

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32629

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16524

研究課題名(和文)ミトコンドリア生体分子の化学修飾に着目した水素の抗炎症作用メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms underlying the anti-inflammatory activity of molecular hydrogen via chemical modification of mitochondrial biomolecules

研究代表者

井内 勝哉 (Iuchi, Katsuya)

成蹊大学・理工学部・助教

研究者番号：40553847

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)：ミトコンドリアなどの細胞内小器官に存在する生体分子の化学修飾に着目し、水素の抗炎症作用メカニズムの解明を目的に研究を行った。その結果、水素による抗炎症メカニズムにおいて、細胞内小器官であるミトコンドリアの関与に加え、細胞膜成分である不飽和脂肪酸を含むリン脂質のフリーラジカル連鎖反応の関与も示唆された。特に、炎症性サイトカインの遺伝子発現や細胞死の誘導が、不飽和脂肪酸の酸化産物によって制御されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the mechanism underlying the anti-inflammatory activity of molecular hydrogen via the regulation of biomolecules in the mitochondria. Molecular hydrogen regulated the gene expression and cell death by modifying the free radical chain reaction-dependent generation of oxidized lipid mediators.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：抗炎症作用 細胞膜 ミトコンドリア フリーラジカル連鎖反応 分子状水素

1. 研究開始当初の背景

分子状水素 (H_2) は、ヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$) とペル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 (Ohsawa I, et al., Nat Med, 2007)。 H_2 の抗炎症作用に関して、世界中で活発に研究が進められ、下記のように様々な疾患モデルを用いて効果を示すことが報告されていた。

脳梗塞モデルにおいて、水素ガスを吸引させると脳梗塞が改善する (Ohsawa I, et al., Nat Med, 2007)。また、肝臓や心臓の虚血再灌流障害にも水素が有効である (Fukuda K, et al., BBRC, 2007, Hayashida K, et al., BBRC, 2008)。さらに、ラットの心肺停止蘇生モデルにおいて、水素ガスが炎症性サイトカインの増加を抑制し、脳や心臓の障害を改善する (Hayashida K, et al., J Am Heart Assoc, 2013)。

動脈硬化モデルにおいて、水素水が血管のアテローム蓄積を抑制する (Ohsawa I, et al., BBRC, 2008)。また、糖尿病モデルにおいて、水素水の摂取によって FGF21 の遺伝子発現が誘導され、脂質や糖代謝を促進させる (Kamimura N, et al., Obesity, 2011)。軟骨細胞を用いた実験では、 H_2 がタンパク質のニトロ化を抑制し、炎症時に活性化する遺伝子発現を低下させる (Hanaoka T, et al., Med Gas Res, 2011)。

2. 研究の目的

H_2 の抗炎症作用は、酸化ストレスによって生じるミトコンドリア機能不全とそれに伴う炎症に関わるシグナル伝達を H_2 が抑制した結果であると予想される。しかし、それらについての詳細なメカニズムの解析は行われておらず、 H_2 の抗炎症作用とミトコンドリアとの関連性について証明されていない。従って、本研究では、酸化ストレスに伴うミトコンドリアや細胞膜の生体分子の化学修飾と機能不全、さらに、炎症に関わるシグナル伝達経路の活性化に着目し、それらに対する H_2 の影響を確かめることを通して、 H_2 の抗炎症作用メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞

ヒト白血病由来株 (THP-1)、ヒト大動脈内皮細胞 (HAEC)、マウスマクロファージ様細胞 (RAW264.7) を、それぞれ RPMI1640 (10% FBS)、DMEM (High glucose) (10% FBS)、endothelial cell growth medium (growth supplements, FCS) で培養した。

