

v-Src による分裂異常が引き起こす細胞の多核化の新機構

千葉大学大学院医学薬学府 4年博士課程3年 添田 修平

がんは日本における死亡率の第一位であり日本人の三人に一人はがんで死亡している。がん細胞では、シグナル伝達など多くの機構が破綻している。チロシンキナーゼ群は、様々な組織において、細胞増殖、発生・分化や細胞機能の維持・制御に関わる重要なシグナル伝達を担っている。がん細胞では、正常細胞に比較し、チロシンキナーゼの酵素活性が亢進していることが知られている。

非受容体型チロシンキナーゼである Src ファミリーは c-Src、c-Yes、Lyn、Fyn、c-Fgr、Hck、Lck、Blk の 8 種により構成される。Src ファミリーは、正常組織における細胞増殖、発生・分化や形態形成などにおける機能が詳細に解析されているが、細胞周期、特に分裂期に関する知見は乏しい。当研究室では、分裂期に Cdk1 により c-Src、c-Yes、Lyn が活性化することを報告している (参考文献 1)。また、細胞質分裂では、Src の下流において ERK が機能することを報告した (参考文献 2)。

v-Src は P. Rous がニワトリの肉種から発見した変異型であり、C 末端の抑制性チロシン残基が欠損し、さらに、キナーゼドメインに活性化型の点変異を持つため常に活性化状態になっている。大腸癌細胞では Src に活性化型の変異が入っているものが知られており、悪性度の高い細胞ほど Src 活性が高いという報告もある。従って、本研究では、Src 活性亢進型である v-Src を大腸癌細胞で発現させて細胞分裂を解析することにより、Src 活性亢進が分裂期に対してどのような影響を及ぼすのかについて解析することを目的とした。

ヒト大腸癌細胞株 HCT116 に tetracycline repressor (TetR) をコードするベクターを遺伝子導入し、TetR を恒常的に発現する細胞株を樹立した。tetracycline operator (TO) の下流に v-Src 遺伝子を導入したベクターをその細胞株に遺伝子導入し、v-Src 誘導発現可能な細胞株 (HCT116/v-Src) を得た。HCT116/v-Src に doxycycline (Dox) を加え培養した結果、親株では v-Src が発現しなかったのに対し、HCT116/v-Src 細胞では Dox の濃度依存的に v-Src の発現が検出された。さらに、顕微鏡観察により、v-Src の発現で誘導される E-cadherin 減少が見られ、それに伴う細胞間接着の減少が観察された。また、Western blotting において、Src の発現と自己リン酸化および細胞内蛋白質のチロシンリン酸化の亢進、E-cadherin の減少を検出した。

flow cytometry を用いて細胞周期の解析を行った結果、v-Src 発現により 4N DNA 細胞が増加した。さらに、顕微鏡による解析では、二核細胞の増加が観察された (Fig. 1)。同様に、HeLa S3 細胞においても v-Src は二核細胞を増加させた。興味深いことに、anaphase 細胞において、二分された姉妹染色体の間に DNA の架橋 (chromosome bridge) (Fig. 2) が形成された細胞が多数観察された。chromosome bridge の形成は細胞質分裂の障害を起こすことが知られているので、細胞質分裂の

特徴である分裂溝 (cleavage furrow) を示す細胞数を計測した。その結果、v-Src 発現により分裂溝を示す細胞数が減少し、Src を阻害すると回復した。しかし、anaphase での chromosome bridge の割合に比較して最終的に二核になる割合は激減する。つまり、細胞質分裂の阻害が起こり、二核細胞が形成されるまでには他のファクターの影響が強いと考えられる。

そこで Aurora B キナーゼの経時的局在変化に着目した。Aurora B は metaphase では spindle checkpoint と連動して染色体の整列に関与しているが、anaphase においては分裂溝が入るタイミングの制御と分裂溝の維持に関与している。分裂期において Aurora B の局在を調べたところ、Aurora B は正常な状態では anaphase 中の spindle midzone に整列して局在する。しかし、大変興味深い事に、v-Src が誘導発現されると Aurora B の mislocalization が高頻度に見られることが分かった。従って、v-Src 誘導発現により、chromosome bridge だけではなく、Aurora B の mislocalization が起こったことにより収縮溝の維持ができず、その結果として分裂の阻害が起こったものと考えている。

以上、本研究の結果から、v-Src 発現によりチロシンキナーゼ活性が著しく亢進した細胞では細胞質分裂の阻害により二核細胞が形成することが明らかになった。これらの結果より、anaphase における chromosome bridge の形成と Aurora B の mislocalization が細胞質分裂阻害の原因の一つであると推定される。現在、本研究に関しては論文投稿の準備中である。今後は、実際に Src 活性亢進が分裂異常を介してがん悪性化に関与するのかを調べるため、担癌マウスモデルを用い、がん転移した細胞の細胞分裂を SPECT (Single photon emission computed tomography) 解析により詳細に調べていきたい。

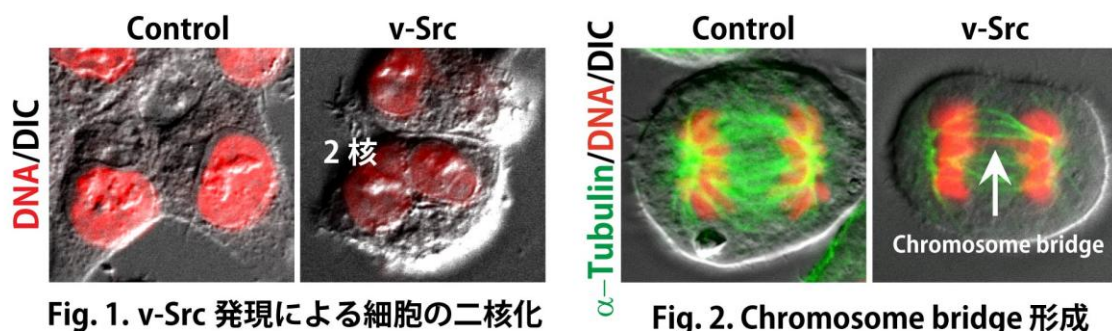


Fig. 1. v-Src 発現による細胞の二核化

Fig. 2. Chromosome bridge 形成

(参考文献)

1. T. Kuga, Y. Nakayama, M. Hoshino, Y. Higashiyama, Y. Obata, D. Matsuda, K. Kasahara, Y. Fukumoto, and N. Yamaguchi. : Differential mitotic activation of endogenous c-Src, c-Yes, and Lyn in HeLa cells. Arch. Biochem. Biophys. 466 (2007) 116-124.
2. K. Kasahara, Y. Nakayama, Y. Nakazato, K. Ikeda, T. Kuga, and N. Yamaguchi. : Src signaling regulates completion of abscission in cytokinesis through ERK/MAPK activation at the midbody. J. Biol. Chem. 282 (2007) 5327-5339