

2013/3048B

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

悪性中皮腫の増殖、分化に係る細胞特性
に基づく新規治療法の開発

平成24年度~25年度 総合研究報告書

研究代表者 関 戸 好 孝

平成26(2014)年 5月

目 次

I. 総合研究報告書

悪性中皮腫の増殖、分化に係る細胞特性に基づく新規治療法の開発

研究代表者 関戸好孝 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 25

I. 総合研究報告書

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）
総合研究報告書

悪性中皮腫の増殖、分化に係る細胞特性に基づく新規治療法の開発

研究代表者 関戸好孝 愛知県がんセンター研究所 副所長兼分子腫瘍学部部长

研究要旨：悪性中皮腫に対する有効な抗がん剤や分子標的薬は未だ存在せず、また、診断時には進行した病期で発見されるため患者予後は極めて不良である。悪性中皮腫は CDKN2A、NF2、BAP1 の3つの腫瘍抑制遺伝子の高頻度変異が明らかになっているが、既存の分子標的治療剤の標的となりうる活性型がん遺伝子変異に乏しく、新たな分子標的治療剤の開発は極めて遅れている。悪性中皮腫において NF2 遺伝子の不活性化等により NF2（マーリン）-Hippo 細胞内増殖抑制シグナル伝達系は特徴的かつ高頻度に不活性化しており、その結果、転写コアクチベーターである YAP ががん遺伝子産物の恒常的な活性化が引き起こされ、細胞の増殖や浸潤に関わる遺伝子群の転写が亢進している。

本研究では NF2（マーリン）-Hippo 細胞内増殖抑制シグナル伝達系について解析し、その本態解明により新規の分子標的治療戦略を構築することを第一の目的として検討を進めた。Hippo シグナル伝達系の制御に係わることが最近報告された複数の分子を詳細に検討したところ、LIM ドメイン蛋白である Ajuba が悪性中皮腫細胞株 24 細胞株中 21 細胞株で発現レベルが低下していた。Ajuba 遺伝子を中皮腫細胞株にトランスフェクションしたところ、中皮腫の細胞増殖が抑制され、Ajuba が中皮腫細胞において腫瘍抑制性に機能することが明らかとなった。さらに、YAP1 をリン酸化して不活性化する LATS2（Hippo シグナル伝達系の因子）をノックダウンしたところ、Ajuba による腫瘍抑制機能が減弱し、Ajuba の細胞増殖抑制効果は LATS2 キナーゼ依存性であることが明らかになった。このように、中皮腫細胞における YAP の恒常的な活性化には NF2 遺伝子変異、LATS2 遺伝子変異の他に Ajuba 分子の発現低下が大きく関与している可能性が示唆された。

さらに、Ajuba ファミリーの他の2つのメンバーである LIMD1 および WTIP1 に関して検討を進めた。Ajuba および LIMD1、WTIP1 をそれぞれ RNA 干渉法にてノックダウンして YAP の活性化状態（リン酸化レベル）を検討したところ、Ajuba のノックダウンは YAP を活性化（低リン酸化）する一方、LIMD1 あるいは WTIP1 のノックダウンは YAP を不活性化（高リン酸化）することが明らかとなった。YAP によって直接、転写が亢進されるサイクリン D1（CCDN1）遺伝子および結合組織成長因子（CTGF）遺伝子の発現も Ajuba は転写亢進、LIMD1 および WTIP1 は転写抑制に働くことが明らかにされた。これらの結果は、Ajuba が悪性中皮腫細胞に対

して腫瘍抑制性に機能する一方、そのファミリー分子である LIMD1 および WTIP1 は逆に Ajuba 機能を抑制する方向に作用することを示唆した。

悪性中皮腫は臨床病理学的に 3 種類の主要な組織型(上皮型, 2 相型, 肉腫型)が存在し、肉腫型ほど悪性度が高い。しかし、この組織多様性の背景に存在すると考えられる中皮細胞の分化や上皮間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) などの制御メカニズムについてはほとんど明らかになっていない。この点を明らかにするために、まず正常中皮細胞の分化能について解析を行う目的で、不死化正常中皮細胞株の作成を試みた。初代中皮細胞にヒトパピローマウイルス (HPV) -E6, E7 および hTERT 遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて導入した結果、敷石状に増殖する上皮性の株から繊維芽細胞様の形態を示す株まで、すなわち、上皮型, 2 相型, 肉腫型を mimic する 3 株の不死化正常中皮細胞株 (パネル) を作成することに成功した。樹立した細胞株は Calretinin, Podoplanin, Mesothelin などの中皮細胞マーカーを中等度から高度に発現すると共に、正常サイズの NF2(マーリン)が発現するなど Hippo シグナル伝達経路はインタクトに保存されていた。これらの細胞株は、核型解析では少数の染色体異常は認めるものの、ヌードマウスでは造腫瘍能を認めなかった。

次に、これらの不死化正常中皮細胞株を用いて種々のサイトカイン刺激等により中皮細胞の上皮間葉移行 (EMT) について検討した。その結果、中間型中皮細胞株 D-4 株では TGF- β および IL1- β などのサイトカインの単独あるいは併用刺激により EMT を誘導可能であることが明らかとなった。一方、D-4 細胞株の結合組織成長因子 (CTGF) 発現を siRNA でノックダウンしたところ、低密度培養下においても細胞間接着性が増強し、敷石状の上皮細胞様配列の促進が認められた。このように、正常の不死化中皮細胞では TGF- β , IL1- β などの複数の炎症性サイトカインの協調作用により EMT が誘導されること、またこの EMT 誘導には TGF- β /CTGF 経路が関与し、この経路をブロックすることにより正常中皮の EMT の抑制のみならず、中皮腫細胞の肉腫型への悪性進展を抑制できる可能性が明らかとなった。

これらの不死化した正常中皮細胞株を用い、中皮腫で高頻度に検出される遺伝子の、細胞増殖能および造腫瘍能に対する役割を明らかにする目的で *in vitro*、*in vivo* の検討を進めた。その結果、不死化中皮細胞株 3 株に YAP1 がん遺伝子を導入することで *in vitro* にて細胞増殖の促進効果が認められることを明らかにした。さらに YAP1 遺伝子を導入した正常中皮細胞株をヌードマウスへ移植したところ、*in vivo* においても腫瘍を形成できることを確認した。このことは特定の遺伝子導入により悪性中皮腫モデルを作成できたことを意味するものと考えられた。次に、不死化正常中皮細胞株に YAP1 に代わり各種の細胞周期を促進する関連遺伝子 (CCDN1 等) の導入を行いその効果を検討した。しかし、YAP1 に比

