

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

分担研究報告書

悪性中皮腫の細胞周期・細胞極性の異常の解析と阻害薬の検討

研究分担者 稲垣 昌樹 愛知県がんセンター研究所 発がん制御研究部 部長

研究要旨： 中皮腫細胞の増殖抑制を目指す目的で、新たな細胞増殖・分化制御の仕組みを明らかにし、その阻害あるいは誘導による効果を検討してきた。なかでも一次線毛形成と細胞周期進行が共に中心体を核としつつも逆相関して起こることは長年分子機構が不明であったが、分担者らの報告はその仕組みを示し、全く新しい細胞増殖・分化制御機構を提示した。すなわち、正常二倍体細胞では一次線毛形成の誘導がトリコプレイン蛋白質あるいはオーロラ A 分裂期キナーゼの機能抑制（RNA 干渉法）により起こることを見出した。しかもこの線毛は細胞増殖休止も導いた。これをがん細胞に応用したところ、がん細胞でのオーロラ A の機能抑制は一次線毛形成を誘導せず、むしろ分裂障害によりがん特異的な傷害を導くことを見出した。このオーロラ A 抑制による効果の差は、多くのがん細胞には一次線毛形成能が無いという細胞特性の差に注目して証明されたものであり、合理的ながん細胞特異的傷害の仕組みの新発見といえる。また、中心体情報を元に出した遺伝子のノックダウンスクリーニングにより、同様の蛋白質、すなわち増殖条件下でも一次線毛形成と細胞周期休止を導く蛋白質を新たに10個ほど見出した。同時に、この結果を追試するための正常中皮のモデル細胞として、hTERT で不死化した正常中皮細胞 LP9/TERT-1 に一次線毛形成能があり、この実験目的に適することを確認した。今後これを対照に、このがん細胞特異的傷害作用の中皮腫細胞での有効性を検討する。同時に複数見出した正常細胞で類似の作用を示す蛋白質についても解析を進める。

A. 研究目的

分担者らは中皮腫細胞の増殖抑制を目指す目的で、新たな細胞増殖・分化制御の仕組みを明らかにし、その阻害あるいは誘導による効果を検討してきた。特に、長年分子機構が不明であった正常二倍体細胞における一次線毛形成と細胞周期進行の逆相関に注目してきた。この逆相関は、共に中心体を核とする現象ではあるが、一次線毛が細胞膜上に

形成されるのに対し、細胞周期進行が細胞内での紡錘体形成を必要とする要求性の差から生じる。分担者らは、トリコプレイン蛋白質およびオーロラ A 分裂期キナーゼの中心体局在がこの逆相関のスイッチとなる可能性を見出したため、詳細な解析による証明とそのがん細胞傷害への応用を試みた。また正常中皮のモデルとなる細胞を一次線毛形成能に注目して検索した。

B. 研究方法

基本的な細胞生物学の手法を用いたが、特記事項を以下に記した。

1. 中心体での蛋白質局在解析

それぞれに特異的な抗体を作成し、マーカー分子と共に組織染色、細胞染色を行いその局在を高解像度顕微鏡（デルタビジョン）により確認した。また、分画を調整しそのイムノプロットを行うことで生化学的にも局在を検討した。一次線毛形成は血清飢餓により誘導した。

2. 分子間結合実験

イーストハイブリッド法、免疫沈降法、リコンビナント精製蛋白質による *in vitro* 結合実験を適宜行った。

3. オーロラ A キナーゼアッセイ

HeLa 細胞を用い、トリコプレインとオーロラ A の共発現によるオーロラ A リン酸化（pT288）の変化を検討した。また *in vitro* のキナーゼ活性変化はトリコプレインとオーロラ-A のリコンビナント精製蛋白質を混合し、ヒストン H3 を基質にすることで検討した。

4. トリコプレイン・オーロラ A の中心体機能の解析

RNA 干渉法による機能抑制実験、すなわちノックダウンを RPE1 細胞（hTERT 不死化網膜色素上皮細胞、正常二倍体）あるいは HeLa 細胞（子宮頸癌細胞）に対して行い、その発現を減弱させた。その状態において免疫染色により解析必要な分子の検討をした。トリコプレイン機能欠失による一次線毛形成については主に RPE1 細胞で検討した。表現型の確認のためには適宜遺伝子を再導入しレス

