

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06835

研究課題名(和文) 幹細胞老化と個体老化のエピジェネティック制御機構の解明

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of stem cell aging and organismal aging

研究代表者

西山 正章 (Nishiyama, Masaaki)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：50423562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：最近、自閉症スペクトラム障害の最も有力な原因候補遺伝子としてCHD8が同定され、世界中で大きな反響を呼んでいるが、われわれはヒト自閉症患者のCHD8変異を再現したモデルマウスを作製し行動解析を行ったところ、このマウスが自閉症様の行動異常を再現することを確認した [Nature 537: 675-9 (2016)]。この自閉症モデルマウスを用いて、自閉症が発症するメカニズムをトランスオミクス解析によって調べたところ、遺伝子変異によってCHD8の発現量が減少すると神経発生に重要な制御因子であるRESTが異常に活性化され、その結果として神経の発生遅延が起こることがわかった。

研究成果の概要(英文)：We showed that mice heterozygous for Chd8 mutations manifest ASD-like behavioural characteristics including increased anxiety, repetitive behaviour, and altered social behaviour. CHD8 haploinsufficiency did not result in prominent changes in the expression of a few specific genes but instead gave rise to small but global changes in gene expression in the mouse brain, reminiscent of those in the brains of patients with ASD. Gene set enrichment analysis revealed that neurodevelopment was delayed in the mutant mouse embryos. Furthermore, reduced expression of CHD8 was associated with abnormal activation of RE-1 silencing transcription factor (REST), which suppresses the transcription of many neuronal genes. REST activation was also observed in the brains of humans with ASD, and CHD8 was found to interact physically with REST in the mouse brain.

研究分野：Molecular biology

キーワード：Autism

## 1. 研究開始当初の背景

多くの研究により、組織幹細胞の老化が神経変性疾患やがんなどの加齢関連疾患の根底にあることが明らかになっている。幹細胞の老化は不可逆的であると考えられてきたが、最近の知見では、老化した組織幹細胞を再活性化させることによって、老化表現型のいくつかの側面を回復できる可能性が示唆されている。一方で、老化は発がんの主要な防御機構であり、過剰な抗老化は発がんリスクを増大させるため、そのバランス調節は重要な課題である。

われわれは、がん抑制タンパク質 p53 に結合し、アポトーシスを抑制する CHD8 というタンパク質を発見し、これが発生期の器官形成に重要な役割を果たしていることを示してきた [Nishiyama et al., *Nature Cell Biol.* 11: 172-82 (2009)]. CHD8 は p53 とヒストン H1 との三量体を形成することによって、p53 の転写活性を抑制し、最終的にアポトーシスを阻害する。その後の研究の中で、CHD8 の強制発現は p53 誘導性の細胞老化を抑制すること、CHD8 強制発現細胞はヌードマウス移植で巨大な腫瘍を形成することが明らかになっている。

最近、大規模エクソーム解析の結果から、自閉症スペクトラム障害の最も有力な原因候補遺伝子としてこの CHD8 が同定され、世界中で大きな反響を呼んでいる。われわれの予備的な研究によって、CHD8 は神経幹細胞機能の維持に必須であり、CHD8 ヘテロ欠損マウスは神経細胞の分化異常を来し、自閉症様症状を呈することが判明した。

## 2. 研究の目的

本研究では、組織幹細胞の老化における CHD8 の重要性を明らかにし、CHD8 の発現レベルを調節することによって組織幹細胞を若返らせることは可能かどうかを検討することを目的とする。この目的のために、以下の4つの疑問に対して研究を進めたい。

- 1) CHD8 は全ての組織幹細胞に発現しているのか？
- 2) CHD8 は組織幹細胞の老化制御に重要な役割を果たしているのか？
- 3) CHD8 の標的分子は何か？ CHD8 の発現を制御している上位分子は何か？
- 4) CHD8 の発現を調節することによって幹細胞の老化を抑制し、がんを起こすことなく、個体老化を抑制できるか？