べ、細胞周期関連遺伝子の単独の導入では不死化正常中皮細胞の増殖能・造腫瘍能の亢進には不十分であることが明らかとなった。また不死化していない初代培養中皮細胞に YAP1 遺伝子を単独で導入し、不死化するか否かを検討したが不死化を誘導することはできなかった。このように、E6/E7-hTERT と YAP1 が有する遺伝子機能が正常中皮細胞の不死化および腫瘍形成能に重要であることが明らかとなった。

一方、レンチウイルスベクターを用いて Luciferase 遺伝子を導入した悪性中皮腫細胞株も複数株樹立した。この細胞をヌードマウスの胸腔内に接種したところ、形成された胸膜播種を生きのまま体外から経時的に発光イメージングで観察することが可能であった。本モデルは前臨床試験に有用な悪性中皮腫の胸腔播種モデルであると考えられた。

最後に、がん細胞においてその制御が異常をきたしている一次線毛形成および中心体複製制御に関する分子機構について検討を進めた。複数の不死化正常中皮細胞株を用い、血清飢餓誘導により一次線毛形成を検討したところ、LP9/TERT1 中皮細胞株において一次線毛形成が確認された。さらに、中心体複製制御には、Albatross や Ndel1 分子が重要であることが明らかとなり、悪性中皮腫を含むヒト腫瘍に対する治療応用の可能性について新たな知見が集積した。

以上、本研究課題では、悪性中皮腫細胞のシグナル伝達系の解析、新規に樹立された不死化正常中皮細胞株を用いた EMT および中皮腫関連遺伝子導入による *in vitro*, *in vivo* における解析、さらには細胞分裂制御に関する解析を遂行した結果、極めて悪性度の高い、かつ難治性の中皮腫に対する新たな治療戦略の方向性に関する新たな提案ができたものと考えられた。

研究分担者	所属施設名	職名	新たな治療戦略を構築するための知見を得ることを目的とする。さらに NF2 (マーリン) -Hippo シグナル伝達経路の不活性化によって恒常的活性化が引き起こされているがん遺伝子産物 YAP を制御する新規戦略を見出すことを目的とする。
関戸好孝	愛知県がんセンター研究所	副所長	
中西速夫	愛知県がんセンター研究所	室長	
稲垣昌樹	愛知県がんセンター研究所	部長	
瀬戸加大	愛知県がんセンター研究所	副所長	

A. 研究目的

悪性中皮腫において高頻度に不活性化している NF2 (マーリン) -Hippo 細胞内増殖抑制シグナル伝達系について、不活性化の原因となる分子異常の詳細を明らかにし、中皮腫に対する

ヒトパピローマウイルス E6/E7-hTERT を用い、種々の分化形質を示す不死化正常中皮細胞株の樹立を試み、様々なアッセイ系を用いての解析可能な正常中皮細胞コントロール株パネルを樹立する。不死化した正常中皮細胞株に悪

性中皮腫に関わるがん関連遺伝子を導入またはノックダウンし、増殖様式や形態変化を検討すると共に、マウスへの移植実験により造腫瘍能を明らかにする。さらに、種々のサイトカイン刺激により、中皮細胞の上皮間葉移行 (EMT) に関する誘導能を検討する。これらの実験により悪性中皮腫の分化、不死化、腫瘍化に関わる分子機構を解明することを目的とする。また、前臨床試験に有用な悪性中皮腫の胸腔播種発光イメージングモデルを作成することを目的とする。

中皮腫細胞の新たな細胞増殖・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って、中皮腫細胞の細胞増殖抑制効果の有無を明らかにすることを目的とする。特に、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関係に着目し、中皮細胞におけるこれらの制御異常の機構を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

a) NF2 (マーリン) -Hippo 細胞内増殖抑制シグナル伝達系の解析

悪性中皮腫細胞株 24 株を使用して解析を行った (Y-MESO-8D, Y-MESO-14, Y-MESO-27 などの 18 株は当センターで樹立に成功した細胞株を使用した)。培養細胞より RNA および whole cell lysate を抽出し、発現解析を行った。ウェスタンブロット法については抗 Ajuba 抗体、抗 LIMD1 抗体、抗 WTIP1 抗体、抗 MST1 抗体、抗 MST2 抗体、抗 KIBRA 抗体、抗 LATS1 抗体、抗 LATS2 抗体、抗 YAP 抗体、抗 phospho-YAP 抗体、抗ベータ-actin 抗体等を用いた。また遺伝子発現は quantitative real time RT-PCR

法にて発現解析を行った。

RT-PCR 法にて Ajuba cDNA フラグメントを増幅した後、ベクターに組み込み、Ajuba 発現プラスミドベクター及びレンチウイルス発現ベクターを構築した。また、Ajuba、LIMD1、WTIP1 等のノックダウンは RNA 干渉法を用いた。CCDN1 および CTGF のプロモーター活性については、それぞれの遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼリポータープラスミドに導入し、その活性を検討した。in vitro における腫瘍細胞の増殖抑制効果は Tetra Color One を用いたカロリメトリックアッセイ及びソフトアガーコロニー形成能アッセイを用いた。免疫組織学的染色にて外科手術標本における Ajuba 等の発現を検討した。

b) 不死化正常中皮細胞株の樹立とその特性の解析

胃がん患者の切除大網組織および腹水より中皮細胞の初代培養を行い、敷石状に増殖する上皮様コロニーを分離してこれにヒトパピローマウイルス (HPV) -E6, E7 および hTERT 遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて導入し、不死化中皮細胞株を作成した。さらにリングクロニング法により敷石状に増殖する上皮型から繊維芽細胞様に増殖する肉腫型まで、細胞形態の異なる亜株を複数分離した。樹立した細胞株は不死化正常中皮細胞 HMC-2 A-7 (B-1) 株 (上皮型、以下 B-1)、HMC-2 A-7 (D-4) 株 (中間型、以下 D-4)、および HMC-3 (A-4) 株 (肉腫型、以下 A-4) と命名した。