キューを試みた。

5. 細胞周期制御機構の検討

RPE1 細胞では一次線毛形成と細胞周期休止は同時に起こることが知られている。そこで一次線毛の細胞周期への直接影響の有無をみるために、一次線毛を生じない系を IFT20 蛋白質のノックダウンにより追加確立した。これにトリコプレインあるいはオーロラ A の siRNA を組み合わせ、各種細胞周期マーカーの変化を検討した。同様の実験を HeLa 細胞でも行った。

6. トリコプレイン変異体解析

分子内ドメイン解析のため、トリコプレインの断片を蛋白質および発現ベクターとして作製し、上述の実験系で適宜使用した。

（倫理面への配慮）

遺伝子組み換え実験に関しては愛知県がんセンター遺伝子組み換え実験等安全委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1. 一次線毛形成と細胞周期進行が逆相関する仕組みの解析と応用

1-1 トリコプレイン・オーロラ A キナーゼによる一次線毛形成抑制機能

一次線毛形成との関連については以下のような結果を得た。血清飢餓による増殖停止で一次線毛が形成されると RPE1 細胞ではトリコプレインの母中心小体での局在が減弱した。同状態でトリコプレインを強制発現すると、一次線毛形成が抑えられた。そこで増殖状態でトリコプレインノックダウンを行ったところ、一次線毛形成が見られた。同時に細胞周期の休止を認めた。この時オーロラ

Aキナーゼの活性化の指標であるT288のリン酸化は免疫染色およびイムノプロットで減弱した。この一次線毛形成はオーロラ-A ノックダウンでも見られた。さらに、トリコプレインとオーロラ A キナーゼの直接結合を *in vitro* で確認し、*in vitro* キナーゼアッセイではトリコプレインがオーロラ A キナーゼを直接活性化することが明らかになった。トリコプレインの分子内解析としては、オーロラ A キナーゼ活性化かつ中心体局在・機能に必要な最小単位が、1-130 アミノ酸残基であることを確認した。特に 52 番目のアラニンと 54 番目のトリプトファンがオーロラ A キナーゼの活性化に重要であった。以上のことから、中心体でトリコプレインがオーロラ A キナーゼを活性化すると一次線毛形成が抑制されると考えられる。

1-2 一次線毛形成抑制と細胞周期制御との関与

細胞周期進行中は一次線毛形成が抑えられることは知られているが、そのメカニズムは今まで不明であった。トリコプレイン機能抑制は細胞周期の休止を起こしたが、一次線毛を除去した系ではそれが見られなくなった。このことは増殖マーカーすなわち Cyclin A の発現、BrdU の取り込み、FACS での S, G2/M 期の存在により確認した。つまり、トリコプレインは一次線毛形成を抑制することで円滑な G1 期細胞周期進行に寄与していると考えられる。まとめると、この成果の特徴はオーロラ A 分裂期キナーゼの活性化が実は G1 期の中心体でトリコプレインによって起こるということと、もう一つは正常二倍体細胞でこの系を抑制すると一次線毛が形成され

細胞周期進行が止まるという新発見にある。

1-3 オーロラ A キナーゼ阻害によるがん細胞特異的傷害

がん細胞は一次線毛形成能を失っているということが知られている。同時にオーロラ A 分裂期キナーゼはがん細胞で要求性の高い酵素でもある。そこで、がん細胞である HeLa 細胞でオーロラ A をノックダウンしたところ、正常二倍体細胞のような一次線毛形成も細胞周期休止も起こらず、分裂障害により死滅した。

2. 類似機能蛋白質の検索

中心体情報を元に選出した遺伝子のノックダウンスクリーニングを RPE1 細胞で行うことにより、同様の蛋白質、すなわち増殖条件下でも一次線毛形成と細胞周期休止を導く蛋白質を新たに 10 個ほど見出した。

3. 正常中皮モデル細胞の検索

悪性中皮腫の細胞株は研究代表者らにより確立されていたが、対照株として一次線毛形成能を持つ正常中皮を入手する必要があった。そこで論文報告を元に、遺伝子変異の無い正常中皮細胞として、LP9/TERT1 細胞を見出した。これは通常培養ではほとんど一次線毛を生じ長いが、血清飢餓下に置いたところ過半数の細胞に一次線毛を形成することができた。

