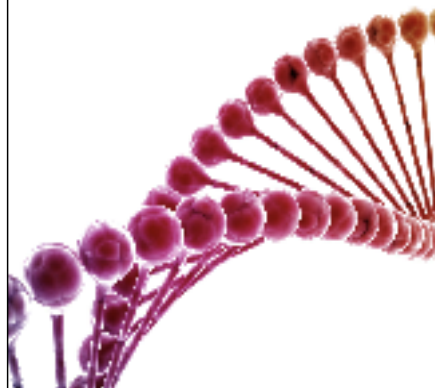




製品臨床研究:

# エピジェネティック 研究

ポール・デイビス博士<sup>1</sup>,  
キャサリン・デイビス博士<sup>1</sup>,  
ダン・グーブラー博士<sup>2</sup>



## 概要:

遺伝子は、体内の様々なプロセスをオン・オフするスイッチだと考えることができます。様々な健康の影響をサポートする遺伝子のオンとオフは、エピジェネティクスとして知られています。栄養価の高い食事や適切な運動を取り入れた良い生活習慣は、エピジェネティクスを適切に維持するのに役立ちます。食生活の乱れ、座りっぱなしの生活、不規則な睡眠、公害、ストレスなどは、体内の遺伝子スイッチの制御が正しく施行されず、健康を損なう原因となります。

THREE製品に含まれているような植物性栄養素は、体内のエピジェネティクス機能を健全に維持することが科学的文献でも示されています。この研究の目的は、科学的根拠に基づく栄養補助食品に、生物学的利用能の高い形でさまざまな植物栄養素が含まれているかどうかを確認することです。

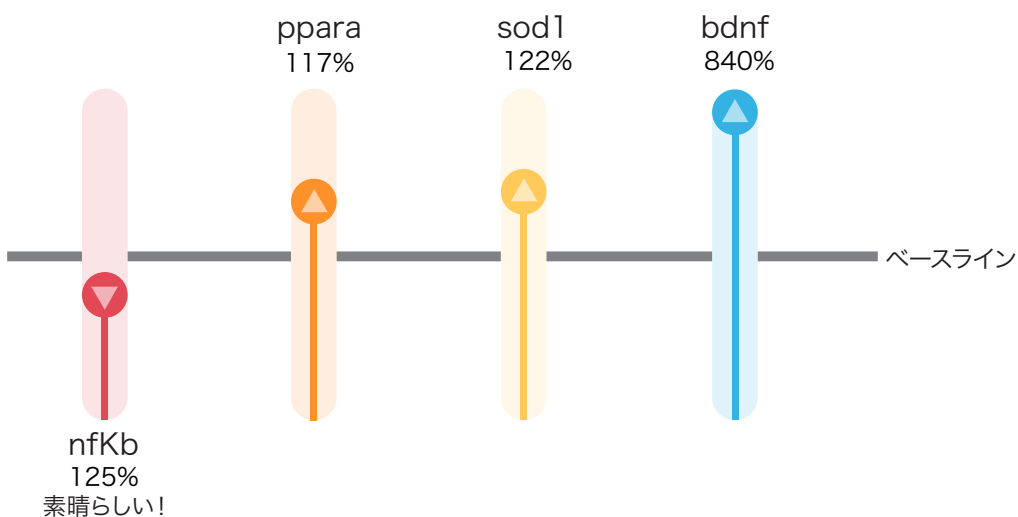
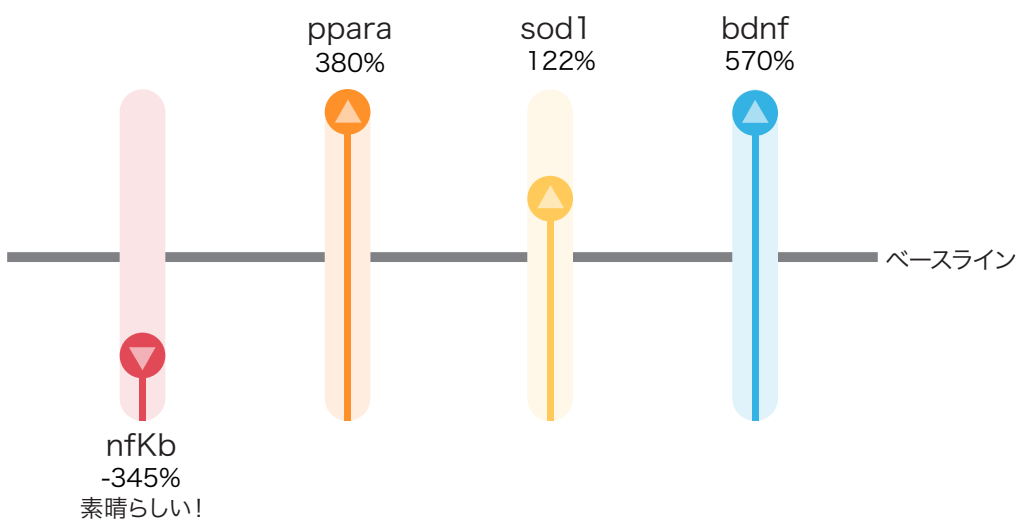
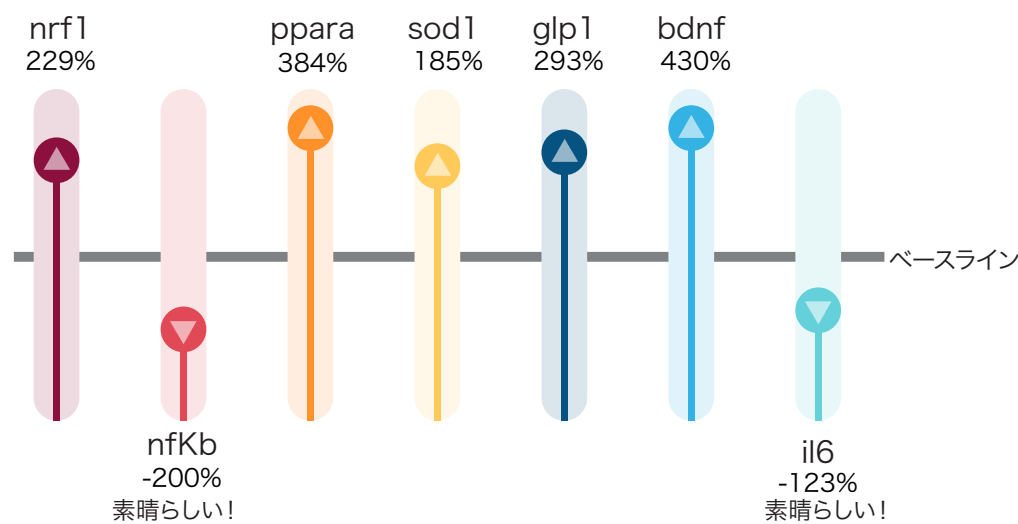
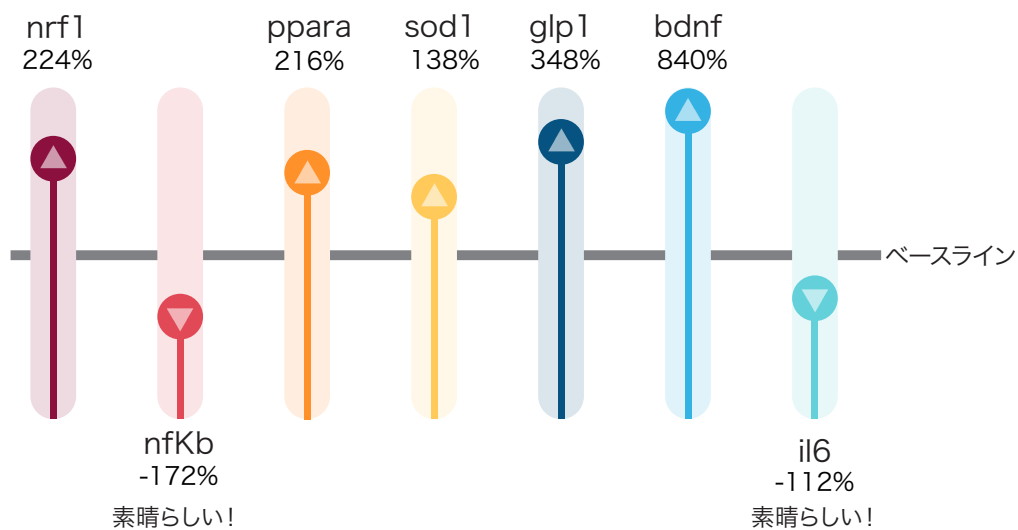
## テストされた遺伝子:

- nrf1 – 健康的なエネルギーレベルと細胞の健康維持を助ける。
- nfkb – 健康的な炎症状態をサポートするために、この遺伝子の不活性化が望ましい。
- ppara – 細胞のエネルギー分子であるATPの産生を担う遺伝子で、人間の健康をサポートする。
- sod1 – 健康維持に重要な抗酸化状態をサポートする。
- ssirt1 – エネルギー産生の維持、細胞機能のサポート、脳の健康促進に関与する遺伝子。
- glp1 – 健康的な血糖値と血中インスリンレベルをサポートする。
- bdnf – 認知機能の維持に役立ち、bdnfの活性化は人の健康をサポートする。
- il6 – 健康的な炎症状態を維持するのに役立つ遺伝子であり、il6が低いことは、ヒトの健康増進に望ましい。

## 研究の結果

THREEが開発した4種類のサプリメントのテストが行われました。その結果、特定の遺伝子機能を調節または抑制することで、望ましい健康結果をサポートするポジティブな影響があることが示されました。下記の図表と研究全体における内容をご覧ください！

# 研究結果





## THREE 製品によるヒト細胞の健全なエピジェネティック機能の維持

ポール・デイビス博士<sup>1</sup>、キャサリン・デイビス博士<sup>1</sup>、ダン・グブラー博士<sup>2</sup>

### はじめに:

人間の身体は 20,000 もの遺伝子で構成され、その中で行われる何百万もの化学反応を維持しています。遺伝子は、体内の様々なプロセスをオン・オフするスイッチだと考えることができます。様々な健康の影響をサポートする遺伝子のオンとオフは、エピジェネティクスとして知られています。栄養価の高い食事や適切な運動を取り入れた良い生活習慣は、エピジェネティクスを適切に維持するのに役立ちます。食生活の乱れ、座りっぱなしの生活、不規則な睡眠、公害、ストレスなどは、体内の遺伝子スイッチの制御が正しく施行されず、健康を損なう原因となります。

植物栄養素は、人間の健康維持に役立つ植物中の分子です。植物栄養素は、健康な抗酸化の状態をサポートするだけでなく、体内の健康なエピジェネティックな機能を維持することも科学文献で示されています。この研究の目的は、科学的根拠に基づく栄養補助食品に、生物学的利用能の高い形でさまざまな植物栄養素が含まれているかどうかを確認することです。これが事実であれば、栄養補助食品が健康とウェルネスの維持に役立つ、新しい作用機序を示すこととなります。

このプロジェクトの目的は、THREE インターナショナルが開発した 4 種類 (Vitalité、Revive、Éternel、Collagène) のサプリメントについて、体内の重要な遺伝子を調整する働きを調べることです。テストされた遺伝子は以下の通りです。

- nrf1 – 健康的なエネルギーレベルと細胞の健康維持を助ける。
- nfKb – 健康的な炎症状態をサポートするために、この遺伝子の不活性化が望ましい。
- ppara – 細胞のエネルギー分子である ATP の産生を担う遺伝子で、人間の健康をサポートする。
- sod1 – 健康維持に重要な抗酸化状態をサポートする。
- ssirt1 – エネルギー産生の維持、細胞機能のサポート、脳の健康促進に関与する遺伝子。
- glp1 – 健康的な血糖値と血中インスリンレベルをサポートする。



- bdnf – 認知機能の維持に役立ち、bdnf の活性化は人の健康をサポートする。
- il6 – 健康的な炎症状態を維持するのに役立つ遺伝子であり、il6 が低いことは、ヒトの健康増進に望ましい。

### 試験サンプル

試験対象製品は、THREE International 社から提供された栄養補助食品で、以下の通り：

- THREE Vitalité (ヴィタリテ)
- THREE Revive (リヴァイヴ)
- THREE Éternel (エタネル)
- THREE Collagène (コラジェン)

### 方法

サンプルの準備

1. 各サンプルは以下の方法で準備。
2. サンプルは、100mg/ml の濃度で DMSO に溶解。ビタリテはカプセルを溶液に溶解し、実験に使用。
3. 各テストサンプルの使用溶液は、適切な媒質で調製。

細胞の準備

1. 凍結した THLE-2 ストック細胞株を液体窒素から取り出し、直ちに 37°C の水中で解凍。その後、内容物を 20ml の気管支完全細胞増殖媒質 (BEGM) + 10% FBS およびペニシリン/ストレプトマイシンを含む 250ml (75cm<sup>2</sup>) 媒質フラスコに移す。指示内容に従う。

細胞を採取：

1. 附着した THLE-2 細胞を剥離するのに、媒質フラスコから媒質を除去し、附着細胞を PBS で洗浄し FBS の痕跡を除去。次に 0.05% トリプシン/EDTA 溶液を 3-4ml 加え、37°C で 5 分間すべての細胞が剥離するまで一定を保った。その後、あらかじめ加温した同量の 0.1% トリプシン抑制剤を加えトリプシンを中和し、125g (500 rpm)、4°C で 7 分間遠心分離した。
2. フラスコからの上澄みを廃棄し、フラスコからの細胞ペレットを、あらかじめ加温した気管支完全細胞増殖媒質 (BEGM) 10ml で再懸濁した。細胞数を数え、 $1 \times 10^5$



cells/ml に調整して媒質した。1 x 10<sup>5</sup> cells/ml の細胞で約 32ml の総容量が必要。

#### 細胞の媒質

1. 細胞接着用に処理した平底 24 ウェルプレートを用いた。このプレートには、10% FBS を含む適切な媒質中に細胞を入れた。これらのプレートは mRNA の測定に使用した。96 ウェルプレートは細胞増殖アッセイに用いた。
2. 細胞懸濁液 (1 x 10<sup>5</sup> cells/ml) 720  $\mu$ l をウェル A-D1-5 に添え、約 8.0 x 10<sup>4</sup> cells/ウェルとした。ウェル A-D6 には適切な媒質のみを 720  $\mu$ l 添加した。
3. 細胞をウェルに接着させるため、プレートを 24 時間インキュベーターに置いた。
4. 24 時間後、プレートをインキュベーターから取り出した。80  $\mu$ l の各種サンプルを適切なウェルに添加した。
5. コントロールと媒質と書かれたウェルに、媒質中の 0.5% DMSO を 80  $\mu$ l 添加した。
6. プレートを 95%Air/5%CO<sub>2</sub> 中、37°C で 24 時間媒質した。
7. 媒質終了時、ウェルから媒質を吸引した。各ウェルからの上澄みを清浄な 96 ウェルプレート (非処理) に移し、-20°C で保存した。

#### 細胞増殖アッセイ

1. 各細胞タイプに 1 枚のプレートを使用し、上澄みを除去した後、800  $\mu$ l の新しい媒質を各ウェルに添加した。その後、80  $\mu$ l の MTT 作業溶液 (5mg/ml) をプレートの各ウェルに加え、37°C でさらに 4 時間媒質した。
2. その後、400  $\mu$ l の MTT 溶解バッファーを各ウェルに加え、37°C で 1 時間インキュベートした。
3. 各ウェルの吸光度は、NeoSyn2 マイクロプレートリーダーを使用して、570 nm で読み取った。

#### RNA の単離

1. 各タイプ毎にもう 1 枚のプレートを使用し、上澄みを除去した後、細胞を HBSS で 2 回洗浄し (各回 400  $\mu$ l)、洗浄液を廃棄した。
2. その後、メーカーが提供する説明書に従い細胞を処理し、全 RNA を単離した。

#### RNA の純度と品質

1. 260 nm の吸光度を読み取り、 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  の RNA 濃度を測定した。
2. 260nm/280 および 260nm/230 の比から RNA の品質を決定した。

qRT-PCR:

1. qRT-PCR は、スポンサーから提供されたプロトコルに従って実施した。

実験デザイン：

細胞生存率と mRNA レベルについては、各サンプルを 3 連でアッセイし、平均値と標準誤差をグラフで表した。媒質のみのブランクも 3 連で実施した。

## 結果

THREE 製品の in vivo (生体内試験) における主要遺伝子の発現維持能を表 1~7 に示しています。全ての製品が各遺伝子を調節することが判明したわけではないことにご注意ください。

製品	濃縮( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	% 変化
Revive	50	229
Vitalité	150	224

表 1：THREE 製品による nrf1 遺伝子の発現 (変化率)。

製品	濃縮( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	% 変化
Éternel	150	-345
Revive	150	-200
Vitalité	150	-172
Collagène	150	-125

表 2：THREE 製品による nfKb 遺伝子の発現 (変化率)。

製品	濃縮( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	% 変化
Revive	50	384
Éternel	50	380
Vitalité	150	216

