

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15315

研究課題名(和文) 分子状水素によるcAMP産生亢進作用の解明

研究課題名(英文) Investigation of molecular mechanism underlying increased cAMP production by molecular hydrogen

研究代表者

松本 明郎 (Matsumoto, Akio)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：60437308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：分子状水素(H₂)が受容体シグナルを増強するとの仮説を立て、受容体シグナルに対するH₂の協力作用を細胞内cAMPのリアルタイム測定系を用いて解析した。H₂は受容体に加えカルシトニン受容体に対しても協力作用を示した。また、H₂の作用は、下流のシグナル制御系に対してではなく、受容体に対するものであることも示唆された。しかし、H₂の有効濃度域は極めて狭く、繊細な濃度管理なくしてH₂の作用を享受することは難しいことが、培養細胞系とマウス個体を用いた検討から明らかになった。また、受容体に対するH₂の効果は医薬品に比較してわずかであり、その効果を過剰に期待することは避けるべきであろう。

研究成果の概要(英文)：This research project was aimed to investigate the mechanism by which molecular hydrogen (H₂) has a potential to accelerate the beta-receptor signal. The real-time measurement system of intracellular cAMP was employed to evaluate the receptor signal. H₂ showed synergistic action on the beta and calcitonin receptors, respectively. The site of action was indicated on the receptor. However, the fact that the effective range of H₂ was extremely narrow suggests the requirement of a delicate control system of H₂ to appreciate H₂ actions. The effect of H₂ on the receptor is slight compared to other pharmaceutical drugs.

研究分野：ガス薬理学

キーワード：分子状水素 cAMP 交感神経受容体 受容体 GPCR

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、分子状水素 (H_2) の生体作用に注目が集まり、水素吸入による心肺停止後の蘇生率の改善 (脳保護効果)、水素水飲水によるパーキンソン病の神経症状改善、気管支喘息の発作予防、血糖値改善など多様な効果がヒトを対象とした研究から報告されている (Ohta et al. *Pharmacol Ther.* 2014)。しかし、生体における水素分子の作用発現機序は明らかではなく、ヒドロキシラジカル (OH^\cdot) の消去能が唯一示されたただけである (Ohsawa et al. *Nat Med.* 2007)。そのような中、飲水中に含まれる H_2 が実験的パーキンソン病の脳障害低減作用を有する (Fujita et al. *PLoS One*, 2009) ことに着目した申請者らは、胃に取り込まれた H_2 は β 受容体刺激と協力してグレリン産生を促進すること、さらに体循環で脳へ移行したグレリンはグレリン受容体を刺激することにより、脳ドパミン産生神経の減少を防いでいる事を明らかにした (Matsumoto et al. *Scientific Reports*, 2013)。しかし、 H_2 が β 受容体シグナルと協力してグレリン産生を活性化する機序については明らかではなかった。

申請者は H_2 単独では β 受容体を刺激しないものの、他の β 受容体刺激に協力作用を示し cAMP 産生を増強させることを先行実験から見出し、cAMP を共通経路として H_2 の作用を説明できるのではないかとの着想に至り、本研究を開始した。

2. 研究の目的

- (1) 細胞内 cAMP 濃度を指標にして β 受容体経路上における H_2 の作用点を明らかにする。
- (2) β 受容体刺激に対する H_2 の協力作用に関する基礎的データを取得し、 H_2 の作用を定量化する。

- (3) β 受容体以外の Gs 共役型受容体経路でも H_2 の協力作用が成立するか明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) H_2 併用による β 刺激増強作用の定量化
細胞内 cAMP 濃度変化をリアルタイムに観察する実験系を用いる。HEK293 細胞に GloSensor cAMP (Fan et al. *ACS Chem. Biol.*, 2008) 遺伝子を安定発現させ、申請者が独自にクローン化する。GloSensor cAMP は PKA regulatory subunit type IIB をルシフェラーゼ遺伝子と連結することにより、細胞内 cAMP 濃度を生物発光強度として経時的に読み取ることが可能にする。基質 (ルシフェリン) を細胞内に導入し受容体刺激を加えた後、cAMP 濃度変化を分単位で 1 時間以上にわたり連続して測定することが可能である。96-well フォーマットにサンプルを収容し、様々な処理を施した多数の検体を同時に処理することも可能である。HEK293 細胞は内因性に β 受容体を発現しているため、 β 受容体シグナル研究には頻用されている。

