

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：34505

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00814

研究課題名(和文) エピジェネティクス制御による新たな認知症予防食品開発のための基礎的解析

研究課題名(英文) Basic analysis for developing dementia preventing foods via regulating epigenetics

研究代表者

長井 薫 (Nagai, Kaoru)

甲子園大学・栄養学部・教授

研究者番号：20340953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、予防することが重要な認知症を、日常摂取する食品によりエピジェネティクス、特にヒストンのアセチル化修飾を制御することで予防する可能性を探るものである。本研究では、認知症における神経細胞死の主な原因となる小胞体ストレスや酸化ストレスを抑制する食品成分が、ヒストン脱アセチル化酵素(Hdac)にどのように影響し、また、どのような細胞内機構を介して神経細胞を保護するのか検討を行った。その結果、いくつかの食品含有成分にHdac活性制御作用と神経保護作用、さらにミトコンドリア増強作用があることを見出した。本研究成果は、新しい認知症予防食品の開発につながるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Since dementia is hardly cured after onset, prevention in the daily life before onset is important. Consumption of effective molecules by diet is one of the way to the prevention. In this study, we analyzed if some dietary molecules, which showed neuroprotective activities against endoplasmic reticulum stress and oxidative stress, regulates epigenetics, especially histone deacetylase (Hdac) activities and other intracellular mechanisms for neuroprotection. I found that Hdac 1, 3 specific inhibitor MS275 protects neuronal cells and increased mitochondrial amount. ClassIII Hdac activating molecule nicotinamide mononucleotide (NMN) also increased mitochondrial amount and protected the cells from oxidative stress. Our data suggests that regulation of Hdac activity by nutritional molecules will contribute to the development of functional foods via novel mechanisms for preventing dementia.

研究分野：生化学、神経科学、栄養学

キーワード：認知症 ヒストン脱アセチル化酵素 ミトコンドリア

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝子配列に依存しない遺伝子発現制御機構であるエピジェネティクスを制御することによる認知症予防効果については、高い注目が集まっていた。一方で、認知症は潜伏期間が20~30年と長く、発症前の診断は困難である上に、発症後の治療はほぼ不可能であることから、発症前の日常生活における予防が重要であると考えられている。その候補の一つとして、食品から予防効果のある成分を摂取することが考えられる。認知症予防効果のある食品成分は、高度不飽和脂肪酸やポリフェノール類など多数報告されているが、その作用機序の詳細については明らかになっていないものも多い。一方で、健康効果の期待されている食品成分にエピジェネティクス機構、特にヒストン修飾関連酵素活性に影響するものが次々と報告され始めた時期であった。しかし、それら食品成分の認知症予防効果とエピジェネティクスへの作用とのつながりについてはほとんど明らかになっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は食品成分による新しい認知症予防法の開発のための基礎的知見を得るものである。作用機序として、エピジェネティクス機構の中でヒストンのアセチル化制御、特にヒストン脱アセチル化酵素(Hdac)に対する作用に注目することとした。具体的には、以下のような点について明らかにすることを目的とした。

(1)近年食品成分について報告が相次いでいるクラス、Hdacへの阻害作用について、Hdac阻害剤による神経保護機構について解析することで保護機構を明らかにすることを試みた。

(2)Hdac阻害作用が期待され、我々の研究グループで神経保護作用を報告しているリン脂質について、同様の効果があるのかについて検討を行った。

(3)反対に活性化が認知症予防作用を示すことが期待されているクラスHdacであるサーチュインの活性化を有する食品含有成分について、神経保護効果とその作用機序を明らかにすることを試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1)神経系細胞保護効果の解析

神経系の細胞として、マウス神経芽細胞腫 Neuro2a細胞とラット褐色細胞腫 PC12細胞を用いた。これらの細胞を、認知症に代表される多くの神経変性疾患に共通の神経細胞死誘導原因である小胞体ストレスあるいは酸化ストレスに曝露することによって神経変性モデルとした。ここに、Hdac阻害剤や食品由来成分を添加することで、神経系細胞への保護効果を評価した。細胞生存率についてはMTT法、およびCalcein-AMとPropidium Iodideを用いた生死細胞染色法により解析

