

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659152

研究課題名(和文) リジン脱メチル化阻害による抗加齢効果とその応用開発

研究課題名(英文) Anti-aging effect of lysine demethylase inhibition and its biomedical application

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) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の老化と抗加齢効果については、多く因子が相互作用するため複合的であり、不明な点が多い。本研究では、脱メチル化酵素LSD1およびメチル化酵素SETDB1の共役因子MCAF1に着目し、細胞老化における意義について検討した。RNA干渉法や化合物を用いたLSD1阻害によって、組織由来の異なる細胞で、ミトコンドリア機能が活性化することが判明した。多くの加齢性疾患でミトコンドリア機能が低下するので、治療的なアプローチの可能性が示唆された。また、RNA干渉法でMCAF1を選択的に阻害した線維芽細胞は、老化が有意に促進された。老化と抗加齢効果において、これらの因子が関わることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cellular senescence and anti-aging effect have not been fully understood due to the involvement of various factors and their interactions. In this study, we investigated the role of lysine demethylase LSD1 and MCAF1, which is a cofactor of lysine methylase SETDB1, in cellular function. LSD1 inhibition activated mitochondrial respiration in various cell types. LSD1 may be a therapeutic target, because aging-related diseases often have mitochondrial dysfunction. In addition, MCAF1 depletion markedly accelerated senescent changes in fibroblasts. Our results indicate that these factors play an essential role in cellular senescence and anti-aging effect.

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：病態医化学

キーワード：遺伝子 発現制御 老化 エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

細胞の老化とそれを抑制する抗加齢効果については、さまざまな因子が相互作用するため、極めて複合的であり、不明な点が多い。また、遺伝と環境の相互作用で生じる加齢性疾患には、生活習慣病、認知症、癌等が挙げられるが、これらの発症機序および治療・予防法には不明な点が多いため。近年、DNAのメチル化とヒストン修飾等で形成されるエピゲノムの実体が明らかになり、さらに環境因子や細胞老化がエピゲノムに多大に影響することが示唆されてきた。

2. 研究の目的

本研究では、リジン脱メチル化酵素LSD1およびリジンメチル化酵素SETDB1の共役因子MCAF1に着目し、細胞老化における意義について明確にすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 老化細胞におけるLSD1の発現状況に関する解析 [1] 細胞老化におけるLSD1の発現解析：線維芽細胞株でER-Rasの発現誘導を行い、ヘテロクロマチン形成を免疫染色で確認した。LSD1やINK4の発現などについて、複製後セネッセンスでも検討した。[2] マウス代謝組織におけるLSD1の発現解析：マウスの各種組織での発現状況を検討した。[3] LSD1の細胞内局在の解析：特異的な抗体を用いて、免疫沈降および免疫染色を行い、細胞内や組織内の局在を検討した。

(2) LSD1阻害による遺伝子発現および代謝機能の解析 [1] LSD1のRNA干渉法、トラニルシプロミンによる阻害：LSD1の特異的ノックダウン、トラニルシプロミンまたは阻害化合物を用いた。[2] LSD1阻害における遺伝子発現の網羅的解析：マイクロアレイで検討した。[3] LSD1のクロマチン免疫沈降-リアルタイムPCR解析：特異抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行い、標的遺伝子プロモーターにおける局在を検討した。[4] LSD1阻害におけるミトコンドリア機能の解析：蛍光色素JC-1の細胞染色、細胞外フラックスアナライザーを用いて、細胞の代謝能を検討した。

(3) MCAF1阻害による細胞老化誘導の解析 [1] MCAF1のRNA干渉法による阻害：細胞老化のマーカーについて検討した。[2] MCAF1阻害における遺伝子発現の網羅的解析：マイクロアレイで検討した。[3] 細胞老化の解析：ヌクレオソームの形成状態、ヒストンの発現、細胞核内のクロマチン状態をヌクレアーゼ感受性、ウエスタンブロット、細胞染色などで解析した。

