

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501305

研究課題名(和文)クロマチンリモデリングによる老化と癌の制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanisms that control aging and cancer by chromatin remodeling

研究代表者

西山 正章(NISHIYAMA, MASAOKI)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

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)：組織幹細胞の老化は神経変性疾患や癌などの加齢関連疾患の発症に深く関与している。われわれは、クロマチンリモデリング因子CHD8がp53に結合し、アポトーシスを抑制することによって発生期の器官形成に重要な役割を果たしていることを発見した。その後、CHD8はp53誘導性のアポトーシスだけでなく細胞老化も抑制し、強力な発癌活性を示すことが明らかになった。また最近、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。われわれの研究によって、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自閉症様症状を呈することが判明した。

研究成果の概要(英文)：Cellular senescence of tissue stem cells are deeply involved in the onset of age-related diseases, such as neurodegenerative diseases and cancer. We found that the chromatin remodeling factor CHD8 binds to tumor suppressor protein p53 and inhibits p53-mediated apoptosis, which plays an important role in organogenesis during embryogenesis. We next revealed that CHD8 inhibits not only p53-induced apoptosis but also cellular senescence and exhibits potent transforming activity. More recently, CHD8 is identified as the most frequently mutated gene in autism spectrum disorder (ASD), which creates a big sensation all over the world. Furthermore, we found that CHD8 is essential for maintenance of neural stem cells and mice heterozygous for CHD8 gene were found to manifest ASD-like phenotypes.

研究分野：分子生物学

キーワード：発がん エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

癌抑制機構としての老化

細胞老化は、さまざまなストレス刺激によって引き起こされる安定な細胞周期停止によって特徴づけられるが、その本質はクロマチン構造の不可逆的な変化であると考えられている。細胞老化は癌遺伝子によっても惹起され、細胞自身が内在性にも癌抑制機構としての役割が想定されており、このことから細胞老化機構は癌治療の対象として期待されている。

老化と寿命を制御する癌抑制タンパク質 p53

p53 は主要な老化制御因子であり、その強力な癌抑制活性によって寿命を保証している。いくつかのマウスモデルでは、持続的な低レベルの p53 活性が早期老化を引き起こす。一方、正常な p53 基礎レベルを保ちながら p53 応答を開始する能力を高められたマウスは、早期老化を起こすことなく非常に強力な癌耐性を示す。つまり、p53 はある状況では老化プロセスを加速して寿命を短縮するのに対して、他の状況では寿命を延長することもできる。

p53 結合分子としての CHD8 の発見

われわれはこの 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(図 1)。つまり、CHD8 は既にクロマチン上に結合している p53 すらも抑制できる“抗 p53 最終機構”を形成していることが判明している。

2. 研究の目的

本研究では CHD8 の老化に果たす役割を分子細胞レベルだけではなく、個体レベルで解明し、癌との関係を明らかにすることが目的である。この目的のために、以下の3つの疑問に対して研究を進めたい。

- 1) 細胞レベルで CHD8 の発現量を調節して、クロマチンへのヒストン H1 供給と p53 の転写活性を調節できるか？それによって細胞老化とトランスフォーム活性を制御できるか？
- 2) 個体レベルで、CHD8 の発現誘導は組織幹細胞および組織の老化を抑制し、寿命を延長できるか？特定の臓器で組織老化を抑制すると寿命は延長されるか？老化した個体を若返らせることは可能か？
- 3) CHD8 の発現誘導は生体内で癌を起こ

すか？癌を起こすことなく、寿命を延長することは可能か？

具体的な達成目標は下記の通りである。

- 1) 発現誘導型 CHD8 トランスジェニック (i-CHD8) マウスの作製とその細胞レベルでの解析。既に前段階研究によって i-CHD8 マウスの作製には成功した。胎仔由来線維芽細胞 (MEF) において、Cre-loxP システムを用いて CHD8 を発現誘導できることが判明している。MEF における細胞老化とトランスフォーム活性について検討する。
- 2) i-CHD8 マウスの個体レベルでの解析。Cre-loxP システムによって CHD8 を時空間特異的に発現誘導し、マウスにおける組織老化および寿命について詳細な観察を行う。
- 3) CHD8 標的遺伝子の網羅的探索。CHD8 の標的遺伝子は p53 以外にも存在することが示唆されており、i-CHD8 マウス由来の細胞あるいは組織を用いて複合体解析および ChIP-seq 解析を行う。
- 4) 老化と癌の分子機構の解明。CHD8 が単独で強力なトランスフォーメーション活性を示すことがほぼ確定しているが、実際に生体内で癌を起こすかどうかを検討するために i-CHD8 マウスの発癌率と生命予後について検討する。

