

令和元年6月25日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15599

研究課題名（和文）水素ガス吸引によって虚血再灌流障害を複合的に軽減する作用機作の総合的解明

研究課題名（英文）Investigation on the mechanism of the multiple effects of the inhalation of hydrogen gas for mitigating ischemia reperfusion injury

研究代表者

太田 成男 (Ohta, Shigeo)

順天堂大学・医学部・客員教授

研究者番号：00125832

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）：私たちは、水素ガスを吸入することで、虚血再灌流障害をはじめとする酸化ストレス障害を軽減することを動物実験で示した。本研究では、動物実験によって有効な投与法を詳細に検討した。さらに、臨床試験によって、水素ガス吸入は脳梗塞と心肺停止後蘇生後に予後改善に寄与することを示唆した。また、分子機構としては、水素はリン脂質の酸化反応に介入し新たなシグナル伝達分子を作り、カルシウムシグナル伝達を抑制し、転写因子のNFATの活性を抑制することを明らかにした。NFATは、多くの因子の遺伝子発現を制御するので、水素が多様な作用を発揮することが可能になる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水素ガス吸入による虚血再灌流障害を実際の治療に用いられるようにするには、臨床試験によって、患者への有効性を示すことが必要である。本研究によって、水素ガス吸入は、脳梗塞患者と心肺停止後蘇生患者の改善に対して有効であることを示唆した。水素ガス吸入治療は、厚生労働省から先進医療Bとして承認され、研究と同時に治療にも用いられている。薬事承認にあたっては、分子機構を解明することが必要である。本研究では、水素が多機能を発揮する分子機作を明らかにした。また、学術的にも、新しいシグナル伝達機構の解明に寄与した。

研究成果の概要（英文）：We have previously revealed that inhalation of hydrogen gas mitigated oxidative stress injury including ischemia reperfusion by animal model experiments. In this study, we investigated the efficient method for the inhalation of hydrogen gas by using a model animal. Then, we showed the efficacies of the inhalation of hydrogen gas for patients with cerebral infarction and cardiac arrest by clinical studies. Moreover, we revealed the molecular mechanism by which hydrogen exhibits the multiple functions: hydrogen modifies the free radical chain reaction to generate the oxidized phospholipids as a signal mediator. The signal mediator suppressed the calcium signaling, and suppressed the activation of a transcription factor NFAT. Since NFAT transcribes many factors, hydrogen can exert multiple functions for the mitigation of ischemia reperfusion injury.

研究分野：水素医学、ミトコンドリア医学、抗加齢医学、分子細胞生物学

キーワード：水素ガス 分子状水素 虚血再灌流障害 脂質メディエーター 転写因子NFAT 脳梗塞 心肺停止後蘇生

## 1. 研究開始当初の背景

私たちは、分子状水素(H<sub>2</sub>、以下「水素」という)が細胞内で酸化力の強い活性酸素種を減少させ、酸化ストレスから細胞を保護することを示した。さらに、脳梗塞モデルラットを作製し、水素ガスを吸入させることで、虚血再灌流障害を著しく軽減することを示した[1]。続いて、肝臓の虚血再灌流障害を軽減することを示し、さらに心筋梗塞モデルラットへの水素ガス吸入の効果を示した[2,3]。

従来、哺乳類細胞では H<sub>2</sub> は生体内では不活性でなんら機能をもつことはないと言われていたもので、画期的成果であった。

その後、世界中で H<sub>2</sub> の効果が調べられ、2016 年当時で、500 報程度の論文が発表されるに至った[4]。また、10 を超える臨床研究結果が報告されている。H<sub>2</sub> の摂取は、多様な疾患モデル改善に有効であることが発表され、H<sub>2</sub> の効果自体は疑う余地がないものとなった。

動物実験では、水素ガスの吸入によって多様な疾患モデルで、虚血再灌流障害が軽減されることが明らかにされた。虚血再灌流障害は、酸化ストレスだけでなく、各種サイトカイン、エンドセリン、アラキドン酸など各種脂質メディエーター産生による障害、活性化好中球と血管内皮細胞の相互作用に基づく障害などの複合的要因によって引き起こされる。さらに、局所だけでなく二次的に全身の主要臓器に障害をきたすので、虚血再灌流障害の克服は、心筋梗塞、脳梗塞、心肺停止蘇生、腸間膜血管閉塞症、臓器移植、手術時などにとって極めて重要な課題である。特筆すべきは、水素ガス吸入で心肺停止蘇生モデル動物の脳機能が保護されることである[5]。

