

膀胱癌細胞株からの中心体分離

—p53 mutation と中心体過剰複製について—

金沢医科大学泌尿器科学教室 (主任 : 鈴木孝治教授)

川村 研二, 森山 学, 菅 幸大, 芝 延行

田中 達朗, 池田 龍介, 鈴木 孝治

CENTROSOME ISOLATION FROM CULTURED
BLADDER CANCER CELLS

—P53 MUTATION AND CENTROSOME HYPERAMPLIFICATION—

Kenji KAWAMURA, Manabu MORIYAMA, Koudai SUGA, Nobuyuki SHIBA,

Tatsuro TANAKA, Ryosuke IKEDA and Koji SUZUKI

From the Department of Urology, Kanazawa Medical University

Centrosome hyperamplification occurs frequently in human cancers, and is the major contributing factor for chromosomal instability and aneuploidy. We examined centrosome hyperamplification in bladder cancer cell lines. Samples were incubated with antibodies to the centrosome protein γ -tubulin. The cell line (RT-4), which has a wild-type p53 status, showed a well-regulated centrosome replication cycle. On the other hand, centrosome hyperamplification was observed in HT-1197 and HT-13r cancer cells by discontinuous sucrose gradient fractionation. We used sucrose gradient fractions enriched for centrosomes by the immunoblot analysis for the presence of γ -tubulin, a major component of centrosomes. The fractions were then immunoblotted with anti-nucleophosmin/B23 (NPM) antibody. NPM is a primary target of CDK2-cyclin E in the initiation of centrosome duplication. The profile of NPM closely paralleled that of γ -tubulin, suggesting the association of NPM with the centrosome.

Identification of the mechanism underlying the replication of the centrosome should lead to the understanding of the mechanism of chromosomal instability in bladder cancer, and enable us to develop cancer therapeutics targeted to centrosome replication.

(Acta Urol. Jpn. 49 : 69-74, 2003)

Key words: Centrosome isolation, Ultracentrifugation, Centrosome hyperamplification, p53, Nucleophosmin/B23 (NPM)

緒 言

中心体 (centrosome) は, 動物細胞では直交する 1 対の中心小体 (centriole) とその周囲を取り巻くタンパク質 (pericentriolar materials) で形成されており, 細胞周期を通じてさまざまな細胞現象に関与していることが知られている¹⁻³⁾。例えば, 間期中に中心体は微小管形成の核 (Microtubule organizing center, MTOC) として細胞質微小管を配向し, 細胞内小器官の特異的局在に関与し細胞の極性を確立する役割を果たしている¹⁻³⁾。また, 中心体は有糸分裂の際, 紡錘体極 (spindle poles) となり, 染色体の均等な分割に必要な不可欠なイベントである 2 極性の確立, 紡錘体系の形成, 赤道面位置の決定を司る¹⁻³⁾。それぞれの娘細胞は親細胞から 1 つの中心体しか受け取らないため, 中心体は有糸分裂前に複製されなければならない。動物体細胞では, 中心体の複製は細胞周期の G1

後期から G1/S 転移期に中心小体の分離, 複製によって始まる。中心小体の複製は, 2 つの中心小体が数 μm ほど離れ, 各中心小体基部付近から直角に娘中心小体が伸長し, G2 期までに完了する。中心体の複製は, 1 細胞周期中 1 度だけでなければならないため, 中心体複製は DNA 複製などその他の細胞周期と同調して起こる必要がある。この制御機構に異常が起これば癌細胞特有の染色体数の異常が観察されることとなる⁴⁻⁷⁾。

今回, 膀胱癌細胞株を用いて, 中心体の超遠心分離⁸⁾を試みた。膀胱癌細胞株から中心体を分離することにより, 中心体複製周期をコントロールするとされるタンパク質 nucleophosmin/B23 (NPM)⁹⁻¹¹⁾の中心体への局在についても検討した。

対 象 と 方 法

培養細胞株

ヒト膀胱癌細胞株 (RT-4, HT-1197, HT-1376) を用いた。いずれの細胞も ATCC (American type culture collection) から購入した。細胞株は10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml) を含んだ MEM 培地で 5% CO₂ 下で培養した。