3. 研究の方法

1) 発現誘導型 CHD8 トランスジェニック (i-CHD8) マウスの作製とその細胞レベルでの解析

遍在的に発現している ROSA26 遺伝子座に、loxP 配列で挟んだ stop カセットに続けて CHD8 の cDNA をノックインする。このマウスでは、Cre リコンビナーゼによって stop カセットが除去されると、内因性の ROSA26 プロモーター下に CHD8 が発現誘導される。誘導する CHD8 のコピー数 (1 または 2 アレル) とプロモーター (ROSA26 または CAG) が異なる系統を作製し、CHD8 の発現量を調節する。これらのマウスから MEF を調製し、p53 の転写活性とクロマチンへのヒストン H1 供給、あるいは細胞老化とトランスフォーム活性に及ぼす効果について検証する。

2) 発現誘導型 CHD8 トランスジェニック (i-CHD8) マウスの個体レベルでの解析

われわれは既に、各種プロモーター下に発

現する Cre トランスジェニックマウス系統を完備している。この中で E^α-Cre トランスジェニックマウスを i-CHD8 マウスと交配し、恒常的に CHD8 を発現したマウスを作製する。このマウス由来の組織幹細胞（造血、神経、肝、皮膚、腸管上皮など）を体外培養し、その機能（増殖能と分化能）について検討するとともに、組織老化および寿命について詳細な観察を行う。また各臓器特異的 Cre トランスジェニックマウスとの交配により、特定臓器で CHD8 を発現させ同様の観察を行う。それによって、特定臓器の組織老化抑制が全身臓器の組織老化抑制につながり、ひいては寿命の延長につながるかどうかを検討する。さらに CAG-Cre-ER トランスジェニックマウスとの交配によって得られたマウスを自然老化させ、タモキシフェン誘導性に CHD8 を発現させ、老化した個体を若返らせることが可能かどうかを検討する。早期老化モデルマウスとして入手、作製した klotho マウス、CHD8 コンディショナルノックアウトマウスとの交配によっても同様の検討を行う。

3) CHD8 標的遺伝子の網羅的探索

最近われわれは、CHD8 によるヒストン H1 のリクルートが Wnt/β-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（投稿中）、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。i-CHD8 マウスにおいて発現誘導される CHD8 には、そのアミノ末端に 6xHis および FLAG タグが付加されているので、それらを用いて免疫沈降し精製することが可能である。時空間特異的に CHD8 を発現誘導した細胞あるいは組織を用いてプロテオームおよび ChIP-Seq 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。

4) 老化と癌の分子機構の解明

CHD8 の発現誘導が、実際に生体内で癌を起こすかどうかを検討するために、作製した i-CHD8 マウスの自然発癌または誘発癌（大腸、肺、肝、子宮、脳、皮膚など）の発生率と生命予後について検討する。また老化モデルとして入手、作製した klotho マウス、CHD8 コンディショナルノックアウトマウスと i-CHD8 マウスを交配させることにより、その発癌率と生命予後がどのよ

うに影響されるかどうかを検討する。さらに CHD8 の発現調節によって、癌を起こさずに寿命を延長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

組織幹細胞の老化は神経変性疾患や癌などの加齢関連疾患の発症に深く関与している。最近の知見では、老化した組織幹細胞の機能を回復させることによって、これらの疾患を治療できる可能性が示唆されている。われわれは、クロマチンリモデリング因子 CHD8 が癌抑制タンパク質 p53 に結合し、アポトーシスを抑制することによって発生期の器官形成に重要な役割を果たしていることを発見した。その後の研究で、CHD8 は p53 誘導性のアポトーシスだけでなく細胞老化も抑制し、強力な発癌活性を示すことが明らかになった。つまり CHD8 は強力な抗老化分子である。また最近、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。われわれの研究によって、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自閉症様症状を呈することが判明した [Katayama et al., *Nature* (in revision)]。