D. 考察

トリコプレイン・オーロラ A の中心体機能の解析により、一次線毛形成抑制による細胞周期制御仕組みが新たに示せた。G1 期におけ

る一次線毛形成の負の制御がオーロラ A を介していることは、この報告も含め近年注目を増やしている。特に今回がん細胞に一次線毛形成能が無いことに着目し、オーロラ A 阻害によるがん細胞特異的傷害効果を狙った試みは画期的と言える。同時に、生体内での線毛制御はより複雑であることが想定されるが、類似機能蛋白質の同定によりその補強が可能となった。また、一次線毛形成の誘導可能な正常中皮のモデル細胞を得たことで、オーロラ A 阻害効果の中皮での応用検討が可能になった。

E. 結論

一次線毛形成能の差によるオーロラ A 阻害のがん細胞特異的傷害効果を中皮で検討する準備が整った。また、類似機能蛋白質の同定により標的分子の幅が広がった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohmuro-Matsuyama Y., Inagaki M., Ueda H. Detection of Protein Phosphorylation by Open-Sandwich Immunoassay. Integrative Proteomics. ed. Leung, H.-C.E. InTech, 197-214, 2012 (ISBN 978-953-51-0070-6)
2. Inoko A., Matsuyama M., Goto H., Ohmuro-Matsuyama Y., Hayashi Y., Enomoto M., Ibi M., Urano T., Yonemura S., Kiyono T., Izawa I., Inagaki M. Trichoplein and Aurora A block aberrant primary cilia assembly in proliferating cells. J Cell Biol, 197: 391-405, 2012

3. Li P., Goto H., Kasahara K., Matsuyama M., Wang Z., Yatabe Y., Kiyono T., Inagaki M. P90 RSK arranges Chk1 in the nucleus for monitoring of genomic integrity during cell proliferation. Mol Biol Cell, 23: 1582-92, 2012
4. Goto H., Izawa I., Li P., Inagaki M. Novel regulation of checkpoint kinase 1: Is checkpoint kinase 1 a good candidate for anti-cancer therapy? Cancer Sci. 103: 1195-200, 2012
5. Toda M., Kuo C.H., Borman S.K., Richardson R.M., Inoko A., Inagaki M., Collins A., Schneider K., Ono S.J. Evidence that formation of Vimentin/Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) complex mediates mast cell activation following Fc{epsilon}RI/CC chemokine receptor 1 cross-talk. J Biol Chem, 287: 24516-24, 2012
6. Jeong H.J., Ohmuro-Matsuyama Y., Ohashi H., Ohsawa F., Tatsu Y., Inagaki M., Ueda H. Detection of vimentin serine phosphorylation by multicolor Quenchbodies. Biosens Bioelectron, 40: 17-23, 2013
7. Goto H., Inoko A., Inagaki M. Cell cycle progression by the repression of primary cilia formation in proliferating cells. Cellular and Molecular Life Sciences. in press.
8. Kasahara K., Goto H., Izawa I., Kiyono T., Watanabe N., Elowe S., Nigg E.A., Inagaki M. PI 3-kinase-dependent

phosphorylation of PIK1-Ser99 promotes its association with 14-3-3 γ and is required for metaphase-anaphase transition. Nat Commun. in press.

1. 学会発表

1. Goto H., Li P., Kasahara K., Matsuyama M., Wang Z., Yatabe Y., Kiyono T., Inagaki M. P90 RSK arranges Chk1 in the nucleus for monitoring of genomic integrity during cell proliferation. 第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会, 2012, (神戸), [ワークショップ]
2. Goto H., Li P., Kasahara K., Matsuyama M., Wang Z., Yatabe Y., Kiyono T., Inagaki M. P90 RSK arranges Chk1 in the nucleus for monitoring of genomic integrity during cell proliferation. 第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会, 2012, (神戸), [ポスター]
3. Inoko A., Matsuyama M., Goto H., Ohmuro-Matsuyama Y., Hayashi Y., Enomoto M., Ibi M., Urano T., Yonemura S., Kiyono T., Izawa I., Inagaki M. Trichoplein and Aurora A block aberrant primary cilia assembly in proliferating cells. 第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会, 2012, (神戸), [ポスター]
4. Kasahara K., Goto H., Izawa I., Watanabe N., Kiyono T., Inagaki M. PI3K-Akt pathway controls Polo-like kinase 1 (Plk1). 第 45 回日本発生生物