RT-4 は移行上皮癌 G1, 乳頭状腫瘍から樹立された細胞株である¹²⁾ HT-1197, HT-1376 は移行上皮癌 G3, いずれも筋層浸潤のある進行癌から樹立された細胞株である¹³⁾ Cooper ら¹⁴⁾ は膀胱癌細胞株の p53 mutation について報告しており, それによれば, RT-4 は p53 wild type, HT-1197, HT-1376 は p53 mutant type の細胞株である。

免疫染色

スライドガラス上の培養細胞を 2 回 PBS で洗浄し, 10% ホルマリンで 20 分間固定した。1% NP-40 in PBS で 5 分間処理し, 10% 正常羊血清を 1 時間室温, anti- γ -tubulin rabbit polyclonal antibody (University of Cincinnati, Prof. Fukasawa より供与)^{4,6)} を 1 時間 37°C で反応させた。 γ -チューブリンは中心体に存在するタンパク質で, 微小管形成の核として細胞質微小管を配向する¹⁵⁾ 2 次抗体は FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Boehringer Mannheim) を用いて 1 時間室温で反応させた。それぞれの反応後に TBS で 3 回洗浄し, 核染色は 4'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いた。

それぞれの細胞毎の中心体数を計測し, 中心体過剰複製について判定した。n=1 は中心体の複製していない細胞, n=2 は中心体複製の起こった細胞, n $\geq$ 3 は中心体を 3 つ以上もつ中心体過剰複製を示す細胞と判定した⁴⁾

中心体の超遠心分離

Moudjou M と Bornens M の方法⁸⁾ に準じて, 密度勾配をつけたシヨ糖の混合溶液を作製し, 超遠心分離により癌細胞株から中心体を分離した。まず, 膀胱癌細胞株を 1 時間サイトカラシン D, ノコダゾールで処理し, トリプシン (EDTA 不含) 処理により回収した。次に, 細胞膜をバッファー (1 mM HEPES, pH7.2, 0.5% NP-40, 0.5 mM MgCl₂, 0.1% β -mercaptoethanol, protease inhibitors; leupeptin, pepstatin, aprotinin, PMSF) で高張処理し裸核化し, 60% シヨ糖液を 500 μ l 試験管に入れ, 細胞溶液を重層し, 9,000 回転 30 分間遠心, 1,500 μ l を残し, 上清を捨て vortex した。下方より 70%, 50%, 40% のシヨ糖の層をつくり, 中心体を含む分画を重層し, 18,000 回転 1 時間遠心分離した。チューブに穴を開け下方より溶液を 100~200 μ l ずつ分画回収した。Anti- γ -tubulin rabbit polyclonal antibody^{4,6)} を用いた western blot で中心体を含む分画を確認した。

Immunoblot analysis

サンプルは sample buffer [2% SDS, 10% glycerol, 60 mM Tris (pH6.8), 5% β -mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue] を加え 95°C で 5 分間処理し SDS-page でタンパク質を分離した。分離されたタンパク質は Immobilon (Millipore) シートにトランスファーした。シートは, まず 5% (W/V) dry milk in Tris-buffered saline + 0.05% Tween 20 (TBS-T) で 1 時間室温, それから 1 次抗体; anti- γ -tubulin rabbit polyclonal antibody^{4,6)}, anti-nucleophosmin/B23 (NPM) mouse monoclonal antibody^{9,10)} を 4°C で 12 時間反応させた。TBS-T で洗浄した後, horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG または anti-mouse IgG を 1 時間室温で反応させた。再度 TBS-T で洗浄し, ECL chemiluminescence (Amersham) システムを用いて写真を撮影した。

免疫沈降法

中心体を含む分画に, IP lysis buffer (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 50 mM NaF) を加えた。4°C で vortex を 5 分ごとに 30 分くり返し, 遠心上清を回収した (タンパク濃度の測定)。Protein A または protein G beads を添加し非特異的結合を除去した。つぎに 1 次抗体を添加し 4°C で 4 時間攪拌, その後 protein A (polyclonal 用) または protein G beads (monoclonal 用) を加え, 4°C で 1 時間攪拌した。ビーズの遠心洗浄を 8 回繰り返し, サンプルバッファーを加え 5 分間煮沸し SDS-PAGE, ウエスタンブロットを行った。

