

平成30年6月25日現在

機関番号：82674

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16616

研究課題名(和文)炎症反応と酸化ストレス応答のクロストークから探る分子状水素の抗炎症メカニズム解明

研究課題名(英文) Research to explore the anti-inflammatory mechanism of molecular hydrogen from crosstalk between inflammatory response and oxidative stress response.

研究代表者

池谷 真澄 (Iketani, Masumi)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：60644359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：水素水摂取は多様な疾患で病態改善効果を発揮すると知られているが、作用機序は未解明の部分が多い。本研究では、水素の作用機序解明の為、炎症反応と酸化ストレス応答に着目した。水素水飲用後の組織中の水素濃度を計測したところ、肝臓において水素濃度の上昇が見られた。また、リポ多糖による敗血症モデルマウスに敗血症誘導前に水素水を飲用させておいたところ、エンドトキシンショックの症状が緩和し、生存率が改善した。また、肝臓の実質部分において抗酸化酵素ヘムオキシゲナーゼ-1の発現上昇が見られた。これらことから、水素が作用する細胞は肝臓の実質細胞で、その効果は酸化ストレスへの適応応答によると推察された。

研究成果の概要(英文)：Molecular hydrogen (H<sub>2</sub>) functions as an antioxidant and anti-inflammatory agent in various diseases. However, the molecular mechanism is largely unknown. In this study, we focused on inflammatory response and oxidative stress response to elucidate the mechanism of H<sub>2</sub> function. After administration of H<sub>2</sub>-dissolved water (HW) containing with a feeding needle in mice, the H<sub>2</sub> concentration in the liver was immediately elevated. Moreover, we showed that preadministration of HW suppresses lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxin shock. Drinking HW for 3 days before LPS injection prolonged survival in a mouse model of sepsis. Moreover, preadministration of HW enhanced LPS-induced expression of heme oxygenase-1 in hepatocyte in the liver. Therefore, it was speculated that the target of H<sub>2</sub> is a hepatocyte of the liver. Moreover, HW is likely to trigger adaptive responses against oxidative stress in the liver.

研究分野：健康科学

キーワード：水素水 酸化ストレス 肝臓 敗血症 ヘムオキシゲナーゼ 炎症

### 1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患やがんなどの老年疾患は炎症と深く関わり、炎症の治療・予防医療の研究発展はこれからの長寿高齢化社会において重要である。水素分子(H<sub>2</sub>)はヒドロキシラジカルなどの反応性が高い活性酸素種を選択的に還元することで虚血再灌流障害の病態改善効果を発揮することが報告されて以来(Ohsawa I, et al, Nature Med, 2007.)、動物モデルとヒト臨床研究で抗酸化・抗炎症効果を中心に 300 以上論文報告されてきた(Ohta S, Pharmacol Therapeutic, 2014.)。H<sub>2</sub>を容易に摂取する方法として、飽和濃度に近い H<sub>2</sub>を含む水(水素水)が開発されている。水素水による病態改善報告も多数示されてきた(Ohta S, Pharmacol Therapeutic, 2014.)。しかし、H<sub>2</sub>の還元作用のみで多様な生理作用を説明するのは困難である。例えば、抗酸化・抗炎症効果を発揮する脳や腎臓などでは水素水飲用直後でも H<sub>2</sub>の増加が検出限界以下と低い為、メディエーターの存在が予想される。作用機序が未解明な為、医療現場における H<sub>2</sub>活用の妨げとなっている。

我々はリポ多糖(LPS)によって敗血症を誘発したモデルマウスなどを用いた水素水の実験から3つの予備的知見を得ている。第一にLPSの腹腔内投与でエンドトキシンショックが誘発されたマウスは敗血症となり数日で死に至るが、LPS投与前に水素水を事前飲用させたマウスの生存率が回復したことから水素水が疾患予防効果を発揮したと考えられる。第二に事前飲用でLPS投与直後の炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ , IL-6)の上昇が抑制された。第三に細胞に H<sub>2</sub>を投与すると nuclear factor E2-related factor-2 (Nrf2)経路の活性化が観察され、酸化ストレス防御因子 heme oxygenase-1 (HO-1)などの下流遺伝子の発現が誘導された。動物モデルでも酸化ストレスによる肺炎誘発時に水素ガスを吸引させると Nrf2 経路が活性化され、HO-1 によって肺障害が抑制されている(Kawamura T, et al, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013)。HO-1は、LPSをリガンドとする Toll 様受容体 4 (TLR4)とその下流に位置する nuclear factor-kappa B (NF $\kappa$ B)カスケードを抑制し、TNF- $\alpha$ の産生を抑制する(Wang X, et al, J Immun, 2009)(Yin H, et al, Mol Immun, 2010)。また、免疫系の細胞実験から、H<sub>2</sub>によってLPS-TLR4下流の Myeloid differentiation primary response 88 (MyD88)からNF $\kappa$ Bに至るシグナルが抑制されることも報告されている(Itoh T, et al, Biochem Biophys Res Commun, 2011)(Liu G, et al, Int J Ophthalmol, 2012)。これらの知見から、申請者は、水素水の事前投与による顕著な抗炎症効果は自然免疫系と酸化ストレス防御系のクロストークによってもたらされると考えている。すなわち、H<sub>2</sub>投与による免疫細胞での Nrf2 経路などの一過的活性化が HO-1

などの上昇による酸化ストレスへの適応応答を誘導し、これがLPS-TLR4-NF $\kappa$ Bカスケードを抑制することで、過剰な免疫応答を抑制しているのではないかという仮説を立てている。更に H<sub>2</sub>によって脂質受容体 CD36/FAT の発現抑制が報告された(Iio A, et al, Med Gas Res, 2013)。LPSによる炎症経路においても脂質ラフトと関連してCD36が働いている(Plóciennikowska A, et al, Cell Mol Life Sci, 2015)(Baranova IN, et al, J Immunol, 2012)。このため、水素水の予防効果にはCD36の関与も考える必要がある。マウスに水素水を飲用させると直後に腸管・門脈・肝臓、腹腔内で高濃度の H<sub>2</sub>が検出されたことから(図3)、H<sub>2</sub>の直接の作用点はこれらの部位の免疫系にあるものと考えている。H<sub>2</sub>によるシグナル伝達制御の最初の標的分子は未知である。最小の無極性分子である H<sub>2</sub>の受容体にタンパク質がなることはできない。前述のように H<sub>2</sub>は反応性が高い活性酸素を選択的に還元する。活性酸素は細胞膜表面のリン脂質やコレステロールなどを標的に脂質過酸化反応を誘発することが知られている。H<sub>2</sub>は酸化ストレスの制御に中心的な役割を担うミトコンドリアの不飽和脂肪酸・カルジオリピンなどの脂質過酸化反応に介入し、細胞膜脂質の性状を変化させ、それが疾患の予防につながる可能性が考えられる。また、LPS刺激時にTLR4と他の共受容体が脂質ラフト上に局在したり(Kondo Y, et al, Proc Natl Acad Sci USA, 2013)、LPSによる炎症反応に脂質ラフトとCD36の相互作用が関係することから、特に脂質ラフトに注目する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究は水素水による疾患予防効果のメカニズムを明らかにし、医療現場で効果的に水素水を活用できるようにすることを目的としている。まずは敗血症モデルマウスのどの部位が水素水の事前飲用によって症状改善したかを組織染色などによって調査・確認する。続いて H<sub>2</sub>の作用点と考えられる小腸・門脈・肝臓、近傍の免疫細胞における酸化ストレス応答因子である Nrf2, HO-1 と、炎症性因子である TLR4, CD36, NF $\kappa$ B などの発現や分子間相互作用を解析し、更に HO-1 ノックアウトマウスなどでも酸化ストレス応答系の解析を行うことで、酸化ストレス防御系と炎症のクロストークを明らかにする。更にはミトコンドリアやラフトとの関連を検討する足掛かりとして、H<sub>2</sub>作用後にそれぞれの脂質を分離抽出し、質量分析を行う。

### 3. 研究の方法

#### 敗血症モデルマウス作成

7週齢の C57BL/6j 雄マウスにLPS投与の72時間前から水素水とコントロール水(純水)を自由飲水させ、LPS(30mg/kg)を腹腔内投与し、敗血症を誘発した(図

1 A)

### 水素水作製

純水を耐圧ステンレス容器に入れ、0.4 MPa の圧力で高純度の H<sub>2</sub> (純度 99.99999%) を溶解させたものを水素水とした。H<sub>2</sub>濃度は飽和濃度の約 80%(約 0.6mM)であった。

### 生存率テスト

LPS を腹腔内投与以降 72 時間後まで水素水と純水を自由飲水させ、12 時間毎に観察を行い、生存率を調べた(図 1 A)。

### 組織 H<sub>2</sub> 濃度測定

水素の作用部位水素が作用する部位を調べるために 7 週齢の麻酔鎮静下の C57BL/6j 雄マウスに水素水をゾンデで投与し、組織中の H<sub>2</sub> を調べた。H<sub>2</sub> 濃度は溶存水素センサー(Unisense 社)を組織中に留置し、モニターした。

### 肝障害解析

LPS 投与 24 時間後に全採血し、血漿中の肝障害マーカー(AST、ALT、LDH)の値を分析キットを用いて定量した。

### 免疫組織染色

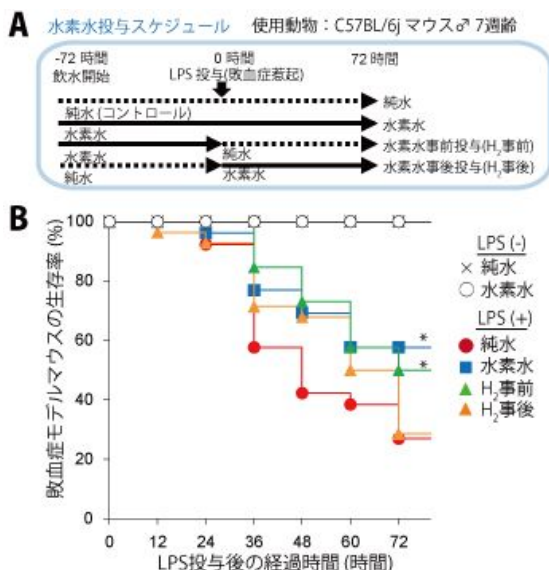
LPS 投与 24 時間後に肝臓を摘出し、4% パラホルムアルデヒド固定・包埋後に凍結切片を作製し、酸化ストレスマーカーである 4-HNE 抗体、血管収縮因子エンドセリン-1(ET-1)抗体、抗酸化酵素ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)抗体、F4/80 抗体を用いて免疫組織染色を行った。

### ウェスタンブロット・定量 PCR

LPS 投与 24 時間後に肝臓を摘出し、遠心分離により細胞を実質分画と非実質分画に分け、一部は可溶化しウェスタンブロットによって HO-1 のタンパク発現を調べた。その他は mRNA を抽出し定量 PCR 法によって HO-1 の遺伝子発現を調べた。

### 質量分析

窒素と H<sub>2</sub> を飽和濃度含有した細胞培養液を培養 C2C12 細胞に添加した後に細胞を回収し、液体クロマトグラフィー質量分析法(LC/MS)によって脂質解析した。



### 図 1 . 水素水投与による敗血症予防効果

(A)水素水投与スケジュール .LPS 投与 72 時間前から純水と水素水の自由飲水を開始し、LPS 投与 72 時間後まで観察を行った。(B)マウスの LPS 投与後の生存曲線 .

### 4 . 研究成果

純水を投与したマウスは LPS 投与 72 時間後には 26.9%の生存率だったが、水素水を投与したマウスにおいて生存率は 57.7%まで改善した。水素水を LPS 投与前だけ投与したマウスにおいても 50%まで生存率の改善が見られ、LPS 投与後だけ水素水を投与したマウスでは 28.6%の生存率であった。このことから敗血症を誘発する前に水素水を投与することで予防効果を発揮することが明らかになった(図 1 B)。

水素が作用する部位を調べる為に敗血症における主たる障害部位である肝臓と腎臓を調べた。水素水投与後に肝臓で H<sub>2</sub> 濃度の上昇が確認された(図 2 A)。腎臓では H<sub>2</sub> 濃度の上昇は見られなかった(図 2 B)。そこで肝臓が H<sub>2</sub> の作用部位であると考えられた。

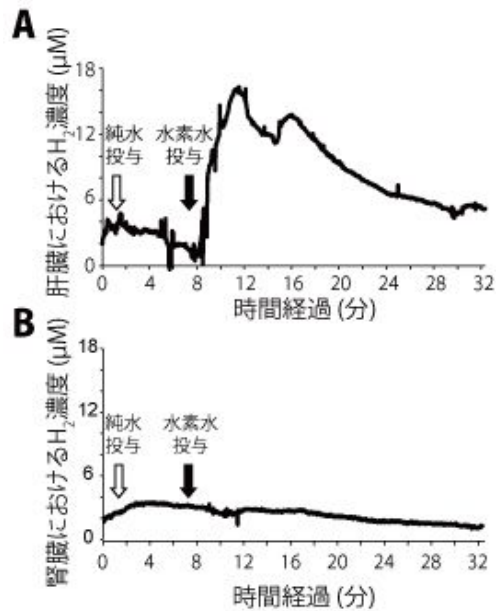


図 2 . 水素水肝臓において H<sub>2</sub> 濃度の上昇 . (A)肝臓における水素水濃度の変化 . (B)腎臓における水素水濃度の変化 .

肝障害マーカーである AST, ALT, LDH を調べた。水素水を事前投与することにより LPS 投与による ALT と LDH の上昇が抑えられた(図 3)。肝組織を観察すると LPS 投与による肝細胞死や血液の鬱滞が抑制されていた。この時、LPS によって肝組織全体に誘導される酸化ストレスマーカー(4-HNE)の蓄積が水素水事前投与で抑制されていた

(図4 A,B) また、LPS 刺激によって誘導されることから知られている肝臓血管内皮における血管収縮因子エンドセリン-1 (ET-1) の発現も抑制されていた (図4 A,C)。

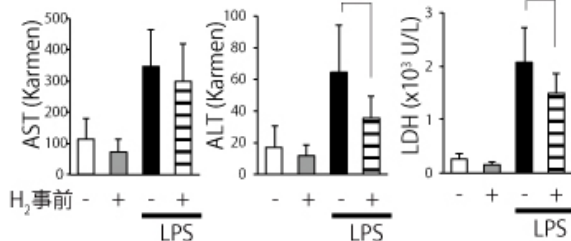


図3. 水素水事前投与による肝障害予防効果. 水素水事前投与と純水を投与したマウスの LPS 投与 24 時間後の血漿中 AST, ALT, LDH の値.

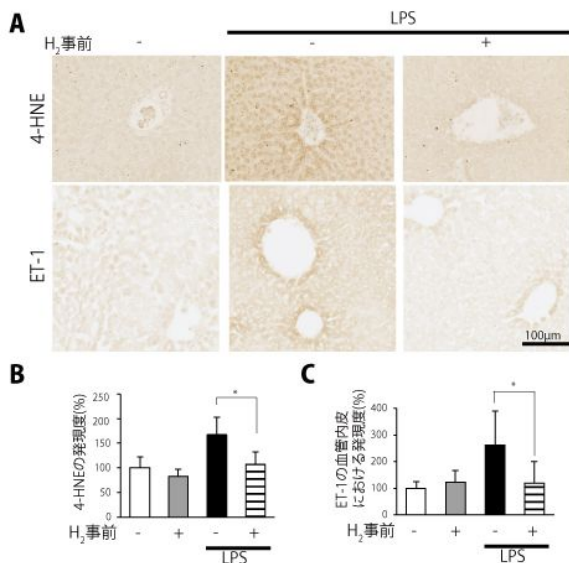


図4. 水素水事前投与による酸化ストレス抑制および ET-1 の発現抑制. (A) 水素水事前投与と純水投与マウスの LPS 投与 24 時間後の 4-HNE と ET-1 の免疫組織染色像. (B) 肝組織における 4-HNE の染色度合の定量化. (C) 血管内皮における ET-1 の染色度合の定量化.

LPS により上昇する ET-1 は内在性の抗酸化酵素であるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) によって抑制されることが知られている (Wiesel P, et al, Circulation, 2000). LPS 刺激によって肝臓において HO-1 発現が亢進することを確認したが、水素水を LPS 投与前に投与したマウスにおいて純水を LPS 投与

前に投与したマウス以上のタンパク質の発現亢進がみられた。肝組織は肝実質細胞とクッパー細胞などを含む非実質細胞で構成される。どの細胞で水素水が効果を発揮しているか免疫組織染色で調べたところ、LPS 投与 24 時間後の肝実質細胞において HO-1 の亢進が見られ、クッパー細胞では見られなかった (図5 A)。更に細胞を実質と非実質に分画し、各々の分画における HO-1 のタンパク量と遺伝子発現量を調べたところ、実質分画において亢進が見られた (図5 B, C)。今後は実質細胞に注目して解析を進めていく予定である。

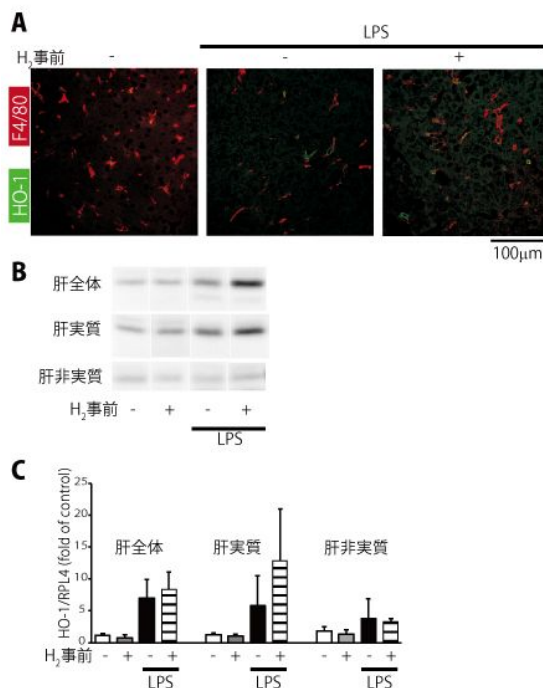


図5. 水素水事前投与による肝実質における HO-1 上昇. (A) 水素水事前飲用マウスと純水飲用マウスの LPS 投与 24 時間後の HO-1 の免疫組織染色像. F4/80 はクッパー細胞のマーカー. 実質分画と非実質分画における HO-1 の発現をウェスタンブロット(B)、定量 PCR 法(C)によって調べた.

培養細胞の H<sub>2</sub> 曝露で、ROS の増加が 1 時間以内の短時間に生じることを観察しており、その際に HO-1 の上昇が見られることを確認している。そこで、マウス筋芽細胞 C2C12 に H<sub>2</sub> 含有培養液を添加し、1 時間後に脂質を抽出して LC-MS で解析をしたところ、H<sub>2</sub> 添加で多くの脂質が変動することが分かった (図6)。今後は変動した脂質の解析を進めると同時に水素水を飲用したマウスの肝臓においても脂質変化が見られるか調べていく予定である。

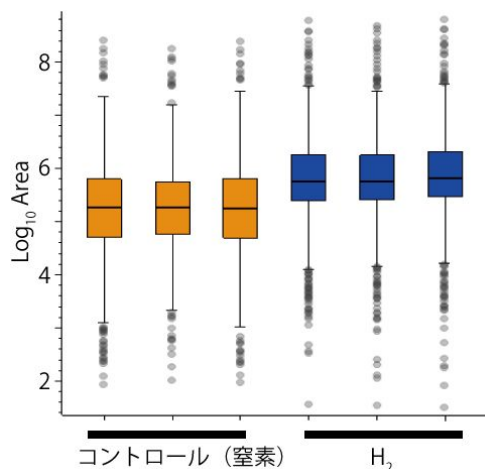


図6 .H<sub>2</sub>が脂質類に与える影響 .C2C12 細胞に H<sub>2</sub> 曝露 1 時間後に抽出した脂質を脂質同定アルゴリズムを使って計算抽出し、その量を平均化した .H<sub>2</sub> 曝露によって多くの脂質に変動が見られた .

#### 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)

Iketani M, Ohshiro J, Urushibara T, Takahashi M, Arai T, Kawaguchi H, Ohsawa I. Preadministration of hydrogen-rich water protects against lipopolysaccharide-induced sepsis and attenuates liver injury. *Shock*, 査読有, 48(1), 85-93, 2017.

Iketani M, Ohsawa I. Molecular Hydrogen as a Neuroprotective Agent. *Current Neuropharmacology*, 査読有, 15(2), 324-331(8) 2017.

Iketani M, Yokoyama T, Kurihara Y, Strittmatter S, Goshima Y, Kawahara N, Takei K. Axonal branching in lateral Signaling. *Scientific Reports*, 査読有, 6:39586 (DOI:10.1038/srep39586), 21 Dec, 2016.

Igarashi T, Ohsawa I, Kobayashi M, Igarashi T, Suzuki H, Iketani M, Takahashi H. Hydrogen prevents corneal endothelial damage 1 in phacoemulsification cataract surgery. *Scientific Reports*, 査読有, 6:31190 (DOI: 10.1038/srep31190), 8 Aug, 2016.

Ishigaki M, Iketani M, Sugaya M, Takahashi M, Tanaka M, Hattori S, Ohsawa I. STED super-resolution imaging of mitochondria labeled with TMRM in living cells. *Mitochondrion*, 査読有, 28, 79-87, 2016.

