

称号及び氏名	博士（理学） 山本 美佳
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 31 日
論文名	<b>The mechanism of chromosome loss induced by an aneugen in human lymphoid cells</b> (ヒトリンパ球における染色体数的異常誘発物質による染色体消失機序に関する研究)
論文審査委員	主査 児玉 靖司 副査 佐藤 孝哉 副査 八木 孝司

論文要旨

序論

近年、細胞のがん化と染色体の数的異常の関係が注目されている。染色体の数的異常は約 **90%** の固形がんと **75%** の血液がんで観察されており、細胞のがん化と密接に関係している可能性があることが指摘されている。しかし、染色体の数的異常がどのようにがん化に関与しているのかは未だに明らかではない。数的異常は約 **90%** のがんで観察されていることから、数的異常が発生するメカニズムの解明、ならびに染色体の異数化を早期に検出することは、発がんの発生機構を解明する上で重要である。

一方、哺乳類の培養細胞を用いた *in vitro* 小核試験は、染色体分配エラーによって取り残された染色体断片、あるいは丸ごとの染色体を小核として間期で検出する方法として、広く用いられている。特に変異原物質による染色体構造異常、および数的異常誘発の定量化に優れており、毒性分野において変異原物質の遺伝毒性の評価に汎用されている。しかし、現行の方法では、小核形成の原因が染色体の構造異常なのか、あるいは数的異常なのかを区別することができない (図 1)。

以上の背景を踏まえて、本研究は、ヒト培養細胞を用いた小核試験で変異原物質による染色体の数的異常の誘発と構造異常の誘発を簡便に区別

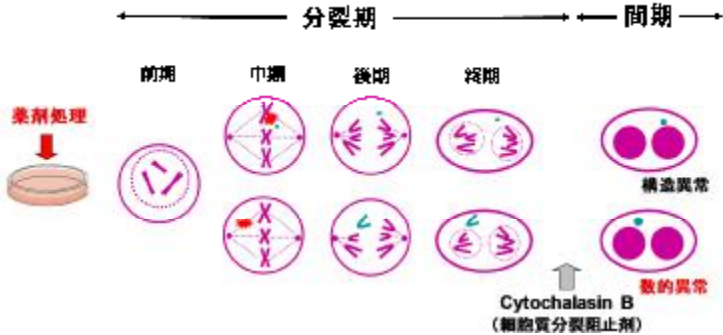


図 1 小核が形成されるメカニズム (構造異常 vs 数的異常)

すること、さらには検出された数的異常のうち、染色体消失がどのようなメカニズムで発生す

るのかを解明することを目的として行った。

### 第一章 動原体 FISH 法を用いた数的異常誘発物質の簡便な検出法の確立

小核形成の原因を簡便に識別するために、ヒトリンパ芽球由来 **TK6** 細胞を数的異常誘発物質 (**Colcemid**, 及び **Vincristine**), もしくは構造異常誘発物質 (**4-Nitroquinoline-1-oxide** (以下, **4-NQO**), 及び **Methylmethanesulfonate** (以下, **MMS**)) で処理し, 小核形成と染色体分配を解析した。すなわち, 被験物質で処理した細胞をサイトカラシン **B** (**Cytochalasin B**) で処理して細胞質分裂を止め, 生じた **2** 核細胞の小核の検出と **2** つの染色体に特異的な動原体プローブを用いて間期核 **fluorescence in situ hybridization** (**FISH**) 法で動原体を可視化することにより, 染色体分配変化の検出を同時に行った。動原体シグナルの変化はシグナルが不均等に分配する分配異常型とシグナル数が増加, あるいは消失する数増減型に分類した (図 2)。