4. 研究成果

(1) RNA干渉法や化合物を用いたLSD1阻害によって、組織型の異なる細胞でも共通

して、ミトコンドリア機能が活性化することが判明した。多くの加齢性疾患ではミトコンドリア機能が不全になることが知られており、その関連性が示唆された。

(2) SETDB1メチル化酵素の共役因子であるMCAF1について、RNA干渉法を用いて選択的に阻害した。MCAF1を欠いた線維芽細胞は、速やかに老化が促進されることが分かった。各種の老化マーカーが有意に増加して、ヒストンの遺伝子やタンパク質が著しく減少することが判明した。

このように、老化のエピジェネティックな制御機構を明らかにすることで、抗加齢という治療・予防的なポテンシャルにつなげる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12件、全て査読あり)

1. S. Kanda, T. Ohmori, A. Taguchi, K. Kudo, T. Horiuchi, Y. Sato, S. Hino, Y. Suzuki, M. Sander, S. Sugano, M. Nakao, and R. Nishinakamura. Sall1 co-operates with Six2 to actively maintain nephron progenitors. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2014.

2. Y. Baba, M. Watanabe, A. Murata, H. Shigaki, K. Miyake, T. Ishimoto, M. Iwatsuki, S. Iwagami, N. Yoshida, E. Oki, K. Sakamaki, M. Nakao, and H. Baba. LINE-1 hypomethylation, DNA copy number alterations, and CDK6 amplification in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2014 (doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1645)

3. A. Murata, Y. Baba, M. Watanabe, H. Shigaki, K. Miyake, T. Ishimoto, M. Iwatsuki, S. Iwagami, N. Yoshida, E. Oki, M. Morita, M. Nakao, and H. Baba. IGF2 DMR0 methylation, loss of imprinting, and patient prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 2014 (doi: 10.1245/s10434-013-3414-7)

4. N. Sasai, N. Saitoh, H. Saitoh, and M. Nakao. The transcriptional cofactor MCAF1/ATF7IP is involved in histone gene expression and cellular senescence. *PLoS One* 87: e68478, 2013.

5. S. Hino, K. Nagaoka, and M. Nakao. Metabolism-epigenome crosstalk in physiology and diseases. *J. Hum. Genet.* (Reviews, Special Section on Epigenomics: biological understanding and clinical application) 58: 410-415, 2013.

6. Y. Xi, S. Watanabe, Y. Hino, C. Sakamoto, Y. Nakatsu, S. Okada, and M. Nakao. Hmga1 is differentially expressed and mediates silencing of the Cd4/Cd8 loci in T cell lineages and leukemic cells. **Cancer Sci.** 103: 439-447, 2012.

7. A. Fournier, N. Sasai, M. Nakao and P.A. Defossez. The role of methyl-binding proteins in chromatin organization and epigenome maintenance. **Brief Funct. Genomics** 11: 251-264, 2012.

8. N. Saitoh, C. Sakamoto, M. Hagiwara, L.T. Agredano-Moreno, L.F. Jiménez-García, and M. Nakao. The distribution of phosphorylated SR proteins and alternative splicing are regulated by RANBP2. **Mol. Biol. Cell** 23: 1115-1128, 2012.

9. M. Taura, M.A. Suico, K. Koyama, K. Komatsu, R. Miyakita, C. Matsumoto, E. Kudo, R. Kariya, H. Goto, S. Kitajima, C. Takahashi, T. Shuto, M. Nakao, S. Okada, and H. Kai. Rb/E2F1 regulate innate immune receptor Toll-like receptor 3 in epithelial cells. **Mol. Cell. Biol.** 32: 1581-1590, 2012.

10. A. Hirose, K. Ishihara, K. Tokunaga, T. Watanabe, N. Saitoh, T. Chandra, M. Narita, M. Shinohara, and M. Nakao. Quantitative assessment of higher-order chromatin structure of the INK4/ARF locus in human senescent cells. **Aging Cell** 11: 553-556, 2012.

11. T. Watanabe, K. Ishihara, A. Hirose, S. Watanabe, S. Hino, H. Ojima, Y. Kanai, Y. Sasaki, and M. Nakao. Higher-order chromatin regulation and differential gene expression in human tumor necrosis factor/lymphotoxin locus in hepatocellular carcinoma cells. **Mol. Cell. Biol.** 32: 1529-1541, 2012.

