

## 先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 実績報告書

本様式の内容は一般に公表されず

研究課題名	再生医療・癌治療への細胞老化の分子機構の利用-エピジェネティクスからのアプローチ
研究機関・ 部局・職名	名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
氏名	島田 緑

1. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

2. 収支の状況

(単位:円)

	交付決定額	交付を受けた額	利息等収入額	収入額合計	執行額	未執行額	既返還額
直接経費	119,000,000	119,000,000	0	119,000,000	119,000,000	0	0
間接経費	35,700,000	35,700,000	0	35,700,000	35,700,000	0	0
合計	154,700,000	154,700,000	0	154,700,000	154,700,000	0	0

3. 執行額内訳

(単位:円)

費目	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	合計
物品費	402,842	22,907,909	15,217,524	54,141,018	92,669,293
旅費	0	28,500	269,010	34,360	331,870
謝金・人件費等	26,785	4,402,086	6,347,239	7,093,187	17,869,297
その他	0	3,625,960	2,437,958	2,065,622	8,129,540
直接経費計	429,627	30,964,455	24,271,731	63,334,187	119,000,000
間接経費計	0	4,857,564	3,405,792	27,436,644	35,700,000
合計	429,627	35,822,019	27,677,523	90,770,831	154,700,000

4. 主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関名
蛍光顕微鏡	HSオールインワン・BZ-9000	1	9,912,315	9,912,315	2012.2.17	名古屋市立大学
微量高速遠心機	トミー精工MX-307	1	1,218,000	1,218,000	2013.2.7	名古屋市立大学
高解像4D蛍光イメージングシステム	DeltaVision Elite GEヘルスケア	1	23,992,500	23,992,500	2013.11.6	名古屋市立大学
CO2インキュベーター	MCO-19AICUVH-PJ	1	1,113,000	1,113,000	2013.12.3	名古屋市立大学
リアルタイムPCRシステム	StepOne Plus 01VP02CP	1	4,179,000	4,179,000	2013.12.24	名古屋市立大学
フローサイトメーター	BD FACSVerser	1	11,760,000	11,760,000	2013.12.24	名古屋市立大学
自動現像機	FPM100	1	840,000	840,000	2014.3.4	名古屋市立大学

5. 研究成果の概要

1. これまで報告されていないChk1の基質の中に、細胞増殖・老化制御において極めて重要な分子を複数取得した。中でも特にH2AXの新規リン酸化については既知のリン酸化S139, Y142に加えて細胞の癌化・増殖と関連していることが分かった。生細胞においてタイムラプスイメージングを行うと、H2AXのリン酸化が染色体分配において重要な役割を持つことが分かった。
2. H2AバリエーションH2ABbdは構造の特異性や組織・時期特異的な発現を示すことから極めて特徴的な機能を持つと予想される。しかしこれまでの研究はin vitroにおける生化学的な機能解析がほとんどであり、in vivoにおける機能は不明である。H2ABbdを精原細胞GC-2spd、HeLa, MEFに発現させるとクロマチン構造が弛緩すること、アポトーシスや生殖細胞特異的遺伝子の発現が上昇すること、NF- $\kappa$ Bが活性化されアポトーシスが誘導されることを見出した (Goshima and Shimada et al., 2013 JBC)。
3. ラット精巣においてMPP8が精粗細胞および精原細胞に高く発現すること、DNAマイクロアレイを用いた解析からMPP8発現抑制HeLa細胞では、分化に関与する遺伝子が脱抑制されていることを見出した。さらにChIP sequence解析からMPP8ターゲット遺伝子上にはH3K9me3の蓄積は認められず、抑制エピジェネティック修飾であるH3K27me3が蓄積していることを明らかにした。

