

令和元年5月10日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02398

研究課題名(和文) aneuploidy (染色体異数性) と細胞の運命 - がん化、老化、分化 -

研究課題名(英文) The fate of aneuploid cells

研究代表者

稲垣 昌樹 (Inagaki, Masaki)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30183007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,700,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞に特異的に発現する中間径フィラメントであるビメンチンの分裂期リン酸化部位に変異を導入した遺伝子改変マウスは、細胞質分裂障害により高効率に細胞がaneuploidy(染色体異数性)を生じることこれまでに明らかにしてきた。本研究では、本遺伝子改変マウスを用いて、皮膚損傷後の治癒過程を経時的に解析した結果、aneuploid細胞は、多核・多中心体を経てDNA障害を引き起こし細胞老化を引き起こすこと、マウス個体の表現型として老化症状の一つである創傷治癒遅延および皮下脂肪減少を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

aneuploidy(染色体異数性)はがん発生において直接的な引き金になるのかという生物学的に非常に重要な問いに対して、本研究は、間葉系組織で高効率にaneuploid細胞が生じる遺伝子改変マウスにおいては、むしろ白内障や皮下脂肪減少、創傷治癒遅延といった老化症状を引き起こすことを示した。さらに、aneuploidyから老化に至る分子メカニズムの糸口となりうるモデルマウスの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Intermediate filaments (IFs) are dramatically reorganized during mitosis. Some protein kinases activated in mitosis control spatial and temporal IF reorganization through IF phosphorylation. Here, we analyzed the dorsal skin wound healing in phospho-vimentin-deficient mice. In response to skin injury, vimentin expression was elevated at wound areas of subcutaneous fibroblast in a genotype-independent manner. During the acute phase of wound healing when vimentin expression was relatively high, IF-bridge formation, binucleation, and extra-centrosome formation was observed specifically in fibroblast of phospho-vimentin-deficient mice. These cellular structures disappeared with decreased expression, leading to increased numbers of aneuploid fibroblasts. Subsequently the fibroblasts exhibited a significant elevation of major senescence-relative markers. These abnormalities resulted in implicated wound healing, one of the premature aging phenotypes.

研究分野：分子生理学

キーワード：染色体異数性 中間径フィラメント 細胞質分裂 老化 がん化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

染色体不安定性の代表的な表現型である aneuploidy (染色体異数性) は、一部の染色体の数が変異している状態を指す。がんにおいては aneuploidy がしばしば観察されることが 100 年以上も前から分かっており、がんの特徴的な形質であると考えられてきた。また、aneuploidy が老化や分化と関連する報告もされているが、aneuploidy とがん化、老化、分化との間に直接的な因果関係があるのか、そして直接の連環があるとすればどのような分子メカニズムが働いているのかは全く不明であった。

研究代表者等はこれまでに、中間径フィラメントのリン酸化が脱重合を引き起こすことを発見し、この脱重合が細胞質分裂に必須であることを示してきた。分裂期リン酸化が起こらない中間径フィラメント変異体を発現する細胞では、細胞質分裂において中間径フィラメントが脱重合されないため、細胞質分裂障害に起因する aneuploidy が高頻度に観察されることを見出している。さらに、間葉系細胞に特異的に発現する中間径フィラメントであるビメンチンの分裂期リン酸化部位をアラニン置換したノックインマウス ($VIM^{SA/SA}$) を作製したところ、老化の表現型である白内障を示した。レンズ組織の解析により、細胞質分裂障害が、多核・多中心体による染色体の分配異常を介して aneuploidy を引き起こすこと、そして aneuploidy 細胞は DNA 障害を経て細胞老化へと至ることが分かった。

2. 研究の目的

aneuploidy とがん化、老化、分化との間に直接的な因果関係があるのか、そして直接連環があるとすればどのような分子メカニズムが働いているのかを解明するため、特定の組織において発現する中間径フィラメントの分裂期リン酸化不全変異体を発現する遺伝子改変マウスを作製・解析することを目的とする。そのために必要となる中間径フィラメントタンパク質のリン酸化・脱重合の機構についても詳しく調べる。

3. 研究の方法

(1) $VIM^{SA/SA}$ マウスが示す老化表現型として、白内障以外に皮膚の創傷治癒遅延を見出している。ビメンチンの分裂期リン酸化障害が創傷治癒遅延を起こすメカニズムについて、皮膚損傷組織における細胞質分裂障害、多核・多中心体、DNA 損傷、細胞老化などの出現を、各種マーカーを用いて経時的に解析する。