結 果

1 膀胱癌細胞株における中心体過剰複製について

今回用いた細胞株の中心体複製について検討した。Fig. 1 に抗 γ チューブリン抗体を用いた免疫染色像を示す。中心体を 3 個以上もつ細胞の比率は, RT-4 では 1%, HT-1197 は 25%, HT-1376 では 43% であった。すなわち, RT-4 は中心体の複製周期が保たれている細胞株であり, HT-1197, HT-1376 は中心体過剰複製を認める細胞株であった。

2 膀胱癌細胞株からの中心体の分離

培養細胞株より中心体を分離することができた。Fig. 2 に密度勾配をつけたシヨ糖溶液により分画された RT-4 の中心体分画 (銀染色) を示す。中心体はシヨ糖の濃度が 60~50% のシヨ糖溶液中に分離できた。他の 2 つの培養細胞 (HT-1197, HT-1376) においても同様に分離できた。どの分画に中心体を含むかは, 抗 γ チューブリン抗体を用いた western blot により同定した。

次に, 分離された中心体をスライドガラスに張り付

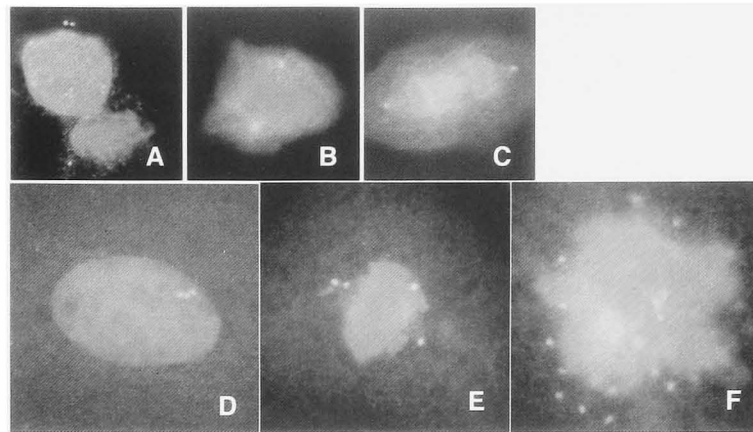


Fig. 1. Staining of γ -tubulin in bladder cancer cell lines during interphase and mitosis. Cells were immunostained with anti- γ -tubulin antibody. Antibody-antigen complexes were detected with FITC-conjugated antibody to rabbit IgG. Cells were also stained with DAPI for visualization of DNA. Original magnification, $\times 600$. A, RT-4: interphase; B, RT-4: metaphase; C, RT-4: anaphase; D, HT-1197: interphase, centrosome hyperamplification; E, HT-1197: metaphase, centrosome hyperamplification; F, HT-1376: a lot of centrosomes in the prometaphase cell.

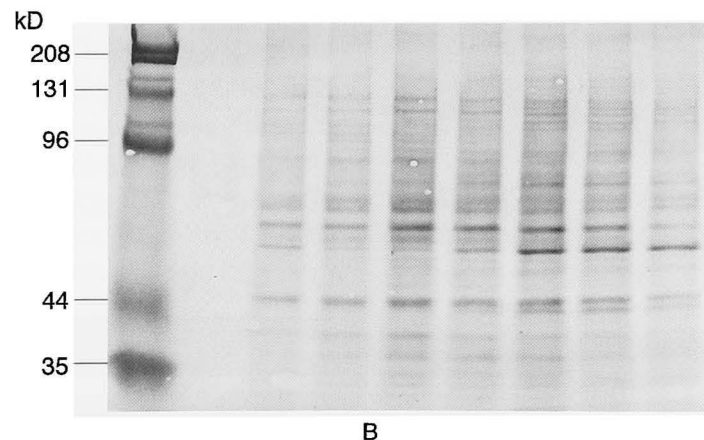
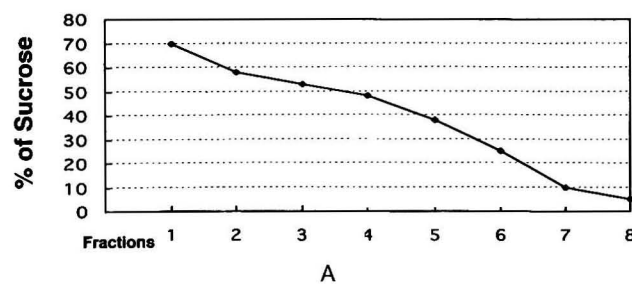