課題番号	LS105
------	-------

## 先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 研究成果報告書

本様式の内容は一般に公表されます
------------------

研究課題名 (下段英語表記)	再生医療・癌治療への細胞老化の分子機構の利用— エピジェネティクスからのアプローチ
	Cellular senescence systems for regenerative medicine and cancer therapy from the epigenetic approach
研究機関・部局・ 職名 (下段英語表記)	名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
	Nagoya City University, Medical School of Science, Assistant professor
氏名 (下段英語表記)	島田 緑
	Midori Shimada

### 研究成果の概要

(和文):

細胞老化は最も重要な癌防御機構であると認識され、その重要性が益々注目されているが、細胞老化誘導の分子機構は不明である。また、老化と密接に関連したエピジェネティックな変化がどのようにクロマチンの機能領域を制御するのかも不明である。我々は①p53 および pRB family 依存的にM期をスキップすることが細胞老化誘導に必要かつ十分であり、世界的に注目を浴びる細胞老化誘導の新たな分子機構を提唱した。さらに②癌抑制因子 Chk1 の新規標的分子および相互作用分子を取得し、新たな染色体維持機構を示した。③ヒストンバリエント H2ABbd およびエピジェネティック制御因子 MPP8 の細胞増殖、分化、アポトーシス誘導における重要性を示した。本研究成果は細胞老化において大きなブレークスルーとなり、世界的に評価された。本研究成果に基づき恒常的増殖停止を簡便に誘導できれば、再生医療、癌治療の分野に役立てることができ、非常に有用であると考えられる。

(英文):

Cellular senescence is an irreversible proliferation arrest of primary cells and plays a critical role in suppression of tumorigenesis. However, it has not been understood how cellular senescence is induced and how chromatin modification affects switching from the proliferative state to the

## 様式21

senescent state. In this work, we have found that mitosis skip, which is mediated by both p53 and pRB family, is necessary and sufficient for senescence induction. We identified several targets and association partners of tumor suppressor Chk1 and investigated their multiple roles in genome stability. Furthermore, we found two epigenetic regulators, histone variant H2A.Bbd and heterochromatin associated factor MPP8 have functions in cell division, differentiation, and apoptosis. Our results are expected to be important for various fields including development of anticancer drug, anti-aging, identifying new markers for cancer diagnosis and cancer therapy.

1. 執行金額 154,700,000 円  
(うち、直接経費 119,000,000 円、間接経費 35,700,000 円)

2. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

### 3. 研究目的

多細胞真核生物は様々なゲノムストレスに対して複数の防御機構(チェックポイント、DNA 修復、アポトーシス誘導、早期細胞老化)を持っている。これらの防御機構の破綻は発癌や様々な遺伝子疾患に大きく寄与している。細胞老化は最も重要な癌防御機構であると認識されその重要性がますます注目されているが、分子機構はほとんど分かっていない。また細胞増殖や細胞老化においてエピジェネティック修飾が重要であると考えられているが、その作用機序は分かっていない。本研究の目的は①細胞老化が誘導される分子機構を明らかにすること、②Chk1 がどのように細胞増殖と細胞老化を制御するのかを明らかにすること、③細胞老化誘導に重要であるヒストン H3K9 のメチル化修飾(H3K9me3)に結合する MPP8 の機能解明、④H2A バリエント H2ABbd の細胞運命制御における役割を明らかにすることである。本研究で得られた成果により、恒常的に細胞増殖を抑制する老化形質を多能性幹細胞や腫瘍細胞に導入し腫瘍化を抑制するシステムを確立する、細胞死を効率よく誘導するシステムを確立することで、再生医療および癌治療などへ応用することを最終的な目標とする。

### 4. 研究計画・方法

ストレス存在下で細胞老化を誘導させ、Fucci の系を利用したタイムラプスイメージングにより、細胞周期の観察を行った。レンチウイルスを用いて p53, pRB family および下流で働く因子をドキシサイクリン存在下で発現抑制/誘導できる MJ90, RPE 細胞などを樹立し、各因子の細胞老化誘導における重要性を検討した。コンディショナルにノックアウトできる Chk1 MEF 細胞を用いて質量分析を行い、Chk1 欠失細胞においてリン酸化が減少する因子およびリン酸化部位を網羅的に同定した。そのうち興味深い因子についてはリコンビナントタンパク質を作製し、実際に in vitro において Chk1 の基質であることを確認した。さらに内在性の発現を抑制した状態でリン酸化部位を置換

