

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：83901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861585

研究課題名(和文) Notch1-Fbxw7シグナル異常による口腔癌モデルマウスの開発

研究課題名(英文) Development of a new mouse model caused aneuploidy

## 研究代表者

田中 宏樹 (Tanaka, Hiroki)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍医化学部・リサーチレジデント

研究者番号：20725452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、aneuploidyによるがん化・老化への影響を明らかにすること、および、発癌モデルマウスの開発である。aneuploidyのがん化・老化への影響に関しては、細胞質分裂障害型のマウスでは、染色体異数性はがん化でなく老化に進み、癌の障壁になっている可能性がある。発癌モデルマウスの開発に関しては、中間径フィラメントの1つで筋肉細胞に高発現するデスミンの分裂期特異的にリン酸化する部位に変異を導入し、aneuploidyを示すと予期されるマウスの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is the clarification of the cell fate of aneuploid cells and the development of a new cancer mouse model. We reported previously that the vimentin mutant mice display tetraploidy or aneuploidy resulting from cytokinetic failure and lens cataract. The fate of tetraploid cells remains largely unknown. We analyze the ability to repair wounds in the skin of the mutant mice. Early into wound healing, subcutaneous fibroblasts appeared binucleate tetraploid cells. Disappearance of tetraploidy coincided with an increase in aneuploidy. Thereafter, senescence-related markers were significantly elevated in mutant mice. our data suggest that following cytokinetic failure, a subset of tetraploid cells enters a new cell cycle and develops into aneuploid cells in vivo, which promote premature aging. We produced a new model mouse that displays cytokinesis failure induced aneuploidy in cells expressing desmin protein.

研究分野：腫瘍学

キーワード：染色体異数性

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部扁平上皮癌において、p53 遺伝子の変異が最も頻度が高いが (Stransky, Science, 2011; 26:333(6046):1157-60)、近年、Notch1、Fbxw7 (Notch1 の E3 コピキチン化酵素) 遺伝子において 10% 以上の頭頸部癌で変異を認めると報告がある (Agrawal, Science, 2011; 333(6046):1154-7)。申請者は、2004.4~2011.4 の間、血液腫瘍発症マウスの研究に携わり、T 細胞急性リンパ性白血病 (T-cell acute lymphoblastic leukemia, T-ALL) における Notch1 点変異と染色体異数性 (染色体数の異常; Aneuploidy) (Wang, Blood, 2008, 1;111(5):2878-86)、慢性骨髄性白血病 (Chronic myelogenous leukemia; CML) 発症前の造血前駆細胞における Fbxw7 異常亢進と恒常的ゲノムストレスが、白血病発症と白血病細胞の Aneuploidy に関与していることを明らかにしてきた (Tanaka, Cancer Sci, 2011; 102(4):784-91)。しかしながら、口腔癌における、Notch1, Fbxw7 に関する個体レベルの解析はあまり進んでいない。

また、申請者は、最近、分裂期リン酸化部位 (すべて Ser 残基) を Ala に置換した (SA) ビメンチンノックインマウスを作製し、その表現型を検討した。その結果、(ビメンチンが高発現している) レンズ組織において、変異マウス特異的に多核細胞形成ならびに Aneuploidy が認められ、白内障が観察された (右写真)。さらに、変異マウスのレンズで DNA 損傷反応に関連した老化マーカーの特異的な上昇を認めた。これらの結果は細胞質分裂異常による Aneuploidy と老化の因果関係を強く示唆するといえる (Matsuyama, J Biol Chem, 2013; 288(50):35626-35)。

このように、ゲノム・染色体の不安定性は、癌のみならず、老化、自己免疫疾患、アルツハイマー病など神経変性疾患にも関与している。そこで、申請者はゲノム・染色体の不安定性と発がんの観点から、新規口腔癌自然発症モデルマウスの開発と Aneuploidy を呈するマウスの癌化への影響を検討することを目的とする。