Fig. 2. Centrosome isolation from cultured bladder cancer. A, The concentration of sucrose fraction. B, SDS-page, Silver staining (RT-4).

け, 抗 γ チューブリン抗体で染色をおこなった (Fig. 3). 中心体は円形のドットとして観察され, 遠心分離後も無傷と思われ小器官として分離できた. RT-4 は中心体の複製が正常に行われている細胞株であり中心体は1個または2個のドットとして観察された. HT-1197, HT-1376 は中心体過剰複製を示す細胞株であり3個以上の中心体も観察できた.

3. 中心体分画に存在するタンパク質の検討

中心体複製周期をコントロールするとされるタンバ

ク質のうち, NPM について検討した. NPM は, 中心体複製をスケジュールどおりに開始させ, また中心体と DNA 複製を同調させるチェックポイントにおいて重要な役割を担うタンパク質である^{9,10)}

Western blot を用い抗 γ チューブリン抗体で同定した中心体分画と同じレーンに NPM が存在するかどうかを検討した (Fig. 4). 中心体過剰複製を認めない RT-4 では抗 γ チューブリン抗体で同定した中心体分画と同じレーンに NPM を認めた. 中心体過剰

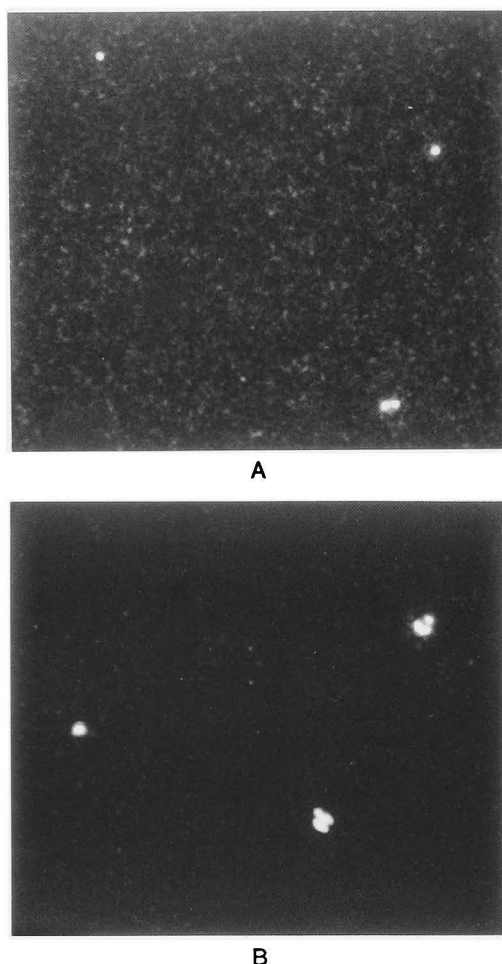


Fig. 3. An example of immunofluorescence staining of centrosomes. Cells were immunostained with anti- γ -tubulin antibody. Antibody-antigen complexes were detected with the FITC-cojugated antibody to rabbit IgG. Original magnification, $\times 600$. A, RT-4; B, HT-1376.

