

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 2 4 年 5 月 1 8 日現在

機関番号：1 7 1 0 2

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2011

課題番号：2 2 6 8 0 0 6 1

研究課題名（和文） CHD8 / ヒストン H1 複合体による老化とがんのエピジェネティック制御機構の研究

研究課題名（英文） Research on epigenetic regulation of aging and cancer by CHD8/histone H1 complex

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：5 0 4 2 3 5 6 2

研究成果の概要（和文）：

最近われわれは、クロマチンリモデリング因子 CHD8 がクロマチン上にリンカーヒストン H1 を呼び込むことによって p53 機能を抑制することを見出したが、CHD8/ヒストン H1 複合体は細胞老化におけるクロマチンリモデリングに重要な役割を果たしていることが予想された。そこでまず正常細胞で CHD8 を過剰発現し、細胞老化に及ぼす効果について検討したところ、CHD8 の強制発現は p53 誘導性の細胞老化を抑制することが明らかとなった。次に発現誘導型 CHD8 トランスジェニックマウスを作製することによって、CHD8 が強力なトランスフォーメーション活性を示すことを明らかにした。また正常老化マウスや老化モデルマウスでは、CHD8/ヒストン H1 の発現レベルが著明に低下していることが判明しており、さらに正常細胞でヒストン H1 をノックダウンすると細胞老化が誘導され、CHD8 ノックアウトマウス由来の細胞も同様に細胞老化を来すことが明らかとなった。つまり、CHD8 は抗老化作用をもつことが予想されるだけでなく、がん遺伝子として機能する可能性が高いものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We recently have found that a chromatin remodeling factor CHD8 suppresses p53 function by recruiting the linker histone H1 on chromatin, and expected that a CHD8/histone H1 complex may play an important role in chromatin remodeling in cellular senescence. First, we investigated the effect of CHD8 overexpression on cellular senescence in normal cells, and revealed that forced expression of CHD8 inhibits p53-induced cellular senescence. We next generated CHD8-inducible transgenic mice, and revealed that CHD8 has a potent transforming activity. In normal aging or premature aging mice, we found that the expression level of CHD8/histone H1 is markedly decreased. Furthermore, we found that cellular senescence is induced in histone H1-knockdown cells or the cells derived from CHD8-knockout mice. Taken together, it is expected that CHD8 not only has anti-aging effect, but also functions as an oncogene.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2 0 1 0 年度	10,400,000	3,120,000	13,520,000
2 0 1 1 年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
年度			
年度			
年度			
総 計	19,700,000	5,910,000	25,610,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・発がん
キーワード：遺伝子、発生・分化、動物、癌、老化

1. 研究開始当初の背景

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。生体において老化細胞が発見されたり、臓器幹細胞において年齢依存的な細胞老化が起きていることが複数の系で報告されており、細胞老化は個体老化の一因としても注目されている。また、細胞老化はがん遺伝子によっても惹起され、細胞自身が内在性にもつがん抑制機構としての役割も想定されており、このことから細胞老化機構はがん治療の対象としても期待されている。

クロマチンリモデリング因子 CHD (Chromodomain-Helicase-DNA binding domain protein) ファミリーに属する酵素群は、クロマチン構造の変化を介して遺伝子発現の制御に関わると考えられているが、特定遺伝子の発現制御における役割は不明であった。最近われわれは、このファミリーの一つである CHD8 が発生早期に高発現し、がん抑制タンパク p53 によるアポトーシスを抑制することを発見した [Nishiyama et al., Nature Cell Biol., (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。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た。

2. 研究の目的

CHD8 とヒストン H1 による“抗 p53 最終機構”が発生段階で必須であることがわかっているが、p53 の重要な機能として、発生期におけるアポトーシス制御だけでなく、成長期以降の「細胞老化の誘導」と、それによる「抗がん作用」が挙げられる。CHD8 がこれらの p53 依存的な経路にも重要な役割を果たすかどうかは重大な医学生物学の問題である。近年、老化細胞においてヒストン H1 が消失することが報告され、細胞老化におけるクロマチンリモデリングに p53/CHD8/ヒストン H1 複合体が中心的な役割を果たしていることが予想される。

そこでわれわれは、「CHD8/ヒストン H1 が老化のマスター遺伝子ではないか？」という仮説を提唱し、p53/CHD8/ヒストン H1 複合体の形成がどのように細胞老化に関わっているか、さらに発がん抑制に果たす役割を実験的に明らかにすることを提案する。

