

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500723

研究課題名（和文） 糖尿病の予防・改善における水素の効果

研究課題名（英文） Effect of hydrogen on prevention and improvement of diabetes

研究代表者

上村 尚美 (KAMIMURA NAOMI)

日本医科大学・老人病研究所・講師

研究者番号：60283800

研究成果の概要（和文）：

酸化ストレスは、糖尿病を誘発する原因のひとつと考えられている。一方、活性酸素種の中には、一酸化窒素のように生理作用に必要なものもある。従って、抗酸化物質を摂取する場合、有害な活性酸素種のみを除去し、生理作用に必要な活性酸素種を損なわないようにしなければならない。本研究では、糖尿病モデルマウスにおいて、水素分子を摂取することにより肝臓での酸化ストレスが軽減し高血糖や肥満の改善効果が得られることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Oxidative stress is one of the causes of diabetes. While some ROS (reactive oxygen species) such as NO play physiological roles. Thus, cytotoxic radicals such as  $\cdot\text{OH}$  must be neutralized without compromising the essential biological activities of physiologically beneficial ROS. In this study we showed that consumption of molecular hydrogen markedly reduces hepatic oxidative stress levels and improves hyperglycemia and obesity in diabetes model mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：糖尿病・酸化ストレス・抗酸化剤

## 1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスは、糖尿病を誘発する原因のひとつと考えられている。また、糖尿病を発症すると酸化ストレスがさらに増加し、腎症や網膜症等の合併症を引き起こすことが知られている。一方、ビタミンCや $\alpha$ -リポ酸等の抗酸化物質は、糖尿病や合併症の改善により作用をもつことが動物モデルおよび臨床例において報告されている (Scott JA and

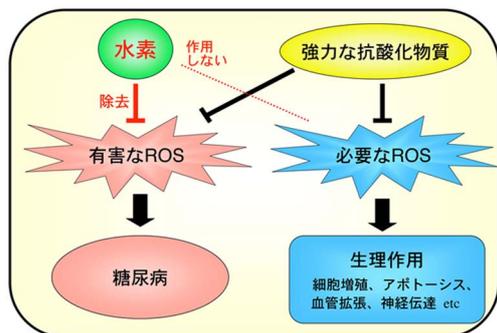
King GL, Ann. N. Y. Acad. Sci., 1031, 204, 2004; Johansen JS et al, Cardiovasc. Diabetol., 4, 5, 2005)。

酸化ストレスは、強い酸化力をもつ活性酸素種やフリーラジカルが過剰に生じることにより起こる。なかでも強力なヒドロキシラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) は生体に悪い影響をもたらすので、抗酸化物質により取り除くことが重要である。一方、一酸化窒素 ( $\text{NO}\cdot$ ) は神経伝

達物質として機能し、血管の拡張に必須である (Murad F, Biosci. Rep., 24, 452, 2004)。

これらの点を考えると、抗酸化物質を摂取する場合、有害な活性酸素種のみを除去し、生理作用に必要な活性酸素種を損なわないようにしなければならない。実際、強力な抗酸化物質を日常的に摂取していると、むしろ死亡率は上昇することが報告されている (Bjelakovic G et al, J. Am. Med. Assoc., 297, 842, 2007)。

我々は、これまでの研究により、水素分子 ( $H_2$ ) が有害な活性酸素種のみを選択的に還元することを見つけ、脳梗塞モデル動物において、2%の水素ガス吸引により急性酸化ストレスが軽減し、脳梗塞が改善することを報告した (Ohsawa I, et al, Nat. Med., 13, 688, 2007)。また、肝臓での虚血再灌流による急性酸化ストレスにおいても水素ガスが有効であることを報告した (Fukuda K, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 361, 670, 2007)。これらの研究より水素分子が急性酸化ストレス障害を軽減することが明らかとなったが、慢性酸化ストレスに影響される疾患も予防または改善できることが予測された。



強力な抗酸化物質は必要なROS(活性酸素種)まで消去してしまうが、水素は有害なROSのみ選択的に除去する。

## 2. 研究の目的

酸化ストレスが原因の一つと考えられている糖尿病の予防や症状の改善に対して、水素分子の効果をモデル動物を用いて検討する。効果が得られたなら、その作用機序を分子レベルで明らかにする。また、他の治療法の効果と比較し、水素分子の効果を評価する。