## 2. 研究の目的

### (1) 新規発癌モデルマウスの開発の試み

口腔癌に関してこれまでに多くのヒト検体や腫瘍細胞株を用い、遺伝子変異、microRNA 異常といった遺伝子要因や DNA のメチル化などエピジェネチクスの解析が精力的に行われ、腫瘍発生・転移・浸潤に関与する可能性がある遺伝子の異常、メチル化異常が報告されてきた。しかしながら、それらの異常を実験動物を用いて実証する研究はあまり進んでいない。これまでに、Smad4 遺伝子破壊マウス、K-RasG12D トランスジェニックマウス (Bornstein, J Clin Invest, 2009; 119(11):3408-19) などが頭頸部癌自然発症マウスとして報告されているが、肝癌、大腸癌、

乳癌など他の腫瘍と比べはるかにモデルマウスが少ない。

本研究目的は、これまでに報告された口腔癌発症に関する遺伝子変異の研究から、重要であると考えられる遺伝子を選び、遺伝子改変により発癌モデルマウスを作出し、癌責任遺伝子産物を標的とした特異的癌療法の前臨床研究や口腔癌に対する分子治療学的技術開発の基盤研究に寄与することを目的としている。

染色体不安定と発癌を考えた際、Aneuploidy が生じる原因として染色体分離に関与する遺伝子の変異・欠失がおきていると容易に想像できるが、実際の報告はほとんどなく、逆にこれらの蛋白質は多くの癌で増加している。それゆえ、申請者は、直接染色体分離に関係しないが、染色体異常に影響を与えると考えられる Notch1-Fbxw7 シグナル経路に注目する。

(2) 染色体異数性による癌化、老化への影響  
多くの癌細胞では Aneuploidy が認められる。また、癌細胞では、染色体の均等分配機構が障害されていることが多く、Aneuploidy そのものが発癌段階の一つと考える研究者もいる。また、染色体の不均等分配が癌遺伝子の増幅、癌抑制遺伝子の欠落を引き起こす要因になりうるので、少なくとも、Aneuploidy が癌の悪性化に寄与しているのではと考える研究者は多い。

しかし、Aneuploidy そのものが癌化に関与する概念に疑問を挟む研究者は少なくない。正常組織においても、脳、肝臓の細胞の一部や胎盤、巨核球 (megakaryocytes) では Aneuploidy が引き起こされており、Aneuploidy が分化細胞のある種の機能を発揮するのに重要である可能性が想定されている。また、Aneuploidy が癌よりも老化と関連しているという報告がある。紡錘体形成チェックポイント因子である BubR1 の hypomorphic 変異マウスにおいて、Aneuploidy が広く認められるが、癌が発生しやすくなる表現型は認められない。むしろ、寿命の短縮、早老による成長障害、脊椎湾曲、白内障、皮下脂肪の減少、損傷治癒の遅延などの早老症に伴う表現型が認められる (Baker, Nat Genet, 2004; 36(7):744-9)。つまり、Aneuploidy は癌化、老化、分化にそれぞれ関与する可能性はあるが、その詳細は不明な点が多い。

## 3. 研究の方法

### (1) Aneuploidy を呈するマウスの癌化への影響

ビメンチンノックインマウスの早老症の表現型は、主に、ビメンチンの発現レベルが高いレンズ組織でしか認められない。しかし、皮膚に損傷を与えたり、薬剤を投与したりすると、反応性に皮下の線維芽細胞ビメンチンの発現量が上昇し、損傷治癒の遅延 (早老症

の表現型の一つ)などの表現型が認められるという実験結果を既に得ている。この実験結果に基づき、ビメンチンノックインマウスに発癌物質を皮下に投与し、線維肉腫の発生にビメンチン変異による Aneuploidy が及ぼす影響を検討する。