具体的な達成目標は下記の通りである。

### 1) 全身の幹細胞における CHD8 の発現パターンの解析

前段階研究によって、胚性幹細胞および一部の組織幹細胞（神経・造血・間葉系）においては CHD8 が高発現していることがほぼ確定しているが、今後は他の幹細胞（特に腸管・皮膚・乳腺など）でその詳細な発現解析を行う。

### 2) 幹細胞老化における CHD8 の機能評価

前段階研究によって、体細胞においては CHD8 が p53 誘導性の細胞老化を抑制することが判明しているが、今後は種々の幹細胞におけるコンディショナルノックアウトマウスを用いて、それぞれの幹細胞で CHD8 が細胞老化を制御しているかどうかを検討する。

### 3) CHD8 による幹細胞老化の制御機構の解明

プロテオーム、ChIP-Seq および RNA-Seq 解析によって、幹細胞における CHD8 の標的遺伝子を網羅的に探索する。さらに CHD8 のプロモーター領域を解析し、遺伝子発現に影響を与えるシス領域を決定すると共に、そこに結合するトランス因子を同定する。

### 4) CHD8 の発現調節による幹細胞若返りと加齢関連疾患の治療への応用

様々な発現レベルの発現誘導型トランスジェニックマウスを用いて、種々の幹細胞に CHD8 を発現誘導し、幹細胞老化に与える影響を調べる。最終的には、がんを起こさずに個体老化を抑制する発現レベルを決定する。

## 3. 研究の方法

### ① 種々の組織幹細胞における CHD8 の詳細な発現パターンの解析

若齢および老齢マウスにおける種々の組織幹細胞（神経・造血・腸管・皮膚・乳腺・間葉系など）およびそれらの分化段階での CHD8 の発現様式を免疫組織学的解析によって調べる。また採取したマウス由来の組織幹細胞を試験管内で分化誘導し、定量的 RT-PCR もしくはウェスタンブロットを行う。若齢マウスにおいて、CHD8 は一部の組織幹細胞（神経・造血・間葉系）で高発現しているが、分化にともなってその発現レベルは低下することが予備的研究からわかっている。

## ②CHD8 コンディショナルノックアウトマウスにおける幹細胞老化に関する解析

CHD8 の Flox アリルマウスは、既にわれわれのラボにおいて作製済みである。まず種々の組織幹細胞で特異的に CHD8 を欠損したマウスラインを多数構築する。次に幹細胞マーカーおよび分化マーカーの免疫組織学的解析もしくは FACS 解析を行い、組織幹細胞の自己複製能と多分化能について評価する。また老化マーカーおよび SA- $\beta$ -gal 活性を定量し、CHD8 の欠損が幹細胞老化に与える影響について評価する。さらにマウスから採取した組織幹細胞もしくはそれらの分化培養条件でも同様の解析を行う。少なくとも神経系において CHD8 を欠損させると、著しく幹細胞機能が障害されることを確認している。

## ③発現誘導型 CHD8 トランスジェニックマウスにおける幹細胞老化に関する解析

われわれは既に、Cre-loxP システムを用いて CHD8 を発現誘導できるマウスの作製に成功している。これらのマウスには、誘導する CHD8 のコピー数とプロモーターが異なる複数の系統が存在し、CHD8 の発現量を調節できる。コンディショナルノックアウトマウスと同様に、各種の組織幹細胞特異的 Cre トランスジェニックマウスと交配し、種々の組織幹細胞で（特定の時期に）CHD8 を発現誘導したマウスラインを多数構築し、上記と同様の解析を行う。

## ④組織幹細胞における CHD8 標的遺伝子の網羅的探索

われわれは、CHD8 によるヒストン H1 のリクルートが Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナル伝達の抑制に必須であることを明らかにしており [Nishiyama et al., *Mol. Cell. Biol.* 32: 501-12 (2012)], CHD8/ヒストン H1 の標的遺伝子は p53 以外にも存在することが示唆されている。最近、マウス脳組織の ChIP-Seq および RNA-Seq 解析を行い、いくつかの新しい標的候補遺伝子を同定した。発現誘導型トランスジェニックマウスを用いて、CHD8 を発現誘導した種々の組織幹細胞で同様の解析を行い、標的遺伝子を網羅的に探索する。同定した標的遺伝子候補は CHD8 コンディショナルノックアウトマウスを用いてバリデーション研究を行う。

## ⑤CHD8 の発現を上位からコントロールする分子機構の解明

CHD8 のプロモーター領域を ENCODE データベースから解析し、遺伝子発現調節に重要なシス領域を推定する。また実際にプロモーターをゲノム DNA よりクローニングし、ルシフェラーゼアッセイにより確認を行う。そのシス領域に結合するトランス因子を ENCODE データベースまたは実際の実験（生化学的精製や Yeast 1-hybrid 法等）によって決定する。特に、幹細胞老化やがん化に関連するシス・トランス因子があれば、それを中心に発現機能解析を行う。

## ⑥発現誘導型 CHD8 トランスジェニックマウスにおける発がんに関する解析

組織幹細胞への CHD8 の発現誘導が生体内でがんを起こすかどうかを検討するために、発現誘導型 CHD8 トランスジェニックマウスの自然発がんまたは誘発がん（神経・造血・腸管・皮膚など）の発生率と生命予後について検討する。成体あるいは老化個体の組織幹細胞にも CHD8 を発現誘導して同様の解析を行う。また老化モデルとして入手した *klotho* マウスと発現誘導型 CHD8 トランスジェニックマウスを交配させることにより、その発がん率と生命予後がどのように影響されるかを検討する。さらに CHD8 の発現調節によって、がんを起こさずに個体老化を抑制することは可能かどうかについても検討を加える。

## 4. 研究成果

本研究は幹細胞老化と個体老化のエピジェネティック制御機構の解明を目指し、クロマチンリモデリング因子 CHD8 による幹細胞老化制御メカニズムの全貌を解明すると共に、神経変性疾患やがんなどの加齢関連疾患にこのシステムがどのように関与しているのかを明らかにすることを目的としている。最近、自閉症スペクトラム障害の最も有力な原因候補遺伝子としてこの CHD8 が同定され、世界中で大きな反響を呼んでいるが、われわれはヒト自閉症患者の CHD8 変異を再現したモデルマウスを作製し行動解析を行ったところ、このマウスが自閉症様の行動異常を再現することを確認した [Katayama et al., *Nature* 537: 675-9 (2016)]。この自閉症モデルマウスを用いて、自閉症が発症するメカニズムをトランスオミクス解析によって調べたところ、遺伝子変異によって CHD8 の発現量が減少すると神経発生に重要な制御因子である REST が異常に活性化され、その結果として神経の発生遅延が起こることがわかつ

た。

さらに、われわれは各種の組織幹細胞（神経、間葉系、造血）特異的 CHD8 ノックアウトマウスを作製したところ、各組織における著しい分化異常を来すことが明らかとなった。特に、CHD8 を欠損した造血幹細胞は、老齢マウスの造血幹細胞と類似した異常な増加が観察され、骨髄移植実験における骨髄再構築能力が著しく障害されていた。われわれは今までに、CHD8 ががん抑制タンパク質 p53 を抑制することを発見しているが、造血幹細胞において CHD8/p53 ダブルノックアウトマウスを作製すると、上記の造血幹細胞の異常な増加が顕著に抑えられ、骨髄移植実験における骨髄再構築能が回復することがわかった。これらの結果から、CHD8 は幹細胞の機能維持において重要であり、CHD8-p53 系が重要な役割を担っていることが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 6 件）

- 1) Kita, Y., Katayama, Y., Shiraishi, T., Oka, T., Sato, T., Suyama, M., Ohkawa, Y., Miyata, K., Oike, Y., Shirane, M., \*Nishiyama, M., \*Nakayama, K. I.: The autism-related protein CHD8 cooperates with C/EBP $\beta$  to regulate adipogenesis. *Cell Rep.*, 23: 1988-2000 (2018). (\*Co-corresponding author)
- 2) Muto, Y., \*Nishiyama, M., Nita, A., Moroishi, T., \*Nakayama, K. I.: Essential role of FBXL5-mediated cellular iron homeostasis in maintenance of hematopoietic stem cells. *Nature Commun.*, (査読有) 8: 16114 (2017). (\*Co-corresponding author)
- 3) Yamauchi, T., \*Nishiyama, M., Moroishi, T., Kawamura, A., \*Nakayama, K. I.: FBXL5 inactivation in mouse brain induces aberrant proliferation of neural stem progenitor cells. *Mol. Cell. Biol.*, (査読有) 37: e00470-16 (2017). (\*Co-corresponding author)
- 4) Katayama, Y., \*Nishiyama, M., Shoji, H., Ohkawa, Y., Kawamura, A., Sato, T., Suyama, M., Takumi, T., Miyakawa, T., \*Nakayama, K. I.: CHD8 haploinsufficiency results in autistic-like phenotypes in mice. *Nature*, (査読有) 537: 675-679 (2016). (\*Co-corresponding author)
- 5) Nita, A., \*Nishiyama, M., Muto, Y., \*Nakayama, K. I.: FBXL12 regulates T-cell differentiation in a cell-autonomous manner. *Genes Cells*, (査読有) 21: 517-524 (2016). (\*Co-corresponding author)
- 6) Nishiyama, M., Nita, A., Yumimoto, K., Nakayama, K. I.: FBXL12-Mediated Degradation of ALDH3 is Essential for Trophoblast Differentiation During Placental Development. *Stem Cells*, (査読有) 33: 3327-3340 (2015).

〔学会発表〕（計 20 件）

- 1) 武藤義治, 西山正章, 諸石寿朗, 中山敬一: ユビキチンリガーゼ FBXL5 による鉄代謝制御と肝がん抑制 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (神戸, 2017.12.8)
- 2) 喜多泰之, 西山正章, 片山雄太, 白根道子, 中山敬一: 自閉症関連因子 CHD8 は C/EBP $\beta$  と協調して脂肪分化を制御する 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (神戸, 2017.12.8)
- 3) 仁田暁大, 西山正章, 武藤義治, 片山雄太, 中山敬一: クロマチンリモデリング因子 CHD8 による幹細胞老化の防止機構の解明 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (神戸, 2017.12.7)
- 4) 片山雄太, 西山正章, 昌子浩孝, 大川恭行, 川村敦生, 佐藤哲也, 須山幹太, 内匠透, 宮川剛, 中山敬一: クロマチンリモデリングの異常によって発症する ASD の分子病態 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (神戸, 2017.12.6)
- 5) Kita, Y., Nishiyama, M., Katayama, Y., Miyata, K., Oike, Y., Nakayama, K. I.: The autism-related gene Chd8 is essential for adipogenesis. 11th International Symposium of The Institute Network (徳島, 2017.1.26)
- 6) 片山雄太, 西山正章, 昌子浩孝, 大川恭行, 川村敦生, 佐藤哲也, 須山幹太, 内匠透, 宮川剛, 中山敬一: Aberrant REST activation is associated with CHD8 deficiency in autism. 新学術領域研究 (マイクロエンドフェノタイプによる精神病態学の創出) 班会議 (新潟, 2017.1.21)
- 7) 武藤義治, 西山正章, 仁田暁大, 諸石寿朗, 中山敬一: ユビキチンリガーゼ FBXL5 による鉄代謝制御の重要性 第 39 回日本分子生物学会年会 (横浜, 2016.12.2)
- 8) 仁田暁大, 西山正章, 中山敬一: クロマチンリモデリングによる幹細胞老化と癌の制御機構解明 第 39 回日本分子生物学会年会 (横浜, 2016.12.2)

- 9) 片山雄太, 西山正章, 昌子浩孝, 大川恭行, 川村敦生, 佐藤哲也, 須山幹太, 内匠透, 宮川剛, 中山敬一: 発生期におけるクロマチンリモデリング異常は自閉症の原因となる 第39回日本分子生物学会年会 (横浜, 2016.11.30)
- 10) 川村敦生, 西山正章, 片山雄太, 中山敬一: クロマチンリモデリング因子 CHD8 はオリゴデンドロサイトの分化に必須である 第39回日本分子生物学会年会 (横浜, 2016.11.30)
- 11) 片山雄太, 西山正章, 昌子浩孝, 大川恭行, 川村敦生, 佐藤哲也, 須山幹太, 内匠透, 宮川剛, 中山敬一: 発生期におけるクロマチンリモデリング異常は自閉症の原因となる 新学術領域研究 (生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御、ステムセルエイジングから解明する疾患原理) 合同若手育成合宿 (大分, 2016.7.28)
- 12) 川村敦生, 西山正章, 片山雄太, 昌子浩孝, 宮川剛, 大川恭行, 佐藤哲也, 須山幹太, 中山敬一: CHD8 haploinsufficiency in oligodendrocytes results in autistic-like phenotypes in mice 新学術領域研究 (グリアアセンブリによる脳機能発現の制御と病態) 夏のワークショップ (山形, 2016.7.15)
- 13) 片山雄太, 西山正章, 昌子浩孝, 大川恭行, 川村敦生, 佐藤哲也, 須山幹太, 内匠透, 宮川剛, 中山敬一: 発生期におけるクロマチンリモデリング異常は自閉症の原因となる 新学術領域研究 (マイクロエンドフェノタイプによる精神病態学の創出) 若手育成合宿 (埼玉, 2016.3.3)
- 14) 川村敦生, 西山正章, 片山雄太, 中山敬一: クロマチンリモデリング因子 CHD8 はオリゴデンドロサイトの分化に必須である 新学術領域研究 (マイクロエンドフェノタイプによる精神病態学の創出) 若手育成合宿 (埼玉, 2016.3.3)
- 15) 仁田暁大, 西山正章, 中山敬一: クロマチンリモデリングによる幹細胞老化と癌の制御機構解明 新学術領域研究 (幹細胞老化と疾患) 若手の会 (熱海, 2016.1.29)
- 16) 仁田暁大, 西山正章, 中山敬一: ユビキチンリガーゼ FBXL12 による ALDH3 分解促進と胸腺細胞分化制御に果たす役割の解析 第38回日本分子生物学会年会 (神戸, 2015.12.3)
- 17) 西山正章, 仁田暁大, 弓本佳苗, 中山敬

一: FBXL12 による ALDH3 の分解はトロホブラストの分化に必須である 第38回日本分子生物学会年会 (神戸, 2015.12.1)

- 18) 武藤義治, 西山正章, 諸石寿朗, 中山敬一: 肝臓におけるユビキチンリガーゼ FBXL5 欠損は鉄代謝異常と肝がんを生じる 第38回日本分子生物学会年会 (神戸, 2015.12.1)

- 19) 川村敦生, 西山正章, 片山雄太, 中山敬一: クロマチンリモデリング因子 CHD8 はオリゴデンドロサイトの分化に必須である 第38回日本分子生物学会年会 (神戸, 2015.12.1)

- 20) 川村敦生, 西山正章, 片山雄太, 中山敬一: クロマチンリモデリング因子 CHD8 はオリゴデンドロサイトの分化に必須である 新学術領域研究 (マイクロエンドフェノタイプによる精神病態学の創出) 第1回領域会議 (山梨, 2015.8.30)

[図書] (計2件)

- 1) 片山雄太, 西山正章, 中山敬一: CHD8 のハプロ不全は REST を異常活性化し自閉症の発症原因となる 実験医学, (査読無) 35: 61-64 (2017).
- 2) 川村敦生, 西山正章, 中山敬一: 自閉症スペクトラムの原因遺伝子 CHD8 分子精神医学, (査読無) 16: 126-128 (2016).

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

<http://anal.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西山 正章 (NISHIYAMA, Masaaki)  
金沢大学・医学系・教授

研究者番号：50423562

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

中山 敬一 (NAKAYAMA, Keiichi)  
九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：80291508

### (4) 研究協力者

なし ( )