それらの結果により、単純な抗酸化作用だけでなく、水素には多彩な機能があることが明らかにされた[6]。水素には抗酸化作用に留まらず、炎症抑制効果、アレルギー抑制効果、細胞死抑制効果、エネルギー代謝促進効果があることが示された。その効果を発揮するためには、水素は、細胞内情報伝達機構を変化させ、遺伝子発現制御をすることが示唆された[6]。

しかし、水素は基本的には触媒がないと反応を示さない分子であり、いかにして細胞内情報伝達機構を制御するのか、遺伝子発現を制御するのかは、全く未知の課題であった。

また、水素ガスの吸引においては、1.3%-4%程度の低い濃度で効果を発揮するのも謎であった。

また、今後、実際の医療に広く用いられるには、水素が医療ガスとして認可される必要があり、安全性と効果について、臨床試験の蓄積が必要であった。

## 2. 研究の目的

### (1) 分子機構の解明

単に酸化ストレス軽減だけではなく、水素が、複合作用によって虚血再灌流障害を軽減するメカニズムを解明することが本研究の主な目的である。具体的には、水素が虚血再灌流障害において、脂質フリーラジカル連鎖反応に介入することによって変化する脂質メディエーターの存在を証明する。複数の新規脂質メディエーターが酸化ストレス軽減、カルシウムの流入阻止、炎症性サイトカインの減少、エンドセリンの減少を引き起こす経路を明らかにする。

### (2) 臨床試験による安全性と効果の証明

臨床試験によって、患者に対して水素ガスの吸入が有効であることを示すことが目的である。本研究期間内に、心肺停止後蘇生患者および脳梗塞患者への水素ガス吸入の治療効果を論文として発表する。脳梗塞患者への水素ガス吸入の治療効果は、無作為抽出、対照研究で、患者数は、全部で50人を目標としている。水素ガス吸入の安全性を確認し、脳梗塞患者の臨床評価、MRIによる病態、リハビリテーションへの効果を評価する。

## 3. 研究の方法

### (1) 分子機構の解明

無細胞系において、水素が関与する化学反応が細胞内シグナルに与える影響を調べた。細胞の主成分であるリン脂質を水素存在下で空気酸化し、酸化物を生成させた。この酸化物を質量分析により網羅的に変化を調べた。その酸化物を培養細胞に加え、細胞内シグナルを調べた。カルシウム、転写因子の核内移行、網羅的遺伝子発現変化に関し培養細胞を用いて調べた。

具体的には以下の方法を用いた。

① 生体膜で多く含まれる多価脂肪酸を含むリン脂質に 1-パルミトイル-2-アラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン (PAPC) がある。PAPC は空気酸化 (フリーラジカル連鎖反応) によって、脂質メディエーターを作り出すことが報告されている。そこで、PAPC を空気酸化させ、生じた OxPAPC を培養細胞に作用させた。

② 蛍光指示薬を用いての細胞内への Ca<sup>2+</sup> のシグナリング解析をした。

③ マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。

- ④ 重要な遺伝子発現の詳細な解析(エンドセリン、TNF- $\alpha$ 、EGR-1、NFkB2、HMOX1 など)
- ⑤ 水素存在下で空気酸化させたPAPCの変化を網羅的に質量分析器で解析した。

#### (2) 臨床試験による水素吸入の安全性、効果の検証

- ① 慶應義塾大学附属病院において、低温療法と併用して、心肺停止後蘇生患者5名に1.3%水素ガスを吸入させた。
- ② 静岡県沼津市西島病院において、脳梗塞患者50名を対照とし、3%水素ガスを脳梗塞後、6時間から24時間に1日2回1時間吸入させた。25人に吸入させ、25人の従来の治療法を対照として比較した。

### 4. 研究成果

分子機構としては、水素はリン脂質の酸化反応に介入し新たなシグナル伝達分子を作り、カルシウムシグナル伝達を抑制し、転写因子のNFATの活性を抑制することを明らかにした[6]。NFATは、炎症性サイトカインを含め多くの因子の遺伝子発現を制御するので、水素が多様な作用を発揮する分子機構が解明された。

動物実験では、水素ガスを吸入することで、虚血再灌流障害をはじめとする酸化ストレス障害を軽減することを示した。本研究では、動物実験によって有効な投与方法を詳細に検討した[7]。