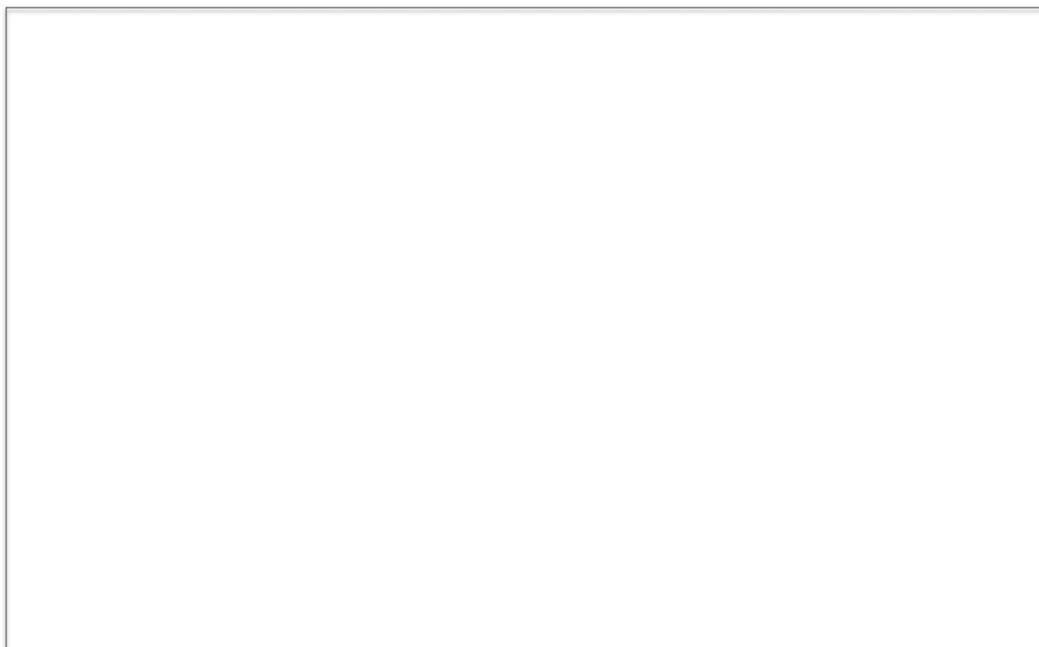
した変異型を発現させ、細胞増殖、細胞老化および DNA 損傷応答における表現型について検討し、Chk1 によるリン酸化の重要性を明らかにした。また FLAG-HA 融合 Chk1, MPP8, H2ABbd を HeLa S3 に発現させ、各タンパク質と相互作用する分子について複合体を精製し、取得した。転写制御における重要性を調べるために、H2ABbd 過剰発現、Chk1 ノックアウトおよび MPP8 を発現抑制させ、DNA マイクロアレイを用いて発現変化する遺伝子群を同定した。

