

令和元年5月31日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06969

研究課題名(和文)細胞老化を制御するエピジェネティック因子の機能解析

研究課題名(英文)Screen and functional analysis of epigenetic factors that regulate cellular senescence

研究代表者

田中 宏(Tanaka, Hiroshi)

熊本大学・発生医学研究所・特定事業研究員

研究者番号：20802127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：老化した細胞は、細胞内のミトコンドリア代謝が活発になることで老化細胞に特異的なタンパク質を産生・分泌し、周囲の細胞ならびに臓器の機能低下を引き起こす。研究者らは遺伝子ノックダウンスクリーニングを行うことで、エピゲノム制御に関わるSETD8ならびにNSD2遺伝子の発現量の低下が、網膜芽細胞腫タンパク質を介したミトコンドリア呼吸活性の上昇を誘導すること、ならびに細胞老化を促進することを見出した。本研究により、正常な細胞内では複数のエピゲノム制御因子が細胞老化ならびに細胞老化におけるミトコンドリア代謝の異常亢進を防ぐ役割を果たしていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の遺伝子の働きは、ゲノムDNAやヒストンなどのタンパク質に対するメチル化などの化学修飾により制御されている。興味深いことに、これらの化学修飾(エピゲノム)は可逆的に調節することができる。本研究により、細胞の老化過程に寄与するエピゲノム制御遺伝子が明らかになった。本研究成果は、今後、老化速度の制御や、老化に伴うガン、肥満・糖尿病、ならびに神経変性疾患などの発症メカニズムの解明ならびに予防・治療法の開発につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Senescent cells exhibit higher mitochondrial activities compared with proliferating cells, which contributes to the production and secretion of senescence-associated secretory proteins. The researchers performed gene-knockdown screen and revealed that depletion of SETD8 or NSD2 histone methyltransferase cause senescence and senescence-associated abnormal activation of mitochondrial respiration. Mechanistically, depletion of SETD8 decreased the levels of histone H4 lysine 20 mono-methylation at p16 and p21 gene loci and activated their expression. Then, p16 and p21 activated retinoblastoma protein (RB) to enhance mitochondrial respiration. Loss of NSD2 also activated p21 and RB to induce senescence. In summary, our data revealed that multiple epigenetic regulators contribute to preventing senescence and senescence-associated metabolic remodeling by maintaining p16/p21-RB pathway.

研究分野：老化エピゲノム

キーワード：細胞老化 老化 エピジェネティクス ヒストン修飾 ミトコンドリア

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

個体老化において、体細胞のゲノムに変異が蓄積するとともに「エピゲノム」の変化が重要な役割を果たしていることが分かってきた[1]。エピゲノムとはDNAにコードされた遺伝子をどのように使うかを制御するメカニズムのことで、DNAおよびヒストンへのメチル化などの化学修飾、クロマチン結合タンパク質のDNAへの結合、さらには細胞核内でのゲノムDNAの立体配置などにより決められる。エピゲノムは、細胞の種類によって異なるとともに、同じ細胞であっても機能が異なる時に変化し、遺伝子の発現、DNAの複製・修復、ならびに染色体の有糸分裂などを制御している。そのため細胞の老化によりエピゲノムが変化すると、細胞ならびに臓器の機能低下につながる。実際に、ヒトやマウスの個体の臓器において加齢とともに老化した細胞が蓄積することが報告されている[2]。また興味深いことに、老化した細胞を生体内から除去することで、臓器の機能が回復することが示唆されている[3,4]。従って、細胞の老化過程におけるエピゲノム制御異常のメカニズムを解明し、細胞の老化を防ぐことができれば、個体老化に伴う様々な組織の機能低下を防ぐことに繋がると考えられる。

