細胞周期制御異常による発癌および悪性化機構

佐谷 秀行

熊本大学大学院医学薬学研究部 腫瘍医学分野

要旨 増殖能を持つ細胞は細胞周期の過程において遺伝子や染色体に異常が生じると、一時的にその進行を停止し、異常を修正する能力があり、組織中に異常細胞が出現することを防いでいると考えられている。この機構をチェックポイントと呼ぶが、そのチェックポイント機構そのものに異常が生じると遺伝子や染色体の損傷が蓄積し、細胞の悪性化の原因になると考えられている。しかし、抗癌剤や放射線による治療は、癌細胞がこのようなチェックポイントに障害があることを逆に利用したものであることが最近の解析によって分かってきた。治療によってDNAや染色体に損傷が加わると正常細胞では細胞周期は停止するが、癌細胞ではチェックポイント障害があるため損傷を持ったまま進行し、細胞死が誘導される。しかし、重度のゲノム変化を持つ腫瘍ではこの細胞死機構すら破綻し、治療に抵抗性を示すと考えられる。

Implication of cell cycle dysregulation in development and malignant progression of tumors

Hideyuki SAYA

Department of Tumor Genetics and Biology, Kumamoto University

Cell cycle checkpoints are a regulatory mechanism that prevents transition of cells into subsequent phases until all processes in the previous phase are completed, ensuring genomic integrity. Arrest in G1 is considered to prevent aberrant replication of damaged DNA and arrest in G2 allows cells to avoid segregation of defective chromosomes. Therefore, defective cell cycle checkpoints lead to gene mutations and chromosome damage which contribute to tumorigenesis. However, recent observations indicate that loss of checkpoint function in cancer cells is associated with their sensitivity to antineoplastic treatments such as chemotherapy and radiation. By treatment with those genotoxic agents, cancer cells having impairment of checkpoint functions initially arrest in the G2 phase of the cell cycle but are unable to maintain cell-cycle arrest. Those cells eventually die as they enter mitosis. This process is referred to as 'mitotic catastrophe'. In this review, we propose the critical relationship between checkpoint functions and sensitivity of cancer cells to anti-tumor therapies. [*Skin Cancer (Japan)* 2004 ; 19 : 281-286]

Key words : Checkpoints, Genomic instability, Mitosis, Mitotic catastrophe

1. はじめに

高等生物の身体は、ほとんどが複製や分裂を停止した細胞によって構成されており、わずか1%程度の細胞が増殖期にあると考えられている。しかし、組織構築は、それらわずか1%に含まれる、それぞれの組織固有の幹細胞およびその分裂から生じた前駆細胞の複製と分裂が正確に行われることによって維持されており、そのステップは多くの分子の連携によって厳密に制御されている。これら増殖能を持つ細胞の遺伝子や染色体に傷が生じた場合、細胞は一時的に細胞周期を停止しその修復を行う。そして、損傷が修復された場合は細胞周期を再開するが、修復不可能な場合は細胞死を誘導することにより、損傷細胞を組織から除去する作業が行われる。このステップをチェックポイントと呼び、個体が正常な組織構築を維持するための重要な機構として機能している。しかし、チェックポイントを制御する分子自身に異常が生じることにより、多発性の遺伝子変異や染色体の不均衡分配など、つまり「ゲノムの不安定化」が発生し、細胞の腫瘍化ならびに悪性化が誘発されると考えられている。従って、癌細胞は悪性度が高くなるほど重度のチェックポイント障害を持つと考えられている。特に、分裂期におけるチェックポイント異常は直接染色体の数や構造に異常を引き起こすため、悪性化に果たす役割が大きい。

現在行われている多くの抗癌剤や放射線による抗癌治療は、癌細胞がチェックポイントに障害を持つという性質を期せずして利用したものであることが最近の解析によって分かってきた。つまり、薬剤や放射線によってDNAや染色体に損傷が加わると、正常の細胞ではチェックポイントが活性化して細胞周期は停止するが、癌細胞においてはチェックポイント障害があるため傷を持ったまま次のphaseへと進むことになる。特にG2期のチェックポイント障害

のある腫瘍細胞では損傷を受けた細胞は修復されることなく分裂期へ侵入し、そこで細胞死が誘導されることが抗腫瘍治療の重要なメカニズムとなっている。本稿では、癌細胞における細胞周期チェックポイントの異常を述べるとともに、その細胞周期異常そのものをターゲットとした治療とその問題点について概説する。