表 3：THREE 製品による ppara 遺伝子の発現 (変化率)。

製品	濃縮(µg/mL)	% 変化
Revive	50	185
Vitalité	50	138
Éternel	50	123
Collagène	50	122

表 4 : THREE 製品による sod1 遺伝子の発現 (変化率)。

製品	濃縮(µg/mL)	% 変化
Vitalité	150	348
Revive	50	293

表 5 : THREE 製品による glp1 遺伝子の発現 (変化率)。

製品	濃縮(µg/mL)	% 変化
Vitalité	150	840
Collagène	150	570
Revive	50	430

表 6 : THREE 製品による bdnf 遺伝子の発現 (変化率)。

製品	濃縮(µg/mL)	% 変化
Éternel	50	-1250
Revive	50	-123
Vitalité	50	-112

表 7 : THREE 製品による il6 遺伝子の発現 (変化率)。

## 考察

表 1 は、THREE 製品の nrf1 遺伝子活性化能に関する結果である。Revive は 229%、Vitalité は 224% nrf1 を活性化した。これらの結果から、Revive と Vitalité は、体内での自然なエネルギー産生を促進する可能性がある。

*nfkb* の遺伝子発現結果を表 2 に示す。身体が健康であるためには、*nfkb* は下方制御されるべ



きである。Éternel と Revive は *nfkb* の発現を強く低下させたが、Vitalité と Collagène は *nfkb* をそれほど低下させなかった。これらの結果から、試験された 4 つの製品はすべて、体内の健康な炎症状態を維持するのに役立つと期待できる。

Revive、Éternel、Vitalité は *ppara* 遺伝子の発現を強く上方制御させたが、Collagène はマイルドな活性化剤であった（表 3）。*ppara* レベルが上昇すると、身体はより多くのエネルギーを生産する。そのため試験した 4 つの製品はすべて、体内のエネルギー産生をサポートするのに役立つ可能性がある。

*sod1* 遺伝子の発現データ（表 4）により、テストした全 4 製品がこの遺伝子の活性化因子であることが明らかになり、体内の健康的な抗酸化状態の維持に役立つはずである。これは、プロアクティブ・ウェルネスに焦点を当てた栄養補助食品が持つべき主なニーズの一つである。

*glp1* 遺伝子は、健康的な血中インスリン濃度の維持や健康的な体重の維持に関与していることから、科学界でも非科学界でも大きな関心を集めている。その結果、Vitalité と Revive が *glp1* 遺伝子（消化管ホルモン）をそれぞれ 348% と 293% 強力に活性化することがわかり、非常に嬉しく思っています。（表 5）。これらの結果は、Vitalité と Revive が、健康的な体重を維持することに重点を置いたプロアクティブ・ウェルネスの重要な一部となりうることを示唆している。

健康的な認知機能をサポートし、維持することは、プロアクティブ・ウェルネスシステムの重要な部分です。ですから、THREE の製品について、脳の健康維持に関与するさまざまな遺伝子である *bdnf* を除法制御する能力を評価した。その結果、表 6 に示すように、Vitalité は *bdnf* の発現を 840%、Collagène は 570%、Revive は 430% 活性化した。これらの結果は驚くべきもので、それぞれの製品に多量のポリフェノールが含まれていることが起因していると思われる。このデータは、これらの製品が *bdnf* のメカニズムにより脳の健康をサポートすることを裏付けています。

表 7 は、THREE 製品がインターロイキン-6 (*il6*) 遺伝子を制御する能力に関するデータである。*il6* の下方制御は、体内の健康的な炎症状態を維持するために望ましい。Revive と Vitalité





は穏やかに下方制御するものであった。

sirt1 遺伝子（サーチュン遺伝子）の制御に関しては、Revive がこの遺伝子の発現を 164%増加させることが判明した（表は示さず）。このデータから、Revive は体内の健康的な炎症状態を維持するだけでなく、健康的な細胞機能を維持し、自然なエネルギー産生をサポートし、脳の健康を促進することができるかもしれない。

### 結論

体内のエピジェネティック機能の健康維持をサポートする栄養補助食品は、身体がプロアクティブに生きるための新たな開拓分野として期待されている。この研究では、THREE の Vitalité、Revive、Éternel、Collagène が、エネルギー産生の維持、健康的な炎症状態のサポート、抗酸化システムの維持、健康的な血糖値と血中インスリンレベルのサポート、認知機能の促進に関連する体内のいくつかの重要な遺伝子の健康維持を助けることができることがわかりました。この研究から、THREE の製品をプロアクティブ・ウェルネス・レジメンに取り入れることは、プロアクティブ・ウェルネスの促進に有益であると結論づけることができる。今後の研究としては、この同じ in-vitro（試験管内試験）の手法をヒトの in-vivo（生体内試験）に応用することが挙げられる。