

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：本年度は、中皮腫特異的な傷害にも応用が期待し得る新規標的分子の同定を中心体（centrosome）の機能に関わる蛋白質に注目して解析を進めた。これまでに研究分担者は、一次線毛形成が正常二倍体細胞の細胞増殖を休止させることをトリコプレイン蛋白質の機能解析から見出してきた。その応用として、Aurora-A 分裂期キナーゼ阻害では正常細胞は一次線毛を形成し細胞周期を休止させるが、一次線毛を形成しないとされるがん細胞は分裂障害により死滅すること、つまりがん細胞特異的な傷害効果のあることを見出した。また、正常中皮細胞にも一次線毛形成能があることを確認した。これらの結果を踏まえ、類似効果を示す標的分子をアミノ酸配列や siRNA 実験から探索し、さらに詳細な分子機能の解析をマーカー分子などで行った結果、Albatross が中心小体（centriole）の付属物に局在するだけでなく中心体の正常な複製を保証することで、細胞周期進行に寄与することを見出した。また、トリコプレイン類縁蛋白質である Ndel1 にも正常二倍体細胞の一次線毛形成抑制機能があることを見出した。この独自の視点により、一次線毛形成や中心体複製制御に関わる複数の中心体蛋白質が、がん治療標的分子となる可能性を新たに見出した。

A. 研究目的

研究分担者はがん細胞に対する新たな治療戦略を開発する目的で、細胞の増殖・分化制御の本態を明らかにし、それらに関わる分子の阻害あるいは誘導実験による細胞増殖に対する効果を検討してきた。その一つとして、細胞の一次線毛形成が正常二倍体細胞の細胞増殖を休止させることをトリコプレイン蛋白質の機能解析を通じて発見し、その応用としてオーロラ A 分裂期キナーゼを阻害すると、正常細胞は一次線毛を形成し細胞周期を休止させるが、一次線毛を形成しないとされるがん細胞は分裂障害により死滅する、

つまりがん細胞特異的な傷害効果が生じることを見出してきた。昨年度、正常中皮細胞にも一次線毛形成能があることを確認し、この阻害効果が悪性中皮腫の傷害にも応用できる可能性を見出した。

本年度はこれらの結果を踏まえ、類似効果を示す新規標的分子の探索し、見出した新規分子に対し詳細な分子機能の解析を行い、その分子特性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 類似機能蛋白質の検索

トリコプレイン類似配列を元に遺伝子を

選出し、そのノックダウンによる機能的スクリーニングを RPE1 細胞( hTERT 不死化網膜色素上皮細胞、正常二倍体 )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含む中心体機能蛋白質を新たに 10 個ほど見出した。

## 2 . 中心体での蛋白質局在解析

特異抗体を作成し、マーカー分子と共に組織染色、細胞染色を行い細胞内局在を高解像度顕微鏡により確認した。一次線毛形成は血清飢餓により誘導した。

## 3 . 中心体機能の解析

RNA 干渉法によるノックダウンを RPE1 細胞に対して行い、各種遺伝子発現を減弱させた。その状態において免疫染色によりマーカー分子の変化を検討した。また、表現型の確認のために適宜遺伝子を再導入しレスキューを試みた。

## 4 . 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。

## 5 . 変異体解析

分子内ドメイン解析のため、分子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 . 新規中心体複製制御分子の同定

トリコブレインと類似配列を持つ Albatross 蛋白質に注目した。その特異的抗体の局在から Albatross の詳細な中心体 ( centrosome ) 内の局在が母中心小体 ( mother centriole ) の遠位端付属物に偏在することを明らかにした。また正常二倍体細胞を用いた Albatross siRNA を用いたノックダウン実験では中心体複製が障害され、同時に細胞周期が休止した。これらの結果から、Albatross が中心小体付属物に局在するだけでなく中心体の正常な複製を保證することで、細胞周期進行に寄与する全く新しいタイプの細胞周期制御因子である可能性が示唆された。

### 2 . 新規一次線毛形成抑制分子の同定

トリコブレインと類似配列を持つ Nde11 に注目した。その特異抗体を用いた解析から Nde11 の中心体における局在が母中心小体の subdistal appendage に偏在することを明らかにした。正常二倍体細胞における Nde11 siRNA を用いたノックダウン実験では増殖条件下でも一次線毛が形成され、同時に細胞周期が休止した。この増殖休止は、一次線毛の除去により解除された。すなわち、一次線毛依存的な細胞周期の休止が起きたことが明らかとなった。この Nde11 の特性はトリコブレイン・Aurora-A の阻害効果と同様であるが、中心体内の局在や分子間結合様式が異なっていたため、新たな標的分子となりうる可能性が示唆された。

