

酸化ストレスにより引き起こされるエンドリデュプリケーションの生物学的意義

47-146302 がん先端生命科学分野
2016年度3月修了 浅井祐輔
指導教官 落合淳志教授

[背景・目的]

酸化ストレスは、ROS (Reactive Oxygen Species) の量が抗酸化物質 (チオレドキシン、グルタチオン等) の量を超えることで生じ、細胞増殖阻害や細胞死を起こすことが知られている。がん細胞は放射線や抗がん剤によって生じる酸化ストレスに対して代謝経路や抗酸化物質を用いて抵抗性を示す。そのため、がんを治療する上でも酸化ストレス耐性獲得のメカニズムを解明することが必要とされている。がん細胞に酸化ストレス刺激を与えると、細胞増殖、細胞増殖阻害、細胞死といった3つの異なる応答性を示す。近年、酸化ストレスを与えた p53 野生株の正常ヒト包皮線維芽細胞が、エンドリデュプリケーションを起こすことが示されている。また、放射線や抗がん剤を処理した p53 野生型のがん細胞でも、エンドリデュプリケーションが起きることが報告されている。がん組織環境下や酸化ストレス下において、がん細胞がエンドリデュプリケーションを起こすのか否かについては、これまで明らかにされていない。エンドリデュプリケーションは、細胞分裂を伴わずDNA量を増幅し、細胞のサイズが大きくなること知られており、抗がん剤や放射線に対して起こることが報告されている。しかしながら、エンドリデュプリケーションを起こした細胞がどのような動態を示すのか、さらには、エンドリデュプリケーションの生物学的意義については明らかにされていない。

本研究の目的は、乳癌細胞において酸化ストレスが起こすエンドリデュプリケーションの生物学的意義を解明することである。

[キーワード]: エンドリデュプリケーション、乳癌細胞、酸化ストレス、ROS

[方法]

In vitro で、乳癌細胞株に酸化ストレスを投与し、エンドリデュプリケーションを起こす過酸化水素濃度と細胞株について検討した。エンドリデュプリケーションを起こす乳癌細胞に Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) を Lentivirus vector で導入し、エンドリデュプリケーションを可視化して継続的に観察することが出来るようにした。継続的観察において、エンドリデュプリケーションを起こした乳癌細胞の応答について調べ、それぞれの応答を示す細胞の割合について解析した。次に、エンドリデュプリケーションを起こした細胞の周辺の細胞の応答についても同様に解析を行った。そして、エンドリデュプリケーションに関連して発現する遺伝子を同定する為に、細胞の大きさで単離した生細胞の mRNA による cDNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。同定された遺伝子がコードするタンパクが、形態学的にエンドリデュプリケーションを起こしている細胞において発現しているかについて、免疫蛍光染色にて検討した。

[結果・考察]

1) 乳癌細胞株においてエンドリデュプリケーションを起こす過酸化水素濃度と細胞株の検討

終濃度 10 μ M の過酸化水素で処理した酸化ストレス下において、MCF7 細胞の面積が増加し、大型化することを認めた。また、同条件下で酸化ストレス刺激を与えた MCF7 細胞において、4 倍体 Fraction の増加が認められた。細胞の大型化と 4 倍体 Fraction の増加が認められたことから、エンドリデュプリケーションを起こした細胞の存在が示唆された (図 1)。

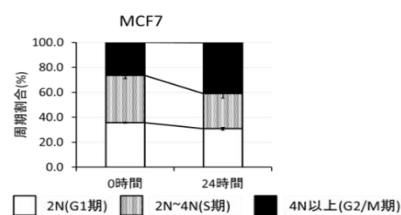


図1. MCF7 細胞の細胞周期割合

2) 酸化ストレス刺激を与えた Fucci 導入乳癌細胞がエンドリデュプリケーションを起こす割合についての検討

Fucci を Lentivirus vector によって形質導入した乳癌細胞 (MCF7-Fucci2 細胞) の Fucci 蛍光が細胞周期を反映することをフローサイトメトリーで確認した。酸化ストレス下の MCF7-Fucci2 細胞では、G2/M 期の細胞が分裂せず、G1 期に移行するエンドリデュプリケーションが 19.2±1.7% の割合の細胞に起こることを認めた(図 2)。

3) エンドリデュプリケーションを起こした細胞の動態

MCF7-Fucci2 細胞においてエンドリデュプリケーションを起こした細胞は、起こしていない細胞よりも、G1 期停止細胞が増加し、細胞死が減少した。このことから、エンドリデュプリケーションを起こすことで細胞死を回避し、生存する可能性が示唆された (図 3)。

