

26. aneuploidy (染色体異数性) とがん化・老化

稲垣 昌樹

*愛知県がんセンター研究所 腫瘍医化学部

Key words : 細胞質分裂, 染色体異数性, 老化, がん化

緒言

染色体の4倍体細胞は固形腫瘍の約20%で観察され、がん化の際の染色体異数性 (aneuploidy) よりも早く出現すると考えられている。近年では、4倍体細胞は最終分化の際にも認められ、老化のhallmarkの1つであると認識されてきている。p53の活性化により大部分の4倍体の培養細胞は細胞周期が停止するが、個体内における4倍体細胞の運命はほとんど明らかにされていない。本研究では、我々が独自で作製した細胞質分裂障害型の4倍体細胞を形成するビメンチンのリン酸化変異マウスを用いて、定常時および損傷治癒における、4倍体細胞の細胞運命を解析した。

方法、結果および考察

1. ビメンチンの分裂期特異的リン酸化変異マウスの作製

当研究室では、これまでにビメンチンの分裂期キナーゼとして、Aurora B キナーゼ、Cdk1 キナーゼ、Plk 1、Rho キナーゼを特定し、これらのリン酸化部位も同定した¹⁾ (図1)。

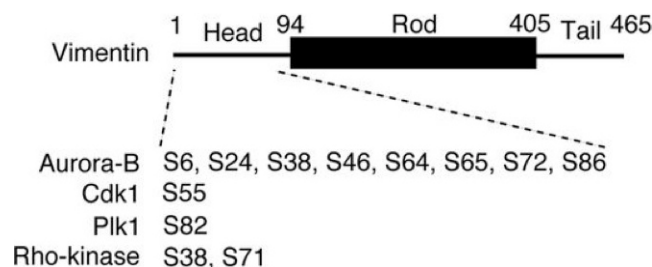


図1. ビメンチンの分裂期のリン酸化部位とその責任酵素

分裂期キナーゼによるビメンチンのヘッド (Head) ドメインのリン酸化部位を示した。S: セリン。

2. 定常状態での皮膚の組織

3および14ヶ月齢のマウスから背部皮膚を採取し組織学的な検討を行った²⁾。3ヶ月齢の組織において、野生型およびヘテロ変異マウスに対しホモ変異マウスは皮下のコラーゲン層が薄く、野生型・ヘテロ変異体ではほとんど認められない脂肪層の増多を認めた (図2A)。さらに、14ヶ月齢では、老化に伴って認められる脂肪層の増加が、野生型・ヘテロ変異マウスで認められたが、ホモ変異体は脂肪層がほとんど消失していた (図2B)。さらに、詳細に脂肪層の核を検討したところ、14ヶ月齢の野生型・ヘテロ変異マウスに対して弱年齢のホモ変異マウスの核は異常な大きさを示した (図2C)。このことは、3ヶ月齢の脂肪層で染色体異常が起きていることを示唆しており、皮膚組織を用いて老化関連遺伝子の発現を検討したところ、3ヶ月齢で既にホモ変異マウスで老化マーカーが亢進していることを確認した。

*現所属：三重大学 大学院医学系研究科 分子生理学

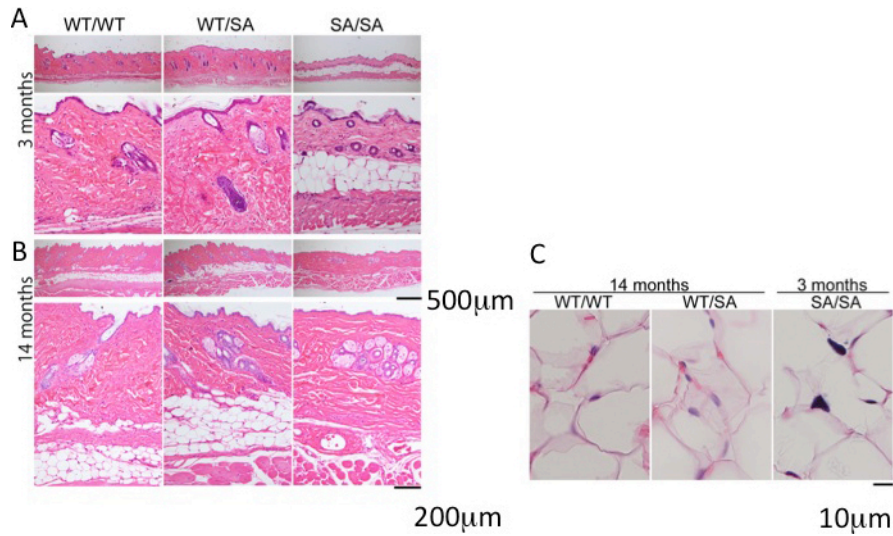


図2. 皮膚組織のヘマトキシリン・エオジン染色

(A) 3ヶ月齢、14ヶ月齢の皮膚のヘマトキシリン・エオジン染色。(B) 脂肪層の強拡大像。

3. ビメンチンリン酸化の損傷治癒への影響を検討

皮下線維芽細胞におけるビメンチンのリン酸化不全が損傷治癒に与える可能性を検討するため、3ヶ月齢のマウスを用いて損傷治癒実験を行った²⁾。その結果、創が閉じるのがホモ変異マウスで遅延することを認めた (図3A、B)。