## D. 考察

Albatross による中心体の複製制御を介し

た新たな細胞周期制御機構の解明は、中心体機能に着目したがん分子治療戦略を構築する上で、新たな可能性を開くものと考えられた。また、Ndel1 の阻害結果からは一次線毛に注目した腫瘍増殖障害を新たな視点から導き得る可能性が考えられた。このように、がん細胞に一次線毛形成能が無い点や、細胞分裂・増殖における中心体の複製の重要性に着目することは、がん細胞に対する特異的な治療戦略を開発する上で、極めて高い独創性をもつものと考えられた。

#### E. 結論

中心体の複製機能に関わる分子および一次線毛形成との関わりの詳細の一端が明らかとなった。これらの分子の阻害による腫瘍特異的傷害効果を検討すると共に、一次線毛形成の誘導可能な正常中皮細胞、さらには悪性中皮腫細胞を用いた検討が、今後、中皮腫に対する新たな治療戦略を開発する上で、極めて重要であると思われた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Odaka C, Loranger A, Takizawa K, Ouellet M, Tremblay MJ, Murata S, Inoko A, Inagaki M, Marceau N: Keratin 8 Is Required for the Maintenance of Architectural Structure in Thymus Epithelium. PLoS ONE 8: e75101, 2013.
2. Neise D, Sohn D, Stefanski A, Goto H, Inagaki M, Wesselborg S, Budach W, Stühler K, Jänicke RU. The p90 ribosomal S6 kinase (RSK) inhibitor

BI-D1870 prevents gamma irradiation-induced apoptosis and mediates senescence via RSK- and p53-independent accumulation of p21WAF1/CIP1. Cell Death and Dis, 4: e859, 2013.

3. Matsuyama M, Tanaka H, Inoko A, Goto H, Yonemura S, Kobori K, Hayashi Y, Kondo E, Itohara S, Izawa I, Inagaki M: Defect of mitotic vimentin phosphorylation causes microphthalmia and cataract via aneuploidy and senescence in lens epithelial cells. J Biol Chem, 288: 35626-35635, 2013.
4. Ikawa K, Satou A, Fukuhara M, Matsumura S, Sugiyama N, Goto H, Fukuda M, Inagaki M, Ishihama Y, Toyoshima F: Inhibition of endocytic vesicle fusion by PIK1-mediated phosphorylation of vimentin during mitosis. Cell Cycle, 131: 126-137, 2014.
5. Kakeno M, Matsuzawa K, Matsui T, Akita H, Sugiyama I, Ishidate F, Nakano A, Takashima S, Goto H, Inagaki M, Kaibuchi K, Watanabe T: PIK1 phosphorylates CLIP-170 and regulates its binding to microtubules for chromosome alignment. Cell Struc Func, 39: 45-59, 2014.
6. Goto H, Inagaki M: New Insights into Roles of Intermediate Filament (IF) Phosphorylation and Progeria Pathogenesis. IUBMB Life, in press.

## 2. 学会発表

1. Goto H, Inagaki M: Screening of novel Aurora-A-associated proteins to prevent primary cilia assembly at the centrosome in proliferating cells. 第 65 回日本細胞生物学会大会, 2013, (名古屋) [シンポジウム]
2. Inoko A, Inagaki M: Translocation of keratin-binding proteins between the cell-cell adhesion and the centrosome as the functional switch of differentiation and proliferation. 第 65 回日本細胞生物学会大会, 2013, (名古屋) [シンポジウム]
3. Kasahara K, Kawakami Y, Kawamura Y, Ibi M, Goshima N, Inagaki M: Emerging role of the ubiquitin- proteasome system in assembly of primary cilium. 第 65 回日本細胞生物学会大会, 2013, (名古屋) [ポスター]
4. 田中宏樹, 猪子誠人, 松山誠, 井澤一郎, 稲垣昌樹: 細胞質分裂障害は染色体不安定性の亢進および細胞老化を誘導する. 第 65 回日本細胞生物学会大会, 2013, (名古屋) [シンポジウム]
5. Li P, Goto H, Kasahara K, Inoko A, Izawa I, Mochizuki H, Togashi T, Kawamura Y, Kawakami Y, Goshima N, Kiyono K, Inagaki M: Screening of novel Aurora-A-associated proteins to prevent primary cilia assembly at the centrosome in proliferating cells. 第 65 回日本細胞生物学会大会, 2013, (名古屋) [ポスター]
6. Goto H, Era S, Li P, Kasahara K, Inoko A, Ichiro I, Mochizuki H, Togashi T, Kawamura Y, Kawakami Y, Goshima N, Kiyono T, Inagaki M: Screening of novel Aurora-A-associated proteins. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013, (横浜) [ポスター]
7. Kasahara K, Kawakami Y, Kawamura Y, Ibi M, Kiyono T, Goshima N, Matsuzaki F, Inagaki M: A Cul3-based ubiquitin E3 ligase controls primary cilia assembly through degradation of Trichoplein. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013, (横浜) [ポスター]
8. 後藤英仁, 渡辺信元, 猪子誠人, 稲垣昌樹: がんの分子標的としての Aurora A キナーゼ. 第 87 回日本薬理学会年会, 2014, (仙台) [口演]

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。