2. 細胞周期進行のエンジン・アクセル・ブレーキ

細胞周期回転の原動力となるのは、サイクリンと呼ばれるタンパクとそのサイクリンによって活性化されるサイクリン依存性キナーゼ(cdk: cyclin-dependent kinase)の複合体である。この複合体は多くのタンパク質をリン酸化することにより細胞内のシグナルを変化させ、細胞周期を進行させると考えられている。まずG1期からS期への移行の引き金を引くのはサイクリンD/cdk4 (あるいはcdk6)の複合体であり、その発火によってサイクリンE/cdk2複合体の活性化が起こり、細胞は本格的にS期に突入することになる。その後サイクリンA/cdk2の活性化により細胞はS期からG2期へ移行し、サイクリンB/cdc2 (cdk1とも呼ぶ)の活性化によって細胞はM期へ進むことができる。M期の後半からサイクリンB/cdc2の活性は消失しはじめ、G1期に再び戻る時にはすべてのサイクリン/cdkの活性は消失する。つまり、それぞれのサイクリン/cdk複合体の時期特異的活性化によりphaseが進行するのであり、この複合体は細胞周期進行のエンジンと考えることができる。サイクリン/cdk複合体の機能を亢進させるシグナルは細胞周期を回転させるアクセルとなり、逆にその機能を抑制するシグナルはブレーキとなる。遺伝子や染色体に損傷が生じると、これらブレーキに相当するシグナルが活性化され、細胞周期は一時的に停止する。これがチェックポイントの仕組みである。

遺伝子に生じた変化はG1期からS期に移行

する時期（G1チェックポイントと呼ぶ）およびG2期からM期に移行する時期（G2チェックポイント）においてチェックを受け、染色体に生じた異常はM期（Mチェックポイント）で検閲を受けることが知られている（図1）。また、S期ではDNA合成が終了するまでは決して分裂期に入らないように制御されている（Sチェックポイント）。腫瘍形成において重要な意味を持つG1、G2およびMチェックポイントの分子機構について以下に解説する。

3. G1、G2チェックポイントの分子制御

上述したようにサイクリンD/cdk4（あるいはcdk6）の活性化がG1期からS期への移行の引き金を引くシグナルとなる。サイクリンD/cdk4（あるいはcdk6）複合体は、増殖因子刺激やras、c-mycなど癌遺伝子産物によって活性化を受けG1/S移行に必要な標的タンパク質のリン酸化を行う。標的タンパク質として代表的なのは、遺伝性網膜芽細胞腫の原因遺伝子であるRb遺伝子にコードされるRbタンパク質である。G1期ではE2Fと呼ばれる転写調節因子とDP-1蛋白（E2Fの転写活性を高める因子

といわれている）の複合体は非リン酸化型のRbタンパク質と結合していて、E2Fの転写活性は抑制されている。しかし、増殖シグナルによってサイクリンD/cdk4（あるいはcdk6）が活性化されると、Rbタンパク質はリン酸化を受けE2F-DP-1複合体と解離し、E2Fは標的遺伝子、すなわちS期への進行に必要な遺伝子群の転写を亢進させる。つまり、サイクリンD/cdk4（あるいはcdk6）によるRbタンパク質のリン酸化はG1からS期へ細胞周期を進めるために必須のシグナルであると考えられている。このシグナルが異常に亢進していること（つまりアクセルの過剰反応）によってチェックポイントが破綻している例が実際の悪性腫瘍に多く観察されている。多くの腫瘍で見られるRasタンパク質の変異、c-myc遺伝子の変異や発現亢進などは当然サイクリンD/cdk4複合体の定常的活性化を引き起こすこととなる。また食道癌ではサイクリンD遺伝子の増幅、脳腫瘍などではcdk4遺伝子の増幅が報告されている。

サイクリンD/cdk4（あるいはcdk6）の活性はp16、p27そしてp21と呼ばれるタンパク質によって阻害され（これらは内因性cdk inhibitorsと総称される）、これらがG1期におけ

図1. 細胞周期チェックポイント

細胞周期において、遺伝子や染色体の損傷をモニターするチェックポイントというシステムが存在する。これらの損傷を受けた細胞は一時的に細胞周期を停止し、その損傷の修復を試みる。修復できない場合は細胞死が誘導され、損傷した細胞は組織から取り除かれることになる。

る細胞周期のブレーキとなる。遺伝子に損傷が加わると、ATMキナーゼ (ataxia telangiectasia の責任遺伝子産物) の活性化が起こり、癌抑制遺伝子産物 p53 のアミノ末端部にリン酸基を導入する¹⁾。p53 タンパク質は mRNA より翻訳されると MDM2 と呼ばれるタンパク質によってユビキチン化を受け、続いてプロテアソームによって分解を受けるため、通常の増殖細胞内での発現量は極めて低い。しかし、ATM によってリン酸化された p53 タンパク質は MDM2 と結合できないため核内に急速に貯留する。貯留した p53 タンパク質は核内で転写因子として働き、p21 の発現を誘導し、それによってサイクリン D/cdk4 (あるいは cdk6) が阻害されるために、細胞周期は G1 で停止することになる。これが、遺伝子損傷による G1 チェックポイントの活性化機構である。

多くの悪性腫瘍細胞の遺伝子解析により、p53 遺伝子の変異欠失、EGF 受容体の増幅や変異、p16 遺伝子の不活化、MDM2 遺伝子の増幅などアクセルとブレーキの異常が大半の腫瘍に認められることが明らかになった。つまり、悪性細胞ではその程度に差はあるにしても、ほとんどすべてにおいて G1 チェックポイントの異常が存在すると考えることができる。

G2 期から M 期への進行はサイクリン B/cdc2 (cdk1) の活性化によって行われ、遺伝子損傷

シグナルはその活性を阻害し、細胞周期を M 期侵入の直前で停止させる。S 期から G2 期にかけての遺伝子損傷は ATM, Chk1, Chk2 など様々なキナーゼを活性化し、その作用によって結果的に cdc2 (cdk1) キナーゼ活性を抑制することが分かっている。興味深いことに、近年 p53 は p21 の転写を介して部分的にサイクリン B/cdc2 (cdk1) を阻害することが分かり²⁾、p53 は G1 のみならず G2 チェックポイントにも重要な役割を果たしていることが明らかになった。

4. M チェックポイント制御と腫瘍

細胞分裂期における染色体の分配過程は、多くの分子が連携することによって厳重に監視されている。すべての姉妹染色体の隣り合った一対の動原体に両紡錘極から伸張した紡錘糸がそれぞれ付着して、同じ張力で染色体を両極に牽引する準備ができるまで、染色体の分離は始まらないように制御されている。従って染色体の分離は、染色体や紡錘糸に異常があつてそのアタッチメントに不均衡が生じると、停止する仕組みになっている (図 2)。これを M チェックポイント (mitotic checkpoint) と呼び、その過程が破綻することによって染色体の不均等分配、あるいは細胞質の分裂障害による多核細

図 2. 分裂期チェックポイント

M 期は、染色体や細胞内の小器官が正確に 2 つの細胞に分離するよう、M チェックポイントによってモニターされている。M チェックポイントでは、染色体が赤道面に整列して、両方の紡錘極から紡錘糸がすべての姉妹染色体の動原体に付着するまで決して染色体を分離することがないように調節されている。この機構が破綻すると、染色体の分配異常が出現する

胞の出現などが観察される。悪性度の高い腫瘍では、核の大きさの不均一性や多核細胞の出現が特徴的な病理像としてみられることが多く、細胞分裂のステップに異常があることが示唆される。つまりこのような病理像を呈する悪性の腫瘍細胞ではG1あるいはG2チェックポイントの異常に加えて、Mチェックポイントの異常が生じている可能性が強く考えられる。ひとたびM期の制御に異常がおよぶと、細胞周期が一回廻るごとに染色体の数や構造に異常が生じ、細胞は極端な形質変化に陥ると考えられる。

5. 分裂期崩壊と抗癌治療

アドリマイシンやシスプラチンをはじめとする多くの抗癌剤はDNA損傷を誘導するため、正常細胞ではG1およびG2チェックポイントが活性化され細胞周期が停止する（図3上段）。停止中に損傷が修復できた細胞は再び細胞周期に戻るが、修復できなかった細胞はアポトーシスによって排除される。しかし、多くの癌細胞ではG1チェックポイントが破綻しているため、DNA損傷を受けても、G1期で停止せずG2期

に一時的に貯留する。しかし癌細胞は既に述べたようにG2チェックポイント機能も低下している事が多く、やがて分裂期に進入しその後細胞死に至る（図3中段）。このような細胞死を分裂期崩壊（mitotic catastrophe）あるいは分裂死（mitotic death）と呼んでいる^{3) 4)}。