## 3. 研究の方法

### (1) モデル動物

レプチンレセプターに遺伝子変異を有する db/db マウスを 2 型糖尿病モデルマウスとして使用した。また、db/+マウス (肥満およ

び糖尿病を発症しない) を正常群として使用した。

### (2) 水素分子の投与方法

飲用水として水素水 (水素ガスを精製水に飽和レベルまで溶解させたもの) を与えて自由摂取させた。対照水は、水素水から水素ガスを脱気したものをを用いた。給水は毎日行い、給水瓶は水素が抜けないように特別に工夫してあるものを使用した。

実験開始時 (6 週齢) より実験終了時 (18 週齢) まで連続して投与した。

### (3) 肥満、糖尿病症状の解析

経時的に体重を測定し、体重変化を観察した。また、小動物用 CT スキャンにて皮下脂肪と内臓脂肪を測定した。血糖値、血中インスリン、中性脂肪等の血液パラメーターについては解剖時に心臓より採血し測定を行った。

### (4) 脂肪肝の解析

採取した肝臓を 4%パラホルムアルデヒドで固定した後に凍結切片を作製し、Oil Red O により脂質の染色を行った。

### (5) 酸化ストレスの解析

肝臓の酸化ストレスレベルは、過酸化脂質のマーカであるマロンジアルデヒドの量を定量することにより行った。

### (6) 水素濃度の測定

肝臓に取り込まれた水素濃度は、針型の水素電極を使用して測定した。サイズの問題から、マウスではなくラットを用い、麻酔下で経口カテーテルを用いて水素水を胃の中に直接投与し、肝臓中の水素濃度をリアルタイムで測定した (図1)。in vitro 系の実験では、同じく針型水素電極を用いて、チューブ内に入れた溶液中の水素濃度を測定した。

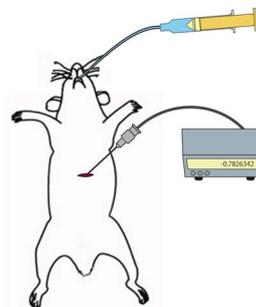


図1. 肝臓での水素濃度測定方法

麻酔下で針型の水素電極を肝臓内部に留置し、水素濃度をモニターする。水素水はカテーテルを用いて胃の中に直接投与する。

### (7) 食餌制限

自由摂食の db/db マウスの 1 日の摂餌量を

測定し、その80%または50%の量の餌を1日1回食餌制限群に与えた。ちなみに、db/dbマウスは過食のため、50%給餌量でdb/+マウスの自由摂食量と同量の食餌を摂取することになる。

(8) RNAの解析

肝臓より total RNA を単離したのち逆転写酵素により cDNA を合成し、定量的 PCR により mRNA の発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) 肥満と高血糖について

2型糖尿病モデルマウス (db/db) に水素分子を投与したところ、初めは対照投与群と同様に体重が増加したが、途中から体重増加

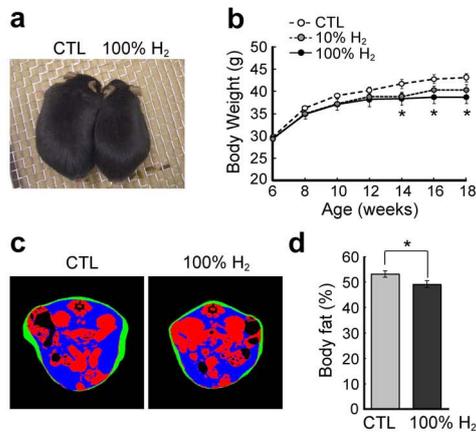


図2. 水素分子投与による肥満の改善

(a)100%水素水(0.8mM)、または、対照水投与3ヶ月後(18週齢)のマウスの外観。(b)100%水素水(0.8mM)、10%水素水(0.08mM)、または対照水を投与した場合の体重変化。(c)100%水素水、または、対照水投与3ヶ月後のマウスのCT画像。青、緑、赤色は、それぞれ内臓脂肪、皮下脂肪、筋肉を示す。(d)100%水素水、または、対照水投与3ヶ月後のマウスの体脂肪率。\*p<0.05

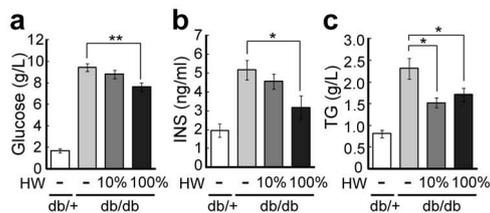


図3. 水素分子投与による血糖値、血中インスリン濃度、中性脂肪濃度の改善

100%水素水(0.8mM)、10%水素水(0.08mM)、または対照水投与3ヶ月後の(a)血糖値、(b)血中インスリン濃度、(c)血中中性脂肪濃度。\*p<0.05、\*\*p<0.01

