

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03448

研究課題名（和文）ユビキチンシグナルによる一次線毛の形成機構と癌細胞増殖制御への標的化戦略

研究課題名（英文）Regulation of primary cilia formation by the ubiquitin-proteasome system

研究代表者

笠原 広介（Kasahara, Kousuke）

三重大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90455535

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000 円

研究成果の概要（和文）：一次線毛（primary cilia）は、中心体が形態的・機能的に変化した細胞小器官である。一次線毛の形成不全や機能異常は、線毛病と呼ばれる種々の疾患や発生異常の原因となるが病態生理には不明な点が多く残されている。本研究では、一次線毛の制御因子であるトリコプレインのノックアウトマウスを作製・解析した結果、肥満及び骨格筋再生において一次線毛が重要な役割を担うこと、その分子機序を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、一次線毛が肥満や骨格筋再生に関与していることをマウス実験で証明し、その分子機序の一端についても明らかにした。本研究を進展させることで、肥満やその関連疾患や、老化による筋力低下、筋ジストロフィなどの難治性筋疾患の分子機序の解明や、治療法や診断法の開発につながることが期待できる。また、本研究で作製したトリコプレインノックアウトマウスは、肥満及びその関連疾患に抵抗性を持つ画期的なマウスモデルとして利用できる。

研究成果の概要（英文）：Primary cilia play pivotal roles in signal transduction and development, and are known to serve as signaling hubs. In this study, we show that genetic ablation of trichoplein (Tchp) induces ciliary elongation on adipose progenitors (APs) in skin and fibro-adipogenic progenitors (FAPs) in injured skeletal muscle. The elongated cilia on APs suppress adipogenic differentiation by disrupting cilia-dependent lipid raft dynamics, which protects mice from high fat diet-induced obesity. Furthermore, the elongated cilia on FAPs accelerate interleukin 13 secretion from FAPs, which promotes skeletal muscle regeneration. Further of APs and promote regeneration of muscle fibers. Overall, our results suggest a novel role for primary cilia in regulating adipogenesis and skeletal muscle regeneration.

研究分野：細胞生物学

キーワード：一次線毛 肥満 骨格筋再生 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

一次線毛は中心体から伸長する微小管構造を基本骨格とする細胞小器官である。ほぼ全ての哺乳類細胞に一次線毛を形成する能力が備わっており、一次線毛の形成不全や機能異常は、線毛病と総称される様々な疾患や発生異常(肥満、嚢胞腎、網膜変性、内臓逆位など)の原因となることが報告されている。しかしながら、一次線毛の形成メカニズム及び生理的意義、線毛病の原因メカニズムについては不明な部分も多く残されており、究明すべき喫緊の課題である。

研究代表者はこれまでに、一次線毛の形成においてユビキチン・プロテアソーム蛋白質分解系が関与することを世界で初めて証明し、その分子機構の一端として、一次線毛の形成を抑制する蛋白質トリコブレイン(TCHP)の分解が一次線毛形成に必要不可欠であることを細胞レベルで明らかにしてきた。さらに、トリコブレインの機能解析を通じて、一次線毛の新しい細胞機能として細胞増殖を制御する働きがあることを示してきた(Kasahara et al, *Nature Commun.* 2014; Inaba et al, *J. Cell Biol.* 2016; Kasahara et al, *Nature Commun.* 2014)。一方で、トリコブレインによる一次線毛制御の生理的意義は不明であり、マウスのなどの実験動物などを用いた解析の必要性が提起される。