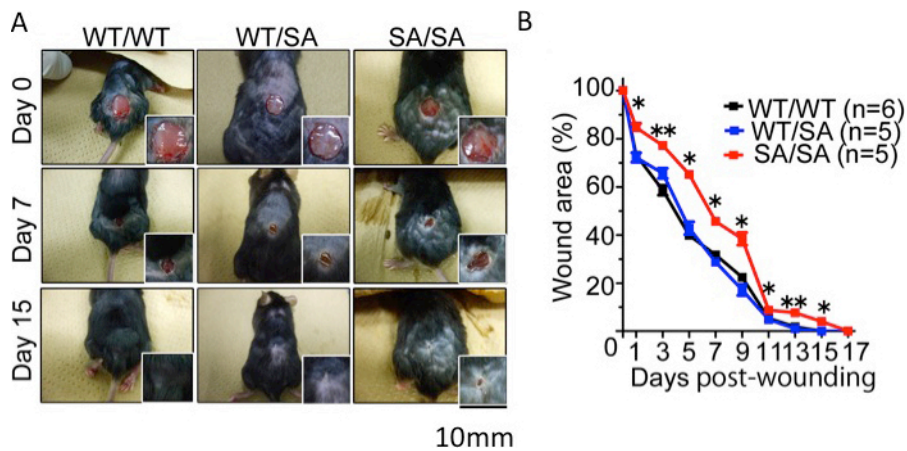


図3. ビメンチンリン酸化不全と損傷治癒

(A) 3ヶ月齢のマウスを用いて、皮膚に直径8mmのbiopsy punchで孔をあけた。実際の写真像。(B) 傷口の大きさの平均値。Error Bar: SE. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$.

4. 損傷部位における線維芽細胞の細胞分裂

今回我々が使用したマウスは、*in vitro*で細胞質分裂障害を引き起こす変異をもつビメンチンを発現することから、損傷治癒が細胞分裂異常に起因するかを検討した。細胞増殖マーカーであるKi-67の組織染色を行った²⁾ところ予想通り、増殖細胞の割合が低下していることが認められた。さらに、細胞質分裂障害の際に認められる2核細胞の出現、娘細胞間を架橋するブリッジ状の構造物、多中心体を検討したところ、ホモ変異体特異的にこれらの表現型が認められた。以上のことから、皮下線維芽細胞において、細胞質分裂障害が引き起こされることを示している (図4)。

