

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25年 4 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22300325

 研究課題名（和文）p53 転写因子複合体によるクロマチン機能調節と
iPS リプログラム制御機構の解明

 研究課題名（英文）Elucidation for Regulation of Chromatin Function and Reprogramming
of iPS Cells by Tumor Suppressor p53 and Its Transcriptional Complex

研究代表者

田中 知明(TANAKA TOMOAKI)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：50447299

研究成果の概要（和文）：山中4因子と呼ばれる特定の転写因子の体細胞への導入により、「多能性」を誘導できるようになった一方で、がん研究分野では「がん幹細胞仮説」が提唱され、新たな治療標的として期待されている。がん幹細胞治療標的を目指して、転写因子p53と核初期化に重要な転写因子(Oct3/4・Sox2・KLF4)に焦点を当て、分子間架橋技術開発やゲノムワイドの連動解析を通じて、癌のエピジェネティック治療の創薬基盤の開発につながる基盤研究を実施した。実際、トランスクリプトーム解析から癌・iPS特異的なnon-coding RNAやlinc RNAだけでなく、幹細胞性維持に重要なGLS2の同定に成功し、それらの抗腫瘍効果や転移抑制能を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Recent several lines of evidence have suggested that the concept regarding “cancer stem cell” is associated with the pathogenesis of drug-resistant or cancer recurrence. However, a little is known about how Oct3/4, Sox2, Klf-4, c-Myc and tumor suppressor p53 can regulate pluripotency and reprogramming process. Here, we have focused on p53 and Yamanaka 4 factors, and attempted to elucidate the common epigenetic mechanism between cancer stem cells and iPS/ES cells by the combination of cross-linking methodology and genome-wide analysis. Transcriptome analysis revealed the identification of cancer and iPS specific non-coding RNA including long intergenic RNA (linc RNA) as well as GLS2 which are important for the maintenance of stemness. Furthermore, we found the tumor suppressor and anti-metastatic function of certain genes *in vitro* and *in vivo*.

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2012年度	3,100,000	930,000	4,030,000
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：転写因子、癌抑制遺伝子、iPS、クロマチン、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞の樹立成功によって、特定の転写因

子の細胞内への導入により、分化した体細胞にリプログラムが生じ、幹細胞としての性質

を持つようになることが明らかとなった。しかしながら、Oct3/4・Sox2・Klf-4・c-Mycなど核の初期化に重要な転写因子が、どのような核内シグナルを通じて、どのような分子メカニズムで多能性を獲得するかは、まだ十分明らかにされていない。最近、山中伸弥先生やGeoffrey Wahlらのグループを含む国内外の5つのグループから、癌抑制遺伝子p53機能を抑制することにより、iPS作成効率が向上することが示された(Nature, 2009)。一方で、がん研究の分野では、がん治療の新戦略として”がん幹細胞”制御の概念が注目されている。”がん幹細胞”は腫瘍集団全体の中でわずかしか存在せず、がん組織においても正常組織と同様に各分化段階の細胞の階層化が認められるが、抗がん剤抵抗性により腫瘍を再生しつづけることから、癌化のプロセスやがんの根治療法を考える上で非常に重要なコンセプトである。研究代表者は、p53によるクロマチン制御機能を独創的な手法を用いて解析してきたが(Cell, 2007)、p53が癌幹細胞を制御している事実からも、これらの制御機構にはある程度共通の分子基盤を共有する可能性が推定されている(図1)。実際に我々は、ChIPアッセイとプロテオミク

スを組み合わせた手法を応用し、p53クロマチン複合体に含まれる機能的分子を同定する方法を開発し、human Cellular Apoptosis Susceptibility protein (hCAS/CSE1L)の同定とそのクロマチン制御の役割とp53転写調節機構について明らかにした(Cell, 2007)。興味深いことに、この分子はクロマチンにカップリングし、ヒストンのメチル化(tri-MetK27-H3)を介してヘテロクロマチンの伸長を阻害することで遺伝子の転写を調節していることがわかった。そこで本研究では、これらの方法と知見を更に推し進め、Oct3/4・Sox2・Klf-4・c-Mycによる体細胞リプログラミングプロセスにおける多能性獲得機構、転写因子p53による癌幹細胞・iPS制御機構に対して、転写因子複合体ネットワークを明らかにして、クロマチン機能調節・エピジェネティクス制御解析を通じて、それらの本質的分子メカニズムにアプローチする。

