

(様式2)

平成 29 年度研究助成（海外渡航費）研究成果報告書

平成 29 年 11 月 27 日

公益財団法人遺伝学普及会 代表理事 殿

貴財団より助成のありました研究の成果を下記のとおり報告します。

海外渡航者氏名 知念 拓実



出席学会等名称 EMBO Conference, Centrosome and Spindle Pole Bodies

開催場所 ドイツ連邦共和国ハイデルベルグ EMBL

開催期間 平成 29 年 9 月 24 日 ~ 平成 29 年 9 月 27 日

渡航期間 平成 29 年 9 月 23 日 ~ 平成 29 年 10 月 2 日

研究成果の概要

EMBL（ドイツ・ハイデルベルグ）で開催された EMBO Conference: Centrosomes and Spindle Pole Bodies に参加した。本学会は中心体、微小管、また繊毛の研究者が世界中から集まる学会であり三年に一度開催される。中心体・微小管系は細胞分裂、細胞遊走、また細胞内シグナル伝達を初めとする様々な生命現象に関わっており、多くの研究者の興味を集めている。本年度の会では主に中心小体の倍化、中心体マトリックス (PCM) の制御、微小管形成中心の制御機構、またそれらと病気の関係性等の最新の知見が報告された。本学会において私は中心体を人工的に除去した際のがん細胞の分裂機構を報告した（形式：ポスター発表）。以下に研究成果の概要を記す。

細胞は複製した染色体を正確に二細胞に分配する。そのためには、二極性の紡錘体形成が必須である。哺乳類の体細胞では、二つの中心体が極として機能することで二極性の紡錘体が形成される。しかしながら、最近の研究により、中心小体複製を阻害し、中心体を除去してもがん細胞は分裂期紡錘体を形成して分裂を続けることが示されている (*Science*, **348**, 1155 (2015))。このことは、がん細胞がこれまでに明らかにされていない紡錘体成立システムを持ち、中心体欠損に適応することを示唆している。そこで本研究では、極になりうる中心体の除去時にも二極紡錘体を成立させるメカニズムの詳細な解明を行い、得られた知識を元に新たな抗がんストラテジーを提唱することを目的とした。具体的には、PLK4 阻害薬 centrinone 処理により、中心体数を減少したヒト培養細胞をモデルとし、1)紡錘体極局在因子のスクリーニング、2)生細胞イメージング、3)薬理阻害を組み合わせたアプローチを用いて解析を行った。その結果、中心体を 0 または 1 に減少させた際に駆動する新たな紡錘体二極性成立機構を見出した。中心体が 0 の場合、キネトコア-微小管結合により、紡錘体の二極性が保証されることを示した。さらに中心体の数を一つに減少させた細胞では、中心体側の極に局在する PCM が、中心体のない側の極へ分配されて新たな極「PCM-pole」を形成して分裂することを明らかにした。さらには PLK4 阻害により、中心体数を減少させたがん細胞では PLK1 阻害薬の感受性が上昇することに着目し、全 19 種類のがん細胞を用いて、PLK1 阻害薬と PLK4 阻害薬の共処理を行った。その結果、中心体経路 (PLK4) と非中心体経路 (PLK1) の両経路を同時に阻害することで、効率よくがん細胞の増殖抑制が可能であることを示した。

上記の発表を行った結果、中心体、微小管分野の研究者からフィードバックが得られ、さらには共同研究者との密な議論を行うことができた。さらには EMBL の Jan Ellenberg Lab と Heidelberg 大の Elamr Schiebel Lab を訪問して、議論を交わした。現在、ボン大学の Dr. Oliver Gruss のグループと共同研究を行うべく、先方と議論を進めている。以上から本渡航は申請者の研究の進展に重要であったと考えられる。本渡航に対して助成をして頂いた遺伝学普及会に感謝申し上げます。



Divergent acentrosomal pathways ensure spindle bipolarity in human cancer cells

Takumi CHINEN and Daiju KITAGAWA

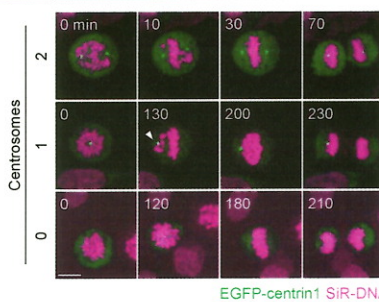
Division of Centrosome Biology, National Institute of Genetics

Summary

Here we uncovered that the divergent mitotic machineries ensure establishment of acentrosomal spindles. Cells with one centrosome form asymmetric bipolar spindles by splitting of pericentriolar materials of the centrosomal pole. In contrast, spindles without centrosomes assemble microtubule near chromosome, like human oocyte, and results in short bipolar spindles by coordination of kinetochore-microtubule attachment, γ -tubulin-dependent microtubule nucleation and Eg5-dynein-dependent force balance. Furthermore, chemical perturbation of acentrosomal spindle formation upon centrosome elimination prevented proliferation of various cancer cell lines. These findings provide insight into how the spindle bipolarity establishes independently of centrosome number, and suggest the dual inhibition of both centrosomal and acentrosomal spindle pathways as an attractive drug target.