12. S. Hino, A. Sakamoto, K. Nagaoka, K. Anan, Y. Wang, S. Mimasu, T. Umehara, S. Yokoyama, K. Kosai, and M. Nakao. FAD-dependent lysine demethylase LSD1 regulates cellular energy expenditure. **Nature Commun.** 3: 758, 2012.

[学会発表](計18件)

1. 齊藤典子、松森はるか、坂本智代美、中尾光善. 核スペックルの形成機序と遺伝子発現制御における機能. 第36回日本分子生物学会年会(ワークショップ:クロマチンと核構造のインタープレーが織りなす生命現

象)平成25年12月5日、神戸ポートピアホテル

2. 中尾光善. エピジェネティクス機構によるエネルギー代謝調節と病態. 第34回日本肥満学会(シンポジウム:白色・褐色脂肪細胞研究の最前線)平成25年10月11日、東京国際フォーラム

3. 中尾光善. エピジェネティクス機構によるエネルギー代謝調節と病態. 第21回日本血管生物医学会学術集会(シンポジウム:細胞代謝が制御する動的恒常性と破綻~心血管疾患の制圧に向けて~)平成25年9月27日、千里阪急ホテル

4. 齊藤典子、松森はるか、オサマ・アブラダ・モハメド、藤原さおり、中尾光善. 核スペックルと核小体の形成機序と機能. 第86回日本生化学会大会(シンポジウム:細胞核内構造体の構築原理と高次生命機能)平成25年9月11日、パシフィコ横浜

5. 中尾光善. エピジェネティクス機構によるエネルギー代謝調節と病態. 第56回日本糖尿病学会年次学術集会(シンポジウム:糖尿病とエピジェネティクス)平成25年5月18日、ホテル日航熊本

6. 中尾光善、石原宏、齊藤典子. 高次エピゲノム機構による細胞プログラムの制御. 第85回日本生化学会大会(シンポジウム:生命活動における高次エピゲノム制御の分子基盤)平成24年12月15日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

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. ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 による癌代謝制御. 第85回日本生化学会大会(シンポジウム:ミトコンドリア応答性から見る細胞機能解析:ミトコンドリア研究の新しい視点)平成24年12月15日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

8. 日野信次朗、坂元顕久、長岡克弥、阿南浩太郎、高瀬隆太、中尾光善. Epigenetic regulation of cellular energy flow by FAD-dependent LSD1. 第85回日本生化学会大会(シンポジウム:Networks of transcription and metabolism: physiology, diseases, and structural basis)平成24年12月15日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

9. 笹井信広、中尾光善. MCAF1/SETDB1 リジンメチル化酵素複合体の細胞老化における役割. 第35回日本分子生物学会年会(ワークショップ:分子修飾による転写とエピジェネティック制御のクロストーク)平成24年12月13日、福岡国際会議場・マリンメッセ

福岡

10. 日野信次朗、坂元顕久、長岡克弥、阿南浩太郎、高瀬隆太、中尾光善。細胞のエネルギー戦略とエピジェネティクス。第35回日本分子生物学会年会(ワークショップ:生命現象をエネルギー代謝から理解する)平成24年12月12日,福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

11. 竹林慎一郎、中尾光善、David M. Gilbert。核内クロマチン相互作用解析により明らかになったマウスES細胞分化過程で制御を受ける染色体ドメインの特殊なクロマチン折りたたみ原理。第35回日本分子生物学会年会(ワークショップ:細胞核構造体によるエピゲノム制御機構)平成24年12月12日,福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

12. 徳永和明、斉藤典子、Goldberg Ilya G、中尾光善。細胞核形態の定量的解析によるiPS細胞の識別。第35回日本分子生物学会年会(ワークショップ:核内構造ネットワーク:分子構築と高次生命機能への寄与)平成24年12月12日,福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

13. M. Nakao. Gene regulation and cell function mediated by epigenetic factors. 8th 3R Symposium (International Symposium on DNA Replication, Recombination and Repair. November 27, 2012 (Awaji yumebutai international conference center))