そこで、今後の研究では「組織幹細胞の若返りによる疾患治療」を目指し、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、神経変性疾患や癌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。具体的な到達目標としては、(1) 種々の組織幹細胞における CHD8 の発現パターンを解析する。(2) コンディショナルノックアウトマウスを用いて、幹細胞老化における CHD8 の役割を評価する。(3) 網羅的解析によって CHD8 の上下流分子を同定し、幹細胞老化の制御メカニズムを明らかにする。(4) 発現誘導型トランスジェニックマウスを用いて、癌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。本研究の遂行によって、幹細胞老化のエピジェネティック制御機構とその制御異常によるヒト加齢関連疾患の発症メカニズムが明らかになり、その根本的治療法の確立へつながることが期待される。

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4件)

- (1)Yamauchi, T., Nishiyama, M., Moroishi, T., Yumimoto, K., *Nakayama, K. I.: MDM2 mediates nonproteolytic polyubiquitylation of the DEAD-Box RNA helicase DDX24. *Mol. Cell. Biol.*, (査読有) 34: 3321-3340 (2014).
- (2)Moroishi, T., Yamauchi, T., Nishiyama, M., *Nakayama, K. I.: HERC2 targets the iron regulator FBXL5 for degradation and modulates iron metabolism. *J. Biol. Chem.*, (査読有) 289: 16430-16441 (2014).
- (3)Nishiyama, M., Skoultschi, A. I., *Nakayama, K. I.: Histone H1 recruitment by CHD8 is essential for suppression of the Wnt-beta-catenin signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.*, (査読有) 32: 501-512 (2012).
- (4)Kita, Y., Nishiyama, M., *Nakayama, K. I.: Identification of CHD7(S) as a novel splicing variant of CHD7 with functions similar and antagonistic to those of the full-length CHD7(L). *Genes Cells*, (査読有) 17: 536-547 (2012).

〔学会発表〕(計21件)

- (1)山内隆好, 西山正章, 諸石寿朗, 武藤義治, 中山敬二, FBXL5-IRP2 軸による鉄代謝調節は神経幹細胞の恒常性維持に必須である, 新学術領域研究(コピキチンネオバイオロジー)平成26年度第1回領域会議, 2014.12.4.: 愛知
- (2)武藤義治, 西山正章, 諸石寿朗, 中山敬二, 造血幹細胞におけるコピキチンリガーゼ FBXL5 による鉄代謝制御の重要性, 新学術領域研究(コピキチンネオバイオロジー)平成26年度第1回領域会議, 2014.12.4.: 愛知
- (3)武藤義治, 西山正章, 諸石寿朗, 中山敬二, 造血幹細胞の機能維持におけるコピキチンリガーゼ FBXL5 による鉄代謝制御の重要性, 第37回日本分子生物学会年会, 2014.11.28.: 横浜
- (4)喜多泰之, 西山正章, 片山雄太, 中山敬二, CHD8 は Ppar と C/ebp の転写活性化を介して脂肪分化を誘導する, 第37回日本分子生物学会年会, 2014.11.26.: 横浜
- (5)西山正章, 仁田暁大, 弓本佳苗, 中山敬二, FBXL12 による ALDH3 の分解は幹細胞状態からの脱出プログラムに必須である, 第37回日本分子生物学会年会, 2014.11.25.: 横浜
- (6)片山雄太, 西山正章, 大川恭行, 佐藤哲也, 須山幹太, 中山敬二, CHD8L アイソフォームの発生と分化における機能の解析, 第37回日本分子生物学会年会, 2014.11.25.: 横浜
- (7)山内隆好, 西山正章, 諸石寿朗, 武藤義治, 中山敬二, FBXL5-IRP2 軸による鉄代謝調節は神経幹細胞の恒常性維持に必須である, 第37回日本分子生物学会年会, 2014.11.25.: 横浜
- (8)Yamauchi, T., Nishiyama, M., Moroishi, T., Muto, Y., Nakayama, K. I.: Regulation of iron metabolism by the FBXL5-IRP2 axis is essential for neural stem cell homeostasis. Annual Meeting of Grants-in-Aid for

Scientific Research, "Ubiquitin neobiology", Symposium for young ubiquitin researcher, International Institute for Advanced Studies.: 2014.11.12.: 京都