分裂死は、「DNA損傷を受けた細胞が分裂期に入ることによって細胞死が誘導されること」と定義され、主に放射線照射治療後における、腫瘍細胞死の特徴とされてきた。しかしながら、その分子機構はまだ明確でない。私達は、ヒト癌細胞株にDNA損傷を与え、その細胞の分裂期を動的に観察したところ、G2チェックポイントで停止できず分裂期に入った細胞は、分裂中期に長時間停止（10～20時間程度）した後に染色体が分離しないで、中期から直接死滅することを見出した⁵⁾。また、この分裂中期における停止は、Mチェックポイントの活性化によって誘導されていることが明らかになり、その機能を抑制すると、染色体分離が急速に進行し、細胞死を誘導することなく細胞分裂が完遂されることが分かった（図4）。このように、Mチェックポイント機能を抑制することによって

図3. チェックポイント異常と抗腫瘍治療の関係

正常細胞はG2チェックポイント機構が保たれているため抗癌剤やX線などでDNA損傷を加えるとチェックポイントが活性化され細胞周期がG2期で停止する（上段）。しかしチェックポイントが障害されている癌細胞ではDNA損傷後停止することができず、分裂期に突入することになる。この「チェックポイント乗り越え」によって分裂期崩壊（mitotic catastrophe）と呼ばれる特徴的な細胞死が誘導される（中段）。これが癌細胞が正常細胞に比べて特異的に抗癌治療に反応する機構と考えられている。しかし、更に悪性化した腫瘍ではこの細胞死誘導機構すら破綻しており、「乗り越え」が起こっても細胞死が誘導できず、治療抵抗性になると考えることができる（下段）

図4. 分裂期崩壊の過程

DNA損傷を受けた癌細胞は一旦G2チェックポイントで停止するが、チェックポイント機能に異常があるため徐々にM期に突入し、多くの場合分裂期崩壊により死滅する。分裂期崩壊の前にみられる分裂中期における停止はM期チェックポイントの活性化によるものであると考えられ、分裂期崩壊を誘導するためにはM期チェックポイント機能が正常に働く必要がある

細胞死を回避した細胞では、染色体は不均等に分離し、微小核などを持つ異常な分裂細胞像がみられた。つまり、DNA損傷後の分裂死にはMチェックポイントの活性化が必要であり、Mチェックポイント機能に問題が生じている癌細胞は、DNA損傷後の分裂死を乗り越え、損傷を保持したまま新たなDNAの複製を開始し、さらに悪性化していく可能性が考えられる(図3下段)。

多くの癌細胞はG1期やG2期チェックポイント異常を持ち、抗癌剤はその異常を逆に利用して分裂期崩壊を誘導し、癌細胞を特異的に殺す方略である。しかし、その分裂期崩壊の誘導にはMチェックポイント機能が正常であることが前提となる。したがってチェックポイントの破綻が進んだ癌細胞では、抗癌治療によるDNA損傷をすり抜けて、より悪性化して治療に抵抗性を示す細胞に変化する可能性がある。更に私達は、DNA損傷を誘導する薬剤のみならず、微小管脱重合阻害剤であるタキサン系薬剤に対する感受性も、Mチェックポイントの機能障害によって低下することを見出しており⁶⁾、各癌細胞におけるそのチェックポイント

機能の評価が治療法の選択において重要なファクターとなる。

文 献

- 1) Siliciano JD, Canman CE, Taya Y, et al : DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev*, 11 : 3471-3481, 1997
- 2) Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, et al : Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*, 282 : 1497-1501, 1998
- 3) Fingert HJ, Chang JD, Pardee AB : Cytotoxic, cell cycle, and chromosomal effects of methylxanthines in human tumor cells treated with alkylating agents. *Cancer Res*, 46 : 2463-2467, 1986
- 4) Roninson IB, Broude EV, Chang BD : If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat*, 4 : 303-313, 2001
- 5) Nitta M, Kobayashi O, Honda S, et al : Spindle checkpoint function is required for mitotic catastrophe induced by DNA-damaging agents. *Oncogene*, 3 : 6548-6558, 2004
- 6) Sudo T, Nitta M, Saya H, et al : Dependence of paclitaxel sensitivity on a functional spindle assembly checkpoint. *Cancer Res*, 64 : 2502-2508, 2004