3. 研究の方法

1) 細胞老化の分子機構の解明

CHD8 コンディショナルノックアウトマウスを作製し、そのマウス胎仔由来線維芽細胞 (MEFs) を樹立して、分裂疲弊あるいはがん遺伝子によって誘導される細胞老化について検討する。また、哺乳類ではヒストン H1 には 8 つのアイソフォームがあり、その機能抑制は困難とされているが、既にわれわれは予備的研究として、RNA 干渉を用いたノックダウンやドミナントネガティブ変異体の過剰発現によるヒストン H1 の機能抑制に成功している。これらの方法を用いてヒストン H1 を機能抑制したヒトおよびマウス胎仔由来の線維芽細胞株を樹立し、細胞老化について検討する。

2) 個体老化の分子機構の解明

老化した野生型マウスあるいは早期老化の表現型を有する変異マウスを用いた解析 (フォワード・ジェネティクス) と遺伝子改変マウスを用いた解析 (リバース・ジェネティクス) を並行して行う。現在、われわれは老化した野生型マウスとヒト早発性老化症候群モデルマウス (klotho マウス) を多数飼育維持しており、種々の老化関連遺伝子の発現量を測定することが可能である。

CHD8 ノックアウトマウスやヒストン H1 ノックアウトマウスは胎生期に死亡するため、現時点では個体老化研究に利用することは不可能である。CHD8 コンディショナルノックアウトマウスを作製し、成体マウスで CHD8 を枯渇させ、個体老化の表現型について解析する。また、ヒストン H1 コンディショナルノックアウトマウスを作製すると同時に、誘導性ヒストン H1 ノックダウンマウスや誘導性ドミナントネガティブ変異体トランスジェニックマウスを作製し、成体においてヒストン H1 を欠損させることによって早老様表現型が出現するかどうかを明らかにする。

3) CHD8/ヒストン H1 標的遺伝子の網羅的探索

CHD8/p53 ダブルノックアウトマウスは CHD8 シングルノックアウトマウスの表現型を改善するものの不完全であり、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る。CHD8 ノックアウトマウスのマイクロアレイ解析を行うと同時に、培養細胞を用いて CHD8 とヒストン H1 の

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) 老化とがんの分子機構の解明

われわれは今までに CHD8 が強力なトランスフォーメーション活性を示すことを見出した(未発表データ)。つまり、CHD8 は抗老化作用をもつことが予想されるだけでなく、がん遺伝子として機能する可能性が高いものと考えられる。実際に培養がん細胞株やヒトがん組織において、CHD8 およびヒストン H1 の発現量が上昇しているかどうかについて検討する。また、CHD8 とヒストン H1 の過剰発現が個体内でがん化に寄与するかどうかを検討するためにトランスジェニックマウスを作製し、その発がん率と生命予後について検討する。さらに、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、ヒストン H1 コンディショナルノックアウトマウスについても p53 ノックアウトマウスと交配させることにより、p53 欠損によって発がん率と生命予後がどのように影響されるかについても検討を加える。

4. 研究成果

1) 細胞老化の分子機構の解明

本研究では、まず正常細胞で CHD8 を過剰発現し、細胞老化に及ぼす効果について検討した。その結果、正常細胞において CHD8 の強制発現は p53 誘導性の細胞老化を抑制することが明らかとなった。次に正常細胞でヒストン H1 をノックダウンすると細胞老化が誘導されることが明らかとなった。さらに CHD8 コンディショナルノックアウトマウスを作製し、その MEFs を樹立して、分裂疲弊あるいはがん遺伝子によって誘導される細胞老化について検討したところ、CHD8 ノックアウトマウス由来の細胞も同様に細胞老化を来すことが明らかとなった [Moroishi et al., *Cell Metab.*, (2011)]。

2) 個体老化の分子機構の解明

老化した野生型マウスあるいはヒト早発性老化症候群モデルマウス (klotho マウス) を用いた解析(フォワード・ジェネティクス)では、CHD8/ヒストン H1 の発現レベルが著明に低下していることが判明した。遺伝子改変マウスを用いた解析(リバース・ジェネティクス)では、CHD8 コンディショナルノックアウトマウスと発現誘導型 CHD8 トランスジェニックマウスを作製することによって、現在その個体老化について解析している。

3) CHD8/ヒストン H1 標的遺伝子の網羅的探索

CHD8 コンディショナルノックアウトマウスを作製し、マイクロアレイと ChIP-Seq によって、CHD8/ヒストン H1 複合体による老化とがんのシグナルネットワークを網羅的に解析している。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た [Nishiyama et al., *Mol. Cell. Biol.*, (2012), Kita et al., *Genes Cells*, in press]。