を行った。

#### (2)ミトコンドリア増強効果の解析

食品由来成分等で処理した細胞を回収後、ミトコンドリア膜電位感受性色素であるJC-1で染色後、イメージングサイトメトリー解析を行うことで、細胞内における活性ミトコンドリア量の解析を行った。

#### (3)タンパク質発現量の解析

細胞処理による細胞内タンパク質の発現変化についてはSDS-PAGE、ウェスタンブロット解析を行い、各抗体染色後の発光基質染色による定量解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1)サブタイプ特異的Hdac阻害剤による神経系細胞保護効果とその作用機序の解析

健康効果に関する報告のあるポリフェノール類や脂肪酸類などの食品由来成分についてHdac阻害作用が次々と報告されている。また、Hdac阻害剤として用いられる低級脂肪酸について、認知症の予防・治療効果が報告されている。しかし、これらのHdac阻害効果はHdacサブタイプについて特異性の低いもの、あるいは明らかになっていないものがほとんどである。Hdacはヒストン修飾に作用することで遺伝子発現に影響するものなので、多くの遺伝子発現に影響すると考えられ、またそれぞれのサブタイプの調節機構や標的遺伝子は異なる。従って、副作用の可能性が低く、より有効に効果を示すには、まずその阻害が認知症予防に有効な特定のHdacを明らかにし、そのHdac特異的な阻害作用を有する食品成分の探索に結びつけることが重要であると考えられる。従って、サブタイプ特異的Hdac阻害剤について、Neuro2a細胞を用い、小胞体ストレスモデルであるタプシナルギン処理に対する保護効果により、神経細胞保護効果におけるHdac阻害のサブタイプ特異性について検討を行った。用いたHdac阻害剤と特異性を図1に示す。

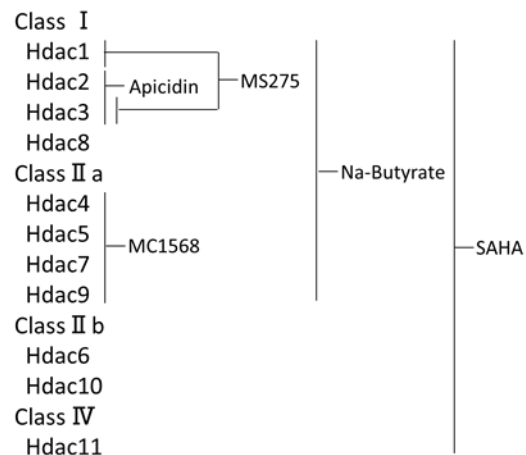


図1. Hdac阻害剤の特異性

これらの阻害剤について、細胞保護効果を行ったところ、Hdac1, 3 を特異的に阻害するMS-275、およびHdac2 を特異的に阻害するアピシジンに保護効果が見出された(図2)。