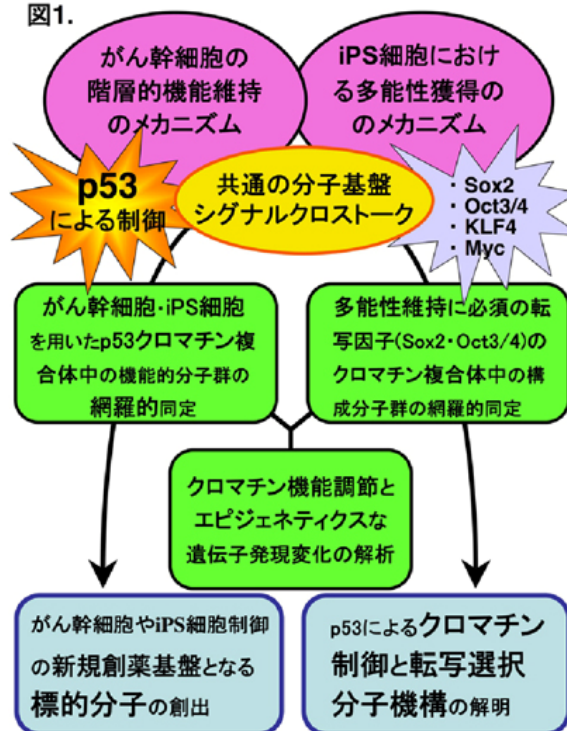
2. 研究の目的

癌抑制遺伝子p53や核の初期化に必須の転写因子を中心に、クロマチン機能とエピジェネティクスを制御する転写因子複合体ネットワークに重要な分子を網羅的に同定することで、がん幹細胞制御の根底で作用する核内シグナルとクロマチン制御メカニズムに分子生化学的にアプローチし、次世代型シーケンサーによるゲノムワイドのepigenetics・トランスクリプトーム解析と有機的に結びつけることで、癌のエピジェネティック治療創薬における新規標的分子候補の発見と効率的で革新的な疾患iPS技術や新たな治療ターゲットの創薬基盤の開発につながる。

3. 研究の方法

本提案では、過去に我々が確立してきた生化学的方法論と知見を更に押し進め、iPS細胞やがん幹細胞の細胞培養技術を応用し、がん幹細胞におけるp53とそのクロマチン制御の核内シグナルや、多能性獲得に必須の転写因子(Oct3/4・Sox2・Klf4・c-Myc)における機能的クロマチン会合分子群を網羅的に同定

図1.

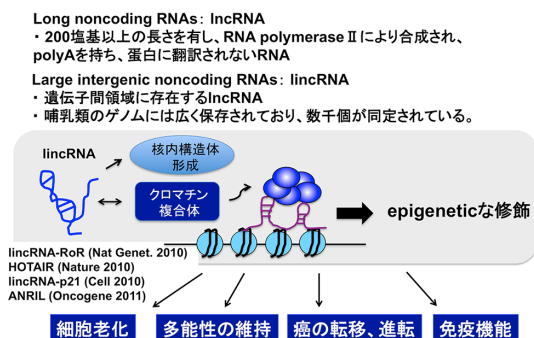


することで、幹細胞制御の根底で作用している共通の分子群を探索し、それらの本質的分子メカニズムに迫る。更に、次世代型シーケンサーを用いたゲノムワイドのChIP-seq・トランスクリプトーム解析を通じて、転写因子複合体における生化学的手法と epigenetics 解析を直接的にクロストークさせることで、転写因子によるクロマチン機能調節の中心的な分子群を明らかにする。