が抑制されるようになり肥満が改善されることが明らかとなった(図2)。この時、摂食量と飲水量については水素分子投与群と対照群で差は見られなかった。

さらに、血糖値、血中インスリン濃度、中性脂肪濃度の低下にも効果を有することがわかった(図3)。これらの効果は、飽和水素水(0.8mM)を投与した場合、対照群と比べ有意な差であった。また、10倍に薄めた水素水(0.08mM)については、有意ではないものの差がある傾向にあった。

(2) 肝臓の酸化ストレスと脂肪肝について

解剖時の所見より水素分子投与群では肝臓の外観の状態が良かったこと(図4)から肝臓に対して特に効果があるのではないかと考え、肝臓の酸化ストレスについて測定した。その結果、水素分子は肝臓での酸化ストレスの軽減に効果があることがわかった(図5) また、肝臓での脂肪の蓄積も抑えられており脂肪肝の改善にも効果を有することが明らかとなった(図4)。

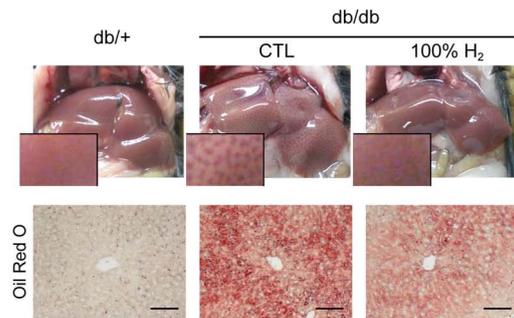


図4. 水素分子投与による脂肪肝の改善

100%水素水(0.8mM)、または、対照水投与3ヶ月後の肝臓の外観(上図)。脂質はOil Red Oにより染色した(下図)。

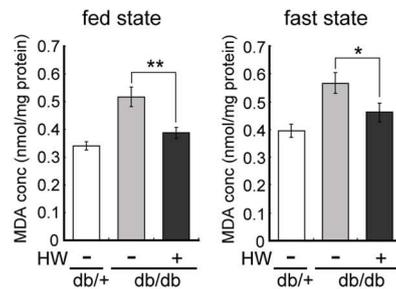


図5. 水素分子投与による肝臓での酸化ストレスの軽減

100%水素水(0.8mM)、または、対照水投与3ヶ月後の摂食状態、または、1晩絶食状態のマウスより単離した肝臓のマロンジアルデヒド(過酸化脂質のマーカー)の濃度を測定した。\*p<0.05、\*\*p<0.01

(3) 肝臓での水素分子の蓄積について

絶食時より摂食時の方が酸化ストレスを抑制する効果が高かったこと(図5)、また、以前行った実験で絶食時より摂食時の方が血中水素濃度が高かったこと(Nakashima-Kamimura N et al., Cancer Chemother Pharmacol., 64, 753, 2009)から食餌状態の違いが水素分子の蓄積に影響すると考え、水素分子投与後の肝臓での水素濃度を測定した。その結果、予想通り絶食時よりも摂食時の方が、より高い水素濃度が維持されることが明らかとなった(図6)。摂食時と絶食時の肝臓で大きく変化するのはグリコーゲンの量である。そこで、in vitroの実験系で、グリコーゲン溶液に水素分子を保持する能力があるか調べた。その結果、水やグルコース溶液と比較してグリコーゲン溶液の方が飽和水素濃度が高く、さらに、常圧開放系で静置したところ、水素分子がより長い時間グリコーゲン溶液中に留まっていることが明らかとなった(図6)

