

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15068

研究課題名(和文)細胞老化を抑制するエピジェネティック因子の機能と作動機序

研究課題名(英文)Functional analysis of epigenetic factors that inhibit cellular senescence

研究代表者

中尾 光善(Nakao, Mitsuyoshi)

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号：00217663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞老化のプログラムには、遺伝子制御とエピゲノムの変換が関わりと予期されるが、詳細は不明である。このため、細胞核・クロマチンの因子に対するsiRNAライブラリーを用いて、細胞老化を抑制する分子群を新たに同定して、細胞老化の分子基盤を明らかにしようと構想した。その結果、1) 網膜芽細胞腫(RB)タンパク質が、がん遺伝子誘導性老化細胞において解糖系遺伝子の活性化およびミトコンドリア好気呼吸を促進すること、2) ヒストンメチル化酵素SETD8/PR-Set7が細胞老化の代謝リモデリングに重要な役割を果たすこと、を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Gene regulation and epigenomic conversion are involved in the program of cellular senescence, but the molecular mechanisms remain unclear. We investigated the key processes of cellular senescence, using specific siRNAs libraries against nuclear and chromatin factors, and found that 1) retinoblastoma protein promotes oxidative phosphorylation through up-regulation of glycolytic genes in oncogene-induced senescent cells; 2) the SETD8/PR-Set7 methyltransferase functions as a barrier to prevent senescence-associated metabolic remodeling.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：細胞老化 エピゲノム 遺伝子 代謝

## 1. 研究開始当初の背景

細胞の老化は、さまざまなストレスで誘導される不可逆的な増殖停止の状態をいう。細胞複製の繰り返し、DNA 損傷、過剰な増殖シグナルなどが働くことで、細胞の内在性のプログラムが作動するものと考えられる。不要な細胞を抑制し、腫瘍化へのバリアにもなり得る。その一方、老化細胞はアクティブな代謝活性とタンパク質の分泌型の形質をもつなどの特色も有している。こうした細胞老化のプログラムには、遺伝子制御とエピゲノムの変換が関わると予期されるが、詳細は不明である。このため、細胞核・クロマチンの因子に対する siRNA ライブラリーを用いて、細胞老化を抑制する分子群を新たに同定して、細胞老化の分子基盤を明らかにしようと構想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞老化におけるエピジェネティックな機序の観点から、老化の内在性のプログラムを明らかにすることを目的とする。具体的には、細胞老化に関わる細胞核・クロマチンの因子について、その標的遺伝子の転写調節、エピゲノムの制御、エネルギー代謝との関連性などを解析することを全体構想とした。世界に先駆けた老化のエピゲノム研究を展開する契機として実施した。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞老化における細胞核・クロマチン因子の発現状況 [1] SETD8、CTCF、MCAF1/ATF7IP、SETDB1 などの発現と機能解析: IMR90 線維芽細胞の老化系(複製後および Ras/MEK 誘導性) 各種の培養細胞株や組織アレイにおいて、定量 RT-PCR 法とウエスタンブロット法、免疫染色法で検討した。[2] 上記因子のマウス代謝組織における発現解析: C57B/6J マウスの若年期と老年期などにおいて、各組織での発現状況を検討した。[3] 細胞核・クロマチン因子の細胞老化における発現解析: 細胞老化に関連が示唆された因子群について、同様の手順で解析を進めた。

(2) 特異的な阻害による細胞老化に及ぼす効果とその機序 [1] RNA 干渉法、化合物による阻害効果: 上記の因子を特異的にノックダウンできる siRNA (または shRNA 発現ベクター) を用いて、ノックダウン効果は、リアルタイム RT-PCR 法とウエスタンブロット法で検討した。化合物は、細胞培養液中に適量を投与した。阻害時に顕著な細胞毒性がないことを確認し、細胞老化の形質 (*INK4/ARF* 等のマーカー遺伝子、酸性  $\beta$ -ガラクトシダーゼ染色、ヘテロクロマチン SARF 形成と細胞形態、細胞増殖を調べた。

(3) 標的遺伝子の転写調節とクロマチンの制御 [1] 阻害における遺伝子発現の網羅的解析: IMR90 細胞株を用いて、特異的なノックダウンまたは阻害剤等を用いた遺伝子発現の変化をマイクロアレイで同定した。この網羅的解析データをもとに、Gene Set Enrichment Analysis 等のパスウェイ解析により、標的遺伝子のカテゴリー分類を行った。[2] SETD8 およびヒストン修飾の解析: SETD8、H4K20me1、H3K36me3 に対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行い、標的遺伝子における集積を ChIP-リアルタイム PCR で検討した。