この HEK293-cAMP 測定系をイソプロテレノール (Iso) で刺激し、誘導された cAMP 濃度と Iso 濃度を対比させ、濃度-反応曲線を得る。さらに H_2 を添加した場合の cAMP 産生量の増大から、 H_2 の併用効果を定量化することが可能である。これまで H_2 の至適作用濃度を定量的に明らかにした検討がなされていないため、cAMP 産生増強効果を指標として指摘作用濃度を見出す。

- (2) β 受容体経路上で H_2 の作用点となる分子を明らかにする

HEK293-cAMP 測定系にフォルスコリン、PDE 阻害薬をそれぞれ加え、cAMP 濃度曲線の変化から H_2 の作用点となる細胞内タンパク質を推定する。

- (3) Gs 共役型受容体に対する作用

H₂が受容体とアゴニストの親和性を高めることによりシグナルを増強している場合、受容体よりも下流でのシグナル調節分子を標的とした検討では明らかな結果が得られない。そこで、G_sタンパク質と共役する他の受容体においてもH₂がcAMP濃度増強作用を示すか検討することにより、受容体とアゴニストの親和性変化を推定する。

LLC-PK1細胞（ブタ腎尿細管上皮細胞由来）はカルシトニン受容体を内因性に発現する。HEK293細胞と同様にGloSensor cAMP遺伝子を導入し安定発現株を作成し、クローン化の後cAMP測定に用いる。カルシトニン刺激に対するcAMP濃度上昇にH₂の有無が関与するか検討する。これらの結果から、H₂の作用標的がβ受容体に限られるのか、他の受容体経路にも共通するのかについて明らかにする。

(4) H₂の生体作用をマウス個体で検証する

これまで、生体に対するH₂の作用を循環器系から定量化したものは少ない。β受容体刺激に対するH₂の作用が循環器系制御に関わるのかどうかについて、マウス個体を用いて検討する。麻酔下でマウスに対して低酸素暴露を実施すると心拍数の低下が認められるが、再酸素化することにより反跳的な心拍数の増大が観察される。この反跳増加を指標としてH₂暴露による効果を検討する。室内気にH₂を混合し一定時間吸入させた後、低酸素暴露を実施する。再びH₂を混合した室内気で自発呼吸を続けさせた際の心拍数の反跳増加を心電図記録から測定する。H₂濃度を正確に調節するために、1000 Lサイズの容器にH₂を導入し、内部に設置したH₂濃度計で常時H₂濃度をモニターしながら一定濃度のH₂混合気を調整する。容器から導管を用いてマウス顔面を覆う容器内に混合気を誘導する。

4. 研究成果

(1) cAMP測定細胞での検討

HEK293細胞とLLC-PK1細胞にGloSensor cAMP遺伝子を導入し、G418存在下で安定発現細胞を作成した。さらに、限界希釈法により作成したクローン化細胞を用意し、反応性の良いものを選択し、実験に用いた。ルシフェリンを細胞に導入した後、HEK293細胞の培養液中にIsoproterenolを添加すると、添加濃度に比例した発光強度の上昇が認められた（図1）。また、この反応はβ受容体特異的遮断薬であるPropranololで前処置することにより消失したため、β受容体を介した反応を観察したといえる。また、Adrenaline添加においても同様の反応が認められた。

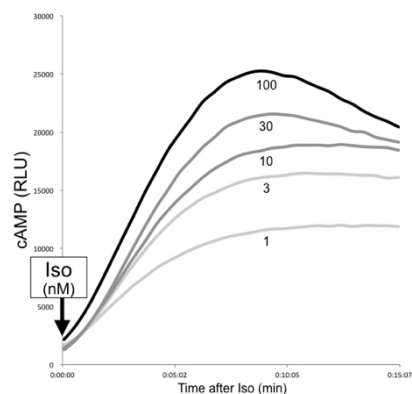


図1：Iso刺激による細胞内cAMP変化

この測定系にH₂を導入した際の発光強度を検討した。純H₂ガスを培養液に導入しH₂飽和溶液（0.8 mM）を作成した。さらに、培養液を用いて希釈し、最終濃度50–160 nMにてIsoproterenol/Adrenalineと併用した。H₂添加によりβ受容体刺激に伴い産生されるcAMP濃度は増大することが観察された（図2）。