4. 研究成果

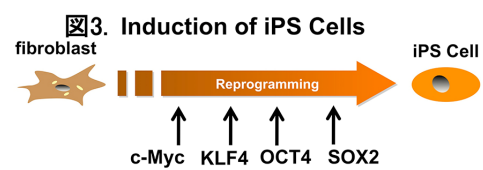
まず初めに、次世代型シーケンサーによる ES/iPS に特異的に発現する p53 依存的な non-coding RNA を含めた転写産物のエピジェネティクス・トランスクリプトーム制御の解析結果を示す。最近になって高速シーケンサーなどを用いた大規模なトランスクリプトーム解析が行われるようになり、たんぱく質をコードしない長鎖の RNA (linc RNA) の同定とその解析が進んでいる。これらの linc RNA がクロマチン制御や核内構造体の構成を介して、癌の転移や悪性化に関係しているばかりでなく、幹細胞性の機能維持や核リプログラミングにおける iPS 樹立効率や性質に重要な役割を果たすことが示唆されている (図 2)。そのような背景の中、転写因子 p53 によって制御される linc RNA の報告がなされているが、その発現制御や機能など十分に明らかにされていない。正常のヒト線維芽細胞と

図2. LincRNA



比較して、iPS 細胞 (253G1) と ES 細胞 (khES1) において 2 倍以上の発現 (RPKM) を示す linc RNA を解析した。その結果、iPS と ES に共通する linc RNA 候補が 1292 遺伝子検出された (図 3)。Chr5 から読み出される linc RNA に関して、ChIP-seq を施行して、その詳細な発現プロファイル解析と epigenetic パターンを解析した。TSS 解析にて転写開始点の明らかなピークを認め、RNA-seq から約 102, 4kb に渡る転写産物が確認された。興味深いことに転写開始点領域近傍に Nanog の結合が観察され、また読み出し領域に一致して、active ヒストンコードである AcK9-H3、3meK4-H3 と同時に、repressive ヒストンコードである 3meK27-H3 のピークが認められた (図 4)。これらの結果は、bivalent な epigenetic regulation を受ける linc RNA の存在を示唆している。また、p53 依存的に DNA 傷害にて転写誘導を受ける linc RNA 候補を 72 遺伝子同定した。これらの一部は、ES/iPS の pluripotency 制御に関わるものが shRNA による機能的スクリーニング解析から確認された。

次に、生化学的な解析として、がん幹細胞・iPS 細胞における p53 クロマチン複合体に含まれる機能的分子群の網羅的同定したので、その結果をしめす。



iPSとES細胞で高発現のlincRNA

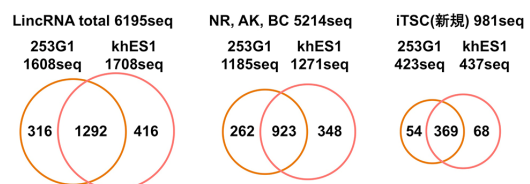
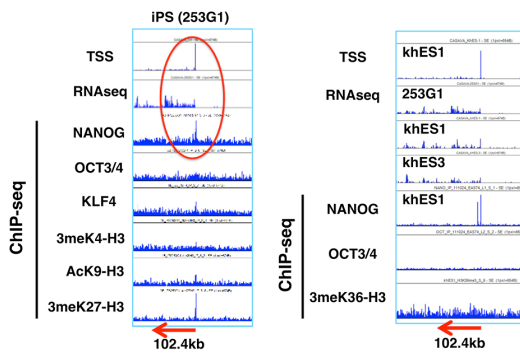


図4. ChIP-seq Analysis of Nanog, OCT4, KLF4 and Epigenetics for iPS/ES-specific linc RNA Chr5 in iPS/ES Cells



従来の解析方法では、各パラメータの個別解析のため複合体としての情報が失われるので、ChIP アッセイの分子間架橋技術を応用し、Sucrose Gradient によるサイズ分画を組み合わせ、p53 転写因子複合体の精製を試みた。架橋剤には formaldehyde を用いたが、この利点としてモノアーム型のため resolution が(約 2Å)非常に高いこと、リバースクロスリンクが効率良く容易に可能(酸性・60℃以上の条件下)であることが挙げられる。H1299 細胞に p53WT アデノを感染させ 24 時間後に、細胞を回収した。細胞回収に先んじて、*in vivo* での機能的クロマチン複合体を回収するために 1%の formaldehyde 処理した細胞としない細胞を用意した。粗核分画を調整し、超音波処理にて DNA を平均約 600bp の長さに shearing した核抽出液を、10-40%の Sucrose Gradient において分離を行った。20Fr. に分画し、各分画中に含まれる p53 を Western blot 法にて検出した。Formaldehyde で Cross-link(-)には、p53 のほとんどは比較的軽い分画に認められた。一方、Cross-link(+)には、p53 複合体が Sucrose Gradient を通して広く分画された。このことは、細胞内において p53 が、DNA も含め様々な multiple cross-linkable complexes を形成していることを示している。つぎに生理的な p53 発現量にコントロール可能な Tet-off p53 inducible cell line を用いて同様の実験を行った。Cross-link(+)と(-)を比較すると、p53 のサイズ分画パターンは大きく変化しておりアデノの系と同じ結果であった。一方、