## 5. 研究成果・波及効果

### 【研究成果】

#### (1) 新たな細胞老化誘導の分子機構を明らかにした。

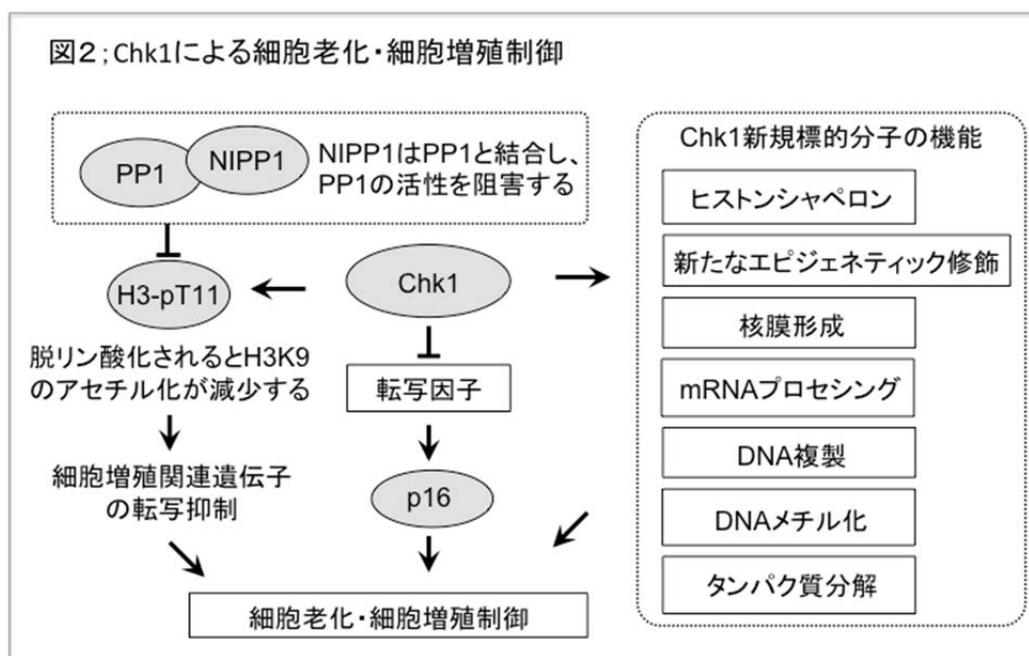
これまで細胞老化誘導には p53 および pRB family が必要であることが分かっていたが、その作用機序は全く分かっていなかった。我々は Fucci の系を利用したタイムラプスイメージングにより、ストレス存在下で細胞老化を誘導させ、細胞周期の観察を行った。①その結果、驚くべきことに老化過程において分裂期回避(mitosis skip)を生じて4倍体 G1 細胞になることを見出した。さらに②Mitosis skip には p53 依存的な APC/C<sup>Cdh1</sup> の活性化と pRB ファミリー依存的な M 期制御因子の転写抑制によって引き起こされる。③G2 期における p53 の活性化が mitosis skip および細胞老化の誘導に必要かつ十分である。④CDK4/6 阻害因子 p16 は細胞老化の不可逆的な細胞増殖停止に必要である。⑤生体内の老化細胞(ヒトのほくろ)においても mitosis skip がおき4倍体 G1 細胞が検出された。以上のことから細胞老化誘導の新たな分子機構を提唱し、世界的に高く評価された。〈Johmura et al., Molecular Cell., 2014〉



(2) Chk1 は染色体安定性維持において新たな役割を持つ。

Chk1 は染色体安定性維持に極めて重要な癌抑制因子であり、Chk1 を欠失すると細胞老化が誘導される。プロテオミクス解析により、Chk1 の新規基質および相互作用する分子を取得した。その結果、細胞周期関連因子、核膜タンパク質、ユビキチンプロテアソーム系因子、スプライシング因子など多くの新規 Chk1 標的因子を同定した。その中でも特に H2AX の新規リン酸化については既知のリン酸化 S139, Y142 に加えて細胞の癌化・増殖と関連していることが分かった。生細胞においてタイムラプスイメージングを行うと、H2AX のリン酸化が染色体分配において重要な役割を持つことが分かった。Chk1 によるヒストン修飾の重要性および取得した分子の機能解析を通して、染色体安定性維持機構の分子基盤の理解につなげた。