複製を認める細胞株 HT-1376 でも、中心体を認めた分画とほぼ同じレーンに NPM を認めた。図には示さないが HT-1197 でも同様であった。RT-4 と HT-1376 で中心体が分画されたレーンが異なっているが、これはそれぞれの分画した溶液量が異なるという技術的な問題であり、いずれの膀胱癌細胞株においてもシヨ糖濃度が約60~50%の fraction に中心体は存在した。

つぎに RT-4 と HT-1197 で免疫沈降法により γ チューブリンと NPM の局在を確認した (Fig. 5)。抗 γ チューブリン抗体で免疫沈降した検体を western blot で抗 NPM 抗体を用いて確認した。また、抗 NPM 抗体で免疫沈降した検体を western blot で抗 γ チューブリン抗体を用いて確認した。RT-4 と HT-1197 とともに γ チューブリンと NPM の局在が一致した。

考 察

生化学的な分析のためには細胞の構造をこわさなければならないが、種々の細胞成分の機能まではそこなわない穏やかな分離技術が工夫されてきた。細胞はいろいろな方法で壊することができるが、破碎処理を注意深く行えば、核、ミトコンドリア、ゴルジ体、リソソームなどの小器官はほとんど無傷のまま残せる。こうして、細胞から膜に囲まれ、大きさ、電荷、密度の異なる粒子が混在する濃厚なスープ（ホモジェネート）がえられる。破碎操作をする際の溶媒を注意深くさえ選べば各粒子の生化学的性質は元とほとんど同じ状態に保てる。超遠心法による細胞の分画においては、細胞のホモジェネートの速度を上げながら繰り返し遠心して、構成成分を分画する。一般に細胞成分が

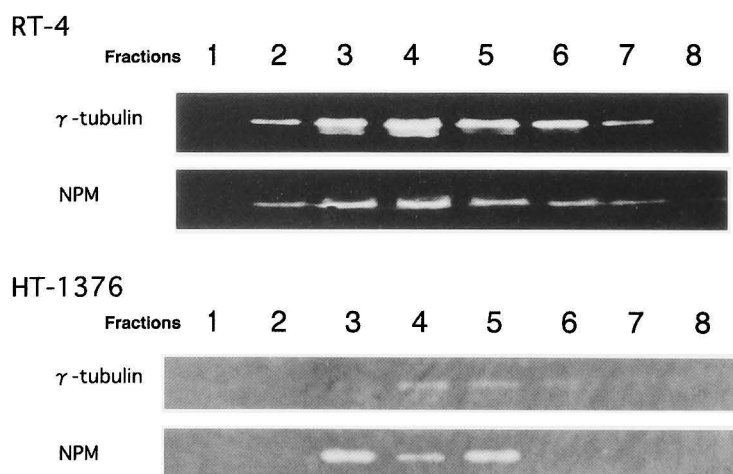


Fig. 4. Western blot: We examined centrosomes enriched sucrose gradient fractions by immunoblot analysis to detect the presence of γ -tubulin, a major component of centrosomes. The fractions were then immunoblotted with nucleophosmin/B23 (NPM) antibody. NPM and γ -tubulin were found in many of the same gradient fractions.

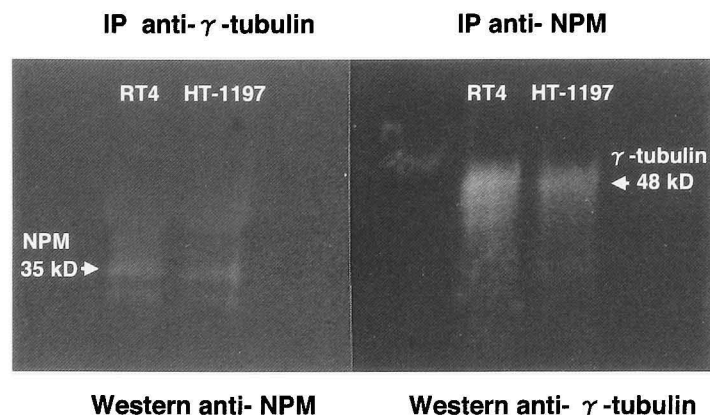


Fig. 5. Co-immunoprecipitation of NPM and γ -tubulin proteins. Immunoblot analysis of the immunoprecipitates showed that NPM was present in protein complex immunoprecipitated by anti- γ -tubulin antibody. Similarly, we detected γ -tubulin in the protein complex immunoprecipitated by anti-NPM antibody.