さらに、臨床試験によって、水素ガス吸入は脳梗塞患者と心肺停止後蘇生後患者に安全であり、予後改善に寄与することを示唆した。

#### (1) 分子機構の解明の結果の詳細 [8]

##### ① 水素が機能を発揮する部位

水素が酸化力の強いヒドロキシルラジカルを消去する場合でも、水溶液中では非常に遅いことが報告されている。そこで、水素の効果を発揮する場所は、脂質中ではないかと推論し、脂質と水溶液への水素の溶解度を調べると、水素は相対的に脂質に溶解することがわかった。

さらに、結合した不飽和脂肪酸を含む脂質では相対的に離れにくいことを明らかにした。

##### ② 水素の多価不飽和脂肪酸のフリーラジカル連鎖反応への介入

多価不飽和脂肪酸への水素の反応に注目した。もっとも小さい多価不飽和脂肪酸であるリノール酸は空気酸化によって過酸化物を生じた。このプロセスは、フリーラジカル連鎖反応によることが知られている。水素が1%程度存在するだけで、リノール酸の過酸化反応は体温レベルでも触媒なしに低下した。

##### ③ 水素のリン脂質のフリーラジカル連鎖反応への介入と脂質メディエーターの改変

水素存在下で、PAPCを空気酸化させ、酸化させたPAPCを培養細胞(モノサイト系)に加えて、細胞内のカルシウムの上昇を測定した。すると、酸化PAPCでは、カルシウムの細胞内上昇が見られた。そして、水素1.3%以上の存在下で酸化したPAPCではカルシウムの細胞内上昇が抑えられた。

質量分析器で網羅的に解析した結果では、カルシウムの上昇を促進するメディエーターは水素によって増加しなかったため、カルシウムの上昇を抑制する新規メディエーターが水素存在下で生成したものと推測される

##### ④ 酸化PAPCによる遺伝子発現制御

空気酸化したPAPCと水素存在下で空気酸化したPAPCを培養細胞に加えることによって、変化する遺伝子発現変化をすべての遺伝子において網羅的に解析した。すなわち、酸化PAPCによって発現が上昇し、水素存在下で酸化したPAPCによって発現が下降した遺伝子を86遺伝子選択すると、細胞内情報伝達に関与する遺伝子が多数含まれていた。なかでも、カルシウムによって活性化するNFATとCREBという転写因子によって発現制御される遺伝子が含まれていた。

⑤ カルシウムは、Calcineurin(脱リン酸化酵素)とcalmodulin-dependent kinase(リン酸化酵素)をそれぞれ通じて活性化し、NFATとCREBを活性化させるので、水素によってNFATとCREBの活性が低下するのは合理的である。また、実際に酸化PAPCによって、NFATが活性化し、水素存在下の酸化PAPCではNFATの活性が抑制することを確認した。

なかでも、TNFやIL-8などの炎症性サイトカイン、炎症に関与するPTGS2(COXII)が水素によって低下したので、水素によって炎症を抑制するメカニズムが理解できた。

また、血管縮小に関与するエンドセリンが水素によって低下することから、水素の血管拡張効果も説明できた。

⑥ 水素は不活性ガス分子なので、触媒がないと反応性を示さないが、フリーラジカル連鎖反応が進行している不飽和脂肪酸を含む脂質の過酸化反応に介入し、酸化脂質メディエーターを改変し、遺伝子発現を制御すると考えられる。

##### ⑦ 培養細胞における水素の効果

培養細胞において同様の効果を示すために、ヒト培養細胞(THP-1)を使って、水素の効果を調べました。人為的にフリーラジカル連鎖反応を起こすためにAAPH加えフリーラジカル連鎖反応を引きこした。水素が1.3%以上存在するときに、フリーラジカル連鎖反応は抑制された。

また、AAPH存在下では、カルシウムの細胞内に上昇し、水素の存在下で抑制されました。同時にNFATの活性も水素によって抑制された。また、NFATにより転写される遺伝子の発現もAAPHによって上昇し、水素によって下降した。