これらの細胞株を用いて染色体の核型解析 (G-banding) やヌードマウスにおける造腫瘍

能を検討した。また蛍光染色、qRT-PCR 法や Western blot 法等を用いて Rb 経路や Hippo シグナル伝達経路に関わる遺伝子の発現解析を行った。一方、in vivo における造腫瘍能を見るためレトロウイルスベクター-MIG-YAP を用いて YAP を強制発現させた株を作成した。

c) 上皮間葉移行 (EMT) の誘導

上皮間葉移行 (EMT) については、細胞培養上清に 1-10 ng/ml のヒト TGF- β 、I1-1 β 、あるいは TNF- α の単独添加、及び、それらの併用により刺激し、24 時間後の EMT 誘導の有無を形態変化および qRT-PCR により検討した。また、siRNA を用いて CTGF 発現をノックダウンし、EMT が抑制されるか否かを検討した。さらに、複数の上皮型および肉腫型の悪性中皮腫細胞株を用いて CTGF 発現のノックダウン実験を行った。

d) 発光イメージングの可能な悪性中皮腫の胸腔播種モデルの作成

NCI-H290 細胞等にレトロウイルスベクター CSII-luc を用いてルシフェラーゼ遺伝子を導入し、薬剤選択により安定細胞株をえた。この H290-Luc 細胞をマウスの胸腔内に接種し、経時的にルシフェリンを腹腔内に投与し、胸腔内の腫瘍増殖や胸腔内進展を IVIS Lumina II を用いて in vivo イメージングを行った。また一定期間後、マウスを屠殺解剖し、胸腔を開いた状態で胸腔内の播種性進展を定量的に検討した。

e) In vitro 増殖様式の検討方法

リン酸カルシウム法を用い 293T 細胞を標

的として、野生型 YAP1 もしくは活性型 YAP1 (S127A) を組み込んだプラスミドを用いてウイルス産生 (レトロウイルスベクター) させ、不死化正常中皮細胞株へ感染させた。YAP1 導入効率をモニターするためにレポーター遺伝子として GFP を使用した。6 well 細胞培養プレートを用いて培養し、感染させた標的細胞の細胞増殖の観察を行った。4 日毎に継代し、継代時に FACS を行い GFP 陽性細胞の割合を 40 日間継時的に調べた。

f) YAP 導入不死化正常中皮細胞株のヌードマウスへの皮下移植

野生型 YAP1 もしくは恒常的活性型 YAP1 (S127A) を導入した不死化正常中皮細胞を $7.5 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ 個/1 か所まで増やし、ヌードマウスへ接種した。対照群としてレポーター遺伝子である GFP のみを導入した (Empty vector) 不死化正常中皮細胞株を接種した。皮下接種の場合、1 匹につき Empty vector 導入正常中皮細胞を左背側の 2 か所に接種し、野生型 YAP1 もしくは活性型 YAP1 (S127A) 導入正常中皮細胞を右背側の 2 か所に接種 (1 匹につき 4 か所接種) した。胸腔内移植の場合、1 匹につき 1 か所ずつ、それぞれのベクター導入正常中皮細胞を右側より胸腔内へ移植した。移植後 60 日目に解剖して観察を行った。

g) 中心体での蛋白質局在解析

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、目的とする分子の細胞内局在を高解像度顕微鏡を用いて解析した。一次線毛形成は血清飢餓により誘導した。

h) オーロラ A キナーゼアッセイ

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。

i) 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。

(倫理面への配慮)

本研究は愛知県がんセンターヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の承認を得た後、患者本人の文書同意を得て提供された検体を実験に使用した。また、遺伝子組換え実験に関しては愛知県がんセンター遺伝子組換え実験等安全委員会の承認を得て行った。動物実験は愛知県がんセンター動物委員会の許可を得た上で行った。

C. 研究結果

1. 悪性中皮腫細胞における NF2-Hippo 関連分子の発現解析

悪性中皮腫細胞株 24 株および不死化正常中皮細胞株 MeT-5A 株を用いてウエスタンブロット法等にて発現解析を行った。NF2, LATS2 な

どの中皮腫において遺伝子異常を有する既知の分子についてその発現低下を確認した。さらに Ajuba, MST1 などの本シグナル伝達系に関与することが報告されている分子について検討を行った。MST1 の発現異常は認められなかったが Ajuba は 24 株中 21 株の中皮腫細胞株において MeT-5A コントロール株より発現低下していることが観察された。

2. Ajuba 遺伝子導入による YAP リン酸化解析

Ajuba の発現が低下した細胞株に Ajuba 発現レンチウイルスを感染させたところ、YAP のリン酸化 (不活性化) が誘導された。さらに YAP の転写標的遺伝子である CCND1 および CTGF のプロモーター活性に与える影響をルシフェラーゼレポーターアッセイにて検討したところ、Ajuba の強制発現がそれらのプロモーター活性を抑制することを明らかにした。一方、Ajuba 導入による YAP リン酸化が LATS ファミリーキナーゼ依存性か否を確かめるために、RNA 干渉法を用いて LATS1 あるいは LATS2 をノックダウンして解析を行ったところ、特に LATS2 キナーゼ依存的に YAP がリン酸化されることが明らかとなった。

3. Ajuba の細胞内局在の検討

中皮腫細胞における Ajuba 分子の局在を Cell fractionation を用いたウエスタンブロット法および免疫蛍光染色法にて検討したところ、Ajuba は細胞質に局在することが明らかとなった。さらに Ajuba の強制発現により YAP が細胞核から細胞質に移動 (転写コファクターとしては不活性化) することが明らかとなった。

4. Ajuba の発現の検討

中皮腫における Ajuba 分子の発現について、外科手術標本 20 例を用いて免疫組織学的に検討を行った結果、発現低下症例は合計 16 例 (80%) であることが明らかとなった。

5. Ajuba による中皮腫細胞の増殖能抑制効果

Ajuba の発現低下が観察された中皮腫細胞株 3 株に Ajuba を強制発現させたところ、細胞増殖抑制効果が観察された。一方、Ajuba が発現低下しているが LATS2 遺伝子が欠失している細胞株では増殖抑制効果は非常に弱かった。FACS による細胞周期の解析では Ajuba 導入により G1 あるいは G2 アレストを誘導していることが明らかとなった。

6. 悪性中皮腫細胞における Ajuba ファミリー関連分子の発現解析

Ajuba が属する Zyxin/Ajuba ファミリーの他のメンバーである LIMD1 および WTIP1 について検討を行った。培養中皮腫細胞株 24 株および不死化正常中皮細胞株 MeT-5A 株を用いた。その結果、LIMD1 は 3 細胞株において発現低下、また WTIP1 については数細胞株において若干の発現低下が認められたが、Ajuba に比較すると発現異常が見られる細胞株の頻度および発現低下レベルは著明ではないことが明らかとなった。