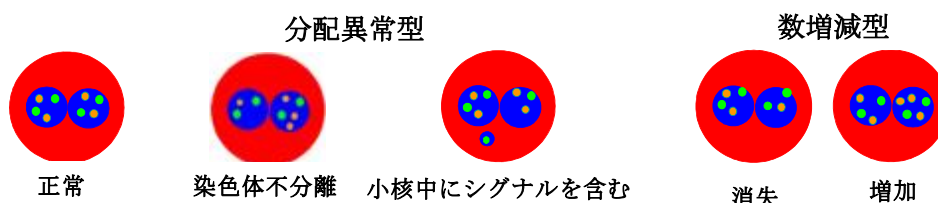


図 2 間期核 FISH 法による動原体シグナルのタイプ分け

その結果, **4** 化合物いずれにおいても小核を有する **2** 核細胞の用量依存的な増加が認められた。分配異常型の染色体数の異常が数的異常誘発物質である **Colcemid**, 及び **Vincristine** では用量依存的に増加するのに対し, 構造異常誘発物質である **4-NQO**, 及び **MMS** では増加しないことがわかった。従って, 動原体 FISH 法で分配異常型の頻度を調べることにより, 数的異常誘発物質を簡便に識別することが可能となった。また, 数的異常誘発物質, 及び構造異常誘発物質のいずれでも動原体のシグナルが消失する細胞が増加することが明らかになった。

### 第二章 ヒトリンパ芽球由来 **TK6** 細胞及び初代培養ヒトリンパ球を用いた染色体全着色法による染色体シグナル消失の解析

第一章で明らかになった間期核の動原体 FISH 法による動原体のシグナルの消失は, 染色体の消失を示唆する。しかし, 予想以上に高頻度 (**3.4** ~ **6.2**%) であるため, 何らかの影響で染色されていない可能性もある。そこで, **Colcemid** 処理で高頻度に動原体シグナル数の減少がみられた濃度で, **2** 番染色体の動原体と **2** 番染色体の短腕に存在する **N-Myc** の両方を同時に染色したところ, 動原体シグナル数が減少し

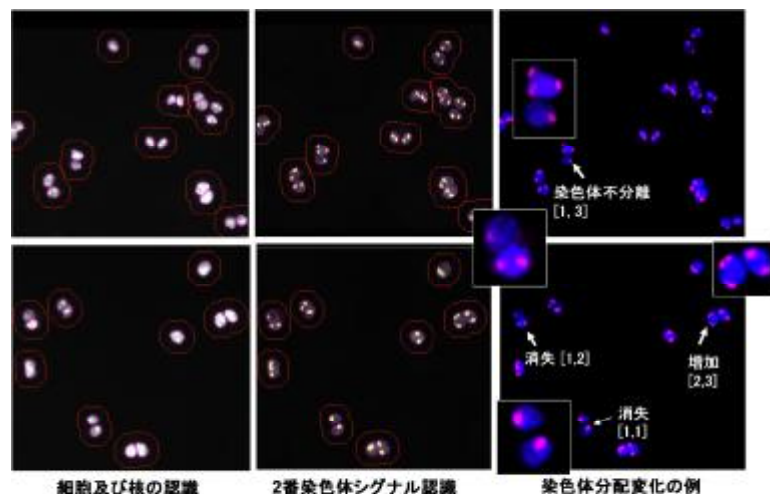


図3 染色体全着色法によるシグナル解析

ている細胞の **88 %** で **N-Myc** のシグナル数も減少していた。このことは動原体部分のみが染色されていないのではないことを示唆している。

一方、**2** 本の染色体シグナルが重なると、本来 **2** 個のシグナルが **1** 個に見えることになる。しかし、染色体シグナルの重なりと染色体消失を区別することが容易ではないために、これまで染色体消失は評価から除外されてきた。シグナルが重なった場合、シグナルの蛍光強度は **2** 倍になる。そこで、染色体消失と重なりを区別するために、**2** 番染色体を可視化した間期核について、染色体全着色法によりシグナル数とシグナル蛍光強度の関係を解析した。

**TK6** 細胞及び初代培養ヒトリンパ球に、**Colcemid**、もしくは **MMS** をサイトカラシン **B** と同時に処理した。生じた **2** 核細胞の **2** 番染色体を染色体全着色法で染色し、**2** 番染色体シグナル数の分配変化、及びシグナルの蛍光強度分布を調べた(図 **3**)。