4) エンドリデュプリケーションを起こした周辺の細胞の動態

MCF-Fucci2 細胞においてエンドリデュプリケーションを起こした細胞の周辺細胞は、起こしていない細胞の周辺細胞に比べて、周期進行する細胞の割合が有意に高いことが示された。エンドリデュプリケーションを起こした周辺の細胞は、細胞周期を進行させて生存する可能性が示唆された (図 4)。

5) エンドリデュプリケーションを起こした細胞の遺伝子発現解析

MCF7-Fucci2 細胞においてエンドリデュプリケーションを起こした細胞を含む細胞集団と起こしていない細胞集団を用いて、マイクロアレイ解析により網羅的遺伝子発現解析を行った。エンドリデュプリケーションを起こした細胞を含む細胞集団において、発現量が 500、且つ起こしていない細胞集団に比べて 2 倍以上の発現上昇が認められる遺伝子を抽出した。過去に DNA 障害や放射線処理で上昇し、細胞死を抑制すると報告されている *ATAD3A* (ATPase family, AAA domain containing 3A)、*CEACAM6* (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6) 遺伝子が見出された。マイクロアレイ解析の結果を、エンドリデュプリケーションを前記と同様の細胞集団から RNA を抽出して定量的 RT-PCR にて解析すると、*CEACAM6* 遺伝子発現については、エンドリデュプリケーションを起こした細胞集団は起こしていない細胞集団に比べて有意に高い発現を認めた (図 5)。エンドリデュプリケーションを起こした細胞が含まれていると想定される大型細胞が存在する Fraction3 では、*CEACAM6* 遺伝子の発現が上昇することで、細胞死を制御している可能性が示唆された。

6) エンドリデュプリケーションを起こした細胞における *CEACAM6* の免疫蛍光染色

大型細胞が多く含まれる Fraction3 において、特異的に発現している *CEACAM6* 遺伝子が、形態学的に観察できるエンドリデュプリケーションを起こした細胞で発現しているかについて検討するために免疫蛍光染色を行った。エンドリデュプリケーションを起こした細胞は、起こしていない細胞と比較して *CEACAM6* の発現強度が有意に高かった (図 6)。エンドリデュプリケーションを起こした細胞は *CEACAM6* を発現することで、酸化ストレスに対して抵抗性を示す可能性が示唆された。

【結論】

過酸化水素刺激による酸化ストレスによって起こる 4 倍体細胞が、エンドリデュプリケーションを起こした細胞であること、エンドリデュプリケーションを起こした細胞が細胞分裂を起こすこと、今回の方法で採取したエンドリデュプリケーションを起こした細胞を含む大型細胞では *CEACAM6* の発現が高いことを明らかにした。

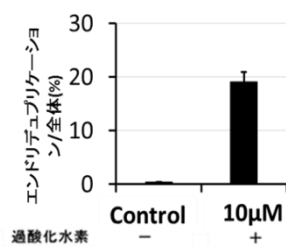


図2. MCF7-Fucci2 細胞におけるエンドリデュプリケーション割合

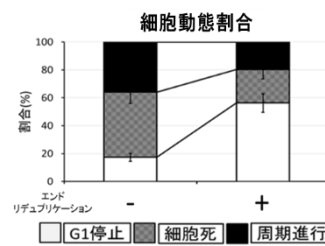


図3. MCF7-Fucci2細胞におけるエンドリデュプリケーションを起こした細胞の細胞動態割合

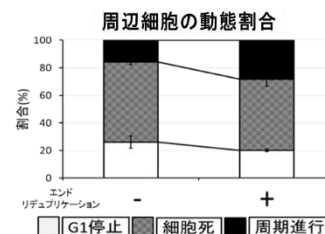


図4. MCF7-Fucci2細胞におけるエンドリデュプリケーションを起こした周辺細胞の細胞動態割合

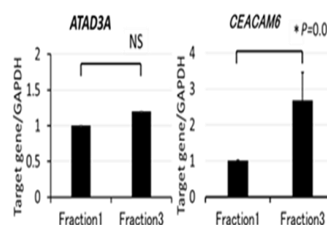


図5. MCF7-Fucci2細胞におけるマイクロアレイ解析の妥当性の検討

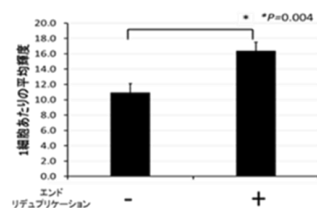


図6. MCF7-Fucci2細胞における免疫蛍光染色