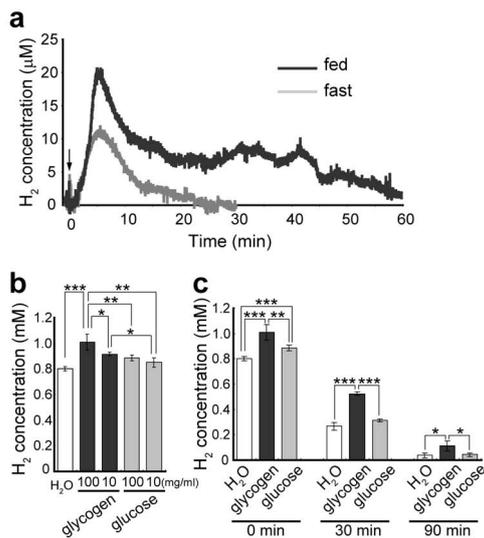


図6. 水素分子は摂食時の肝臓やグリコーゲン溶液に蓄積する

(a)針型水素電極を用いて水素水投与後の肝臓における水素濃度の変化を測定。(b)グリコーゲン溶液、グルコース溶液、または、水の飽和水素濃度。(c)飽和水素溶液を作製後、常圧開放系で静置した時の水素濃度の変化。\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001

(4) 水素分子と食餌制限との効果の比較について

水素分子の効果について、糖尿病の初期の治療方法である食餌制限の効果との比較を行った。その結果、血糖値、血中インスリン濃度、中性脂肪濃度について、自由摂取の80%

に給餌量を制限したものと水素分子は同等の効果をもつことが明らかとなった。さらに、水素分子と80%食餌制限を併用することで50%食餌制限と同様の効果があり、併用効果もあることがわかった(図7)。

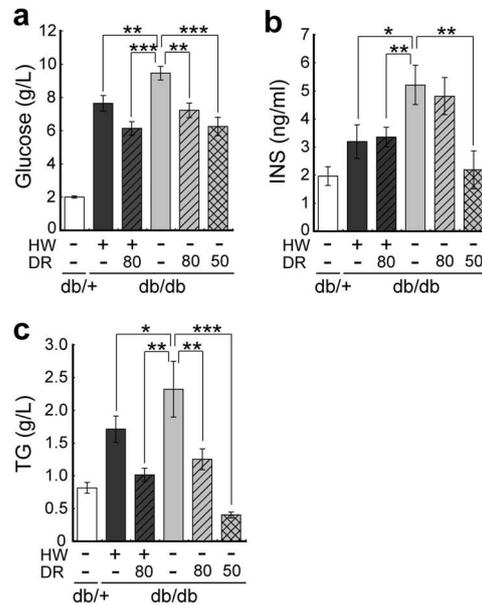


図7. 水素分子の効果と食餌制限の効果の比較

100%水素水(0.8mM)または対照水を投与し、食餌を自由摂取、80%給餌または50%給餌で行った。3ヶ月経過後の(a)血糖値、(b)血中インスリン濃度、(c)血中中性脂肪濃度。\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001

(5) 水素分子は、肝臓での FGF21 の mRNA 発現量を増加させる。

水素分子は、肝臓に蓄積しやすいこと、肝臓の酸化ストレスを抑制する効果があること、そして高血糖の改善に効果があることから、肝臓における糖尿病関連因子の解析を行った。肝臓で発現して分泌され膵臓や筋肉に働きかける内分泌ホルモンのような役割を持っている FGF21 (fibroblast growth factor 21) と糖新生酵素の mRNA 発現量の変化を調べた。その結果、糖新生酵素である G6PC (glucose-6-phosphatase) や PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) の発現量は水素分子によって変化しないが、FGF21 の発現量が増加することが明らかとなった(図8)。

以上の結果より、2型糖尿病モデルマウスにおいて、水素分子を長期間投与することにより肝臓での FGF21 の発現量が増加し、その結果、血糖値が低下し肥満が改善される可能性が示唆された。

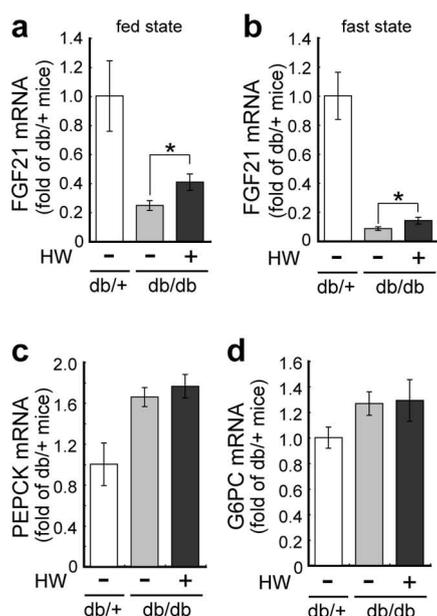


図8. 肝臓での糖尿病関連因子の遺伝子発現に対する水素分子の効果

100%水素水(0.8mM)、または対照水投与3ヶ月後の肝臓より単離したmRNA発現量を定量的PCRにて解析した。(a)摂食時のFGF21、(b)絶食時のFGF21、(c)PEPCK、(d)G6PC。\*p<0.05

## 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)

① Kamimura, N., Nishimaki, K., Ohsawa, I., Ohta, S.: Molecular hydrogen improves obesity and diabetes by inducing hepatic FGF21 and stimulating energy metabolism in db/db mice. *Obesity* (査読有) 2011 Feb 3. [Epub ahead of print].