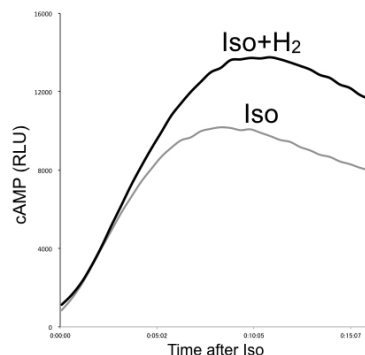


図2：β受容体刺激とH₂の協力作用

興味深いことに、H₂添加による cAMP 濃度増加効果に H₂濃度依存性は認められなかった。80-100 nM 程度の添加が最も効果的に cAMP 濃度を増加させたものの、160 nM 添加では増大効果を認めることはなかった。また、50 nM 添加も増大効果を認めなかった。すなわち、H₂の効果はベル型であり、これまで考えられてきた薬物と標的分子の直接反応によるものとは大きく異なる機序で作用していることが示唆された。また、有効濃度を 80-120 nM 程度と推定すると、1/2 または 2 倍の濃度では既に活性を示さないことになる。H₂の有効域が極めて狭く、繊細な濃度調節を行わない限りは有効性が期待できないものであるとも言える。濃度依存性を示さないことは、脳梗塞モデルを用いた検討 (Ohsawa et al. *Nat Med.* 2007) で示されている事実と合致する。さらに、H₂溶解水の飲用 (低濃度) と H₂吸入 (高濃度) では生体に対する作用が異なる (Ito et al. *Med. Gas Res.* 2012) 原因が H₂の有効作用濃度の狭さに起因する可能性をも示唆する。

β 受容体に対する反応 (HEK293 細胞) に加え、G_s 共役型の GPCR でも同様の反応性の変化が認めらるか、バソプレシン受容体とカルシトニン受容体を持つ LLC-PK1 細胞においても検討した。β 刺激と同様に H₂添加による cAMP 増大効果が観察された。しかし、β 受容体に比較して反応が弱い傾向が認められた。

次に、Forskolin ならびに IBMX を併用した際の H₂の効果と比較検討した。アデニル酸シクラーゼ、フォスフォジエステラーゼの活性化が生じるが、いずれの処置においても H₂による増強効果は残存した。すなわち、アデニル酸シクラーゼより下流の cAMP の産生・分解に直接関わる部位ではなく、受容体または G タンパク質に対して H₂は作用するものと考えられる。GPCR の種類に

より H₂の増強効果が異なることから、ここまでの検討からは受容体タンパク質が H₂の作用点ではないかと考えられる。本研究課題での成果をもとに、今後の研究課題として H₂の作用が受容体のどの部分に対するものであるかについて検討が進められるべきであろう。

(2) マウス個体での H₂作用 (循環器系)

本実験は、千葉大学動物実験委員会の承認のもと実施した。C57BL/6 マウスにメドトミジン、ブトルファノール、ミダゾラムを用い麻酔し、自発呼吸を保ったまま窒素ガスによる低酸素暴露を行った。その後、室内気に回復させた際に認められる心拍数の反跳増加を体表心電図から測定した。室内気に H₂を混合し作成した一定濃度の H₂含有室内気をマウス頭部を覆うマスク内に一定流量にて送気した。H₂濃度は 2%, 3%にて比較検討を行った。これらの濃度は脳梗塞モデルマウスにて効果を示した吸入気濃度に準拠し (Ohsawa et al. *Nat Med.* 2007)、培養細胞 cAMP 濃度測定から得られた結果を加味して近接した濃度を選択した。

低酸素換気により低下した心拍数が室内気による換気後に最大心拍数に到達するまでの時間を指標にしたところ、H₂吸入を併用することにより有意な到達時間の短縮が観察された。すなわち、低酸素暴露により誘発された交感神経刺激が H₂吸入により増強された機序が示唆される。2%濃度での吸入では有意な短縮効果が認められたものの、3%吸入では効果を認めなかった。室内気単独での測定値に対して 3% H₂吸入での測定値は有意差を示さなかった。培養細胞系での観察結果を裏付ける結果が動物個体を用いた検討からも示された。なお、この実験においては副交感神経系への H₂の関与も考慮されなければならない。アトロピンにて前処置した上で同様の実験を実施したところ、最大心拍数への到達時間は H₂吸

入により延長した。詳細は明らかにはできなかったものの、副交感神経系に対してもH₂は活性化効果を有する可能性を示唆するものである。

(3) まとめ

本研究課題により、β受容体をはじめとする複数のGタンパク質共役型受容体に対してH₂分子が作用することが明らかになった。cAMP濃度がH₂併用により増大することから、これまで機序が明らかではなかったH₂分子の生体での作用を推定することが可能になるのではないであろうか。