(2) ケラチン 8/18 は、肺や肝臓、消化管などの上皮細胞に多く発現する中間径フィラメントである。ケラチン 8/18 の分裂期リン酸化も脱重合を引き起こし円滑な細胞質分裂を遂行するためには必須であることを見出しているが、リン酸化の起こるアミノ酸残基やキナーゼの同定はまだ不十分である。そこで、分裂期に活性化することが知られているキナーゼ群や、その指向配列についてリン酸化の可能性と細胞質分裂への影響を解析する。

4. 研究成果

(1) マウス皮膚損傷後、損傷組織においてビメンチンタンパク質の著しい発現上昇を認めた。そこで、正常マウスと $VIM^{SA/SA}$ マウスについて、皮膚損傷後の治癒過程について経時的解析を行った結果、 $VIM^{SA/SA}$ マウスにおいてのみ細胞質分裂障害に起因する多核・多中心体細胞の出現を高頻度に認めた。FISH 解析により、多核細胞はその後、aneuploidy へ進行することが分かった。Aneuploidy 細胞は、DNA 障害 (γ H2A.X の上昇) により最終的に細胞老化 ($p53$, $p21$, $p16^{INK4a}$, $p19^{Arf}$, ガラクトシダーゼの上昇) へ至ることが分かった。すなわち、皮膚の創傷治癒モデルにおいてもレンズ組織同様に、aneuploidy は上記過程を経て老化を引き起こすことが明らかになった。

(2) ヒトのデスミンタンパク質の分裂期リン酸化部位としてセリン 6、セリン 27、セリン 31 を新たに同定し、これらのセリン残基をリン酸化するキナーゼとして Cdk1 (cyclin-dependent kinase 1) を同定することに成功した。リン酸化セリン 31 に対するマウスモノクローナル抗体 (TD31) を作製して細胞内での時空間的解析を行ったところ、デスミンは分裂前期 (prophase) から前中期 (prometaphase) にかけて cytoplasm でリン酸化されることが分かった。また、これらリン酸化部位 3 箇所をアラニン置換したデスミン変異体を発現させた細胞では、細胞質分裂が正常に起こらないことを明らかにした。このリン酸化の意義をさらに生理的に解析するため、マウス胎児および新生児の筋組織や、ヒト横紋筋組織を用いて解析したところ、分裂期細胞でデスミンの著しいリン酸化を検出した。本成果によって、aneuploidy の原因となりうる細胞質分裂のメカニズムの一端が明らかになった。また、作製したリン酸化抗体 TD31 は、横紋筋肉腫の診断において有用なツールとなりうる可能性を見出した。現在、上記リン酸化部位にアラニン変異を加えたノックインマウスの作製に成功しており、さらに詳細な解析を進めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

1. Nishimura Y, Kasahara K, Shiromizu T, Watanabe M, Inagaki M, Primary cilia as signaling hubs in health and disease. Adv Sci. 6: 1801138. 2019.