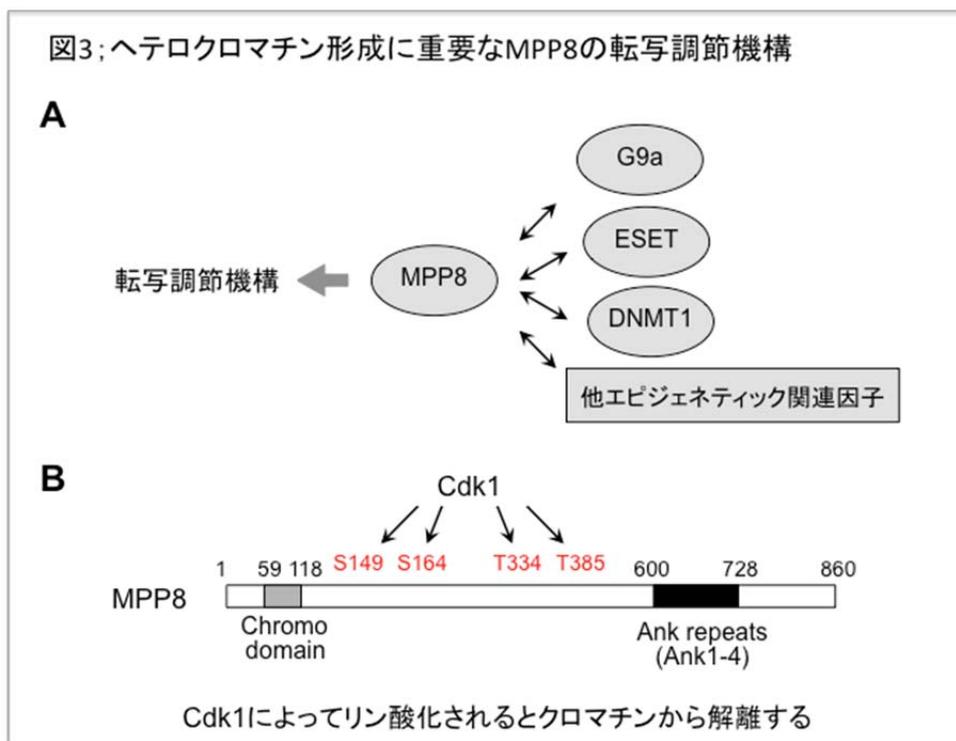
<Haruta et al., manuscript in preparation>



(3) エピジェネティック制御因子 MPP8 は精巣で発現が高く、精子形成過程における転写調節に重要である。

ラット精巣において MPP8 が精粗細胞および精原細胞に高く発現すること、DNA マイクロアレイを用いた解析から MPP8 発現抑制 HeLa 細胞では、分化に関与する遺伝子が脱抑制されていることを見出した。さらに ChIP sequence 解析から MPP8 ターゲット遺伝子上には H3K9me3 の蓄積は認められず、抑制エピジェネティック修飾である H3K27me3 が蓄積していることが分かった。複合体解析から、MPP8 は DNA メチル化酵素、ヒストンメチル化酵素およびヒストンメチル化修飾と結合する因子と相互作用することを見出した。これらの結果は過去に報告されている H3K9me3 との相互作用以外の新たな分子機構により、MPP8 が分化に関与する遺伝子の発現を抑制している可能性を示している。

<Nishigaki et al., Biochem Biophys Res Commun., 2013, Goshima et al., Nagoya Med. Journal. 2014, Murata et al., manuscript in preparation>