細胞老化 (senescence) はDNA損傷ストレスや代謝ストレスなど、様々な細胞ストレスにより実験的に誘導されることが分かっている。老化した細胞は増殖能が低下し、様々な細胞老化マーカーが現れる。代表的なマーカーとして、細胞老化関連β-ガラクトシダーゼ (SA-β-Gal) 活性の増加、細胞の増殖を制御する *p16/INK4A* 遺伝子の発現上昇が認められる。また、老化した細胞は細胞内の解糖ならびにミトコンドリアの代謝活性が上昇し、それに伴い老化細胞に特異的な分泌物を産生・放出し、周囲の細胞にも機能異常を引き起こすことが分かってきた[5]。そのため、細胞内代謝を制御するエピゲノム因子は細胞の老化を防ぐ重要な因子であると考えられるが、現在までにその報告例は少ない。

参考文献： [1]. Booth and Brunet, *Molecular Cell* 62, 728-744, 2016、 [2]. Muñoz-Espín and Serrano, *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 482-496, 2014、 [3]. Baker et al., *Nature* 530, 184-189, 2016、 [4]. Baar et al., *Cell* 169, 132-147, 2017、 [5]. Wiley and Campisi, *Cell Metabolism* 23, 1013-1021, 2016

## 2. 研究の目的

エピゲノムの正常な制御が細胞老化を防ぐ上で重要であることから、いくつかのエピゲノム制御因子の機能低下は細胞老化を促進すると予想される。申請者はこれまでに、細胞老化を防ぐ上で重要なエピゲノム制御因子を探索することを目的として、ヒト正常線維芽細胞株 IMR-90 細胞を用いて 79 種類のエピゲノム関連遺伝子等をターゲットにした siRNA スクリーニングを行なった。老化した細胞はミトコンドリア代謝活性ならびにミトコンドリア量が顕著に増加することが知られている (Fig. 1a)。本研究では、ミトコンドリアの形態変化を指標とした siRNA スクリーニングを行うことで、細胞老化におけるミトコンドリア代謝制御に関わる因子を明らかにするとともに、それらの遺伝子によるエピゲノム制御ならびに細胞老化制御の仕組みを解明することを目的とする。

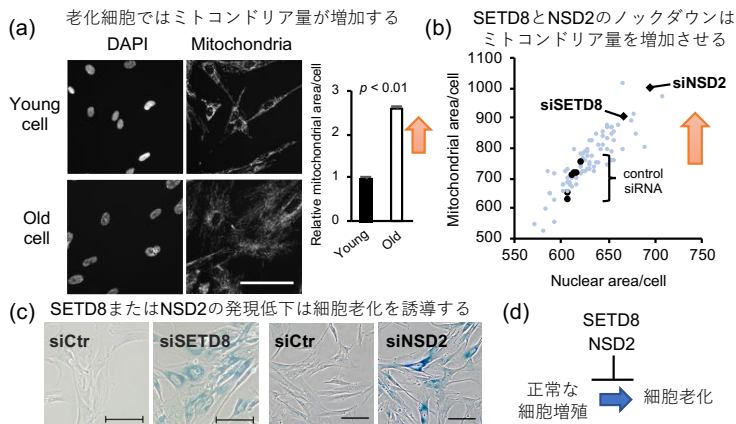


Fig. 1 SETD8およびNSD2はヒト線維芽細胞を細胞老化から防ぐ  
(a). ハイコンテント画像解析装置による、複製老化 (細胞分裂を繰り返すことで起こる老化) 細胞内のミトコンドリア量の定量。 (b). siRNAライブラリーを用いたミトコンドリア量の変化を指標としたスクリーニング。 (c). SETD8とNSD2のノックダウン細胞における細胞老化マーカーSA-β-Gal染色。 (d). SETD8とNSD2は細胞老化から細胞を守る働きをしている。