## (4) エネルギー代謝との関連性

[1] 標的とする代謝機能遺伝子の解析: IMR90 細胞株において、ノックダウンまたは阻害剤処理の条件下で、代謝関連因子の発現状況を発現マイクロアレイ法、リアルタイム RT-PCR 法などで解析した。[2] エネルギー代謝経路の機能的な解析: 細胞を蛍光色素 JC-1 で染色し、フローサイトメトリーで解析した。細胞外フラックスアナライザーを用いて、酸素消費や乳酸産生などの代謝経路の動態を解析した。

(5) 細胞老化における代謝関連性 [1] 細胞老化系における代謝機能遺伝子の解析: IMR90 老化細胞において、代謝関連因子の発現状況を発現マイクロアレイ法、リアルタイム RT-PCR 法、ウエスタンブロット法で解析した。[2] 細胞老化系における代謝経路の機能的な解析: JC-1 染色、細胞外フラックスアナライザーを用いて、上記の代謝経路の動態を解析した。

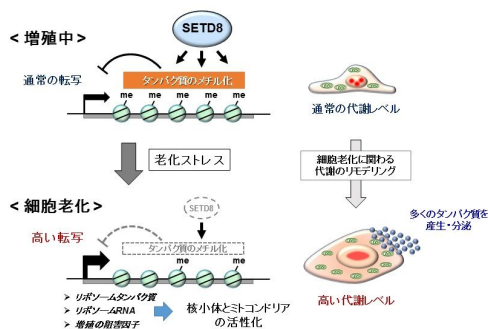
(6) 個体レベルの細胞老化とエネルギー代謝の解析 [1] マウスにおける代謝関連遺伝子の解析: C57B/6J マウスの若年期と老年期などにおいて、代謝組織で関連因子の発現状況をリアルタイム RT-PCR 法、ウエスタンブロット法で解析した。[2] 組換えマウスの準備を行った。

## 4. 研究成果

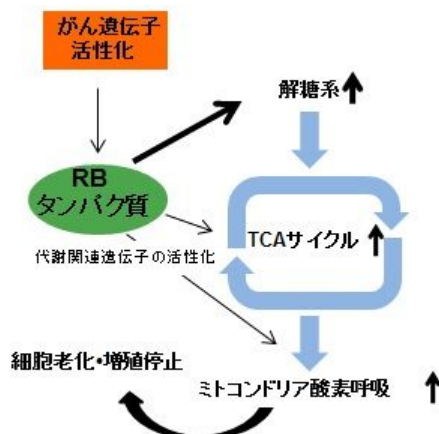
(1) SETD8/PR-Set7 が細胞老化の代謝リモデリングに重要な役割を果たすことを明らかにした (*Cell Rep.*, 2017)。細胞核のエピゲノムが細胞老化に重要な役割を果たしていると考え、ヒト線維芽細胞を用いて細胞老化に関わるエピゲノム因子を探索した。その結果、SETD8/PR-Set7 メチル基転移酵素が細胞老化の過程で顕著に減少することを見出した。同様に、RNAi または化合物による SETD8 の阻害は、増殖中の線維芽細胞に対して細胞老化を誘導した。SETD8 はヒストン H4 リジン 20 をモノメチル化 (H4K20me1) し、遺伝子発現を負に制御することが知られている。そこで、マイクロアレイによる遺伝子発現解析な

どを用いて、SETD8 のノックダウンで発現が上昇する遺伝子を検討したところ、リボソームタンパク質、リボソーム RNA ならびにサイクリン依存性キナーゼ阻害因子  $p16^{INK4A}$  の発現上昇が認められた。これらの遺伝子の発現上昇は、リボソーム生合成の活性化による細胞内タンパク質合成の増加、ならびに p16-RB 経路によるミトコンドリア好気呼吸（酸化リン酸化）の活性化を引き起こし、老化した細胞に特徴的な代謝状態を誘導することが示唆された。

これらの結果から、SETD8 は H4K20me1 を介してターゲット遺伝子の発現を抑制することで、細胞老化に関わる代謝リモデリングを防御する役割を果たしていることが示唆された（図）。



(2) 網膜芽細胞腫(RB)タンパク質は、がん遺伝子誘導性老化細胞において、解糖系遺伝子の活性化およびミトコンドリア好気呼吸を促進することを明らかにした (*Aging Cell*, 2015)。ヒト線維芽細胞を用いて、細胞外フラックスアナライザーで調べると、老化細胞におけるミトコンドリア好気呼吸の活性化が RB 依存性であることが分かった。さらに、網羅的な遺伝子発現および代謝産物解析により、RB が解糖系を中心とする複数の代謝関連遺伝子の発現を増加させることで、老化細胞の代謝全体を活性化していた（図）。



本研究では、細胞核・クロマチンの制御因子に着目し、細胞老化に果たす役割、標的遺伝子の転写調節とクロマチンの制御、エネルギー代謝調節との関連性を明確にした。細胞老化の機序解明とアンチエイジング効果への応用を目指した可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等  
(研究代表者に下線)

〔雑誌論文〕(計19件、全て査読あり)

1. H. Tanaka, S. Takebayashi, A. Sakamoto, T. Igata, Y. Nakatsu, N. Saitoh, S. Hino, and M. Nakao. The SETD8/PR-Set7 methyltransferase functions as a barrier to prevent senescence-associated metabolic remodeling. **Cell Rep.** 18: 2148-2161, 2017.

2. M. Nakamoto, K. Ishihara, T. Watanabe, A. Hirose, S. Hino, M. Shinohara, H. Nakayama, and M. Nakao. The glucocorticoid receptor regulates the *ANGPTL4* gene in a CTCF-mediated chromatin context in human hepatic cells. **PLoS One** 12: e0169225, 2017.

3. K. Ishihara, M. Nakamoto, and M. Nakao. DNA methylation-independent removable insulator controls chromatin remodeling at the *HOXA* gene locus via retinoic acid signaling. **Hum. Mol. Genet.** 25: 5383-5394, 2016.

4. T. Tsutsumi, K. Iwao, H. Hayashi, T. Kawaji, T. Inoue, S. Hino, M. Nakao, and H. Tanihara. Potential neuroprotective effects of an LSD1 inhibitor in retinal ganglion cells via p38 MAPKγ activity. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 57: 6461-6473, 2016.

5. K. Nakamura, Y. Baba, K. Kosumi, K. Harada, H. Shigaki, K. Miyake, Y. Kiyozumi, M. Ohuchi, J. Kurashige, T. Ishimoto, M. Iwatsuki, Y. Sakamoto, N. Yoshida, M. Watanabe, M. Nakao, and H. Baba. UHRF1 regulates global DNA hypomethylation and is associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. **Oncotarget** 7: 57821-57831, 2016.

6. S. Tomita, M.O. Abdalla, S. Fujiwara, T. Yamamoto, H. Iwase, M. Nakao, and N. Saitoh. Roles of long non-coding RNAs in chromosome domains. **Wiley Interdiscip. Rev. RNA**, 8: 2017.

7. S. Hino, K. Kohroggi, and M. Nakao. Histone demethylase LSD1 controls the phenotypic plasticity of cancer cells. **Cancer Sci. (Reviews)** 107: 1187-1192, 2016.

8. P. Miyazato, H. Katsuya, A. Fukuda, Y. Uchiyama, M. Matsuo, M. Tokunaga, S. Hino, M. Nakao, and Y. Satou. Application of targeted enrichment to next-generation sequencing of retroviruses integrated into the host human genome. **Sci. Rep.** 6: 28324, 2016.

9. T. Nakayama, N. Saitoh, K. Morotomi-Yano, KI. Yano, M. Nakao, and H. Saitoh. Tunicamycin induces discharge of the nucleus and chromatin fibers to extracellular spaces in a range of myeloid cell lines. **Cell Biol. Int.** 40: 597-602, 2016.
10. K. Kosumi, Y. Baba, T. Ishimoto, A. Sakamoto, K. Harada, J. Kurashige, Y. Hiyoshi, M. Iwatsuki, S. Iwagami, Y. Miyamoto, Y. Sakamoto, N. Yoshida, M. Watanabe, S. Hino, M. Nakao, and H. Baba. Lysine-specific demethylase-1 contributes to malignant behavior by regulation of invasive activity and metabolic shift in esophageal cancer. **Int. J. Cancer** 138: 428-439, 2016.
11. A. Matsumoto, C. Sakamoto, H. Matsumori, J. Katahira, Y. Yasuda, K. Yoshidome, M. Tsujimoto, I.G. Goldberg, N. Matsuura, M. Nakao, N. Saitoh, and M. Hieda. Loss of the integral nuclear envelope protein SUN1 induces alteration of nucleoli. **Nucleus**, 7: 68-83, 2016.
12. Y. Xi, W. Shen, L. Ma, M. Zhao, J. Zheng, S. Bu, S. Hino, and M. Nakao. HMG A2 promotes adipogenesis by activating C/EBP $\beta$ -mediated expression of PPAR $\gamma$ . **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 472: 617-623, 2016.
13. A. Sakamoto, S. Hino, K. Nagaoka, K. Anan, R. Takase, H. Matsumori, H. Ojima, Y. Kanai, K. Arita, and M. Nakao. Lysine demethylase LSD1 coordinates glycolytic and mitochondrial metabolism in hepatocellular carcinoma cells. **Cancer Res.** 75: 1445-1456, 2015.
14. K. Nagaoka, S. Hino, A. Sakamoto, K. Anan, R. Takase, T. Umehara, S. Yokoyama, Y. Sasaki, and M. Nakao. Lysine-specific demethylase LSD2 suppresses lipid influx and metabolism in hepatic cells. **Mol. Cell. Biol.** 35: 1068-1080, 2015.
15. S. Takebayashi, H. Tanaka, S. Hino, Y. Nakatsu, T. Igata, A. Sakamoto, M. Narita, and M. Nakao. Retinoblastoma protein promotes oxidative phosphorylation through up-regulation of glycolytic genes in oncogene-induced senescent cells. **Aging Cell** 14: 689-697, 2015.
16. A. Murata, Y. Baba, T. Ishimoto, K. Miyake, K. Kosumi, K. Harada, J. Kurashige, S. Iwagami, Y. Sakamoto, Y. Miyamoto, N. Yoshida, M. Yamamoto, S. Oda, M. Watanabe, M. Nakao, and H. Baba. TET family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in esophageal squamous cell carcinoma. **Oncotarget** 6: 23372-23382, 2015.
17. H. Kitamura, H. Matsumori, A. Kalendova, P. Hozak, I.G. Goldberg, M. Nakao, N. Saitoh, and M. Harata. The actin family protein ARP6 contributes to the structure and the function of the nucleolus. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 464: 554-560, 2015.
18. T. Koga, M.A. Suico, S. Shimasaki, E. Watanabe, Y. Kai, K. Koyama, K. Omachi, S. Morino-Koga, T. Sato, T. Shuto, K. Mori, S. Hino, M. Nakao, and H. Kai. Endoplasmic reticulum (ER) stress induces Sirtuin 1 (SIRT1) expression via PI3K-Akt-GSK3 $\beta$  signaling pathway and promotes hepatocellular injury. **J. Biol. Chem.** 290: 30366-30374, 2015.
19. Y. Matsumura, R. Nakaki, T. Inagaki, A. Yoshida, Y. Kano, H. Kimura, T. Tanaka, S. Tsutsumi, M. Nakao, T. Doi, K. Fukami, T.F. Osborne, T. Kodama, H. Aburatani, and J. Sakai. H3K4/H3K9me3 bivalent chromatin domains targeted by lineage-specific DNA methylation pauses adipocyte differentiation. **Mol. Cell** 60: 584-596, 2015.
- 〔学会発表〕(計15件)
1. 中尾光善、日野信次朗. エピジェネティクスとエネルギー代謝. 第39回日本分子生物学会年会(シンポジウム: エピゲノム制御: 疾患発症における意義)平成28年12月1日(パシフィコ横浜、横浜市)
  2. 斉藤典子、アブダラ・モハメド、藤原沙織、山本達郎、富田さおり、前原一満、大川恭行、中尾光善. 乳がんにおいて非コードRNA群が規定する活性染色体ドメイン. 第39回日本分子生物学会年会(シンポジウム: 発生・老化・疾患をつかさどるクロマチンイベント)平成28年11月30日(パシフィコ横浜、横浜市)
  3. 中尾光善. エピジェネティクスと現代人の体質学、第56回リンパ網内系学会総会・第26回日本樹状細胞研究会(合同特別講演)平成28年9月2日(ホテル日航熊本、熊本市)
  4. 中尾光善. 細胞老化に関わるエピゲノム因子の探索と解析、第43回日本毒性学会学術年会(シンポジウム: エピジェネティック毒性評価に向けたバイオマーカー探索とその関連研究の動向)平成28年6月30日(ウインクあいち、名古屋市)
  5. 中尾光善. エピジェネティクス機構による細胞制御と病態、第23回肝細胞研究会(特別講演)平成28年7月7日(大阪大学、大阪)