4) 老化とがんの分子機構の解明

発現誘導型 CHD8 トランスジェニックマウスを作製し、その MEFs を樹立することによって、CHD8 が強力なトランスフォーメーション活性を示すことを明らかにした。現在、その発がん率と生命予後について検討している。つまり、CHD8 は抗老化作用をもつことが予想されるだけでなく、がん遺伝子として機能する可能性が高いものと考えられた。このように細胞レベルと個体レベルの二つの方向より老化研究を進展させ、それらを融合させて老化とがんの分子機構の全貌解明を目指している。

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3件)

1) Moroishi T., Nishiyama M., Takeda Y., Iwai K., Nakayama KI.: The FBXL5-IRP2 axis is integral to control of iron metabolism in vivo. *Cell Metab.*, 14: 339-51 (2011). 査読有り

西山正章らが *Cell Metabolism* 誌に発表した論文の内容につき、2011 年 9 月 7 日付読売新聞、日経産業新聞等で取り上げられた。

2) Nishiyama M., Skoultchi AI., Nakayama KI.: Histone H1 recruitment by CHD8 is essential for suppression of the Wnt-beta-catenin signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.*, 32: 501-12, (2012). 査読有り

3) Kita Y., Nishiyama M., Nakayama KI.: Identification of CHD7S as a novel splicing variant of CHD7 with functions similar and antagonistic to those of the full-length CHD7L. *Genes Cells*, in press. 査読有り

[学会発表](計10件)

1) 諸石寿朗, 西山正章, 岩井一宏, 中山敬一: ディファレンシャル・プロテオミクス技

術を用いた鉄代謝制御ユビキチンリガーゼ Fbx15 の機能解析
CREST「生命システムの動作原理と基盤技術」
研究領域 平成 22 年度公開シンポジウム
(東京, 2010.6.1)

2) 西山正章, 中山敬一: 発生過程におけるアポトーシスの新しい制御機構: クロマチンリモデリングによる p53 のエピジェネティックコントロール
Biochemistry and Molecular Biology 2010 (神戸, 2010.12.7)

3) 諸石寿朗, 西山正章, 岩井一宏, 中山敬一: ディファレンシャル・プロテオミクス技術を用いた鉄代謝制御ユビキチンリガーゼ Fbx15 の網羅的基質探索と個体における機能解析
Biochemistry and Molecular Biology 2010 (神戸, 2010.12.7)

4) 片山雄太, 西山正章, 中山敬一: クロマチンリモデリング因子 CHD8 の L 型アイソフォームはマウスの個体発生や細胞分化に必須である
Biochemistry and Molecular Biology 2010 (神戸, 2010.12.8)

5) Toshiro Moroishi, Masaaki Nishiyama, Kanae Yumimoto, Masaki Matsumoto, Kazuhiro Iwai, Keiichi Nakayama: Loss of SCFFbx15 results in deregulation of iron metabolism in mice
The Joint Symposium of the 7th Global-COE International Symposium and 6th Young Investigators Forum (Bintan island, Indonesia, 2011.2.10)

6) Toshiro Moroishi, Masaaki Nishiyama, Kanae Yumimoto, Masaki Matsumoto, Kazuhiro Iwai, Keiichi Nakayama: Loss of Fbx15 results in deregulation of iron metabolism in mice
6th Cold Spring Harbor meeting on The Ubiquitin Family (Cold Spring Harbor, U.S.A, 2011.5.17)

7) 諸石寿朗, 西山正章, 武田有紀子, 岩井一宏, 中山敬一: ユビキチン化による鉄代謝制御機構
第 35 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 (徳島, 2011.9.10)

8) 西山正章, 中山敬一: CHD8 によるヒストン H1 のリクルートは Wnt/ β -カテニンシグナル伝達の抑制に必須である
第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜, 2011.12.13)

9) 諸石寿朗, 西山正章, 武田有紀子, 岩井一宏, 中山敬一: ユビキチン化による鉄代謝

制御機構

第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜, 2011.12.13)

10) 片山雄太, 西山正章, 中山敬一: クロマチンリモデリング因子 CHD8 の L 型アイソフォームはマウスの個体発生や細胞分化に必須である
第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜, 2011.12.13)

〔図書〕(計 2 件)

1) 西山正章, 中山敬一: 発生過程におけるアポトーシスの新しい制御機構: クロマチンリモデリングによる p53 のエピジェネティックコントロール *実験医学増刊* 27: 1029-35 (2010)

2) 喜多泰之, 西山正章, 中山敬一: 初期発生における CHD8 依存的な p53 の制御機構 *BIO Clinica*, (査読無) 26: 466-70 (2011).

〔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://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 MASAACKI)
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

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：