(2) 培養細胞の薬剤処理

細胞に *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP) もしくは 2,2'-azobis(2-amidinopropane)

di-hydrochloride (AAPH) 処理により酸化ストレスを誘導した。また、NF-E2-related factor 2 (Nrf2) の活性化剤として、2-cyano-3,12-dioxo-oleana-1,9(11)-dien-28-oic acid methyl ester (CDDO-Me) を使用した。Lipopolysaccharide (LPS) を、炎症誘導剤として使用した。各誘導剤を投与し、一定時間培養した後、分子生物学的な解析を行った。ミトコンドリア膜電位は、テトラメチルローダミンメチルエステル (TMRM) によって染色した。細胞膜の脂質過酸化は、Liperfluo によって解析した。細胞生存率は、AlamarBlue もしくは CCK-8 を用いて測定した。細胞内のカルシウム濃度は、Fluo-4 によって測定した。

(3) 不飽和脂肪酸含有リン脂質や不飽和脂肪酸の自動酸化

アルミパウチ内に 80% 窒素・20% 酸素を充填し、その中で不飽和脂肪酸含有リン脂質や不飽和脂肪酸を 2 日間自動酸化させた。本研究では、不飽和脂肪酸含有リン脂質は、1-palmitoyl-2-arachidonyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PAPC) を使用し、不飽和脂肪酸は、docosahexaenoic acid (DHA)、eicosapentaenoic acid (EPA)、arachidonic acid (AA)、linoleic acid (LA)、飽和脂肪酸に palmitic acid (PA) を使用した。自動酸化させた PAPC を OxPAPC、自動酸化させた DHA、EPA、AA、LA をそれぞれ OxDHA、OxEPA、OxAA、OxLA と表記する。

(4) 動物実験

3% セボフルランにて吸入麻酔したマウスの後肢に、エラスチック・ラバーバンドを巻き虚血状態にした後、バンドをはずすことで、虚血再灌流モデルを作製した。骨格筋における細胞生存は、2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロライド (TTC) を使用した組織染色によって確認した。

4. 研究成果

(1) H_2 の酸化ストレス軽減効果

H_2 は、THP-1 細胞や HAEC において、AAPH または TBHP 処理によって生じる脂質過酸化や細胞死を有意に軽減した。また、 H_2 は、TBHP によって引き起こされるミトコンドリア膜電位の低下を抑制した。TBHP はミトコンドリアに含まれる DNA・タンパク質・脂質など生体成分を化学修飾する。それらの化学修飾を抑制し、細胞死を軽減していることが示唆された。

(2) 酸化リン脂質の細胞死誘導活性

20% 酸素存在下で自動酸化させた PAPC は、培養細胞に対して細胞内カルシウム濃度の上昇や細胞死を誘導した。しかしながら、無酸素状況下で放置した PAPC は、それらの誘導活性がなかった。また、 H_2 存在下での酸化させた PAPC は、細胞死誘導活性が減弱した

ことから、不飽和脂肪酸の酸化に対して H₂ が直接作用することが示唆された。

(3) 酸化脂肪酸の細胞死誘導作用

抗炎症作用や細胞死制御における酸化脂肪酸の役割を確かめた。その結果、酸化前の脂肪酸 (DHA, EPA, AA, LA) と比較して酸化脂肪酸 (OxDHA, OxEPA, OxAA, OxLA) は強い細胞死誘導活性を有した。特に、不飽和度の高い DHA から産生した OxDHA が、最も高い細胞死誘導活性を有した。

また、酸化脂肪酸に対するマクロファージの応答を調べるために、25, 50, 75 µg/mL OxAA 処理した Raw264.7 細胞を解析した結果、濃度依存的に細胞死を誘導した。75 µg/mL OxAA 処理した細胞において、細胞内カルシウム濃度が上昇し、ミトコンドリア膜電位が低下した。興味深いことに、25 µg/mL OxAA で 6 時間処理した細胞において、CDDO-Me 処理と同様に細胞保護に関わるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) と nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) の発現量の増加を確認した。一方で、75 µg/mL OxAA 処理では確認されなかった。これらの結果から、酸化脂肪酸の濃度依存的に、細胞応答が異なることが示唆された。

(4) 酸化脂肪酸の抗炎症作用

Nrf2 活性化は、活性酸素の除去酵素の発現誘導に加え、炎症性サイトカインの発現を抑制することが報告されている。また、(3) の結果より、低濃度 (25 µg/mL) の OxAA で処理した Raw264.7 細胞において、Nrf2 経路を活性化したことから、酸化脂肪酸が炎症を抑制するか確かめた。その結果、25 µg/mL OxAA で細胞を前処理することにより、LPS 誘導性の炎症を減少させた。特に、LPS 処理によって誘導される TNF- α , IL-6, IL-1 のタンパク質の産生を有意に抑制した。しかしながら、LPS による nuclear factor-kappa B (NF- κ B) の核移行には、影響を及ぼさなかった。これらの結果から、酸化脂肪酸による炎症抑制作用は、NF- κ B 経路に関与しないことが示唆された。

(5) H₂ ガス吸入マウスにおける後肢虚血再灌流障害の軽減効果

マウス後肢の虚血再灌流により、TTC で染色されない筋組織領域 (組織損傷) が増加した。一方で、H₂ ガス吸入により、その組織損傷と炎症領域が抑制した。TTC は、ミトコンドリアなどに存在する細胞内の酸化還元酵素の働きによって染色される。よって、本研究で行ったマウス *in vivo* においても、H₂ がミトコンドリアを保護し、炎症を抑制することが示唆された。

(6) 考察・今後の展望

H₂ による抗炎症作用を解析するにあたり、ミトコンドリアのみならず生体膜に含まれ

る不飽和脂肪酸のフリーラジカル連鎖反応によって生じた酸化脂肪酸が、抗炎症や細胞死誘導に重要であった。また、細胞死と炎症などの細胞応答において、酸化脂肪酸の量的・質的な変化により、応答シグナルが制御されている可能性が示唆された。H₂ の作用機序として、Nrf2 経路の活性化も報告されているが、その正確なメカニズムは明確になっていない。しかし、細胞死誘導活性を有する酸化脂肪酸と炎症抑制活性を有する脂肪酸に関して、さらに詳細に調べることで、Nrf2 経路の活性化メカニズムを解明できると考えられる。今後の研究の進展に期待したい。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- (1) Mai Watanabe, Naomi Kamimura, Katsuya Iuchi, Kiyomi Nishimaki, Takashi Yokota, Rei Ogawa, Shigeo Ohta. Protective effect of hydrogen gas inhalation on muscular damage using a mouse hind limb ischemia reperfusion injury model. *Plast. Reconstr. Surg.* 140, 1195-1206 (2017) 査読有
DOI: 10.1097/prs.0000000000003878
- (2) Naomi Kamimura, Harumi Ichimiya, Katsuya Iuchi, Shigeo Ohta. Molecular hydrogen stimulates the gene expression of transcriptional coactivator PGC-1 to enhance fatty acid metabolism. *NPJ Aging Mech. Dis.* 2, 16008 (2016) 査読有
DOI: 10.1038/npjamd.2016.8
- (3) Katsuya Iuchi, Akemi Imoto, Naomi Kamimura, Kiyomi Nishimaki, Harumi Ichimiya, Takashi Yokota, Shigeo Ohta. Molecular hydrogen regulates gene expression by modifying the free radical chain reaction-dependent generation of oxidized phospholipid mediators. *Sci. Rep.* 6: 18971. (2016) 査読有
DOI: 10.1038/srep18971

[学会発表] (計 1 1 件)

- (1) 依馬 未佳, 井内 勝哉, 久富 寿, 酸化脂肪酸のヒトがん細胞に対する増殖抑制効果, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), (兵庫・神戸ポートアイランド) 2017.12.6-2017.12.9
- (2) Katsuya Iuchi, Naomi Kamimura, Kiyomi Nishimaki, Takashi Yokota, Hisashi Hisatomi, Shigeo Ohta, Oxidized

arachidonic acid activates an anti-inflammatory pathway and a pro-cell death signal, 58TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE BIOSCIENCE OF LIPIDS (Zurich, Switzerland)
2017.9.10-2017.9.14