[学会発表](計 14 件)

大澤郁朗, 池谷真澄, 村上弥生, 高橋眞由美 . 水素分子のミトホルミシス効果 . 第 17 回日本ミトコンドリア学会年会 . 京都, 2017.11.22-23

鎌田太生, 池谷真澄, 高橋眞由美, 川口英夫, 大澤郁朗. 生体内における移動と反応についての重水素分子と水素分子の差異検証. 第 7 回日本分子状水素医学学生物学会年会. 名古屋, 2017.10.29-30.

池谷真澄, 鎌田太生, 関本香奈子, 漆原拓也, 高橋眞由美, 川口英夫, 大澤郁朗. 予防的水素水投与による敗血症肝障害抑制の分子機構 . 第 7 回日本分子状水素医学学生物学会年会. 名古屋, 2017.10.29-30.

Iketani M, Urushibara T, Ohshiro J, Takahashi M, Kawaguchi H, Ohsawa I. Preadministration of H<sub>2</sub>-water protects mice against LPS-induced liver injury with HO-1 expression. 第 40 回日本基礎老化学会大会. 名古屋, 2017.6.14-16.

横山高玲, 池谷真澄, 栗原裕司, 川原信隆, 竹居光太郎 . Nogo シグナルによる嗅索の軸索側枝形成. 第 10 回神経発生討論会, 仙台, 2017.3.10-11

池谷真澄, 畑七瀬, 石垣匡也, 菅谷麻希, 高橋眞由美, 田中雅嗣, 服部成介, 大澤郁朗 . 「超解像 G-STED 顕微鏡を用いたミトコンドリア呼吸鎖スーパーコンプレックスの可視化」『第 39 回日本分子生物学学会年会』, シンポジウム, パシフィコ横浜, 横浜, 12 月 2 日, 2016

漆原拓也, 池谷真澄, 大城樹実, 高橋眞由美, 川口英夫, 大澤郁朗 . 「水素水飲用はリポ多糖により引き起こされる肝機能障害を予防する」『第 39 回日本分子生物学学会年会』, パシフィコ横浜, 横浜, 12 月 1 日, 2016

池谷真澄, 漆原拓也, 大城樹実, 高橋眞由美, 川口英夫, 大澤郁朗 . 「高濃度水素水の事前投与はリポ多糖による急性肝障害を予防する」, 『Frontiers in aging research toward healthy longevity ~ 健康長寿をめざした老化研究の最前線 ~ 』 明治安田生命ビル 丸の内 MY PLAZA ホール, 東京, 11 月 17 日, 2016

池谷真澄, 大城樹実, 漆原拓也, 高橋眞由美, 川口英夫, 大澤郁朗 . 「水素水はリポ多糖による敗血症を予防する」『日本分子状水素医学学生物学会設立記念大会 (第 6 回年会)』 ワークピア横浜, 横浜, 5 月 28 日, 2016

畑七瀬, 石垣匡也, 菅谷麻希, 池谷真澄, 高橋眞由美, 田中雅嗣, 服部成介, 大澤郁朗 . 「ミトコンドリア上における呼吸鎖スーパーコンプレックスの可視化」『第 39 回日本基礎老化学会大会』 伊勢原市文化会館, 伊勢原, 5 月 27 日, 2016

池谷真澄, 大城樹実, 漆原拓也, 高橋眞

由美,川口英夫,大澤郁朗.「水素水飲用はエンドトキシンショックによる臓器傷害を予防する」『第39回日本基礎老化学会大会』伊勢原市文化会館,伊勢原,5月27日,2016

Iketani M, Kamata T, Urushibara T, Takahashi M, Kawaguchi H, Ohsawa I. Preventive effects of Hydrogen-dissolved water on lipopolysaccharide-induced sepsis with attenuation of liver injury, 2017 Keystone Symposia Conference, E2: Aging and Mechanisms of Aging-Related Disease, Yokohama, Japan 15-19(16) May, 2017.

Iketani M, Hata N, Ishigaki M, Sugaya M, Takahashi M, Tanaka M, Hattori S, Ohsawa I. STED imaging of super complex in mitochondrion. The 13th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM), The 16th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (J-mit), Tokyo, Japan, 30 Oct.-1 Nov., 2016

Iketani M, Urushibara T, Ohshiro J, Takahashi M, Kawaguchi H, Ohsawa I. Drinking of water saturated with hydrogen prevented lipopolysaccharide-induced acute injury of the liver in mice. The 12th Congress of the European Union Geriatric Medicine Society (EUGMS), Lisbon, Portugal, 7 Oct., 2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0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0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

池谷 真澄 (Iketani, Masumi)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員  
研究者番号：60644359

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )