてサテライト RNA の過剰発現が発癌のイニシエーションになっていることが示唆されており、CT26 細胞と MC38 細胞において mSAT 過剰発現による細胞増殖能の亢進や足場非依存性増殖能の亢進があると予想したが、mSAT 過剰発現による増殖への影響は認められなかった。すでにがん化した細胞においては、mSAT は増殖への影響を及ぼさなかったと考えられる。また、DNA 損傷応答の亢進が mSAT 過剰発現によって認められており、これも増殖能へ影響すると予想された。DNA 損傷応答が亢進することで、細胞周期が停止するため、mSAT 過剰発現細胞での増殖が低下すると予想したが、細胞増殖能には影響しなかった。サテライト RNA を過剰発現させた実験で細胞周期チェックポイントが阻害されることが報告されている²³。それゆえ DNA 損傷応答が亢進したにもかかわらず細胞増殖への影響が少なかった理由として、mSAT 過剰発現によって細胞周期チェックポイントの阻害されたことが同時に生じていたため増殖への影響は限定的であったと考えられた。

岸川らは mSAT がマウス膵臓癌細胞株で染色体およびゲノムの不安定性を引き起こすことを示している^{37,38}。本研究では CIN 誘導の直接的な検証できていないものの、マウス大腸癌細胞株において mSAT の過剰発現によって CIN 誘導の前段階と考えられる有糸分裂異常の増加と DNA 損傷応答の亢進が認められた。この結果は、マウス大腸癌においても SAT の発現増加が CIN 誘導の引き金となりうることを示唆する。

薬剤感受性の検討では、マイクロサテライト不安定性(MSI)をもつ MC38 細胞に対するトポイソメラーゼ I 阻害剤 CPT-11 の薬剤感受性を高めることが示された。一方で、マイクロサテライト安定性(MSS)を特徴とする CT26 細胞は、CPT-11 による薬剤感受性の変化を示さなかった。このことは、mSAT 過剰発現と MSI を有するがんにおいて CPT-11 が有効である可能性を示す。多くの論文^{9,10,11,12}で、薬剤耐性の獲得は CIN によって誘発されると報告されている。Zhang らの報告¹⁷と同様に、本研究では CPT-11 に対する薬剤感受性が増加したという結果と同様となった。Swanton らの報告では CIN は、2 つの異なる薬剤に対する感受性の変化と関連していると報告している。卵巣がん患者で、カルボプラチン(プラチナ抗がん剤)の感受性は CIN によって増加するが、パクリタキセル(微小管安定化阻害剤)では逆に耐性が見られたことを示したが¹²、CIN による特定の薬剤の薬剤感受性の誘導の根底にある明確なメカニズムについての言及はなかった。

Zaki らは、染色体分配異常が、腫瘍の治療効果に重要な影響を与えることを明らかにした。染色体分配異常により起こる anaphase bridge などは、広範な DNA 損傷をきたし、さらに 5-FU と放射線照射の併用によって腫瘍に対する治療効果を高めたと報告している¹⁵。本研究でも Abnormal segregation、Micronuclei や anaphase bridge など有糸分裂異常を持つ細胞の割合は、コントロール細胞と比較して mSAT 過剰発現細胞で増加しており、mSAT による染色体分配異常が薬剤の感受性に関与している可能性が考えられる。

細胞分裂に伴う DNA 複製に際して、2 本鎖 DNA が解離することにより Y 字型の複製フォークを形成する。複製フォークを起点とする DNA 複製は、dNTP の枯渇やマイトマイシン C 処理などによる DNA 鎖架橋、がん遺伝子の活性化などにより阻害される。このような DNA 複製の停滞は複製ストレスと呼ばれている³⁹。複製ストレスによる DNA 複製の停滞は、CIN の原因となる。BRCA1 や PARP をはじめとするいくつかのタンパク質は複製フォークの安定化と DNA 修復に寄与することが知られている⁴⁰。一方で、サテライト RNA の過剰発現は、BRCA1 複合体の複製フォークへの結合を阻害し、さらに複製フォークにおける RNA-DNA ハイブリッドの形成を誘導することにより染色体の不安定性を引き起こすことが報告されている²⁵。加えて、CPT-11 によるトポイソメラーゼ I の阻害は、複製フォークの停止を介してアポトーシスを誘導することが報告されている^{41,35}。mSAT の過剰発現が CPT に対する感受