これらの結果は、上記の空気酸化によりPAPCをフリーラジカル連鎖反応で酸化させた結果と一致していた。

## (2) その他の分子機構 [9]

虚血再灌流後に炎症性サイトカインが減少する水素の効果は上記で説明できるが、エネルギー代謝促進効果を説明するのは上記の説明では難しい。

そこで、糖尿病／肥満のモデルマウスを用いて、水素摂取によるエネルギー代謝促進のメカニズムを解明した。

- ① 水素は酸化ストレスを軽減し、過酸化脂質を減少させる。過酸化脂質の最終産物であるヒドロキシノネナール(4-HNE)を減少させる。
- ② 4-HNEは、Aktキナーゼを活性化することが知られており、4-HNEの減少によりAktキナーゼの活性は低下する。
- ③ Aktキナーゼは、転写因子FoxO1をリン酸化しすることが知られており、FoxO1のリン酸化も低下し、核への移行が可能になり、PGC-1アルファを転写する。すなわち、水素によって、PGC-1アルファが増加する。
- ④ PGC-1アルファは、転写因子PPARアルファと結合して、PPARアルファを活性化し、エネルギー代謝を司るホルモンFGF21を増加させる。
- ⑤ FGF21は脂質代謝に関する酵素群を増加させることによって、エネルギー代謝が亢進する。

## (3) 心肺停止後蘇生患者への効果[10]

パイロット研究として、5名の患者に1.3%の水素ガスを吸入させた。4名は、90日後も生存しており、特に神経障害は認められなかった。

## (4) 脳梗塞患者への水素ガス吸入効果[11]

- ① 安全性に関しては、血液検査において何ら副作用と思われる異常は示さなかった。酸素飽和濃度の改善が認められた。
- ② 臨床指標では、NIHSS (NIH stroke-scale) によって評価し、水素ガス吸入群では、初期段階から改善を認めた。
- ③ MRIでは、水素群が有意に改善を認められた。
- ④ リハビリテーションへの効果では、Barthel Indexで有意に改善効果を示した。

## 引用文献

- [1] Ohsawa, I., Ishikawa M., Takahashi K., Watanabe, M., Nishimaki, K., Yamagata, K., Katsura, K., Katayama, Y., Asoh, S., Ohta, S.: Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med.* 2007 ;13(6):688-694.
- [2] Fukuda, K., Asoh, S., Ishikawa, M., Yamamoto, Y., Ohsawa, I., Ohta, S.: Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 361(3): 670-674.
- [3] Hayashida, K., Sano, M., Ohsawa, I., Shinmura, K., Tamaki, K., Kimura, K., Endo, J., Katayama, T., Kawamura, A., Kohsaka, S., Makino, S., Ohta, S., Ogawa, S., Fukuda, K.: Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 ;373(1):30-35.
- [4] Nicolson, GL., Mattos, GF., Settineri, R., Costa, C., Ellithorpe, R., Rosenblatt, S., Valle, JL., Jimenez, A., Ohta, S.: Clinical Effects of Hydrogen Administration: From Animal and Human Diseases to Exercise Medicine. *Int J Clin Med.* 2016;7:32-76.
- [5] Hayashida, K., Sano, M., Kamimura, N., Yokota, T., Suzuki, M., Ohta, S., Fukuda, K., Hori, S.: Hydrogen Inhalation During Normoxic Resuscitation Improves Neurological Outcome in a Rat Model of Cardiac Arrest, Independent of Targeted Temperature Management. *Circulation.* 2014;130(24):2173-80.
- [6] Ohta, S.: Molecular hydrogen as a preventive and therapeutic medical gas: initiation, development and potential of hydrogen medicine. *Pharmacol Ther.* 2014;144(1):1-11.
- [7] Watanabe M, Kamimura N, Iuchi K, Nishimaki K, Yokota T, Ogawa R, Ohta S. Protective Effect of Hydrogen Gas Inhalation on Muscular Damage Using a Mouse Hindlimb Ischemia-Reperfusion Injury Model. *Plast Reconstr Surg.* 2017 Dec;140(6):1195-1206.
- [8] Iuchi, K., Imoto, A., Kamimura, N., Nishimaki, K., Ichimiya, H., Yokota, T., Ohta, S.: Molecular hydrogen regulates gene expression by modifying the free radical chain reaction-dependent generation of oxidized phospholipid mediators. *Sci Rep.* 2016;6:18971.
- [9] Tamura T, Hayashida K, Sano M, Suzuki M, Shibusawa T, Yoshizawa J, Kobayashi Y, Suzuki T, Ohta S, Morisaki H, Fukuda K, Hori S. Feasibility and Safety of Hydrogen Gas Inhalation for Post-Cardiac Arrest Syndrome - First-in-Human Pilot Study. *Circ J.* 2016;80(8):1870-3.