6. 研究発表等

<p>雑誌論文 計6件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計5件</p> <p>Nishigaki M, Kawada Y, Misaki T, Murata K, Goshima T, Hirokawa T, Yamada C, <u>Shimada M (corresponding author)</u>, Nakanishi M. Mitotic phosphorylation of MPP8 by cyclin-dependent kinases regulates chromatin dissociation. <i>Biochem Biophys Res Commun.</i>, 2013, 432, p654-659  <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X13002738">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X13002738</a></p> <p><u>Shimada M (corresponding author)</u> and Nakanishi M. Response to DNA damage: why do we need to focus on protein phosphatases? <i>Front Oncol.</i>, 2013, 3, p1-14  <a href="http://www.frontiersin.org/Radiation_Oncology/10.3389/fonc.2013.00008/abstract">http://www.frontiersin.org/Radiation_Oncology/10.3389/fonc.2013.00008/abstract</a></p> <p>Goshima T*, <u>Shimada M* (corresponding author, *Both authors contributed equally to this work)</u>, Sharif J, Matsuo H, Misaki T, Johmura Y, Murata K, Koseki H, Nakanishi M. Mammal-specific H2A Variant, H2ABbd, Is Involved in Apoptotic Induction via Activation of NF-κB Signaling Pathway.  <i>J Biol Chem.</i> 2014, 289 p11656-66</p> <p>Johmura Y, <u>Shimada M</u>, Misaki, Naiki-Ito A, Miyoshi H, Motoyama N, Ohtani N, Hara E, Nakamura M, Morita A, Takahashi S and Nakanishi M. Necessary and sufficient role for a mitosis skip in senescence induction <i>Molecular Cell.</i> 2014 Jun 4. pii: S1097-2765(14)00397-9. doi: 10.1016/j.molcel.2014.05.003. [Epub ahead of print]  <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276514003979">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276514003979</a></p> <p>Hirokawa T, Shiotani B, <u>Shimada M</u>, Murata K, Johmura Y, Haruta M, Tahara H, Takeyama H and Nakanishi M. CBP-93872 inhibits NBS1-mediated ATR activation, abrogating maintenance of the DNA double strand break specific G2 checkpoint <i>Cancer Reserch.</i> 2014 May 29. pii: canres.3604.2013. [Epub ahead of print]  <a href="http://cancerres.aacrjournals.org/content/early/2014/05/29/0008-5472.CAN-13-3604.full.pdf">http://cancerres.aacrjournals.org/content/early/2014/05/29/0008-5472.CAN-13-3604.full.pdf</a></p> <p>(掲載済み一査読無し) 計0件</p> <p>(未掲載) 計1件</p> <p>Goshima T, Sato S, Haruta M, Murata K, Takahashi S, Chiba Y, Sharif J, Koseki H, Nakanishi M and <u>Shimada M (corresponding author)</u>.          Predominant expression of MPP8 in spermatocytes and its implication for regulation of spermatogenesis  <i>Nagoya Med. Journal.</i> 2014 in press</p>
<p>会議発表 計12件</p>	<p>専門家向け 計9件</p> <p>守田科学研究奨励賞受賞講演          島田 緑、染色体安定性維持機構の研究、          アルカディア市ヶ谷、東京都、2011年6月4日、大学女性協会</p>

<p>金沢大学セミナー 島田 緑、DNA 損傷に応答するエピジェネティック制御 金沢大学がん進展制御研究所、石川県、2011 年 7 月 27 日</p> <p>第二回 高次クロマチン研究会、口頭発表 島田 緑、DNA 損傷に応答するエピジェネティック制御 公立学校共済組合蒲郡保養所 蒲郡荘、愛知県、2011 年 8 月 10 日</p> <p>新学術領域「細胞運命制御」若手の会、ポスター発表 島田 緑、DNA 損傷に応答するエピジェネティック制御 軽井沢プリンスホテル、長野県、2011 年 9 月 19 日</p> <p>山口大学共同獣医学部大学院特別セミナー 島田 緑、Chk1 による DNA 損傷応答機構 山口大学獣医学部、2012 年 12 月 10 日</p> <p>分子生物学会年会、ポスター発表 村田和大、島田 緑、中西 真 プロテアソーム調節因子 Psmf1 は DNA 損傷応答を制御している 福岡国際会議場、マリンメッセ福岡、2012 年 12 月 13 日</p> <p>新学術領域「細胞運命制御」若手の会、ポスター発表 春田真由美、島田 緑、西山敦哉、城村由和、中西真 Dnmt1 の発現抑制による DNA 損傷応答の活性化には UHRF1 が必要である 静岡県浜松市、2014 年 5 月 18 日</p> <p>第 66 回日本細胞生物学会大会、シンポジウム発表 島田 緑 H2A バリエーション H2ABbd の発現により NF-<math>\kappa</math>B 依存的なアポトーシスが誘導される 奈良県新公会堂、2014 年 6 月 11 日</p> <p>第 66 回日本細胞生物学会大会、ポスター発表 村田和大、島田 緑 MPP8 is expressed predominantly in spermatocytes and regulates transcription with HP1<math>\gamma</math> 奈良県新公会堂、2014 年 6 月 11 日</p> <p>一般向け 計 3 件 名古屋市立大学 平成 23 年度第 2 期オープンカレッジ 名市大発の新医療へ向けて(モデルを用いた挑戦) がん治療を目指した細胞老化誘導の分子機構の解明 名古屋市立大学、2011 年 10 月 7 日</p> <p>第 70 回 サイエンスカフェ 「不思議な遺伝子ワールドへようこそ！」～遺伝子の基礎から癌化、老化まで～ 名古屋市中区栄・ナディアパーク 7 階 7<sup>th</sup> Cafe、2012 年 10 月 19 日</p> <p>東大阪市立日新高等学校特別授業 遺伝子の基礎から最先端まで 大阪府東大阪市立日新高等学校、2014 年 2 月 14 日</p>
--

