

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：33402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25750059

研究課題名(和文)食品成分由来ヒストン脱アセチル化酵素活性調節分子の探索と新規神経再生治療法の開発

研究課題名(英文) Screening of novel molecules that regulate the histone deacetylase activity from foods and development of nerve regeneration treatment

研究代表者

名取 貴光 (NATORI, Takamitsu)

山梨学院大学・健康栄養学部・准教授

研究者番号：00528721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)を阻害してアセチル化を亢進する食品由来成分としてシアニジンおよびペオニジンを見出した。マウス胎児脳由来の初代培養系神経細胞およびSH-SY5Y細胞株を用いて神経細胞保護効果と神経突起伸長に対する効果を検討し、これらの成分により、細胞保護効果においてCHOPの発現が有意に減少し、神経突起伸長効果においてGAP43の発現が有意に増加すること、また核におけるアセチル化p53の局在が増加していることが確認された。このことからシアニジンおよびペオニジンによる神経保護効果と神経突起伸長にはヒストンとp53のアセチル化の2つの機構が関係している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that cyanidin and peonidin inhibited histone deacetylase (HDAC) and increased histone acetylation. Using a primary culture neuronal cells and SH-SY5Y cell lines to consider the effect on the neuronal cell protective effect and the neurite outgrowth. Cyanidin and peonidin protected SH-SY5Y cells from endoplasmic reticulum stress, and promoted neuronal outgrowth in primary cultured neuronal cells. Cyanidin and peonidin decreased CHOP expression and increased GAP-43 expression. On the other hand acetylated p53 localized to the nucleus. Our data suggests that the neuroprotection and neurite elongation by cyanidin and peonidin might be involved in acetylation of histone and p53.

研究分野：神経科学、食品科学、生化学

キーワード：HDAC アントシアニジン 神経保護効果 神経突起伸長 ヒストンアセチル化 p53

1. 研究開始当初の背景

ヒストン脱アセチル化酵素 (Hdac) の阻害薬であるバルプロ酸には神経再生効果のあることが知られていたが、胎児の成長に重大な障害を引き起こすこと、また治療用薬剤であることからその使用には制限があった。一方、食品成分の一部に Hdac 活性を阻害する作用のあることが報告されていた。安全で日常的に摂取できる食品由来成分の中には神経再生に効果を発揮するものも知られているがその効果の作用機序は不明で、また Hdac 活性との関連も明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Hdac 活性を指標として神経再生および神経機能の回復効果を有する食品由来の天然成分を見つけ出し、神経損傷の治療や神経変性疾患の予防法を開発することである。

3. 研究の方法

(1) Hdac 活性阻害作用を有する天然成分の探索

各種植物・キノコ類等の凍結乾燥粉末をメタノールやアセトン、酢酸エチル等で抽出した後、人工合成蛍光基質を利用して Hdac 活性阻害作用を有する分子の探索を行った。

(2) Hdac 活性阻害分子の神経突起伸長促進効果及び細胞保護効果の検討

マウス胎児脳由来の初代培養神経細胞培養系に Hdac 活性を阻害する分子を添加して一定時間培養した後、神経細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定した。神経細胞マーカーのチューブリン- β -III 抗体にて免疫染色を行い、蛍光顕微鏡にて染色像を撮影した。画像解析ソフト ImageJ を用いて神経突起の長さ和本数の解析を行った。

また、SH-SY5Y 細胞株培養系に Hdac 活性を阻害する分子を添加して一定時間培養した後、ツニカマイシンを添加して小胞体ストレスを誘導 (細胞死誘導) した。一晚培養した際の細胞生存率を測定し保護効果の有無の検討を行った。

(3) Hdac 活性阻害分子による神経再生促進効果の分子メカニズムの解明

神経突起伸長促進効果または神経細胞保護効果の認められた Hdac 活性阻害分子を初代培養神経細胞および SH-SY5Y 細胞株培養系に添加し、Rho ファミリー G タンパク質を中心として、細胞骨格タンパク、PKC、Rho-ROCK 関連タンパク、NGF および NT、BDNF、p53 等の成長因子、細胞別分化マーカー、転写因子の発現変化をリアルタイム PCR 法及びウェスタンブロット法により経時的に解析した。ま