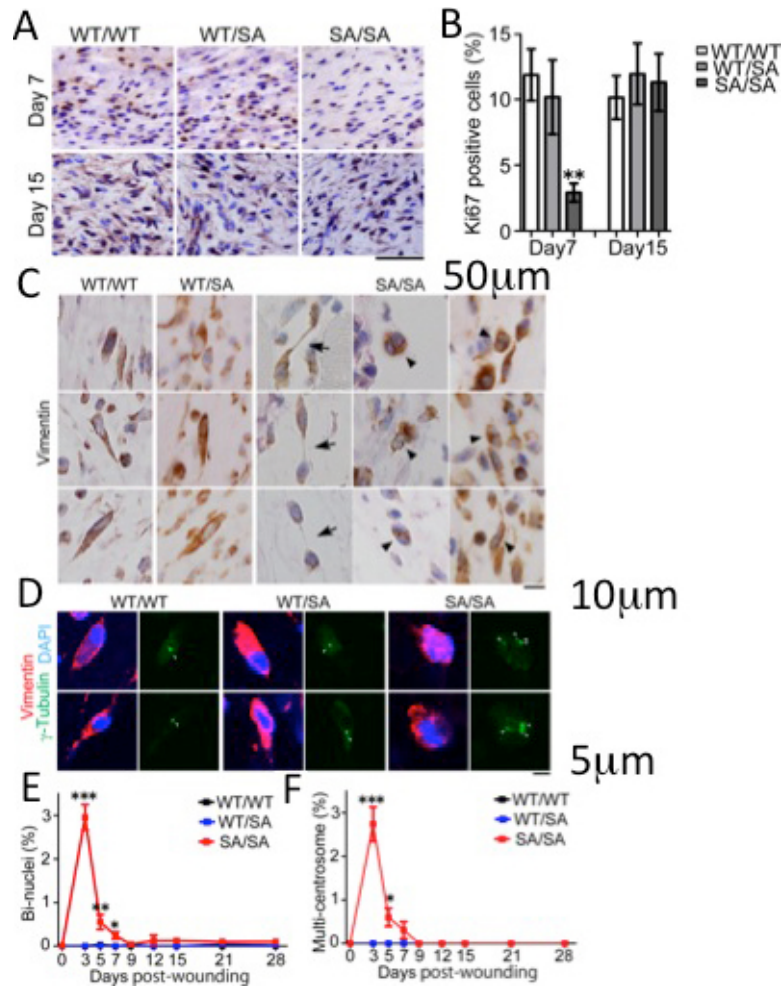


図4. 損傷治癒過程の細胞質分裂障害

(A) Ki-67の損傷部位の組織染色。(B) Aを定量化。(C) ビメンチンの組織染色で、2核細胞、ブリッジ構造の出現を検討。(D) 蛍光免疫染色で多中心体の出現を検討。(E) Cの2核細胞を定量化。(F) Dの多中心体を定量化。 Error Bar: SE. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$.

5. 損傷部位での Aneuploidy、DNA 損傷修復、老化マーカーの検討

損傷部位において、Aneuploidy、DNA 損傷修復の出現を観察し、これらから少し遅れて老化マーカーである β -ガラクトシダーゼ陽性細胞が出現することを認めた²⁾ (図5)。

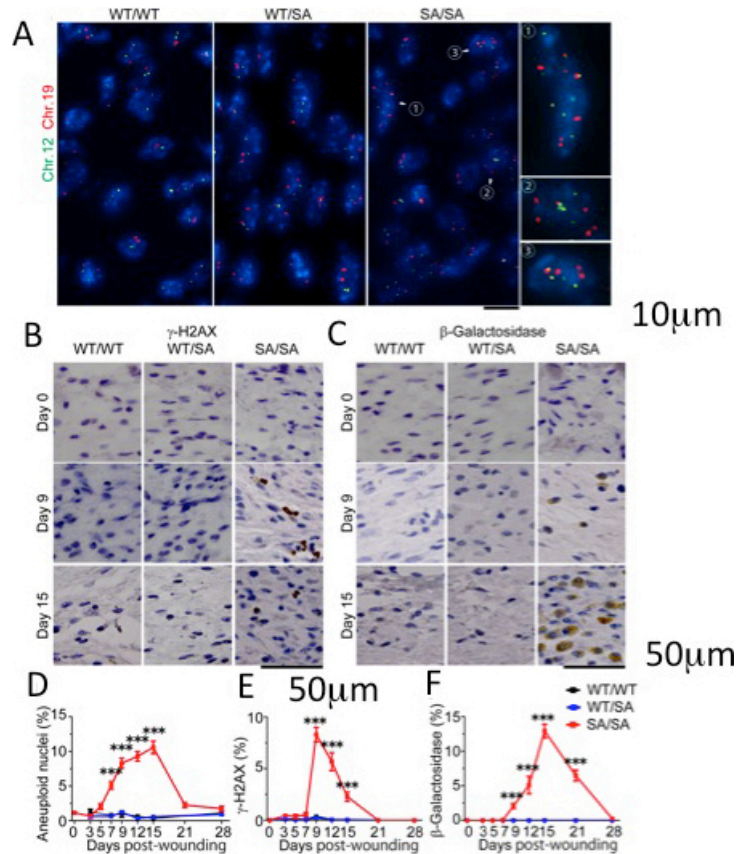


図5. 細胞質分裂障害を起こした細胞の運命

(A) FISH で染色体異数性を検討。(B) DNA 損傷修復や複製ストレスのマーカである γ H2AX の組織染色。(C) 老化マーカである β -ガラクトシダーゼの組織染色。(D-F) A-C を定量化した。

6. 経時的变化のまとめ

β -ガラクトシダーゼ以外のマーカとして知られる p21、p16、p19 を損傷部位出の発現を経時的に検討したところ、4 倍体化する時期において、p53 の標的遺伝子である p21 の発現がホモ変異マウス特異的に亢進することを認めた²⁾ (図 6A)、これは、この損傷治療実験で 4 倍体化チェックポイント機構が機能していることを示唆している。さらに、図の実験から、ホモ変異マウスの損傷部位の線維芽細胞では 3 つ以上の中心体が存在するため、細胞質分裂障害を引き起こした 4 倍体細胞が細胞分裂していることが明らかとなった。各指標の経時的な推移から、4 倍体細胞ができたのちに染色体異数性が認められ、それと同時に、DNA 損傷反応や複製ストレスの際に上昇する γ H2AX の亢進、最後に老化マーカである β -ガラクトシダーゼの誘導が認められた (図 6B)。

この研究から、我々は、細胞質分裂障害によって生じた 4 倍体細胞が次の細胞周期に入ることにより、その際に染色体の不等分配が起き染色体異数性がおきること、さらに、これらの細胞ではがん化せず、老化に向かうことを明らかにした^{2,3)} (図 6C)。現在、異なった組織に特異的に発現する中間径フィラメントのリン酸化不全マウスを作製しており、今後細胞質分裂障害型の染色体異数性細胞の運命を検討する。さらに、一次線毛と細胞増殖の連関も視野入れて、細胞運命の解析を進めていきたい^{4,5)}。

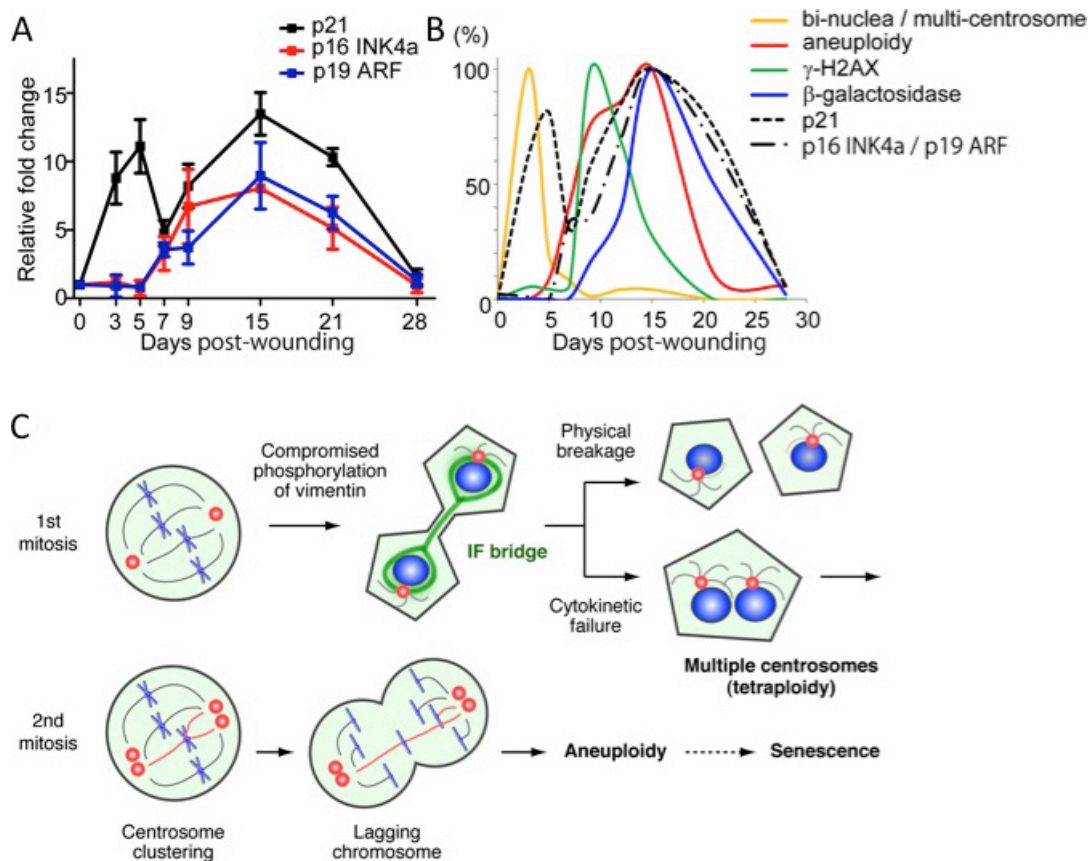


図6. 経時的変化のまとめと我々が考えているモデル

(A) p21, p16, p19 の老化マーカーの real-time PCR。(B) 損傷後の各指標の経時的な推移。(C) 我々が考える仮説。

共同研究者

本研究の共同研究者は、名古屋大学医学研究科腫瘍病理分野の榎本篤である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文 献

- 1) 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.* 2013 Dec 13;288(50):35626-35. doi: 10.1074/jbc.M113.514737. PubMed PMID: 24142690
- 2) 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.* 2015 May 22;290(21):12984-98. doi: 10.1074/jbc.M114.633891. PMID: 25847236
- 3) Goto H, Inagaki M. New insights into roles of intermediate filament phosphorylation and progeria pathogenesis. *IUBMB Life.* 2014 Mar 23. doi: 10.1002/iub.1260. PubMed PMID: 24659572
- 4) Izawa I, Goto H, Kasahara K, Inagaki M. Current topics of functional links between primary cilia and cell cycle. *Cilia.* 2015 Dec 29;4:12. doi: 10.1186/s13630-015-0021-1. PubMed PMID:26719793
- 5) 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.* 2016 Feb 15;212(4):409-23. doi: 10.1083/jcb.201507046. PubMed PMID:26880200