

氏名 (生年月日) ^{かき}柿 ^{はな}花 ^{あや}采 ^な那 (1990年7月22日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博薬第178号

学位授与の日付 2019年3月16日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

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

論文審査委員 (主査) 教授 中山 祐治

(副査) 教授 藤室 雅弘

(副査) 教授 長澤 一樹

論文内容の要旨

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 Knl1 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

微小管脱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。

審査の結果の要旨

《緒言》

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として、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。代表的なストレス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の変化、機能異常のみならず、DNA ダメージを介した細胞周期停止なども引き起こす。細胞分裂に対する影響としては中心体異常、細胞分裂停止、染色体数異常などが報告されているがそのメカニズムは不明である。そこで本研究では、細胞分裂期における熱ショック応答を解析した。

《審査結果の要旨》

(1) 細胞分裂に与える熱ショックの影響

培養細胞を 42°C で 30 分間の温和な熱ショックに晒すと細胞分裂が遅延した。このとき、紡錘体チェックポイントの活性化を示す BuBR1 のキネトコア局在が観察され、チェックポイント関連タンパク質をノックダウンすると、熱ショックによる細胞分裂遅延が解除された。タイムラプスイメージングにおいて紡錘体軸の傾きが観察されたことから、温和な熱ショックは、紡錘体軸異常を誘導することで紡錘体チェックポイントを活性化し、細胞分裂を遅延させることを見出した。

(2) Hsp105 による紡錘体チェックポイント制御

熱ショックによる紡錘体チェックポイントの活性化が明らかになったので、熱ショックタンパク質の関与を検討した。代表的な熱ショックタンパク質である Hsp70 を阻害しても、温和な熱ショックによる細胞分裂停止は変化しなかったが、Hsp70 ファミリーの一つ Hsp105 のノックダウンにより細胞分裂停止が一部解除され、染色体分配異常が増加した。これらの結果により、Hsp105 は紡錘体チェックポイントに関与して、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を明らかにした。

(3) タキソール感受性における Hsp105 の役割

タキソールなどの微小管標的薬は細胞分裂停止により細胞死を誘導するため、紡錘体チェックポイントに関与する Hsp105 がタキソール感受性に寄与するか検討した。Hsp105 のノックダウンはタキソールが誘導する細胞分裂停止を一部解除し、細胞死が誘導される前に細胞分裂を終了させ、タキソールによる細胞死を部分的に抑制した。以上の結果から、Hsp105 は紡錘体チェックポイントを介してタキソールによる細胞分裂停止に関与し、タキソール感受性に寄与することを明らかにした。

《結論》

本研究により、熱ショックが紡錘体チェックポイントを活性化して細胞分裂を停止すること、この細胞分裂停止に Hsp105 が関与し、熱ショックによ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。さらに、タキソールなど、細胞分裂を標的とする抗がん剤の感受性にも Hsp105 が関与することが示唆された。これらの研究成果は、温和な熱ショックは紡錘体チェックポイントを活性化し細胞分裂停止を誘導するという、温熱療法の作用機構の一つを明らかにしただけではなく、Hsp105 を標的としたがん化学療法に有益な情報を与えるものである。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。