た、各種抗体を用いて免疫染色を行いヒストンのアセチル化や各種分子の発現の局在を確認した。

4. 研究成果

(1) Hdac 活性阻害作用を有する天然成分の探索について

供試した食品試料および数種の植物由来天然化合物の中から Hdac 活性阻害作用を有する分子としてアントシアニン類、フラボン類、イソフラボン類の数種を見出した。中でも、シアニン及びデルフィニジン、ペオニジン、ペチュニジン等アントシアニン類に強い Hdac 阻害活性のあることが明らかとなった (図 1)。また、これらアントシアニンはヒト脳由来の神経芽細胞種 (SH-SY5Y 細胞株) のヒストンのアセチル化量を増加させることがわかった (図 2、3B)。なお、Hdac 活性化剤であるテオフィリンを共投与するとヒストンのアセチル化量が増加しないことからアントシアニン添加の効果がエピジェネティック調節であることが確認された (図 3A)。

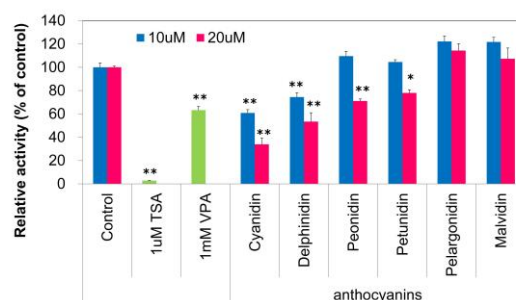


図 1. 食品由来天然成分による HDAC 活性阻害

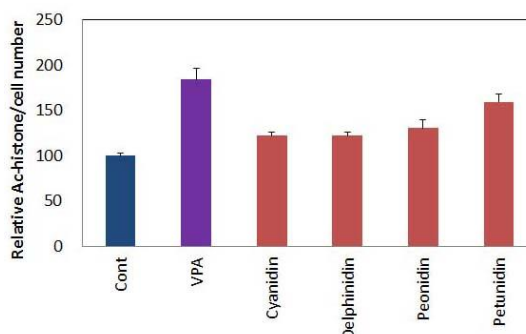


図 2. アントシアニン類によるヒストンのアセチル化亢進作用

(2) Hdac 活性阻害分子の神経突起伸長促進効果及び細胞保護効果の検討

次に、マウス胎児脳由来の初代培養系神経細胞を用いて神経突起伸長に対する効果を

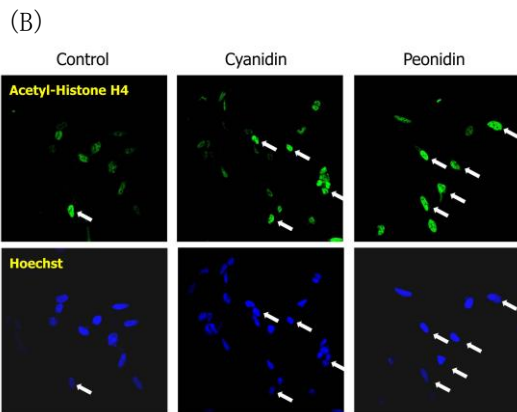
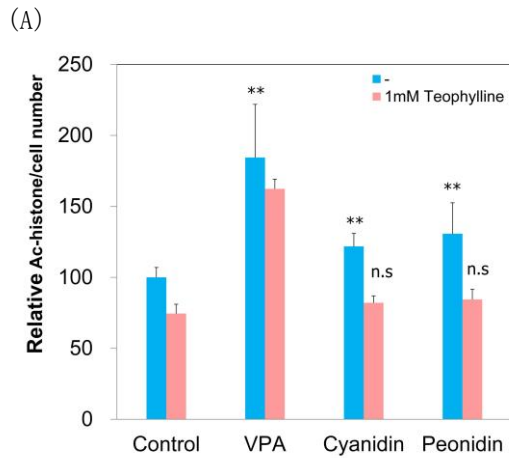


図3. シアニジンとペオニジンによるヒストンのアセチル化亢進作用

検討した。その結果、シアニジン、ペオニジン、ペチュニジンにおいて有意な神経突起伸長作用のあることが確認された(図4)。更に、SH-SY5Y細胞株を用いて小胞体ストレス付加に対する神経保護作用について検討を行ったところ、シアニジン、ペオニジン、ペラルゴニジン、マルビジンに小胞体ストレス細胞死を抑制する作用のあることが明らかとなった(図5)。また、これらは酸化ストレス付加時の神経細胞死に対しても保護効果を発揮していた。