2. 研究の目的

トリコブレインのノックアウトマウス(KOマウス)を作製し、一次線毛の形態に異常が生じる組織や細胞種の同定及び、KOマウスの表現型の解析を実施することで、一次線毛による生体調節の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) マウス実験: C57BL6/Jを用いてトリコブレイン KOマウスを作製した。マウスの高脂肪食摂取実験においては、生後6週まで通常食(DC-8 containing 4.5% crude fat, CLEA Japan, Inc)を与えた後、高脂肪食(Quick Fat containing 14.13% crude fat, CLEA Japan, Inc)へ移行した。コントロール実験は、6週後も通常食を与えた。骨格筋損傷モデルは、50 μ Lの50%グリセロールをマウスの左側前脛骨筋(tibialis anterior muscle)に投与した。コントロールでは、反対側前脛骨筋に同量の生理食塩水を投与した。

(2) 細胞培養: マウス肺由来C310T1/2細胞(ATCC)はL-Glutamineと10% FBSを添加したDMEM培地で培養した。マウス脂肪前駆細胞(adipose progenitors)は、8-20週齢の皮膚から、Adipose Tissue Progenitor Isolation Kit (Mitenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany)を用いて単離し、0.1% gelatinコートディッシュで、10 ng/ml basic FGFと10% FBSを添加したDMEM培地で培養したものを切り出し、dispase II、collagenase type I、collagenase type II処理により単離した。C310T1/2細胞及びマウス脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化は、分化誘導培地(10% FBS, 200 μ M indomethacin, 0.5 mM 3-isobutyl methylxanthine, 1 μ M dexamethasone, 10 μ g/mL insulin)で3日間培養し、その後、分化維持培地(10% FBS, 10 μ g/mL insulin)で2日間培養した。マウス間葉系前駆細胞(FAP細胞、Fibro-adipogenic progenitor cells)及び筋芽細胞は後足の骨格筋より採取し、それぞれ10%FBS、10 ng/mL human bFGF添加DMEM培地及び、20% FBS、5 ng/mL human bFGF添加F-10培地(0.67% gelatinコートディッシュ)で培養した。

4. 研究成果

(1) 一次線毛と肥満

トリコブレイン KOマウスは、通常飼育において外見上の大きな変化を示すことが無かったが、高脂肪食摂取条件においてコントロールマウスで観察される体重増加が起こりにくく、内臓脂肪や皮下脂肪の蓄積も少ないことを見出した。さらに、コントロールマウスで併発する脂肪肝や脂質異常なども起こりにくく、肥満及び肥満関連疾患に抵抗性を呈するマウスであることが判明した。

原因について解析したところ、KOマウスでは脂肪前駆細胞の一次線毛がコントロールと比較して有意に長く、これが原因で脂肪細胞(BODIPY陽性、Perilipin陽性)への分化が抑制されていることが分かった。同様に、トリコブレインをsiRNAでノックダウンしたC3H10T1/2細胞でも、一次線毛が伸長して脂肪細胞への分化が低下することを認めている。

さらに、マウス志望前駆細胞やC3H10T1/2細胞では、脂肪細胞への分化誘導刺激後、一次線毛近傍に脂質ラフトが集積し、そこで脂肪細胞への分化シグナル(Insulin-like growth factor 1 receptor, IGF1R-Akt経路)が活性化することを発見した。トリコブレインを機能阻害した細胞では、一次線毛が長くなることによって脂質ラフトの集積が阻害され、脂肪細胞への分化シグナ

ルが低下することを明らかにした。

本研究により、肥満における一次線毛の役割を分子レベルで解明された。さらに、一次線毛の新たな細胞機能として、脂質ラフトの動態を制御し、脂肪細胞へ分化を調節していることも明らかになった。本研究成果は、Cell Reports 誌 (Yamakawa, Katoh, Kasahara et al, 2021) に掲載された。