14. 中尾光善、坂元顕久、日野信次朗。エピジェネティクス機構によるエネルギー代謝調節と病態。日本人類遺伝学会第57回大会(シンポジウム:エピジェネティクス研究の新展開)平成24年10月25日,京王プラザホテル

15. 斉藤典子、徳永和明、松森はるか、田代聡、中尾光善。細胞核の画像定量解析による細胞状態の評価。日本放射線影響学会第55回大会ワークショップ、平成24年9月6日,東北大学(仙台市)

16. 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35回日本基礎老化学会(特別講演)平成24年7月26日,東邦大学習志野キャンパス

17. 中尾光善。エピジェネティクス機構による細胞病態と治療。第18回日本遺伝子治療学会学術集会(シンポジウム)平成24年6月29日,ホテル熊本テルサ

18. 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55回日本腎臓学会(教育講演)平成24年6月2日,パシフィコ

横浜

〔図書〕(計13件)

1. 高瀬隆太、日野信次朗、中尾光善。エネルギー代謝のエピジェネティック制御と疾患、エピジェネティクス 基礎研究から産業応用への展望、シーエムシー出版(印刷中)

2. 藤原沙織、富田さおり、中尾光善。乳癌のエピゲノム異常と診断・治療への応用、遺伝子医学MOOK25号(エピジェネティクスと病気)(佐々木裕之、中尾光善、中島欽一編)、メディカル・ドゥ、88-94, 2013.

3. 阿南浩太郎、中尾光善、日野信次朗。エネルギー代謝病、遺伝子医学MOOK25号(エピジェネティクスと病気)(佐々木裕之、中尾光善、中島欽一編)、メディカル・ドゥ、106-111, 2013.

4. 竹林慎一郎、中尾光善。哺乳類遺伝子発現に重要な高次エピゲノム制御、化学と生物、51: 597-599, 2013.

5. 斉藤典子、徳永和明、松森はるか、中尾光善。核内ボディーの構造・機能・形成機序、染色体と細胞核のダイナミクス(平岡泰・原口徳子編)、化学同人、147-168, 2013.

6. 石原宏、中元雅史、中尾光善。高次構造解析、エピジェネティクスキーワード事典、羊土社、282-289, 2013.

7. 斉藤典子、松森はるか、Mohamed O. Abdalla、藤原沙織、安田洋子、中尾光善。核内高次構造、エピジェネティクスキーワード事典、羊土社、91-98, 2013.

8. 富田さおり、笹井信広、日野信次朗、中尾光善。エピゲノム修飾を標的とした癌治療ポテンシャル、日本臨床、70: 91-97, 2012.

9. 中尾光善。基礎の基礎、3D-エピゲノムが生む新たな生命情報(中尾光善 監修)、細胞工学、31: 858-862, 2012.

10. 斉藤典子、徳永和明、松森はるか、富田さおり、中尾光善。細胞核内構造の計測・分類、3D-エピゲノムが生む新たな生命情報(中尾光善 監修)、細胞工学、31: 870-876, 2012.

11. 日野信次朗、中尾光善。エピジェネティック制御、シグナル伝達キーワード事典(山本雅、仙波憲太郎、山梨裕司編集)、羊土社、327-334, 2012

12. 中尾光善、日野信次郎. エピジェネティクス機構による代謝制御と病態、栄養とエピジェネティクス 食による身体変化と生活習慣病の分子機構 (ネスレ栄養科学会議監修)、建帛社、63-73, 2012.

13. 木下 聡、渡邊智佳子、中尾光善. 遺伝子調節とヒト疾患(12章翻訳)、遺伝情報の発現制御 転写機構からエピジェネティクスまで(David S. Latchman 原著、五十嵐和彦、深水昭吉、山本雅之 監訳)、メディカル・サイエンス・インターナショナル、365-385, 2012

〔産業財産権〕

取得状況(計1件)

名称：ミトコンドリア機能向上剤

発明者：中尾光善、日野信次郎

権利者：熊本大学

種類：特許

番号：US8,637,480

出願年月日：2014年1月28日

国内外の別：外国

〔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/

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