性を増強するメカニズムとしては、DNA 複製のプロセスにおける DNA 修復阻害およびトポイソメラーゼ I の阻害の両者による相乗効果が考えられた。

今回の検討で用いた CT26 細胞と MC38 細胞は同様に染色体分配異常や DNA 損傷応答を誘導されていたが、CT26 細胞では薬剤感受性に差を認めず、MC38 細胞のみで感受性が高まった。CT26 細胞はマイクロサテライト安定性の癌細胞株であり、もともと CPT-11 に対する薬剤感受性も高く、CT26 細胞のコントロールの細胞 IC₅₀ は 0.261 μ M であった。一方で MC38 細胞のコントロール細胞の IC₅₀ は 0.814 μ M で CT26 細胞に比べて MC38 の薬剤感受性が低かった。

CT26 細胞はもともとの薬剤感受性が高かったため、mSAT 過剰発現による染色体分配異常の増加や DNA 損傷応答の影響を受けにくく、薬剤感受性に差が出なかったと考えられた。一方でもともと CPT-11 に対する薬剤感受性の低い MC38 細胞では、mSAT による影響を受けて薬剤感受性が高まったと推察する。

mSAT 過剰発現によって MSI を有するマウス大腸癌細胞株 MC38 の染色体分配異常と DNA 損傷応答を誘導するとともに、CPT-11 の感受性を高めたが、細胞死に至るまでのメカニズムについては不明な点も多く、今後も更なる検証が必要である。

終わりに

マウスの大腸癌細胞株においてサテライト RNA を過剰発現させると、染色体分配異常の増加と DNA 損傷応答の亢進を誘導され、CIN に関連することが示唆された。さらにマイクロサテライト不安定性(MSI)を有する MC38 細胞株に対しては、サテライト RNA の過剰発現がトポイソメラーゼ I 阻害剤の薬剤感受性を高めることが示された。

略語一覧

CIN: chromosomal instability

SAT: satellite alpha transcripts

mSAT: major satellite transcripts

CPT-11: irinotecan

FBS: Fetal bovine serum

PBS: phosphate buffered saline

MSS: microsatellite stable

MSI: microsatellite instability

DMSO: dimethyl sulfoxide

RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction

BRCA: breast cancer gene

PARP: poly-ADP-ribose polymerases

謝辞

本研究は自治医科大学大学院医学研究大学院生補助金、日本学術振興会科研費から助成を受けたものであり、ご支援いただいた関係各位に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、ウイルスベクター作製や細胞へのインフェクションの手技をはじめとする、実験の詳細なご指導をいただいた、自治医科大学大学院 生体分子科学 多胡憲治講師、太田聡講師、柳澤健教授、研究全般にわかりご指導いただいた、自治医科大学附属さいたま医療センター 外科系総合医学 力山敏樹教授、そして終始懇切かつ情熱的なご指導を賜りました同 鈴木浩一准教授に心から感謝申し上げます。

また研究に付随する事務手続きや実験試薬、器具の準備や実験の補助など研究に直接的間接的に多大な貢献をしていただいた自治医科大学附属さいたま医療センター 研究補助員の石坂依津子様、自治医科大学大学院 生体分子科学 研究補助員の大村千尋様に厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 1 Ong, J. Y. & Torres, J. Z. Phase Separation in Cell Division. *Mol Cell***80**, 9-20, doi:10.1016/j.molcel.2020.08.007 (2020).
- 2 Boveri, T. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. . (1914).
- 3 Holland, A. J. & Cleveland, D. W. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol***10**, 478-487, doi:10.1038/nrm2718 (2009).
- 4 Kops, G. J., Weaver, B. A. & Cleveland, D. W. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer***5**, 773-785, doi:10.1038/nrc1714 (2005).
- 5 Siegel, J. J. & Amon, A. New insights into the troubles of aneuploidy. *Annu Rev Cell Dev Biol***28**, 189-214, doi:10.1146/annurev-cellbio-101011-155807 (2012).
- 6 Bach, D. H., Zhang, W. & Sood, A. K. Chromosomal Instability in Tumor Initiation and Development. *Cancer Res***79**, 3995-4002, doi:10.1158/0008-5472.Can-18-3235 (2019).
- 7 Carter, S. L. *et al.* Absolute quantification of somatic DNA alterations in human cancer. *Nat Biotechnol***30**, 413-421, doi:10.1038/nbt.2203 (2012).
- 8 Cimini, D., Fioravanti, D., Salmon, E. D. & Degross, F. Merotelic kinetochore orientation versus chromosome mono-orientation in the origin of lagging chromosomes in human primary cells. *J Cell Sci***115**, 507-515 (2002).
- 9 Lee, A. J. X. *et al.* Chromosomal Instability Confers Intrinsic Multidrug Resistance. *Cancer Research***71**, 1858-1870, doi:10.1158/0008-5472.Can-10-3604 (2011).
- 10 Bakhoun, S. F., Danilova, O. V., Kaur, P., Levy, N. B. & Compton, D. A. Chromosomal instability substantiates poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res***17**, 7704-7711, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2049 (2011).
- 11 Carter, S. L., Eklund, A. C., Kohane, I. S., Harris, L. N. & Szallasi, Z. A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat Genet***38**, 1043-1048, doi:10.1038/ng1861 (2006).
- 12 Swanton, C. *et al.* Chromosomal instability determines taxane response. *Proc Natl Acad Sci USA***106**, 8671-8676, doi:10.1073/pnas.0811835106 (2009).
- 13 Jamal-Hanjani, M. *et al.* Extreme chromosomal instability forecasts improved outcome in ER-negative breast cancer: a prospective validation cohort study from the TACT trial. *Ann Oncol***26**, 1340-1346, doi:10.1093/annonc/mdv178 (2015).
- 14 Roylance, R. *et al.* Relationship of extreme chromosomal instability with long-term survival in a retrospective analysis of primary breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev***20**, 2183-2194, doi:10.1158/1055-9965.Epi-11-0343 (2011).
- 15 Zaki, B. I., Suriawinata, A. A., Eastman, A. R., Garner, K. M. & Bakhoun, S. F. Chromosomal instability portends superior response of rectal adenocarcinoma to chemoradiation therapy. *Cancer***120**, 1733-1742, doi:10.1002/cncr.28656 (2014).

- 16 Bakhoun, S. F. *et al.* Numerical chromosomal instability mediates susceptibility to radiation treatment. *Nat Commun* **6**, 5990, doi:10.1038/ncomms6990 (2015).
- 17 Zhang, W. *et al.* Centromere and kinetochore gene misexpression predicts cancer patient survival and response to radiotherapy and chemotherapy. *Nat Commun* **7**, 12619, doi:10.1038/ncomms12619 (2016).
- 18 Chan, F. L. & Wong, L. H. Transcription in the maintenance of centromere chromatin identity. *Nucleic Acids Res* **40**, 11178-11188, doi:10.1093/nar/gks921 (2012).
- 19 John, B. & Miklos, G. L. Functional aspects of satellite DNA and heterochromatin. *Int Rev Cytol* **58**, 1-114, doi:10.1016/s0074-7696(08)61473-4 (1979).
- 20 Probst, A. V. & Almouzni, G. Heterochromatin establishment in the context of genome-wide epigenetic reprogramming. *Trends Genet* **27**, 177-185, doi:10.1016/j.tig.2011.02.002 (2011).
- 21 Volpe, T. A. *et al.* Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* **297**, 1833-1837, doi:10.1126/science.1074973 (2002).
- 22 Ting, D. T. *et al.* Aberrant Overexpression of Satellite Repeats in Pancreatic and Other Epithelial Cancers. *Science* **331**, 593-596, doi:10.1126/science.1200801 (2011).
- 23 Zhu, Q. *et al.* BRCA1 tumour suppression occurs via heterochromatin-mediated silencing. *Nature* **477**, 179-184, doi:10.1038/nature10371 (2011).
- 24 Ichida, K. *et al.* Overexpression of satellite alpha transcripts leads to chromosomal instability via segregation errors at specific chromosomes. *Int J Oncol* **52**, 1685-1693, doi:10.3892/ijo.2018.4321 (2018).
- 25 Zhu, Q. *et al.* Heterochromatin-Encoded Satellite RNAs Induce Breast Cancer. *Mol Cell* **70**, 842-853 e847, doi:10.1016/j.molcel.2018.04.023 (2018).
- 26 Bush, N. G., Evans-Roberts, K. & Maxwell, A. DNA Topoisomerases. *EcoSal Plus* **6**, doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0010-2014 (2015).
- 27 Shamma, M. & St Georgiev, V. Camptothecin. *J Pharm Sci* **63**, 163-183, doi:10.1002/jps.2600630203 (1974).
- 28 Legarza, K. & Yang, L. X. Novel camptothecin derivatives. *In Vivo* **19**, 283-292 (2005).
- 29 Heinemann, V. *et al.* FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **15**, 1065-1075, doi:10.1016/s1470-2045(14)70330-4 (2014).
- 30 Cremolini, C. *et al.* FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. *Lancet Oncol* **16**, 1306-1315, doi:10.1016/s1470-2045(15)00122-9 (2015).
- 31 Douillard, J. Y. *et al.* Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* **355**, 1041-1047, doi:10.1016/s0140-6736(00)02034-1 (2000).

- 32 Saltz, L. B. *et al.* Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med* **343**, 905-914, doi:10.1056/nejm200009283431302 (2000).
- 33 Boland, C. R. & Goel, A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* **138**, 2073-2087.e2073, doi:10.1053/j.gastro.2009.12.064 (2010).
- 34 Vilar, E. & Gruber, S. B. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol* **7**, 153-162, doi:10.1038/nrclinonc.2009.237 (2010).
- 35 Le, D. T. *et al.* Phase II Open-Label Study of Pembrolizumab in Treatment-Refractory, Microsatellite Instability-High/Mismatch Repair-Deficient Metastatic Colorectal Cancer: KEYNOTE-164. *J Clin Oncol* **38**, 11-19, doi:10.1200/jco.19.02107 (2020).
- 36 Nilsson, J. A. *et al.* Targeting ornithine decarboxylase in Myc-induced lymphomagenesis prevents tumor formation. *Cancer Cell* **7**, 433-444, doi:10.1016/j.ccr.2005.03.036 (2005).
- 37 Kishikawa, T. *et al.* Satellite RNAs promote pancreatic oncogenic processes via the dysfunction of YBX1. *Nature Communications* **7**, doi:10.1038/ncomms13006 (2016).
- 38 Kishikawa, T. *et al.* Satellite RNA Increases DNA Damage and Accelerates Tumor Formation in Mouse Models of Pancreatic Cancer. *Molecular Cancer Research* **16**, 1255-1262, doi:10.1158/1541-7786.Mcr-18-0139 (2018).
- 39 Mazouzi, A., Velimezi, G. & Loizou, J. I. DNA replication stress: causes, resolution and disease. *Exp Cell Res* **329**, 85-93, doi:10.1016/j.yexcr.2014.09.030 (2014).
- 40 Trenner, A. & Sartori, A. A. Harnessing DNA Double-Strand Break Repair for Cancer Treatment. *Front Oncol* **9**, 1388, doi:10.3389/fonc.2019.01388 (2019).
- 41 Aris, S. M. & Pommier, Y. Potentiation of the novel topoisomerase I inhibitor indenoisoquinoline LMP-400 by the cell checkpoint and Chk1-Chk2 inhibitor AZD7762. *Cancer Res* **72**, 979-989, doi:10.1158/0008-5472.Can-11-2579 (2012).