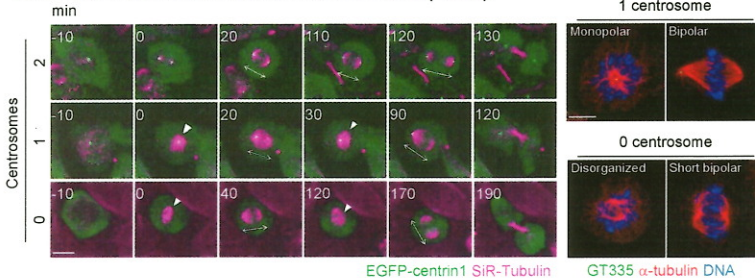
Introduction

Centrosomes are not absolutely essential for cell division; cancer cells in which centrosomes are removed can divide¹. Furthermore, PLK4 haploinsufficiency causes carcinogenesis², and cancer-related mutations in the *Cep152* gene locus impair Cep152-PLK4 interaction, resulting in procentriole assembly defects and chromosomal instability³. These findings indicate that cancer cells can drive acentrosomal spindle pathways that are not yet identified, and also that acentrosomal cell division may promote carcinogenesis.



Result 1: Acentrosomal spindle formation in cancer cells

To understand the mechanisms of acentrosomal spindle formation in cancer cells, we induced the formation of acentrosomal spindles which have 1 or 0 centrosomes by treatment of cells with a PLK4 inhibitor centrinone B (CentB).

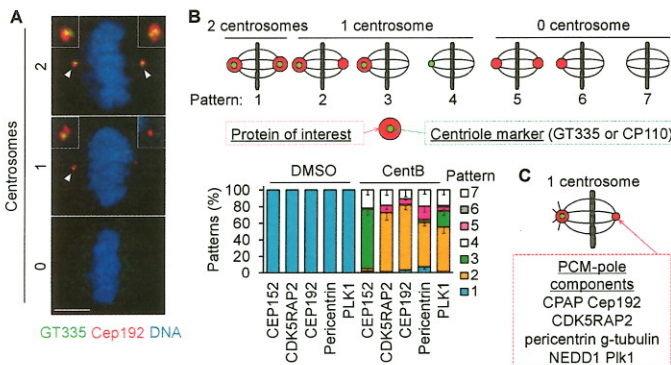


(Left) Spindle assembly patterns. Two-way arrows represent a bipolar state of spindle. Arrowheads denote monopolar spindles in 1-centrosome cells, and disorganized state of microtubules in 0-centrosome cells. Scale bar, 10 μ m. Time zero corresponds to the beginning of mitotic cell rounding. (Right) Two patterns of spindle structures in 1-centrosome and 0-centrosome cells. Scale bars, 5 μ m.

Cells with one centrosome first form centrosome-mediated monopolar spindles, and subsequently assemble asymmetric bipolar spindles. In contrast, spindles without centrosomes assemble microtubules near chromosomes, like human oocytes, and result in short bipolar spindles.

Result 2: Splitting of PCM ensures spindle bipolarity in 1-centrosome cells

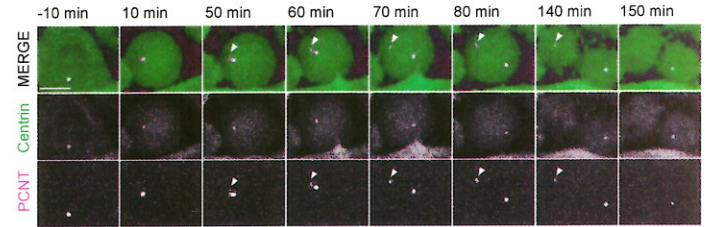
Previous studies indicated that the meiotic spindle poles of mouse oocytes without centrosomes contain pericentriolar material (PCM) components at the spindle poles⁴ whereas human oocytes lack these PCM-pole⁵. We conducted localization-based screening with known centrosomal proteins to see whether they localize at acentrosomal spindle poles.



(A) Spindle poles were observed in proTAME-arrested metaphase cells. Scale bar, 5 μ m. (B) Quantification of pole patterns in (A). Values are mean percentages \pm s.d. from three independent experiments ($N = 50$ for each experiments). (C) Schematic illustration of acentrosomal pole components in 1-centrosome cells.

Acentrosomal spindle poles of 1-centrosome cells contains PCM. On the other hand, most of 0-centrosome cells lack these components like human oocytes, suggesting that acentrosomal somatic cells could be a useful model system to understand meiotic properties of human oocytes.

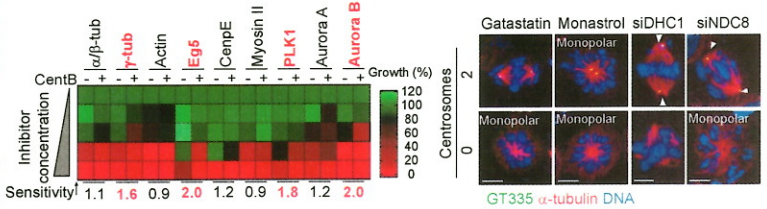
To understand the assembly mechanisms of the acentrosomal spindle poles of 1-centrosome cells, we tracked the localization and dynamics of endogenous pericentrin tagged with mCherry by time-lapse fluorescence microscopy. This strategy revealed that 1-centrosome cells form an acentrosomal pole by 'pole splitting' from the centrosomal pole



Time-lapse observation of spindle pole formation. HeLa cells expressing EGFP-centrin1 and pericentrin-mCherry were observed with a x63 objective. Magenta and green represent pericentrin and centrin, respectively. Arrowheads indicate the split acentrosomal pole. Scale bar, 10 μ m. Time zero corresponds to the beginning of mitotic cell rounding.

Result 3: Kinetochore-microtubule attachment, γ -tubulin-dependent microtubule nucleation and Eg5-dynein-dependent force balance promotes the spindle bipolarity in 0-centrosome cells

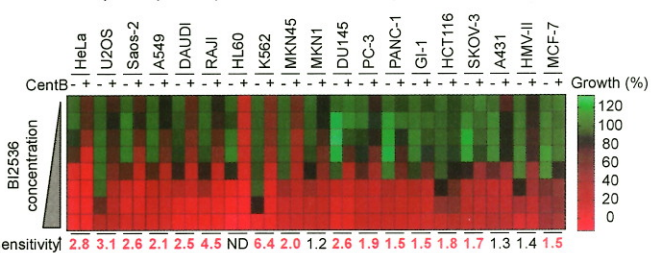
Mitotic spindle formation is supported by several key machineries⁶⁻¹⁰. To understand the molecular properties which are specific for acentrosomal spindle assembly in human cancer cells, we next performed a functional screening with an array of mitotic inhibitors upon CentB treatment and showed that kinetochore-microtubule attachment, γ -tubulin-dependent microtubule nucleation and Eg5-dynein-dependent force balance promotes spindle bipolarity in 0-centrosome cells.



(Left) Cell-growth screening with mitotic inhibitors to identify regulators for acentrosomal spindle formation. The ratio between IC_{50} values (\pm CentB) is shown below the heat map. (Right) Mitotic spindle structures of 2- or 0-centrosome cells upon gatastatin, monastrol, siDHC1 or siNDC80 treatment were observed with x63 objective. Scale bars, 5 μ m.

Result 4: Dual inhibition of PLK1 and PLK4 as a promising drug target for cancer chemotherapy

Mitotic spindle formation is a target for anti-cancer drugs. Since the dual inhibition of PLK1 and PLK4 (PLK1+4i) prevented the growth of HeLa cells efficiently, we further tested the potential of PLK1+4i as an alternative anticancer strategy. PLK1+4i prevented the growth of wide-variety of cancer cell lines efficiently suggesting that the inhibition of both centrosomal and acentrosomal spindle pathways as an attractive drug target for anticancer strategy.



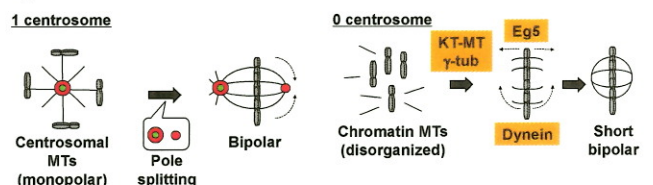
Dual inhibition of both centrosomal and acentrosomal spindle pathways in various cancer cell lines. After 4 days treatment with 500 nM of CentB and various concentrations of BI2536 (0, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 or 20 nM), cell viability (% of DMSO control) was determined and shown as a heat map. The ratio between IC_{50} values (\pm CentB) are shown below the heat map.

Conclusions

1-centrosome cells: Assemble asymmetric bipolar spindles by splitting of the PCM of the centrosomal pole (left in model)

0-centrosome cells: Assemble short bipolar spindles by the coordination of kinetochore-microtubule attachment, γ -tubulin-dependent microtubule nucleation and Eg5-dynein-dependent force balance (right in model)

Dual inhibition of PLK1 and PLK4: Prevented proliferation of various cancer cell lines efficiently



Reference

¹Science (80-.). **348**, 1155 (2015), ²Nat. Genet. **37**, (2005), ³Nat. Struct. Mol. Biol. **21**, 696–703 (2014), ⁴J. Cell Sci. 1251 (2017), ⁵Science **348**, 1143 (2015), ⁶Nature **440**, 697 (2006), ⁷Cell **91**, 357 (1997), ⁸J. Cell Biol. **138**, 1055 (1997), ⁹Curr. Biol. **26**, R719 (2016), ¹⁰Cell **127**, 983 (2006)