一方、H₂分子は有効性を示す濃度範囲が極めて狭く、有効濃度域が2倍程度と極めて生体に適用することの難しい分子であることも示唆された。通常は高濃度＝高効果と考えられがちではあるが、H₂に関しては当てはまらない。作用機序を無視した状況で一般社会に浸透しつつある分子状水素は、適用方法を厳密に管理しなければ効果を得ることが難しい物質である。医療用医薬品に比較すると、受容体シグナルに対する増強効果も強くはなく、H₂に対して過剰な期待を抱くことは避けるべきであろう。しかし、H₂分子の生体作用は実在することを科学的に明らかにした。

本研究課題の目的である、科学的な論拠を一般社会に還元する目的は達成されたであろう。

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3件)

① Yasuhiro WATANABE, Akio MATSUMOTO, Takashi MIKI, Susumu SEINO, Naohiko ANZAI, Haruaki NAKAYA, Electrophysiological analyses of transgenic mice overexpressing KCNJ8 with S422L mutation in cardiomyocytes,

Journal of Pharmacological Sciences, 査読有, Vol.135, 2017, 37-43, DOI:10.1016/j.jphs.2017.08.009

② Kenji SUGAWARA, Kohei HONDA, Yoshie REIEN, Norihide YOKOI, Chihiro SEKI, Harumi TAKAHASHI, Kohtaro MINAMI, Ichiro MORI, Akio MATSUMOTO, Haruaki NAKAYA, Susumu SEINO, A Novel Diphenylthiosemicarbazide Is a Potential Insulin Secretagogue for Anti-Diabetic Agent, PLoS One, 査読有, 20;11(10), 2016, e0164785, DOI:10.1371/journal.pone.0164785

③ Kimitoshi ICHIMURA, Takeshi SHIMIZU, Akio MATSUMOTO, Shinichiro HIRAI, Eiji YOKOYAMA, Hiroki TAKEUCHI, Kinnosuke YAHIRO, Masatoshi NODA, Nitric oxide-enhanced Shiga toxin production was regulated by Fur and RecA in enterohemorrhagic Escherichia coli O157, Microbiologyopen, 査読有, 2016, 6(4), DOI:10.1002/mbo3.461

[学会発表] (計12件)

① 松本明郎, 一酸化窒素(NO)の殺菌力を活用した新規感染症治療法の創出, 第1回千葉大学AI研究会, 2018

② 松本明郎, 心筋細胞におけるKir6.1強制発現マウスに認められた突然死の解析, 第138回日本薬理学会関東部会, 2018

③ 清水健, in vivo解析による腸管内での志賀毒素産生様式の解明, 第21回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 2017

④ Haruaki NAKAYA, Role of ATP-Sensitive K⁺ Channels in Cardiac Arrhythmias:

Electrophysiological Analyses Using Genetically Manipulated Mice, 第64回日本不整脈心電学会学術大会 (JHRS2017) 第10回アジア太平洋不整脈学会学術集会 (APHRS2017) 合同学術集会, 2017

⑤ Yasuhiro WATANABE, Investigation of the role of KATP channel in the pathogenesis of J wave syndrome, 日本麻酔科学会第64回学術集会, 2017

⑥ 松本明郎, NO消去酵素活性により規定される大腸菌の腸管内存能, 第17回日本NO学会学術集会, 2017

⑦ 松本明郎, NO産生マクロファージにおける細胞内外NO濃度の検討, 第17回日本NO学会学術集会, 2017

⑧ 清水健, NOストレス環境における腸管出血性大腸菌のNO代謝酵素の役割, 第90回日本細菌学会総会, 2017

⑨ 松本明郎, NOを活用した細菌感染制御機構, 第90回日本薬理学会年会, 2017

⑩ 松本明郎, マイクロバイオマシンの生体内NO測定系の開発, 第67回日本薬理学会北部会, 2016

⑪ 松本明郎, 分子状水素によるグレリン産生亢進に関与する交感神経受容体シグナル活性化機構の解明, 第16回日本抗加齢医学会総会(招待講演), 2016

⑫ Akio MATSUMOTO, SNO Signaling, The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (国際学会), 2016

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 組換えベクター、該ベクターで形質転換された微生物を利用した一酸化窒素消去を抑制する化合物のスクリーニング方法及び細胞内一酸化窒素濃度の測定方法
発明者: 松本明郎、清水健、野田公俊
権利者: 千葉大学

種類: 特許

番号: 特願2016-114134

出願年月日: 2016年6月8日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 明郎 (MATSUMOTO, Akio)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号: 60437308