- (3) Katsuya Iuchi, Hyunjin Lee, Kiyomi Nishimaki, Harumi Ichimiya, Takashi Yokota, Naomi Kamimura, Shigeo Ohta. Anti-inflammatory and pro-cell death effects of oxidized arachidonic acid in RAW264.7 cells. 酸化アラキドン酸のRAW264.7細胞に対する抗炎症作用と細胞死誘導作用 第90回日本薬理学会年会 (長崎ブリックオール,長崎新聞文化ホール アストピア)
2017.3.15-2017.3.17
- (4) Naomi Kamimura, Harumi Ichimiya, Katsuya Iuchi, Shigeo Ohta. Molecular hydrogen induces expression of the PGC-1 gene, followed by stimulation of the pathway that regulates FGF21, and the fatty acid and steroid metabolism. 第90回日本薬理学会年会 (長崎ブリックオール,長崎新聞文化ホール アストピア)
2017.3.15-2017.3.17
- (5) 上村尚美, 一宮治美, 井内勝哉, 太田成男: 糖尿病モデルマウスにおいて水素分子により誘導される脂肪酸代謝メカニズムの解明 Analysis of mechanisms of fatty acid metabolism induced by molecular hydrogen in diabetes model mice. 第39回日本分子生物学会年会 (神奈川・パシフィコ横浜)
2016.11.30-2016.12.2
- (6) 西槇貴代美, 井内勝哉, 上村尚美, 横田隆, 太田成男: 水素分子は多価不飽和脂肪酸のフリーラジカル連鎖反応に介入しジエン生成を抑制する Suppression of autoxidation of linoleic acid-film by H₂ gas. 第39回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜)
2016.11.30-2016.12.2
- (7) 井内勝哉, 井本明美, 上村尚美, 西槇貴代美, 一宮治美, 横田隆, 太田成男: 分子状水素はフリーラジカル連鎖反応に介入して酸化脂質メディエーターを改変することを介して遺伝子発現を制御する Molecular hydrogen regulates gene expression by modifying the free radical chain reaction-dependent generation of oxidized phospholipid mediators 第6回日本分子状水素医学

生物学会(創立記念大会)(神奈川・横浜ワークピア)
2016.5.27-2016.5.29

- (8) 上村尚美, 一宮治美, 井内勝哉, 太田成男: 水素分子は転写活性化コアクチベーターである PGC-1 遺伝子の発現を誘導することにより脂肪酸代謝を高める Molecular hydrogen stimulates the gene expression of transcriptional coactivator PGC-1 to enhance fatty acid metabolism. 第6回日本分子状水素医学生物学会(創立記念大会)(横浜・ワークピア)
2016.5.27-2016.5.29
- (9) 井内勝哉, 井本明美, 西槇貴代美, 一宮治美, 李炫溱, 横田隆, 上村尚美, 太田成男: 分子状水素はフリーラジカル連鎖反応で生じる脂質メディエーターを調節して遺伝子発現を制御する 第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会 合同大会 (兵庫・神戸ポートアイランド)
2015.12.1-2015.12.4
- (10) 上村尚美, Alexander M. Wolf, 一宮治美, 井内勝哉, 西槇貴代美, 横田隆, 太田成男: 糖尿病モデルマウスの in vivo 酸化還元状態の測定と分子状水素の効果 第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会 合同大会 (兵庫・神戸ポートアイランド)
2015.12.1-2015.12.4
- (11) 井内勝哉, 井本明美, 西槇貴代美, 一宮治美, 李炫溱, 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(大阪・大阪大学豊中キャンパス)
2015.7.11-2015.7.12

6. 研究組織

- (1)研究代表者
井内 勝哉 (IUCHI, Katsuya)
成蹊大学・理工学部・助教
研究者番号: 40553847