

2018年度 課程博士学位論文

熱ショックによる紡錘体チェックポイント活性化を介した細胞分裂停止と
熱ショックタンパク質Hsp105の関与

生化学分野 柿花 采那

2018年度 課程博士学位論文

熱ショックによる紡錘体チェックポイント活性化を介した細胞分裂停止と
熱ショックタンパク質Hsp105の関与

生化学分野 柿花 采那

目次

略語表	4
要旨	6
緒論	8
本論	
第1章 熱ショックが細胞分裂進行に与える影響	
1-1 序論	14
1-2 実験方法	15
1-2-1 材料・機器	
1-2-2 細胞培養、細胞同調及び熱ショック処理	
1-2-3 ノックダウン	
1-2-4 フローサイトメトリーを用いた細胞周期解析	
1-2-5 細胞分裂進行の観察	
1-2-6 紡錘体チェックポイント [spindle assembly checkpoint (SAC)] 活性化の評価	
1-2-7 紡錘体配向性の評価	
1-2-8 小胞体ストレスの誘導及び評価	
1-2-9 統計解析	
1-3 実験結果	20
1-3-1 細胞周期に及ぼす熱ショックの影響	
1-3-2 細胞分裂進行に及ぼす熱ショックの影響	
1-3-3 熱ショックによるSAC活性化	
1-3-4 SAC活性化機構の検討	
1-4 考察	34
1-5 小括	37
第2章 Hsp105によるSAC制御	
2-1 序論	38
2-2 実験方法	39
2-2-1 材料・機器	
2-2-2 細胞培養、細胞同調及び熱ショック処理	
2-2-3 ノックダウン	
2-2-4 細胞分裂進行の観察	
2-2-5 SAC活性化の評価	

2-2-6	細胞増殖速度の評価	
2-2-7	免疫沈降法を用いたmitotic checkpoint complex (MCC) 形成の解析	
2-2-8	lagging chromosomeの評価	
2-2-9	統計解析	
2-3	実験結果	43
2-3-1	SAC活性化に及ぼすHsp105ノックダウンの効果	
2-3-2	Hsp105によるSAC制御機構	
2-3-3	lagging chromosomeの評価	
2-4	考察	62
2-5	小括	64
第3章 パクリタキセル感受性に対するHsp105の寄与		
3-1	序論	65
3-2	実験方法	66
3-2-1	材料・機器	
3-2-2	細胞培養、ノックダウン法およびパクリタキセル処理	
3-2-3	WST-8を用いた細胞生存の評価	
3-2-4	フローサイトメトリーを用いた細胞周期解析	
3-2-5	タイムラプスイメージングを用いたmitotic slippageの観察	
3-2-6	統計解析	
3-3	実験結果	68
3-3-1	Hsp105ノックダウンによるパクリタキセル抵抗性の獲得	
3-3-2	Hsp105ノックダウンによるパクリタキセル感受性低下の機序	
3-4	考察	72
3-5	小括	73
	総括	74
	引用文献	76
	謝辞	83

略語表

5-FU	5-fluorouracil
AIM-1	Aurora and Ipl1-like midbody-associated protein 1
APC/C	anaphase promoting complex/cyclosome
ATF6	activating transcription factor 6
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3 related protein
Bub1	Budding uninhibited by benzimidazole 1
Bub3	Budding uninhibited by benzimidazole 3
BubR1	Budding uninhibited by benzimidazole related 1
BSA	bovine serum albumin
Cdc20	cell division cycle protein 20
Cdk1	cyclin-dependent kinase 1
CENP-F	centromere protein F
Chk1	checkpoint kinase 1
Chk2	checkpoint kinase 2
CREST	calcinosis, Raynaud's phenomenon, esophageal dysfunction, sclerodactyly, telangiectasia
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
FBS	fetal bovine serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FoxM1	Forkhead box protein M1
G α i	Gi alpha subunit
GFP	green fluorescent protein
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1piperazineethanesulfonic acid
HSF1	heat shock factor 1
Hsc	heat shock cognate
Hsp	heat shock protein
IF	immunofluorescence staining
IP	immunoprecipitation
IRE1	inositol-requiring enzyme 1
Knl1	kinetochore scaffold 1
LGN	Leu-Gly-Asn repeat-enriched protein
Mad2	mitotic arrest defect 2
MCC	mitotic checkpoint complex
Mps1	monopolar spindle 1
NuMA	microtubule binding nuclear mitotic apparatus protein
PERK	PKR-like endoplasmic reticulum kinase
Plk1	polo-like kinase
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride

Ran	Ras-related nuclear protein
RCC 1	regulator of chromosome condensation 1
ROS	reactive oxygen species
SAC	spindle assembly checkpoint
siRNA	small interfering RNA
shRNA	short hairpin RNA
TBS	tris-buffered saline
WB	western blot analysis
WST-8	water soluble tetrazolium-8

課程博士学位論文 内容の要旨

専攻・課程： 薬学専攻博士課程

氏名 (英字名)： 柿花 采那 (Ayana Kakihana)

学位論文題目： 熱ショックによる紡錘体チェックポイント活性化を介した細胞分裂停止と熱ショックタンパク質 Hsp105 の関与

序章

生存環境下、生物は熱、紫外線、活性酸素種など、多くのストレスに曝されている。ストレスが細胞に与える影響は多数報告されており、熱によるタンパク質変性や、紫外線、活性酸素種による DNA ダメージなどがある。代表的な環境ストレスの1つである熱ショックは、タンパク質の熱変性を介した細胞形態、機能の異常のみならず、活性酸素種の産生を介した DNA ダメージを惹起し、細胞周期に影響する。また、熱ショックが中心体にダメージを与えると、紡錘体形成に異常が生じ、細胞分裂の停止や染色体数異常を引き起こすことが報告されている。染色体数異常はがん細胞の代表的な特徴であり、染色体の不均衡分配を伴う細胞分裂異常により形成する。しかし、熱ショックが細胞分裂に及ぼす影響は未解明の部分が多く、熱ショックによる染色体数異常の発生メカニズムは明らかになっていない。そこで本研究は、細胞分裂期における熱ショック応答の解明を目指した。

1章 熱ショックが細胞分裂に与える影響

細胞周期に対する熱ショックの影響を観察するために、子宮頸がん細胞 HeLa S3 細胞に 42°C の熱ショックを 30 分間与えた。免疫染色法で、DNA と微小管の形態に基づき分裂期細胞の割合 (mitotic index) を計測したところ、熱ショック直後には有意ではないものの mitotic index が減少し、その後 37°C で 3 時間培養すると有意に増加した。この結果から、熱ショックが細胞分裂に影響を与えることが示唆された。その影響を詳細に観察するために、可逆的 Cdk1 阻害剤 RO-3306 を用いて細胞を G2 期に停止させ、RO-3306 処理の最後 30 分間に 42°C の熱ショックを与えた。その後 RO-3306 を除去して細胞分裂の進行をタイムラプスイメージングにより観察したところ、熱ショックによる中期での細胞分裂停止が観察された。

全ての染色体に紡錘糸が正しく結合していないとき、紡錘体チェックポイント spindle assembly checkpoint (SAC) が活性化し、細胞分裂は中期で停止する。熱ショックによる細胞分裂停止に SAC が関与しているか検討するため、SAC 活性化時に動原体上に局在するタンパク質 BubR1 を観察したところ、熱ショックにより BubR1 が動原体に局在量している細胞の割合が有意に増加した。セリン/スレオニン、チロシン残基を基質とするキナーゼ Mps1 は SAC の活性化に必須であり、Mps1 による Kn1 のリン酸化が熱ショックにより亢進した。また、Mps1 阻害剤 AZ3146 を処理し SAC の活性化を抑制したところ、熱ショックによる細胞分裂停止の解除と BubR1 が動原体に局在している細胞の減少が観察された。更に、SAC に必須のタンパク質 Mad2 のノックダウンにより熱ショックによる細胞分裂停止が解除された。以上より、熱ショックにより SAC が活性化することが明らかになった。更に、熱ショックを与えた細胞において、紡錘体軸が水平でない、即ち紡錘体配向性異常を示す細胞が有意に増加した。プロテアソーム阻害剤を添加して細胞分裂を中期に停止させても紡錘体配向性異常は観察されなかったことから、中期停止が紡錘体配向性異常の原因ではなく、熱ショックにより紡錘体配向性異常が生じた結果、SAC が活性化し、細胞分裂が中期で停止したことが示唆された。

2章 Hsp105によるSAC制御

代表的な熱ショックタンパク質 Hsp70 が熱ショックから中心体を保護することが報告されている。そこで、Hsp70 阻害剤 VER155008 を処理した細胞に熱ショックを与え、細胞分裂進行を観察したが、熱による細胞分裂停止に影響はなかった。一方、Hsp70 スーパーファミリーの1つ Hsp105 のノックダウンは、BubR1 が動原体に局在している細胞の割合を有意に減少させるとともに、熱による細胞分裂停止を一部解除した。熱ショックではなく微小管重合阻害剤ノコダゾールを処理しても SAC が活性化し細胞分裂の進行が停止するが、Hsp105 のノックダウンはノコダゾールによる細胞分裂停止を一部解除した。これらの結果は、熱ショックの有無に関わらず、Hsp105 が SAC 活性化に関与することを示唆している。SAC 活性化には、Cdc20、BubR1、Mad2 及び Bub3 で構成される、mitotic checkpoint complex (MCC) と呼ばれる複合体形成が必要である。抗 Cdc20 抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、BubR1 や Mad2 と同様に Hsp105 が Cdc20 と共沈し、Mps1 阻害剤 AZ3146 を処理するとその共沈量が減少した。一方、Hsp105 をノックダウンしても、Cdc20 と結合する Mad2 や BubR1 量に変化はなかった。また、Hsp105 ノックダウンにより、染色体分配異常の1つ lagging chromosome が有意に増加し、熱ショック時には更に増加したことも、SAC 制御への Hsp105 の関与を支持する。以上より、Hsp105 は MCC 形成に影響はしないものの、Mps1 依存的に Cdc20 と結合することで SAC 制御に関与し、熱ショックにより引き起こされる染色体分配異常から細胞を保護することが明らかになった。

3章 パクリタキセル感受性に対する Hsp105 ノックダウンの影響

微小管重合阻害薬パクリタキセルは SAC を活性化させ、細胞分裂を停止させて細胞死を誘導する。Hsp105 をノックダウンした細胞にパクリタキセルを 48 時間処理すると、コントロール細胞の場合と比較して IC₅₀ が上昇する傾向にあったことから、パクリタキセル感受性への Hsp105 の関与が示唆された。0.01 µg/mL のパクリタキセルを 24 時間処理し、パクリタキセル除去後 3 日間培養すると、コントロール細胞では細胞死により経時的に細胞数が減少したが、Hsp105 のノックダウンにより生存細胞数が増加し、Mad2 のノックダウンよりも生存細胞数の増加は顕著であった。0.01 µg/mL のパクリタキセルを 24 時間処理し、その後半 12 時間をタイムラプスイメージングで観察したところ、コントロール細胞ではほとんどの細胞が細胞分裂を停止し、その後フローサイトメトリーで細胞死を観察したが、Hsp105 のノックダウンにより細胞分裂の終了が誘導された。これらの結果から、Hsp105 ノックダウンにより SAC に異常が生じ、細胞分裂を終了することで、パクリタキセルに対する感受性を低下させたと考えられる。

総括

以上より、(1) 42°C の熱ショックを細胞に 30 分与えると、紡錘体配向性異常が生じた結果、SAC が活性化し、細胞分裂が中期で停止すること、(2) 熱ショックを受けたまま細胞分裂が進行すると染色体分配異常が生じること、(3) SAC 制御に Hsp105 が関与し、熱ショックによる染色体分配異常を防ぐこと、(4) Hsp105 のノックダウンがパクリタキセル抵抗性を獲得させること、が明らかとなった。従って本研究は、細胞分裂期における熱ショック応答として SAC が活性化し、細胞分裂が停止することを明らかにしただけでなく、その防御機構に関与する新たな分子として Hsp105 を特定した。

本研究は細胞分裂期における熱ショック応答の一端を解明したのみならず、がん化学療法への温熱療法の併用の可能性と Hsp105 ノックダウンあるいは阻害と併用する抗がん剤の選択への知見を提供し、がん化学療法の治療戦略においても有益なものである。

緒論

生存環境下において、生物は熱、紫外線、活性酸素種 (ROS) など、多くのストレスに曝されている。ストレスが細胞に与える影響は多数報告されており、熱によるタンパク質変性や、紫外線、放射線などによる DNA ダメージなどがある^{1,2,3}。代表的な環境ストレスの1つである熱ショックは、外界から受けるだけでなく、自己免疫疾患や感染時などに発熱としても惹起される。感染時の発熱は、病原体の増殖を抑制するのみならず、白血球の貪食作用の賦活や T 細胞の産生増加など、自身の免疫の賦活にも重要である⁴。しかし、温度や時間などの条件が強くなると、熱ショックは細胞に様々な弊害を引き起こす。タンパク質の熱変性は代表的な障害であり、actin、vimentin の凝集、微小管の形態異常^{5,6}、中心体の機能的異常^{7,8}などを介して細胞の形態変化を誘導するほか、小胞体やゴルジ体の断片化⁹など、細胞小器官の機能に影響を及ぼす。また、小胞体内に変性タンパク質が蓄積すると、小胞体ストレス応答として、小胞体膜貫通型キナーゼである PERK や IRE1 のリン酸化、膜結合型転写因子の発現が誘導され、変性タンパク質の分解やリフォールディングの促進、アポトーシスや細胞周期停止が誘導される^{10,11,12,13}。更に、熱ショックは活性酸素種の産生を介して DNA ダメージを生じ、細胞周期に影響を及ぼす¹⁴。Chk2 や p38 のリン酸化¹⁵、p53 の発現を介した G1 停止¹⁶、Chk1 のリン酸化¹⁷ や Cdk1 の凝集¹⁸ を介した G2 期での停止、複製フォークの停止を介した S 期での停止¹⁹ などが、細胞周期への熱ショックの影響として報告されている。細胞分裂に関しては、熱ショックにより中心体がダメージを受けた結果、紡錘体形成に異常が生じて細胞分裂期が停止すること^{8,20,21}や、染色体数に異常が生じること^{7,22}が報告されている (図 1)。正しい染色体数を維持することは生命の維持に不可欠であり、染色体数異常は細胞のがん化や、ダウン症に代表される染色体数異常による先天性症候群の発生に関与する²³。染色体数異常が生じる代表的な原因は、染色体の不均等な分配を伴う細胞分裂異常である²⁴。しかし、細胞分裂に及ぼす熱ショックの影響は未解明の部分が多く、熱ショックによって染色体数異常が生じるメカニズムは明らかになっていない。

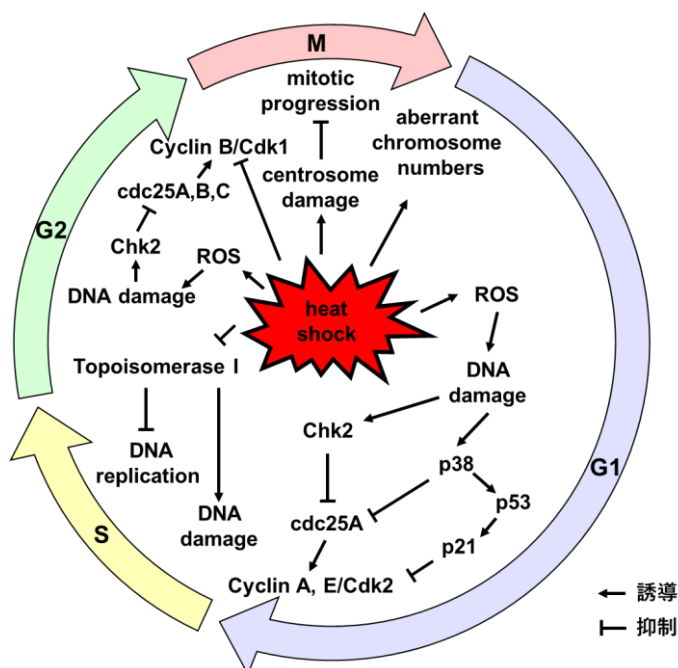


図 1 熱ショックは細胞周期に影響を及ぼす

熱ショックは Chk2 や p38 のリン酸化、p53 の発現、小胞体ストレスを介した G1 停止、Chk1 のリン酸化や Cdk1 の凝集を介した G2 停止、複製フォークの停止を介した S 期での停止、中心体へのダメージを介した細胞分裂期停止などを引き起こす。

細胞に熱ショックを与えると熱ショック応答として、熱ショックタンパク質の発現が誘導される。熱ショックタンパク質は、Hsp105(またはHsp110)、Hsp90、Hsp70、低分子Hspなどのいくつかのファミリーに分類され、熱ショックによってフォールディングに異常が起きたタンパク質の凝集を抑制し、タンパク質のリフォールディング、あるいは分解を行う²⁵。熱ショックタンパク質の中には熱ショックの有無に関わらず恒常的に発現し、タンパク質のフォールディング制御などに関与する分子も存在し(表1)、細胞周期制御への関与も報告されている。例えば、cyclin D1の発現はG1期からS期への進行に必要であるが、Hsc70はCdk1によってリン酸化されることでcyclin D1の分解を促進し、G1期からS期への進行を抑制的に制御している²⁶。また細胞分裂期において、Hsp70はPlk1によってリン酸化され、紡錘体形成に関与すること²⁷、動原体と接続する微小管の安定性維持に関与すること²⁸、Aurora Bのキナーゼ活性を制御する²⁹ことなどが報告されている。出芽酵母のHsp105/110ファミリータンパク質であるSse1はS期においてキネシン5を制御することで紡錘体長を調節する³⁰。また、脱リン酸化酵素Cdc25はCdkの脱リン酸化によりCdkを活性化するが、Hsp90はCdc25の分解に関与しており、G1期からS期への進行及び、G2期からM期への進行を調節する³¹ほか、細胞分裂期において染色体分配の開始を阻害する機構、紡錘体チェックポイント spindle assembly checkpoint (SAC)の活性化に必須のキナーゼMps1のリン酸化による活性化³²や中心体の成熟と紡錘体形成に必須のキナーゼPlk1の活性を制御する³³ことで、細胞分裂の進行を制御する。更に、Hsp27ファミリーの1つHspB8は細胞分裂期において、アクチンの動態や紡錘体配向性、染色体分配の制御に寄与する³⁴。このように、熱ショックタンパク質による細胞周期制御に関する報告は多数あるものの、細胞分裂期における熱ショック応答としての熱ショックタンパク質の役割に関しては、Hsp70による中心体保護機能が報告されているのみである^{8,21}。

表1 代表的な熱ショックタンパク質とその機能

ファミリー	主な Hsp	主な機能
small Hsp	Hsp27, HspB8	変性タンパク質の凝集抑制
DnaK	Hsp40	Hsp70のATP加水分解促進
chaperonin	Hsp60, Hsp10	ATP依存的フォールディング
Hsp70	Hsp70, Hsc70, GRP78	ATP依存的タンパク質フォールディング、変性タンパク質の凝集抑制とリフォールディング
Hsp90	Hsp90, GRP94	ステロイドホルモン受容体やキナーゼなどの制御
Hsp105(またはHsp110)	Hsp105, Apg-1, Apg-2	変性タンパク質の凝集抑制、Hsp70のヌクレオチド交換因子

細胞分裂は複製した染色体を2つの娘細胞に分配する過程である。細胞分裂は主に染色体の挙動をもとに、前期 (prophase)、前中期 (prometaphase)、中期 (metaphase)、後期 (anaphase)及び終期 (telophase)に分けられる。また、細胞質の分離を細胞質分裂 (cytokinesis) という (図2)。核膜崩壊と染色体の凝縮開始は「前期」、凝縮した染色体が微小管により赤道面に移動するまでは「前中期」、染色体が赤道面上に整列し、紡錘体が完成した細胞は「中期」に分類される。染色体の分配が「後期」の開始を意味し、染色体が紡錘体極に到達するのが「終期」に分類される。最後に収縮環によって細胞質が2つに分けられる細胞質分裂により細胞分裂が終了する。この娘細胞が次の細胞分裂を開始するまでの間を「間期」と呼ぶ。このように、細胞の形態は細胞分裂を通して劇的に変化するが、娘細胞に遺伝情報を正確に伝達するために、これらの変化の全てが多くの制御機構によって厳密に制御されている。

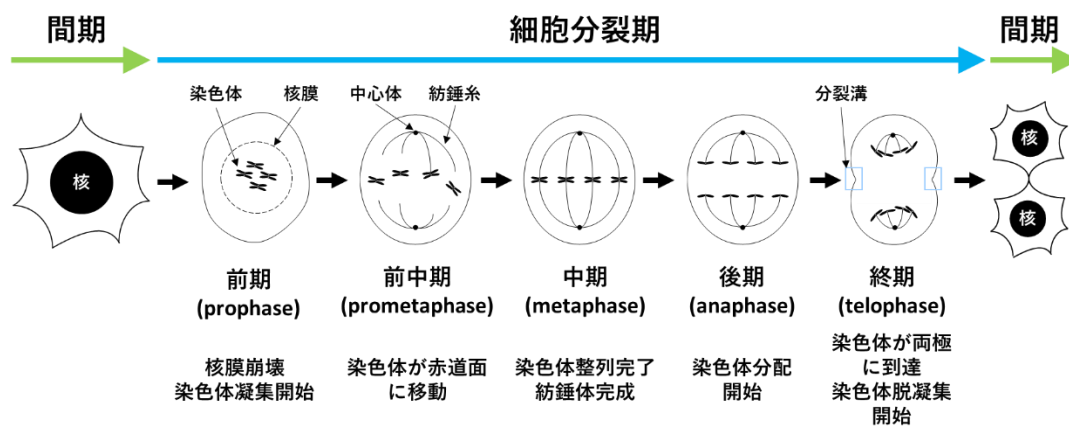


図2 細胞分裂は前期 (prophase)、前中期 (prometaphase)、中期 (metaphase)、後期 (anaphase)及び終期 (telophase)に分けられる。また、細胞分裂が終了してから次の細胞分裂までの間を間期と呼ぶ。核膜崩壊と染色体の凝縮開始を「前期」、凝縮した染色体が微小管により赤道面に移動するまでを「前中期」、染色体が赤道面上に整列し、紡錘体が完成した細胞を「中期」に分類する。染色体の分配が「後期」の開始を意味し、染色体が紡錘体極に到達するのが「終期」である。最後に収縮環によって細胞質が2つに分けられる細胞質分裂により細胞分裂が終了する。

細胞分裂後期の開始を決定する重要な役割を担う制御機構の1つがSACであり、全ての染色体に紡錘系が正しく結合するまで染色体分配が開始しないように、細胞分裂を停止させる。染色体分配の開始には、E3ユビキチンリガーゼAPC/C^{Cdc20} (anaphase promoting complex/cyclosome)の活性化が必要である。APC/Cによって種々のタンパク質がユビキチン化され分解すると、細胞分裂後期の開始に必要な制御が始まる。特に、APC/Cによってcyclin B1がユビキチン化され分解するとCdk1が不活性化し、またsecurinの分解の結果separaseが活性化すると、染色体同士を接着させているcohesinを分解する^{35,36,37} (図3)。

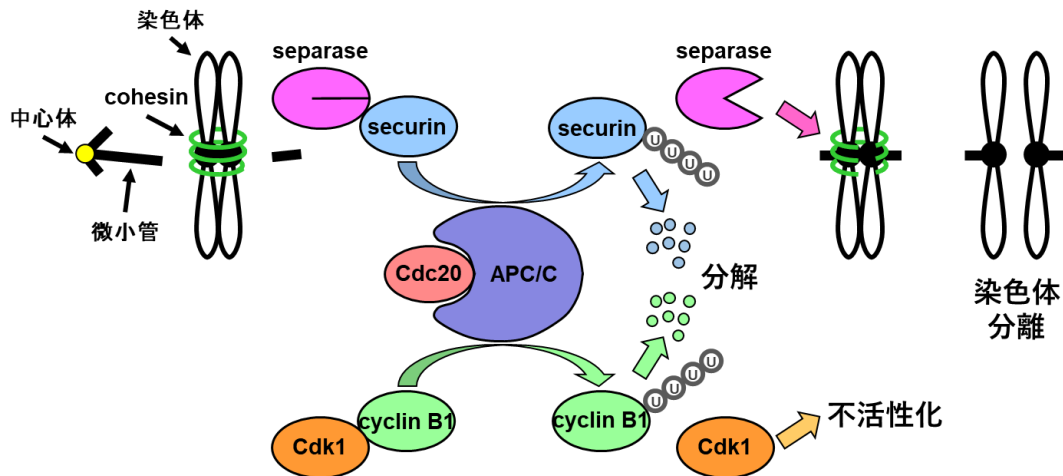


図3 細胞分裂後期進行には APC/C^{Cdc20} が活性化する必要である。APC/C によって cyclin B1 がユビキチン化され分解すると Cdk1 が不活性化し、また、securin の分解の結果 separase が活性化すると染色体同士を接着させている cohesin を分解し、染色体が分離できるようになる。

SAC は、この APC/C^{Cdc20} 抑制を介して、染色体分配の開始 (後期の開始) を抑制している。SAC で中心的な役割を担うのが、Cdc20、Mad2、BubR1 及び Bub3 の 4 つのタンパク質から構成される mitotic checkpoint complex (MCC) と呼ばれる複合体である。MCC の形成は動原体上で行われ、紡錘体チェックポイントの活性化は、まず Aurora B や Mps1 などのキナーゼが動原体上のチェックポイント関連タンパク質をリン酸化することから始まる。例えば、セリン/スレオニンキナーゼ Aurora B は 2 つの動原体間に局在し、Mps1 の動原体局在と活性化を介して SAC の活性化に関与する³⁸ だけでなく、Ndc80 や Mis12 などの動原体上の微小管が結合する部位をリン酸化して動原体と微小管の接続を不安定化することで、動原体と微小管が誤った接続をしたときに修正する機能を持つ^{39,40}。また、セリン/スレオニン、チロシンの両アミノ酸残基をリン酸化する dual specificity キナーゼ Mps1 は動原体上に局在する Knl1 の Met-Glu-Leu-Thr (MELT) 配列をリン酸化し、リン酸化された Knl1 は MCC 形成の足場として機能する^{41, 42}。Knl1 がリン酸化されると Bub3-Bub1 複合体が Knl1 上へ動員され、MCC 構成分子の BubR1-Bub3 及び Cdc20 がこの Bub1 に結合する。また、Bub1 に結合する Mad1-Mad2 複合体は、もう 1 分子の Mad2 を活性化して Cdc20-Mad2 複合体の形成を誘導する (図 4)。形成された MCC は、APC/C^{Cdc20} に結合してその機能を抑制し、securin や cyclin B1 の分解を抑制して、染色体分配の開始を阻害する⁴³ (図 5)。SAC に異常があると、全ての動原体に微小管が正しく結合していなくても APC/C^{Cdc20} が抑制されず、染色体の分配が開始する。このような細胞は、動原体に微小管が結合していない染色体や誤った結合をした染色体が存在したまま細胞分裂が進行し、G1 期へ進出するため、

微小管が正しく結合していない動原体

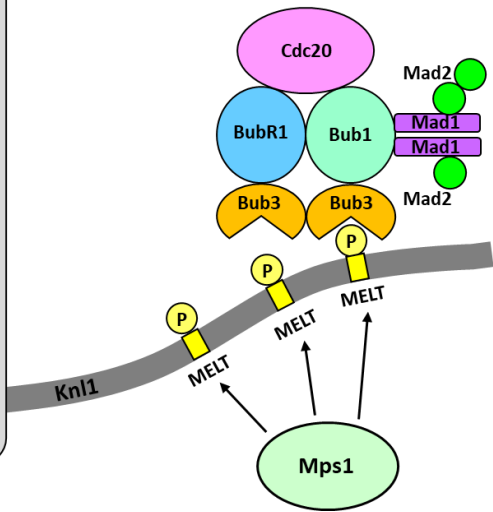


図4 セリン/スレオニン、チロシンの両アミノ酸残基をリン酸化する dual specificity キナーゼ Mps1 は動原体上に局在する Knl1 の MELT 配列をリン酸化する。Knl1 がリン酸化されると Bub3-Bub1 複合体が Knl1 上へ動員され、MCC 構成分子の BubR1-Bub3、Cdc20 はこの Bub1 に結合する。また、Bub1 に結合する Mad1-Mad2 複合体は、もう 1 分子の Mad2 を活性化して Cdc20-Mad2 複合体の形成を誘導する。

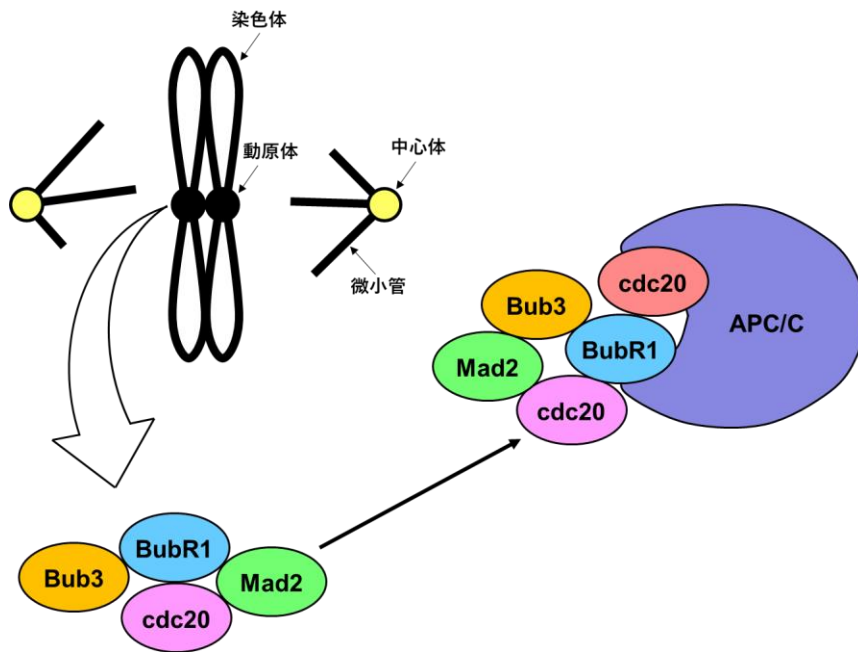


図5 動原体に微小管が正しく結合していない時、動原体上で MCC が形成され、この MCC は APC/C^{Cdc20} と結合し、その機能を抑制する。

娘細胞は染色体数異常を持つ。よって、紡錘体チェックポイントの異常は、染色体数異常を引き起こす原因の1つである。

上述のように、熱ショックによる染色体数異常の誘導メカニズムは明らかになっていない。しかし、染色体数異常が生じる代表的な原因は、SACの異常など染色体の不均等な分配を伴う細胞分裂異常であることから、熱ショックにより細胞分裂異常が生じた結果、染色体数が異常になる可能性が示唆される。また、熱ショックにさらされた分裂期細胞での熱ショックタンパク質の機能はHsp70の中心体保護機能以外に報告されていないが、これ以外にも分裂期細胞を熱ショックから保護する機能を持っている可能性がある。そこで本研究では、細胞分裂に及ぼす熱ショックの影響とそのときに機能する細胞分裂制御機構を明らかにすることで、細胞分裂期における熱ショック応答の意義の解明を目指した。

第1章 熱ショックが細胞分裂進行に与える影響

1-1 序論

熱ショックはタンパク質の熱変性やDNAダメージを介して細胞周期に影響を及ぼす。細胞分裂期においては、熱ショックが中心体ダメージを介して細胞分裂停止を引き起こすこと^{8, 20, 21}や、染色体数に異常が生じること^{7, 22}が報告されている。細胞分裂の異常は染色体数異常を誘導するが、そのメカニズムは複数存在する。SACに異常が生じると全ての染色体に紡錘糸が結合する前に染色体分配が開始されるため、染色体分配異常を介した染色体数異常が生じる。cohesinはS期で複製した染色体を細胞分裂後期が開始するまで分かれないう繋ぎ止めているが、cohesinに異常が生じた細胞では後期が開始する前に複製した2本の染色体が分離してしまうため、娘細胞に染色体数異常が生じる。紡錘体の両極から伸びた微小管が片方の動原体に結合する異常であるメロテリック結合が生じた場合、1つの動原体が両極から引っ張られた結果染色体分配が出来なくなるため、染色体数異常が生じる。また、多極紡錘体や中心体分離の遅延もメロテリック結合を介した染色体数異常を引き起こしうる。更に、細胞質分裂に異常が生じた場合には、細胞が2つに分離しないため、4倍体の染色体を持つG1期の細胞が生じる²³。このように染色体数異常を引き起こしうる細胞分裂の異常は複数存在するが、細胞分裂に及ぼす熱ショックの影響は未解明の部分が多く、熱ショックによって染色体数異常が生じるメカニズムは明らかになっていない。熱ショックによる細胞分裂異常が染色体異常の発生に関与する可能性を考え、1章では細胞分裂に及ぼす熱ショックの影響とその時に機能する細胞分裂制御機構を明らかにすることで、熱ショックにより染色体数異常が生じるメカニズムの解明を目指した。

1-2 実験方法

1-2-1 材料・機器

1) 細胞

細胞は子宮頸がん由来HeLa S3細胞 [独立行政法人 医薬基盤研究所 JCRB細胞バンク (大阪) より購入]、不死化ヒト網膜色素上皮由来hTERT RPE-1細胞 [CRL-4000 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) より購入] を使用した。

2) 抗体

以下に示す一次抗体をウエスタンブロット (WB) 及び免疫染色法 (IF) で使用した。

- ・マウスモノクローナル抗BubR1抗体 (IF 400倍希釈, K0169-3, clone 8G1, 株式会社医学生物学研究所, 名古屋)
- ・マウスモノクローナル抗PERK抗体 (WB 1000倍希釈, sc-377400, clone B-5, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)
- ・マウスモノクローナル抗 γ -tubulin抗体 (IF 400倍希釈, T6557, GTU-88, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- ・ラットモノクローナル抗 α -tubulin抗体 (IF 800倍希釈, MCA78G, clone YOL1/34, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- ・ヤギポリクローナル抗Lamin B1抗体 (WB 1000倍希釈, sc-6216, Santa Cruz Biotechnology)
- ・CREST, ヒト抗セントロメア抗体 (IF 400倍希釈, HCT-0100, Immunovision, Springdale, AR, USA,)

以下に示す二次抗体をウエスタンブロット及び免疫染色法で使用した。

ウエスタンブロットで使用した抗体

- ・西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ロバ抗マウスIgG抗体 (4000倍希釈, 715-035-151, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)
- ・西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ロバ抗ヤギIgG抗体 (4000倍希釈, sc-2056, Santa Cruz Biotechnology)

免疫染色で使用した抗体

- ・Alexa Fluor 488標識ロバ抗マウスIgG抗体 (400倍希釈, A21202, Life Technology, Waltham, MA, USA)
- ・Alexa Fluor 555標識ヤギ抗ラットIgG抗体 (800倍希釈, A21434, Life Technology)
- ・FITC標識抗ヒトIgG抗体 (400倍希釈, 732549, Beckman Coulter, Miami, FL, USA)

3) 試薬

可逆的Cdk1阻害剤RO-3306 (217699, Merck-Millipore; S7747, Selleckchem, Houston, TX, USA) は7~9 μ Mで20時間細胞に処理した。Mps1阻害剤AZ3146 (11170, Adooq Bioscience, Irvine, CA, USA) は2 μ Mで使用した。プロテアソーム阻害剤MG-132 (10012628, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA; 3175-v, ペプチド研究所, 大阪) は40 μ M で使用した。上記の試薬は全てジメチルスルホキシドに溶解した。Hoechst 33342 (Merck-Millipore, darmstadt, Germany) は1 μ Mで使用した。RNase (R4875-100G,

Sigma-Aldrich) は200 µg/ml、ヨウ化プロピジウム (164-16721, 富士フイルム和光純薬, 大阪) は50 µg/mlで使用した。糖鎖修飾阻害剤ツニカマイシンは2 µg/mLで使用した。上記の試薬は水に溶解した。

4) siRNA

MISSION siRNA Universal Negative Control (SIC-001, Sigma-Aldrich)及びMad2 siRNA (siMad2-1, Hs01_00042213, siMad2-2, Hs_00042212, Sigma-Aldrich) を使用した。

5) 機器

蛍光画像を取得するために40倍レンズ (NA, 0.75)、60倍油浸レンズ (NA, 1.42, Olympus, 東京) を搭載した倒立型リサーチ顕微鏡、IX-83 (Olympus) を使用した。蛍光観察用の光学系は、Hoechst 33342 の蛍光取得にU-FUNA cube (360–370 nm 励起波長, 420–460 nm 蛍光波長)、Alexa Fluor 488及びFITCの蛍光取得にU-FBNA cube (470–495 nm 励起波長, 510–550 nm 蛍光波長)、並びにAlexa Fluor 555の蛍光取得にU-FRFP cube (535–555 nm 励起波長, 570–625 nm 蛍光波長) を使用した。蛍光シグナルの過剰露光を避けるために、ランプ出力及び露光時間を設定し、それぞれの実験で一定に保って観察した。電気泳動槽はAE-6530M型 ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽 (AE-6530M, アトー株式会社, 東京) を使用し、転写装置はミニ転写装置 (NA-1510, 日本エイドー株式会社, 東京) を使用した。ウェスタンブロットにおける各種タンパク質の化学発光シグナルはimage analyzer ChemiDoc XRSplus (Bio-Rad) を用いて検出した。フローサイトメーターはBD FACSCalibur (BD Biosciences) を使用した。ライブセルイメージングはOperetta imaging system (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いて観察した。熱ショックを与えるために水浴 [ユニット恒温槽 サーモミンダーSDminiN (0068750-000, タイテック株式会社, 埼玉)]を使用した。

1-2-2 細胞培養、細胞周期同調及び熱ショック処理

HeLa S3細胞は37°C、5% CO₂の条件のインキュベーター内で、5% FBS、20 mM Hepes-NaOH (pH 7.4) (346-08235, 同仁化学研究所, 熊本)及び2 mM L(+)-glutamine (072-00523, 富士フイルム和光純薬) を添加したDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (05919, 日水製薬, 東京) を用いて培養した。hTERT RPE-1細胞は37°C、5% CO₂の条件のインキュベーター内で、0.01 mg/mL hygromycin B及び10% FBSを添加したDMEM/Ham's F-12 (08460-95, ナカライテスク, 京都) を用いて培養した。

HeLa S3細胞をG2/M境界で停止させ、その後細胞分裂期に細胞周期を同調するために、可逆的Cdk1阻害剤、RO-3306を7~9 µM で細胞に20時間処理した。hTERT RPE-1細胞はRO-3306を7 µM で20時間処理した。その後、予め37°Cに加温した、Ca²⁺ [CaCl₂ (06731-05, ナカライテスク)], Mg²⁺ [MgCl₂ (20909-42, ナカライテスク)] を添加したPBS [以下PBS(+)] で細胞を4回洗い、37°Cに加温した培地を添加することで、RO-3306によるG2/M境界での停止を解除し、細胞分裂を開始させた。細胞を中期で停止させる場合には、RO-3306除去30分後にプロテアソーム阻害剤MG-132を40 µM添加した。

細胞培養ディッシュをパラフィルムで密封し、42°C (HeLa S3細胞) または41°C (hTERT RPE-1細胞) に加温した水槽中に30分間沈め、急速に熱ショックを与えた。コントロール細胞は、37°Cに加温した水浴中に30分間沈めた。熱ショック処理後、ディッシュ内の培地を37°Cで温めた培地に置換し、37°Cのインキュベーター内でリカバリーを行った。

1-2-3 ノックダウン

HeLa S3細胞を4 穴プレートまたは24 穴プレートに播種した翌日に以下の処理を行った。Opti-MEM 20 μL にLipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を1 μL 、Opti-MEM 20 μL に20 pmol siRNAをそれぞれ添加し、室温で5分間静置した後2液を混合し、室温で30分静置することで、siRNAとリポソームの複合体を形成させた。ディッシュ内の培地を37°Cで温めた培地 (400 μL) に交換し、その培地にLipofectamine 2000とsiRNAの混合液を添加することによりトランスフェクションした。24時間後にタンパク質の発現量をウエスタンブロットで確認した。ウエスタンブロットで解析した細胞溶解液は、ホスファターゼ阻害薬 (50 μM NaF, 20 μM β -glycerophosphate, 10 μM Na_3VO_4) を添加したSDS-sample bufferを用いて細胞を溶解し作成した。タンパク質はSDS-PAGEで分離し、polyvinylidene difluoride membrane (Pall Corporation, Port Washington, NY, USA) に転写した。0.1% Tween-20及び5% BSA を添加したTris-buffered saline (TBS) でブロッキングした後、0.1% Tween-20及び3% BSAを添加したTBSで希釈した1次抗体と二次抗体をそれぞれ反応させた。リプロービングは、0.1% NaN_3 で西洋ワサビペルオキシダーゼを失活させた後行った。タンパク質はimage analyzer ChemiDoc XRSplusを用いて、Chemi-Lumi One L (07880-70, ナカライテスク) またはClarity (170-5061; Bio-Rad) を基質として検出した。

1-2-4 フローサイトメトリーを用いた細胞周期解析

細胞をPBSで1回洗浄した後、37°Cで5分間トリプシンを処理し、細胞を回収した。回収した細胞は-30°Cで70% EtOHを1時間処理し、固定した。200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNaseA 存在下、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ヨウ化プロピジウムを37°Cで30分間遮光下で反応させてDNAを染色した。サンプルは488 nmアルゴンレーザーを搭載したフローサイトメーター (BD FACSCalibur, BD Biosciences) を用いて測定し、FSC/SSCドットプロットから死細胞を除外して解析を行った。

1-2-5 細胞分裂進行の観察

PBSに溶解した4%ホルムアルデヒドを20分間処理し細胞を固定した。固定した細胞は3% BSA (019-23293, Wako) と0.1% saponin (101552601, Sigma) を添加したPBSでインキュベートした後、3% BSAと0.1% saponinを添加したPBSに希釈した一次抗体と二次抗体をそれぞれ1時間ずつ反応させた。DNAは3% BSAと0.1% saponinを添加したPBSに希釈した1 μM Hoechst 33342を20分間反応させ染色した。 α -tubulinとDNAを染色し、顕微鏡下で α -tubulinの形とDNAの凝集を指標に、細胞分裂の進行を以下のように評価した。前期; 核膜が崩壊し、染色体が凝集を開始する。前中期; 染色体が赤道面に移動開始すると共に紡錘体が形成される。中期; 染色体が赤道面に整列し、紡錘体が完成する。後期; 染色体分配が開始する。終期; 染色体が紡錘体極に到達する。細胞質分裂期; 分裂溝が完成する。赤, DNA, 緑, α -tubulin (図1)

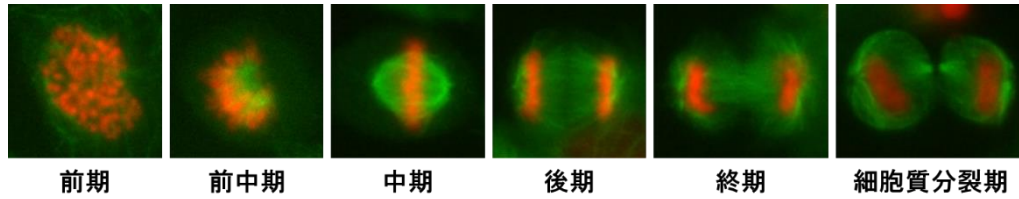


図1 免疫染色法による分裂期細胞の染色像

タイムラプスイメージングで観察を行う際には、RO-3306で同調した細胞に、RO-3306除去と同時に0.1 μ M Hoechst 33342を添加した。Hoechst 33342添加から10分以内に37°C、5% CO₂の条件のlive cell chamberに細胞を入れ、Operetta imaging system (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いてタイムラプスイメージングを行った。タイムラプスイメージングでは、DNAの凝集と細胞形態変化を指標に、細胞形態が丸くなると共に染色体凝集開始から染色体が赤道面に移動する時期を前期～前中期、赤道面に染色体が整列する時期を中期、染色体分配開始から分裂溝形成が完了するまでを後期～終期と判断し、細胞分裂の進行を評価した。上段, DNA, 下段, 明視野 (図2)

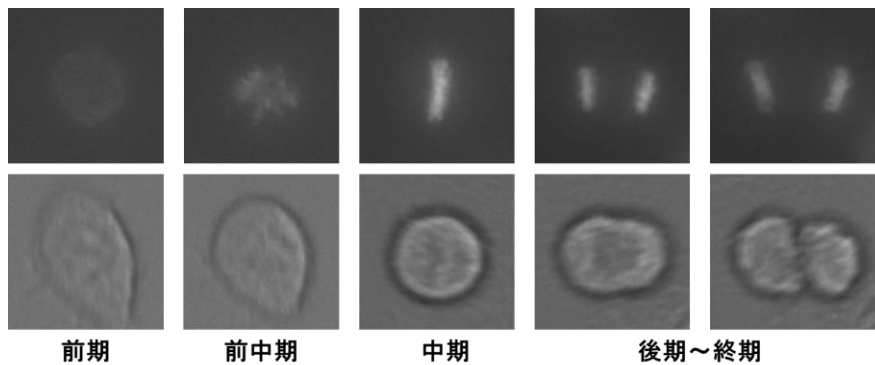


図2 タイムラプスイメージングによる分裂期細胞の観察像

1-2-6 紡錘体チェックポイント [spindle assembly checkpoint (SAC)] 活性化の評価

細胞をRO-3306で同調し、RO-3306除去と同時にSACに必須のキナーゼMps1の阻害剤、AZ3146を2 μ Mで細胞に添加した。より詳細に観察するために、細胞にsiContまたはsiMad2-1をトランスフェクションすることでSAC活性化に必須のタンパク質Mad2をノックダウンし、4時間後にRO-3306を処理した。その後、1-2-5の方法で細胞分裂の進行を評価した。

PBSに溶解した4%ホルムアルデヒドで細胞を7時間固定した後、PBSに溶解した0.2% Triton-X 100で5分間抽出を行った。その後BubR1とCRESTを染色した。BubR1はSAC活性化時に動原体上に局在するタンパク質であるため、動原体のマーカであるCREST上へのBubR1の局在を指標に、SACの活性化を評価した。

1-2-7 紡錘体配向性の評価

RO-3306で同調した細胞に、RO-3306除去と同時に0.1 μ M Hoechst 33342を添加した。Hoechst 33342

添加から10分以内に37°C、5% CO₂の条件のlive cell chamberに細胞を入れ、Operetta imaging systemを用いてタイムラプスイメージングを行った。DNA及び細胞の形を指標に評価した。DNAが一列に並んだ後にDNAが丸く広がったように観察されるものを紡錘体配向性異常を持つ細胞と判断した。

RO-3306で同調した細胞を、RO-3306の除去後30分間培養し、40 µM MG132を添加して60分間培養した。4%ホルムアルデヒドと20%メタノールを添加したPBSにより室温で20分間固定した後、100%メタノールにより-30°Cで5分間固定した。その後、α-tubulin、γ-tubulin、DNAを染色し、顕微鏡でZ軸方向に0.5 µmずつレンズを移動させて細胞を撮影し、細胞の三次元観察を行った。

1-2-8 小胞体ストレスの誘導及び評価

糖鎖修飾阻害剤ツニカマイシンを2 µg/mLの濃度で2または8時間処理し、小胞体ストレスを誘導した。ウエスタンブロットにより、細胞に小胞体ストレスが生じた時にリン酸化されるタンパク質、PERKのリン酸化シフトを指標に、小胞体ストレスを評価した。ウエスタンブロットは1-2-3に記載した方法と同様に行った。

細胞分裂進行に及ぼす小胞体ストレスの影響を評価するときには、RO-3306を20時間処理する最後の2時間あるいは30分間に2 µg/mLツニカマイシンを処理した。RO-3306を除去し、60分後に固定し観察を行った。

1-2-9 統計解析

2群間を検定する時には、F検定で等分散であることを検定し、次に有意差があるかをスチューデントのt検定(両側)で検定した。多群比較検定を行う時には、パートレット検定で等分散であることを検定し、次にダネット検定またはTukey-Kramer検定で有意差を検定した。統計解析にはMicrosoft Excel (Microsoft, redmond, WA, USA) とR (version 3.4.3, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria)を使用した。

1-3 実験結果

1-3-1 細胞周期に及ぼす熱ショックの影響

細胞周期に及ぼす熱ショックの影響を観察するために、子宮頸がん由来HeLa S3細胞に42°Cの熱ショックを30分間与え、フローサイトメトリーを用いてDNA量を観察した。細胞が持つDNAはS期で複製され、細胞分裂期で2つに分配されるため、細胞分裂期後からS期開始までのG1期では2倍体 (2N)、S期から細胞分裂開始までのG2期では4倍体 (4N) のDNAを持つ。よって、DNAヒストグラム上では、2Nのピークと2Nのピークの約2倍の位置に4Nのピークが形成される。コントロール細胞において、2Nと4Nの2つのピークを示す、典型的なヒストグラムが観察された (図1-1 A, 37°C)。一方、熱ショックを与えていない細胞 (図1-1 A, 37°C) と比較して、42°Cの熱ショックを与えた細胞のDNA量に変化は観察されなかった (図1-1 A, 42°C)。更に、熱ショックを30分間与えた後、37°Cで3時間培養した細胞でも、DNA量の変化は観察されなかった (図1-1 A, 42°C+3h)。そこで次に、熱ショックを与えた細胞の分裂期細胞の割合 (以下、mitotic index) を免疫染色で観察した。熱ショックを与えていない細胞のmitotic indexは6.2%であった (図1-1 B, 37°C) のに対し、42°Cの熱ショックを30分間与えた直後の細胞では4.7%であり (図1-1 B, 42°C)、有意ではないもののmitotic indexが減少する傾向にあった。また、熱ショック後、37°Cで3時間培養した細胞のmitotic indexは9.0%であり、熱ショックを与えていない細胞と比較してmitotic indexが有意に増加した (図1-1 B, 37°C 対 42°C+3h)。これらの結果より、42°Cの熱ショックが細胞分裂期に影響を及ぼす可能性が示唆された。

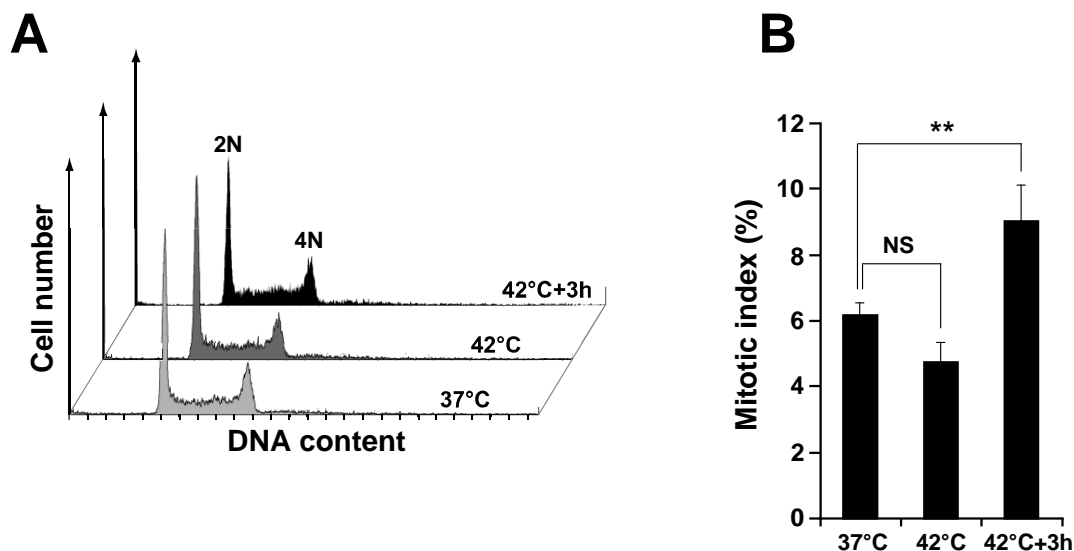


図 1-1 熱ショックは細胞分裂期に影響を及ぼす

HeLa S3細胞を42°Cで30分培養し、その後37°Cで3時間培養した。その時のDNA量 (A) と mitotic index (B) を示す。(A) 70%エタノールで1時間固定した細胞をヨウ化プロピジウムで染色し、フローサイトメトリーでDNA量を定量した。それぞれのヒストグラムは10000個の細胞を示す。(B) 分裂期細胞は微小管の形態と染色体の整列から判断した。Mitotic indexは (分裂期細胞の個数) / (総細胞数) × 100で算出し、グラフは3回の実験 (n > 1000) の平均 ± 標準偏差を示す。アスタリスクはダネット検定から求めた有意差を示す (**p < 0.01, NS, not significant)。37°C 対 42°C, p = 0.104, 37°C 対 37°C + 3 h, p = 0.00661。 *FASEB J.* 2019 (印刷中) Figure 1より引用。

1-3-2 細胞分裂進行に及ぼす熱ショックの影響

Cdk1は細胞分裂期の開始に必須のキナーゼであるため、RO-3306を処理した細胞はG2/M境界で停止する。また、RO-3306は可逆的阻害剤であるため、RO-3306処理によりG2/M境界で停止した細胞は、RO-3306を除去すると一斉に細胞分裂を開始し、ほぼ同じ速度で細胞分裂が進行する。よって、RO-3306を使用すると、細胞分裂の速さや細胞分裂の様子を観察することができる。そこで本研究ではRO-3306を使用した同調実験を用いて、細胞分裂に及ぼす熱ショックの影響を観察した。

細胞にRO-3306を20時間処理して細胞周期をG2期で停止させ、RO-3306処理の最後の30分間に42°Cの熱ショックを与えた。その後RO-3306を除去し細胞分裂を開始させ、60分後に細胞を固定し観察した (図1-2 A)。熱ショックを与えていない細胞では、染色体分配を開始した後期以降の細胞が観察された一方で、熱ショックを与えた細胞ではほとんど認められなかった (図1-2 B)。そこで分裂期細胞を、染色体分配開始前の細胞 (P/PM/M, 前期/前中期/中期)と染色体分配開始後の細胞 (A/T/Cyto, 後期/終期/細胞質分裂期) の2群に分けて計測を行った。熱ショックを与えていない細胞では、染色体分配開始前の細胞が約57%であったが (図1-2 C, 37°C, P/PM/M)、熱ショックを与えた細胞では染色体分配開始前の細胞が97%に増加した (図1-2 C, 42°C, P/PM/M)。これらの結果より、熱ショックを与えた細胞では、細胞分裂が染色体分配開始前で停止することが明らかになった。

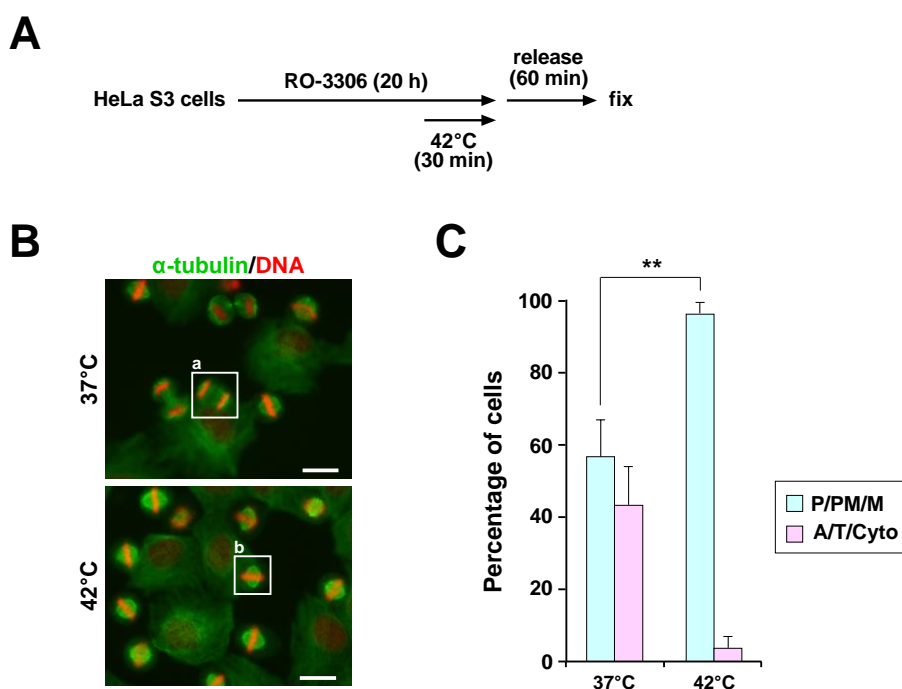


図 1-2 熱ショックは細胞分裂の進行を遅延させる

(A) 同調実験の流れを示す。(B) 固定した細胞の α -tubulinとDNAを染色した。その時の42°Cの熱ショックを与えていない細胞 (上) と与えた細胞 (下) の写真を示す。DNAを赤、 α -tubulinを緑で示す。a, 染色体分配開始後の細胞 b, 染色体分配開始前の細胞 (C) 細胞分裂後期開始前 (青, P/PM/M)と開始後 (赤, A/T/Cyto) の細胞の割合を示す。グラフは3回の実験 ($n \geq 199$) の平均±標準偏差を示した。アスタリスクはスチューデントのt検定から計算した有意差を示す (** $p < 0.01$)。P/PM/Mにおける37°C 対 42°C, $p = 0.00316$ 。スケールバー, 20 μm 。FASEB J. 2019 (印刷中) Figure 1より引用。

熱ショックにより、細胞分裂が染色体分配開始前のどの段階で停止するのかをタイムラプスイメージングを用いて観察するため、初めに、0.1 μM Hoechst 33342 自体が細胞分裂の進行に影響を与えるか観察した。RO-3306を処理して細胞をG2/M境界に停止させ、RO-3306除去と同時に0.1 μM Hoechst 33342を添加してタイムラプスイメージングで細胞分裂の進行を観察した。細胞分裂開始から分裂溝完成までの時間を計測したところ、0.1 μM Hoechst 33342の有無に関わらず52分であり (図1-3)、0.1 μM Hoechst 33342を添加しても細胞分裂の進行は影響を受けないことが分かった。この結果より、0.1 μM Hoechst 33342を添加し、DNAの形態変化を観察しながら正常な細胞分裂を観察することにした。HeLa S3細胞をRO-3306でG2/M境界に停止させ、最後の30分間に42°Cの熱ショックを与えた。その後、RO-3306除去と同時に0.1 μM Hoechst 33342を添加し、タイムラプスイメージングで120分間観察した (図1-4 A)。核膜崩壊から染色体が一行に並ぶまでを前期/前中期 (P/PM)、染色体が一行に並んでいる間を中期 (M)、染色体が2つに分かれ始めてから分裂溝が完成するまでを後期/終期 (A/T) に分類した。個々の細胞の細胞分裂の時間を計測すると、熱ショックを与えていない細胞では、観察開始直後から約20分後までが前期/前中期 [図1-4 B, 37°C, 緑 (P/PM)]、観察開始約20分後～約50分後にかけて中期 [図1-4 B, 37°C, 赤 (M)]、観察開始約50分後～約70分後に後期/終期 [図1-4 B, 37°C, 青 (A/T)] の細胞が観察され、ほとんどの細胞が細胞分裂を70分程度で終了した。観察開始からの細胞分裂各段階の割合の時間推移において、前期/前中期の割合のピークは観察開始20分後 (図1-4 C, 37°C, 緑 [P/PM])、中期のピークは約36分後 (図1-4 C, 37°C, 赤 [M]) 及び後期/終期のピークが約65分後に現れた (図1-4 C, 37°C, 青 [A/T])。

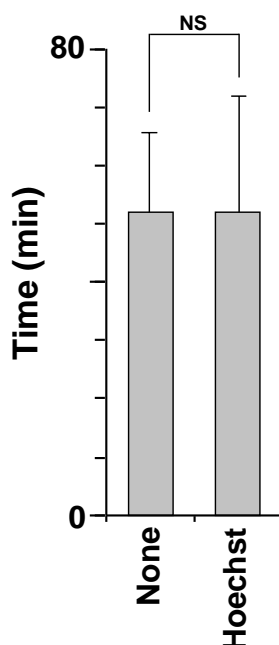


図 1-3 0.1 μM Hoechst 33342の添加は細胞分裂の進行に影響を与えない

HeLa S3細胞に9 μM RO-3306を20時間処理し、RO-3306を除去と同時に0.1 μM Hoechst 33342を添加していない細胞 (None) と添加した細胞 (Hoechst) をタイムラプスイメージングで観察した。観察した細胞の細胞分裂開始から分裂溝完成までの時間の平均±標準偏差を示した (None, n = 20, Hoechst, n = 21)。NSはスチューデントのt検定から計算した有意差がなかったことを示す (NS, not significant)。

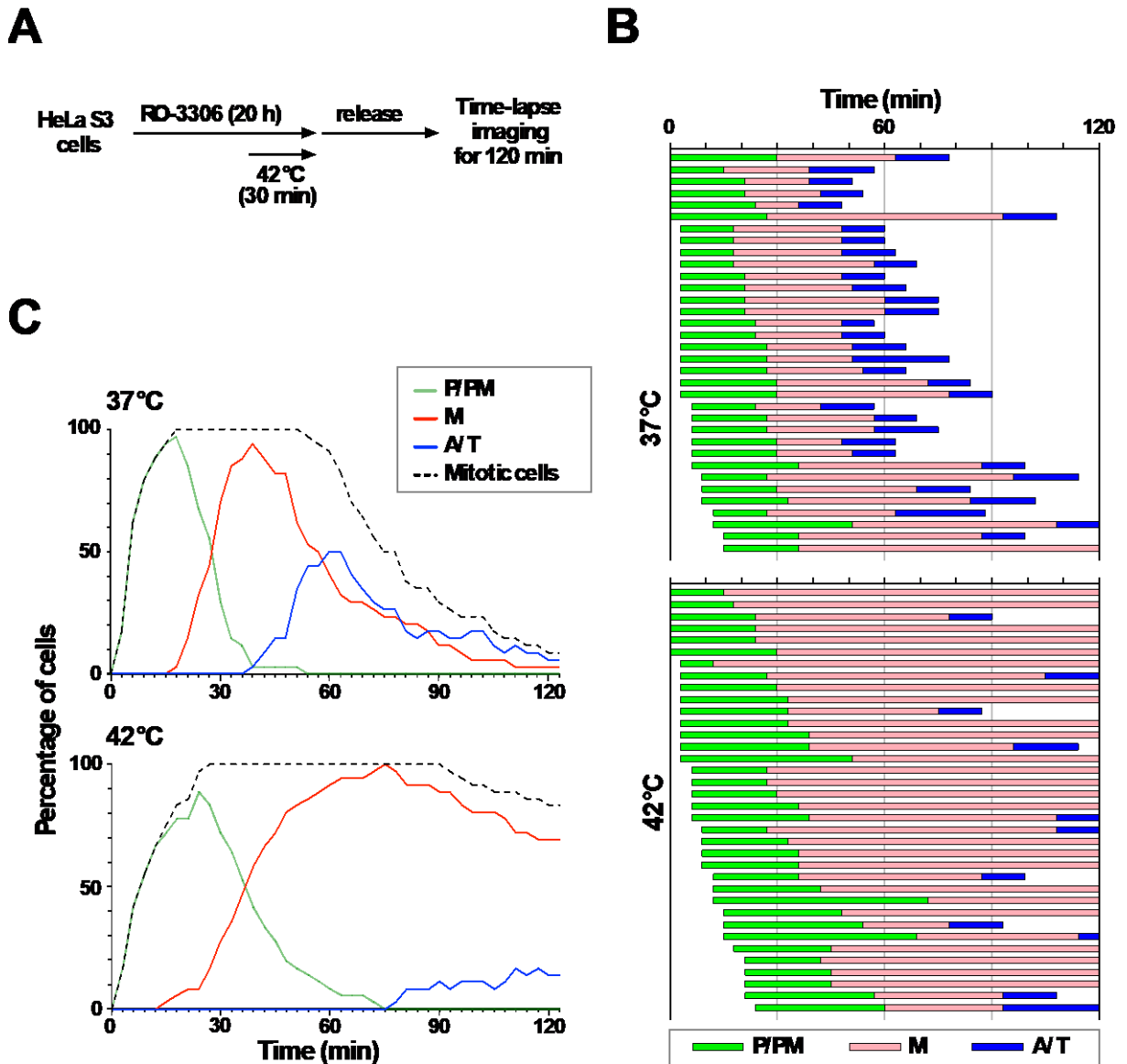


図 1-4 熱ショックは細胞分裂を中期で停止させる

(A) 同調実験の流れを示す。(B) 観察した個々の細胞の前期/前中期 (緑, P/PM)、中期 (赤, M)、後期/終期 (青, A/T) のそれぞれの時間を示す。(37°C, n = 34, 42°C, n = 36) (C) 細胞分裂期各段階の割合の時間推移を示す。細胞分裂期 (前期から終期 [黒破線, Mitotic cells])、前期/前中期 (緑, P/PM)、中期 (赤, M)、後期/終期 (青, A/T)。FASEB J. 2019 (印刷中) Figure 2より引用。

一方、熱ショックを与えた細胞においては、前期/前中期の細胞は観察開始直後から20~30分後まで観察された (図1-4 B, 42°C, 緑 [P/PM]) が、大半の細胞において中期の時間が90分程度から観察終了まで延長し (図1-4 B, 42°C, 赤 [M])、120分以内に後期/終期への進行が観察されたのは36個中11個の細胞であった (図1-4 C, 42°C, 青 [A/T])。細胞分裂各段階の割合の時間推移において、前期/前中期の割合のピークは観察開始25分後に現れ (図1-4 C, 42°C, 緑 [P/PM])、熱ショックを与えていない細胞とほとんど変わらなかった。しかし中期の細胞はピークが現れた後の減少が非常に緩徐であり (図1-4 C, 42°C, 赤 [M])、後期/終期のピークは観察されなかった (図1-4 C, 42°C, 青 [A/T])。以上の結果より、前期及び前中期の時間は熱ショックの有無でほとんど変化がなかった一方で、中期の時間が大きく延長することが分かった。この結果は、熱ショックが細胞分裂を中期で停止させることを示している。

熱ショックによる細胞分裂停止が正常細胞でも生じるかを観察するために、不死化ヒト網膜色素上皮 (hTERT RPE-1) 細胞にRO-3306を処理し、最後の30分間に41°Cまたは42°Cの熱ショックを与えた。RO-3306除去60分後に細胞を固定し、細胞分裂の割合を計測したところ、熱ショックを与えていない細胞と41°Cの熱ショックを与えた細胞では細胞分裂期細胞の割合がそれぞれ26%及び22%であった一方で、42°Cの熱を与えた細胞では3.5%であった (図1-5 A)。これは、42°Cの熱ショックを与えた細胞ではほとんどの細胞が細胞分裂期に進行しなかったことを示している。熱ショックを与えていない細胞と41°Cの熱ショックを与えた細胞の細胞分裂進行を計測したところ、熱ショックを与えていない細胞では前期/前中期/中期 (P/PM/M) の細胞の割合が19%であった (図1-5 B, 37°C)。その一方で、熱ショックを与えた細胞は38%に有意に増加した (図1-5 B, 42°C)。この結果は、hTERT RPE-1細胞においても熱ショックが細胞分裂停止を引き起こすことを示唆している。

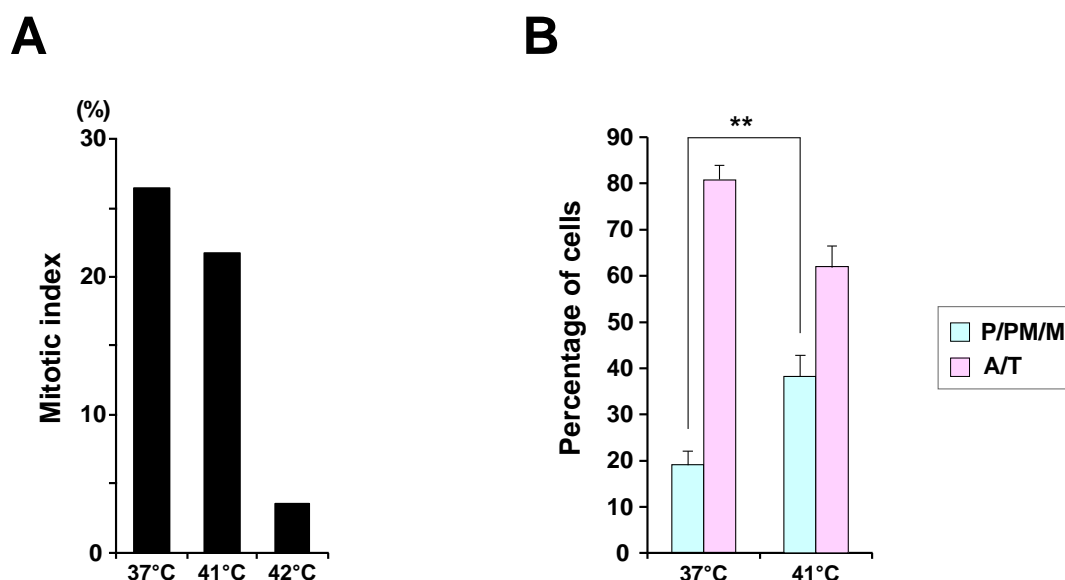


図 1-5 hTERT RPE-1細胞において熱ショックは細胞分裂の進行を遅延させる
説明は次ページ

hTERT RPE-1細胞に7 μ M RO-3306を20時間処理し、RO-3306処理の最後30分間に41°Cまたは42°Cの熱を与えた。コントロール細胞はRO-3306を処理している間37°Cで培養した。RO-3306を除去して60分間37°Cで培養した後、4%ホルムアルデヒドで固定した。固定した細胞の α -tubulinとDNAを染色した。Mitotic index (A) と細胞分裂後期開始前 (青, P/PM/M) と開始後 (赤, A/T/Cyto) の細胞の割合 (B)を示す。グラフは3回の実験 ($n > 200$) の平均 \pm 標準偏差を示した。アスタリスクはスチューデントのt検定から計算した有意差を示す (** $p < 0.01$)。P/PM/M における37°C 対 41°C, $p = 0.00171$ 。 *E4SEB.J.* 2019 (印刷中) Supplemental Figure 5より引用。

1-3-3 熱ショックによる紡錘体チェックポイント (SAC) 活性化の観察

SACは全ての動原体に微小管が正しく結合するまで染色体分配が開始しないよう、細胞分裂を停止させるチェックポイント機構であり、染色体を正確に2つに分配するために不可欠な細胞分裂制御機構である⁴³。熱ショックによる細胞分裂停止にSACの活性化が関与している可能性を検討するため、RO-3306でG2/M境界に停止させ、熱ショックを与えた細胞に、SAC活性化に必須のキナーゼMps1の阻害剤AZ3146をRO-3306除去と同時に添加し、タイムラプスイメージングで60分間観察した。その結果、熱ショックを与えた細胞では91%が中期までで停止していた一方で、AZ3146を添加した細胞では68%が後期に進行した (図1-6 A, 左)。また、SACに必須のタンパク質Mad2をノックダウンした細胞 (図1-6 B) に熱ショックを与えたところ、コントロール細胞では26%の細胞が後期に進行したが、Mad2ノックダウン細胞では95%の細胞が有意に後期に進行した (図1-6 A, 右)。これらの結果は熱ショックがSACの活性化を引き起こすことを示唆している。

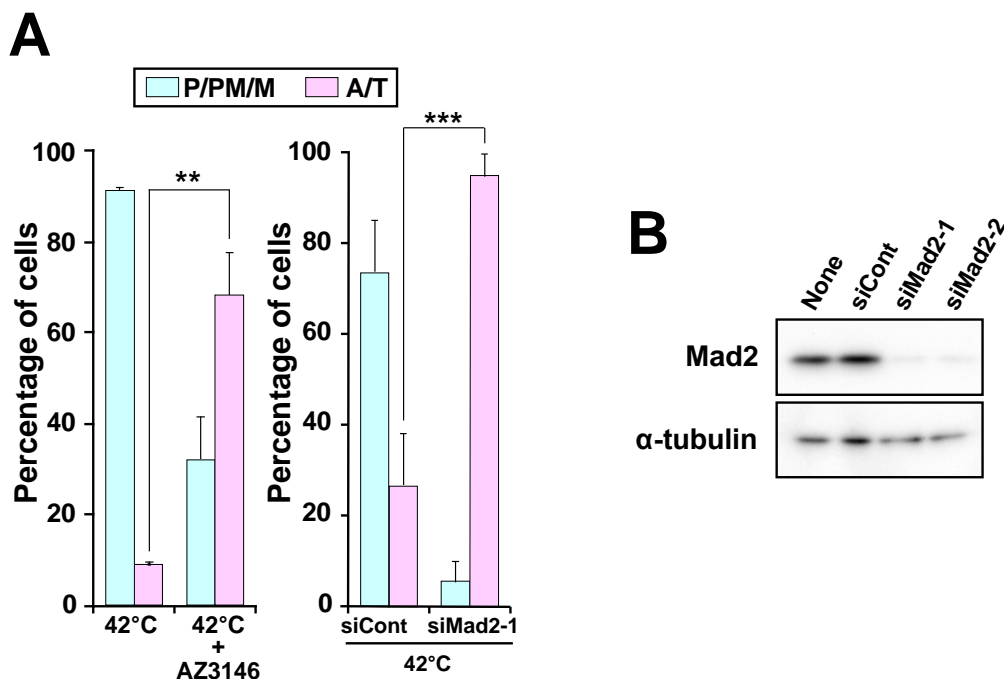


図 1-6 AZ3146処理あるいはMad2のノックダウンは熱ショックによる細胞分裂停止を解除する

(A) HeLa S3細胞に7-8 μM RO-3306を20時間処理し、RO-3306処理最後の30分間に42°Cの熱を与えた。コントロール細胞はRO-3306を処理している間37°Cで培養した。RO-3306を除去した後、0.1 μM Hoechst 33342を添加して60分間タイムラプスイメージングで観察した。左図、RO-3306除去と同時に2 μM AZ3146またはDMSOを添加した。右図、Mad2ノックダウン細胞とコントロール細胞を使用した。siRNAをトランスフェクションした4時間後に7 μM RO-3306を処理した。グラフはタイムラプスイメージング終了時点で細胞分裂後期開始前 (青, P/PM/M) と開始後 (赤, A/T/Cyto) の細胞の割合を、3回の実験 (n > 30) の平均±標準偏差で示す。アスタリスクはスチューデントのt検定から計算した有意差を示す (**p < 0.01, ***p < 0.001)。42°C 対 42°C + AZ3146, p = 0.00828, 42°CにおけるsiCont 対 siMad2-1 in, p = 0.000650。 (B) siCont、siMad2-1、siMad2-2をトランスフェクションして24時間後の全細胞溶解液を回収し、ウエスタンブロットで解析した。FASEB J. 2019 (印刷中) Figure 3より引用。

SACが活性化する際には、BubR1が動原体に局在するため、熱ショックを与えてBubR1の動原体局在を観察した。細胞にRO-3306を20時間処理して細胞周期をG2/M境界で停止させ、RO-3306処理の最後の30分間に42°Cの熱ショックを与えた。RO-3306を除去し細胞分裂を開始させた30分後にプロテアソーム阻害剤MG132を添加し、細胞分裂が後期に進行する際に必要なcyclin B1の分解を抑制することで、細胞を中期で停止させた。MG132を添加して60分後に細胞を固定し、BubR1が動原体に局在している中期の細胞を計測した。熱ショックを与えていない細胞では、BubR1が動原体に局在している細胞は33%であった (図1-7, 37°C)。一方、熱ショックを与えた細胞では、BubR1が動原体に局在している細胞の割合は79%であった (図1-7, 42°C)。熱ショックを与えた細胞にSACに必須のキナーゼであるMps1の阻害剤AZ3146を添加すると、BubR1が動原体に局在している細胞は14%まで減少した (図1-7, 42°C+AZ3146)。以上の結果より熱ショックによってSACが活性化した結果、細胞分裂が中期で停止したことが明らかになった。

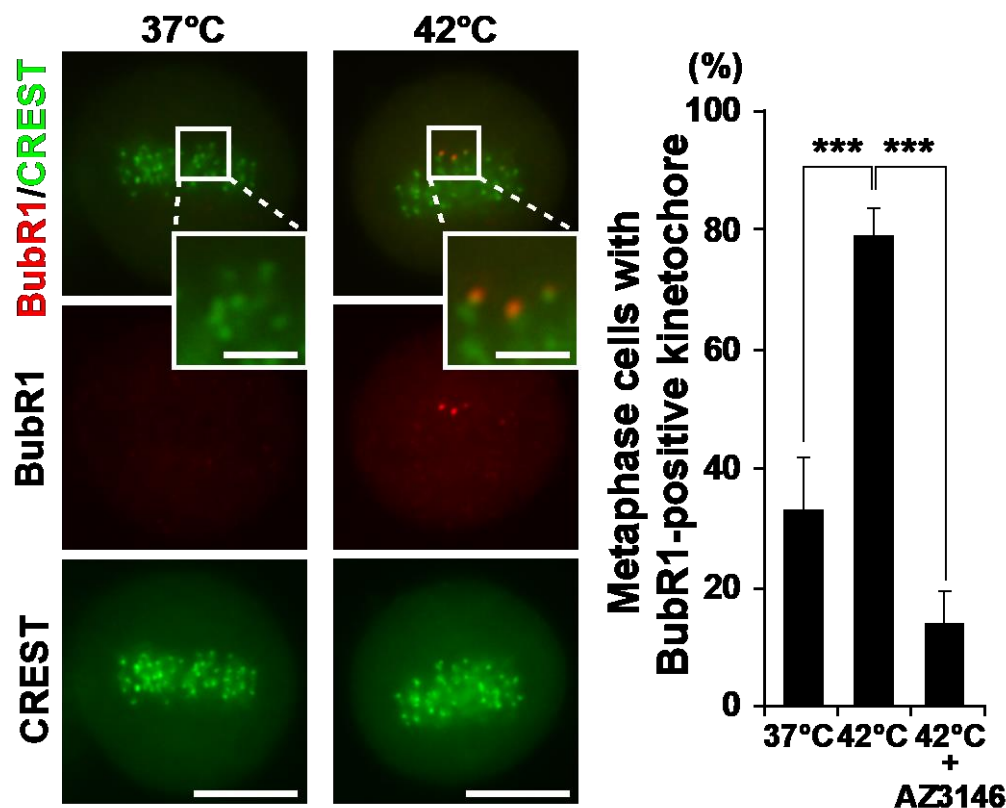


図 1-7 熱ショックによりBubR1が動原体局在する細胞が増加する

HeLa S3細胞に7-8 μM RO-3306を20時間処理し、RO-3306処理最後の30分間に42°Cの熱を与えた。コントロール細胞はRO-3306を処理している間37°Cで培養した。RO-3306を除去し30分間培養後、40 μM MG132を添加して60分間培養した。固定した細胞のBubR1と動原体のマーカであるCRESTを染色した。左、42°Cの熱ショックを与えた細胞と与えていない細胞の写真 (赤, BubR1、緑, CREST)。挿入している写真は動原体の拡大写真を示している。右、動原体上にBubR1が局在した中期の細胞の割合。グラフは3回の実験 ($n \geq 200$) の平均±標準偏差を示している。アスタリスクはダネット検定を用いて計算した有意差を示す (***) $p < 0.001$ 。37°C 対 42°C, $p = 0.000332$, 42°C 対 42°C+AZ3146, $p = 4.8 \times 10^{-5}$ 。スケールバー, 10 μm (拡大写真), 2.5 μm (挿入写真)。FASEB J. 2019 (印刷中) Figure 3より引用。

1-3-4 SAC活性化機構の検討

熱ショックによりSACが活性化することが明らかになったので、その活性化機構について検討を行った。熱ショックはタンパク質フォールディングの異常を引き起こし、タンパク質の高次構造に異常を持つ変性タンパク質を生じさせ、小胞体ストレスを誘導する。細胞に小胞体ストレスが生じると、小胞体においてPERKのリン酸化やATF6の発現などが誘導され、アポトーシスや分子シャペロンの転写誘導など、様々な細胞応答が引き起こされる¹⁰。そこで、熱ショックが小胞体ストレスを介してSACを活性化する可能性について検討した。

熱ショックが小胞体ストレスを誘導しているかを、小胞体ストレスのマーカーであるPERKのリン酸化を指標に観察した。ポジティブコントロールとして、糖鎖修飾を阻害して小胞体ストレスを誘導する薬剤ツニカマイシンを使用した。ツニカマイシンを細胞に処理すると、処理時間依存的にPERKのリン酸化シフトが観察された (図1-8 A, TM)。しかし、熱ショックを与えた細胞では、明確なPERKのリン酸化シフトは観察されなかった (図1-8 A, Heat shock)。この結果は、本研究で用いた熱ショックの条件 (42°C、30分) は、小胞体ストレスを誘導するためには十分な条件でないことを示唆している。次に、熱ショックとツニカマイシン誘導性の小胞体ストレスが細胞分裂に与える影響を比較するために、RO-3306でG2/M境界に停止させた細胞に熱ショックまたはツニカマイシン処理を行なった。RO-3306除去60分後の細胞を観察したところ、mitotic indexは熱ショック、ツニカマイシン処理いずれにおいても減少した (図1-8 B)。細胞分裂進行については、熱ショックを与えた細胞のほとんどが中期までで停止した (図1-8 C, heat shock)。一方で、ツニカマイシンを処理した細胞においても細胞分裂は遅延したが、熱ショックを与えた細胞における細胞分裂の遅延よりもその影響は小さかった (図1-8 C, TM, 0.5 h, 2 h)。これらの結果は、小胞体ストレスが誘導する細胞分裂の遅延は熱ショックより弱いことを示している。以上より、熱ショックは小胞体ストレス以外の経路を介して細胞分裂の遅延を誘導していることが示唆される。

熱ショックが微小管の重合に影響を与えることが報告されている⁴⁴。そこで、熱ショックを与えた細胞で微小管と動原体の接続に異常が生じた結果、SACが活性化した可能性について検討した。細胞にRO-3306を20時間処理し、細胞周期をG2/M境界で停止させ、RO-3306処理の最後の30分間に42°Cの熱ショックを与えた。その後RO-3306を除去し細胞分裂を開始させた30分後にプロテアソーム阻害剤MG132を添加し、細胞を中期で停止させた。MG132を添加して60分後に細胞を固定し、hepatoma up-regulated protein (HURP) を染色した。Ranのグアニンヌクレオチド交換因子 (Ran-GEF)であるRCC1 (regulator of chromosome condensation 1) がクロマチンに結合しているため、染色体付近はRanGTP濃度が高い⁴⁵。HURPはRanGTP依存的に微小管と相互作用する分子であり、RanGTP濃度が高い動原体近くの微小管上に局在し、微小管と動原体の接続を安定化する機能を持つ^{46, 47}。よって、HURPが局在する微小管は動原体と結合する微小管であるため、HURPの蛍光強度を指標に微小管と動原体の接続を観察することができる (図1-9, 左)。熱ショックを与えた細胞と与えていない細胞のHURPと α -tubulinの蛍光強度を計測し、 α -tubulinに対するHURPの蛍光強度の比を算出した。しかし、熱ショックを与えていない細胞と与えた細胞の間で蛍光強度の比はほぼ同程度であった (図1-9, 右)。この結果より、熱ショックは微小管と動原体の接続に影響を与えないことが示唆された。

熱ショックが中心体の機能に影響を与えることが報告されている。中心体は主要な微小管形成中心であり、細胞分裂期においては中心体から微小管が染色体や細胞膜に向かって伸長することで紡錘体

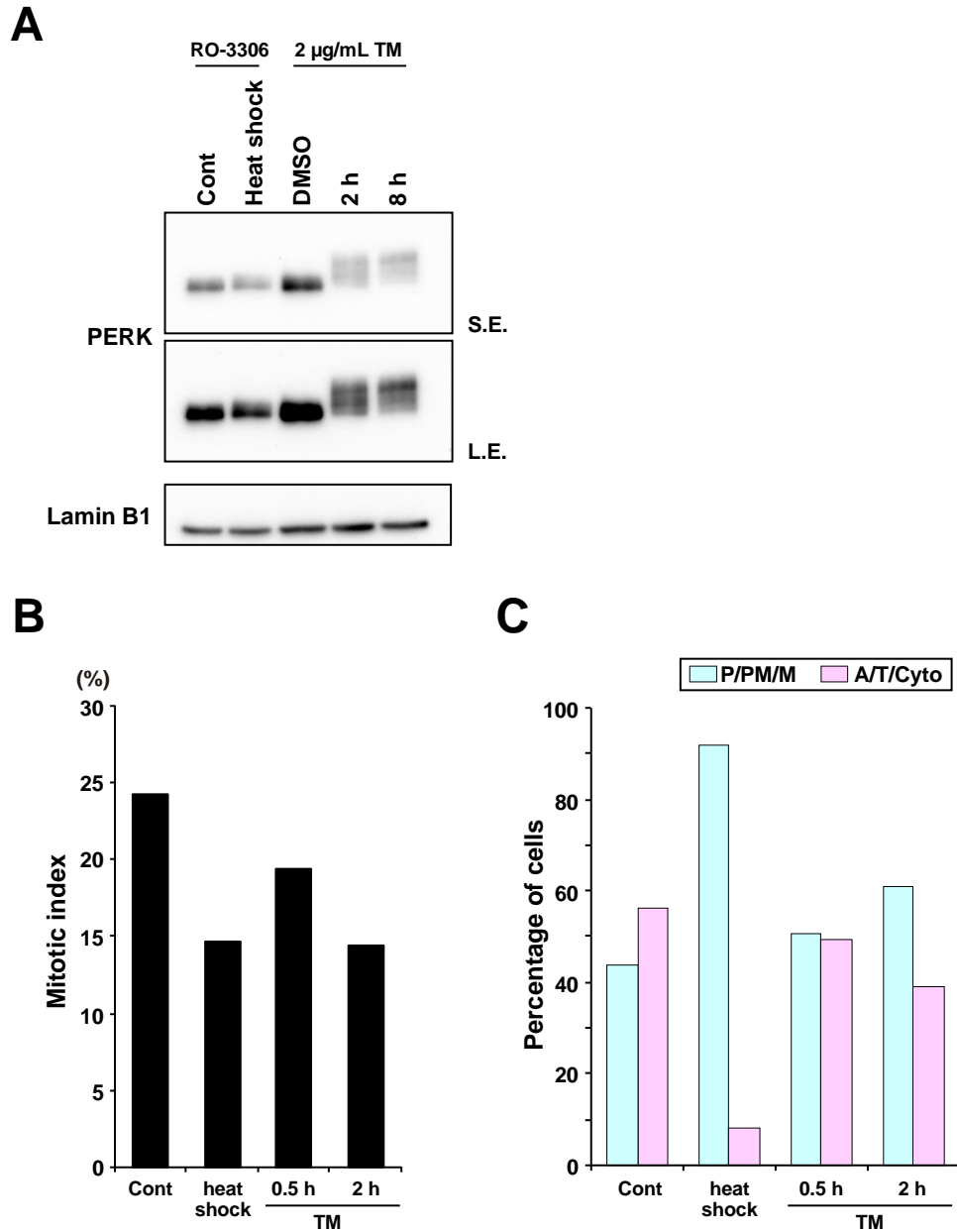


図 1-8 小胞体ストレスは細胞分裂の進行を遅延させるが、その影響は熱ショックよりも小さい (A) HeLa S3細胞に7-8 μM RO-3306を20時間処理し、RO-3306処理の最後30分間に42°Cの熱を与えた。RO-3306を除去していない細胞から全細胞溶解液を回収した (RO-3306)。同調していない細胞に2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ツニカマイシン (TM) を2または8時間処理し、全細胞溶解液を回収した (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TM)。抗PERK抗体及び抗lamin B1抗体 (ローディングコントロール) を用いてウエスタンブロットによる解析を行った。(B, C) HeLa S3細胞に7-8 μM RO-3306を20時間処理し、RO-3306処理最後の30分間に42°Cの熱ショック、あるいは最後の2時間または30分間に2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ツニカマイシン (TM) を処理した。RO-3306を除去し60分後に微小管の形態と染色体の整列を指標に、mitotic index (B) と細胞分裂期の各段階の割合 (C) を計測した。Bは各群500個以上、Cは各群200個以上を計測し、後期開始前 (青, P/PM/M) と開始後 (赤, A/T/Cyto) の割合を表示した。S.E., short exposure, L.E., long exposure。FASEB J. 2019 (印刷中) Supplemental Figure 1より引用。

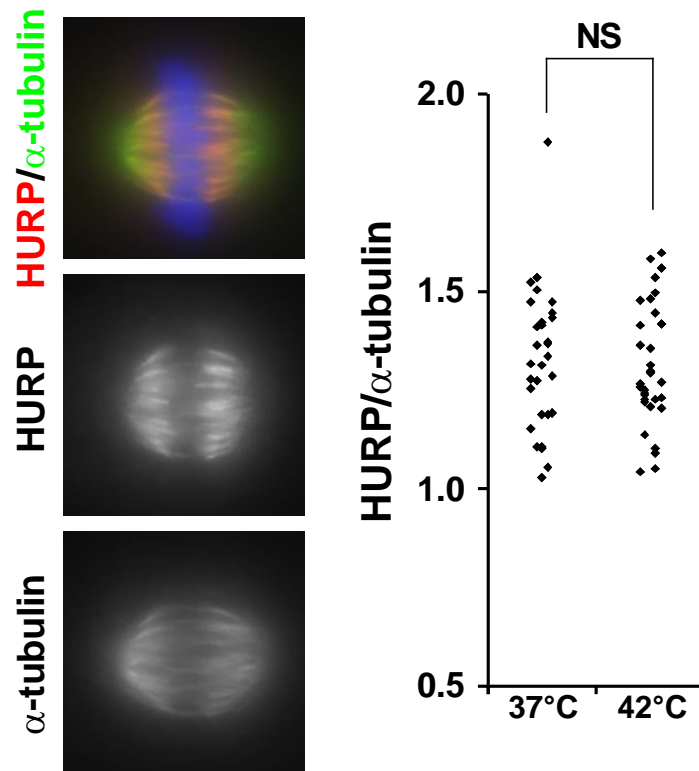


図 1-9 熱ショックはHURPの蛍光強度に影響を与えない

HeLa S3細胞に7-8 μM RO-3306を20時間処理し、RO-3306処理の最後30分間に42°Cの熱を与えた。コントロール細胞はRO-3306を処理している間37°Cで培養した。RO-3306を除去し30分間培養後、40 μM MG132を添加して60分間培養した。固定した細胞のHURP (赤)、 α -tubulin (緑)及びDNA (青)を染色した (左)。Image Jを用いて細胞全体のHURPと α -tubulinの蛍光強度を定量し、 α -tubulinに対するHURPの比を細胞ごとに算出した (右)。NSはスチューデントのt検定から計算した有意差がなかったことを示す (NS, not significant)。37°C 対 42°C, $p=0.753$ 。

を形成するため、中心体は紡錘体形成に不可欠である。そこで次に、熱ショックが中心体の機能に影響を与えた結果、紡錘体形成に影響を与え、紡錘体チェックポイントを活性化する可能性を検討した。RO-3306を処理しG2/M境界に停止させ、最後の30分間に42°Cの熱ショックを与えた細胞を、RO-3306除去と同時にタイムラプスイメージングを用いて観察した。熱ショックを与えていない細胞では、細胞分裂開始10分後に染色体が一行に整列し、40分後に染色体分配が開始するまで一行に整列した状態を維持していた (図1-10 A, 上)。一方で、熱ショックを与えた細胞においては、細胞分裂開始20分後に染色体が整列したが、その後染色体が徐々に丸く広がっていく様子が観察され (図1-10 A, 下)、このような細胞の割合を計測したところ、熱ショックを与えた細胞において有意に増加した (図1-10 B, 42°C)。

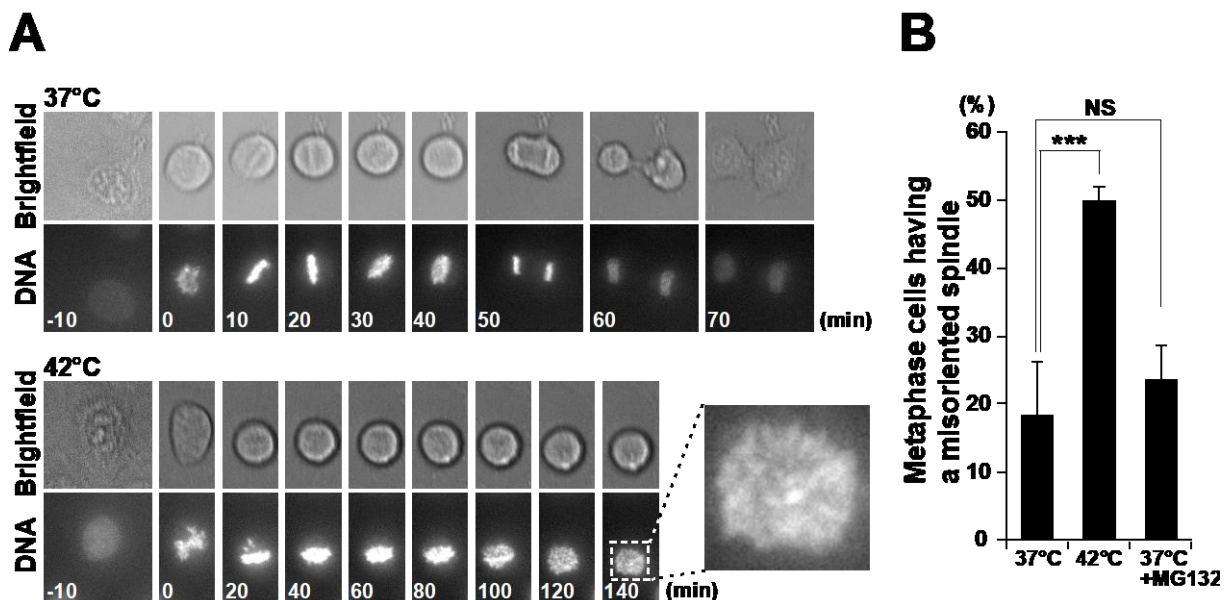


図 1-10 熱ショックにより紡錘体配向性異常を持つ細胞が増加する

(A, B) HeLa S3細胞に8 μ M RO-3306を20時間処理し、RO-3306処理の最後30分間に42°Cの熱ショックを与えた。RO-3306除去後、0.1 μ M Hoechst 33342を添加して180分間タイムラプスイメージングを行った。37°C+MG132群は0.1 μ M Hoechst 33342と同時に40 μ M MG132を添加している。(A) 明視野とDNAの画像を示す。核膜崩壊を0分とし、分裂期細胞の経時的変化を示す。37°C: 細胞分裂開始10分後に整列し、50分後に染色体分配が開始した。42°C: 細胞分裂開始20分後に整列し、100分後から丸く広がり始めた。右の拡大写真は細胞分裂開始140分後の細胞を示す。(B) 紡錘体配向性異常を持つ中期の細胞を示している ($n > 40$)。アスタリスクとNSはダネット検定より求めた有意差があったものとなかったものを示している (***) $p < 0.001$ 。37°C 対 42°C, $p = 0.0000894$, 37°C 対 37°C+MG132, $p = 0.447$ 。FASEB J. 2019 (印刷中) Figure 3より引用。

そこで免疫染色後、細胞分裂中期の細胞の紡錘体を三次元的に観察した (図1-11)。熱ショックを与えていない細胞をX-Z方向で観察すると、中心体に局在するタンパク質 γ -tubulin (矢印) の高さがほぼ同じであり、紡錘体は培養ディッシュへの接地面に対して水平に形成されていることが観察された。一方、熱ショックを与えた細胞をX-Z方向で観察すると、両極に位置する γ -tubulinの高さが異なっており、紡錘体が傾いて形成されていることが示唆された。これらの結果から、熱ショックを与えた細胞では、紡錘体が傾いて形成される異常、紡錘体配向性異常が生じることが分かった。

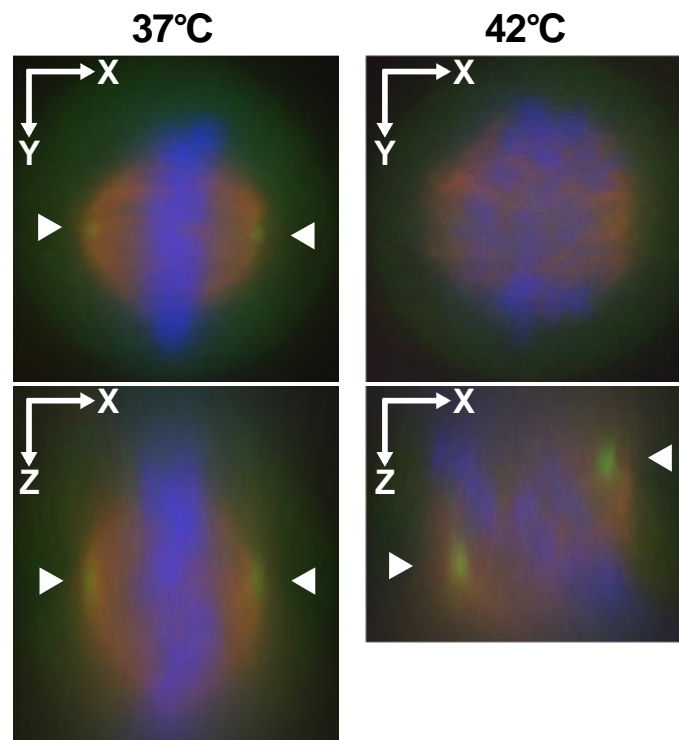


図 1-11 熱ショックにより紡錘体配向性異常が生じる

HeLa S3細胞に8 μ M RO-3306を20時間処理し、RO-3306処理の最後30分間に42°Cの熱を与えた。コントロール細胞はRO-3306を処理している間37°Cで培養した。RO-3306を除去し30分間培養後、40 μ M MG132を添加して60分間培養した。固定した細胞の α -tubulin (赤)、 γ -tubulin (緑) 及びDNA (青) を染色し、Z軸方向に0.5 μ mずつ撮影した (撮影間隔, 0.5 μ m; 撮影枚数: 37°C, 46枚, 42°C: 37枚)。白い矢頭は γ -tubulinの場所を示す。

熱ショックそのものが紡錘体配向性異常を誘導するのか、熱ショックにより細胞分裂が中期で長時間停止した結果、紡錘体配向性異常が生じるのかを明らかにするために、プロテアソーム阻害剤MG132を細胞に処理し、細胞分裂を中期で長時間停止させたときの染色体をタイムラプスイメージングで観察した。しかし、MG132を添加し中期で長時間停止した細胞において紡錘体配向性異常は有意に増加しなかった (図1-10 B, MG142)。この結果は、熱ショック時に観察された紡錘体配向性異常は、熱ショックにより細胞分裂が中期で停止することが原因ではなく、熱ショックそのものが引き起こしたことを示唆している。紡錘体配向性異常が細胞分裂進行の遅延を引き起こすことから、熱ショックにより紡錘体配向性異常が生じた結果、SACが活性化し、細胞分裂が中期で停止したと考えられる。

1-4 考察

本章では、熱ショックが紡錘体配向性異常を引き起こした結果、紡錘体チェックポイントが活性化し、細胞分裂が中期で停止することを見出した。更に、熱ショックによる細胞分裂停止は子宮頸がん細胞 HeLa S3 細胞だけでなく、不死化ヒト網膜色素上皮細胞 hTERT RPE-1 細胞で観察されたことから、がん細胞と正常細胞のどちらにおいても、熱ショックが細胞分裂に異常を引き起こすストレスであることを示した。よって、熱ショックは正常細胞とがん細胞いずれにおいても細胞分裂に異常を引き起こすストレスであることが示唆される。

熱ショックはタンパク質のフォールディング異常と凝集を介して、小胞体ストレスを誘導する¹⁰。ツニカマイシンを処理したとき小胞体ストレスマーカーである PERK のリン酸化シフトが明確に観察されたが、ツニカマイシンにより誘導される細胞分裂の遅延の程度は弱かった。一方、本研究で用いた条件 (42°C, 30 分) では PERK のリン酸化シフトが明確に観察できなかったが、細胞分裂は大きく遅延した。本研究で用いた熱ショックでは十分な小胞体ストレスが誘導されなかった一方で、ツニカマイシン処理時よりも劇的な細胞分裂の遅延が生じることは、熱ショックによる細胞分裂の遅延に小胞体ストレスが主たる経路ではないことを示唆している。

微小管はそのマイナス端を中心体に置き、中心体から伸長することで動原体に接続するなどの様々な機能を果たすため、中心体は紡錘体形成と染色体分配において重要な機能を持つ細胞小器官である。熱ショックが中心体にダメージを与えた結果、多極紡錘体の形成を引き起こし、細胞分裂を前中期で停止させることが Hut らや Vertii らによって報告されている^{21, 48}。また、Vidair らによって、G1 期に熱ショックを与えた細胞において、微小管形成中心が増加し、多極紡錘体が形成された結果、細胞分裂前期から中期への進行が遅延することが報告されている²⁰。このように、熱ショックによって紡錘体形成に異常が生じて細胞分裂が前期/前中期で停止する報告が複数あるにも関わらず、本研究においては前期/前中期での停止は観察されなかった。この違いは、熱ショックの条件によるものと考えられる。Vidair らはチャイニーズハムスターの卵巣細胞 CHO 細胞に 45°C の熱を 13-15 分間与えたときに多極紡錘体が形成することを報告しており²⁰、逆に Vertii らは hTERT RPE-1 細胞に 43°C の熱ショックを 90 分与えた細胞で紡錘体が形成されないことを報告している⁸。また、Hut らは OT70 ハムスター肺線維芽細胞に 45°C の熱ショックを 15 分間与えたときには紡錘体が形成されない一方で、42°C の熱ショックを 15 分間与えると中心体機能に異常が生じるものの、紡錘体は形成されることを報告している²¹。よって、細胞に強い熱ショックを与えたときには、多極紡錘体の形成や紡錘体が形成されない異常が引き起こされるが、比較的弱い熱ショックでは紡錘体は形成されると考えられる。本研究で用いた、42°C の熱ショックを 30 分間与える条件は比較的温和な熱ショックであるため、前期/前中期での停止の原因は、多極紡錘体の形成や紡錘体が形成されないことではないと考えられる。

一方、本研究では、熱ショックが紡錘体配向性異常を引き起こした結果、紡錘体チェックポイントを活性化したことを明らかにした。紡錘体配向性は、上皮組織など極性を持った組織の細胞分裂の際に、基底膜側と頂側膜側を決定したり、発生時の細胞分裂において娘細胞の運命を決定するのに必要であるため、細胞の正常な機能に非常に重要である。紡錘体配向性の決定には、星状体微小管が重要な役割を担っている。星状体微小管は中心体から紡錘体極近くの細胞膜へ伸長し、結合している微小

管である。星状体微小管が正しく紡錘体微小管近くの細胞膜と結合し、紡錘体両極側から適切に張力がかかることで、紡錘体配向性は維持される。紡錘体配向性の決定には多くのタンパク質が関与し、G α i、LGN、NuMA、myosin10、dyneinはその代表である^{49,50}。細胞分裂期の間、G α i、LGN、NuMAは紡錘体極に近い細胞膜上で複合体を形成し、dyneinを細胞膜上へと動員している。細胞膜に局在するdyneinは星状体微小管と結合し、星状体微小管を細胞膜側へ引っ張ることで、紡錘体配向性を決定するための張力が生まれる。Myosin10は星状体微小管の制御を介して紡錘体配向性に寄与している。このように、紡錘体配向性は多くのタンパク質によって星状体微小管が正しく維持されることが必要である。微小管重合阻害剤ノコダゾールは微小管の伸長を阻害する。高濃度のノコダゾールを処理すると、全ての微小管の伸長が阻害されるために、紡錘体の形成が抑制される。一方、低濃度のノコダゾールを細胞に処理した場合、紡錘体は形成されるものの、紡錘体配向性異常が生じる。このことから、低濃度のノコダゾールは動原体と結合する微小管には影響を与えず、星状体微小管優先的に破壊する^{51,52}ため、星状体微小管は動原体微小管よりもダメージを受けやすいと考えられる。*In Vitro*において熱ショックが温度依存的に微小管の重合を阻害することが報告されている⁴⁴。しかし、本研究において動原体微小管と動原体の接続に異常は観察されなかったことから、動原体と接続する微小管に影響を与えていないと考えられる。よって、本研究で用いた熱ストレスでは、低濃度のノコダゾールを細胞に処理した時と同様に、動原体に接続する微小管に影響を与えずに、動原体と接続する微小管よりダメージを受けやすい星状体微小管のみに異常を与えた結果、紡錘体配向性異常が生じた可能性がある。また、*Caenorhabditis elegans*の胚において、熱ショックが細胞膜に局在するdyeninの局在に異常を与えた結果、第一減数分裂が遅延するという報告⁵³や、細胞膜に局在するdynein/dynactinを制御するタンパク質dynamitin/p50の局在が温和な熱ストレスによって消失するとの報告²¹がある。よって、熱ストレスがdyneinなど膜に局在する、星状体微小管制御に関与するタンパク質の機能や局在に異常を与えた結果、紡錘体配向性異常が生じた可能性も考えられる。

HeLa S3細胞に42°Cの熱ショックを30分間与えても、細胞は細胞分裂期に進行したが、hTERT RPE-1細胞に42°Cの熱ショックを与えるとほとんど全ての細胞がG2/M境界で停止した。このことは、hTERT RPE-1細胞はHeLa S3細胞よりも熱感受性が高いことを示唆している。hTERT RPE-1細胞とHeLa S3細胞の温度感受性の違いは、HeLa細胞でp53の分解が亢進していることと関係している可能性がある。p53はDNA修復や細胞増殖停止、アポトーシスなどに関与する転写因子であり、熱ショックによってp53量が増加することが報告されている。p53はCdk1、cyclin B1の転写を抑制する^{54,55,56,57}だけでなく、p21や14-3-3 σ などのCdk1を抑制的に制御するタンパク質の転写を亢進させて^{58,59}、細胞分裂の開始を抑制する。よって、p53の分解が亢進しているHeLa S3細胞よりも、p53が正常に機能しているhTERT RPE-1細胞では熱ショックによるG2停止が起こりやすい可能性が考えられる。p21が発現しているヒト肝がん由来細胞HepG2細胞に42°Cの熱ショックを30分間与えるとG2期での停止が誘導されるが、p53の変異及びp21の欠損株であるヒト肝がん由来細胞Huh7細胞に42°Cの熱ショックを30分間与えてもG2期での停止が誘導されないこと¹⁸は、G2期での停止においてp53経路が関与する可能性をより支持する。

不死化正常細胞hTERT RPE-1細胞においても、がん細胞であるHeLa S3細胞と同様に熱ショックが細胞分裂停止を引き起こすことが示された。このことは、正常細胞においても、熱ショックが細胞分裂に異常を引き起こすストレスであることを示唆している。細胞分裂の異常は染色体数異常を介し

て細胞のがん化や発生異常を誘導し得るため、本研究は、熱ショックが細胞分裂異常を介した細胞の異常を引き起こす可能性を示唆する。

1-5 小括

本研究により、以下のことが明らかになった。

- HeLa S3 細胞に G2/M 境界の細胞に 42°C の熱ショックを 30 分間与えると、細胞分裂が中期で停止した。また、hTERT RPE-1 細胞においても熱ショックによる細胞分裂停止が観察されたことから、熱ショックによる細胞分裂停止は正常細胞、がん細胞間で保存されている熱ショック応答である。
- 中期での停止は紡錘体チェックポイントが活性化が誘導された結果、引き起こされた。
- 熱ショックを与えた細胞では、紡錘体配向性異常が生じることにより紡錘体チェックポイントの活性化を誘導したと考えられる。

以上より、熱ショックは紡錘体配向性異常を誘導するストレスであり、細胞は紡錘体チェックポイントを活性化させることにより、熱ショックによる細胞分裂異常から細胞を保護することが示唆された。

第2章 Hsp105によるSAC制御

2-1 序論

熱ショック時に機能する代表的なタンパク質が熱ショックタンパク質である。熱ショックを与えた細胞ではタンパク質変性が生じるが、熱ショックタンパク質はタンパク質の熱変性の抑制、熱変性したタンパク質の凝集抑制、熱変性したタンパク質のリフォールディングや分解の誘導を行うことで、熱ショックから細胞を保護している²⁵。熱ショックタンパク質はストレス時だけでなく、構成的にも発現しており、その代表的な機能としてリボソームで合成されたタンパク質のフォールディングが知られている。また、細胞分裂制御にも熱ショックタンパク質が関与している。Hsp70が動原体結合微小管の制御に関与し、紡錘体形成に関与する²⁸こと、Hsp90がMps1と結合してMps1のキナーゼ活性に関与する³²こと、分子量22 kDaの低分子Hspの1つ、HspB8はアクチン骨格の制御に関与し、正しい紡錘体配向性の決定に必要である³⁴ことなどが知られている。

1章で明らかにしたように、熱ショックは紡錘体配向性異常を引き起こし、SACの活性化を介して細胞分裂停止を引き起こす。熱ショックタンパク質は熱ショック時の細胞の保護に寄与するため、熱ショックによるSAC活性化に熱ショックタンパク質が関与する可能性が考えられる。しかし、熱ショック時の細胞分裂制御に関しては、Hsp70が熱ショックから中心体を保護し、正確な細胞分裂進行に寄与することが報告されている²¹のみであり、熱ショックによるSAC活性化に熱ショックタンパク質が関与するかは不明である。そこで本章では熱ショックによるSAC活性化への熱ショックタンパク質の関与とその制御機構について検討を行った。

2-2 実験方法

2-2-1 材料・機器

1) 細胞

細胞はHeLa S3細胞 (1章と同じ)、histone H2B-GFP 発現HeLa細胞 (熊本大学 佐谷 秀行先生より譲渡⁶⁰⁶¹)、HEK293 細胞 [Qbiogene (Carlsbad, CA, USA) より購入]、HCT116 細胞 (千葉大学 朝長 毅先生より譲渡)、hTERT RPE-1細胞 (1章と同じ) を使用した。

2) 抗体

以下に示す一次抗体をウエスタンブロット (WB) 及び免疫染色法 (IF) で使用した。

- ・マウスモノクローナル抗actin抗体 (WB 2000倍希釈, A3853, clone No. AC-40, Sigma-Aldrich)
- ・マウスモノクローナル抗BubR1抗体 (1章と同じ)
- ・マウスモノクローナル抗Cdc20抗体 (WB 2000倍希釈, sc-13162, clone E-7, Santa Cruz Biotechnology)
- ・マウスモノクローナル抗Bub3抗体 (WB 1000倍希釈, sc-376506, clone E-7, Santa Cruz Biotechnology)
- ・マウスモノクローナル抗FoxM1抗体 (WB 2000倍希釈, sc-376471, clone G-5, Santa Cruz Biotechnology)
- ・マウスモノクローナル抗AIM-1抗体 (WB 1000倍希釈, 611082, clone 6/AIM-1, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)
- ・ウサギモノクローナル抗phospho-Knl1抗体 (Thr943/Thr1155) (IF 400倍希釈, 40758S, clone D8D4N, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)
- ・ウサギモノクローナル抗Phospho-Aurora A抗体 (Thr288)/Aurora B (Thr232)/Aurora C (Thr198) (WB 1000倍希釈, 2914, clone D13A11, Cell Signaling Technology)
- ・ウサギポリクローナル抗human Hsp105 抗体⁶² (IF 400倍希釈, WB 1000希釈)
- ・ウサギポリクローナル抗Mad2抗体 (WB 7000倍希釈, A300-301A, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA)
- ・ウサギポリクローナル抗phospho-Histone H3 (Ser10) 抗体 (IF 400倍希釈, 9701S, Cell Signaling Technology)
- ・ラットモノクローナル 抗 α -tubulin抗体 (1章と同じ)
- ・CREST、ヒト抗セントロメア抗体 (1章と同じ)
- ・マウスIgGアイソタイプコントロール抗体 (免疫沈降実験のネガティブコントロールとして使用, sc-2025, Santa Cruz Biotechnology)

以下に示す二次抗体をウエスタンブロット及び免疫染色法で使用した。

ウエスタンブロットで使用した抗体

- ・西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ロバ抗マウスIgG抗体 (2000倍希釈, 7076S, Cell Signaling Technology, Jackson ImmunoResearchの抗体は1章と同じ)
- ・西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ニワトリ抗ラットIgG抗体 (2000倍希釈, sc-2964, Santa Cruz Biotechnology)
- ・西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ロバ抗ラットIgG抗体 (4000倍希釈, 712-035-153, Jackson

ImmunoResearch)

- ・西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体 (2000倍希釈, 7074, Cell Signaling Technology)
- ・西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ロバ抗ウサギIgG抗体 (4000倍希釈, 177-035-152, Jackson ImmunoResearch)
- ・西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス軽鎖特異的IgG抗体 (4000倍希釈, 115-035-174, Jackson ImmunoResearch)
- ・西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ重鎖特異的IgG抗体 (4000倍希釈, 111-035-046, Jackson ImmunoResearch)

免疫染色で使用した抗体

- ・Alexa Fluor 488標識ロバ抗マウスIgG抗体 (1章と同じ)
- ・Alexa Fluor 555標識ロバ抗マウスIgG抗体 (400-800倍希釈, A21202, A31570, Life Technology, Waltham, MA, USA)
- ・Alexa Fluor 555標識ロバ抗ウサギIgG抗体 (400倍希釈, A31572, Life Technology)
- ・Alexa Fluor 488標識ロバ抗ラットIgG抗体 (800倍希釈, A21208, Life Technology)
- ・Alexa Fluor 555標識ヤギ抗ラットIgG抗体 (1章と同じ)
- ・FITC標識抗ヒトIgG抗体 (1章と同じ)

3) 試薬

可逆的Cdk1阻害剤RO-3306 (217699, Merck-Millipore; S7747, Selleckchem, Houston, TX, USA) は7~9 μM で20時間細胞に処理した。Mps1阻害剤AZ3146 (11170, Adooq Bioscience, Irvine, CA, USA) は2 μM で使用した。プロテアソーム阻害剤MG-132 (10012628, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA; 3175-v, ペプチド研究所) は40 μM で使用した。微小管重合阻害剤、ノコダゾール (146-08533, 富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪) は0.1 $\mu\text{g/ml}$ で使用した。Hsp70阻害剤、VER-155008 (SML0271-5MG, Sigma-Aldrich) は5 μM で使用した。上記の試薬は全てジメチルスルホキシドに溶解した。Thymidine (T1895-10G, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) は4 mMで使用した。Hoechst 33342 (Merck-Millipore, darmstadt, Germany) は1 μM で使用した。上記の試薬は水に溶解した。

4) siRNA

RISC-free control siRNA (siCont, Dharmacon, Chicago, IL, USA)

Hsp105 siRNA (5'-GCAAAUCACUCAUGCAAACUU-3', Dharmacon)

shHsp105-1 (5'-CCGGAGCAAATCACTCATGCAAACACTCGAGTGTGTTGTCATGAGTGATTTGCTTTTTTG-3')

shHsp105-2 (5'-CCGGAGCTTAAGTCTGTAGTCTTTACTCGAGTAAAGACTACAGACTTAAGCTTTTTTG-3')

MISSION siRNA Universal Negative Control (SIC-001, Sigma-Aldrich)

Mad2 siRNA (siMad2-1, Hs01_00042213, siMad2-2, Hs_00042212, Sigma-Aldrich)

5) 機器

蛍光顕微鏡は1章と同じものを使用した。

共焦点画像を取得するために63倍油浸レンズ (NA, 1.40) を搭載した共焦点レーザー顕微鏡

(LSM800, Carl Zeiss, Jena, Germany) を使用した。Hoechst 33342、FITC、Alexa Fluor 555をそれぞれ405、488、561 nmの光で励起し、400–460、510–550、570–620 蛍光フィルターで蛍光を取得した。

電気泳動槽、転写装置、ライブセルイメージング装置は1章と同じものを使用した。

2-2-2 細胞培養、細胞周期同調及び熱ショック処理

HeLa S3細胞、HCT116細胞、histone H2B-GFP発現HeLa細胞、HEK293細胞は37°C、5% CO₂のインキュベーター内で、5% FBS、20 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、2 mM L(+)-glutamineを添加したDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用いて培養した。不死化ヒト網膜色素上皮 (hTERT RPE-1) 細胞は37°C、5% CO₂のインキュベーター内で、10% FBSを添加したDMEM/Ham's F-12 (08460-95, ナカライテスク, 京都) を用いて培養した。

HeLa S3細胞をG2/M境界で停止させるために、7、8及び9 μ Mの可逆的Cdk1阻害剤、RO-3306を20時間細胞に処理した。HCT116細胞は6 μ MのRO-3306を20時間、hTERT RPE-1細胞は7 μ MのRO-3306を20時間処理した。その後、Ca²⁺、Mg²⁺を添加したPBS [以下、PBS(+)] を予め37°Cに加温し、細胞を4回洗い、37°Cに加温した培地を添加することで、RO-3306によるG2/M境界での停止を解除し、細胞分裂を再開させた。細胞を中期で停止させる場合には、RO-3306除去30分後にプロテアソーム阻害剤MG-132を40 μ M添加し、60分培養した。

熱ショックは1章と同じ方法で行った。

2-2-3 ノックダウン

トランスフェクションは1-2-3と同様の方法で行った。Hsp105をノックダウンするために、RISC-free control siRNA (siCont, Dharmacon, Chicago, IL, USA) 、 Hsp105 siRNA (5'-GCAAAUCACUCAUGCAAACUU-3', Dharmacon) をHeLa S3とhTERT RPE-1細胞にそれぞれ50、20 pmolトランスフェクションした。Mad2に対するsiRNAは1-2-3と同じものを使用した。

Hsp105ノックダウン細胞株、及びコントロール細胞株を樹立するために、HEK293細胞を3.5 cm径ディッシュに200000個播種した。翌日、Opti-MEM 100 μ Lにレンチウイルスパッケージングプラスミド [pCAG-HIVgp, pCMV-VSV-G-RSV-Rev (理化学研究所 三好 浩之先生より譲渡)] をそれぞれ1 μ gと、pLKO-Hsp105-1, -2, -Cont⁶³を1.5 μ g、Opti-MEM 100 μ LにLipofectamine 2000に2.5 μ L添加し、室温で5分静置した。その後2液を混合し、室温で30分静置した。ディッシュに37°Cで温めたOpti-MEMを800 μ L添加し、そこへLipofectamine 2000とプラスミドの混合液を添加し、トランスフェクションを行った。トランスフェクション48時間後に、その培養上清をHeLa S3細胞またはHCT116細胞に添加した。添加して48時間後から感染細胞を1 μ g/ml puromycinでセレクションした。ウエスタンブロットでノックダウンされていることを確認した。ウエスタンブロットは1-2-3と同様の方法で行った。

2-2-4 細胞分裂進行の観察

1-2-5と同様の方法で観察した。

2-2-5 SAC活性化の評価

BubR1は1-2-6と同様の方法で観察した。

Mitotic indexと多核細胞を観察するために、細胞に0.1 µg/mL ノコダゾールを16時間処理した。その後、PBSで希釈した4%ホルムアルデヒドで20分間固定し、 α -tubulinとDNAを染色した。 α -tubulinとDNAの形態を指標に細胞分裂期細胞の割合と多核細胞の割合を計測した。

リン酸化Kln1を観察するために、2 mM PIPES (pH 6.8)、0.2% Triton X-100、10 mM EGTA、1 mM MgCl₂及び4%ホルムアルデヒドを添加したPBSを用いて20分間固定した。その後p-Kln1とCRESTを染色し、CREST上に局在するp-Kln1の量を計測した。

2-2-6 細胞増殖速度の評価

24穴プレートにshCont細胞とshHsp105-2細胞をそれぞれ7×10⁴個ずつ播種し、1-5日間培養した。細胞を播種してから1、3及び5日目にBürker-Türk hemocytometerを使用して細胞数を計測した。

2-2-7 免疫沈降法を用いたmitotic checkpoint complex (MCC) 形成の観察

HeLa S3細胞をS期で停止させるために、細胞に25 mM thymidineを24時間処理した。その後、細胞を37°Cに加温したPBSで4回洗浄し、37°Cに加温した培地を添加することで、S期停止を解除した。その9時間後に0.1 µg/mlノコダゾールを細胞に添加し、4時間培養することで、細胞を細胞分裂期に停止させた。Cyclin B1の分解を抑制するために、ノコダゾール処理の後半2時間にプロテアソーム阻害剤MG132を40 µM添加した。

HeLa S3 shHsp105-2細胞がthymidineで同調できなかつたため、HeLa S3 shCont及びshHsp105-2細胞に0.1 µg/mlノコダゾールを8時間処理し、細胞分裂期に細胞を停止させた。Cyclin B1の分解を抑制するために、ノコダゾール処理の後半4時間にプロテアソーム阻害剤MG132を40 µM添加した。

Mitotic-shake offにより回収した分裂期細胞にTriton lysis buffer [0.1% Triton X-100, 43 mM Hepes-NaOH (pH7.4), 2.6 mM EDTA-NaOH (pH7.4), 6.5% glycerol, 115 mM NaF, 20 mM β -glycerophosphate, 2 mM PMSF, 10 mM Na₃VO₄, 10 µg/ml aprotinin, 4 µg/ml pepstatin A, 10 µg/ml leupeptin及び2.5 mM EGTA]を添加し、氷上で30分静置した。15000 rpmで30分間遠心した後、1 µgの一次抗体と反応させたprotein G-sepharoseに細胞抽出液を添加し、4°Cで3時間インキュベートした。その後、プロテアソーム阻害剤 (20 mM β -glycerophosphate, 10 mM Na₃VO₄及び10 mM Hepes-NaOH) を添加した0.1% Triton lysis buffer を用いてprotein G-sepharose を洗い、ホスファターゼ阻害剤 (50 mM NaF, 20 mM β -glycerophosphate, 10 mM Na₃VO₄及び10 mM Hepes-NaOH) を添加したSDS-sample bufferで溶解した。

2-2-8 Lagging chromosomeの観察

リン酸化histone H3を観察するために、PBSに溶解した4%ホルムアルデヒドで15分間固定した後、100% MeOHを用いて-30°Cで10分間固定した。リン酸化histone H3を指標にlagging chromosomeを持つ細胞の割合を計測した。

2-2-9 統計解析

1-2-9と同様の方法で行った。

2-3 実験結果

2-3-1 SAC活性化に及ぼすHsp105ノックダウンの効果

Hsp70は細胞分裂期において中心体に局在し、熱ショックから中心体を保護することで、正常な細胞分裂進行に寄与していることが報告されている²¹。そこで、熱ショックによるSAC活性化にHsp70が関与しているか調べるため、RO-3306を処理した細胞にATP競合的Hsp70阻害剤VER-155008を4時間処理し、RO-3306処理の最後の30分間に42°Cの熱ショックを与え、RO-3306除去90分後に固定し、細胞分裂の進行を観察した。熱ショックを与えていない細胞では、RO-3306を除去して90分後には染色体分配を開始した後の細胞の割合 [後期/終期/細胞質分裂期(A/T/Cyto)] の細胞の割合は50%であったが (図2-2 B, shCont, 37°C)、熱ショックを与えた細胞では、染色体分配を開始した後の細胞の割合 (A/T/Cyto) は24%であり、大半の細胞が染色体分配開始前で停止していた (図2-1, DMSO)。これは、既述した (1-3-2項)、熱ショックが細胞分裂進行を停止させることと一致する。VER-155008処理細胞に熱ショックを与えたとき、染色体分配を開始した細胞の割合 (A/T/Cyto) は22%であり、Hsp70阻害による細胞分裂後期以降の細胞の増加はなかった (図2-1, VER155008)。これらの結果は、ここで用いた熱ショック条件によるSAC活性化にHsp70は関与しないことを示唆している。一方で、VER-155008処理細胞において、前期/前中期 (P/PM) の細胞の増加が観察された。この増加は、Hsp70は熱ショックから中心体を保護しているとの知見に基づく²¹、Hsp70を阻害することで中心体が熱ショックによるダメージを受けて正常に機能しなくなり、紡錘体形成異常が一部現れたためであると考えられる。

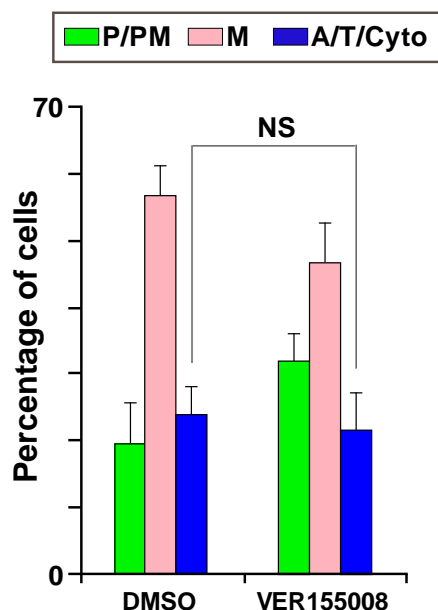


図 2-1 Hsp70の阻害は熱ショックによる細胞分裂停止を解除しない

HeLa S3細胞に8 μ M RO-3306を20時間処理した。その後30分間に42°Cの熱ショックを与えた。5 μ M VER155008はRO-3306処理の最後4時間に処理した。RO-3306を除去した後90分間細胞を培養し、固定した。VER155008処理群はRO-3306除去後も引き続きVER155008を添加した。微小管の形態と染色体の整列を指標に、細胞分裂期の各段階を前期/前中期 (緑, P/PM)、中期 (赤, M)、後期/終期/細胞質分裂期 (青, A/T/Cyto) に分けて計測を行った。グラフは3回以上の実験 (n > 200) の平均 \pm 標準偏差を示す。NSはスチューデントのt検定より算出した有意差がないことを示している。DMSO 対 VER155008, p = 0.738. *FASEB J.* 2019 (印刷中) Figure 4より引用。

過去に、Hsp70スーパーファミリーの1つ、Hsp105が熱ショックから微小管を保護すること⁶や、出芽酵母のHsp105/110ファミリータンパク質であるSse1がスピンドル長を制御すること³⁰が報告されている。これらの知見から、熱ショックを与えた分裂期細胞において、Hsp105が細胞分裂制御に関与している可能性が考えられた。そこで2種類のshRNAを用いて、Hsp105をノックダウンしたHeLa S3細胞株 (shHsp105-1及び-2) を樹立した (図2-2 A)。コントロール細胞 (shCont細胞) とshHsp105-2細胞にRO-3306を処理してG2/M境界で停止させ、RO-3306処理最後の30分間に42°Cの熱ショックを与えた。RO-3306を除去して90分後に細胞を固定し観察した。shCont細胞において、熱ショックを与えていない細胞では後期以降の細胞 (A/T/Cyto) の割合が49%であった (図2-2 B, 左グラフ, shCont 37°C) が、熱ショックを与えた細胞では中期の細胞 (M) の割合が65%まで蓄積し (図2-2 B, 左グラフ, shCont 42°C)、熱ショックによる細胞分裂の停止が観察された。この結果は、前述した (1-3-2項)、熱ショックが細胞分裂を停止させることと一致する。一方、shHsp105-2細胞に熱ショックを与えると、shCont細胞と比較して、後期以降の細胞 (A/T/Cyto) の割合が有意に増加した (図2-2 B, 左グラフ, shHsp105, 42°C)。shHsp105-1細胞においても同様に後期以降の細胞の増加が観察された (図2-2, 右グラフ)。これらの結果は、熱ショックによる細胞分裂停止がHsp105ノックダウンにより減弱したことを示唆している。

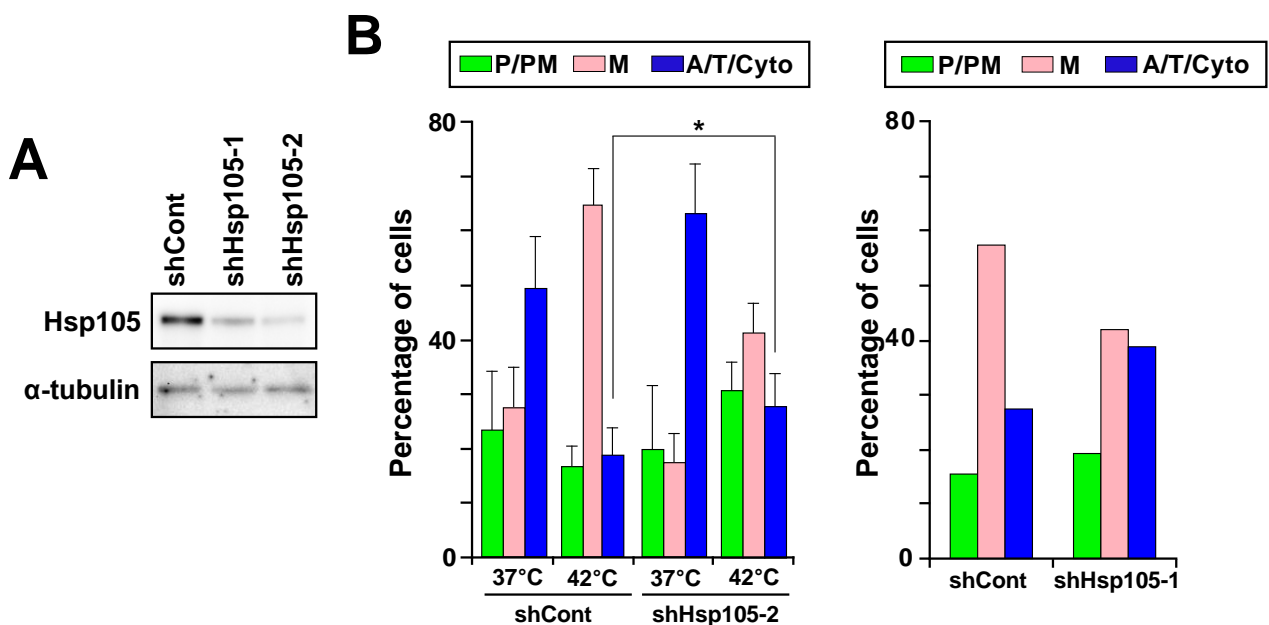


図 2-2 Hsp105ノックダウンは熱ショックによる細胞分裂停止を減弱させる

(A) shCont, shHsp105-1及びshHsp105-2細胞から全細胞抽出液を回収し、ウエスタンブロットで解析した。抗Hsp105抗体、抗 α -tubulin抗体 (ローディングコントロール) を反応させた。(B) HeLa S3 shCont, HeLa S3 shHsp105-1及び-2細胞に9 μ M RO-3306を20時間処理し、最後の30分間に42°Cの熱ショックを与えた。RO-3306除去後90分間培養し固定した。微小管の形態と染色体の整列を指標に、細胞分裂期を、前期/前中期 (緑, P/PM)、中期 (赤, M)、後期/終期/細胞質分裂期 (青, A/T/Cyto) に分類した。左グラフ, グラフは3回以上の実験 ($n \geq 90$) の平均 \pm 標準偏差を示している。アスタリスクはスチューデントのt検定より算出した有意差を示している (* $p < 0.05$)。shCont (42°C) 対 shHsp105-2 (42°C), $p = 0.0362$ 。右グラフ, 実験の平均 ($n > 200$) を示している。FASEB J. 2019 (印刷中) Figure 4より引用。

Hsp105ノックダウンが熱ショックによる細胞分裂停止に与える影響を更に詳細に観察するために、熱ショック後のshCont細胞とshHsp105-2細胞の細胞分裂進行をタイムラプスイメージングを用いて観察した。細胞にRO-3306を処理してG2/M境界で停止させ、RO-3306処理の最後の30分間に42°Cの熱ショックを与えた。RO-3306除去と同時に0.1 μ M Hoechst 33342を添加し、タイムラプスイメージングによる観察を180分間行った。細胞分裂を前期/前中期 (P/PM)、中期 (M)及び後期/終期/細胞質分裂期 (A/T/Cyto) に分けて計測したところ、前述した結果 (1-3-2項) と同様に、shCont細胞の多くが前期/前

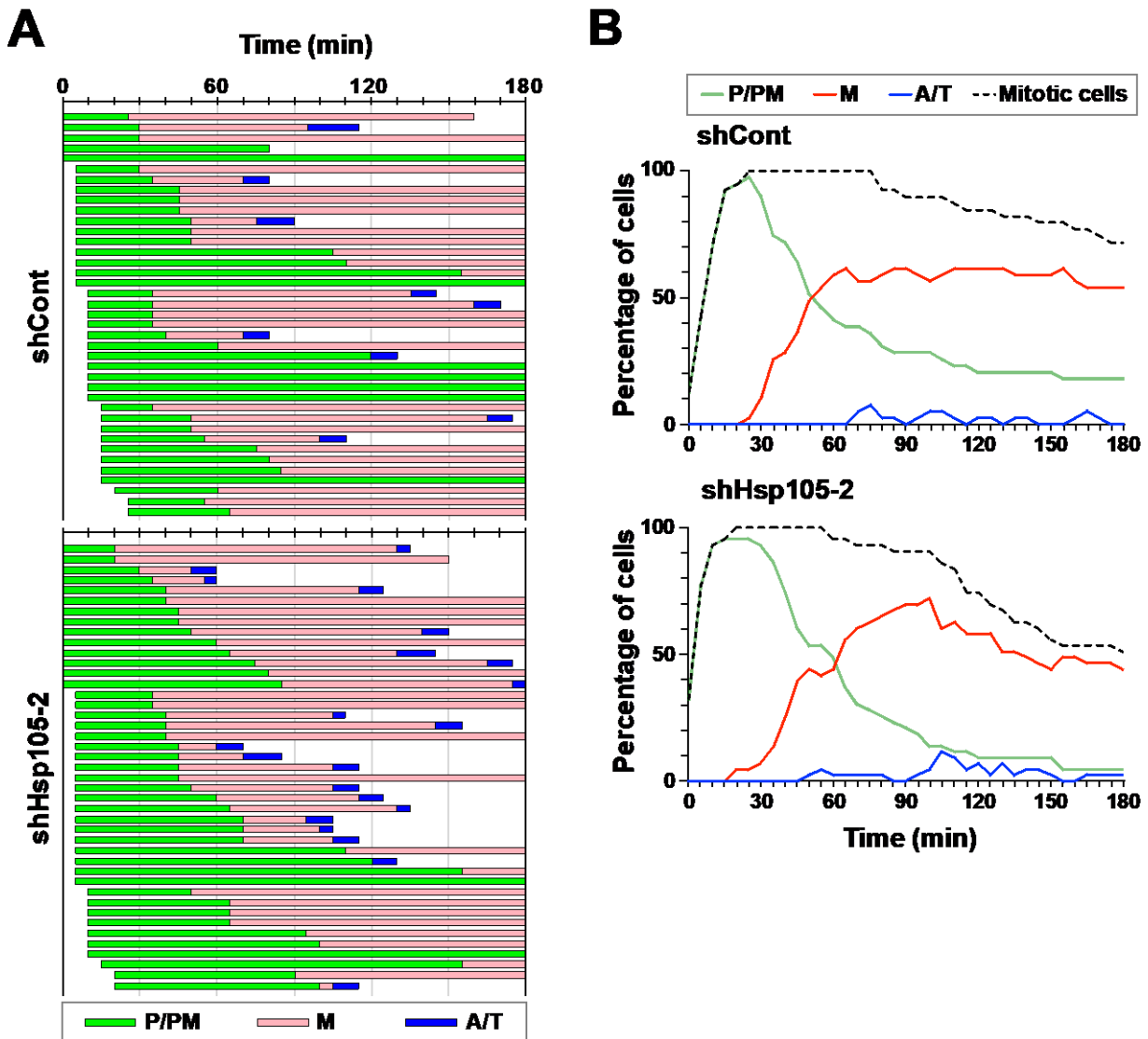


図 2-3 Hsp105ノックダウンは熱ショックによる細胞分裂中期での停止を解除する

HeLa S3 shCont、shHsp105-2細胞に9 μ M RO-3306を20時間処理し、最後の30分間に42°Cの熱ショックを与えた。RO-3306を除去し、0.1 μ M Hoechst 33342を添加してtime-lapse imagingを行った。Aは図1-3と同様に、観察した個々の細胞 (37°C, n=39, 42°C, n=43) の細胞分裂の各段階の時間を示している。Bは観察したそれぞれの時間における細胞分裂期 (前期から終期 [黒破線, Mitotic cells])、前期/前中期 (緑, P/PM)、中期 (赤, M)、後期/終期/細胞質分裂期 (青, A/T/Cyto) の割合を示している。FASEB J. 2019 (印刷中) Figure 4より引用。

中期から中期へは進行するものの、中期で停止することが観察された (図2-3 A, shCont)。一方、shCont細胞と比較して、より多くのshHsp105細胞が観察時間中に細胞分裂を終了した(図2-3A, shHsp105-2)。細胞分裂各段階の割合の時間推移において、shCont細胞では、前期/前中期 (P/PM) のピークが観察開始20分後付近に出現した後、中期 (M) が増加し、約60分から中期の細胞の割合は観察終了までほぼ一定であった (図2-3 B, shCont)。shHsp105-2細胞では、前期/前中期 (P/PM) のピークはshCont細胞と大きく変わらなかったが、中期 (M) の割合は観察開始後90分付近までは上昇するものの、その後減少に転じた (図2-3 B, shHsp105-2)。これらの結果は、Hsp105が熱ショックによる細胞分裂停止を解除することを示唆している。

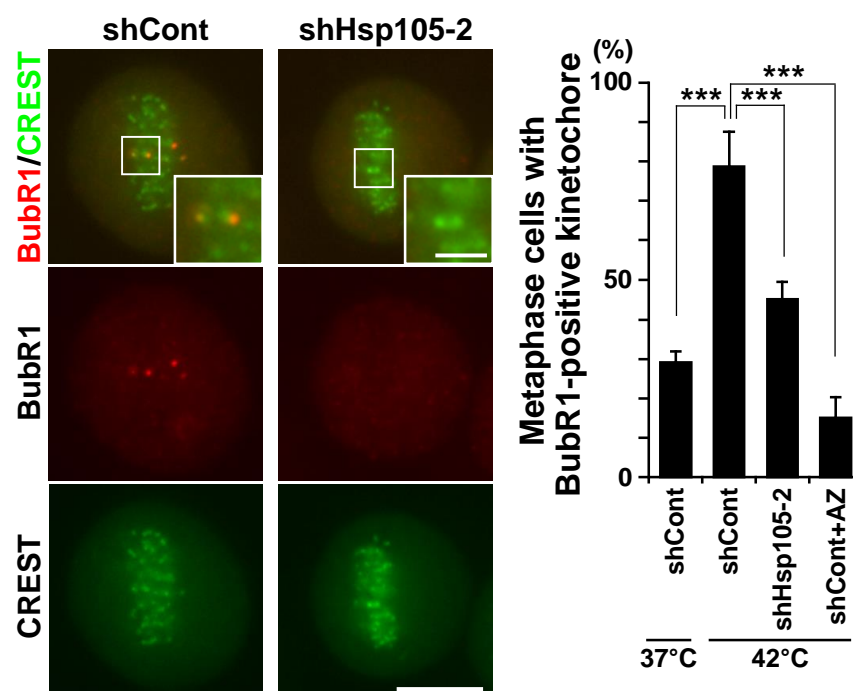


図2-4 熱ショックによるBubR1の動原体局在量の増加はHsp105ノックダウンにより減少する

HeLa S3 shCont、HeLa S3 shHsp105-2細胞に9 μ M RO-3306を20時間処理し、最後の30分間に42°Cの熱ショックを与えた。RO-3306除去後30分間培養した後、40 μ M MG132を添加して60分間培養した。固定した細胞のBubR1とCRESTを染色した。左、HeLa S3 shCont、HeLa S3 shHsp105-2細胞の写真 (赤,BubR1、緑,CREST)。挿入している写真は動原体の拡大写真である。右、動原体上にBubR1が局在している中期の細胞の割合を示した。グラフは3回の実験 (n = 100) の平均±標準偏差を示している。アスタリスクはダネット検定を用いて計算した有意差があることを示す (***) $p < 0.001$ 。shCont (37°C) 対 shCont (42°C), $p < 1.0 \times 10^{-4}$, shCont (42°C) 対 shHsp105-2 (42°C), $p = 0.000216$, shCont (42°C) 対 shCont + AZ3146 (42°C), $p < 1.0 \times 10^{-4}$ 。スケールバー、10 μ m (拡大写真)、2.5 μ m (挿入写真)。FASEB J. 2019 (印刷中) Figure 5より引用。

1章で示したように、熱ショックによる細胞分裂停止にはSACの活性化が関与している。Hsp105ノックダウンが熱ショックによる細胞分裂停止を一部解除したことから、Hsp105がSACの活性化に関与している可能性が考えられた。そこで、SACの活性化時に動原体に局在するタンパク質、BubR1の動原体局在を調べた (図2-4, 左)。上述した結果 (1-3-3) と同様、非熱ショック時と比較して、熱ショックを与えた細胞ではBubR1が動原体に局在している細胞が有意に増加し (図2-4, 右, 42°C shCont)、shHsp105-2細胞ではその増加が有意に減少した (図2-4, 右, 42°C shHsp105-2)。また、ポジティブコントロールとして、SACに必須のキナーゼであるMps1の阻害剤、AZ-3146を添加した細胞では、BubR1が動原体に局在している細胞が非熱ショック時よりも減少した (図2-4, 右, 42°C shCont+AZ)。これらの結果は、Hsp105がSAC活性化に関与していることを示唆している。

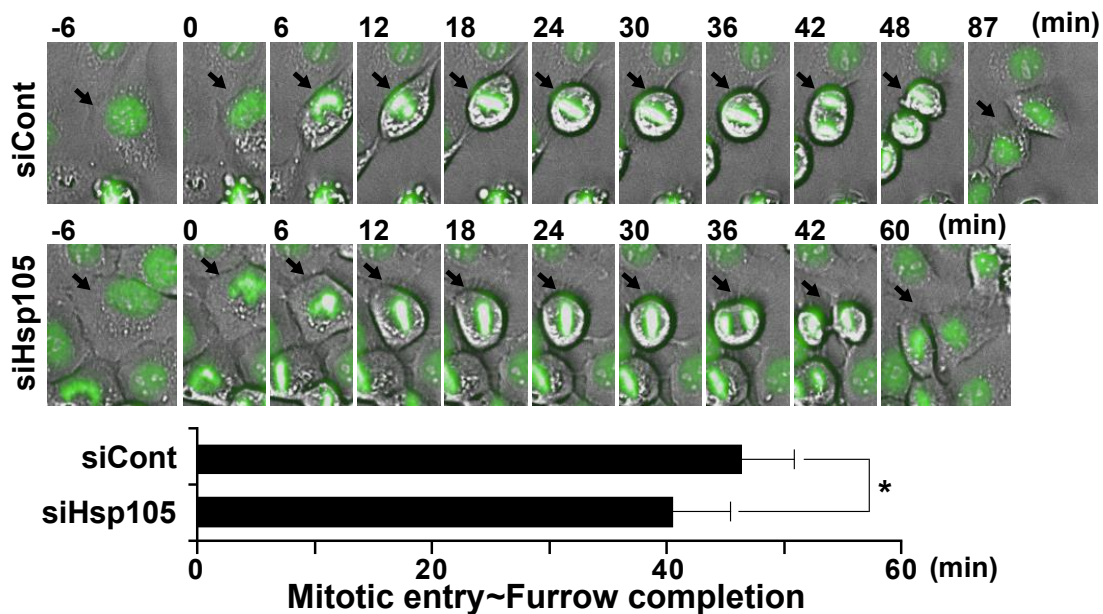


図 2-5 Hsp105ノックダウンは非熱ショック時の細胞分裂進行を促進する

histone H2B-GFPを発現させたHeLa細胞に、Hsp105を標的としたsiRNA (siHsp105) とコントロールsiRNA (siCont) をトランスフェクションし、タイムラプスイメージングで観察した。上、コントロールsiRNAを導入した細胞とHsp105をノックダウンした細胞における、分裂期細胞のhistone H2B-GFP (緑) と明視野の経時的変化を示す。下、細胞分裂開始から分裂溝形成完了までの時間を計測した。グラフは平均±標準偏差を示している (siCont, n = 20, siHsp105, n = 20)。アスタリスクはスチューデントのt検定を用いて算出した有意差を示している (***)。siCont 対 siHsp105, p = 0.000356。FASEB J. 2019 (印刷中) Figure 6より引用。

熱ショックなどのストレスがない場合でも、全ての動原体に紡錘糸が正しく結合するまでSACは活性化している。そこで、非熱ショック時のSAC活性化にHsp105が関与するかを検討した。非同調の条件で細胞分裂期の観察を行うためには、タイムラプスイメージングを長時間行う必要がある。0.1 μ M Hoechst 33342を長時間細胞に処理しDNAを観察すると、細胞毒性が生じる可能性があるため、histone H2B-GFP発現HeLa細胞を用いた。コントロールsiRNAを導入した細胞では、細胞分裂開始18分後に染色体が整列し、42分後に染色体分配が開始された (図2-5, 上, siCont)。Hsp105をノックダウンしても、コントロールsiRNAを導入した細胞と同様に、細胞分裂開始18分後に染色体が一行に整列した。しかし、染色体の分配は細胞分裂開始36分後に開始し、染色体分配開始のタイミングは、Hsp105をノックダウンした細胞の方がコントロール細胞よりも早かった (図2-5, 上, siHsp105)。細胞分裂開始から分裂溝形成が完了するまでの時間を計測したところ、Hsp105ノックダウンにより有意に減少した (図2-5, 下)。

RO-3306を用いて同調し、RO-3306除去90分後の細胞を観察したところ、Hsp105ノックダウン (図2-6 A) により、細胞質分裂期の細胞 (矢印) が多く観察された (図2-6 B, 左)。細胞分裂期を染色体分配開始前 (P/PM/M) と開始後 (A/T/Cyto) に分けて定量したところ、コントロール細胞では、RO-3306除去60分後に染色体分配開始後 (A/T/Cyto) の細胞が28%であった (図2-6 B, 右, siCont, 60 min) が、Hsp105をノックダウンすると有意ではないものの37%に増加した (図2-6 B, 右, siHsp105, 60 min)。RO-3306除去90分後にはコントロール細胞では染色体分配開始後 (A/T/Cyto) の細胞が46%であった (図2-6 B, 右, siCont, 90 min) が、Hsp105をノックダウンすると60%まで有意に増加し、コントロール細胞よりも早く細胞分裂が進行した (図2-6 B, siHsp105, 90 min)。shHsp105-1細胞でも同様に、コントロール細胞と比較して細胞分裂が促進した (図2-6 C)。これらの結果から、Hsp105は非熱ショック時の細胞分裂においても、細胞分裂進行に関与することが明らかになった。

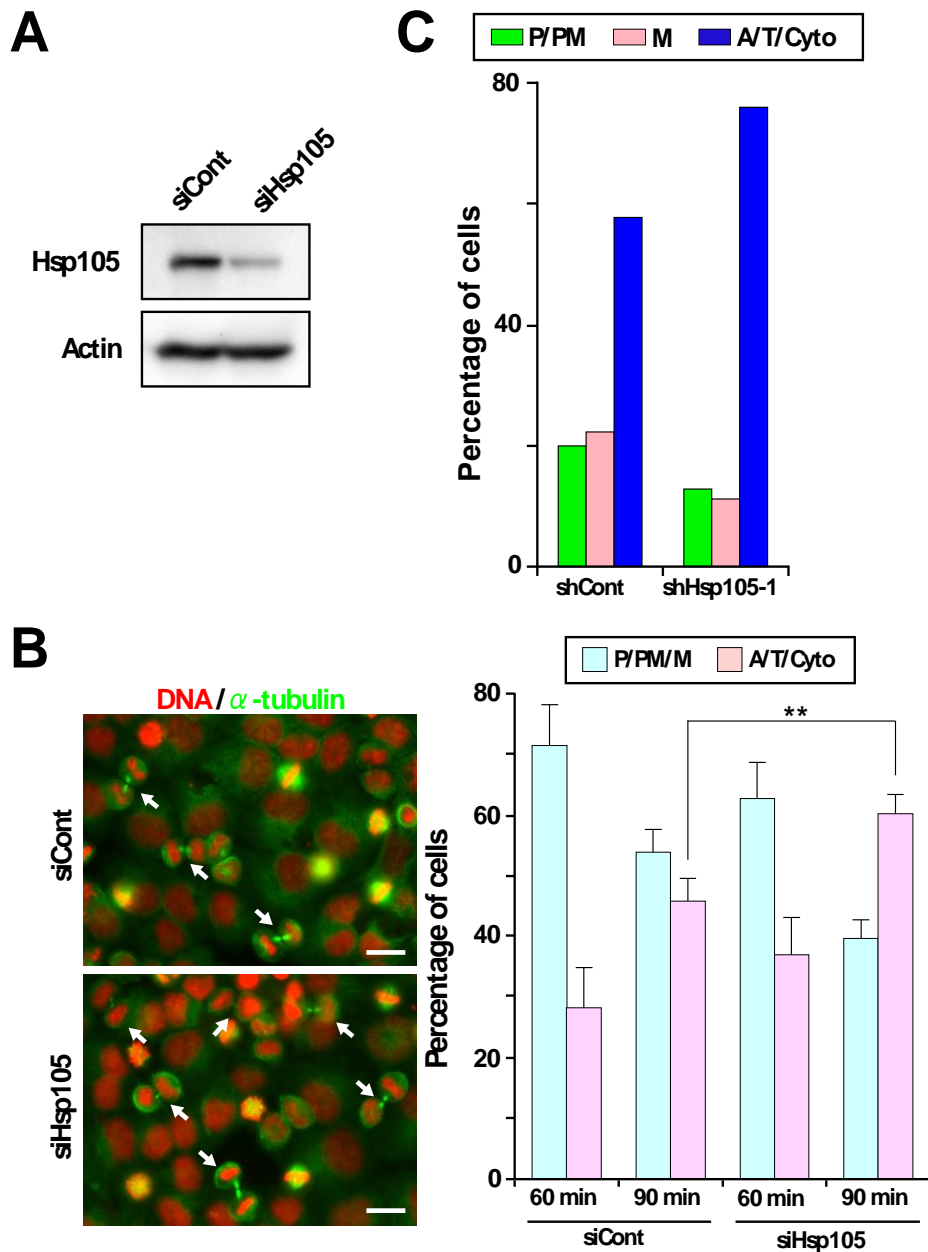


図 2-6 RO-3306を用いた同調実験においてHsp105ノックダウンは非熱ショック時の細胞分裂進行を促進する

(A) siCont、siHsp105をトランスフェクションしたHeLa S3細胞の全細胞溶解液をウェスタンブロットで解析した。抗Hsp105抗体、抗actin抗体（ローディングコントロール）を用いた。(B) siCont、siHsp105をトランスフェクションしたHeLa S3細胞に9 μ M RO-3306を20時間処理した。RO-3306除去後90分間培養し、固定した。微小管の形態と染色体の整列を指標に、細胞分裂期の染色体分配開始前 (青, P/PM/M) と染色体分配開始後 (赤, A/T/Cyto) の割合を計測した。グラフは3回以上の実験の平均土標準偏差を示している。アスタリスクはスチューデントのt検定より算出した有意差があることを示している (** $p < 0.01$)。siCont 対 siHsp105, $p = 0.00308$ 。白い矢印は細胞質分裂期の細胞を示す。(C) shCont、shHsp105-1細胞に8 μ M RO-3306を20時間処理した。RO-3306除去後90分間培養し、固定した。微小管の形態と染色体の整列を指標に、前期/前中期 (緑, P/PM)、中期 (赤, M)、後期/終期/細胞質分裂期 (青, A/T/Cyto) の割合を計測した。FASEB J. 2019 (印刷中) Figure 5及びSupplemental Figure 2より引用。

微小管重合阻害剤ノコダゾールを細胞に処理すると、微小管伸長が阻害されるために紡錘体が形成できなくなるため、SACが活性化し、細胞は細胞分裂期で停止する。しかし、SACの機能に異常が生じた細胞では、ノコダゾールを処理しても細胞分裂が停止せず、細胞は間期に進行するため、分裂期細胞の割合が低下する。そして、SAC機能異常により間期に進行した細胞では多核を形成することが知られている^{64, 65}。そこで分裂期細胞の割合と多核細胞の割合を指標に、Hsp105がSAC活性化に関与しているかを熱ショックを与えない条件下において観察した。ノコダゾールを処理して16時間後の細胞分裂期細胞の割合を計測したところ、コントロール細胞 (shCont) のmitotic indexは68%であった (図2-7 A, 左, shCont, M-phase)。一方、Hsp105をノックダウンした細胞 (shHsp105-2) のmitotic indexは43%であり、コントロール細胞と比較して有意に減少した (図2-7 A, shHsp105-2, M-phase)。多核細胞を計測したところ、ノコダゾールを処理していないとき、shCont細胞とshHsp105-2細胞間で差はなかった (図2-7 B, 左, none)。しかし、ノコダゾール処理16時間後の多核細胞を計測すると、shCont細胞では4.2%であった (図2-7 B, 左, shHsp105-2) が、shHsp105-2細胞では8.1%まで有意に増加した (図2-7 B, 左, shHsp105-2)。Hsp105ノックダウンにより細胞周期が遅延した結果、mitotic indexが減少した可能性を検討するために、HeLa S3 shCont、shHsp105-2細胞を播種し、1、3及び5日後の細胞数を計測することで、それぞれの細胞の細胞増殖速度を計測した。しかし、HeLa S3 shCont及びshHsp105-2細胞間で細胞増殖速度に差はなかった (図2-8)。よって、Hsp105ノックダウン細胞で観察されたmitotic indexの減少は、細胞周期が遅延したためではなく、ノコダゾール存在下で細胞分裂が進行し、その後細胞分裂が終了したためであることが分かった。一方、SACに必須のタンパク質、Mad2をノックダウンした時のmitotic indexを計測したところ、ノコダゾールを16時間処理した時のmitotic indexは、コントロール細胞では50%であった (図2-7 A, 右, siCont) が、Mad2ノックダウン細胞でそれぞれ8.9% (図2-7 A, 右, siMad2-1)と23% (図2-7 A, 右, siMad2-2) に顕著に減少した。また、多核細胞の割合も、コントロール細胞では8.6%であったが (図2-7 B, 右, siCont)、Mad2ノックダウン細胞では33% (図2-7 B, 右, siMad2-1) または28% (図2-7 B, 右, siMad2-2) に有意に増加していた。これらの結果は、Mad2ノックダウンによりSACの活性化がほぼ完全に消失したことを示している。Mad2ノックダウン時の結果と比較すると、Hsp105ノックダウンではノコダゾール処理時の細胞分裂期細胞の割合の減少及び、多核細胞の増加の程度は小さかったことから、Hsp105は非熱ショック時のSAC制御に関与するが、その関与は部分的であることが示唆された。

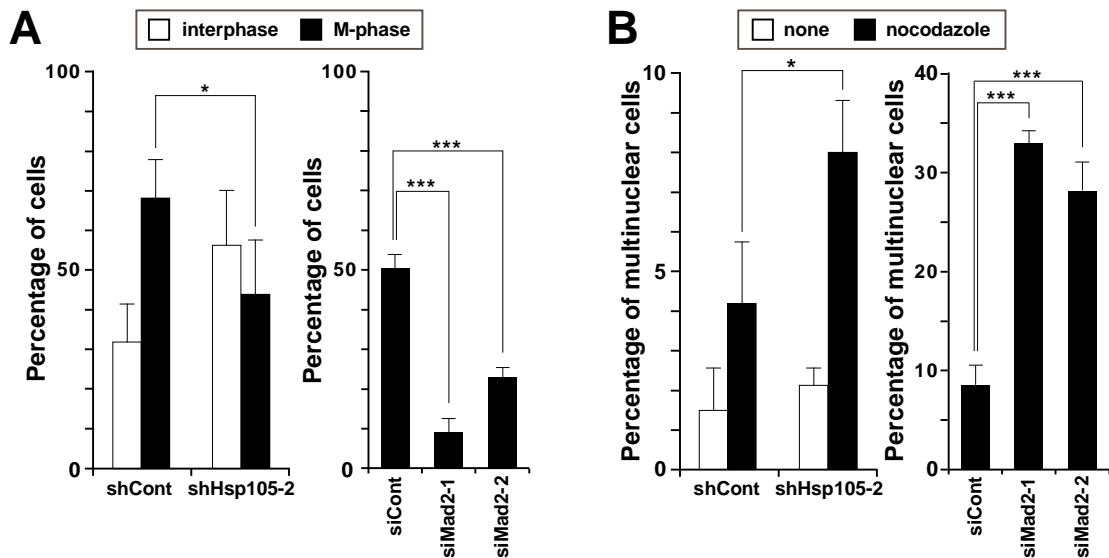


図 2-7 Hsp105ノックダウンは非熱ショック時のSAC活性化に異常を引き起こす

細胞に0.1 $\mu\text{g/ml}$ ノコダゾールを16時間処理した。AとBはそれぞれmitotic indexと多核細胞の割合を示している。左のグラフ, HeLa S3 shContまたはshHsp105-2細胞を使用した。右のグラフ, HeLa S3細胞にsiContまたはsiMad2をトランスフェクションし, 8時間後にノコダゾールを添加した。グラフは3回以上の実験の平均±標準偏差を示している ($n > 500$)。アスタリスクはTukey-Kramer検定より算出した有意差を示している (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$)。A, shCont 対 shHsp105-2, $p = 0.0120$, siCont 対 siMad2-1, $p = 8.63 \times 10^{-6}$, siCont 対 siMad2-2, $p = 9.20 \times 10^{-5}$ B, shCont 対 shHsp105-2, $p = 0.0121$, siCont 対 siMad2-1, $p = 1.99 \times 10^{-5}$, siCont 対 siMad2-2, $p = 7.00 \times 10^{-5}$ 。FASEB J. 2019 (印刷中) Figure 6より引用。

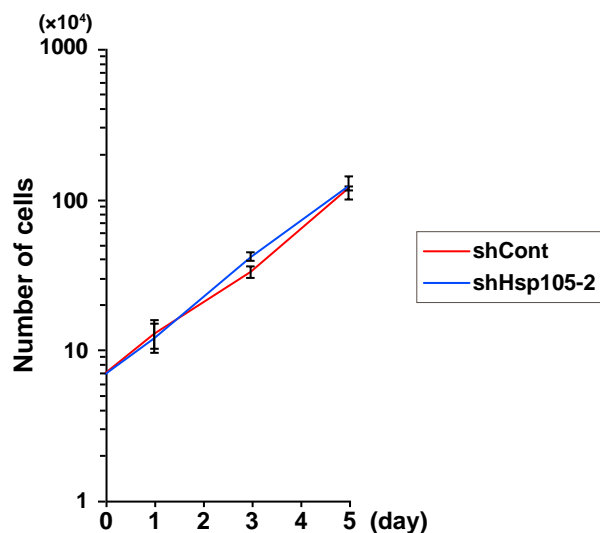


図 2-8 Hsp105ノックダウンは細胞増殖に影響を与えない

HeLa S3 shCont, shHsp105-2細胞を24穴プレートに 7×10^4 個ずつ播種し, 1, 3または5日後にBürker-Türk血球計算盤を用いて細胞数を計測した。グラフは3 wellの平均±標準偏差を示している。FASEB J. 2019 (印刷中) Supplemental Figure 4より引用。

他のがん種でもHsp105によるSAC制御が存在するかを検証するために、ヒト結腸腺がん細胞HCT116細胞にウイルスベクター、shHsp105-1、2及びshContをインフェクションにより導入し、Hsp105ノックダウン株およびコントロール株を作成した(図2-9 A)。この細胞をRO-3306を用いて細胞周期を同調した。HeLa S3細胞は染色体数が70本程度と正常細胞よりもかなり多いが、HCT116細胞の染色体数は正常細胞と同じ46本である。全ての動原体が微小管に正しく結合するまでの時間は染色体数に依存するため、HCT116細胞の細胞分裂の進行は染色体数が多いHeLa S3細胞よりも速い⁶⁶。そこでHeLa S3細胞ではRO-3306除去60あるいは90分後に観察したのに対して、HCT116細胞ではRO-3306除去45分後に細胞を固定し細胞分裂進行の様子を観察した。shRNAをトランスフェクションしていない細胞の細胞質分裂期(Cyto)の割合(図2-9 B, None)とshCont細胞の細胞質分裂期(Cyto)の割合(図2-10 B, shCont)に差はなかったものの、Hsp105-1及び-2細胞のいずれにおいても細胞質分裂期(Cyto)の割合(図2-9 B, shHsp105-1, -2)は有意に増加した。この結果から、HCT116細胞においてもHsp105がSAC制御に関与することが明らかになった。

Hsp105によるSAC制御が正常細胞でも存在するか観察した。siContあるいはsiHsp105を導入したhTERT RPE-1細胞(図2-10 A)にRO-3306を処理し、最後の30分間に41°Cの熱ショックを与えた。RO-3306を除去して60分後に細胞を固定し観察したところ、コントロールでは前期/前中期/中期(P/M/M)の細胞が74%であった(図2-10 B, siCont)が、Hsp105ノックダウンにより60%に有意に減少した(図2-10 B, siHsp105)。また、熱ショックを与えていない細胞をRO-3306除去40分後に固定し観察した場合にも、Hsp105ノックダウンにより前期/前中期/中期(P/M/M)の細胞の有意な減少が観察された(図2-10 C)。以上の結果より、不死化した正常細胞であるhTERT RPE-1細胞においてHsp105がSAC制御に関与することが明らかとなり、Hsp105によるSAC制御は正常細胞とがん細胞間で保存されている機能であることが示唆された。

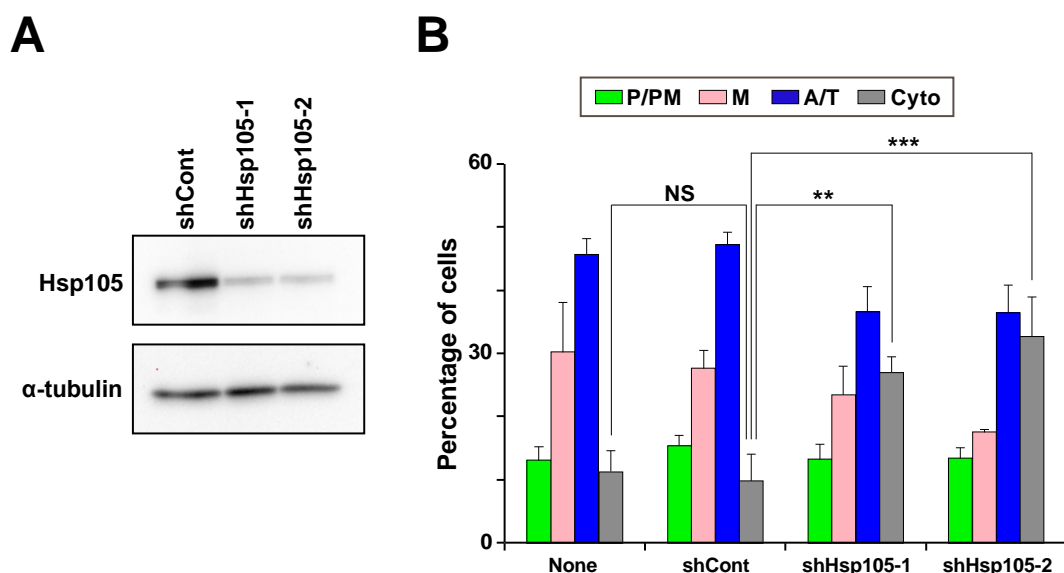


図 2-9 HCT116細胞においてHsp105のノックダウンは細胞分裂進行を促進する
説明は次ページ

(A) HCT116 shCont、shHsp105-1、-2細胞の全細胞溶解液をウェスタンブロットで解析した。抗Hsp105抗体、抗 α -tubulin抗体（ローディングコントロール）を用いた。(B) HCT116 shCont、shHsp105-1、-2細胞に6 μ M RO-3306を20時間処理した。RO-3306除去後、細胞を45分間培養し、固定した。固定した細胞は α -tubulinとDNAを染色し、微小管の形態と染色体の整列を指標に、細胞分裂期の各段階の割合を、前期/前中期 (緑, P/PM)、中期 (赤, M)、後期/終期/細胞質分裂期 (青, A/T/Cyto) に分けて計測を行った。グラフは3回の実験の平均 \pm 標準偏差を示している ($n > 200$)。アスタリスクはTukey-Kramer検定より算出した有意差を示している (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。トランスフェクションしていないHCT116細胞 対 HCT116 shCont細胞, $p = 0.977$, HCT116 shCont細胞 対 HCT116 shHsp105-1細胞, $p = 0.00548$, HCT116 shCont細胞 対 HCT116 shHsp105-2細胞, $p = 0.000844$ 。FASEB J. 2019 (印刷中) Supplemental Figure 6より引用。

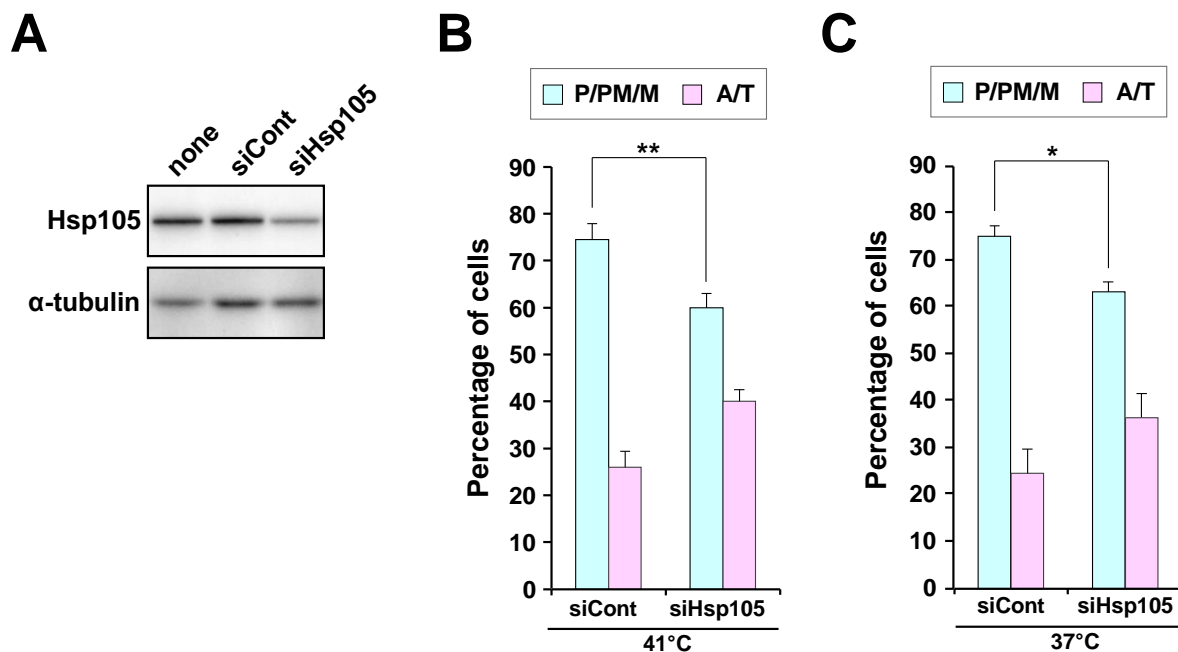


図 2-10 hTERT RPE-1細胞においてHsp105のノックダウンは細胞分裂進行を促進する

(A) hTERT RPE-1細胞にHsp105をターゲットとしたsiRNA (siHsp105) とコントロールsiRNA (siCont) をトランスフェクションし48時間培養した。siContとsiHsp105をトランスフェクションしたhTERT RPE-1細胞の全細胞溶解液をウェスタンブロットで解析した。抗Hsp105抗体、抗 α -tubulin抗体（ローディングコントロール）を用いた。(B, C) siContとshHsp105-2をトランスフェクションしたhTERT RPE-1細胞に7 μ M RO-3306を20時間処理し、Bは最後の30分間に41°Cの熱ショックを与え、Cは熱ショックを与えなかった。RO-3306除去後、Bは60分、Cは40分間培養し、固定した。固定した細胞の α -tubulinとDNAを染色し、微小管の形態と染色体の整列を指標に、細胞分裂期を後期開始前 (青, P/PM/M) と後期開始後 (赤, A/T/Cyto) に分けて細胞の割合を計測した。グラフは3回の実験の平均 \pm 標準偏差を示している。アスタリスクはスチューデントのt検定より算出した有意差があることを示している (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。B, P/PM/MにおけるsiCont 対 siHsp105, $p = 0.004869$, C, P/PM/MにおけるsiCont 対 siHsp105, $p = 0.0196$ 。FASEB J. 2019 (印刷中) Supplemental Figure 5より引用。

2-3-2 Hsp105によるSAC制御機構

Hsp105によるSAC制御機構について検討を行った。Hsp105はタンパク質フォールディングに関与する^{67, 68}ため、Hsp105がSAC制御キナーゼ及び、SAC関連タンパク質の発現やフォールディングに関与することで、SAC活性化を制御する可能性がある。転写因子であるFoxM1はSAC制御キナーゼであるPlk1やAurora B転写を制御することでSAC制御に関与する⁶⁹。また、FoxM1は熱ショック条件下において、熱ショックタンパク質の転写を誘導するheat shock factor 1の転写を誘導し、G2期からM期への進行を制御する⁷⁰。そこで、Hsp105のノックダウンがFoxM1の発現量及び、FoxM1によって制御されるAurora Bの発現量とリン酸化に影響するかを調べた。しかし、Hsp105をノックダウンしても、FoxM1とAurora Bの発現量、あるいはAurora Bのリン酸化量に変化はなかった (図2-11)。よって、Hsp105によるSACの制御はFoxM1を介さないことが示唆された。

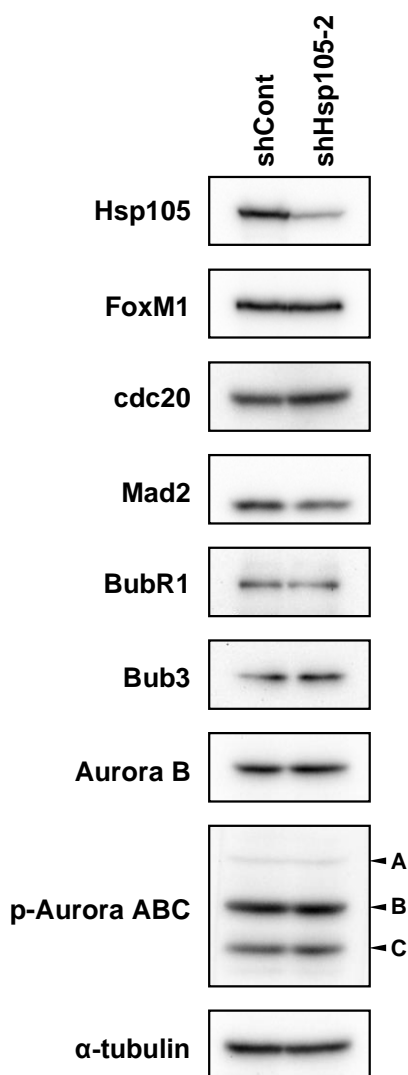


図 2-11 Hsp105ノックダウンはSAC制御キナーゼとSAC関連タンパク質の発現に影響を与えない
HeLa S3 shCont、shHsp105-2細胞の全細胞溶解液をウエスタンブロットで解析した。抗Hsp105抗体、抗Fox M1抗体、抗Cdc20抗体、抗Mad2抗体、抗BubR1抗体、抗Bub3抗体、Aurora B抗体、リン酸化Aurora ABC抗体及び抗α-tubulin抗体 (ローディングコントロール) を用いた。FASEB J. 2019 (印刷中) Supplemental Figure 7より引用。

SACが活性化するときには、セリン/スレオニンおよびチロシン残基を基質とするキナーゼであるMps1が動原体のKnl1をリン酸化することで、Knl1はチェックポイントタンパク質の複合体形成の足場として機能する⁴³。2-3-1及び2項に示したように、Mps1阻害剤を細胞に処理した時と同様に、Hsp105ノックダウンはSACの活性化異常を引き起こした。そこで、Hsp105がMps1によるリン酸化制御に関与するか否かについて検討した。初めに、抗リン酸化Knl1 (p-Knl1) 抗体を用いて前中期 (PM)、中期 (M) の細胞におけるp-Knl1の局在及びKnl1のリン酸化量を観察した。その結果、前中期及び中期に、p-Knl1の動原体への局在が観察された (図2-12)。中期の細胞において、中心体が強く染色されたが、p-Knl1が中心体に局在する報告はないため、抗体の非特異的な結合によるものであると考えられる。前中期と中期を比較すると、中期の細胞の動原体のp-Knl1由来の蛍光強度は非常に弱く、中期の細胞ではKnl1のリン酸化量の低下が示された。中期の細胞は微小管が正しく結合した動原体と、まだ結合していない動原体が混在している状態である。よって、全ての動原体がまだ微小管と正しく結合していない前中期の細胞と比較すると、中期の細胞ではSACの活性が弱く、Knl1のリン酸化量が減少したと考えられる。

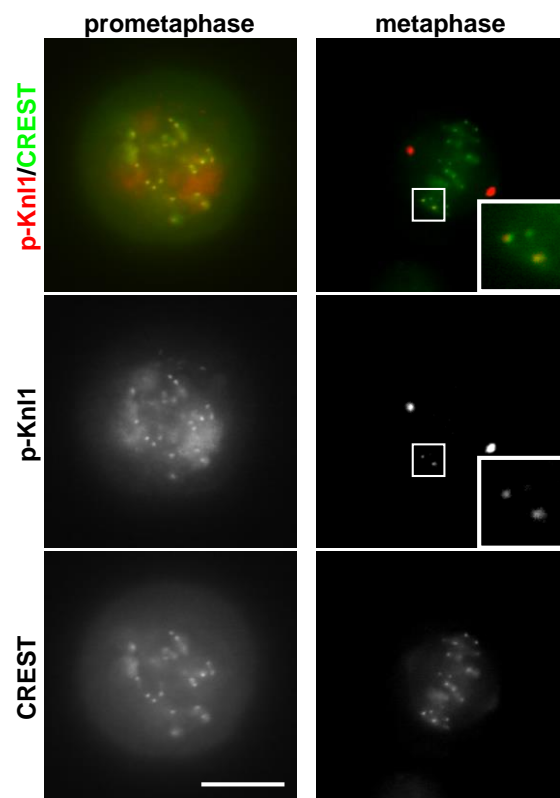


図 2-12 前中期及び中期の細胞におけるリン酸化Knl1の観察

HeLa S3細胞を固定し、p-Knl1 (赤) とCREST (緑) を染色した。前中期の細胞 (左)及び中期の細胞 (右)を示している。

Hsp105がMps1によるKnl1のリン酸化に関与するかを調べるために、コントロール (shCont) 及びHsp105をノックダウンしたshHsp105-2細胞にRO-3306を20時間処理して細胞周期をG2/M境界で停止させ、最後の30分間に42°Cの熱ショックを与えた。その後RO-3306を除去し細胞分裂を開始させた。その30分後にプロテアソーム阻害剤MG132を添加し、細胞分裂が後期に進行する際に必要なcyclin B1の分解を抑制することで、細胞を中期で停止させた。MG132を添加して60分後に細胞を固定し、p-Knl1を染色した。shCont細胞に熱ショックを与えたとき、p-Knl1の動原体上への局在が観察され (図2-13, 左, shCont)、Mps1阻害剤AZ3146により、動原体上のMps1によるKnl1の動原体上への局在は阻害された (図2-13, 左, shCont+AZ)。shHsp105-2細胞に熱ショックを与えたときには、p-Knl1が動原体上に局在した (図2-12, 左, shHsp105-2)。p-Knl1が動原体上に局在している中期の細胞の割合を計測したところ、熱ショックを与えていないshCont細胞では29%であった (図2-13, 右, 37°C, shCont) のに対し、shCont細胞に熱ショックを与えると70%に増加した (図2-13, 右, 42°C, shCont)。熱ショックを与えたshCont細胞にAZ3146を添加すると、p-Knl1が動原体上に局在する中期の細胞の割合は18%まで減少した (図2-12, 右, 42°C, shCont+AZ)。しかし、shHsp105-2細胞に熱ショックを与えたときには、p-Knl1が動原体上に局在する中期の細胞の割合は68%であり (図2-13, 右, 42°C, shHsp105)、shCont細胞に熱ショックを与えたときと比較して有意差はなかった。これらの結果は、Hsp105がMps1によるKnl1のリン酸化に影響を与えないことを示唆している。

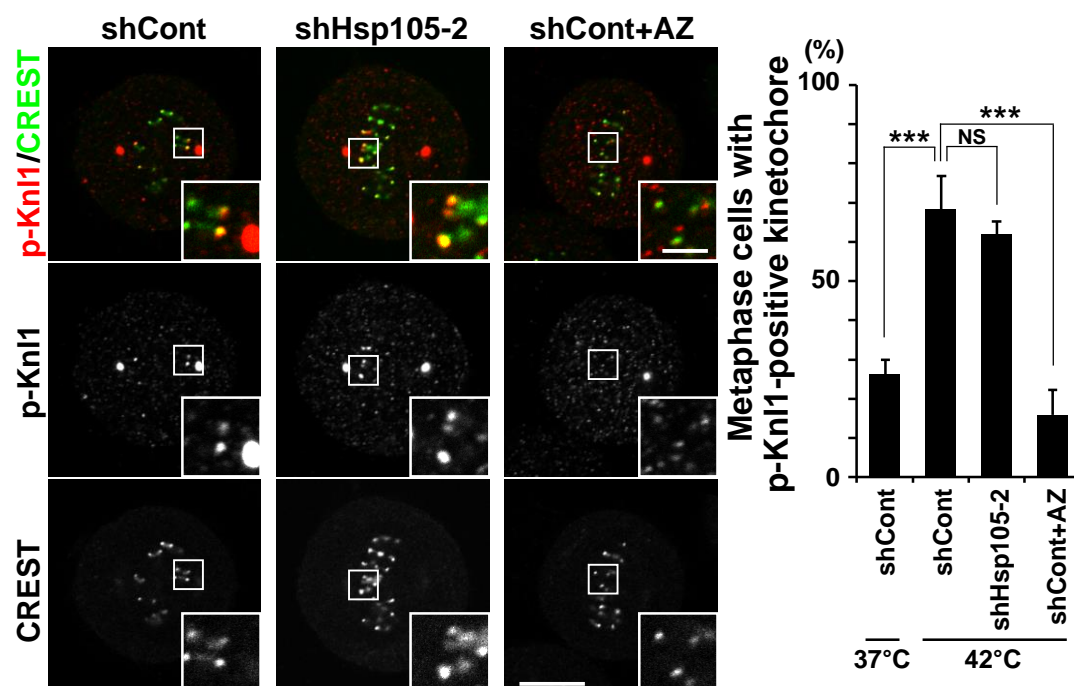


図 2-13 熱ショックはp-Knl1の動原体局在を増加させるが、Hsp105ノックダウンは熱ショックによるp-Knl1の動原体局在に影響を与えない
説明は次ページ

HeLa S3 shCont、HeLa S3 shHsp105-2細胞に9 μ M RO-3306を20時間処理し、最後の30分間に42°Cの熱ショックを与えた。RO-3306除去後30分間培養した後、40 μ M MG132を添加して60分間培養した。固定した細胞のp-Knl1 (赤) と動原体マーカーとしてCREST (緑) を染色した。左、それぞれの細胞の共焦点画像を示している。右、中期の細胞のうち、動原体上にp-Knl1が局在している細胞の割合を示している。アスタリスクとNSはそれぞれダネット検定で算出した有意差があることとないことを示している (***) $p < 0.001$, NS, not significant)。37°C shCont 対 42°C shCont, $p < 0.001$, 42°C shCont 対 42°C shHsp105-2, $p = 0.469$, 42°C shCont 対 42°C shCont + AZ3146, $p < 0.001$ 。スケールバー、10 μ m (拡大写真)、2.5 μ m (挿入写真)。FASEB J. 2019 (印刷中) Figure 5より引用。

SACが活性化するとき、動原体上でCdc20、Mad2、BubR1及びBub3がMCCを形成する。このMCCがE3ユビキチンリガーであるAPC/Cを阻害し、cyclin B1などの分解を抑制することで、細胞分裂を中期で停止させる⁴³。Hsp105のSAC制御メカニズムを解明するために、Hsp105ノックダウン細胞を用いて、Cdc20、Mad2、BubR1及びBub3の発現量を観察したが、変化はなかった (図2-11)。このことは、Hsp105がMCC構成タンパク質の発現に関与していないことを示唆する。Hsp105がMCCに結合する可能性を検討するために抗Cdc20抗体を用いて免疫沈降実験を行った。その結果、これまでに結合することが報告されているMad2及びBubR1のCdc20との共沈が観察されると共に、Hsp105がCdc20と共沈した (図2-14 A, Cdc20, AZ3146: -)。更に、Mps1阻害剤AZ3146を添加してMCCの形成を抑制したところ、過去に報告されている通り、Cdc20と共沈するMad2及びBubR1量が減少すると共に、Cdc20と共沈するHsp105量も減少した (図2-14 A, Cdc20, AZ3146: +)。これらの結果は、Hsp105がMps1のキナーゼ活性依存的にCdc20と結合することを示している。次に、Hsp105がMCC形成に関与する可能性を検討するためにHsp105ノックダウン細胞を用いて抗Cdc20抗体で免疫沈降実験を行った。その結果、抗Cdc20抗体で沈降するCdc20、Mad2、BubR1の量が増加した (図2-14 B)。コントロール細胞とHsp105をノックダウンした細胞間で、Cdc20に結合するMad2、BubR1量には差がなかった (図2-14 D, E) が、抗Cdc20抗体に結合するCdc20量が有意に増加した (図2-14 C) ことから、Hsp105によりMCCの形成量が増加した可能性がある。しかし、Hsp105ノックダウン時にはSACの活性化が抑制されることから、この可能性は考えにくい。あるいは、Cdc20との結合において、Hsp105が抗Cdc20抗体と競合している可能性も考えられる。使用した抗Cdc20抗体はCdc20のN末端領域 (1-175) を認識するため、Hsp105がCdc20のN末端領域に結合する可能性がある。以上の結果より、少なくともHsp105ノックダウンはMCC形成を抑制しないものの、Hsp105はMps1依存的にCdc20と結合してSAC制御に関与することが示唆される。

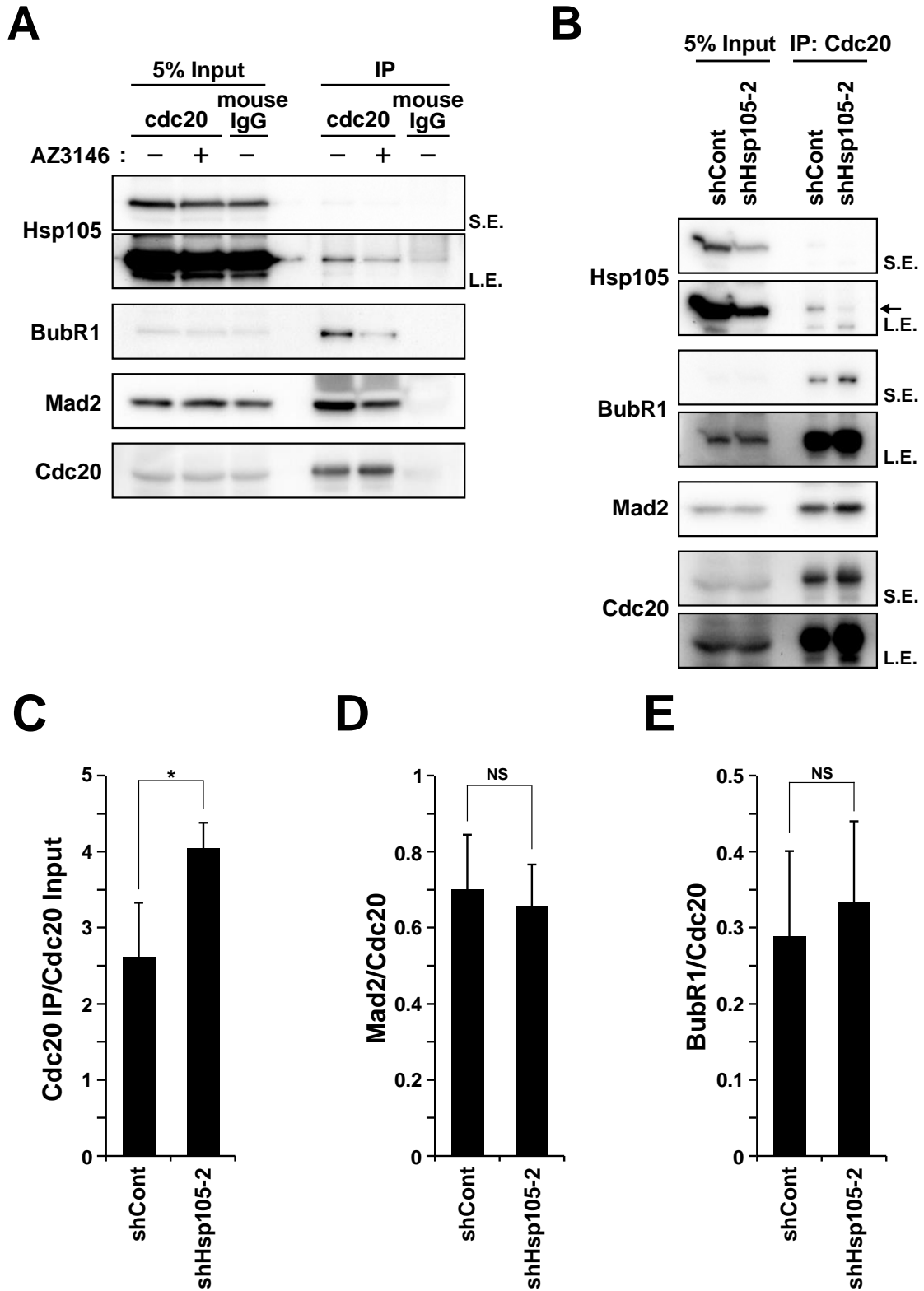


図 2-14 Hsp105はMps1依存的にCdc20と結合する
説明は次ページ

(A) HeLa S3細胞に4 mM thymidineを24時間処理後、thymidineを除去して9時間培養した。その後0.1 $\mu\text{g/ml}$ ノコダゾールを4時間処理し、後半の2時間に40 μM MG132と2 μM AZ3146を添加した。細胞はmitotic-shake offにより回収し、Triton lysis bufferを用いて細胞を溶解した。この細胞抽出液を用いて抗Cdc20抗体あるいは抗マウス IgG抗体により免疫沈降を行った。細胞抽出液 (5% input) と免疫沈降物をウェスタンブロットで解析した。抗Cdc20抗体、抗Hsp105抗体、抗BubR1抗体、抗Mad2抗体を用いた。(B-E) HeLa S3 shCont、shHsp105-2細胞に0.1 $\mu\text{g/ml}$ ノコダゾールを8時間処理し、後半4時間に40 μM MG132を添加し培養した。細胞はmitotic-shake offにより回収し、Triton lysis bufferを用いて細胞を溶解した。この細胞抽出液を用いて抗Cdc20抗体あるいは抗マウス IgG抗体により免疫沈降を行った。細胞抽出液 (5% input) と免疫沈降物をウェスタンブロットで解析した。抗Cdc20抗体、抗Hsp105抗体、抗BubR1抗体、抗Mad2抗体を用いた。矢印はHsp105のバンドを示している。S.E., short exposure, L.E., long exposure. 検出したバンドのシグナル強度を定量した (C-E)。Cdc20の細胞抽出液のシグナル強度 (Cdc20 Input) に対する免疫沈降物のシグナル強度 (Cdc20 IP) の比をC に示した。免疫沈降物における、Cdc20のシグナル強度に対するMad2、BubR1のシグナル強度の比をそれぞれD、Eに示した。アスタリスクはスチューデントのt検定より算出した有意差を示している (* $p < 0.05$, NS, not significant)。Cdc20 IP/Cdc20 InputにおけるshCont 対 shHsp105-2, $p = 0.03569$, Mad2/Cdc20におけるshCont 対 shHsp105-2, $p = 0.7213$, BubR1/Cdc20におけるshCont 対 shHsp105-2, $p = 0.6369$ 。FASEB J. 2019 (印刷中) Figure 5及びSupplemental Figure 7より引用。

2-3-3 lagging chromosome形成への影響

SACの活性化あるいは機能に異常が生じた細胞では、全ての動原体に紡錘糸が正しく結合する前に染色体分配が開始するため、染色体分配異常が生じる。異常の1つにlagging chromosomeと呼ばれる染色体の一部が分配されずに赤道面上に取り残される現象がある (図2-15, 左)。このlagging chromosomeを指標に染色体分配異常を評価した。非熱ショック時のshCont細胞では、lagging chromosomeを持つ細胞の割合は6.8%であった (図2-15, 右, 37°C, shCont)が、非熱ショック時のshHsp105-2細胞では、14%まで有意に増加した (図2-15, 右, 37°C, shHsp105-2)。更に、Hsp105をノックダウンしたshHsp105-2細胞に42°Cの熱ショックを与えた時、lagging chromosomeを持つ細胞の割合は21%まで増加した (図2-15, 右, 42°C, shHsp105-2)。これらの結果は、Hsp105のノックダウンがSACの活性化あるいは機能異常を介して染色体分配異常を誘導するが、熱ショック時にはSAC異常がより強く生じることを示唆している。また、コントロール細胞においては、熱ショックを与えていないときにlagging chromosomeを持つ細胞の割合が6.8%であった (図2-15, 右, 37°C, shCont)ことと比較して、42°Cの熱ショックを与えるとそれは15%まで増加した (図2-15, 右, 42°C, shCont)。この結果は、熱ショックは紡錘体配向性に異常を引き起こしてSACの活性化を誘導する一方で、lagging chromosomeを増加させるような異常も誘導する可能性を示唆している。したがって、熱ショックは染色体分配異常を引き起こすストレスであり、Hsp105はSAC制御を介して細胞を染色体異常から保護していることが示唆された。

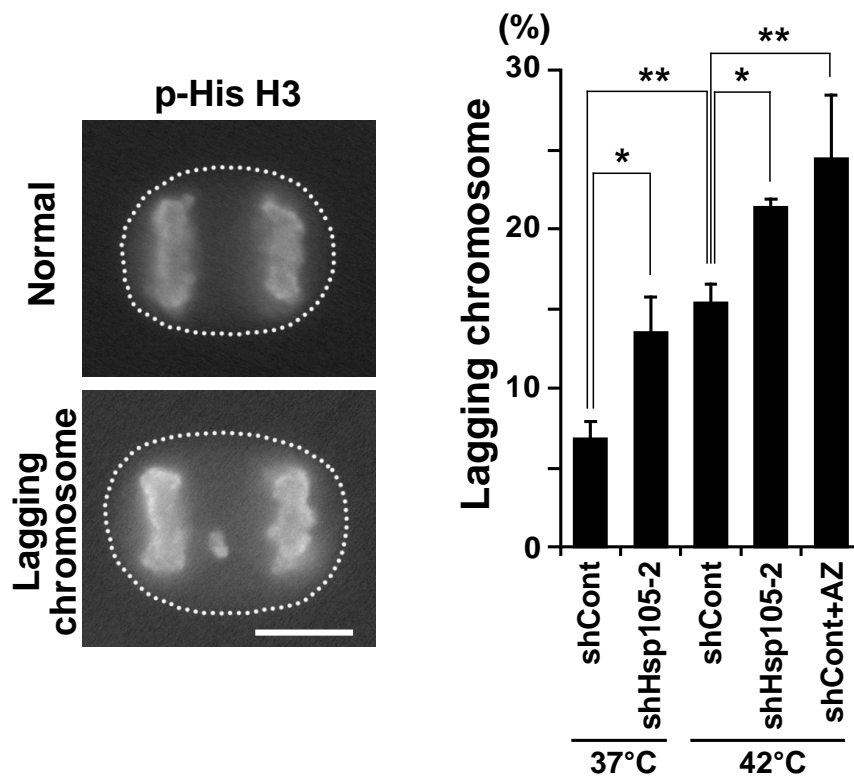


図 2-15 Hsp105ノックダウンはlagging chromosomeを増加させる

HeLa S3 shCont及びshHsp105-2細胞に8 μ M RO-3306を20時間処理し、最後の30分間に42°Cの熱ショックを与えた。RO-3306を除去後37°Cで培養し、以下のように後期/終期の細胞が多い時間で固定し、リン酸化histone H3を染色した。60分 (shCont, shHsp105-2, 37°C)、90分 (shCont + AZ, 42°C)、120分 (shHsp105-2, 42°C)、180分 (shCont, 42°C) 右、正常な分配をした染色体と、lagging chromosomeが生じた染色体をもつ細胞分裂後期の細胞の写真を示す。左、後期/終期の細胞のうちlagging chromosomeを持つ細胞の数を計測し、その割合を示した。グラフは3回の実験の平均±標準偏差を示す (n \geq 149)。アスタリスクはTukey-Kramer検定より算出した有意差を示す (*p < 0.05, **p < 0.01)。shCont (37°C) 対 shHsp105-2 (37°C), p = 0.0246, shCont (37°C) 対 shCont (42°C), p = 0.00552, shCont (42°C) 対 shHsp105-2 (42°C), p = 0.0421, shCont (42°C) 対 shCont + AZ3146 (42°C), p = 0.00342。スケールバー, 10 μ m。FASEB J. 2019 (印刷中) Figure 5より引用。

2-4 考察

本章では、熱ショックの有無に関わらず、Hsp105 が紡錘体チェックポイント制御に関与していることを明らかにした。

Hsp105 には構成的に発現している Hsp105 α と、42°C 加温でのみ発現する Hsp105 β の2つのアイソフォームが存在する⁷¹。間期の細胞では、正常時、ストレス時共に Hsp105 α は細胞質に存在し、Hsp105 β は核に存在する⁷²。本研究では42°Cの熱ショックを30分与えた細胞における SAC 活性化に Hsp105 が関与することを見出した。本研究では42°Cの熱を与えた後に観察を行っているが、比較的短時間の熱ショック直後に観察を行ったため Hsp105 β は発現誘導されておらず、SAC 制御に関与するのは Hsp105 α であると考えられる。

転写因子である FoxM1 は Plk1、Aurora B、CENP-F などの転写を制御することで紡錘体チェックポイント制御に関与している⁶⁹。また、FoxM1 は熱ショック条件下において、G2 期から M 期への進行を制御するとともに、熱ショックタンパク質の転写を誘導する heat shock factor 1 の転写を誘導する⁷⁰。仮に Hsp105 が FoxM1 のフォールディング制御に関与しているならば、Hsp105 のノックダウンが FoxM1 の機能に異常を誘導した結果、紡錘体チェックポイントの異常を誘導すると考えられる。しかし、Hsp105 をノックダウンしたとき、FoxM1 の発現量と、FoxM1 によって制御される Aurora B の発現量及びリン酸化量に変化はなかったことから、Hsp105 による紡錘体チェックポイント制御は FoxM1 を介していないと考えられる。また、Hsp105 ノックダウンにより、Cdc20、Mad2、BubR1 及び Bub3 の MCC 構成タンパク質の発現量に変化がなかったことから、Hsp105 は MCC 構成タンパク質の発現にも関与していないと考えられる。

紡錘体チェックポイントが活性化するとき、セリン/スレオニン、チロシンキナーゼ Mps1 が Bub1 や Knl1 をリン酸化する。次いで、これらのタンパク質を足場として、Cdc20、Mad2、BubR1 及び Bub3 などが動員されることで、MCC が形成される⁴³。熱ショックタンパク質の1つ Hsp90 は Mps1 のリン酸化を制御することが報告されている³²。しかし、Hsp105 をノックダウンしても、リン酸化 Knl1 の動原体局在はコントロール細胞と比較して変化がなかったことは、Hsp105 が Mps1 のキナーゼ活性に影響しないことを示唆している。

抗 Cdc20 抗体を用いた免疫沈降実験により、Hsp105 が Mps1 依存的に Cdc20 と結合することが分かった。更に、Hsp105 が Mps1 依存的に動原体に局在することも観察した。これらの結果は、Hsp105 が Mps1 の制御を受けて、動原体上で Cdc20 と相互作用することを示唆している。一方で、Hsp105 ノックダウンが Cdc20 と Mad2 及び BubR1 との結合に影響を及ぼさなかったことは、Hsp105 が MCC 形成を制御しないことを示唆している。一方、Hsp105 をノックダウンした細胞では抗 Cdc20 抗体の Cdc20 との反応性が有意に上昇したことから、Cdc20 との結合において、Hsp105 が抗 Cdc20 抗体と競合している可能性がある。抗 Cdc20 抗体は Cdc20 の N 末端領域 (1-175 アミノ酸) を認識するため、Hsp105 が Cdc20 の N 末端領域に結合する可能性がある。1-175 アミノ酸領域には、Mad2 と結合する Mad2-interacting motif (MIM) がある⁷³ほか、Bub1、Plk1 のリン酸化ドメインが含まれている⁷⁴。Yu らは、APC/C^{Cdc20} の構成分子の Cdc20 が Bub1 及び Plk1 によってリン酸化されることで不活性化することを報告している。Bub1 及び Plk1 によってリン酸化されない Cdc20 変異体は MCC 形成に影響せずに APC/C の抑制ができなくなる⁷⁴。Hsp105 をノックダウンした細胞でも同様に、MCC 形成には影響

がないものの、SAC 活性化異常が引き起こされたことから、Hsp105 が Bub1 及び Plk1 による Cdc20 のリン酸化制御に関与している可能性も考えられる。

熱ショック条件下において、Hsp105 は Hsp70/Hsp40 のヌクレオチド交換因子として機能する⁷⁵ため、Hsp105 がヌクレオチド交換因子として、Hsp70/Hsp40 の活性を増強して SAC 制御に関与する可能性が考えられる。しかし、Hsp70 阻害剤を用いた実験(2-3-1 項)により、その可能性は否定された。また過去の報告において、非熱ショック条件において、Hsp70 ノックダウンにより細胞分裂が遅延し、その際に BubR1 が動原体に局在している細胞の増加を伴うことが報告されている。これらの知見より、Hsp70 は熱ショックの有無に関わらず、SAC 制御に関与しないと考えられる。細胞分裂期において、ATP-Mg の加水分解による Mg²⁺の増加が染色体凝集を促し、それに伴って細胞の ATP 量が減少すること⁷⁶、そして、熱ショック時には細胞の ATP 量が急激に減少すること^{25,77,78}が報告されている。これらのことから、細胞分裂期の細胞に熱ショックを与えると、細胞内 ATP 量がより減少すると考えられる。Hsp105 は ATP 存在下より ADP 存在下においてタンパク質の凝集をより抑制するが、これは Hsp70/Hsp40 では認められない⁷⁹。従って、熱ショックを与えた細胞分裂期細胞、即ち ATP 量がより少なくなっている細胞においては、Hsp105 は Hsp70 よりも機能する可能性がある。よって、Hsp105 は Hsp70 とは独立して、SAC 制御に関与している可能性が考えられる。

細胞に熱ショックを与えたとき、lagging chromosome の割合が熱ショックを与えていない Hsp105 をノックダウンした細胞と同程度まで増加した。微小管脱重合阻害剤パクリタキセルは細胞分裂停止を引き起こし、細胞死を誘導する抗がん剤であるが、パクリタキセルを処理して細胞分裂期に停止させた細胞に熱ショックを与えると、細胞分裂期での停止から逸脱して G1 期に進行する現象 mitotic slippage が引き起こされることが報告されている⁸⁰。これらのことから、熱ショックは SAC 活性を減弱させる可能性がある。最近になって、細胞の ATP が枯渇すると APC/C 依存的な cyclin B1 の分解が生じ、mitotic slippage が誘導されることが報告された⁸¹。上述のように、熱ショックを与えた分裂期細胞では ATP 量がより低下すると考えられることから、熱ショックによる SAC 活性の減弱は熱ショックによる ATP 量の低下が原因である可能性が考えられる。熱ショック後に生じる lagging chromosome の割合は、有意ではないものの細胞分裂停止が長い細胞ほど多い傾向にあった。これは、細胞分裂期に止まる時間が長いほど細胞内 ATP 量が低下し、SAC に異常が生じたことに起因する可能性がある。また別の可能性として、Hsp105 は熱によってダメージを受けたタンパク質の凝集を抑制する機能がある^{79,82}ことから、熱ショックを与えた細胞では Hsp105 がタンパク質の凝集を抑制するために機能し、相対的に SAC 制御への寄与が低下した可能性がある。即ち、熱によってダメージを受けたタンパク質と結合する Hsp105 が増加し、Cdc20 と相互作用する Hsp105 が減少した結果、熱ショックが Hsp105 ノックダウンと同程度の lagging chromosome を生じさせた可能性がある。

Hsp105 による SAC 制御が、がん細胞である HeLa S3 細胞及び HCT116 細胞と不死化正常細胞 hTERT RPE-1 細胞において観察されたことから、Hsp105 による SAC 制御は正常細胞、がん細胞間で保存される機能であることが示唆される。SAC は正確な染色体分配に必須の機構であるため生物の生存に必要であり、その破綻は細胞のがん化に関与する⁸³のみならず、発生異常を誘導する可能性がある。よって、Hsp105 が SAC 制御を介して正常な細胞の維持に寄与している可能性が考えられる。

2-5 小括

本研究により、以下のことが明らかになった。

- 熱ショックによって誘導される SAC 活性化に Hsp105 が関与する。
- 熱ショックを与えていない細胞の SAC 活性化にも Hsp105 が関与する。
- Hsp105 は MCC 形成には寄与しないものの、Mps1 依存的に Cdc20 と相互作用する。
- Hsp105 をノックダウンした細胞では染色体分配異常が増加し、熱ショックを与えると更に増加した。
- Hsp105 による SAC 制御は子宮頸がん由来細胞 HeLa S3 細胞のみならず、大腸がん由来細胞 HCT116 細胞及び正常細胞モデルとして用いた不死化ヒト網膜色素上皮細胞 hTERT RPE-1 細胞でも認められた。

以上より、Hsp105 が Mps1 依存的に Cdc20 と相互作用することで SAC に関与しており、Hsp105 をノックダウンした細胞では SAC 異常を介して染色体分配異常が増加することを明らかにした。また、Hsp105 による SAC 制御は正常細胞、がん細胞間で保存されている機能であることが示唆された。

第3章 パクリタキセル感受性に対する Hsp105 の寄与

3-1 序論

Hsp105 は大腸がん、胃がん、肝細胞がん、肺がんをはじめ、多くのがん細胞で高発現している^{84,85,86,87}。Hsp105 は細胞の DNA の修復に寄与し、抗がん剤であるオキサリプラチンから細胞を保護する機能を持つ⁸⁸ため、Hsp105 のノックダウンはオキサリプラチンのみならず、5-FU やシスプラチンなどの抗がん剤に対する感受性を増大させる^{88,89,90}。

パクリタキセルは卵巣がん、非小細胞肺癌、乳がん、胃がんを始め、多くのがん種に適用を持つ抗がん剤である。微小管脱重合阻害薬であるパクリタキセルは、紡錘体の形成を阻害し、SAC を活性化させることで細胞を細胞分裂期で停止させ、長期に細胞分裂期に停止した細胞ではアポトーシスが誘導される⁹¹。そのため、パクリタキセルの殺細胞効果には、SAC が正しく機能する必要があり、SAC 活性化に必須のタンパク質、Mad2 や BubR1 のノックダウンや発現低下はパクリタキセルの殺細胞効果を低下させることが報告されている^{92,93}。

本研究において、Hsp105 が Cdc20 との相互作用を介して SAC 活性化に関与し、Hsp105 のノックダウンが SAC 活性化に異常を引き起こすことを明らかにした。そこで、Hsp105 が細胞のパクリタキセル感受性に関与する可能性が考えられるため、本章では、パクリタキセル感受性に及ぼす Hsp105 ノックダウンの効果とその機序について解析した。

3-2 実験方法

3-2-1 材料・機器

1) 細胞

細胞は HeLa S3 細胞 (1,2 章と同じ) を使用した。

2) 試薬

パクリタキセルは富士フイルム和光純薬 (169-18611) より購入した。細胞増殖を観察するために Cell Counting Kit-8 (株式会社 同仁化学研究所, 熊本) を使用した。RNase 及びヨウ化プロピジウムは 1 章と同じものを使用した。

3) shRNA

2-2-1 項 4)と同じものを使用した。

4) 機器

吸光度の測定は iMark マイクロプレートリーダー (168-1130JA, Bio-rad) を使用した。フローサイトメーターは BD Accuri C6 Plus (BD Biosciences) を使用した。タイムラプスイメージングは Operetta imaging system を使用した。顕微鏡は 1 及び 2 章と同様のものを使用し、倍率は 10 倍で撮影した。

3-2-2 細胞培養、ノックダウン法およびパクリタキセル処理

HeLa S3 細胞は 1 及び 2 章と同様の条件で培養した。ノックダウンは 2-2-3 項と同様の方法で行った。パクリタキセルは 0.001–1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で用い、細胞に 24 または 48 h 処理した。

3-2-3 WST-8 を用いた生存細胞の観察

パクリタキセルによる細胞増殖抑制効果 IC_{50} を算出するために、Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を使用した。細胞を 96 穴プレートに 4000 個播種し、0.001、0.01、0.1 または 1 $\mu\text{g/mL}$ パクリタキセルを 48 時間処理した。その後、2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-isulfofphen-yl)-2H-tetrazolium, monosodium salt (WST-8) を各 well に 10 μL ずつ入れ、37°C で 2 時間培養後に形成した水溶性のフォルマザンを 450 nm の波長で検出した。

パクリタキセル感受性を比較するために、0.01 $\mu\text{g/mL}$ パクリタキセルを処理し、24 時間後に PBS で 2 回洗浄後、薬剤不含 DMEM に入れ替えて 3 日間培養した。その後、WST-8 を各 well に 10 μL ずつ入れて 37°C で培養し、2 時間後に 450 nm の吸光度を測定した。

3-2-4 フローサイトメトリーを用いた細胞周期解析

HeLa S3 shCont 及び shHsp105-2 細胞に 0.01 $\mu\text{g/mL}$ パクリタキセルを 24 時間処理し、薬剤不含 DMEM に入れ替えて 3 日間培養した。パクリタキセルを 24 時間処理した直後の細胞と、DMEM に入れ替えて 1、2 及び 3 日後の細胞を PBS で洗浄した後、37°C で 5 分間トリプシンを処理し、分裂期

細胞と死細胞も含めて全ての細胞を回収した。回収した細胞は-30°Cの条件で70% EtOHで1時間固定した。固定後、200 µg/ml RNaseA 存在下、50 µg/ml ヨウ化プロピジウムを37°Cで30分間、遮光下で反応させてDNAを染色した。サンプルは488 nm レーザーを搭載したフローサイトメーター (BD Accuri C6 Plus, BD Biosciences) を用いて測定し、FSC/SSC ドットプロットから死細胞を除外して解析を行った。

3-2-5 タイムラプスイメージングを用いた mitotic slippage の観察

HeLa S3 shCont、shHsp105-2 細胞を24穴プレートに播種して0.01 µg/mL パクリタキセルを24時間処理した。パクリタキセル処理の後半12時間に、37°C、5% CO₂の条件のlive cell chamberに細胞を設置し、Operetta imaging system (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) 用いてタイムラプスイメージングを行った。

3-2-6 統計解析

1-2-9と同様の方法で行った。

3-3 実験結果

3-3-1 Hsp105 ノックダウンによるパクリタキセル感受性の低下

微小管脱重合阻害剤パクリタキセルは紡錘体の形成を阻害し、SAC の活性化状態を持続させる。その結果、細胞は細胞分裂期に長期に停止し、細胞死が誘導される。Hsp105 が SAC の活性化に関与することから、Hsp105 が細胞のパクリタキセル感受性に関与する可能性を検討した。shCont 細胞と shHsp105 細胞に 0.001、0.01、0.1 または 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のパクリタキセルを 48 時間処理したときの細胞生存率を WST-8 を用いて評価した。パクリタキセルを 48 時間処理すると、shCont 細胞と比較して shHsp105-2 細胞の増殖に対するパクリタキセルの IC_{50} が高い傾向にあり、細胞生存率の差はパクリタキセルの濃度が 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のときに最大となった (図 3-1 A)。そこでパクリタキセル感受性に及ぼす Hsp105 ノックダウンの効果をより詳細に検討するため、shCont 細胞と shHsp105-2 細胞に 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のパクリタキセルを 24 時間処理し、その後パクリタキセルを除去し 3 日間培養した。shCont 細胞では、パクリタキセル除去 3 日後にほとんどの細胞が認められなかったのに対し、shHsp105-2 細胞では多くの細胞が存在した (図 3-1 B)。これを WST-8 を用いて定量的に評価したところ、shHsp105-2 細胞の生存細胞が有意に多かった (図 3-1 C, 左)。siRNA を用いて Hsp105 をノックダウンし、同様の実験を行った場合にも、Hsp105 ノックダウン細胞で残存した生細胞が多かった (図 3-1 D)。これらの結果より、Hsp105 のノックダウンが細胞のパクリタキセル感受性を低下させることが明らかになった。

3-3-2 Hsp105 ノックダウンによるパクリタキセル感受性低下の機序

Hsp105 ノックダウンによるパクリタキセル感受性低下の機序について検討した。パクリタキセル 24 時間処理の後半 12 時間をタイムラプスイメージングで観察すると、shCont 細胞は観察中ほとんどの細胞が細胞分裂期で停止した一方で、shHsp105-2 細胞では多くの細胞が細胞分裂を終了した (図 3-2 B, C)。shCont 細胞と shHsp105-2 細胞に 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のパクリタキセルを処理して 24 時間後、パクリタキセルを除いて 1、2 及び 3 日目の細胞の DNA 量をフローサイトメトリーで観察した。その結果、shCont 細胞及び shHsp105-2 細胞共にパクリタキセル処理 24 時間後ではほとんどの細胞の DNA が 4 倍体 (4N) を示した。shCont 細胞ではパクリタキセル除去 1 日後には 2 倍体 (2N) 及び 4N のピークが消失し、G1 期よりも低い DNA 含有量を示す細胞、即ち死細胞を示す sub-G1 期の細胞が増加する一方で、shHsp105-2 細胞ではパクリタキセル除去後に 2N 及び 4N のピークが認められた (図 3-2 A)。これらの結果は shCont 細胞はパクリタキセル除去後にほとんどの細胞が細胞死するが、shHsp105-2 細胞はパクリタキセル除去後に一部の細胞が生存したことを示唆する。したがって、Hsp105 のノックダウンは SAC 異常を介して、パクリタキセルによる細胞分裂停止を解除し、それによってパクリタキセル存在下において細胞周期が間期に進行したと考えられる。

更に、SAC に必須のタンパク質 Mad2 をノックダウンした細胞に 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ パクリタキセルを 24 時間処理し、その後パクリタキセルを除去し 3 日間培養を行った。その結果、コントロール細胞と比較して、Mad2 ノックダウン細胞は有意に高い細胞生存率を示した (図 3-1 C, 右) が、その増加の程度は Hsp105 をノックダウンした場合の方が大きかった。この結果はパクリタキセル感受性低下への寄与は Mad2 より Hsp105 がより大きいことを示している。

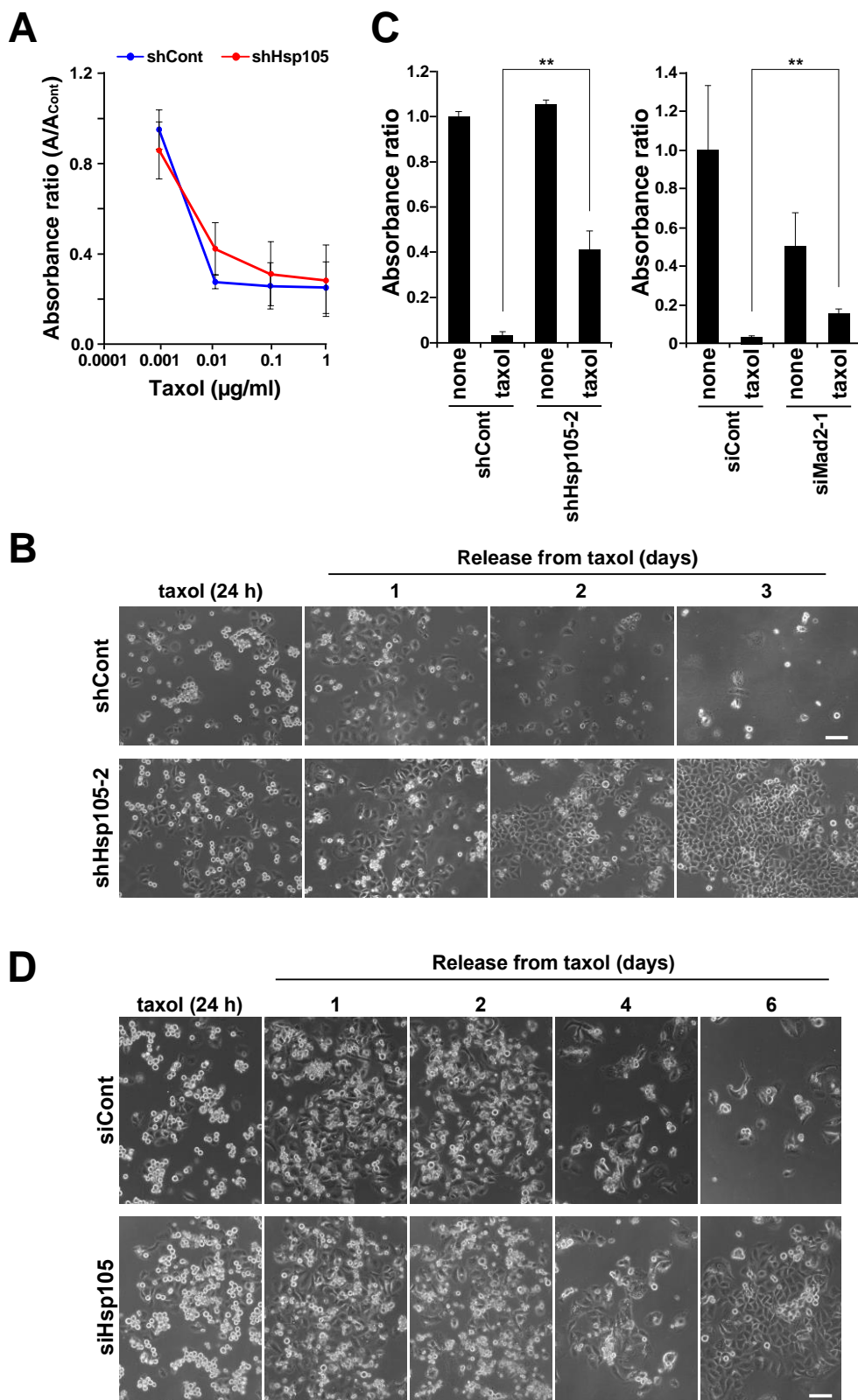


図 3-1 Hsp105 のノックダウンはパクリタキセル感受性を低下させる
説明は次ページ

(A) 4×10^3 個/well の HeLa S3 shCont、shHsp105-2 細胞を 96 穴プレートに播種した。細胞は播種して 2 日後からパクリタキセルを 48 時間処理した。その後、形成した水溶性のフォルマザンを 450 nm の波長で検出し、細胞生存を観察した。コントロール (パクリタキセルを入れていないサンプル) の 3 回の平均の吸光度を 1 とし、コントロールに対する各処理群吸光度の比を求めた。グラフは 3 回以上の実験の平均±標準偏差を示している。(B, C) HeLa S3 shCont、shHsp105-2 細胞に 0.01 $\mu\text{g/ml}$ パクリタキセルを 24 時間処理し、その後パクリタキセルを除いて 3 日間培養した。明視野の画像を B に示す。パクリタキセルを除いて 3 日間培養した細胞の細胞生存率を、形成した水溶性のフォルマザンを 450 nm の波長で検出することで観察した。ポジティブコントロールとして、siMad2-1、siCont をトランスフェクションした細胞に 0.01 $\mu\text{g/ml}$ を 24 時間処理した。C のグラフは 3 回の実験の平均±標準偏差を示している。アスタリスクはスチューデントの t 検定により算出した有意差を示している (** $p < 0.01$)。 shCont (taxol) 対 shHsp105-2 (taxol), $p = 0.00164$, siCont (taxol) 対 siMad2-1 (taxol), $p = 0.00153$ (D) siCont、siHsp105 をトランスフェクションした HeLa S3 細胞に 0.01 $\mu\text{g/ml}$ パクリタキセルを 24 時間処理し、その後パクリタキセルを除いて 3 日間培養した。明視野の画像を示した。スケールバー, 100 μm 。 *FASEB J.* 2019 (印刷中) Figure 8 より引用。

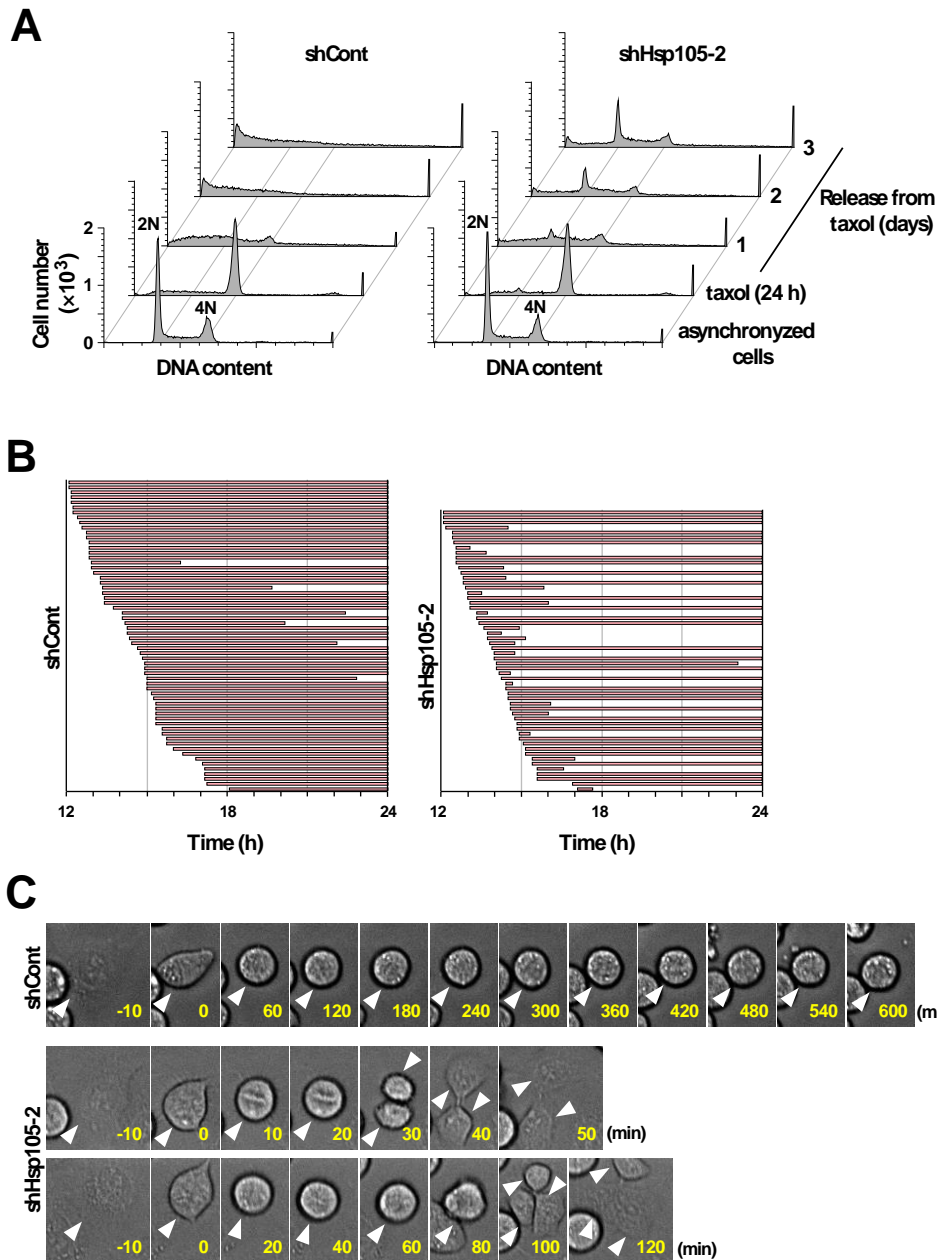


図 3-2 Hsp105 のノックダウンはパクリタキセルによる細胞分裂停止を解除する

(A) HeLa S3 shCont、shHsp105-2 細胞に 0.01 $\mu\text{g/ml}$ パクリタキセルを 24 時間処理し、その後パクリタキセルを除いて 3 日間培養した時の DNA 量を示す。それぞれのグラフは 20000 個の細胞を解析した結果を示している。(B, C) HeLa S3 shCont、shHsp105-2 細胞に 0.01 $\mu\text{g/ml}$ パクリタキセルを 24 時間処理し、後半 12 時間をタイムラプスイメージングで観察した。B は観察した個々の細胞の細胞分裂期で停止した時間を示している (shCont, $n = 62$, shHsp1-5-2, $n = 56$)。C は明視野の画像を示している。矢印は細胞分裂期で停止した細胞 (shCont) と 2 つに分裂した細胞 (shHsp105-2, 上)、3 つに分裂した細胞 (shHsp105-2, 下) を示している。FASEB J. 2019 (印刷中) Figure 8 より引用。

3-4 考察

微小管脱重合阻害剤パクリタキセルは細胞を細胞分裂期で停止させ、細胞死を誘導する。細胞分裂期で活性化するキナーゼ Cdk1 はアポトーシス誘導因子である caspase-9 を抑制的にリン酸化することで、細胞分裂期中の細胞死を抑制する。しかし細胞分裂期に長期に停止すると、Cdk1 に結合して Cdk1 の活性化状態を維持する cyclin B1 が徐々に分解され、Cdk1 の活性が低下する。その結果、caspase-9 の抑制的リン酸化が低下するため、細胞分裂期で停止している時間依存的にアポトーシスが上昇する⁹⁴。同時に、Cdk1 の活性化は細胞分裂停止に必須であるため、細胞分裂期に長時間停止した細胞では cyclin B1 の分解に伴い細胞分裂停止に必要なシグナルが徐々に低下する⁹⁵。即ち、長時間細胞分裂期に停止している細胞では、細胞死のシグナルの上昇と細胞分裂停止に必要なシグナルの低下が同時に生じる。細胞死のシグナルが閾値を超えると細胞分裂期中の細胞死が誘導されるが、細胞死のシグナルが閾値以上に達する前に、Cdk1 の活性が閾値以下に達すると、細胞は細胞分裂を終了する。Cyclin B1 の分解が遅いヒト結腸がん細胞 HT29 細胞や別のヒト結腸がん細胞 RKO 細胞では細胞死のシグナルが先に閾値を超えることが示されている⁹⁶。Cyclin B1 の分解は APC/C によるユビキチン化が必要であり、SAC は APC/C の抑制を介して cyclin B1 の分解を抑制している。Mad2 や BubR1 の発現量の減少によって、パクリタキセル感受性の減弱が誘導される^{92,93} ことから、パクリタキセルの殺細胞効果に SAC の活性化が必要であることが示唆される。

本章において、Hsp105 のノックダウンがパクリタキセル感受性を低下させた。細胞にパクリタキセルを処理したとき、コントロール細胞では細胞分裂期に停止していた一方で、Hsp105 をノックダウンした細胞では細胞分裂期が終了した。2 章で明らかにしたように、Hsp105 ノックダウンにより SAC に異常を引き起こしたことから、Hsp105 をノックダウンした細胞では、SAC の異常により早期の cyclin B1 の分解が誘導され、細胞分裂が終了したため、パクリタキセル感受性が低下したことが考えられる。

Mad2 をノックダウンした細胞にパクリタキセルを処理した時よりも、Hsp105 をノックダウンした細胞の方がパクリタキセル除去後に生存する細胞が多かった。染色体分配異常の程度が大きいと細胞死が誘導され腫瘍形成が抑制されるが、染色体分配異常の程度が小さい場合には腫瘍形成を促進する⁹⁷。Mad2 をノックダウンすると SAC の活性化がほぼ完全に抑制されるため、パクリタキセル存在下で間期に進行した Mad2 ノックダウン細胞では深刻な染色体数異常が誘導され、多くの細胞が細胞死した。一方、Hsp105 ノックダウンによる SAC 活性化の抑制は部分的であるため、Mad2 ノックダウン時と比較して、パクリタキセル存在下で間期に進行した細胞が持つ染色体数異常の程度が小さく、染色体数異常による細胞死を引き起こしにくいと考えられる。その結果、パクリタキセル処理後に生存した細胞が、Mad2 のノックダウンよりも Hsp105 ノックダウン細胞では多くなったことが示唆される。

3-5 小括

本研究により、以下のことを明らかにした

- Hsp105 をノックダウンした細胞ではパクリタキセル処理後生存する細胞が増加し、Mad2 ノックダウン時よりも多かった。
- パクリタキセルを処理すると、コントロール細胞ではほぼ全ての細胞が細胞分裂期で停止していたが、Hsp105 をノックダウンした細胞では間期に進行する細胞が認められた。

よって、Hsp105 をノックダウンした細胞では、SAC 活性化異常によりパクリタキセル存在下において細胞分裂を終了するため、パクリタキセル感受性が低下したと考えられる。

総括

本研究では、細胞分裂期における熱ショック応答と、そのときに機能する熱ショックタンパク質の解明を目指した。

1章では、RO-3306でG2/M境界で停止させた細胞に42°Cの熱ショックを与えると、紡錘体配向性異常により、SACが活性化した結果、細胞分裂が中期で停止することを示した。

2章では、熱ショック及び非熱ショック時におけるSAC活性化に、Hsp105がHsp70を介さずに関与することを明らかにした。Hsp105はMps1依存的にCdc20と相互作用することでSAC制御に関与しており、Hsp105をノックダウンするとSAC異常を介して染色体分配異常が増加した。本研究はHsp105が細胞分裂制御に関与することを示した初めての知見である。

3章では、微小管脱重合阻害剤パクリタキセルはSACを活性化させて細胞分裂を停止させ、細胞死を誘導する抗がん剤であるが、Hsp105をノックダウンした細胞にパクリタキセルを処理すると細胞分裂期で停止せず間期に進行し、その後増殖する、即ちHsp105ノックダウンがパクリタキセル感受性を低下させることを示した。

以上より、熱ショックは細胞分裂に異常を生じさせ染色体分配異常を誘導するストレスであり、Hsp105はSAC活性化に寄与することで熱ショックに起因する染色体分配異常から細胞を保護することを明らかにした。

また本研究により、Hsp105によるSAC制御が正常細胞とがん細胞間で保存されていることが示唆された。このことは、Hsp105がSAC制御を介して正常な細胞の維持に関与することを意味する。特に発生初期はG1期が非常に短いため細胞周期が早く、細胞分裂が盛んである。マウスの発生初期において、Hsc70の発現量は一定であるにも関わらず、Hsp105は妊娠9-11日目に一過性に高発現する⁹⁸ことは、Hsp105がHsp70を介さない経路で発生に寄与している可能性を示している。発生初期において、Hsp105はSAC制御を介して正確な細胞分裂に寄与しているかもしれない。また、Hsp105は種々のがん細胞で高発現している。がん細胞においてHsp105はアポトーシス抑制^{99, 100}、 β -カテニン活性化¹⁰¹、stat3活性化¹⁰²などに関与し、がん細胞の生存及び増殖に関与していることが報告されている。一方、本研究において、Hsp105がSAC制御に関与していることを明らかにした。SACに必須のタンパク質Mad2の過剰発現がSAC異常による染色体分配異常の増加を介して細胞のがん化を誘導することが報告されている⁸³ことから、がん細胞におけるHsp105の高発現はSAC異常を介して細胞のがん化に寄与している可能性がある。

がんの治療において、パクリタキセルと温熱療法の併用が細胞死を増加させることが報告されている^{80, 103, 104}が、その機序は明らかになっていなかった。本研究の1章より、熱ショックがパクリタキセルと同様にSACを活性化することを明らかにした。このことから、パクリタキセルと温熱療法は相加的にSACを活性化し、細胞死を増加させると考えられる。Hsp105は抗アポトーシス効果やDNA修復経路に関与するため、Hsp105をノックダウンすると5-FU、シスプラチン、オキサリプラチンの感受性が増加することが報告されている^{88, 89, 90}。しかし、3章で明らかにしたように、細胞分裂期作用薬パクリタキセルに関しては、Hsp105をノックダウンするとSACに異常が生じるため細胞死が減少した。従って本研究により、Hsp105をターゲットとしたがん治療と微小管作用薬との併用は適さないことが示された。

以上より本研究は、細胞分裂期における熱ショック応答として SAC が活性化し、細胞分裂が停止することを明らかにしただけでなく、その防御機構に関与する新たな分子として Hsp105 を特定し、更に細胞分裂期に作用する抗がん剤の感受性に寄与することを明らかにした。熱ショックを受けたまま細胞分裂が進行すると染色体分配異常が生じるため、細胞は SAC を活性化させて細胞分裂を停止させるという、本研究で見出した分子機構は、染色体数異常という細胞のがん化や発生異常を引き起こしうる病的な状態の形成を防ぐ熱ショック応答である。更にこの機構は、SAC の活性化がパクリタキセルなどの細胞分裂期に作用する抗がん剤の効果に必要であることから、パクリタキセルなどの分裂期作用薬と熱ショックの併用効果を裏付けるものである。即ち本研究は細胞分裂期における熱ショック応答の一端を解明したのみならず、温熱療法を併用する新たながん化学療法を提唱する上でも有益である。また、本研究では SAC 活性化に関与する新規の分子として Hsp105 を見出し、更に Hsp105 のノックダウンがパクリタキセル感受性を低下させることを示した。Hsp105 のノックダウンが 5-FU やオキサリプラチンなど感受性を上昇させる報告がある一方で、パクリタキセルの感受性を低下させたことは、Hsp105 の阻害あるいはノックダウンをがん治療に応用した場合に細胞分裂期作用薬を併用すべきでないことを示しており、本研究の知見はがん化学療法の治療戦略において有益なものである。

引用文献

- (1) Schröder, H. Langer, T. Hartl, F. U. Bukau, B. DnaK, DnaJ and GrpE Form a Cellular Chaperone Machinery Capable of Repairing Heat-Induced Protein Damage. *EMBO J.* **1993**, 12, 4137–4144.
- (2) Marti, T. M. Hefner, E. Feeney, L. Natale, V. Cleaver, J. E. H2AX Phosphorylation within the G1 Phase after UV Irradiation Depends on Nucleotide Excision Repair and Not DNA Double-Strand Breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103, 9891–9896.
- (3) Cowell, I. G. Sunter, N. J. Singh, P. B. Austin, C. A. Durkacz, B. W. Tilby, M. J. γ H2AX Foci Form Preferentially in Euchromatin after Ionising-Radiation. *PLoS One* **2007**, 2, 1–8.
- (4) Evans, S. S. Repasky, E. A. Fisher, D. T. Fever and the Thermal Regulation of Immunity: The Immune System Feels the Heat. *Nat. Publ. Gr.* **2015**, 15, 335–349.
- (5) Pawlik, A. Nowak, J. M. Grzanka, D. Gackowska, L. Michalkiewicz, J. Grzanka, A. Hyperthermia Induces Cytoskeletal Alterations and Mitotic Catastrophe in p53-Deficient H1299 Lung Cancer Cells. *Acta Histochem.* **2013**, 115, 8–15.
- (6) Saito, Y. Yamagishi, N. Ishihara, K. Hatayama, T. Identification of α -Tubulin as an Hsp105 α -Binding Protein by the Yeast Two-Hybrid System. *Exp. Cell Res.* **2003**, 286, 233–240.
- (7) Nakahata, K. Miyakoda, M. Suzuki, K. Kodama, S. Watanabe, M. Heat Shock Induces Centrosomal Dysfunction, and Causes Non-Apoptotic Mitotic Catastrophe in Human Tumour Cells. *Int. J. Hyperth.* **2002**, 18, 332–343.
- (8) Vertii, A. Zimmerman, W. Ivshina, M. Doxsey, S. Centrosome-Intrinsic Mechanisms Modulate Centrosome Integrity during Fever. *Mol. Biol. Cell* **2015**, 26, 3451–3463.
- (9) Welch, W. I. Suhan, J. P. Morphological Study of the Mammalian Stress Response: Characterization of Changes in Cytoplasmic Organelles, Cytoskeleton, and Nucleoli, and Appearance of Intranuclear Actin Filaments in Rat Fibroblasts after Heat-Shock Treatment. *J. Cell Biol.* **1985**, 101, 1198–1211.
- (10) Guzel, E. Arlier, S. Guzeloglu-Kayisli, O. Tabak, M. S. Ekiz, T. Semerci, N. Larsen, K. Schatz, F. Lockwood, C. J. Kayisli, U. A. Endoplasmic Reticulum Stress and Homeostasis in Reproductive Physiology and Pathology. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, E792.
- (11) Bourougaa, K. Naski, N. Boularan, C. Mlynarczyk, C. Candeias, M. M. Marullo, S. Fåhræus, R. Endoplasmic Reticulum Stress Induces G2 Cell-Cycle Arrest via mRNA Translation of the p53 Isoform p53/47. *Mol. Cell* **2010**, 38, 78–88.
- (12) Thomas, S. E. Malzer, E. Ordóñez, A. Dalton, L. E. Van T'Wout, E. F. A. Liniker, E. Crowther, D. C. Lomas, D. A. Marciniak, S. J. p53 and Translation Attenuation Regulate Distinct Cell Cycle Checkpoints during Endoplasmic Reticulum (ER) Stress. *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 7606–7617.
- (13) Schröder, M. Kaufman, R. J. ER Stress and the Unfolded Protein Response. *Mutat. Res.* **2005**, 569, 29–63.
- (14) Katschinski, D. M. Boos, K. Schindler, S. G. Fandrey, J. Pivotal Role of Reactive Oxygen Species as Intracellular Mediators of Hyperthermia-Induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 21094–21098.

- (15) Madlener, S. Rosner, M. Krieger, S. Giessrigl, B. Gridling, M. Vo, T. P. N. Leisser, C. Lackner, A. Raab, I. Grusch, M. Short 42°C Heat Shock Induces Phosphorylation and Degradation of Cdc25A Which Depends on p38MAPK, Chk2 and 14.3.3. *Hum. Mol. Genet.* **2009**, 18, 1990–2000.
- (16) Nitta, M. Okamura, H. Aizawa, S. Yamaizumi, M. Heat Shock Induces Transient p53-Dependent Cell Cycle Arrest at G1/S. *Oncogene* **1997**, 15, 561–568.
- (17) Furusawa, Y. Iizumi, T. Fujiwara, Y. Zhao, Q. L. Tabuchi, Y. Nomura, T. Kondo, T. Inhibition of Checkpoint Kinase 1 Abrogates G2/M Checkpoint Activation and Promotes Apoptosis under Heat Stress. *Apoptosis* **2012**, 17, 102–112.
- (18) Huang, Z. Zhou, X. He, Y. Ke, X. Wen, Y. Zou, F. Chen, X. Torre, L. A. Roccarina, D. Whittaker, S. Hyperthermia Enhances 17-DMAG Efficacy in Hepatocellular Carcinoma Cells with Aggravated DNA Damage and Impaired G2/M Transition. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 38072.
- (19) Velichko, A. K. Petrova, N. V. Razin, S. V. Kantidze, O. L. Mechanism of Heat Stress-Induced Cellular Senescence Elucidates the Exclusive Vulnerability of Early S-Phase Cells to Mild Genotoxic Stress. *Nucleic Acids Res.* **2015**, 43, 6309–6320.
- (20) Vidair, C. A., Doxsey, S. J., and Dewey, W. C. Heat Shock Alters Centrosome Organization Leading to Mitotic Dysfunction and Cell Death. *J. Cell Physiol.* **1993**, 154, 443–455.
- (21) Hut, H. M. J. Kampinga, H. H. Sibon, O. C. M. Hsp70 Protects Mitotic Cells against Heat-Induced Centrosome Damage and Division Abnormalities. *Mol. Biol. Cell* **2005**, 16, 3776–3785.
- (22) Gupta, R. K. Srinivas, U. K. Heat Shock Induces Chromosomal Instability in Near-Tetraploid Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Biol. Ther.* **2008**, 7, 1471–1480.
- (23) Levine, M. S. Holland, A. J. The Impact of Mitotic Errors on Cell Proliferation and Tumorigenesis. *Genes Dev.* **2018**, 32, 620–638.
- (24) Schvartzman, J. M. Sotillo, R. Benezra, R. Mitotic Chromosomal Instability and Cancer: Mouse Modelling of the Human Disease. *Nat. Rev. Cancer.* **2010**, 10, 102–115.
- (25) Richter, K. Haslbeck, M. Buchner, J. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Mol. Cell* **2010**, 40, 253–266.
- (26) Truman, A. W. Kristjansdottir, K. Wolfgeher, D. Hasin, N. Polier, S. Zhang, H. Perrett, S. Prodromou, C. Jones, G. W. Kron, S. J. CDK-Dependent Hsp70 Phosphorylation Controls G1 Cyclin Abundance and Cell-Cycle Progression. *Cell* **2012**, 151, 1308–1318.
- (27) Chen, Y. J. Lai, K. C. Kuo, H. H. Chow, L. P. Yih, L. H. Lee, T. C. HSP70 Colocalizes with PLK1 at the Centrosome and Disturbs Spindle Dynamics in Cells Arrested in Mitosis by Arsenic Trioxide. *Arch. Toxicol.* **2014**, 88, 1711–1723.
- (28) O'Regan, L. Sampson, J. Richards, M. W. Knebel, A. Roth, D. Hood, F. E. Straube, A. Royle, S. J. Bayliss, R. Fry, A. M. Hsp72 Is Targeted to the Mitotic Spindle by Nek6 to Promote K-Fiber Assembly and Mitotic Progression. *J. Cell Biol.* **2015**, 209, 349–358.
- (29) Cho, H.-S. Shimazu, T. Toyokawa, G. Daigo, Y. Maehara, Y. Hayami, S. Ito, A. Masuda, K. Ikawa, N. Field, H. I. Enhanced HSP70 Lysine Methylation Promotes Proliferation of Cancer Cells through Activation of Aurora Kinase B. *Nat. Commun.* **2012**, 3, 1072.

- (30) Makhnevych, T. Wong, P. Pogoutse, O. Vizeacoumar, F. J. Greenblatt, J. F. Emili, A. Houry, W. A. Hsp110 Is Required for Spindle Length Control. *J. Cell Biol.* **2012**, 198, 623–636.
- (31) Senju, M. Sueoka, N. Sato, A. Iwanaga, K. Sakao, Y. Tomimitsu, S. Tominaga, M. Irie, K. Hayashi, S. Sueoka, E. Hsp90 Inhibitors Cause G2/M Arrest Associated with the Reduction of Cdc25C and Cdc2 in Lung Cancer Cell Lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2006**, 132, 150–158.
- (32) Woodford, M. R. Truman, A. W. Dunn, D. M. Jensen, S. M. Cotran, R. Bullard, R. Abouelleil, M. Beebe, K. Wolfgeher, D. Wierzbicki, S. Mps1 Mediated Phosphorylation of Hsp90 Confers Renal Cell Carcinoma Sensitivity and Selectivity to Hsp90 Inhibitors. *Cell Rep.* **2016**, 14, 872–884.
- (33) De Cárcer, G. Heat Shock Protein 90 Regulates the Metaphase-Anaphase Transition in a Polo-like Kinase-Dependent Manner. *Cancer Res.* **2004**, 64, 5106–5112.
- (34) Fuchs, M. Luthold, C. Guilbert, S. M. Varlet, A. A. Lambert, H. Jetté, A. Elowe, S. Landry, J. Lavoie, J. N. A Role for the Chaperone Complex BAG3-HSPB8 in Actin Dynamics, Spindle Orientation and Proper Chromosome Segregation during Mitosis. *PLoS Genet.* **2015**, 11, 1–32.
- (35) Nasmyth, K. Haering, C. H. Cohesin: Its Roles and Mechanisms. *Annu. Rev. Genet.* **2009**, 43, 525–558.
- (36) Primorac, I. Musacchio, A. Panta Rhei. The APC/C at Steady State. *J. Cell Biol.* **2013**, 201, 177–189.
- (37) Chang, L. Barford, D. Insights into the Anaphase-Promoting Complex: A Molecular Machine That Regulates Mitosis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2014**, 29, 1–9.
- (38) Saurin, A. T. van der Waal, M. S. Medema, R. H. Lens, S. M. A. Kops, G. J. P. L. Aurora B Potentiates Mps1 Activation to Ensure Rapid Checkpoint Establishment at the Onset of Mitosis. *Nat Commun.* **2011**, 2, 316.
- (39) Cheeseman, I. M. Chappie, J. S. Wilson-kubalek, E. M. Desai, A. The Conserved KMN Network Constitutes the Core Microtubule-Binding Site of the Kinetochore. *Cell* **2006**, 127, 983–997.
- (40) Lampson, M. A. Cheeseman, I. M. Sensing Centromere Tension: Aurora B and the Regulation of Kinetochore Function. *Trends Cell Biol.* **2011**, 21, 133–140.
- (41) Shepperd, L. A. Meadows, J. C. Sochaj, A. M. Lancaster, T. C. Zou, J. Buttrick, G. J. Rappsilber, J. Hardwick, K. G. Millar, J. B. A. Phosphodependent Recruitment of Bub1 and Bub3 to Spc7/KNL1 by Mph1 Kinase Maintains the Spindle Checkpoint. *Curr. Biol.* **2012**, 22, 891–899.
- (42) Krenn, V. Overlack, K. Primorac, I. Van Gerwen, S. Musacchio, A. KI Motifs of Human Knl1 Enhance Assembly of Comprehensive Spindle Checkpoint Complexes around MELT Repeats. *Curr. Biol.* **2014**, 24, 29–39.
- (43) Musacchio, A. The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. *Curr. Biol.* **2015**, 25, R1002–R1018.
- (44) Coss, R. A. Dewey, C. Bamburg, J. R. Effects of Hyperthermia on Dividing Chinese Hamster Ovary Cells and on Microtubules in Vitro. *Cancer Res.* **1982**, 42, 1059–1071.
- (45) Kalab, P. Heald, R. The RanGTP Gradient - a GPS for the Mitotic Spindle. *J. Cell Sci.* **2008**, 121, 1577–1586.
- (46) Nagel, S. Nigg, E. A. Article HURP Is a Ran-Importin β -Regulated Protein That Stabilizes Kinetochore Microtubules in the Vicinity of Chromosomes. *Curr. Biol.* **2006**, 16, 731–742.

- (47) Wong, J. Fang, G. HURP Controls Spindle Dynamics to Promote Proper Interkinetochore Tension and Efficient Kinetochore Capture. *J Cell Biol.* **2006**, 173, 879–891.
- (48) Vertii, A. Zimmerman, W. Ivshina, M. Doxsey, S. Centrosome-Intrinsic Mechanisms Modulate Centrosome Integrity during Fever. *Mol. Biol. Cell* **2015**, 26, 3451–3463.
- (49) Lu, M. S. Johnston, C. A. Molecular Pathways Regulating Mitotic Spindle Orientation in Animal Cells. *Development* **2013**, 140, 1843–1856.
- (50) di Pietro, F. Echard, A. Morin, X. Regulation of Mitotic Spindle Orientation: An Integrated View. *EMBO Rep.* **2016**, 17, 1106–1130.
- (51) O’Connell, C. B. Wang, Y. -l. Mammalian Spindle Orientation and Position Respond to Changes in Cell Shape in a Dynein-Dependent Fashion. *Mol. Biol. Cell* **2000**, 11, 1765–1774.
- (52) Lagos-Cabr e, R. Moreno, R. D. Mitotic, but Not Meiotic, Oriented Cell Divisions in Rat Spermatogenesis. *Reproduction* **2008**, 135, 471–478.
- (53) Singh, D. Odedra, D. Lehmann, C. Pohl, C. Acute Heat Shock Leads to Cortical Domain Internalization and Polarity Loss in the *C. Elegans* Embryo. *Genesis* **2016**, 54, 220–228.
- (54) Innocente, S. A. Abrahamson, J. L. Cogswell, J. P. Lee, J. M. Biology, C. P53 Regulates a G2 Checkpoint through Cyclin B1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, 96, 2147–2152.
- (55) Taylor, W. R. Deprimo, S. E. Agarwal, A. Munna, L. Scho, A. H. Katula, K. S. Stark, G. R. Mechanisms of G2 Arrest in Response to Overexpression of p53. *Mol Biol Cell.* **1999**, 10, 3607–3622.
- (56) Krause, K. Wasner, M. Reinhard, W. Haugwitz, U. Dohna, C. L. M ossner, J. Engeland, K. The Tumour Suppressor Protein p53 Can Repress Transcription of Cyclin B. *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 4410–4418.
- (57) Taylor, W. R. Scho, A. H. Galante, J. Stark, G. R. p130 / E2F4 Binds to and Represses the Cdc2 Promoter in Response to p53. *J. Biol. Chem.* **2006**, 276, 1998–2006.
- (58) Agarwal, M. L. Agarwal, A. Taylor, W. R. Stark, G. R. P53 Controls Both the G2 / M and the G1 Cell Cycle Checkpoints and Mediates Reversible Growth Arrest in Human Fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, 92, 8493–8497.
- (59) Hermeking, H. Lengauer, C. Polyak, K. He, T. Zhang, L. Thiagalingam, S. Kinzler, K. W. Vogelstein, B. 14-3-3p Is a p53-Regulated Inhibitor of G2 / M Progression. *Mol Cell.* **1997**, 1, 3–11.
- (60) Izumi, M. Miyazawa, H. Kamakura, T. Yamaguchi, I. Endo, T. Hanaoka, F. Blasticidin S-Resistance Gene (Bsr): A Novel Selectable Marker for Mammalian Cells. *Exp. Cell Res.* **1991**, 197, 229–233.
- (61) Kanda, T. Sullivan, K. F. Wahl, G. M. Histone-GFP Fusion Protein Enables Sensitive Analysis of Chromosome Dynamics in Living Mammalian Cells. *Curr. Biol.* **1998**, 8, 377–385.
- (62) Honda, K. Hatayama, T. Yukioka, M. Common Antigenicity of Mouse 42 Degrees C-Specific Heat-Shock Protein with Mouse HSP 105. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, 160, 60–66.
- (63) Mikami, H. Saito, Y. Okamoto, N. Kakihana, A. Kuga, T. Nakayama, Y. Requirement of Hsp105 in CoCl₂-Induced HIF-1 α Accumulation and Transcriptional Activation. *Exp. Cell Res.* **2017**, 352, 225–233.
- (64) Kienitz, A. Vogel, C. Morales, I. Mu, R. Bastians, H. Partial Downregulation of MAD1 Causes Spindle Checkpoint Inactivation and Aneuploidy , but Does Not Confer Resistance towards Taxol. *Oncogene* **2005**, 4301–4310.

- (65) Mondal, G. Sengupta, S. Panda, C. K. Gollin, S. M. Saunders, Saunders, W. S. Roychoudhury, S. Overexpression of Cdc20 Leads to Impairment of the Spindle Assembly Checkpoint and Aneuploidization in Oral Cancer. *Carcinogenesis* **2007**, 28, 81–92.
- (66) Wollman, R. Cytrynbaum, E. N. Jones, J. T. Meyer, T. Scholey, J. M. Mogilner, A. Efficient Chromosome Capture Requires a Bias in the ‘ Search-and-Capture ’ Process during Mitotic-Spindle Assembly. *Curr Biol.* **2005**, 15, 828–832.
- (67) Yamagishi, N. Nishihori, H. Ishihara, K. Ohtsuka, K. Hatayama, T. Modulation of the Chaperone Activities of Hsc70/Hsp40 by Hsp105 α and Hsp105 β . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 272, 850–855.
- (68) Mattoo, R. U. H. Sharma, S. K. Priya, S. Finka, A. Goloubinoff, P. Hsp110 Is a Bona Fide Chaperone Using ATP to Unfold Stable Misfolded Polypeptides and Reciprocally Collaborate with Hsp70 to Solubilize Protein Aggregates. *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 21399–21411.
- (69) Costa, R. H. FoxM1 Dances with Mitosis. *Nat. Cell Biol.* **2005**, 7, 108–110.
- (70) Dai, B. Gong, A. Jing, Z. Aldape, K. D. Kang, S. H. Sawaya, R. Huang, S. Forkhead Box M1 Is Regulated by Heat Shock Factor 1 and Promotes Glioma Cells Survival under Heat Shock Stress. *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 1634–1642.
- (71) Yasuda, K. Nakai, a Hatayama, T. Nagata, K. Cloning and Expression of Murine High Molecular Mass Heat Shock Proteins, HSP105. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 29718–29723.
- (72) Saito, Y. Yamagishi, N. Hatayama, T. Different Localization of Hsp105 Family Proteins in Mammalian Cells. *Exp. Cell Res.* **2007**, 317, 3707–3717.
- (73) Luo, X. Tang, Z. Rizo, J. Yu, H. The Mad2 Spindle Checkpoint Protein Undergoes Similar Major Conformational Changes Upon Binding to Either Mad1 or Cdc20. *Mol Cell.* **2002**, 9, 59–71.
- (74) Jia, L. Li, B. Yu, H. The Bub1-Plk1 Kinase Complex Promotes Spindle Checkpoint Signalling through Cdc20 Phosphorylation. *Nat. Commun.* **2016**, 7, 1–14.
- (75) Bracher, A. Verghese, J. The Nucleotide Exchange Factors of Hsp70 Molecular Chaperones. *Front. Mol. Biosci.* **2015**, 2, 1–9.
- (76) Maeshima, K. Matsuda, T. Shindo, Y. Imamura, H. Tamura, S. Imai, R. Kawakami, S. Nagashima, R. Soga, T. Noji, H. A Transient Rise in Free Mg²⁺Ions Released from ATP-Mg Hydrolysis Contributes to Mitotic Chromosome Condensation. *Curr. Biol.* **2018**, 28, 444–451.e6.
- (77) Lambowitz, A. M. Kobayashi, G. S. Painter, A. Medoff, G. Possible Relationship of Morphogenesis in Pathogenic Fungus, *Histoplasma Capsulatum*, to Heat Shock Response. *Nature* **1983**, 303, 806–808.
- (78) Patriarca, E. J. Maresca, B. Acquired Thermotolerance Following Heat Shock Protein Synthesis Prevents Impairment of Mitochondrial ATPase Activity at Elevated Temperatures in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Exp. Cell Res.* **1990**, 190, 57–64.
- (79) Yamagishi, N. Ishihara, K. Saito, Y. Hatayama, T. Hsp105 but Not Hsp70 Family Proteins Suppress the Aggregation of Heat-Denatured Protein in the Presence of ADP. *FEBS Lett.* **2003**, 555, 390–396.
- (80) Giovinazzi, S. Bellapu, D. Morozov, V. M. Ishov, A. M. Targeting Mitotic Exit with Hyperthermia or APC/C Inhibition to Increase Paclitaxel Efficacy. *Cell Cycle* **2013**, 12, 2598–2607.

- (81) Park, Y. Y. Ahn, J. Cho, M. Lee, J. ATP Depletion during Mitotic Arrest Induces Mitotic Slippage and APC/C^{Cdh1}-Dependent Cyclin B1 Degradation. *Exp. Mol. Med.* **2018**, 50, 46.
- (82) Yamagishi, N. Nishihori, H. Ishihara, K. Ohtsuka, K. Hatayama, T. Modulation of the Chaperone Activities of Hsc70/ Hsp40 by Hsp105 α and Hsp105 β . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 272, 850–855.
- (83) Sotillo, R. Hernando, E. Díaz-Rodríguez, E. Teruya-Feldstein, J. Cordon-Cardo, C. Lowe, S. W. Benezra, R. Mad2 Overexpression Promotes Aneuploidy and Tumorigenesis in Mice. *Cancer Cell* **2007**, 11, 9–23.
- (84) Nakatsura, T. Senju, S. Yamada, K. Jotsuka, T. Ogawa, M. Nishimura, Y. Gene Cloning of Immunogenic Antigens Overexpressed in Pancreatic Cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 281, 936–944.
- (85) Hwang, T. S. Han, H. S. Choi, H. K. Lee, Y. J. Kim, Y. J. Han, M. Y. Park, Y. M. Differential, Stage-Dependent Expression of Hsp70 , Hsp110 and Bcl-2 in Colorectal Cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2003**, 18, 690–700.
- (86) Miyazaki, M. Nakatsura, T. Yokomine, K. Senju, S. Monji, M. Hosaka, S. Komori, H. Yoshitake, Y. Motomura, Y. Minohara, M. DNA Vaccination of HSP105 Leads to Tumor Rejection of Colorectal Cancer and Melanoma in Mice through Activation of Both CD⁴⁺ T Cells and CD⁸⁺ T Cells. *Cancer Sci.* **2005**, 96, 695–705.
- (87) Muchemwa, F. C. Nakatsura, T. Ihn, H. Kageshita, T. Heat Shock Protein 105 Is Overexpressed in Squamous Cell Carcinoma and Extramammary Paget Disease but Not in Basal Cell Carcinoma. *Br. J. Dermatol.* **2006**, 155, 582–585.
- (88) Causse, S. Z. Marcion, G. Chanteloup, G. Uyanik, B. Boudesco, C. Grigorash, B. B. Douhard, R. Dias, A. M. M. Dumetier, B. Dondaine, L. HSP110 Translocates to the Nucleus upon Genotoxic Chemotherapy and Promotes DNA Repair in Colorectal Cancer Cells. *Oncogene* **2018**.
- (89) Kimura, A. Ogata, K. Altan, B. Yokobori, T. Ide, M. Mochiki, E. Toyomasu, Y. Kogure, N. Yanoma, T. Suzuki, M. Nuclear Heat Shock Protein 110 Expression Is Associated with Poor Prognosis and Chemotherapy Resistance in Gastric Cancer. *Oncotarget* **2016**, 7, 18415–18423.
- (90) Kimura, A. Ogata, K. Altan, B. Yokobori, T. Mochiki, E. Yanai, M. Kogure, N. Yanoma, T. Suzuki, M. Bai, T. Nuclear Heat Shock Protein 110 Expression Is Associated with Poor Prognosis and Hyperthermo-Chemotherapy Resistance in Gastric Cancer Patients with Peritoneal Metastasis. *World J. Gastroenterol.* **2017**, 23, 7541–7550.
- (91) Weaver, B. A. How Taxol/Paclitaxel Kills Cancer Cells. *Mol. Biol. Cell* 2014, 25, 2677–2681.
- (92) Sudo, T. Nitta, M. Saya, H. Ueno, N. T. Dependence of Paclitaxel Sensitivity on a Functional Spindle Assembly Checkpoint. *Cancer Res.* **2004**, 64, 2502–2508.
- (93) Furlong, F. Fitzpatrick, P. O’Toole, S. Phelan, S. McGrogan, B. Maguire, A. O’Grady, A. Gallagher, M. Prencipe, M. McGoldrick, A. Low MAD2 Expression Levels Associate with Reduced Progression-Free Survival in Patients with High-Grade Serous Epithelial Ovarian Cancer. *J. Pathol.* **2012**, 226, 746–755.
- (94) Allan, L. A. Clarke, P. R. Phosphorylation of Caspase-9 by CDK1/Cyclin B1 Protects Mitotic Cells against Apoptosis. *Mol. Cell* **2007**, 26, 301–310.
- (95) Brito, D. A. Rieder, C. L. Mitotic Checkpoint Slippage in Humans Occurs via Cyclin B Destruction in the Presence of an Active Checkpoint. *Curr. Biol.* **2006**, 16, 1194–1200.

- (96) Gascoigne, K. E. Taylor, S. S. Cancer Cells Display Profound Intra- and Interline Variation Following Prolonged Exposure to Antimitotic Drugs. *Cancer Cell* **2008**, 14, 111–122.
- (97) Silk, A. D. Zasadil, L. M. Holland, A. J. Vitre, B. Cleveland, D. W. Weaver, B. A. Chromosome Missegregation Rate Predicts Whether Aneuploidy Will Promote or Suppress Tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, 110, E4134–E4141.
- (98) Hatayama, T. Takigawa, T. Takeuchi, S. Shiota, K. Characteristic Expression of High Molecular Mass Heat Shock Protein HSP105 during Mouse Embryo Development. *Cell Struct. Funct.* **1997**, 22, 517–525.
- (99) Yamagishi, N. Ishihara, K. Saito, Y. Hatayama, T. Hsp105 Family Proteins Suppress Staurosporine-Induced Apoptosis by Inhibiting the Translocation of Bax to Mitochondria in HeLa Cells. *Exp. Cell Res.* **2006**, 312, 3215–3223.
- (100) Yamagishi, N. Saito, Y. Hatayama, T. Mammalian 105 KDa Heat Shock Family Proteins Suppress Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis through a p38 MAPK-Dependent Mitochondrial Pathway in HeLa Cells. *FEBS J.* **2008**, 275, 4558–4570.
- (101) Yu, N. Kakunda, M. Pham, V. Lill, J. R. Du, P. Wongchenko, M. Yan, Y. Firestein, R. Huang, X. HSP105 Recruits Protein Phosphatase 2A To Dephosphorylate β -Catenin. *Mol. Cell. Biol.* 2015, 35, 1390–1400.
- (102) Berthenet, K. Bokhari, A. Lagrange, A. Marcion, G. Boudesco, C. Causse, S. De Thonel, A. Svrcek, M. Goloudina, A. R. Dumont, S. HSP110 Promotes Colorectal Cancer Growth through STAT3 Activation. *Oncogene* **2017**, 36, 2328–2336.
- (103) Lin, Y. Liu, Z. Li, Y. Liao, X. Liao, S. Cen, S. Yang, L. Wei, J. Hu, X. Publication, A. Short-Term Hyperthermia Promotes the Sensitivity of MCF-7 Human Breast Cancer Cells to Paclitaxel. *Biol. Pharm. Bull.* **2012**, 36, 1–20.
- (104) Paulson, J. R. Kresch, 3 A. K. Mesner, P. W. Moderate Hyperthermia Induces Apoptosis in Metaphase-Arrested Cells But Not in Interphase Hela Cells. *Adv. Biol. Chem.* **2016**, 6, 126–139.

謝辞

本研究の遂行に当たり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました京都薬科大学学生化学分野 中山祐治 教授に深甚なる感謝の意を表します。

本論文の作成に当たり、貴重なご助言を賜りました、京都薬科大学衛生化学分野 長澤一樹 教授、並びに細胞生物学分野 藤室雅弘 教授に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行に当たり、ご助言ご助力を賜りました、京都薬科大学学生化学分野 齊藤洋平 助教に感謝申し上げます。

本研究を遂行するに当たり、一部の実験にご協力頂きました、京都薬科大学学生化学分野 (現 洛和会音羽病院) 大東優衣 学士に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するに当たり、多大なるご協力、ご助言を頂きました京都薬科大学学生化学分野の諸氏に心より感謝申し上げます。

平成29年度に長井記念薬学研究奨励支援事業に採用頂き、経済的支援を賜りました、日本薬学会に深く感謝申し上げます。