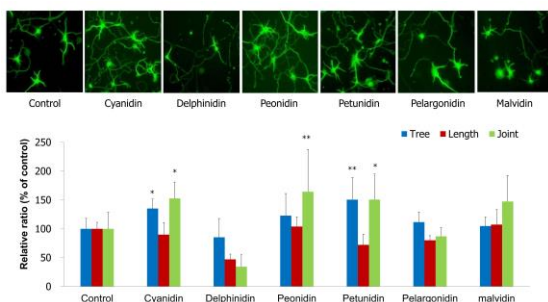


図4. アントシアニジンによる神経突起伸長促進効果

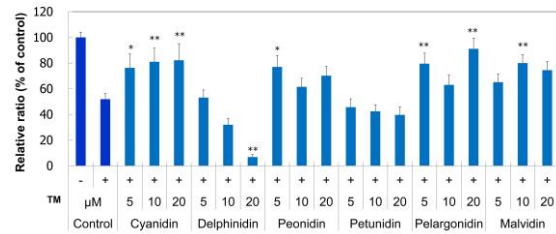


図5. アントシアニジンによる神経細胞保護効果

(3) Hdac 活性調節分子による神経再生促進効果の分子メカニズムの解明

各効果の作用機序を確認するため遺伝子解析を行った。神経細胞保護効果の検討においては、細胞死誘導マーカーである CHOP の発現が有意に減少し、神経突起の伸長の検討においては GAP43 の発現が有意に増加していることが明らかとなった(図6)。一方で、免疫染色によりアセチル化 p53 の局在を確認したところシアニジンおよびペオニジン群において核での発現が増加していることが確認された(図7)。転写因子の一つである p53 は突起伸長や神経細胞保護に関係する種々の遺伝子の発現に関与する重要な分子であるが、p53 の脱アセチル化には Hdac が関与していることが知られている。このことから、シアニジンおよびペオニジンによる神経保護効果と神経突起伸長にはヒストンと p53 のアセチル化亢進の2つが関係している可能性が示唆された。

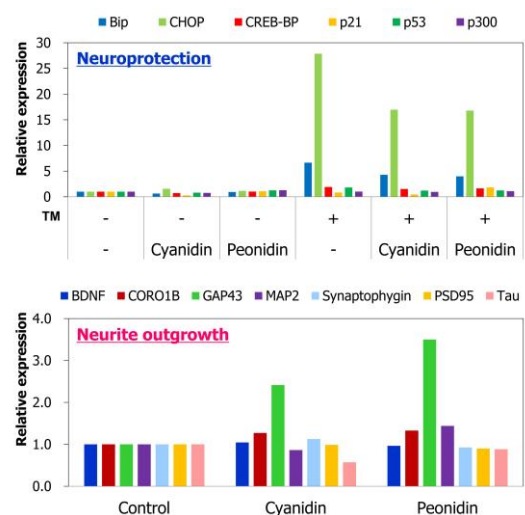


図6. シアニジン及びペオニジンにより発現増強される神経再生関連遺伝子

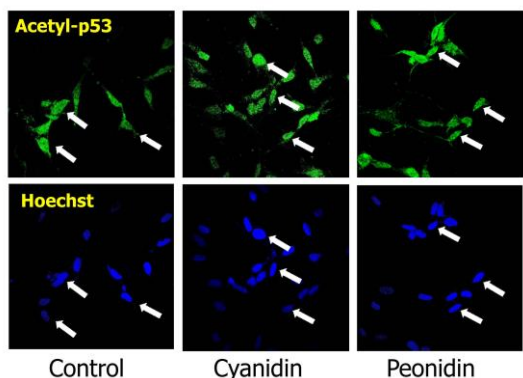


図7. シアニジン及びペオニジンにより誘導されるアセチル化 p53 の核移行

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 4 件 査読有)