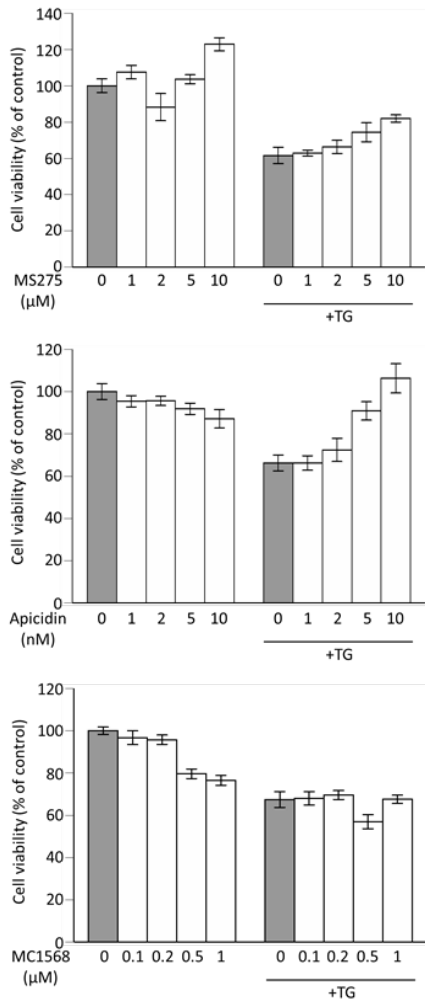


図2. 特異的Hdac阻害剤による小胞体ストレスからのNeuro2a細胞保護効果

### (2) サブタイプ特異的 Hdac 阻害剤による神経系細胞内ミトコンドリア増強作用の解析

神経細胞の老化時、特に認知症における神経変性時には神経細胞内のミトコンドリア機能の低下が知られている。従って、ミトコンドリア機能の亢進を目指したアルツハイマー病等の認知症の予防・治療法に関する研究が活発に行われている。このことから、Hdac 阻害剤の細胞保護作用がミトコンドリア機能亢進作用によるものではないかと考えた。上記と同様の阻害剤を用いて、Hdac 阻害による Neuro2a 細胞内のミトコンドリア増強作用のサブタイプ特異性について JC-1 染色とイメージングサイトメトリーにより解析を行った。その結果、特異性の低い Na-Butyrate や SAHA には弱い、MS-275 には強いミトコンドリア増強作用があることを見出した(図3)。このことから、MS-275 については、ミトコンドリア増強作用を介してさ

た。これはつまり、Hdac1,3 を阻害する食品成分はミトコンドリア増強作用による認知症予防作用を示す可能性があることを示している。

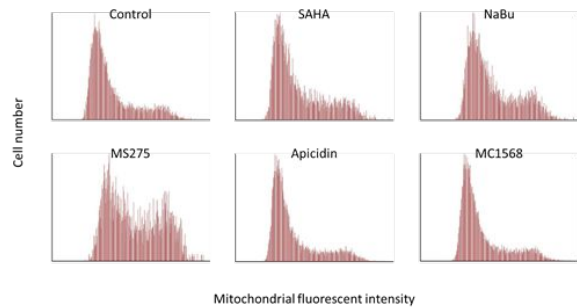


図3. 特異的Hdac阻害剤によるNeuro2a細胞内ミトコンドリア量への作用

### (3) 多価不飽和脂肪酸含有リン脂質による神経細胞保護効果の解析

我々の研究グループでは、これまでにリノール酸をもつホスファチジルエタノールアミン(DLPE)が、小胞体ストレスからの神経細胞保護効果を示すことを報告している。今回、認知症予防効果について多数の報告があるDHAを含有するホスファチジルエタノールアミン(DDPE)に同様の効果があるのか否かについて解析を行った。その結果、DDPEについてもDLPEと同様の細胞保護効果があることが分かった(図4)。DHAについては、Hdac 阻害作用を示唆する報告もあり、一部の脂肪酸類は Hdac 阻害剤としても用いられていることから、これらリン脂質は同様の作用機序により細胞保護作用を示す可能性が考えられる。

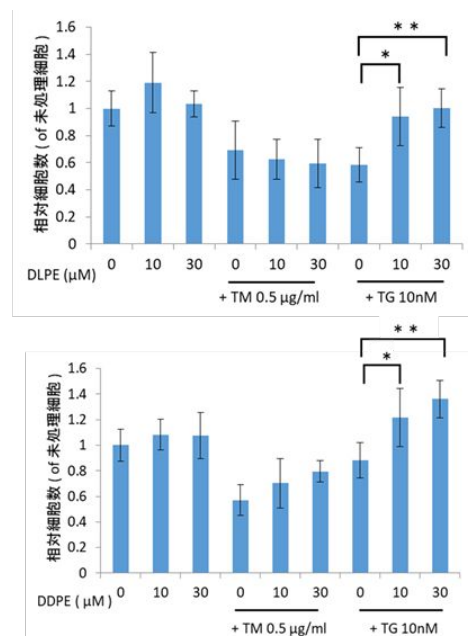


図4. DLPE、DDPEによる小胞体ストレスからのNeuro2a細胞保護効果

(5)多価不飽和脂肪酸含有リン脂質によるミトコンドリア増強作用

保護効果を有するリン脂質が、Hdac 阻害剤と同様のミトコンドリア増強作用を示すか否かについて解析を行った。その結果、多価不飽和脂肪酸を含む DLPE、DDPE についてはミトコンドリア増強作用が見られた一方で、飽和脂肪酸を含む DPPE や一価不飽和脂肪酸を含む DOPE についてはミトコンドリアに対する影響は観察されなかった(図 5)。この結果は、多価不飽和脂肪酸含有リン脂質の細胞保護効果はミトコンドリア増強作用を介していることを示唆している。

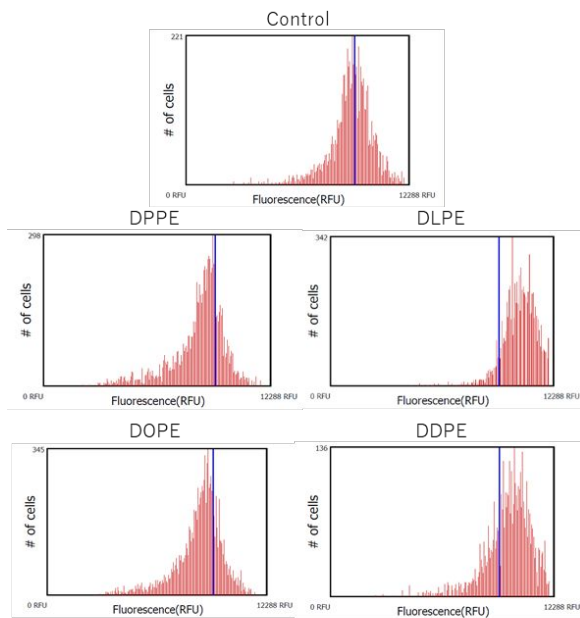


図5. リン脂質によるNeuro2a細胞内ミトコンドリア量への作用

(6)クラス Hdac 活性化因子による酸化ストレスからの神経系細胞保護効果の解析

クラス Hdac であるサーチュインについては、クラス Hdac とは反対にその活性化が抗老化作用等の健康効果を示すことが知られている。従って、細胞内サーチュイン活性化作用を示す食品成分であるニコチンアミドモノヌクレオチド(NMN)について、これも認知症における神経変性の原因となる酸化ストレスからのPC-12細胞保護効果について解析を行った。酸化ストレスモデルとして6-ヒドロキシドーパミン(6-OHDA)およびH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を用いた。その結果、NMNで処理を行うことにより、どちらの酸化ストレスに対しても細胞保護効果を示すことが分かった(図6)。また、これらの保護効果はサーチュイン阻害剤であるサーチノール存在下では失われたことから、サーチュイン活性化依存的であることが分かった(図6)これらの結果は、サーチュイン活性化作用を有する食品成分が認知症予防作用を示すことを示唆している。

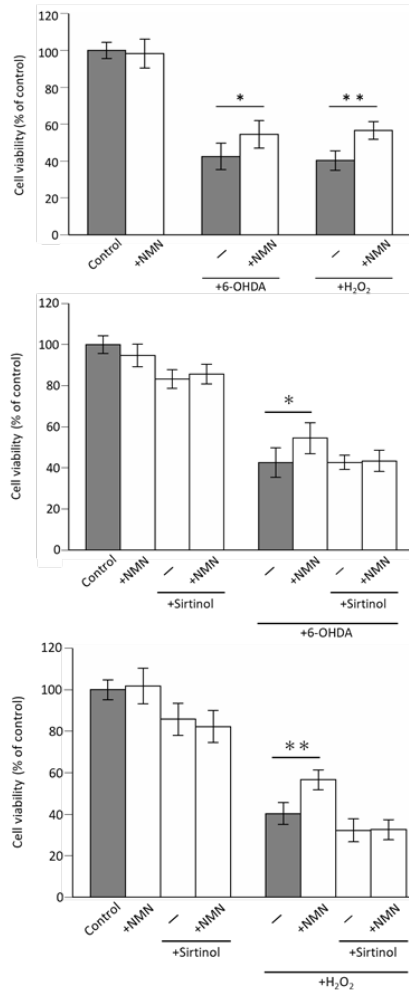


図6. NMNによる酸化ストレスからのPC-12細胞保護効果と保護効果のサーチュイン活性化依存性

(7)NMNによるPC-12細胞内ミトコンドリア増強作用の解析

サーチュインの活性化がクラス Hdac 阻害と同様にミトコンドリア増強作用を示すのか否かについて解析を行った。その結果、NMNのみの処理においてもPC-12細胞内のミトコンドリア増強作用を示し、酸化ストレス存在下においても、ミトコンドリアの増強作用が確認された(図7)。また、この作用は、細胞保護効果と同様にサーチュインで抑制されることも確認された(結果は示さず)。この結果は、サーチュインの活性化もミトコンドリア増強作用を介して、神経系の細胞を保護する作用を示すことを示唆している。

(8)まとめ

今回の研究により、健康効果が報告されている食品成分に次々と報告されているクラス Hdac 阻害やクラス Hdac サーチュインの活性化という活性制御が、ミトコンドリアを増強する作用を介して神経細胞保護効果を示すことを見出した。本研究成果は、エピジェネティクス調節とミトコンドリア機能制御を結びつけた新しい視点からの、認知症予防機能を有する機能性食品の開発につ

ながるものであると考えられる。

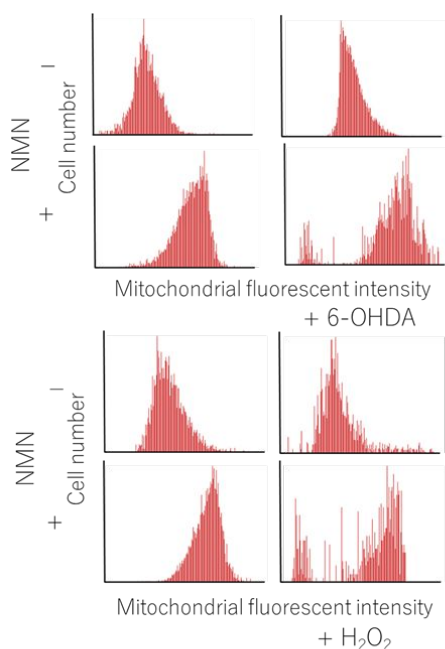


図7. NMNによる酸化ストレス存在下非存在下でのPC-12細胞内ミトコンドリア量への作用

#### 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 5 件)

1. Nagai K, Phytanic acid induces Neuro2a cell death via histone deacetylase activation and mitochondrial dysfunction. *Neurotoxicol. Teratol.*, 48: 33-39, 2015

2. Choi J-H, Suzuki T, Okumura H, Nagai K, Hirai H, Kawagishi H. Thapsigargin-induced ER stress suppressive compounds from the mushroom *Mycocleptodonoides aitchisonii*. *Tetrahedron Lett.*, 41: 5561-5563, 2015

3. Mori T, Wang J, Tanaka Y, Nagai K, Kawagishi H, Hirai H. Bioremediation of the neonicotinoid insecticide clothianidin by the white-rot fungus *Phanerochaete sordida*. *J. Hazard. Mater.*, 321: 586-590, 2016

4. Takakura K, Ito S, Sonoda J, Tabata K, Shiozaki T, Nagai K, Shibata M, Koike M, Uchiyama Y, Gotow T. *Cordyceps militaris* improves the survival of Dahl salt-sensitive hypertensive rats possibly via influences of mitochondria and autophagy functions. *Heliyon*, 3(11): e00462, 2017

5. Kobayashi S, Hamada Y, Yasumoto T, Hashino Y, Masuyama A, Nagai K. Total synthesis and endoplasmic reticulum stress suppressive activities of Hericenones A-C and their derivatives. *Tetrahedron Lett.*, 59: 1733-1736, 2018

[学会発表](計 4 件)

1. Nagai K, Shirazawa H. Histone deacetylase inhibitor MS-275 protects Neuro2a cells from endoplasmic reticulum stress via mitochondrial enhancement. *Annual Meeting of Society for Neuroscience* (San Diego, USA), 2016

2. Tabata K, Ito S, Sonoda J, Takakura K, Nagai K, Shiozaki M, Shibata M, Koike M, Uchiyama Y, Gotow T. Cyto-protective and toxic effects of *Cordyceps militaris* and cordycepin on rat CNS neurons and PC12 cells. *Annual Meeting of Society for Neuroscience* (San Diego, USA), 2016

3. 伊藤章吾、長井薫 Protective effects of NMN against oxidative stress induced PC12 cell death via mitochondrial enhancement. *2017 年度生命科学系学会合同年次大会 神戸ポートアイランド(神戸)*, 2017

4. 伊藤章吾、長井薫 NMN(ニコチンアミドモノヌクレオチド)の PC12 細胞におけるミトコンドリア機能亢進を介した酸化ストレスからの細胞保護効果 *日本農芸化学会 2018 年度大会 名城大学(名古屋)*, 2018

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

長井 薫 (NAGAI, Kaoru)

甲子園大学・栄養学部・教授

研究者番号：20340953