7. Ajuba ファミリー分子のノックダウンによる検討

悪性中皮腫細胞株を用いて Ajuba、LIMD1 および WTIP1 を RNA 干渉法によって発現を抑制し、それらの細胞生物学的な効果を検討した。

MeT-5A および Y-MESO-43 細胞株 (両細胞株とも 3 つの遺伝子は正常に発現) を用いた。YAP の活性化状態 (p-YAP/YAP 比) の検討では、Ajuba をノックダウンすると YAP が活性化 (低リン酸化) する一方、LIMD1、WTIP1 のノックダウンでは YAP が不活性化 (高リン酸化) される傾向が認められた。さらに、YAP が転写を誘導する遺伝子 (CCDN1 および CTGF 遺伝子) のプロモーター活性に関する検討においても、Ajuba のノックダウンはそれぞれの転写活性を亢進する一方、LIMD1、WTIP1 のノックダウンでは逆に抑制することが明らかとなった。これらの結果により、Ajuba が悪性中皮腫細胞に対して腫瘍抑制性に機能する一方、他のファミリー分子である LIMD1、WTIP1 は腫瘍促進性の機能を有することが示唆された。

8. 不死化正常中皮細胞株の樹立とその特性の解析

リングクロニング法により細胞形態が異なり、悪性中皮腫の上皮型、2 相型、肉腫型をミミックする 3 種類の不死化中皮細胞株の作成に成功した。これらの細胞株を HOMC-2 A-7 (B-1) (上皮型)、HOMC-2 A-7 (D-4) (2 相型)、HOMC-3 A-4 (肉腫型) と命名した (図 1)。HPV-E6、E7、hTERT の発現を RT-PCR 法で調べ、樹立された HOMC-2 A-7 (B-1) (以下 B-1)、HOMC-2 A-7 (D-4) (以下 D-4)、HOMC-3 A-4 (以下 A-4) 細胞株で発現していることを確認した。また、不死化中皮細胞は中皮腫細胞と異なり初代培養細胞と同様に p16^{Ink4a} を高発現しており、Rb のリン酸化は阻止されるが、E7 が直接 Rb に結合することにより、Rb 経路を不活化し S 期移行を促進していることを確認した。ヌード

マウスにおける造腫瘍性は皮下移植、胸腔内移植ともに認めなかった。

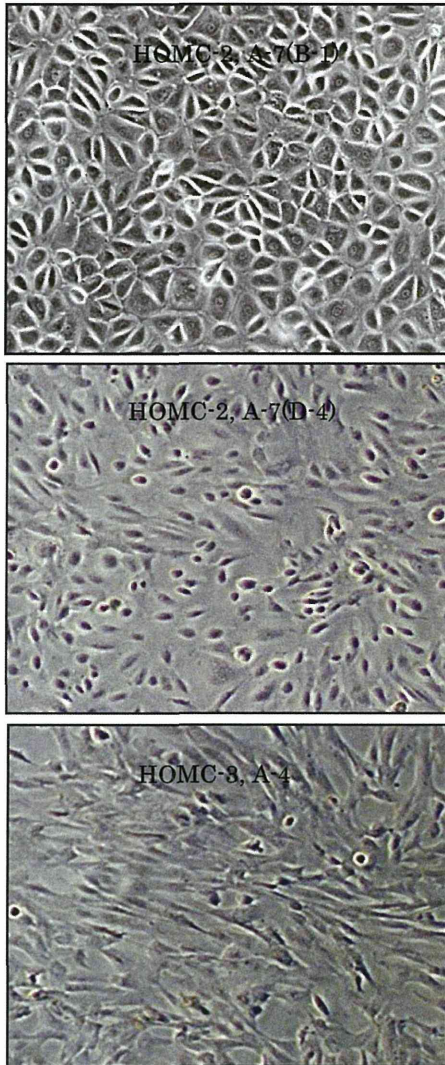


図1 種々の形態を示す不死化正常中皮細胞株

次に各種中皮細胞マーカー遺伝子発現を解析したところ、B-1 細胞株は上皮マーカー (E-cadherin) を初代培養細胞と同様に高発現していたが、D-4 細胞株の E-cadherin 発現は低く、A-4 細胞株では発現を殆ど認めなかった。一方、マーリン (NF2) は不死化細胞では悪性中皮腫細胞と異なり初代培養細胞と同様に発現が認められた。

9. 不死化正常中皮細胞株を用いた中皮細胞

の EMT 誘導とその分子機構の解析

上皮型形質を示す B-1 細胞株、および比較的、上皮様形態を保持する中間型の D-4 細胞株を用いて正常中皮細胞における上皮間葉移行 (EMT) 誘導の可能性とそのメカニズムについて検討した。B-1、D-4 細胞株を TGF- β 、IL1- β 、TNF α などのサイトカインで刺激したところ、TGF- β 単独投与でも軽度ながら形態変化が認められ、同時に E-cadherin 発現の低下および Snail の発現上昇傾向が認められた。さらに TGF- β と IL-1 β を併用投与したところ、上皮形態から紡錘型形態へと明らかな EMT 様変化が観察された (図2)。これに伴い EMT マーカー発現では、E-cadherin の顕著な発現低下および Snail および CTGF の有意な発現上昇が認められた。

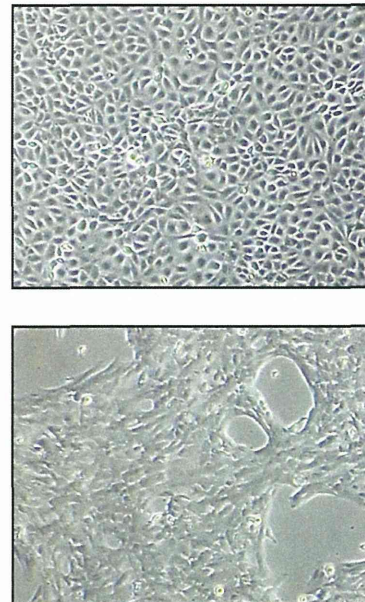


図2 不死化中皮細胞 D-4 株における TGF-beta + IL-1beta による EMT 誘導。上皮～中間様形態 (上段) から繊維芽細胞様形態 (下段) に変化。

さらに、複数の悪性中皮腫細胞株を形態から上皮型と肉腫型に分けて E-cadherin, Snail

や CTGF の発現を調べたところ上皮型に比べ肉腫型細胞株において明らかな E-cadherin の発現低下と共に、Snail および CTGF の発現上昇が認められた。

10. 発光イメージングの可能な悪性中皮腫の胸腔播種モデルの作成

H290-Luc 細胞を胸腔内に接種し、経時的にルシフェリンを腹腔内に投与し、胸腔内の腫瘍増殖や胸腔内進展を IVIS Lumina II を用いて in vivo イメージングを行った (図 3)。胸腔は肋骨など硬組織に被われているため、蛍光イメージングでは体外からのイメージングは不可能であるのに対し、発光イメージングでは胸腔接種後 1 日目から数週間まで体外からの経時的な胸腔内腫瘍の非侵襲的モニタリングが可能であった。

