

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16525

研究課題名(和文) エピジェネティクス制御からみた水素の抗炎症作用のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of anti-inflammatory action of molecular hydrogen from epigenetic control

研究代表者

Lee Hyunjin (lee, hyunjin)

早稲田大学・ナノ・ライフ創新研究機構・その他(招聘研究員)

研究者番号：80734441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は生活習慣病におけるエピジェネティクスの異常に対する水素の作用を確かめることを通じて、水素の抗作用メカニズムを解明することである。
細胞を用いて、エピジェネティクスの異常を引き起こす条件下で水素の効果を確かめた。その結果、水素がHDACの活性化を含むエピジェネティクスを変化させることが確認された。しかし、高脂肪食摂取動物モデルを用いて水素の効果を検討することができず、動物モデルにおけるエピジェネティックな変化の有無については、方法論の確立に時間を有し、比較検討するまでの段階に至らなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the anti oxidant effect mechanism of hydrogen through confirming the effect of molecular hydrogen on epigenetic abnormality in lifestyle - related diseases.
Cells were used to ascertain the effect of molecular hydrogen under conditions causing epigenetic abnormality. As a result, it was confirmed that molecular hydrogen changes epigenetics including activation of HDAC. However, it was not possible to examine the effect of molecular hydrogen by using a high-fat diet intake animal model, and the existence of epigenetic change in an animal model has time to establish a methodology, and at the stage of comparing and examining it did not arrive.

研究分野：応用健康科学

キーワード：活性酸素種 水素 エピジェネティクス 抗酸化物質

1. 研究開始当初の背景

H₂ がヒドロキシルラジカル (\cdot OH)とペロオキシナイトライト (ONOO⁻)を選択的に消去する抗酸化物質であることを我々の研究室で始めて証明してから、その後 7 年間の間に 300 報以上もの論文が世界中から発表され、H₂ の生体への抗酸化作用に加えて、様々な作用が実証された。特徴的なのは、様々な酸化ストレスによるモデル動物ほとんど全ての臓器と抗酸化作用を維持し、炎症抑制作用があり、さらにエネルギー代謝促進作用があることが判明した。例えば、同じ量の食餌を食べていてもエネルギー代謝促進によって肥満マウスが改善し、糖尿病が改善した。そして人に対する水素の効果については臨床試験が次々に はじまっており、様々な疾患と病態に対する効果として 10 以上の論文が発表されるに至っている。メタボリックシンドローム予備軍に水素水を投与すると血中 LDL が減少するとともに炎症性サイトカインが減少した。酸化ストレスと炎症は、老化の原因であるばかりでなく生活習慣病をはじめとする多くの疾患の原因とされている。これらの水素の多機能性の作用は、健康増進と疾病の予防に寄与することが想定される。このような様々な病態に対し多様な機能を発揮する際には、水素は遺伝子発現を抑制することが判明した。しかし、水素が直接転写制御因子に作用するとは考えにくいので間接的であろうことが予測される。日本の血圧および糖尿病の人口はそれぞれ 4000 万、890 万人といわれ、生活習慣病は国民の病と言われている。生活習慣病とその合併症の問題は、一度罹患するとともに戻すことが難しく進行性であることである。こうした進行性病態の源はエピジェネティクスの異常である。エピジェネティクスは発生・分化において必要な遺伝子を発現させ、不要な遺伝子発現は止める厳密な調節をする遺伝子発現の変化に関わる生体現象である。エピジェネティクスは可逆性があり、決定された遺伝子発現状態が環境・ストレス・生活習慣などの外部からの刺激や老化などの影響を受けて変化し、通常と異なる遺伝子発現状態になる。これがエピジェネティクスの異常であり、病の発病に深く関連している。エピジェネティクス構造は DNA メチル化およびヒストン修飾によって遺伝子発現を調節するしくみである。ヒストンの化学修飾は、転写抑制やその維持、DNA 修復に深くかかわっており、あらゆる生命現象の調節に関係する分子として、特に人の健康や疾患を考える観点からも、その状態を明らかにすることが重要となっている。ヒストンのアセチル化を調節するヒストンアセチル化酵素 (HAT)と、HDAC が遺伝子発現制御に重要な役割をする。しかし、様々な酸化ストレスにより、HDAC がニトロ (-NO₂)、またはニトロソ化 (-S-NO₂)

することで、エピジェネティクスの異常が起こり、炎症性サイトカインや遺伝子発現を増加させる。

2. 研究の目的

生活習慣病におけるエピジェネティクスの異常に対する水素の作用を確かめることを通じて、水素の抗作用メカニズムを解明することである。

実験 1

細胞を用いて、エピジェネティックの異常を引き起こす条件下で水素の効果を確かめた。

試験 2

生活習慣病モデルの一つである高脂肪食摂取動物モデルを用いて、記憶力低下およびエピジェネティクスの異常における水素の効果を水素以外の抗酸化物質と比較検討することにした。

3. 研究の方法

実験 1

THP-1 cell を Macrophage 分化させた後に LPS 処理を行い、4 時間後に回収した。

細胞を分化させる方法細胞に phorbol myristate acetate (PMA, 100 nM) を入れて 5 時間反応させた。

LPS (Escherichia coli 0111:B4)は 1 μ g/ml 濃度で 4 時間反応させた。

水素及び窒素 LPS 処理 30 分前に処理を行なった。

回収したサンプルでタンパク質抽出し、分析を行なった。

HDAC 活性化測定

HDAC Activity Colorimetric Assay Kit を用いて測定を行なった。

Histone H3 (Lys9)アセチル化測定

ウェスタンブロット方を用いて測定を行なった。

実験 2

8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用いて実験を行なった。群はコントロール(Con)群、高脂肪食 (HFD) 群、HFD+クルクミン摂取 (Cur+HFD)群に分け、各群 10 匹とした。

一週間の予備飼育の後、HFD 群、Cur+HFD 群のマウスには、糖質：タンパク質：脂質が 20：20：60 の高脂肪食を与えた。Con 群には糖質：タンパク質：脂質が 70：20：10 の通常食を与えた。高脂肪食の摂取期間は 25 週間であった。

Y 迷路試験

記憶力を測定する試験であり、24 週目に測定を行なった。

4. 研究成果

試験 1

HDAC 活性化

水素+LPS 処理群が窒素+LPS 処理群より優位に低下した。(図 1)

Histone H3 (Lys9)アセチル化

水素+LPS 処理群が窒素+LPS 処理群より高値を示した。LPS 処理を行っていない水素と窒素群には優位な差は無かった。

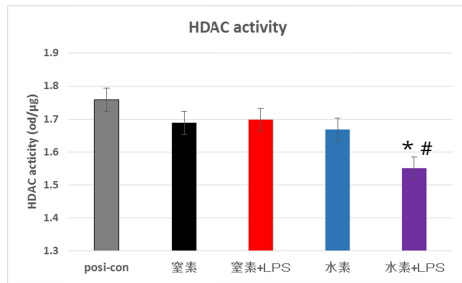


図1 HDAC 活性化: 1µg/µl サンプルの中の HDAC activity の量を示している *;p<0.05 vs.窒素、#;p<0.05 vs.窒素+LPS 試験2

水素と水素以外の抗酸化物質の効果を比較検討しようと思ったが、研究施設移行により、研究環境の変化し、細胞試験と同様な水素の作製ができず、動物に水素水の摂取させることができなかった。そのため、水素以外の抗酸化物質(クルクミン)のみで高脂肪食摂取における記憶力低下モデルに及ぼす影響を検討した。その結果、抗酸化物質が記憶力測定テストの Y 迷路試験において高脂肪食誘導の記憶力低下を抑制させる可能性が示唆された。しかし、記憶力低下を抑制させる因子とエピジェネティック異常に関連する遺伝子の特定、動物モデルにおけるエピジェネティックな変化の有無については、方法論の確立に時間を有し、比較検討するまでの段階に至らなかった。今後さらに研究の継続が必要であろう。

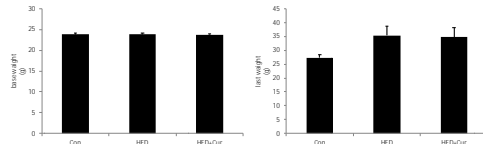


図2 試験2の体重変化: 高脂肪食摂取前(左)と高脂肪食摂取 25 週目(右)の体重を示している

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)

1. Lee Hyunjin, Nagata Kazufumi, Nakajima Sanae, Ohno Makoto, Ohta Shigeo, Mikami Toshio

Intermittent intense exercise protects against cognitive decline in a similar manner to moderate exercise in chronically stressed mice

Behavioural Brain Research 2018(345) 59-64 DOI:10.1016/j.bbr.2018.01.017

2. Ma Sihui, Yada Koichi, Lee Hyunjin, Fukuda Youichi, Iida Akira, Suzuki Katsuhiko

Tahebo Polyphenols Attenuate Free Fatty Acid-Induced Inflammation in Murine and Human Macrophage Cell Lines As

Inhibitor of Cyclooxygenase-2

Frontiers in Nutrition 2017 (4) 1-11

DOI:10.3389/fnut.2017.00063

3. Nishikawa Sho, Kamiya Misa, Aoyama Hiroki, Nomura Mami, Hyodo Takuma, Ozeki Aoi, Lee Hyunjin, Takahashi Tsukasa, Imaizumi Atsushi, Tsuda Takanori

Highly Dispersible and Bioavailable Curcumin but not Native Curcumin Induces Brown-Like Adipocyte Formation in Mice

Molecular Nutrition & Food Research 2018(62)1700731

DOI:10.1002/mnfr.201700731

4. Akemi Uwaya, Hyunjin Lee, Jonghyuk Park, Hosung Lee, Junko Muto, Sanae Nakajima, Shigeo Ohta, Toshio Mikami

Acute immobilization stress following contextual fear conditioning reduces fear memory: timing is essential

Behavioral and Brain functions

2017:10.1186/s12993-016-0092-1

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 馬 思慧, 矢田 光一, Lee hyunjin, 鈴木 克彦

ぶどう種子ポリフェノール、アカシアポリフェノールの抗炎症作用および選択的シクロオキシゲナーゼ抑制作用に関する検討

代替補完医療学会 2017 年

2. 井内勝哉, 井本明美, 西楨貴代美, 一宮直美, Lee Hyunjin, 横田隆, 上村尚 美, 太田成男

Molecular hydrogen regulates gene expression by modifying the free radical chain reaction-dependent generation of oxidized phospholipid mediators

第 38 回日本分子生物学会第

3. 井内勝哉, 井本明美, 西楨貴代美, 一宮直美, Lee Hyunjin, 横田隆, 上村尚 美, 太田成男

TBHP を用いた酸化ストレス誘導性の細胞死に対する分子状水素の保護作用

第 24 回日本 Cell Death 学会 学術集会

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

イ ヒョンジン (Hyunjin Lee)
早稲田大学・ナノライフ創新研究機構
・ 招聘研究員
研究者番号：80734441

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：