(2) 一次線毛と骨格筋再生

上記研究では、一次線毛が皮下脂肪や内臓脂肪の蓄積を制御していることを明らかにしてきた。一方、脂肪は骨格筋などのそれ以外の組織にも存在し、骨格筋においては損傷後の修復過程において脂肪沈着が観察されることが報告されている。そこで骨格筋における異所性脂肪沈着に一次線毛が関与しているか検討したところ、グリセロール筋注による骨格筋損傷モデルにおいて、トリコブレイン KO マウスでは脂肪沈着が著しく抑えられることが分かった。骨格筋においては内在する間葉系前駆細胞 (FAP 細胞) が脂肪細胞へ分化することが知られているが、KO マウスの FAP 細胞は、コントロールマウスよりも長い一次線毛を有すること、これにより一次線毛周辺の脂質ラフト動態が乱れるため、脂肪細胞への分化シグナルが低下することが分かった。これは、皮膚の脂肪細胞分化と同様の分子機序であることから、心臓の異所性脂肪沈着などその他の組織でも共通している可能性がある。今後、究明すべき課題であると考えられる。

骨格筋損傷後の脂肪沈着に加えて、トリコブレイン KO マウスでは筋線維の修復が早まることも分かった。分子機序の解明を進めた結果、FAP 細胞がインターロイキン 13 (IL13) の分泌細胞であること、KO マウスの FAP 細胞では、一次線毛が長くなることによって IL13 の分泌が亢進すること、IL13 が筋芽細胞の増殖を亢進することで筋線維の再生を促進することなどが明らかとなった。

本研究により、筋線維再生における一次線毛の役割が分子レベルで解明された。今後、加齢による筋力低下や筋ジストロフィーなどの難治性筋疾患における一次線毛の機能について解析し、治療法や予防法の開発につなげていく。本研究成果は、Advanced Science 誌 (Yamakawa, Tsuboi, Kasahara et al, 2022) に掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kasahara Kousuke, Inagaki Masaki	4. 巻 31
2. 論文標題 Primary ciliary signaling: links with the cell cycle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Trends in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 954 ~ 964
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tcb.2021.07.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamakawa Daishi, Katoh Daisuke, Kasahara Kousuke, Shiromizu Takashi, Matsuyama Makoto, Matsuda Chise, Maeno Yumi, Watanabe Masatoshi, Nishimura Yuhei, Inagaki Masaki	4. 巻 34
2. 論文標題 Primary cilia-dependent lipid raft/caveolin dynamics regulate adipogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108817 ~ 108817
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.108817	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shiromizu T, Yuge M, Kasahara K, Yamakawa D, Matsui T, Bessho Y, Inagaki M, Nishimura Y.	4. 巻 21
2. 論文標題 Targeting E3 Ubiquitin Ligases and Deubiquitinases in Ciliopathy and Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5962
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21175962.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yukimoto H, Miyamoto T, Kiyono T, Wang S, Matsuura S, Mizoguchi A, Katayama N, Inagaki M, Kasahara K.	4. 巻 527
2. 論文標題 A novel CDK-independent function of p27Kip1 in preciliary vesicle trafficking during ciliogenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 716-722
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.05.048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamakawa D, Tsuboi J, Kasahara K, Matsuda C, Nishimura Y, Kodama T, Katayama N, Watanabe M, Inagaki M.	4. 巻 14
2. 論文標題 Cilia-Mediated Insulin/Akt and ST2/JNK Signaling Pathways Regulate the Recovery of Muscle Injury.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Advanced Science	6. 最初と最後の頁 e2202632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/advs.202202632	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 笠原広介, 山川大史, 稲垣昌樹
2. 発表標題 一次繊毛による細胞増殖・分化制御と疾患
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笠原広介, 山川大史, 稲垣昌樹
2. 発表標題 ユビキチン修飾系による一次線毛動態制御と疾患治療
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲垣昌樹, 笠原広介, 山川大史, 松田知世, 渡邊昌俊
2. 発表標題 一次線毛と細胞増殖・分化・がん化
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	白水 崇 (Shiromizu Takashi) (00582678)	三重大学・医学系研究科・助教 (14101)	
研究 分担者	山川 大史 (Yamakawa Daishi) (20631097)	三重大学・医学系研究科・助教 (14101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------