6. 中尾光善. エピジェネティクスとエネルギー代謝. 第 10 回日本エピジェネティクス研究会年会、平成 28 年 5 月 19 日 (千里ライフサイエンスセンター、大阪)

7. 坂元顕久、日野信次朗、長岡克弥、阿南浩太郎、高瀬隆太、中尾光善. 細胞外環境への細胞内代謝の適応におけるリジン脱メチル化酵素 LSD1 の役割. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 (ワークショップ: 栄養・メタボライトと遺伝子発現調節 ~ ニュートリゲノミクスの最前線) 平成 27 年 12 月 3 日 (ポートアイランド、神戸市)

8. 日野信次朗、坂元顕久、長岡克弥、阿南浩太郎、高瀬隆太、興相健作、中尾光善. マルチオミックス解析技術を用いた代謝 - エピゲノムクロストークの解明. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 (ワークショップ: マルチオミックス統合解析の新機軸) 平成 27 年 12 月 2 日 (ポートアイランド、神戸市)

9. 阿南浩太郎、日野信次朗、坂元顕久、長岡克弥、高瀬隆太、興相健作、中尾光善. FAD 依存性ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 による骨格筋代謝制御. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 (ワークショップ: NAD と FAD の分子生物学: 水溶性ビタミンの多面的理解に向けて) 平成 27 年 12 月 1 日 (ポートアイランド、神戸市)

10. M. Nakao. Epigenetic reprogramming in physiology and cancer. The 6<sup>th</sup> Hiroshima Conference and 50<sup>th</sup> Anniversary Commemoration. October 24, 2015 (広島国際会議場、広島市)

11. 中尾光善. 環境エピゲノムによるエネルギー代謝調節と病態. 日本人類遺伝学会第 60 回大会 (シンポジウム: 疾患発症に関わる環境エピゲノム変化) 平成 27 年 10 月 15 日 (京王プラザホテル、東京)

12. 中尾光善. エピジェネティクスと現代人の体質学. 第 33 回日本眼腫瘍学会、平成 27 年 10 月 3 日 (くにびきメッセ国際会議場、松江市)

13. 中尾光善. エピジェネティクスと現代人の体質学. 第 4 回 DoHad 研究会・学術集会、2015 年 8 月 2 日 (昭和大学、東京)

14. 中尾光善. エピジェネティクス: 生命のプログラムを解く. 第 13 回日本プロテオーム学会 JHUPO2015 年大会 (シンポジウム: エピゲノミクス ~ エピゲノム、RNA、タンパク質の協調的な相互作用 ~) 平成 27 年 7 月

24 日 (くまもと森都心プラザ、熊本市)

15. 中尾光善、坂元顕久、長岡克弥、日野信次朗. エピジェネティクス機構による代謝制御と病態. 第 88 回日本内分泌学会学術集会 (シンポジウム: エネルギー代謝のエピジェネティクス) 平成 27 年 4 月 25 日 (ホテルニューオータニ東京、東京)

〔図書〕(計 5 件)

1. 日野信次朗、阿南浩太郎、高瀬隆太、興相健作、中尾光善. FAD 依存性ヒストン脱メチル化酵素による遺伝子制御、実験医学増刊 (栄養シグナル)、羊土社、34: 88-94, 2016.

2. 興相健作、日野信次朗、中尾光善. 環境エピゲノムと疾患、Bio Clinica (エピゲノムの遺伝)、北隆館、31: 23-27, 2016.

3. 中尾光善. あなたと私はどうして違う? 体質と遺伝子のサイエンス - 99.9% 同じ設計図から個性と病気が生じる秘密. 羊土社、2015.

4. 田中宏、坂元顕久、中尾光善. エピジェネティック調節 (ヒストン修飾) 生体の科学 (細胞シグナル操作法)、金原一郎医学医療振興財団/医学書院、66: 476-477, 2015.

5. 日野信次朗、中尾光善. エネルギー代謝とエピジェネティクス、The Lipid、メディカルレビュー社、26: 181-184, 2015.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 神経変性疾患治療剤  
発明者: 谷原秀信; 岩尾圭一郎; 中尾光善; 林秀樹; 日野信次朗; 堤孝之  
権利者: 熊本大学  
種類: 特許  
番号: 特許願 2016-011705 号  
出願年月日: 2016 年 1 月 25 日  
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ

<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp>

[http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/medical\\_cell\\_biology/](http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/medical_cell_biology/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾 光善 (NAKAO MITSUYOSHI)

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号: 00217663