## 4. 研究成果

siRNAによるノックダウン後、細胞内のミトコンドリア量を測定したところ、SETD8、NSD2といったエピゲノム修飾因子のノックダウンにより細胞内のミトコンドリア量が顕著に増加することが分かった (Fig. 1b)。また、SETD8あるいはNSD2遺伝子のノックダウンにより、ノックダウン3日目から細胞増殖の低下ならびに細胞老化マーカーであるSA-β-Galの染色が観察された (Fig. 1c)。これらのことから、SETD8ならびにNSD2は細胞を老化から防ぐために重要なエピゲノム因子であることが初めて明らかになった (Fig. 1d)。

続いてSETD8あるいはNSD2の発現低下がどのように細胞内のエピゲノムを変え、細胞老化におけるミトコンドリア代謝変化に寄与しているかを解析した。SETD8はヒストンH4リジン

## 3. 研究の方法

siRNAによる遺伝子のノックダウン後、抗ミトコンドリアタンパク質抗体によりミトコンドリア領域を免疫染色し、ハイコンテント画像解析装置を用いて細胞内の総ミトコンドリア量を測定した。その後、ノックダウンにより細胞内のミトコンドリア量が有意に増加した遺伝子が、細胞老化ならびに細胞老化におけるミトコンドリア代謝変化をどのように制御しているか明らかにするため、トランスクリプトーム解析、クロマチン免疫沈降、ならびにミトコンドリア代謝活性測定を行った。

20番目をモノメチル化 (H4K20me1) し、NSD2 はヒストン H3 リジン 36 番目をジまたはトリメチル化 (H3K36me2, H3K36me3) することで遺伝子の発現を制御することが報告されている。そこで、SETD8 または NSD2 をノックダウンした細胞においてトランスクリプトーム解析ならびにクロマチン免疫沈降によるエピゲノム解析を行った。その結果、SETD8 の発現低下により、細胞老化に重要な遺伝子である *p16/INK4A* および *p21/CDKN1A* 遺伝子領域上の H4K20me1 の蓄積量が低下するとともにこれらの遺伝子の発現上昇が観察された (Fig. 2a,b)。このことから、SETD8 は H4K20me1 を介してこれらの遺伝子の発現抑制に貢献していることが示唆された。

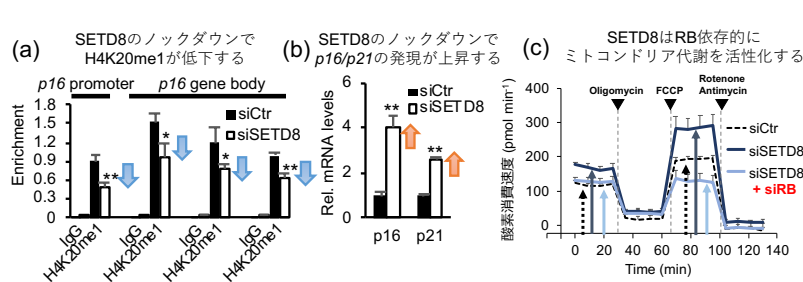


Fig. 2 SETD8の発現低下はp16/p21-RB経路を介して老化細胞内のミトコンドリア代謝の活性化に寄与する (a). SETD8ノックダウン細胞におけるp16遺伝子領域上のH4K20me1のクロマチン免疫沈降解析。 (b). SETD8ノックダウン細胞におけるp16/p21遺伝子のqRT-PCR解析。 (c). フラックスアナライザーを用いた、SETD8ならびにRBのノックダウン細胞におけるミトコンドリア酸素消費速度の解析。 \*\*:  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$

p16 および p21 タンパク質はサイクリン依存性キナーゼタンパク質と結合し、その機能を阻害することで間接的に網膜芽細胞腫タンパク質 (RB) を活性化する。細胞老化において、RB はクロマチンに結合し、細胞周期制御に関わる遺伝子の発現を抑制することが報告されているが、老化細胞内の代謝にどのような影響を与えるか分かっていなかった。興味深いことに、SETD8 ノックダウン

細胞において RB をノックダウンすると、ミトコンドリアの酸化的リン酸化ならびに活性酸素種の産生が抑えられることが分かった (Fig. 2c)。この結果は SETD8 の発現低下が p16/p21-RB 経路を活性化することで細胞のミトコンドリア呼吸活性を上昇させていることを示唆している。さらに NSD2 のノックダウンによっても p21 遺伝子の発現上昇ならびに RB の活性化が誘導されることが分かり、複数のエピゲノム因子の発現異常が、RB を介した細胞老化ならびにミトコンドリア代謝の異常調節に関わることが明らかになった。

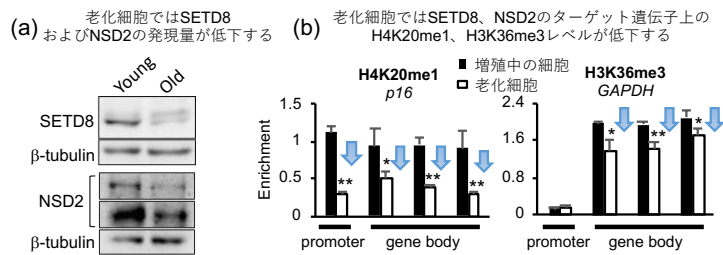


Fig. 3 SETD8およびNSD2の発現低下は老化エピゲノムの形成に貢献する (a). 老化細胞におけるウェスタンブロット。 (b). 老化細胞内のp16遺伝子ならびにGAPDH遺伝子上のH4K20me1またはH3K36me3蓄積量のChIP解析。 \*\*:  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$

また SETD8 ならびに NSD2 は老化細胞内で顕著に発現量が低下することが確認された (Fig. 3a)。それに伴い、老化細胞における SETD8 および NSD2 のターゲット遺伝子上の、H4K20me1 ならびに H3K36me3 の蓄積量の低下が観察された (Fig. 3b)。これらの結果は、SETD8 ならびに NSD2 の発現低下が、実際に老化細胞内のエピゲノム制御異常に関わっていることを示唆している。

#### 【申請者のこれまでの研究のまとめと課題】

申請者はこれまでにヒト線維芽細胞をモデルとして、細胞老化に関わるエピゲノム制御因子の探索を行った。その結果、SETD8 と NSD2 が細胞の増殖に必須であり、これらの因子の発現低下は細胞のエピゲノムを変化させるとともに、細胞老化を促進することが明らかになった。またこれらの因子の発現低下は RB を活性化することで細胞老化におけるミトコンドリア代謝の異常亢進に寄与することが示唆された。これらの結果は、細胞のエピゲノム制御の異常が細胞の老化に直接結びつきうることを示す証左となる。一方、H4K20me1 および H3K36me3 といった老化で変化するエピゲノムマークが、実際にどのようにして遺伝子の転写あるいはクロマチン機能の制御に関わっているか分かっていない。今後、エピゲノムの変化がどのように細胞あるいは個体の老化制御に貢献しているかさらなる研究が必要である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

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

〔学会発表〕 (計 3 件)

【国内学会口頭発表】

○田中宏、竹林慎一郎、坂元顕久、井形朋香、斉藤典子、日野信次朗、中尾光善、細胞老化におけるエネルギー代謝制御機構の解明、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) ワ

ークショップ「生老病死」の分子生物学」、神戸、2017年12月

【国内学会ポスター発表】

○田中宏、井形朋香、古賀友紹、竹林慎一郎、日野信次朗、中尾光善、細胞老化に関わるヒストン修飾酵素の探索と機能解析、第12回日本エピジェネティクス研究会年会、北海道、2018年5月

○田中宏、竹林慎一郎、坂元顕久、井形朋香、斉藤典子、日野信次朗、中尾光善、SETD8/PR-Set7メチル基転移酵素は細胞老化に関わる代謝リモデリングを抑制する、第11回日本エピジェネティクス研究会年会、東京、2017年5月

〔図書〕(計 0 件)

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。