(2) 新規癌自然発症モデル動物の開発  
標的遺伝子に変異を入れたマウスの作製および解析

(a) ターゲティング・ベクターの作製

マウスの Bacterial Artificial Chromosome (BAC)クローンを購入し、Notch1 の変異とゲノム相同領域を薬剤耐性遺伝子の両側に挿入したターゲティング・ベクターを作製する。また、ランダムインテグレーションの確率を減らすため、相同領域の外に DTpA 遺伝子も挿入しておく。

(b) 遺伝子組換えマウス ES 細胞クローンの確立

ターゲティングベクターをマウス ES 細胞に電気穿孔法を用いて導入する。その後、相同組換えが引き起こされたクローンを薬剤選択する。得られたコロニーのうち、目的の相同組換えが起こったものを PCR 法およびサザンブロット法で確認する。

(c) ノックインマウスの作製

上記でできた組換え ES 細胞をマウス C57BL6/c の受精卵にマイクロインジェクションする。その後、キメラマウスが誕生してきたら、C57BL6/c のメスと交配させ、ES 細胞由来の遺伝子情報が入ったマウスを選択する。その後、PCR 法およびサザンブロット法を用いてヘテロマウスであることを確認するとともに、目的の変異がゲノム上で引き起こされているかについてもシーケンスすることで確認する。このようにして作製したヘテロマウス同士を交配させることで、ノックインマウスを作製する。

#### 4. 研究成果

Aneuploidy を生じるマウスであるビメンチンノックインマウスを用いて 3-メチルコラントレインの皮下投与による化学発癌試験を行うと野生型に比べ腫瘍の発症が遅延した。この結果は、Aneuploidy による細胞老化が癌発症の障壁になっている可能性を示唆している。今後、癌治療において Aneuploidy-induced Senescence を応用した治療の開発が期待される可能性がある。

新規口腔癌モデルマウスの作製に関しては、Fbw7/Notch1 シグナルに関する遺伝子ではないが、細胞質分裂障害を引き起こすタイプの変異を導入した新規マウスの作製に成功した。本マウスは、筋肉細胞を中心としたデスミンを発現する細胞で Aneuploidy が生じることが予想され、Aneuploidy が、がん化に進むのか、老化を引き起こすのかを証明する有用なツールになり得ると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

1. Goto, H., Tanaka, H., Kasahara, K., and Inagaki, M. (2016) Phospho-specific antibody probes of intermediate filament (IF) proteins. *Methods in Enzymology*, 568, 85-111 (査読有り)
2. Tanaka, H., Goto, H., Inoko, A., Makihara, H., Enomoto, A., Horimoto, K., Matsuyama, M., Kurita, K., Izawa, I., and Inagaki, M. (2015) Cytokinetic failure-induced tetraploidy develops into aneuploidy, triggering skin aging in phospho-vimentin deficient mice. *The Journal of biological chemistry* 290, 12984-12998 (査読有り)
3. 後藤英仁, 田中宏樹, 稲垣昌樹 (2015) 染色体不安定性とがん化・分化・老化 The impact of chromosomal instability (CIN) on carcinogenesis, differentiation, or aging. 月刊細胞, 47 (5) 223-226 (査読有り)

[学会発表](計3件)

田中宏樹, ほか: Vimentin phospho-deficient mice display aneuploidy and skin premature aging, 第73回日本癌学会、2015.10.01,名古屋国際会場(愛知県・名古屋市)

田中宏樹, ほか: Defect of Vimentin Phosphorylation Cause Aging via Aneuploidy and Cellular Senescence. 第72回日本癌学会、2014.10.01,パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

田中宏樹, et.al.: "Phosphorylation-deficient mutant mice develop premature aging via aneuploidy and cellular senescence." The 13<sup>th</sup> Gordon Research Conference on Intermediate Filaments, 2014.6.22, West Dover, USA

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 宏樹 (TANAKA, Hiroki)

愛知県がんセンター (研究所)・腫瘍医化学部・リサーチレジデント

研究者番号：20725452