

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02898

研究課題名(和文) 食事性亜硝酸によるエピゲノム修飾に対する作用と生理的役割解明

研究課題名(英文) Physiological role of dietary nitrite

研究代表者

玉置 俊晃 (TAMAKI, Toshiaki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・教授

研究者番号：80179879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：高脂肪食負荷ラットでは、耐糖能の異常が起きるが亜硝酸塩を同時投与することにより耐糖能異常が改善する。この現象は、亜硝酸塩によるAMPKを直接活性化することとグルカゴン分泌抑制作用が関与する可能性が示唆された。亜硝酸塩は、ヒト血管内皮細胞において内皮障害マーカーのVCAM-1の発現抑制や、内皮保護分子であるERK5の活性化をおこした。脂肪毒性に対して亜硝酸塩の長期投与を行ない、DNAメチル化解析を行った。亜硝酸の有無に関わらずDNAのメチル化パターンに有意な差は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Impaired glucose tolerance occurs in high-fat diet loaded rats, but impaired glucose tolerance improves by simultaneously administering nitrite. This phenomenon suggested that direct activation of AMPK by nitrite and the inhibitory action on glucagon secretion may be involved. Nitrite inhibited expression of endothelial injury marker VCAM-1 in human vascular endothelial cells and activated endothelial protective molecule ERK5. Long-term administration of nitrite to fatty toxicity was performed and DNA methylation analysis was performed. There was no significant difference in DNA methylation pattern with or without nitrite.

研究分野：薬理学

キーワード：亜硝酸 硝酸 エピゲノム グルカゴン AMP kinase

1. 研究開始当初の背景

(1) 「野菜を食べると体に良い」ことを科学的に証明するために、我々は野菜に多く含まれる硝酸・亜硝酸に注目して研究を行っている。生体内では、これまでの L-arginine を基質として nitric oxide synthases (NOS) によって生成するとされてきた NO(nitric oxide) 産生系 (classic L-arginine-NOS pathway) の他に硝酸・亜硝酸から NO が産生される nitrate-nitrite-nitric oxide pathway が存在する。

(2) 亜硝酸塩 (イオン) そのものが生理活性物質であるという可能性がある。亜硝酸が生理活性物質であると証明するためには、食事で摂取できる亜硝酸量で、AMPK を中心とした糖代謝・脂肪代謝に関する細胞内情報伝達機構が変動することを示す必要がある。

(3) 遺伝子発現に関与するエピゲノム修飾を引き起こす環境因子として毎日 3 回摂る「食」が注目されている。野菜を多く取るヒトが高血圧や循環器障害が少ないことが、疫学的に報告されているがそのメカニズムは十分には解明されていない。食によるエピゲノム修飾は、遺伝子にエピジェネティックメモリーとして徐々に蓄積されて閾値を超えると慢性疾患が発症すると考えられている。

2. 研究の目的

細胞内情報伝達機構に対する硝酸・亜硝酸の作用を解明し、野菜から多く摂取される食事性硝酸・亜硝酸による慢性的低濃度刺激が引き起こすヒトの細胞に対するエピゲノム修飾を解明して、食事性亜硝酸の生理作用の本質に迫る。

3. 研究の方法

(1) ラットを使用して食餌性亜硝酸による生理的役割解明研究を行う。糖代謝異常動物に亜硝酸塩の投与により、耐糖能異常がどの様に変化するかを明らかにする。

(2) ヒトの培養細胞 (内皮細胞、肝細胞、骨格筋細胞) を用いて、生体内での生理的濃度

の硝酸・亜硝酸による AMPK を中心とする糖代謝・脂肪代謝に関する細胞内情報伝達機構の変化を細胞種別に明らかにする。

(3) 亜硝酸による糖代謝・脂肪代謝に関する酵素活性の変化の大きい細胞種を用いて、DNA メチル化アレイを使用して亜硝酸によるエピゲノム修飾が起こりやすい遺伝子を同定する。

4. 研究成果

(1) Wistar ラットを 4 群 (通常食群、高脂肪食群、高脂肪食に亜硝酸 Na を 100mg/L または 1000mg/L で飲水に混ぜて投与した群) に分け、投与 1 週目に経口糖負荷試験 OGTT を、投与 2 週目に血中トリグリセライド値および空腹時インスリン値を測定した。OGTT、HOMA-IR、そして血中 TG は亜硝酸塩の投与で有意な改善が見られ、一方、血中インスリン値は変化がなかった。

(2) ヒトの培養細胞 (内皮細胞、肝細胞、) を用いて、生体内での生理的濃度の硝酸・亜硝酸による AMPK の直接活性作用を見いだした。亜硝酸による血糖降下作用はグルカゴン分泌の抑制によるものではないかと仮説を立て、培養膵細胞 (TC 細胞) に亜硝酸塩を添加すると、グルカゴン分泌が低下する現象を見出した。

(3) ヒトの染色体から 1 塩基レベルまでのゲノム・エピゲノム解析技術基盤と情報解析パイプラインの整備をさらに進めたが、細かなエピゲノム変化解析は困難であった。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞に食品機能因子や栄養素による刺激を与えても、全ゲノム DNA のメチル化パターンは大きくは変化していなかった。ケルセチングルクロン酸抱合体 (Q3GA) で血管内皮細胞を長期刺激後、マイクロアレイ解析 (Agilent) および、DNA メチル化解析 (Illumina) を行った。その結果、血液凝固やフラボノイドの代謝に関わるいくつかの遺伝子で Q3GA による発現の変化が見られた。一方、全ゲノム DNA のメチル化パ

ターンを変化させていなかった。ヒト大動脈瘤を用いた検討で関与が示唆されているヒストンアセチル化について解析を行った。動物実験では、ケルセチン投与群の大動脈組織から抽出した H3K9 のアセチル化を増加させる傾向を認めた。その病態的意義については検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Tsuda K, Miyamoto L, Hamano S, Morimoto Y, Kangawa Y, Fukue C, Kagawa Y, Horinouchi Y, Xu W, Ikeda Y, Tamaki T, Tsuchiya K.

Mechanisms of the pH- and oxygen-dependent oxidation activities of artesunate.

Biol Pharm Bull. 2018, in press (査読有)

Sato Y, Tajima A, Sato T, Nozawa S, Yoshiike M, Imoto I, Yamauchi A, Iwamoto T.

Genome-wide association study identifies ERBB4 on 2q34 as a novel locus associated with sperm motility in Japanese men.

J Med Genet. 2018 in press (査読有)

Miyamoto L, Yamane M, Tomida Y, Kono M, Yamaoka T, Kawasaki A, Hatano A, Tsuda K, Xu W, Ikeda Y, Tamaki T, Tsuchiya K.

Nitrite Activates 5'AMP-Activated Protein Kinase-Endothelial Nitric Oxide Synthase Pathway in Human Glomerular Endothelial Cells.

Biol Pharm Bull. 40, 1866-1872, 2017 (査読有)

Fukunaga Y, Izawa-Ishizawa Y, Horinouchi Y, Sairyō E, Ikeda Y, Ishizawa K, Tsuchiya K, Abe Y, Hashimoto I, Tamaki T.

Topical application of

nitrosonifedipine, a novel radical scavenger, ameliorates ischemic skin flap necrosis in a mouse model.

Wound Repair Regen. 25(2):217-223. 2017 (査読有)

Ikeda Y, Horinouchi Y, Hamano H, Hirayama T, Kishi S, Izawa-Ishizawa Y, Imanishi M, Zamami Y, Takechi K, Miyamoto L, Ishizawa K, Aihara KI, Nagasawa H, Tsuchiya K, Tamaki T.

Dietary iron restriction alleviates renal tubulointerstitial injury induced by protein overload in mice.

Sci Rep. 7(1):10621, 2017 (査読有)

Ikeda Y, Hamano H, Satoh A, Horinouchi Y, Izawa-Ishizawa Y, Kihira Y, Ishizawa K, Aihara K, Tsuchiya K, Tamaki T.

Bilirubin exerts pro-angiogenic property through Akt-eNOS-dependent pathway.

Hypertens Res. 38:733-740. 2015 (査読有)

Kihira Y, Burentogtokh A, Itoh M, Izawa-Ishizawa Y, Ishizawa K, Ikeda Y, Tsuchiya K, Tamaki T.

Hypoxia Decreases Glucagon-Like Peptide-1 Secretion from the GLUTag Cell Line.

Biol Pharm Bull. 38:514-521. 2015 (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

宮本理人、梅本果奈、上島沙弥香、友成奈央実、土橋有希、池田康将、玉置俊晃、土屋浩一郎

食後生じる AMPK の新たな翻訳後修飾を介した代謝制御機構

第 47 回日本心臓血管作動物質学会 2018 年 2 月 9 日 長崎大学坂本キャンパス(長

崎県・長崎市)

Koichiro Tsuchiya

Invited Lecture “Dietary nitrite and renal function”

College of Pharmacy, Dongguk University, December 15, 2016, Seoul (Korea),

K. Tsuchiya, L. Miyamoto, Y. Tomida, M. Yamane, Y. Tsuchihashi, K. Tsuda, Y. Ikeda, T. Tamaki

Nitrite activates 5' AMP-Activated Protein Kinase - endothelial nitric oxide synthase pathway in human glomerular endothelial cells.

第 16 回日本 NO 学会学術集会 & 第 9 回国際 NO 学会 2016 年 5 月 21 日 仙台国際センター (宮城県・仙台市)

石澤有紀, 今西正樹, 木平孝高, 宮本理人, 座間味義人, 池田康将, 土屋浩一郎, 玉置俊晃, 石澤啓介

Development of endothelial dysfunction-induced aortic dissection model and search for a preventive strategy

第 89 回日本薬理学会年会 2016 年 3 月 10 日 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

L. Miyamoto, Y. Tsuchihashi, Y. Tomida, M. Yamane, K. Takenokuma, Y. Ikeda, T. Tamaki and K. Tsuchiya

Dietary nitrite ameliorates glucose tolerance and hyperlipidemia in diet-induced obese rats

The 6th International Conference on Food Factors November 24, 2015, Coex Mall, Seoul (Korea)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉置 俊晃 (TAMAKI, Toshiaki)

徳島大学・大学院医歯薬研究部・教授

研究者番号 : 80179879

(2) 研究分担者

井本 逸勢 (IMOTO, Issei)

徳島大学・大学院医歯薬研究部・教授
研究者番号 : 30258610

土屋 浩一郎 (TSUCHIYA, Koichiro)

徳島大学・大学院医歯薬研究部・教授
研究者番号 : 70301314

池田 康将 (IKEDA, Yasumasa)

徳島大学・大学院医歯薬研究部・准教授
研究者番号 : 60432754

石澤 有紀 (ISHIZAWA, Yuki)

徳島大学・大学院医歯薬研究部・講師
研究者番号 : 40610192