学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会, 2012, (神戸), [ワークショップ]

5. Kasahara K., Goto H., Izawa I., Watanabe N., Kiyono T., Inagaki M. PI3K-Akt pathway controls Polo-like kinase 1 (Plk1). 第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会, 2012, (神戸), [ポスター]
6. Tanaka H., Matsuyama M., Inoko A., Kondo E., Kobori K., Hayashi Y., Itohara S., Izawa I., Inagaki M. Disorder of cytokinesis by defect of mitotic vimentin phosphorylation results in chromosomal instability. The 12th biennial Gordon Conference on Intermediate Filaments, 2012, (Lewiston, ME), [ワークショップ]
7. Tanaka H., Matsuyama M., Inoko A., Kondo E., Kobori K., Hayashi Y., Itohara S., Izawa I., Inagaki M. Disorder of cytokinesis by defect of mitotic vimentin phosphorylation results in chromosomal instability. The 12th biennial Gordon Conference on Intermediate Filaments, 2012, (Lewiston, ME), [ポスター]
8. Inoko A., Matsuyama M., Goto H., Ohmuro-Matsuyama Y., Hayash Y., Enomoto M., Ibi M., Urano T., Yonemura S., Kiyono T., Izawa I., Inagaki M. Trichoplein and Aurora A block aberrant primary cilia assembly in proliferating cells. The 12th biennial Gordon Conference on Intermediate Filaments, 2012, (Lewiston, ME), [ポ

- スター]
9. Izawa I., Hayashi Y., Inagaki M. LAP family protein Scribble interacts with Multidrug Resistance Protein 4 (MRP4/ABCC4). 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, (札幌), [ポスター]
 10. Kasahara K., Goto H., Izawa I., Watanabe N., Kiyono T., Inagaki M. The PI3K-Akt pathway controls mitotic progression through Plk1. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, (札幌), [ポスター]
 11. Inagaki M. Intermediate filaments and site- and phosphorylation state-specific antibodies. Lecture at the University of Gothenburg, 2012, (Gothenburg), [招請講演]
 12. Kasahara K., Inagaki M. Novel mitotic signaling crosstalk between PI3K-Akt pathway and Plk1. Seminar for Center for Brain Repair and Rehabilitation, 2012, (Gothenburg), [セミナー]
 13. Inagaki M., Goto H. Novel regulation of checkpoint kinase 1 (Chk1): Is Chk1 a good candidate for anti-cancer therapy? Mini-Symposium on “Stress Signals & Responses”, Abo Akademi University Center of Excellence “Cell stress and Molecular Aging”, 2012, (Turku), [シンポジウム]
 14. Kasahara K., Inagaki M. Complex formation between Plk1 and 14-3-3 gamma is essential for metaphase to anaphase transition. Mini-Symposium on “Stress Signals & Responses”, Abo Akademi University Center of Excellence “Cell stress and Molecular Aging”, 2012, (Turku), [シンポジウム]
 15. Inagaki M. Pathophysiological roles of intermediate filaments and intermediate filament phosphorylation. Molecular concepts in epithelial differentiation, pathogenesis and repair. International Meeting of the German Society for Cell Biology, 2012, (Leipzig), [シンポジウム]
 16. Inagaki M. Intermediate filaments and site- and phosphorylation state-specific antibodies. Global COE the 4th International Symposium, 2012, (Nagoya), [シンポジウム]
 17. Tanaka H., Matsuyama M., Inoko A., Kondo E., Kobori K., Hayashi Y., Itohara S., Izawa I., Inagaki M. Disorder of cytokinesis by defect of mitotic vimentin phosphorylation results in chromosomal instability. Global COE the 4th International Symposium, 2012, (Nagoya), [ポスター]
 18. Goto H., Kasahara K., Izawa I., Kiyono T., Watanabe N., Elowe S., Nigg E.A., Inagaki M. Novel mitotic signalling crosstalk between PI3K-Akt pathway and Plk1. the 52nd Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2012, (San Francisco), [ポスター]

(予定を含む。)

なし。