- [10] Ono H, Nishijima Y, Ohta S, Sakamoto M, Kinone K, Horikosi T, Tamaki M, Takeshita H, Futatuki T, Ohishi W, Ishiguro T, Okamoto S, Ishii S, Takanami H. Hydrogen Gas Inhalation Treatment in Acute Cerebral Infarction: A Randomized Controlled Clinical Study on Safety and Neuroprotection. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2017 Nov;26(11):2587-2594.
- [11] Kamimura, N., Ichimiya, H., Iuchi, K., Ohta, S.: Molecular hydrogen stimulates the gene expression of transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  to enhance fatty acid metabolism. npj Aging Mech Dis 2016;2:16008.

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 14 件)

1. Ono H, Nishijima Y, Ohta S, Sakamoto M, Kinone K, Horikosi T, Tamaki M, Takeshita H, Futatuki T, Ohishi W, Ishiguro T, Okamoto S, Ishii S, Takanami H.: Hydrogen Gas Inhalation Treatment in Acute Cerebral Infarction: A Randomized Controlled Clinical Study on Safety and Neuroprotection. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2017;26: 2587-2594. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.06.012.
2. Kamimura N, Ichimiya H, Iuchi K, Ohta S: Molecular hydrogen stimulates the gene expression of transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  to enhance fatty acid metabolism. NPJ Aging Mech Dis. 2016 Apr 28;2:16008. doi: 10.1038/npjamd.2016.8.
3. Iuchi K, Imoto A, Kamimura N, Nishimaki K, Ichimiya H, Yokota T, Ohta S.: Molecular hydrogen regulates gene expression by modifying the free radical chain reaction-dependent generation of oxidized phospholipid mediators. Sci Rep. 2016 Jan 7;6:18971. doi: 10.1038/srep18971.

### 〔学会発表〕(計 13 件)

1. 太田成男: 水素医学のこの1年の発展 第8回日本分子状水素医学生物学会 2018. 8. 24 東京
2. 太田成男: Hydrogen Medicine: from basic science to clinical applications. 5th meeting of the International Academy of Cardiovascular Sciences - European Section (IACS-AS) 2018. 5. 24 スロバキア
3. 太田成男: Hydrogen Molecular Medicine Forum. BIT' S 9th anniversary world DNA day-2018 2018. 4. 26 中国
4. 太田成男: 水素水の飲用によって ApoE4 遺伝子保有者の経度認知障害が改善する。第7回日本分子状水素医学生物学会 2017. 10. 29 名古屋
5. 太田成男: 水素の効能 第2回日本パーキンソン病コンgres 2017. 4. 15 東京
6. 太田成男: ミトコンドリアからみた認知症予防 認知症予防シンポジウム(睡眠からアプローチする) 2017. 2. 5. 名古屋
7. 太田成男: Introduction of Japanese Society of Hydrogen and current situation of hydrogen in Japan 2016 KOREA International Symposium on Hydrogen 2016. 11. 25 韓国
8. 太田成男: The molecular mechanism by which H<sub>2</sub> regulates gene expression. What is the primary target of H<sub>2</sub>? 3rd Symposium of Chinese Hydrogen Biomedical Association 2016. 9. 25 中国
9. 太田成男: 分子状水素による酸化ストレス軽減と遺伝子発現制御: 基礎医学から臨床応用へ日本臨床検査自動化学会第48回大会 2016. 9. 22 横浜
10. 太田成男: 水素医学の創始、展開、応用とメカニズム NPO 法人国際医科学研究会第12回フォーラム 2016. 6. 19 品川
11. 太田成男: 水素研究の up to date 第16回日本抗加齢医学会 2016. 6. 11 横浜
12. 太田成男: 分子状水素による遺伝子発現制御 日本分子状水素医学生物学会設立記念大会(第6回年会) 2016. 5. 29. 横浜
13. 太田成男: 水素医学研究の最新情報 アンチエイジング歯科学会 2016. 5. 22. 福岡

### 〔図書〕(計 2 件)

1. 太田成男・安保徹: 老いない人の健康術 産学社 2016. 4. 30 1-204。
2. 太田成男: 続水素水とサビない身体 ここまでわかった水素水最新 Q&A 小学館 1-186

### 〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.juntendo.ac.jp/graduate/kenkyudb/search/researcher.php?MID=547>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。