小さい程, 沈降させるのに大きな遠心力を要する¹⁶⁾ 中心体の分離に関しては, Moudjou M and Bornens M の方法⁸⁾ が用いられている. 今回, この中心体分離法を用いて膀胱癌の中心体を分離することができた. Fig. 2b に示した銀染色の各分画においてタンパク質の多くの band を認めるが, Moudjou M and Bornens M の原法においても同様に多くの band を認めている. 中心体の周囲を取り巻いて多数のタンパク質が存在しており¹⁻³⁾, それぞれのタンパク質の中心体複製周期における役割の解明が待たれる¹⁷⁾

最近中心体の複製周期について, いくつかの重要な報告があるが¹⁷⁾, その中でも p53 pathway (p53-Waf1-CDK2/Cyclin E-nucleophosmin) が注目を集めている^{4,6,9,10)}

p53 の転写機能のおもなターゲットの1つである Waf1 は CDK2 inhibitor のファミリーのひとつで CDK2/サイクリン E の活性をコントロールしていることが知られている. 中心体複製周期において CDK2/サイクリン E のリン酸化のターゲットが nucleophosmin (NPM)/B23 であることが最近明らかになった^{9,10)} NPM は複製前の中心体に局在するが, CDK2/サイクリン E によるリン酸化により中心体の結合能を失い中心体から遊離する. NPM の機能のひとつとしてシャペロニング (タンパク質凝集抑制能) が知られているが, NPM の遊離は中心体の構造変化をもたらし複製開始を促すと考えられている^{9,10)} 正常細胞では, サイクリン E の発現は G1 後期におこり, CDK2/サイクリン E の活性は S 期の移行 (DNA 複製開始) に必要である. それゆえ, CDK2/サイクリン E の G1 後期における特異的発現が中心体複製と DNA 複製との同調を確立するとされている. p53 を上流とする CDK2/サイクリン E の G1 後期における特異的活性は, 中心体複製をスケジュールどおりに開

始させ, また中心体と DNA 複製を同調させるチェックポイントとなる事象である¹⁸⁻²¹⁾ 今回の実験では, 抗 γ -チューブリン抗体を用いたウエスタンプロテイングで中心体が含まれている分画同定し, 中心体を含む分画に NPM が含まれていることを確認した. NPM は正常細胞では複製前の中心体に存在しているが^{9,10)}, 今回膀胱癌培養細胞株の中心体にも存在することが明らかになった. 正常細胞以外で中心体への NPM の局在を証明した報告は現在まで Zetasepina ら¹¹⁾ の HeLa 細胞の M 期の中心体に NPM が存在するという報告のみである. NPM が膀胱癌の中心体に局在したことは p53 を上流とし NPM を下流とする中心体複製経路が正常動物細胞だけではなく, ヒトの癌の中心体複製にも重要であることを示唆するものと考ええる. また, p53 が wild type の膀胱癌細胞株において中心体複製が保たれており, p53 が mutant の膀胱癌細胞株で中心体過剰複製が生じていたことも注目に値する. Carroll ら²²⁾ は p53 の経路に異常を認める頭頸部癌において中心体過剰複製が生じていたと報告している. また, Weber ら²³⁾ も p53 の変異と中心体過剰複製との関連について脳腫瘍において報告している. われわれは P53 pathway (p53-Waf1-CDK2/Cyclin E-nucleophosmin) が膀胱癌の中心体複製に関与しており, p53 の経路の機能不全が中心体過剰複製に関わっている可能性があると考えている. 今後は, p53 pathway と中心体過剰複製について検討していく必要があると考える.

結 語

中心体は, 細胞の動的中心 (dynamic centre) という考えに基づいて約100年前を Boveri によって名づけられた²⁴⁾ このような古い歴史を持つ中心体であるが, 中心体複製の分子レベルでの解析ははじまった

ばかりであり、不明な点が多い。p53, Waf1 などがあるように中心体複製周期と DNA 複製周期を調節しているのか、どのように膀胱癌の中心体過剰複製が生じるのかを明らかにすることは、膀胱癌の染色体不安定性 (chromosomal instability) の発現機構を解明する上でも重要であると考えられる。