(9)Muto, Y., Nishiyama, M., Moroishi, T., Yamauchi, T., Nakayama, K. I.: Proteolytic control of iron metabolism by the ubiquitin ligase FBXL5 and its suppressive role in carcinogenesis in the liver. Annual Meeting of Grants-in-Aid for Scientific Research, "Ubiquitin neobiology", Symposium for young ubiquitin researcher, International Institute for Advanced Studies.: 2014.11.12.: 京都

(10)Nishiyama, M., Nita, A., Yumimoto, K., Nakayama, K. I.: FBXL12-mediated degradation of ALDH3 is essential for the exit program from the stem cell state. The 24th Hot Spring Harbor International Symposium.: 2014.11.8.: 福岡

(11)Muto, Y., Nishiyama, M., Moroishi, T., Nakayama, K. I.: Role of the ubiquitin ligase FBXL5 controlling iron metabolism in hematopoietic stem cells. The 24th Hot Spring Harbor International Symposium.: 2014.11.8.: 福岡

(12)Nishiyama, M., Nakayama, K. I.: Regulation of trophoblast stem cell fate by SCFFBXL12 ubiquitin ligase complex. 第36回日本分子生物学会年会, 2013.12.3.-2013.12.6.: 神戸

(13)Yamauchi, T., Nishiyama, M., Moroishi, T., Yumimoto, K., Nakayama, K. I.: MDM2 mediates nonproteolytic polyubiquitylation of the DEAD-Box RNA helicase DDX24 to regulate pre-tRNA processing. 第36回日本分子生物学会年会, 2013.12.3.-2013.12.6.: 神戸

(14)Nishiyama, M., Nakayama, K. I.: FBXL12 targets ALDH3A1 for degradation to regulate the fate of trophoblast stem cells. The Joint Symposium of the 23rd Hot Spring Harbor International Symposium and the 3rd 'Grants for Excellent Graduate Schools' International Symposium.: 2013.11.5.: 福岡

(15)Yamauchi, T., Nishiyama, M., Moroishi, T., Yumimoto, K., Nakayama, K. I.: MDM2 mediates nonproteolytic polyubiquitylation of the DEAD-Box RNA helicase DDX24 to regulate pre-rRNA processing. Post-GCOE Symposium & Retreat in Singapore with NUS & TLL.: 2013.3.4.: Singapore

(16)中山敬二, 西山正章, 諸石寿朗, コピキチン化による鉄代謝制御機構とその破綻, 第85回日本生化学会大会(招待講演), 2012.12.16.: 福岡

(17)諸石寿朗, 西山正章, 山内隆好, 武田有紀子, 岩井一宏, 中山敬二, 生体における鉄代謝制御の中心をなす FBXL5-IRP2 系の発見, 第85回日本生化学会大会(招待講演), 2012.12.15.: 福岡

(18)山内隆好, 西山正章, 諸石寿朗, 弓本佳苗, 押川清孝, 中山敬二, MDM2 による RNA ヘリカーゼ DDX24 の非分解的制御機構の解明, 第35回日本分子生物学会年会, 2012.12.14.: 福岡

(19)諸石寿朗, 西山正章, 岩井一宏, 中山敬二, コピキチンリガーゼ FBXL5 による鉄代

謝制御と肝がん, 第 35 回日本分子生物学会
年会, 2012.12.13.: 福岡

(20) 喜多泰之, 西山正章, 中山敬一, クロ
マチンリモデリングタンパク質 CHD7 の新規
スプライシングバリエーションの発見とその機
能解析, 第 35 回日本分子生物学会年会,
2012.12.11.: 福岡

(21) Moroishi, T., Nishiyama, M., Takeda, Y., Iwai, K.,
Nakayama, K. I.: The FBXL5-IRP2 axis is integral to
control of iron metabolism in vivo. The Joint
Symposium of the 7th International Symposium of the
Institute Network and the 45th IDAC Symposium, the
2nd Symposium for Joint Usage/Research Center of
Aging.: 2012.6.14.: 仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/saibou/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 正章 (NISHIYAMA, Masaaki)
九州大学・生体防御医学研究所・助教
研究者番号: 5 0 4 2 3 5 6 2

(2) 研究分担者

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: 8 0 2 9 1 5 0 8

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: