

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500972

研究課題名(和文) ヒストン脱アセチル化酵素の活性制御を指標とした新規神経変性疾患予防成分の探索

研究課題名(英文) Screening of novel therapeutic molecules against neurodegenerative diseases via modulation of Hdac activity

研究代表者

長井 薫 (NAGAI, Kaoru)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：20340953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Hdac活性を指標とした探索実験の結果、ブラジル産プロポリス含有成分にHdac阻害作用があることを見出し、また多くの認知症に共通の小胞体ストレスからの神経系細胞に対する保護効果を有する事を見出した。

一方、クロロフィル代謝中間体であり、牛肉や牛乳等に含まれる分枝型脂肪酸であるフィタン酸のHdac活性に与える影響を解析した。すると、フィタン酸には逆にHdacを活性化作用を有する事が分かった。さらに、神経系の細胞に細胞死を誘導することが分かった。また、この実験過程において、Hdac阻害作用を有する物質はミトコンドリアの活性化を介して神経系の細胞を保護していることを示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：By screening of Hdac inhibitory molecules, we found that Brazilian propolis extract (BPE) showed Hdac inhibitory effect. BPE also protected neuronal cells from endoplasmic reticulum stress induced cell death, which causes most of the neurodegenerative diseases. We studied the Hdac modulating effects of branched fatty acid phytanic acid (PA), which is a metabolic intermediate of chlorophyll in beef and dairy products. Although generally fatty acids were reported to show Hdac inhibitory effects, PA showed Hdac activating effect. And PA induced neuronal cell death. During this study, we found that Hdac modulation associated with mitochondrial activity in neuronal cells. Our data suggests that the mitochondrial activations might be involved in the neuroprotective functions of Hdac inhibitory molecules.

研究分野：生化学 神経科学

キーワード：機能性食品 ヒストン脱アセチル化酵素 認知症予防

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクス制御、特にヒストンアセチル化制御による認知症予防効果には注目が集まっていた。一方、認知症は潜伏期間が長く、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、発症前の日常生活レベルでの予防が重要であると考えられる。従って、日常生活レベルでの予防の候補として、食品成分によるエピジェネティクス制御が考えられるが、当初有効な食品成分と作用機序についてはほとんど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、食品由来成分からエピジェネティクス制御、特にヒストン脱アセチル化酵素(Hdac)活性制御を指標として、認知症予防効果が期待できる成分を探索し、その保護作用について確認後、作用機序を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 食品由来成分による Hdac 活性への影響の解析

標的となる食品成分について、蛍光標識合成ペプチド基質を用いた *in vitro* の酵素活性測定系により Hdac 活性に与える作用について検討を行った。さらに、神経系培養細胞を処理した後、遺伝子のヒストンアセチル化量を ELISA 法で定量解析を行い、実際に細胞内においてヒストンアセチル化に作用し得るかにあつての解析を行った。

(2) 食品由来成分による神経保護効果に関する解析

主に Hdac 活性に影響を与えた物質について、神経細胞に対する保護効果についても解析を行う。多くの認知症で見られるのと同様の小胞体ストレス条件下での生存率の低下を、どの程度抑制するのかについて解析を行った。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。

神経系細胞内のミトコンドリア活性については、処理後の細胞を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により、各細胞内における活性ミトコンドリア量についての解析を行った。

4. 研究成果

(1) プロポリス成分による Hdac 活性制御作用

これまでの報告で Hdac 阻害剤が神経保護効果を示すことが報告されているが、我々の研究室では幾つかの機能性食品由来成分についてスクリーニングを行い、ブラジル産プロポリス含有成分に Hdac 活性阻害作用があることを見出した(図1)。また、神経系細胞に対し、ヒストンのアセチル化量を増加させる作用を有することも確認された(図2)。ま

た、主要構成成分について Hdac 阻害作用について確認を行ったところ、幾つかの成分が阻害作用を有することを確認した。

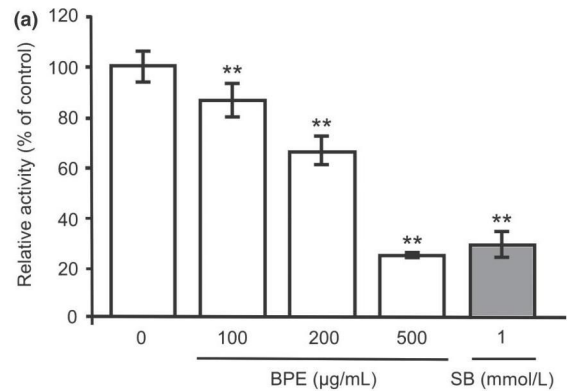


図1. ブラジル産プロポリス抽出成分(BPE)によるヒストン脱アセチル化酵素(Hdac)阻害作用

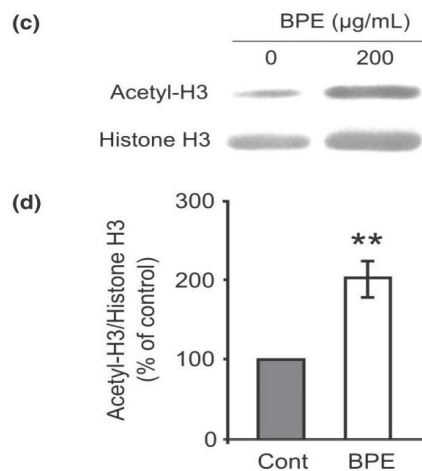


図2. BPEによる神経系細胞内のヒストンアセチル化増加作用

(2) プロポリス含有成分による神経系細胞保護効果

Hdac 阻害作用が確認されたプロポリス成分について、小胞体ストレスからの神経保護作用の解析を行ったところ、保護作用を有することが確認された。しかし、酵素活性等との有効濃度に差があり、この保護作用が本当に Hdac 阻害作用を介しているのかについては今後の課題である。

(3) フィタン酸による Hdac 活性亢進と神経傷害作用

クロロフィルの代謝中間体であり、牛肉や牛乳に含まれるフィタン酸には、反対に Hdac 活性化作用があり(図3)、神経毒性を示すことが分かった。これは、フィタン酸の蓄積に

より神経症状を示す Refsum 症候群の発症メカニズムとなっている可能性が示唆される。

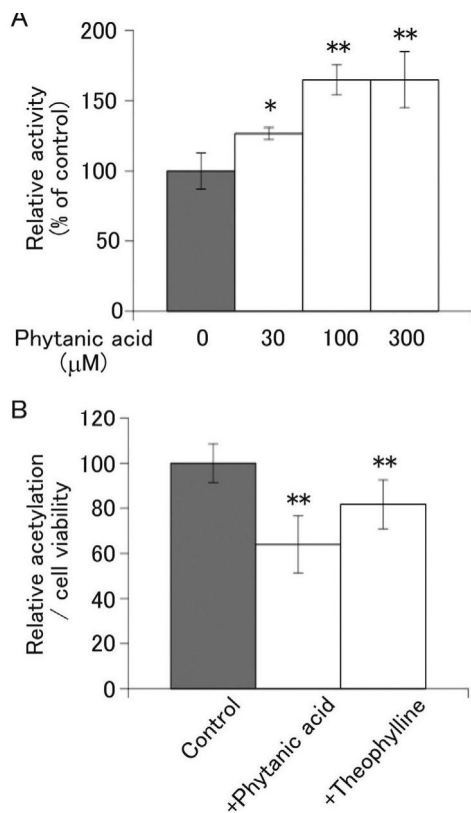


図3 . フィタン酸による Hdac 活性化作用とヒストンアセチル化低減作用

また、その細胞毒性は Hdac 阻害剤により阻害され、その阻害剤特異性は Hdac2,3 であったことから、フィタン酸は Hdac2,3 活性化を介して神経系細胞死を誘導している事が分かった。さらに、フィタン酸は神経系細胞のミトコンドリア活性を低下させる作用を有することをイメージングサイトメトリー法により見出し(図4)、カスパーゼ-9 阻害剤が細胞死を抑制する作用を示したことから、ミトコンドリア機能障害が神経系細胞死の原因となっていることを明らかにした。

(4) Hdac 活性制御とミトコンドリア活性について

フィタン酸の細胞毒性に関する解析過程において、特異性の低い Hdac 阻害剤が、神経系細胞に対してミトコンドリア機能の活性化作用を示すことをイメージングサイトメトリーにより見出した(図4)。ミトコンドリア機能の活性化が神経保護作用を示すという報告もあることから、これまで作用機序については不明な点も多かった Hdac による神経保護効果は、ミトコンドリア機能の活性化を介している可能性を示唆する結果を得た。

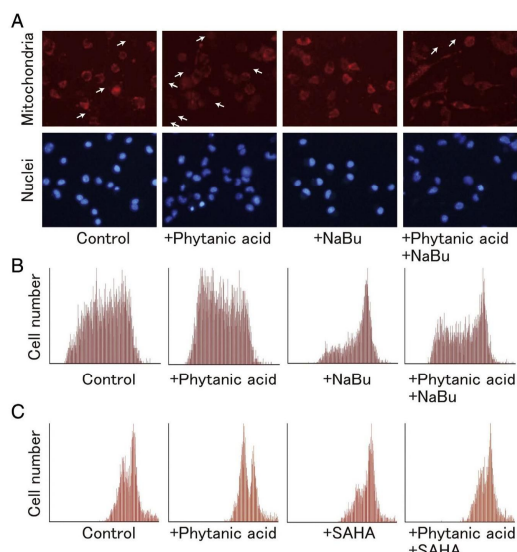


図4 . フィタン酸による神経系細胞内ミトコンドリア機能低減作用と Hdac 阻害剤によるミトコンドリア機能亢進作用

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 2 件 査読有)

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

Ishiai S, Tahara W, Yamamoto E, Yamamoto R, Nagai K. Histone deacetylase inhibitory effect of Brazilian propolis and its association with the anti-tumor effect in Neuro2a cells. *Food Sci. Nutr.*, 2(5):565-570, 2014

[学会発表](計 13 件)

Nagai K. Phytanic acid induces Neuro2a cell death via histone deacetylase activation. *Annual Meeting of Society for Neuroscience*, Washington DC, USA, 2014

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, 国立京都国際会館 (京都府京都市), 2014

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および神経突起伸長作用 第 87 回日本生化学会大会, 国立京都国際会館 (京都府京都市), 2014

長井 薫. フィタン酸によるヒストン脱アセチル化酵素活性化を介した Neuro2a 細胞に対する毒性作用 日本農芸化学会 2014 年度大会, 明治大学生田キャンパス (神奈川県

川崎市), 2014

名取 貴光, 長井 薫. ポリフェノール類によるヒストン脱アセチル化酵素(Hdac)活性制御と神経機能調節 日本農芸化学会 2014 年度大会, 明治大学生田キャンパス (神奈川県川崎市), 2014

Nagai K. Phytanic acid enhances histone deacetylase activity and vulnerability to endoplasmic reticulum stress in Neuro2a cells. *Annual Meeting of Society for Neuroscience*, San Diego, USA, 2013

Ishiai S, Tahara W, Yamamoto R, Nagai K. Protective effect of Brazilian propolis and its major component Artepillin C on endoplasmic reticulum stress induced Neuro2a cell death. *Annual Meeting of Society for Neuroscience*, San Diego, USA, 2013

長井 薫. フィタン酸はヒストン脱アセチル化酵素を活性化し Neuro2a 細胞への小胞体ストレスを強める 第 86 回日本生化学会大会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2013

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, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2013

長井 薫. フィタン酸によるヒストン脱アセチル化酵素活性化作用 日本農芸化学会 2013 年度大会, 東北大学川内北キャンパス (宮城県仙台市), 2013

石合 忍, 田原 渉, 山本 悦子, 山本 倫大, 長井 薫. ブラジル産プロポリス抽出物による小胞体ストレスからの Neuro2a 細胞保護効果 日本農芸化学会 2013 年度大会, 東北大学川内北キャンパス (宮城県仙台市), 2013

Ishiai S, Tahara W, Yamamoto R, Nagai K. Neuroprotective effect of Brazilian propolis extract via regulating Hdac activities. *Annual Meeting of Society for Neuroscience*, New Orleans, USA, 2012

石合 忍, 田原 渉, 山本 倫大, 長井 薫. ブラジル産プロポリスによるヒストン脱アセチル化酵素活性制御と神経保護作用、第 35 回日本神経科学会大会, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市), 2012

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

長井 薫 (NAGAI, Kaoru)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号 : 20340953