- ① Natori T, Nakagawa Y, Sakurabayashi H, Fukui S, Noda S, Kubojima A, Tozawa K and Nakao R, Induction of apoptosis by extracts of edible wild plants in C6 glioma cells. Food Reservation science, 41, 91-102, 2015.
- ② Matsui H, Ohgomori T, Natori T, Miyamoto K, Kusunoki S, Sakamoto K, Ishiguro N, Imagama S, Kadomatsu K. Keratan sulfate expression in microglia is diminished in the spinal cord in experimental autoimmune neuritis, Cell Death Dis. e946, 2013.
- ③ Hirano K, Ohgomori T, Kobayashi K, Tanaka F, Matsumoto T, Natori T, Matsuyama Y, Uchimura K, Sakamoto K, Takeuchi H, Hirakawa A, Suzumura A, Sobue G, Ishiguro N, Imagama S, Kadomatsu K. Ablation of Keratan Sulfate Accelerates Early Phase Pathogenesis of ALS, PLoS One. e66969, 2013.
- ④ Muramoto A, Imagama S, Natori T, Wakao N, Ando K, Tauchi R, Hirano K, Shinjo R, Matsumoto T, Ishiguro N, Kadomatsu K. Midkine overcomes neurite outgrowth inhibition of chondroitin sulfate proteoglycan without glial activation and promotes functional recovery after spinal cord injury, Neuroscience letters, 550, 150-155, 2013.

[学会発表] (計 12 件)

- ① 吉原沙奈恵, 小田切香, 中川裕子, 千野正章, 仲尾玲子, 名取貴光, 骨代謝調節作用を有する在来農産物の探索, 日本食品保蔵科学第 64 回大会 (東京大会), 2015.
- ② 名取貴光, 吉原沙奈恵, 小田切香, 中川裕子, 千野正章, 仲尾玲子. 在来農産物によるアミロイドβ凝集抑制および神経細胞保護効果について, 日本食品保蔵科学第 64 回大会 (東京大会), 2015.
- ③ Natori T, Nagai K, Komatsu Y, Kadomatsu K. Keratan sulfate regulate neuronal plasticity in visual cortex. Annual meeting of the Society for Neuroscience, Washington, DC, USA, 2014.
- ④ Nagai K, Natori T. Phytanic acid induces Neuro2a cell death via histone deacetylase activation. Annual meeting of the Society for Neuroscience, Washington, DC, USA, 2014.
- ⑤ 名取貴光, 長井薫. アントシアニンのヒストン脱アセチル化を介した神経細胞保護及び神経突起伸長作用, 第 87 回日本生化学会大会 (京都), 2014.
- ⑥ 長井薫, 名取貴光. フィタン酸はヒストン脱アセチル化酵素(Hdac)活性化とミトコンドリア障害を介しNeuro2a細胞に細胞死を誘導する, 第 87 回日本生化学会大会 (京都), 2014.
- ⑦ 名取貴光, 中川裕子, 仲尾玲子. 天然色素による神経突起伸長および神経保護効果について, 日本食品保蔵科学第 63 回大会 (長野大会), 2014.
- ⑧ 仲尾玲子, 小田切香, 吉原沙奈恵, 中川裕子, 名取貴光. 植物性食品由来抽出物に含まれる機能性成分の網羅的解析, 日本食品保蔵科学第 63 回大会 (長野大会), 2014.
- ⑨ 名取貴光, 長井薫. Neurite outgrowth and neuroprotective effect by polyphenols is regulated by histone deacetylase (HDAC) families. 日本農芸化学会 2014 年度大会 (東京), 2014.

- ⑩ 名取貴光, 長井薫. Relationship of histone deacetylation and natural product-derived pigments exhibit anti-inflammatory activity and neuroprotective effects. 第86回日本生化学会大会(横浜), 2013.
- ⑪ 大箆友博, 平野健一, 小林和克, 松本智宏, 名取貴光, 平川晃弘, 今釜史郎, 門松健治. Ablation of Keratan Sulfate accelerates early pathogenesis of ALS. 第36回日本神経科学大会, 2013.
- ⑫ 杉山茜, 望月春菜, 名取貴光, 中川裕子, 仲尾玲子. 山菜ポリフェノールの抗酸化活性とヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の活性調節について, 日本食品保蔵科学第62回大会(山形大会), 2013.

[図書] (計 2件)

- ① 名取貴光, 高橋書店, 新・野菜の便利帳, 2016, 176.
- ② 吉田真史、谷口亜樹子、名取貴光、大道公秀、茂木秀喜、成井浩二, 光生館, 基礎化学と生命化学, 2014, 162.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

名取 貴光 (NATORI, Takamitsu)
山梨学院大学・健康栄養学部・准教授
研究者番号: 00528721