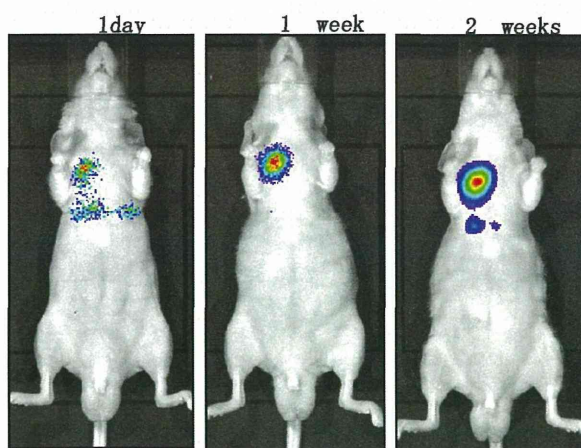


図 3 悪性中皮腫細胞 H290, CSII-luc による胸腔播種性進展の in vivo 発光イメージング

11. 不死化中皮細胞への YAP 遺伝子導入

樹立した不死化正常中皮細胞株 3 株を対象に、野生型 YAP1 あるいは活性型 YAP1 (S127A) 遺伝

子を導入し、細胞増殖能における役割を検討した。その結果、in vitro では B-1 細胞株 (上皮型) では増殖促進効果は明確に認められなかったものの、D-4 細胞株 (中間型) では明確に増殖促進効果が認められた。一方、A-4 細胞株 (肉腫型) では、遺伝子導入のない元の細胞株と比較し増殖能の低下が認められた。

12. 細胞周期関連遺伝子の検討

不死化正常中皮細胞に細胞周期を促進する関連遺伝子 (CCND1、SKP2、FOXM1、MYC) を導入し、それらの増殖促進効果の有無を検討した。その結果、MYC 遺伝子の導入時のみいずれの 3 細胞株においても in vitro で細胞増殖能の促進を認めた。しかしヌードマウスへの皮下移植では腫瘍形成に至らず、細胞周期関連遺伝子のみの導入では in vivo での造腫瘍能の獲得は認められなかった。

さらに、YAP1 単独にて不死化・腫瘍化が可能かを検討するため、不死化していない初代培養中皮細胞へ YAP1 遺伝子を導入した。しかし、Control と同様に継代後、細胞増殖の停止を認め、YAP1 単独導入では中皮細胞の不死化が誘導できないことが明らかとなった。

13. 不死化正常中皮細胞株に対する NF2、BAP1 のノックダウンの検討

中皮腫臨床検体では高頻度の NF2 および BAP1 遺伝子の不活性化変異が報告されている。RNA 干渉法を用いて 2 つの遺伝子発現をノックダウンすることにより、不死化正常中皮細胞の細胞増殖能に及ぼす影響を検討した。その結果、NF2-shRNA では増殖能の促進を認めたが、BAP1-shRNA では逆に増殖能の低下を認めた。

さらに *in vivo* のヌードマウスへの移植実験では、NF2-shRNA を導入した中間型 D-4 株で腫瘍形成を認めた。

14. YAP 遺伝子導入した不死化中皮腫細胞の *in vivo* 移植実験

不死化正常中皮細胞株に YAP を導入し、*in vivo* での造腫瘍能を検討した。遺伝子導入のない元の細胞株もしくはレポーター遺伝子 GFP のみ導入した細胞株ではヌードマウスへの皮下接種にて腫瘍を形成しなかったが、野生型 YAP1 あるいは活性型 YAP1 (S127A) を導入した B-1 細胞株 (上皮型)、D-4 細胞株 (中間型)、A-4 細胞株 (肉腫型) の 3 細胞株ともに腫瘍を形成した (表 1)。一方、胸腔内接種においても、野生型 YAP1 あるいは活性型 YAP1 (S127A) を導入したいずれの細胞株でも胸腔内に腫瘍形成を認めた (表 1、図 4)。

表 1

A. 皮下移植における腫瘍形成率

	上皮型	中間型	肉腫型
Control	0/8 (0.0%)	0/8 (0.0%)	0/8 (0.0%)
野生型 YAP1	5/8 (62.5%)	8/8 (100%)	4/8 (50%)
活性型 YAP1	4/8 (50.0%)	6/8 (75%)	6/8 (75%)

B. 胸腔内移植における腫瘍形成率

	上皮型	中間型	肉腫型
Control	1/2 (50%)	0/2 (0.0%)	0/2 (0.0%)
野生型 YAP1	2/2 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)
活性型 YAP1	2/2 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)

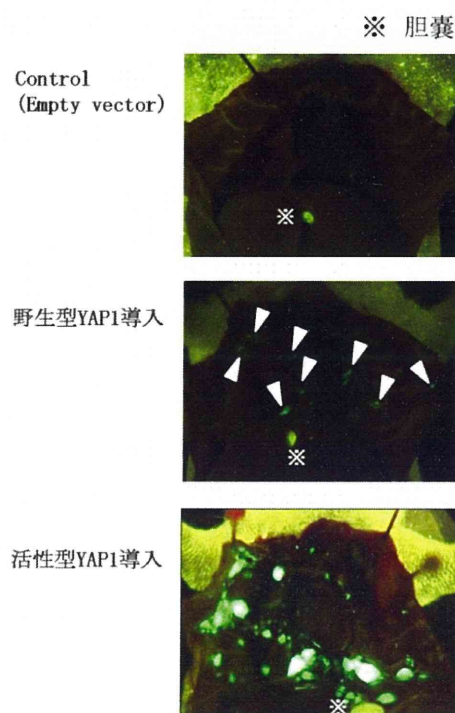


図 4 中皮細胞株の胸腔内移植像

15. 中皮細胞における一次線毛形成

中皮細胞における一次線毛形成について検討を進めた。一次線毛は、一つの細胞に一つだけ生じる細胞膜上の突起物 (アンテナ様構造物) で、正常細胞の増殖休止期に形成される。多くのがん細胞が一次線毛形成能を失っており、これが細胞周期制御を逸脱する原因の一つであると考えられている。我々はトリコプレイン分子が、分裂キナーゼであるオーロラ A キナーゼを活性化し、また、一次線毛を消失させて、正常細胞における円滑な細胞周期の進行に寄与していることを明らかにしてきた。オーロラ A キナーゼの阻害薬の投与により、正常細胞では一次線毛を形成することで細胞周期を停止させて細胞死を回避することができるが、一次線毛形成能を失っているがん細胞では増殖休止を生じず細胞分裂障害を起こして死滅することを明らかにした。