② Wan, R., Ahmet, I., Brown, M., Cheng, A., Kamimura, N., Talan, M., Mattson, M.P.: Cardioprotective effect of intermittent fasting is associated with an elevation of adiponectin levels in rats. *J. Nutr. Biochem.* (査読有) 21:413-417 (2010).

③ Nakashima-Kamimura, N., Mori, T., Ohsawa, I., Asoh, S., Ohta, S.: Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* (査読有) 64: 753-761 (2009).

④ Nagata, K., Nakashima-Kamimura, N., Mikami, T., Ohsawa, I., Ohta, S.: Consumption of molecular hydrogen prevents the stress-induced impairments in hippocampus-dependent learning tasks during chronic physical restraint in mice. *Neuropsychopharmacology.* (査読有) 34:501-508 (2009).

⑤ Nakashima-Kamimura, N., Nishimaki, K., Mori, T., Asoh, S., Ohta, S.: Prevention of chemotherapy-induced alopecia by the anti-death FNK protein. *Life Sci.* (査読有) 82:218-225 (2008).

[学会発表] (計11件)

① 上村尚美、肝臓における水素分子の動態とその効果、分子状水素医学シンポジウム、2011年2月18日、名古屋

② Naomi Kamimura: Molecular hydrogen improves obesity and diabetes by inducing FGF21 through reducing oxidative stress in db/db mice. 7th ASMRM & 10th J-mit, 16 Dec. 2010, Fukuoka, Japan.

③ 上村尚美、水素分子は、肝臓グリコーゲン中に蓄積し、糖尿病モデルマウスの症状を改善する、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月7日、神戸

④ 西園啓文、新規細胞死抑制タンパク質を用いたミトコンドリア機能保護というまったく新しいアプローチによる精子保存技術の開発、第103回日本繁殖生物学会大会、2010年9月2日、青森

⑤ 佐藤佑一郎、細胞導入型細胞死抑制タンパク質 PTD-FNK による精子凍結保存、第19回日本 Cell Death 学会学術集会、2010年7月31日、名古屋

⑥ 上村尚美、糖尿病モデルマウスの症状改善に対する水素分子の効果、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月11日、横浜

⑦ 花岡央泰、水素分子による軟骨組織の酸化ストレス傷害の軽減、第24回日本整形外科学会基礎学術集会、2009年11月6日、横浜

⑧ 永田和史、水素分子摂取による身体拘束マウスの海馬依存的学習・記憶能力低下の抑制、第8回日本ミトコンドリア学会年会、2008年12月18日、東京

⑨ 上村尚美、水素分子は抗癌剤シスプラチンの抗腫瘍効果を抑制することなく副作用である腎障害を軽減する、第 31 回日本分子生物学会/第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 9 日、神戸

⑩ 上村尚美、抗癌剤シスプラチンに誘導される腎臓でのアポトーシスは水素分子により抑制される、第 17 回日本アポトーシス研究会学術集会、2008 年 8 月 1 日、京都

⑪ Naomi Nakashima-Kamimura: Three-dimensional analysis of mitochondrial structure in a HeLa cell by Ultra-High Voltage Electron Microscope. Euromit 7/ The seventh European Meeting on Mitochondrial Pathology, 11 Jun. 2008, Stockholm, Sweden

〔産業財産権〕

○取得状況（計 1 件）

名称：細胞死抑制活性強化タンパク質 FNK を用いた脱毛の防止

発明者：太田成男、上村尚美、麻生定光

権利者：日本医科大学

種類：特許

番号：4686780

取得年月日：平成 23 年 2 月 25 日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上村 尚美 (KAMIMURA NAOMI)

日本医科大学・老人病研究所・講師

研究者番号：60283800

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

大澤郁朗 (OHSAWA IKUROH)

東京都健康長寿医療センター研究所・老化制御研究チーム・研究副部長

研究者番号：30343586

太田成男 (OHTA SHIGEO)

日本医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：00125832