様式21

<p>図書 計1件</p>	<p>G2/M期チェックポイントを標的としたがん細胞特異的抗がん療法増強剤の開発 廣川高久、<u>島田 緑</u>、竹山廣光、中西 真、 がん基盤生物学(南山堂)、186-192、2013</p>
<p>産業財産権 出願・取得状況 計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>名古屋市立大学 平成23年度第2期オープンカレッジ 名市大発の新医療へ向けて(モデルを用いた挑戦)          標題:がん治療を目指した細胞老化誘導の分子機構の解明          実施日:2011年10月7日          場所:名古屋市立大学          対象者:教育・保育・福祉関係者、医療関係者、行政自治体関係者、企業関係者等幅広い社会人及び一般市民(学生・大学院生の聴講可)          参加者数:27</p> <p>第70回 サイエンスカフェ          標題:「不思議な遺伝子ワールドへようこそ!」～遺伝子の基礎から癌化、老化まで～          実施日:2012年10月19日          場所:名古屋市中区栄・ナディアパーク7階 7<sup>th</sup> Cafe          対象者:教育・保育・福祉関係者、医療関係者、行政自治体関係者、企業関係者等幅広い社会人及び一般市民(小中高の学生の聴講可)          参加者数:40名</p> <p>東大阪市立日新高等学校特別授業          標題「遺伝子の基礎から最先端まで」          実施日:2014年2月14日          場所:大阪府東大阪市立日新高等学校          対象者:東大阪市立日新高等学校第2学年          参加者数:15名</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載 計5件</p>	<p>社団法人 大学女性協会会報 242号、2011.7.25 6,7面          「染色体安定性維持機構の研究 -再生医療、癌治療への応用を目指して-」</p> <p>AERA 2014年2月24日号 リケジヨ時代、p27          資生堂、リコー、JAXA、JAL、東京大、名古屋市大、神戸大…企業でも大学でも</p> <p>中日新聞(朝刊) 2014年6月6日          老化のカギはタンパク質</p> <p>読売新聞(朝刊) 2014年6月6日          刺激受け 細胞老化 名市大グループ メカニズム解明</p>

様式21

	<p>毎日新聞(夕刊) 2014年6月6日 細胞老化の仕組み解明 名古屋市立大 がん治療に期待</p>
その他	<p>平成23年度 科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞 受賞</p> <p>2014年6月6日 NHK 名古屋 おはよう日本 6:30am～ 名古屋市立大学 ヒトの細胞を老化に導くメカニズムを解明</p> <p>2014年6月6日 NHK 名古屋 おはよう東海 7:45am～ 名古屋市立大学 ヒトの細胞を老化に導くメカニズムを解明</p> <p>2014年6月6日 東海テレビ スーパーニュース “老化”メカニズムを解明 名市大 研究 G</p>

7. その他特記事項