2. Goto H, Natsume T, Kanemaki MT, Kaito A, Wang S, Gabazza EC, Inagaki M, Mizoguchi A. Chk1-mediated Cdc25A degradation as a critical mechanism for normal cell cycle progression. *J Cell Sci.* 132. 2019
3. Inoko A, Yano T, Miyamoto T, Matsuura S, Kiyono T, Goshima N, Inagaki M, Hayashi Y. Albatross/FBF-1 contributes to both centriole duplication and centrosome separation. *Genes Cells.* 23: 1023-1042. 2018
4. Kasahara K, Aoki H, Kiyono T, Wang S, Kagiwada H, Yuge M, Tanaka T, Nishimura Y, Moizoguchi A, Goshima N, Inagaki M. EGF receptor kinase suppresses ciliogenesis through activation of USP8 deubiquitinase. *Nat Commun.* 22: 758. 2018
5. Tanaka K; Goto H, Nishimura Y, Kasahara K, Inagaki M. Tetraploidy in cancer and its possible link to aging *Cancer Sci.* 109: 2632-2640. 2018
6. Inaba H, Yamakawa D, Tomono Y, Enomoto A, Mii S, Kasahara K, Goto H, Inagaki M. Regulation of keratin 5/14 intermediate filaments by CDK1, Aurora-B, and Rho-kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 498:544-550. 2018
7. Chen M, Puschmann TB, Marasek P, Inagaki M, Pekna M, Wilhelmsson U, Pekny M. Increased Neuronal Differentiation of Neural Progenitor Cells Derived from Phosphovimentin-Deficient Mice. *Mol Neurobiol.* 55: 5478-5489. 2018
8. Andrieu G, Ledoux A, Branka S, Bocquet M, Gilhodes J, Walzer T, Kasahara K, Inagaki M, Sabbadini RA, Cuvillier O, Hatzoglou A. Sphingosine 1-phosphate signaling through its receptor S1P₅ promotes chromosome segregation and mitotic progression. *Sci Signal.* 10(472) 2017
9. Goto H, Inaba H, Inagaki M. Mechanisms of ciliogenesis suppression in dividing cells. *Cell Mol Life Sci.* 74:881-890. 2017
10. Makihara H, Inaba H, Enomoto A, Tanaka H, Tomono Y, Ushida K, Goto M, Kurita K, Nishida Y, Kasahara K, Goto H, Inagaki M. Desmin phosphorylation by Cdk1 is required for efficient separation of desmin intermediate filaments in mitosis and detected in murine embryonic/newborn muscle and human rhabdomyosarcoma tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 478:1323-9. 2016
11. Inaba H, Goto H, Kasahara K, Kumamoto K, Yonemura S, Inoko A, Yamano S, Wanibuchi H, He D, Goshima N, Kiyono T, Hirotsune S, Inagaki M. Ndel1 suppresses ciliogenesis in proliferating cells by regulating the trichoplein-Aurora A pathway. *J Cell Biol.* 212:409-23. 2016
12. Goto H, Tanaka H, Kasahara K, Inagaki M. Phospho-Specific Antibody Probes of Intermediate Filament Proteins. *Methods Enzymol.* 568:85-111. 2016
13. Izawa I, Goto H, Kasahara K, Inagaki M. Current topics of functional links between primary cilia and cell cycle. *Cilia.* 4:12. 2015
14. Bargagna-Mohan P, Lei L, Thompson A, Shaw C, Kasahara K, Inagaki M, Mohan R. Vimentin Phosphorylation Underlies Myofibroblast Sensitivity to Withaferin A In Vitro and during Corneal Fibrosis. *PLoS One.* 10:e0133399. 2015
15. Hyder CL, Kempainen K, Isoniemi KO, Imanishi SY, Goto H, Inagaki M, Fazeli E, Eriksson JE, Törnquist K. Sphingolipids inhibit vimentin-dependent cell migration. *J Cell Sci.* 128:2057-69. 2015
16. Tanaka H, Goto H, Inoko A, Makihara H, Enomoto A, Horimoto K, Matsuyama M, Kurita K, Izawa I, Inagaki M. Cytokinetic Failure-induced Tetraploidy Develops into Aneuploidy, Triggering Skin Aging in Phosphovimentin-deficient Mice. *J Biol Chem.* 290:12984-98. 2015
17. Goto H, Kasahara K, Inagaki M. Novel insights into Chk1 regulation by phosphorylation. *Cell Struct Funct.* 40:43-50. 2015

〔学会発表〕(計3件)

1. Inagaki M, Kasahara K : Primary cilia and cell cycle、第40回日本分子生物学会学術総会、パシフィコ横浜(横浜市)2016年12月2日
2. 稲垣昌樹 : 一次シリアと細胞周期、第28回CDBミーティング「Cilia and Centrosomes」理化学研究所(神戸市)2016年11月27日
3. Inagaki M, Izawa I : Cell cycle and cancer、第74回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場(名古屋市)2015年10月5日

〔図書〕(計1件)

笠原広介、稲垣昌樹、羊土社、実験医学増刊 知る・見る・活かす!シグナリング研究、一次繊毛を制御するAuroraAシグナル、2015年213ページ(p88-92)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称:スクリーニング方法
発明者:稲垣昌樹、笠原広介

権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2017-210896
出願年：2017年10月31日
国内外の別：国内

取得状況（計0件）

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.medic.mie-u.ac.jp/organization/course/physiology/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：井澤 一郎
ローマ字氏名：(IZAWA, Ichiro)
所属研究機関名：名古屋学芸大学
部局名：管理栄養学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：20311441

研究分担者氏名：後藤 英仁
ローマ字氏名：(GOTO, Hidemasa)
所属研究機関名：三重大学
部局名：医学系研究科
職名：特任准教授（研究担当）
研究者番号（8桁）：20393126

研究分担者氏名：笠原 広介
ローマ字氏名：(KASAHARA, Kousuke)
所属研究機関名：三重大学
部局名：医学系研究科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：90455535

研究分担者氏名：猪子 誠人
ローマ字氏名：(INOKO, Akihito)
所属研究機関名：愛知県がんセンター（研究所）
部局名：がん予防研究分野
職名：主任研究員
研究者番号（8桁）：30393127

研究分担者氏名：田中 宏樹
ローマ字氏名：(TANAKA, Hiroki)
所属研究機関名：京都大学
部局名：医学研究科
職名：特定助教
研究者番号（8桁）：20725452

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。