本研究は文部省科学研究費基盤研究C (50y26) の研究補助を受けて実施した。

文 献

- 1) Brinkley BR: Microtubule organizing centers. *Annu Rev Cell Biol* **1**: 145-172, 1985
- 2) Andersen SS: Molecular characteristics of centrosome. *Int Rev Cytol* **187**: 51-109, 1999
- 3) Lange BM, Faragher AJ, March P, et al.: Centriole duplication and maturation in animal cells. *Curr Top Dev Biol* **49**: 235-249, 2000
- 4) Fukasawa K, Choi T, Kuriyama R, et al.: Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science* **271**: 1744-1747, 1996
- 5) Winey M: Keeping the centrosome cycle on track. genome stability. *Curr Biol* **6**: 962-964, 1996
- 6) Fukasawa K, Wiener F, Vande Woude GF, et al.: Genomic instability and apoptosis are frequent in p53 deficient mice. *Oncogene* **15**: 1295-1302, 1997
- 7) Tarapore P and Fukasawa K: p53 mutation and mitotic infidelity. *Cancer Invest* **18**: 148-155, 2000
- 8) Moudjou M and Bornens M: Method of centrosome isolation from cultured animal cells. In: *Cell Biology Laboratory Hand Book*. Edited by Celis JE 2nd ed., pp 111-119, Academic Press, San Diego, 1998
- 9) Okuda M, Horn HF, Tarapore P, et al.: Nucleophosmine/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome replication. *Cell* **103**: 127-140, 2000
- 10) Tokuyama Y, Horn HF, Kawamura K, et al.: Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr (199) by cyclin-dependent kinase 2-cyclin E and its role in centrosome duplication. *J Biol Chem* **276**: 21529-21537, 2001
- 11) Zetasepina OV, Rousselet A, Chan PK, et al.: The nucleolar B23 redistributes in part to the spindle poles during mitosis. *J Cell Sci* **112**: 455-466, 1999
- 12) Rigby CC and Franks LMA: Human tissue culture cell line from a transitional cell tumor of the urinary bladder: growth, chromosome pattern and ultrastructure. *Br J Cancer* **24**: 746-754, 1970
- 13) Rasheed S, Gardner MB, Rongey RW, et al.: Human bladder carcinoma: characterization of two new tumor cell lines and search for tumor viruses. *J Natl Cancer Inst* **58**: 881-890, 1977
- 14) Cooper MJ, Haluschak JJ, Johnson D, et al.: p53 mutation in bladder carcinoma cell lines. *Oncol Res* **6**: 569-579, 1994
- 15) Stearns T, Evance L and Kirschner M: Gamma-tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell* **65**: 825-836, 1991
- 16) Alberts B, Bray D, Lewis J, et al.: Fraction of cells and analysis of their molecules. In *Molecular biology of the Cell*. Edited by Alberts B. 3rd ed., pp 162-163, Garland Publishing, New York and London, 1994
- 17) Hinchcliffe EH and Sluder G: Centrosome duplication: three kinases come up a winner!. *Curr Biol* **11**: 698-701, 2001
- 18) Hinchcliffe EH, Li C, Thompson EA, et al.: Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. *Science* **283**: 851-854, 1999
- 19) Matsumoto Y, Hayashi K and Nishida E: Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) is required for centrosome duplication in mammalian cells. *Curr Biol* **9**: 429-432, 1999
- 20) Lacey KR, Jackson PK and Stearns T: Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 2817-2822, 1999
- 21) Mussman JG, Horn HF, Carroll PE, et al.: Synergistic induction of centrosome hyperamplification by loss of p53 and cyclin E overexpression. *Oncogene* **19**: 1635-1646, 2000
- 22) Carroll PE, Okuda M, Horn HF, et al.: Centrosome hyperamplification in human cancer. chromosomal instability induced by p53 mutation and/or Mdm2 overexpression. *Oncogene* **18**: 1935-1944, 1999
- 23) Weber RG, Bridger JM, Benner A, et al.: Centrosome amplification as a possible mechanism for numerical chromosome aberrations in cerebral primitive neuroectodermal tumors with TP53 mutations. *Cytogenet Cell Genet* **83**: 266-269, 1998
- 24) Boveri T: The origin of malignant tumors. Williams & Wilkins, Baltimore, 1929

(Received on October 1, 2002)

(Accepted on December 5, 2002)

(迅速掲載)