**Colcemid** を処理した **TK6** 細胞は、染色体全着色法において第一章で述べた動原体 **FISH** 法の場合と同様に高濃度で染色体シグナル数減少を示す細胞が有意に増加することが分かった。次に、**G1** 期の細胞について、**2** 番染色体のシグナル蛍光強度分布を調べた。その結果、**2** 番染色体のシグナルが **1** 個消失した細胞の一部は染色体シグナル強度が **2** 倍以上になっており、**2** 個のシグナルが重なって **1** 個に見えている見かけ上の減少であることがわかった。しかし、**Colcemid** 処理により、シグナルの重なりではなく、シグナル消失が生じている細胞の出現頻度は、陰性対照群に比べて有意に高くなった。初代培養ヒトリンパ球においても同様の結果が得られた。このことから、**Colcemid** 処理によって、染色体 **1** 本が消失することが、普遍的に生じる現象であることが分かった。

### 第三章 **Colcemid** 処理したヒトリンパ球でみられる染色体シグナル消失のメカニズム解明

第二章において、**Colcemid** 処理によって染色体が消失する現象がみられることがわかったが、その消失メカニズムは明らかではない。**Terradas** ら (**2009** 年) は、 $\gamma$  線により **DNA** 損傷を受けたヒト末梢血リンパ球を **-H2AX** フォーカス (**DNA2** 本鎖切断の標識) 及び **TUNEL** 染色 (**DNA** 断片化の標識) で同時検出したところ、照射後 **24** 時間には、小核を有する細胞の **50%** 以上が **-H2AX** フォーカス及び **TUNEL** 染色のいずれにおいても陽性を示した。このことは、小核を有する細胞に **DNA2** 本鎖切断が蓄積し、**DNA** 断片化が生じていることを示している。この現象を踏まえると、本研究の結果は、**Colcemid** 処理により **2** 番染色体を丸ごと含む小核ができた後、その小核が **DNA** 断片化を起こして消失したことにより、片方の核から **2** 番染色体が **1** 本消失した細胞となってみると推測される。

そこで、染色体消失と **DNA** 断片化の関係を調べるために、**TK6** 細胞及びその **p53** 変異型である **WTK-1** 細胞を **Colcemid**、もしくは **MMS** で処理し、細胞質分裂阻止して生じた **2** 核細胞に **DNA** 断片化のマーカとして **TUNEL** 陽性シグナルを検出した (図 **4**)。同時に **2** 番染色体の染色体全着色法を行い、**2** 番染色体の分配変化を第一章で述べた動原体 **FISH** 法の場合と同様に分類した (図 **5**)。

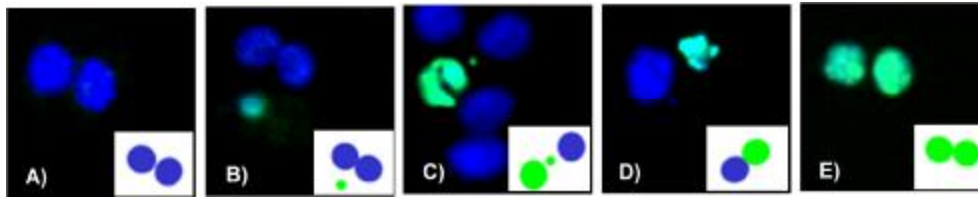


図 4 TUNEL assay による種々のタイプの DNA 断片化の検出

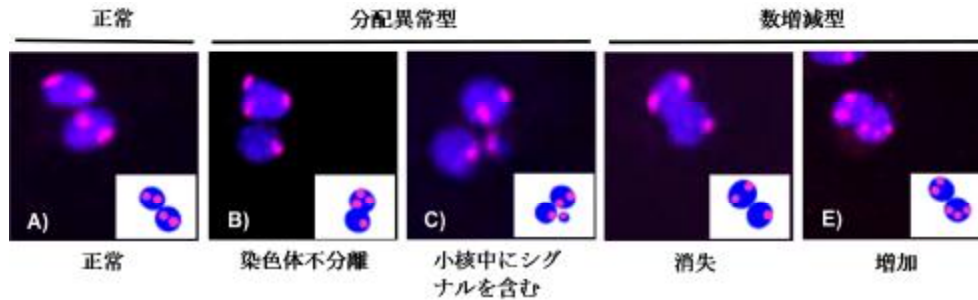


図 5 染色体全着色法による 2 番染色体シグナルのタイプ分け

その結果、Colcemid 処理した TK6 細胞では、2 番染色体が 1 本消失した細胞の小核及び主核の各々 30% で DNA 断片化が起こっていた。また、DNA 断片化は、Colcemid 処理によって誘発した 2 番染色体を含む小核の 60% でみられた。しかし、染色体不分離を持つ細胞ではほとんどみられなかった。また、Colcemid 処理によって DNA 断片化した主核もしくは小核を持つ 2 番染色体が 1 本消失した WTK-1 細胞の割合（主核：25%，小核：11%）は、TK6 細胞よりも少なかった。

さらに、小核誘発と DNA 断片化の関係を調べたところ、Colcemid 処理で有意な増加を示した染色体を丸ごと含む小核の 43% (TK6) 及び 20% (WTK-1) が TUNEL 陽性小核であった。一方、MMS 処理は染色体断片を含む小核を有意に増加させたが、いずれの細胞も TUNEL 陽性小核を増加させなかった。

以上の結果は、Colcemid 処理によって誘発した数的異常細胞のうち、染色体を丸ごと含む小核もしくはその主核で DNA 断片化が生じ、それが引き金となって染色体構造が変化することにより FISH シグナルが見えなくなること示唆している。さらに、数的異常誘発物質処理により生じる染色体を丸ごと含む小核の DNA 断片化は、p53 依存的事であることを示唆している。染色体を丸ごと含む小核は、不完全な核膜構造が原因で核のタンパク輸送能が欠損して DNA 断片化を誘発すること、染色体のメロテリックな結合によるキネトコア部分の構造上のひずみが原因で DNA 断片化を起こすことが報告されている。

以上の結果を踏まえ、Colcemid 処理による染色体シグナル消失メカニズムとして、以下の 2 つの経路を提案する (図 6)。

- ① 2 番染色体を丸ごと含む小核が DNA 断片化を起こし、小核が排除されて 2 番染色体が 1 本消失する (図 6 a)
- ② 2 番以外の染色体を丸ごと含む小核の DNA 断片化が起こった後、片方の主核で DNA 断片化が起こり 2 番染色体が 1 本見えなくなる (図 6 b)

#### 第四章 総括

本研究により、動原体 FISH 法を用いた分配異常型誘発率を解析することにより、数的異常誘発物質を簡便に検出する方法を確立した。さらに、Colcemid 処理による染色体消失は、株化細胞に特異的な反応ではなく、正常な初代培養ヒトリンパ球を用いても見られる普遍的な現象であることが分かった。この染色体消失は、Colcemid 処理により誘発した染色体を丸ごと含む小核が DNA 断片化の引き金となって染色体構造の変化を引き起こすことにより、染色体 1 本に相当する FISH シグナルが消失しているものと考えられる。