16. 一次線毛形成に関する正常中皮モデル細胞

複数の不死化正常中皮細胞株を用い、血清飢餓誘導により一次線毛形成を検討したところ、正常腹膜中皮細胞を hTERT で不死化した LP9/TERT1 細胞株において一次線毛形成が確認された。本細胞株は中皮腫細胞株に対するオーロラ A キナーゼ阻害薬の効果を検討する上で良いコントロール細胞株となり得ることを明らかにした。

17. 新規中心体複製制御分子の同定

細胞内の中心体 (centrosome) における Albatross 蛋白質の詳細な局在を検討したところ、母中心小体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に対する Albatross siRNA によるノックダウン実験では中心体の複製が障害され、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正常な中心体の複製を保証することで、細胞周期の進行に寄与するタイプの細胞周期制御因子である可能性が明らかとなった。

18. 新規一次線毛形成抑制分子の同定

中心体における Ndel1 の局在を検討したところ、母中心小体の subdistal appendage に偏在することが明らかとなった。正常二倍体細胞を用いた Ndel1 siRNA による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、一次線毛依存的な細胞周期休止が起きていたことが明らかとな

った。

D. 考察

悪性中皮腫において NF2(マーリン)-Hippo シグナル伝達系の不活性化が高頻度に認められる。NF2(マーリン)-Hippo シグナル伝達系の不活性化は転写コアクチベーター YAP の恒常的活性化 (低リン酸化) を引き起こし、細胞周期の促進に関わる遺伝子群 (CCND1 など) や細胞間質造成に関わる遺伝子群 (CTGF など) の発現を誘導する。NF2(マーリン)-Hippo シグナル伝達系の不活性化の原因は NF2 遺伝子 (約 40%) あるいは LATS2 遺伝子 (約 15%) におけるジェネティックな異常で説明されるが、これらの遺伝子変異が認められない中皮腫においても YAP の活性化が認められる症例があり、どの分子の異常が原因であるかが大きな疑問であった。本研究により LIM-ドメイン蛋白である Ajuba が高頻度に発現低下し、中皮腫における腫瘍抑制遺伝子として機能していることが明らかとなった。さらに、Ajuba のファミリー分子である LIMD1, WTIP 1 の解析を進め、これらの分子が Ajuba とは逆に腫瘍促進性の機能を有することが示唆された。以上により LIM-ドメイン蛋白である Ajuba、LIMD1 および WTIP1 の中皮腫における NF2-Hippo シグナル伝達系に関する役割の詳細が明らかとなった。

現在、in vitro の実験で使用可能であるコントロールの正常中皮細胞株は極めて限られている。今回樹立した 3 種類の不死化中皮細胞株は極めて有用性が高いとともに、in vitro, in vivo においてそれぞれ以下のユニークな特徴を示した。B-1 株は in vitro において敷

石状の上皮様増殖パターンを示し E-cadherin を高発現するが、Vimentin、Snail、CTGF の発現が低く、また YAP 強制発現株をヌードマウス胸腔内に移植すると乳頭状パターンで増殖する上皮型腫瘍を形成することから最も上皮性格の強い細胞株であることが明らかとなった。D-4 株は *in vitro* で B-1 株ほどきれいな敷石状の上皮様増殖パターンを示さず、E-cadherin の発現も B-1 株に比べ低く、逆に Vimentin、Snail、CTGF の発現は高いこと、YAP 強制発現株の胸腔内移植では一部で肉腫様の組織型を認めることから、2 相型をミミックしている細胞株であることが示された。一方、A-4 株は *in vitro* で線維芽細胞様形態を示し、E-cadherin の発現は殆どなく、逆に Vimentin、Snail、CTGF の発現が高く、また YAP 強制発現株の胸腔内移植では肉腫様腫瘍を形成することから、上皮性格を欠損した肉腫様の細胞株であることが明らかとなった。

このように、本研究で樹立した不死化中皮細胞株 B-1、A-4 およびそれらの YAP 発現株は悪性中皮腫の上皮型、肉腫型を、また D-4 株は中間（2 相）型をミミックしており、肉腫型に近い従来の SV40-LT 導入による不死化中皮細胞 (MeT-5A) に比べて、中皮細胞の増殖、分化、シグナル伝達等の解析により有用なモデルと考えられた。

これらの不死化正常中皮細胞株を用い、中皮腫の上皮型、2 相型および肉腫型という組織学的多様性解明の鍵を握ると考えられる上皮間葉移行 (EMT) の詳細な機構について解析を進めた。中間型 D-4 細胞においてはサイトカイン TGF- β および IL1- β の刺激により明らかな EMT を誘導できることを確認した。D-4 株のサ

イトカインによる EMT 誘導は *in vivo* における 2 相型の病理像を考える上で重要な示唆を含むものと考えられた。すなわち、D-4 株の YAP 強制発現株をマウスの胸腔内に移植した際、上皮様組織を呈する部分と肉腫様の組織を示す部分が共存する 2 相型の組織所見が認められるが、本実験結果により、腫瘍内の部位により宿主の微小環境が異なることが大きな要因であることが考えられた。このように中皮細胞が *in vitro* でサイトカイン濃度の変化により EMT を起こしその性質を変えるということを考慮すると、ヒトの臨床例でも中皮腫では上皮型、2 相型、肉腫型という組織型が一つの腫瘍内に存在し、それらの間で移行が見られるが、この Heterogeneity は腫瘍細胞の遺伝子レベルでの変異の蓄積にもとづくジェネティックな polyclonality によるものというよりも、むしろサイトカインなどの微小環境の変化により引き起こされる可能性が高いことが示唆された。

不死化した正常中皮腫細胞株を用いて悪性中皮腫に関与する主要なシグナル伝達系の構成遺伝子である YAP1 を導入することで、*in vitro* での増殖促進効果が認められ、ヌードマウスで腫瘍を形成したことは、正常中皮細胞から中皮腫を作成できたことを意味すると考えられた。すなわち、特定の遺伝子導入による悪性中皮腫モデルを作成できたことを意味し、治療実験や他の遺伝子導入による効果などの検定のための基盤ができたものと考えられる。さらに、YAP 導入により B-1 株では *in vitro* で増殖促進効果が低く、A-4 株では逆に増殖能の低下が認められた、しかし両者においても共にヌードマウスで腫瘍を形成したこ

とから、おそらく、*in vivo*での腫瘍を取り巻く微小環境が造腫瘍能の付与にかかわっている可能性が示唆された。

悪性中皮腫細胞株に細胞周期を促進する遺伝子 (CCND1、FOXM1 など)を YAP1 の代わりに導入することで造腫瘍能の亢進に寄与するか否かを検討したが、それらの遺伝子導入では腫瘍形成能を認めなかった。この結果から、細胞周期関連遺伝子の発現制御を司るマスター遺伝子である YAP1 の恒常的活性化が中皮細胞の増殖にとって極めて重要であることが強く示唆された。また、不死化していない初代培養中皮細胞に対し YAP1 遺伝子単独導入での不死化を試みたが、YAP1 単独では中皮細胞の不死化に不十分であることが明らかとなった。

BAP1 は中皮腫の新規がん抑制遺伝子として同定されたが、その細胞増殖能に対する効果は議論が分かれている。本実験系の条件下においては中皮細胞において BAP1 遺伝子の存在がむしろ細胞増殖維持に機能していることが示唆された。

Albatross による中心体複製制御を介した新たな細胞周期制御機構の発見は、中心体機能に着目したがん治療標的分子の可能性を高めるものと考えられた。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メカニズムで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ことや細胞増殖における中心体複製の要求性に着目し、複数の手段を提示することは、がん細胞特異的傷害効果を狙う上での新たな試みとなり得るものと考えられた。

E. 結論

悪性中皮腫細胞において LIM-ドメイン蛋白である Ajuba が高頻度に発現低下していることが明らかとなった。Ajuba は悪性中皮腫細胞に対して腫瘍抑制分子として働き、その機能は LATS ファミリーキナーゼ依存的に YAP をリン酸化 (不活性化) することによるものであることが明らかとなった。本研究結果は悪性中皮腫細胞において NF2(マーリン)-Hippo シグナル伝達系の不活性化が重要であり、その原因として NF2、LAT2 の遺伝子異常に加え Ajuba の発現低下が大きく関与していることが示唆された。

さらに、Ajuba が腫瘍抑制性に機能する一方、ファミリー分子である LIMD1、WTIP 1 は腫瘍促進性に機能することが示唆された。悪性中皮腫における YAP がん遺伝子の恒常的活性化は上流の分子の様々な不活性化異常が原因と考えられるが、本研究により Ajuba ファミリーを制御することが中皮腫に対する新たな分子治療戦略となり得ることが強く示唆された。

正常の不死化正常中皮細胞パネルを確立した。中皮腫には3種類の組織型 (上皮型、2相型、肉腫型) が存在するが、この組織多様性を備えながら、しかも単一患者に由来し、従って遺伝的背景の均一な正常不死化細胞株 3 株を作成することに成功し、それぞれ、上皮型、中間型、肉腫型の形態・性状を示した。それらを用いて TGF- β 、IL1- β 、TNF- α などの複数のサイトカインの協調作用により EMT が誘導されることを明らかにした。またこの EMT 誘導には TGF- β /CTGF 経路が関与し、この経路をブロックすることにより肉腫型への悪性進展を抑制できる可能性を明らかにした。今後、これらのモデルを組み合わせるにより、中皮腫の組織多

様性や EMT のメカニズム解明、また中皮腫の各組織型に対する新しい治療法の開発につながるべくモデルをさらに発展させることが重要であると考えられた。

またルシフェラーゼ発光による高感度な胸腔播種の in vivo イメージングが可能な、前臨床試験に有用な悪性中皮腫の胸腔播種モデルを確立した。

不死化中皮細胞株に野生型 YAP1 もしくは活性化型 YAP1 (S127A) 遺伝子導入を行い、その細胞増殖に対する効果を検討した。さらに、ヌードマウスにこれらの細胞株を移植して腫瘍形成能を明らかにした。これらの結果により、中皮腫の細胞増殖は、YAP がん遺伝子の直接的な増殖促進効果とマウス個体内でのがん微小環境の二つが重要であることが明らかとなった。一方、正常中皮細胞に対する不死化は YAP1 単独導入では不可能であることが明らかとなった。さらに、悪性中皮腫における代表的な遺伝子異常を呈する BAP1 は、肉腫型において増殖能への関連は乏しい一方、中間型では逆に増殖能の維持に寄与していることが示唆された。

細胞の中心体の複製機能や細胞の一次線毛形成に関わる分子の詳細が明らかとなり、これらの分子機能の阻害による腫瘍細胞特異的な治療戦略の可能性が示唆された。正常中皮細胞および中皮腫細胞の比較により、悪性中皮腫に対する本治療戦略を検証することが可能になるものと考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mizuno T, Murakami H, Fujii M, Ishiguro F, Tanaka I, Kondo Y, Akatsuka S, Toyokuni S, Yokoi K, Osada H, Sekido Y. : YAP induces malignant mesothelioma cell proliferation by upregulating transcription of cell cycle promoting genes. *Oncogene*, 31:5117-22, 2012.
2. Ishiguro F, Murakami H, Mizuno T, Fujii M, Kondo Y, Usami N, Yokoi K, Osada H, Sekido Y. : Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) promotes malignant phenotypes of malignant mesothelioma. *J Thorac Oncol*, 7, 890-9, 2012.
3. Fujii M, Toyoda T, Nakanishi H, Yatabe Y, Sato A, Matsudaira Y, Ito H, Murakami H, Kondo Y, Kondo E, Hida T, Tsujimura T, Osada H, Sekido Y. : TGF-beta synergizes with defects in the Hippo pathway to stimulate human malignant mesothelioma growth. *J Exp Med*, 209:479-94, 2012.
4. Horio M, Sato M, Takeyama Y, Elshazley M, Yamashita R, Hase T, Yoshida K, Usami N, Yokoi K, Sekido Y, Kondo M, Toyokuni S, Gazdar AF, Minna JD, Hasegawa Y. : Transient but not stable ZEB1 knockdown dramatically inhibits growth of malignant pleural mesothelioma cells. *Ann Surg Oncol*, 19 Suppl 3:S634-45, 2012.
5. Elshazley M, Sato M, Hase T, Yamashita

- R, Yoshida K, Toyokuni S, Ishiguro F, Osada H, Sekido Y, Yokoi K, Usami N, Shames DS, Kondo M, Gazdar AF, Minna JD, Hasegawa Y. : The circadian clock gene BMAL1 is a novel therapeutic target for malignant mesothelioma. *Int J Cancer*, 131:2820–31. 2012.
6. Fujii M, Nakanishi H, Toyoda T, Tanaka I, Kondo Y, Osada H, Sekido Y. : Convergent signaling in the regulation of the connective tissue growth factor in malignant mesothelioma: TGF- β signaling and defects in the Hippo signaling cascade. *Cell Cycle*, 11: 3373–3379, 2012.
 7. Sekido Y: Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma. *Carcinogenesis*, 34:1413–9, 2013.
 8. Satoh M, Takemura Y, Hamada H, Sekido Y, Kubota S: EGCG induces human mesothelioma cell death by inducing reactive oxygen species and autophagy. *Cancer Cell Int*, 13:19, 2013.
 9. Abe S, Morita Y, Kato-Kaneko M, Hanibuchi M, Tsujimoto Y, Goto H, Kakiuchi S, Aono Y, Huang J, Sato S, Kishuku M, Taniguchi Y, Azuma M, Kawazoe K, Sekido Y, Yano S, Akiyama S, Sone S, Minakuchi K, Kato Y, Nishioka Y: A novel targeting therapy of malignant mesothelioma using anti-podoplanin antibody. *J Immunol*, 190: 6239–40, 2013.
 10. Chew S-H, Okazaki Y, Nagai H, Misawa N, Akatsuka S, Yamashita K, Jiang L, Yamashita Y, Noguchi M, Hosoda K, Sekido Y, Takahashi T, Toyokuni S: Cancer-promoting role of adipocytes in asbestos-induced mesothelial carcinogenesis through dysregulated adipocytokine production. *Carcinogenesis*, 35 : 164–72, 2014.
 11. Tanaka I, Osada H, Fujii M, Fukatsu A, Hida T, Horio Y, Kondo Y, Sato A, Hasegawa Y, Tsujimura T, Sekido Y: LIM-domain protein AJUBA suppresses malignant mesothelioma cell proliferation via Hippo signaling cascade. *Oncogene*, in press.
 12. Ohta M, Abe A, Ohno F, Hasegawa Y, Tanaka H, Maseki S, Kondo E, Kurita K, Nakanishi H. : Positive and negative regulation of podoplanin expression by TGF- β and histone deacetylase inhibitors in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol*, 49:20–26, 2013.
 13. Murakami H, Nakanishi H, Tanaka H, Ito S, Misawa K, Ito Y, Ikehara Y, Kondo E, and Kodera Y. : Establishment and characterization of novel gastric signet-ring cell and non signet-ring cell, poorly-differentiated adenocarcinoma cell lines with low and high malignant potential. *Gastric Cancer*, 16:74–83, 2013.
 14. Akita K, Yoshida S, Ikehara Y, Shirakawa S, Toda M, Inoue M, Kitawaki J, Nakanishi H, Narimatsu H, Nakada H. : Different

- levels of Sialyl-Tn Antigen expressed on MUC16 in Patients With Endometriosis and Ovarian Cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 22:531-8, 2012.
15. Maseki S, Ijichi K, Tanaka H, Fujii M, Hasegawa Y, Ogawa T, Murakami S, Kondo E, Nakanishi H: Acquisition of EMT phenotype in the gefitinib-resistant cells of a head and neck squamous cell carcinoma cell line through Akt/GSK-3 β /snail signaling pathway. *Br J cancer*, 106:1196-1204, 2012.
 16. Ozaki H, Matsuzaki H, Ando H, Kaji H, Nakanishi H, Ikehara Y, Narimatsu H.: Enhancement of metastatic ability by ectopic expression of ST6GalNAcI on a gastric cancer cell line in a mouse model. *Clin Exp Metastasis*, 29:229-38, 2012.
 17. Nakanishi H, Ito S, Matsui M, Murakami H, Kodera Y.: Non invasive and real-time fluorescence imaging of peritoneal metastasis in nude mice. *Methods Mol Biol*, 872 : 85-95, 2012.
 18. Yusa A, Toneri M, Masuda T, Okochi M, Iwata H, Honda H, Arai F, Nakanishi H: Development of a New Rapid Isolation Device for Circulating Tumor Cells (CTCs) using 3D Palladium Filter and its Application for Genetic Analysis. *PLoS ONE*: 9, e8882, 2014.
 19. Ito A, Ito Y, Matsushima S, Tsuchida D, Ogasawara M, Hasegawa J, Misawa K, Kondo E, Kaneda N, Nakanishi H: New whole-body multimodality imaging of gastric cancer peritoneal metastasis combining fluorescence imaging with ICG-labeled antibody and MRI in mice. *Gastric Cancer*, in press, 2014.
 20. Oshima Y, Tanaka H, Murakami H, Ito Y, Furuya T, Kondo E, Kodera Y, Nakanishi H: Lapatinib sensitivity of two novel trastuzumab-resistant HER2 gene-amplified gastric cancer cell lines. *Gastric cancer*, in press.
 21. Yokobori T, Iinuma H, Shimamura T, Imoto S, Sugimachi K, Ishii H, Iwatsuki M, Ota D, Ohkuma M, Iwaya T, Nishida N, Kogo R, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Toh H, Sato T, Barnard GF, Fukagawa T, Yamamoto S, Nakanishi H, Sasaki S, Miyano S, Watanabe T, Kuwano H, Mimori K, Pantel K, Mori M: Plastin 3 Is a Novel Marker for Circulating Tumor Cells Undergoing the Epithelial-Mesenchymal Transition and Is Associated with Colorectal Cancer Prognosis. *Cancer Res*, 73; 2059-2069, 2013.
 22. 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)
 23. 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.
24. 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.
 25. 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.
 26. Toda M, Kuo CH, Borman SK, Richardson RM, Inoko A, Inagaki M, Collins A, Schneider K, Ono SJ. : 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.
 27. Jeong HJ, Ohmuro-Matsuyama Y, Ohashi H, Ohsawa F, Tatsu Y, Inagaki M, Ueda H. : Detection of vimentin serine phosphorylation by multicolor Quenchnbodies. *Biosens Bioelectron*, 40: 17-23, 2013.
 28. 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.
 29. 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.
 30. 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.
 31. 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 Plk1-mediated phosphorylation of vimentin during mitosis. *Cell Cycle*, 131: 126-137, 2014.
 32. Kakeno M, Matsuzawa K, Matsui T, Akita H, Sugiyama I, Ishidate F, Nakano A, Takashima S, Goto H, Inagaki M, Kaibuchi K, Watanabe T : Plk1 phosphorylates CLIP-170 and regulates its binding to microtubules for chromosome alignment. *Cell Struc Func*, 39: 45-59, 2014.
 33. Goto H, Inagaki M : New Insights into Roles of Intermediate Filament (IF) Phosphorylation and Progeria