アクチンの分画パターンを検討すると、Cross-link(+)と(-)においてほとんど差を認めなかった。このことは、cross-link によって生じる p53 複合体のサイズの変化は、過剰発現によるアーチファクトではなく、*in vivo* での複合体形成を反映していることを示している。そこで、これらのサイズの異なる p53 複合体がどのような標的遺伝子のプロモーターと結合しているのかを調べるため、各分画における p53 の ChIP アッセイを施行した。興味深いことに、p21WAF1 や HDM2 などの non-proapoptotic gene promoter への結合は、Sucrose Gradient 全体を通して広範に検出されたのに対して、p53AIP1 や PIG3 などの proapoptotic gene promoter への結合は、比較的 High-sedimenting な分画にのみ検出された。これらの結果は、proapoptotic gene promoter に結合している p53 転写複合体中に特異的に含まれる分子を同定できる可能性を示している。

本研究の成果として、ChIP アッセイのプロトコルを応用し生化学的手法と組み合わせることで、細胞内で生きたままクロスリンクされた転写因子のクロマチン複合体を精製し、そこに含まれる機能的な分子群を同定できることが明らかとなった。がん幹細胞や iPS 細胞のクロマチンレベルでの分子制御メカニズムはほとんどわかっておらず、この方法論を応用して発見される分子や新発見は、がん幹細胞制御や iPS 細胞効率化の創薬分子基盤となることが期待される。今後、網羅的分子基盤の基礎的情報やエピジェネティクスの統合理解を更に発展させ、エピゲノム創薬分子基盤の構築と具体的なシーズの探索、そしてトランスレーショナルリサーチへと推進する必要がある。

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 5 件)

1. Hosokawa H*, Tanaka T(*Co-first author), Suzuki Y, Iwamura C, Ohkubo S, Endoh K, Kato M, Endo Y, Onodera A, Tumes J D, Kanai A, Sugano S, Nakayama T. Functionally distinct Gata3/Chd4 complexes coordinately establish Th2

- cell identity. Proc Natl Acad Sci USA. 12, 4691-4696 (2013) (査読有)
2. Tatsuno I, Terano T, Nakamura M, Suzuki K, Kubota K, Yamaguchi J, Yoshida T, Suzuki S, Tanaka T, Shozu M. Lifestyle and osteoporosis in middle-aged and elderly women: Chiba bone survey. Endocr J. (2013) (査読有)
 3. Utsumi T, Kawamura K, Imamoto T, Kamiya N, Komiya A, Suzuki S, Nagano H, Tanaka T, Nihei N, Naya Y, Suzuki H, Tatsuno I, Ichikawa T. High predictive accuracy of Aldosteronoma Resolution Score in Japanese patients with aldosterone-producing adenoma. Surgery (2012) (査読有)
 4. Terano T, Suzuki S, Yoshida T, Nagano H, Hashimoto N, Mayama T, Koide H, Suyama K, Tanaka T, Yamamoto K, Tatsuno I. Glycemic control and bone metabolism in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. Diabetology International, (2012) (査読有)
 5. 田中知明 p53 による細胞内代謝調節機構, Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌, (2012) (査読無)

[学会発表] (計15件)

1. 鈴木佐和子、田中知明. p53 は GLS2 によるグルタミン代謝制御を介した抗酸化作用とエネルギー調節により腫瘍抑制作用を発揮する。第 35 回 日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、福岡。
2. 中山哲俊、鈴木佐和子、永野秀和、橋本直子、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、横手幸太郎、田中知明 (ポスター口演) p53 による転写抑制遺伝子群の探索的解析と癌における予後の検討。第 35 回 日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、福岡。
3. 永野秀和、鈴木佐和子、中山哲俊、橋本直子、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、龍野一郎、横手幸太郎、田中知明 (ポスター口演) p53 下流遺伝子 DPYSL4 の癌抑制機構と細胞内エネルギー調節作用。第 35 回 日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、福岡。
4. 佐久間一基、鈴木佐和子、永野秀和、橋本直子、中山哲俊、樋口誠一郎、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、横手幸太郎、田中知明 (ポスター口演) 脂肪細胞における転写因子 p53 による新たな代謝調節分子の探索的解析とその生活習慣病における役割。第 35 回 日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、福岡。
5. 橋本直子、田中知明 (ポスター口演) p53 クロマチン複合体に含まれる Nuclear body protein SP110 と細胞老化誘導・癌抑制機能。第 35 回 日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 12 日、福岡。
6. 鈴木佐和子、永野秀和、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、龍野一郎、横手幸太郎、田中知明. p53 と GLS2 のミトコンドリア制御を介した生活習慣病および癌における役割。第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 20 日、北海道。
7. 橋本直子、滝口朋子、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、横手幸太郎、田中知明. 癌細胞における COP9 signalosome による p53 および p73 のリン酸化と安定化の制御機構。第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 20 日、北海道。
8. 永野秀和、鈴木佐和子、中山哲俊、橋本直子、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、龍野一郎、横手幸太郎、田中知明. RNA-sequencing 解析を用いた p53 下流遺伝子 DPYSL4 の同定とそのエネルギー代謝調節機構。第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 20 日、北海道。
9. 田中知明. 癌抑制遺伝子産物 p53 による細胞内代謝制御機構～がん、エネルギー代謝、肝細胞性の接点の新展開～第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19 日、北海道。
10. 吉田知彦、鈴木穰、菅野純夫、龍野一郎、横手幸太郎、田中知明 (2012) RANKL 依存性破骨細胞分化におけるゲノムワイドでの転写産物解析。第 85 回 日本内分泌学会学術総会、4 月 21 日、名古屋。
11. 鈴木佐和子、龍野一郎、鈴木穰、菅野純夫、横手幸太郎、田中知明 (2012) AIMAH 症例の臨床内分泌学的特徴と RNA sequence を用いたゲノムワイドの遺伝子発現解析。第 85 回 日本内分泌学会学術総会、4 月 20 日、名古屋。
12. 陶山佳子、樋口誠一郎、佐久間一基、永野秀和、今田映美、鈴木佐和子、吉田知

彦、川村幸治、今本敬、市川智彦、龍野一郎、横手幸太郎、田中知明 (2012) サブクリニカルクッシング症候群 (SCS)101 症例の手術の有無による合併症への影響に関する検討。第 85 回 日本内分泌学会学術総会、4 月 20 日、名古屋。

13. 橋本直子、大石賢吾、龍野一郎、鈴木穰、菅野純夫、横手幸太郎、田中知明 (2012) ゲノムワイド解析に用いた細胞老化における p53 による老化形質制御機構。第 85 回 日本内分泌学会学術総会、4 月 20 日、名古屋。
14. 永野秀和、鈴木佐和子、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、横手幸太郎、田中知明 (2012) p53 下流遺伝子 DPYSL4 のエネルギー代謝調節作用と癌抑制機能。第 85 回 日本内分泌学会学術総会、4 月 20 日、名古屋。
15. 鈴木佐和子 他 (2012) GLS2 を介した p53 による iPS/ES 幹細胞の機能調整から癌・生活習慣病の基盤病態にかかわるエネルギー産生と ROS 制御機構の解明。第 85 回 日本内分泌学会学術総会、4 月 19 日、名古屋。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 知明(TANAKA TOMOAKI)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：50447299

(2) 研究分担者

龍野 一郎 (TATSUNO ICHIROU)
東邦大学・医療センター佐倉病院・教授
研究者番号：80282490

(3) 連携研究者

()

研究者番号：