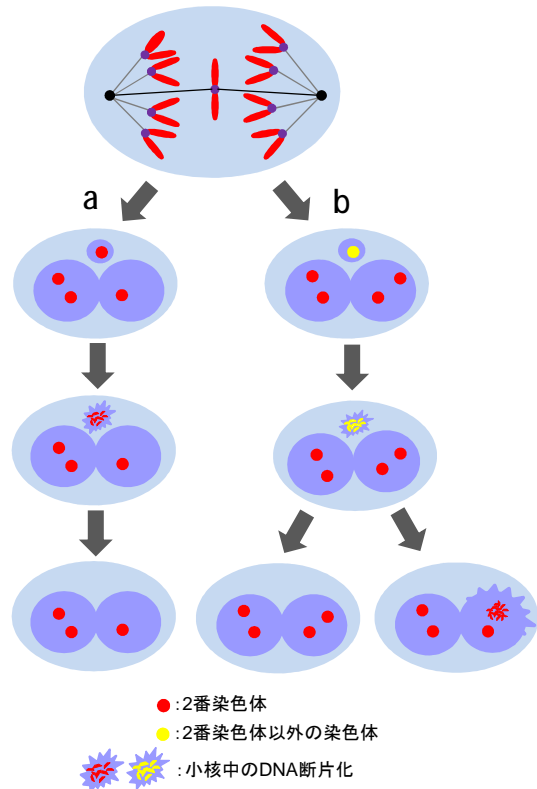


図6 Colcemid 処理により2番染色体が1本消失した細胞が生じる機構

#### 論文リスト

1. Induction of a whole chromosome loss by colcemid in human cells elucidated by discrimination between FISH signal overlap and chromosome loss, M. Yamamoto, A. Wakata, Y. Aoki, Y. Miyamae, S. Kodama, *Mutation Res.*, 749, <39-48> (2013)

2. Chromosome loss caused by DNA fragmentation induced in main nuclei and micronuclei of human lymphoblastoid cells treated with colcemid, M. Yamamoto, A. Wakata, Y. Aoki, Y. Miyamae, S. Kodama, *Mutation Res.*, 762, <10-16> (2014)

## 審査結果要旨

現在、変異原性を評価するのに培養細胞を用いた小核試験が汎用される。小核形成には、染色体の構造異常に由来するものと数的異常に由来するものの**2種類**があるが、現行の小核試験では、その由来を判別することはできない。本論文は、動原体と特異的にハイブリッド形成する蛍光**DNA**プローブを用いた**FISH**によって動原体を蛍光シグナルとして可視化する方法を小核試験と組み合わせることにより、数的異常誘発物質を簡便に識別することが可能であることを明らかにした。さらにこの実験において、動原体の蛍光シグナルが消失する細胞が有意に検出されることを明らかにした。

そこで次に、動原体シグナル消失の原因について、紡錘糸形成阻害剤のコルセミドと**DNA**損傷剤(**MMS**)を誘発剤として用いて調べた。動原体シグナルの消失は、シグナルの重なりか、染色体消失を意味する。そこで、リンパ芽球細胞、及び末梢血リンパ球を用い、また、**2番**染色体全体を全着色法で蛍光染色してその蛍光強度を定量化することにより、蛍光シグナルの重なり(蛍光強度**2倍**)と消失を区別して計測した。その結果、どちらのタイプの細胞でも、コルセミド処理により、蛍光シグナルの重なりではなく、**2番**染色体シグナルの消失頻度が有意に上昇することが分かった。

そこで、なぜコルセミド処理によって染色体**1本**全体のシグナルが消失するのかを明らかにするために、**DNA**断片化を**TUNEL**染色で検出し、**DNA**断片化とシグナル消失の関係を調べた。その結果、コルセミド処理によって誘発された染色体の数的異常細胞のうち、染色体**1本**を丸ごと含む小核、もしくはその主核で**DNA**断片化が生じることが分かった。さらに、**p53**変異細胞を用いた解析から、染色体**1本**を丸ごと含む小核の**DNA**断片化は、**p53**依存的であることも明らかになった。

以上のように、本論文は、染色体数的異常誘発物質の簡便な検出法の確立に端を発し、コルセミド処理によって、染色体**1本**を含む小核において**DNA**断片化が生じることを明らかにした。さらに、それが引き金となって起きる染色体構造の変化がシグナル消失につながる可能性を示唆した。したがって、本論文は、これまで未知であった染色体消失に至る新規の機序を明らかにした点において、高く評価できる。

以上の結果を踏まえて、本委員会は、当該学位論文が博士(理学)の学位を授与するに相当すると判断した。