

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300244

研究課題名（和文） 分子状水素による健康増進・疾患抑制の新規分子機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanisms underlying the effects of molecular hydrogen on health promotion and disease control

研究代表者

伊藤 雅史（ITO MASAFUMI）

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・研究部長

研究者番号：80393114

研究成果の概要（和文）：

分子状水素の効果は多岐にわたる病態で報告されている。その作用機序としてヒドロキシラジカルの選択的消去が提唱され、水素が酸化障害を抑制することが確認されている。我々は、I 型アレルギー・炎症・脂肪肝の細胞モデルにおいて、水素は生理的に重要な酸化シグナルに対しては影響を与えず、細胞内シグナル伝達を抑制することにより効果を示すことを明らかにし、水素の新規作用機序として、シグナル伝達の調節を確立した。

研究成果の概要（英文）：

The effects of molecular hydrogen have been reported in various diseases. A selective scavenging of hydroxyl radicals was proposed as an underlying mechanism of the hydrogen effects and indeed a reduction of the oxidative damage by hydrogen has been observed. In cell culture models of inflammation and fatty liver as well as type I allergy, we have demonstrated that hydrogen does not affect the oxidative signal that is physiologically important but inhibits the intracellular signal transduction, thereby exerting beneficial effects. Based on these findings, we have established the modulation of signal transduction as a novel mechanism of the effects of hydrogen.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2011 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2012 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,200,000	18,330,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：水素・シグナル伝達・酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

分子状水素をラットに吸入させると脳梗塞

の範囲が縮小すること、その効果はヒドロキシラジカルの選択的消去を介していることが、2007年のNature Medicineに報告された。以来、飲用水または吸入気体としての水素が、心筋梗塞・新生児脳虚血・認知症・糖尿病・肝虚血・動脈硬化症・移植腸管虚血・潰瘍性大腸炎等多岐にわたる病態で効果を示すことが報告されてきた。我々は、飲用水素水の片側性パーキンソン病モデル動物に対する発症予防効果を報告した。このように分子状水素は多くの酸化ストレス病態に有効であることが確認された。一方で、生体内で生じる大量のヒドロキシラジカルに比して投与される水素量は微量であり、水素分子の化学反応論のみでは水素の顕著な効果を説明できず、別の分子機構の存在が想定された。我々は、酸化的傷害が病態に直接関与しないI型アレルギーを水素が抑制すること、その効果はヒドロキシラジカルの選択的消去ではなくシグナル伝達の抑制を介していることを報告した。我々は、それらの結果に基づき、水素の新規作用機序として、シグナル伝達の調節を提唱した。

2. 研究の目的

各種疾患の細胞モデルで、① 水素がシグナル伝達に及ぼす影響を検討し、② シグナル伝達経路における水素の作用点、標的分子を同定する。また、③ 水素により発現が誘導される遺伝子を同定し、シグナル伝達制御との関連を検討する。以上の研究により、水素効果へのシグナル伝達の調節、遺伝子の発現変化、ヒドロキシラジカルの消去の関与を評価し、分子状水素による健康促進・疾患抑制の詳細な分子機構を解明する。

3. 研究の方法

パーキンソン病・アレルギー・炎症・筋代謝・骨代謝・皮膚老化・脂質代謝等の複数の疾患の細胞モデルで、水素存在下での培養が、細胞内シグナル伝達・酸化ストレス・疾患の表

現型に及ぼす影響を検討した。水素がシグナル伝達系への作用を介して表現型を修飾することが判明した疾患モデルにおいては、シグナル伝達経路における水素の作用点、標的分子の同定を試みた。さらにDNAマイクロアレイ解析を行い、水素により発現が誘導される遺伝子およびそれぞれの遺伝子の発現調節に関わるシグナル伝達経路における水素の作用点、標的分子の同定を試みた。

4. 研究成果

- ① 水素は、RAW264マクロファージ細胞において、LPS/IFN γ 処理により誘導されるASK1およびその下流のp38・JNK・I κ B α のリン酸化の抑制を介してiNOSの発現およびNOの産生を抑制することを見出した。また、LPS/IFN γ 処理によるNADPH oxidaseの活性化の結果産生されるsuperoxideおよびそれから変換され酸化的シグナルとして機能するH₂O₂の細胞内レベルは水素処理により変化しなかった。すなわち、水素は酸化的シグナルには影響を与えず、LPS/IFN γ 処理により誘導されるシグナル伝達の活性化を抑制することにより、NF κ B・AP-1等の転写因子の活性を抑制し、iNOS・COX2等の炎症性遺伝子の発現を抑制するものと考えられた。水素はLPS受容体またはその直下に作用する可能性が示唆され、今後その詳細な作用機序および標的分子の同定が望まれる。さらに、慢性関節リウマチの動物モデルであるコラーゲン誘発関節炎で水素水の飲用が症状を軽減することを確認した。本研究により、炎症における水素効果の分子メカニズムを明らかにするとともに、慢性関節リウマチ等の炎症性疾患への水素の臨床応用の可能性を示した。
- ② 脂肪肝の細胞モデルとして、パルミチン酸負荷による肝細胞への脂肪蓄積モデルを用いて水素効果を評価したところ、水素はパルミチン酸の取り込みを抑制し、

中性脂肪の蓄積を抑制した。その分子メカニズムを検討したところ、水素は脂肪酸のトランスポーターであるCD36の発現を抑制しその取り込みをする結果、下流にあるJNKのシグナル伝達を抑制し脂肪蓄積を抑制することが判明した。水素の標的分子は、CD36の発現調節に関わる遺伝子またはその上流にある可能性が示唆された。脂質代謝異常の動物モデルおよびヒトで水素効果が報告されているが、本研究により、その作用機序の一つとして、CD36の発現調節を同定した。

- ③ 水素処理の濃度・時間を変化させられる新規に開発した水素投与システムを用いて、パーキンソン病の細胞・動物モデルで水素効果が認められる条件の検討を行った。その結果、水素の間歇投与でもパーキンソン病の抑制効果が認められることを確認した。水素水の経口投与は血中の水素濃度を一過性に上昇させることから、この間歇投与で効果が認められた知見は、生体内での水素効果を模倣しているものと考えられた。
- ④ ヒトで水素がシグナル伝達、遺伝子発現等に及ぼす影響を検討するため、進行性筋ジストロフィー・ミトコンドリア脳筋症・炎症性筋疾患患者12例に水素水を12週間投与し、血中・尿中マーカーを測定した。その結果、血中乳酸/ピルビン酸・空腹時血糖・マトリックスメタロプロテアーゼ3、中性脂肪の血中レベルに変動を認め、水素はヒトで遺伝子の発現変化を誘導することを確認した。
- ⑤ 水素水を投与したマウスの肝臓を用いてメタボローム解析および網羅的遺伝子発現解析を行い、水素水の飲用により肝臓で誘導される代謝および遺伝子発現の変化を同定した。
- ⑥ 神経変性疾患モデルマウスに対する水素

水の効果を検証し、運動機能のアッセイにて水素水はモデルマウスの発症を遅延させ、病理像の解析でも神経細胞死を遅延させる効果があることを見いだした。今後、この分子機構の解明を目指す。

- ⑦ 水素効果を検証する実験においては、細胞を水素で24時間前処理していたが、非常に短時間の前処理でも水素が効果を示すことを見いだしている。今後、水素処理の時間・濃度を変化させることにより、細胞・動物のみならず、ヒトにおいても至適な水素投与の方法を確立する必要があるものと考えられた。
- ⑧ 本研究では、各種疾患の細胞モデルで水素効果を検証した。水素効果を確認できなかった疾患モデルにおいて、水素の投与方法を変更したところ、水素効果が明確に確認された場合も認められた。これらの事実は、細胞モデルを用いた水素効果の研究においては、水素の投与濃度・時間を厳密にコントロールすることが必要不可欠であることを示している。

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] (15 件)

1. Iio A, Ito M, Itoh T, Terazawa R, Fujita Y, Nozawa Y, Ohsawa I, Ohno K, Ito M. Molecular hydrogen attenuates fatty acid uptake and lipid accumulation through downregulating CD36 expression in HepG2 cells. *Med Gas Res* 査読有 3:6, 2013.
2. Yamamoto R, Matsushita M, Kitoh H, Masuda A, Ito M, Katagiri T, Kawai T, Ishiguro N, Ohno K. Clinically applicable antianginal agents suppress osteoblastic transformation

- of myogenic cells and heterotopic ossifications in mice. *J Bone Miner Metab* 査読有 31: 26-33, 2013.
3. Ohno K, Ito M, Ichihara M, Ito M. Molecular hydrogen as an emerging therapeutic medical gas for neurodegenerative and other diseases. *Oxid Med Cell Longev* 査読有 2012:353152, 2012.
 4. Kami K, Fujita Y, Igarashi S, Koike S, Sugawara S, Ikeda S, Sato N, Ito M, Tanaka M, Tomita M, Soga T. Metabolomic profiling rationalized pyruvate efficacy in cybrid cells harboring MELAS mitochondrial DNA mutations. *Mitochondrion* 査読有 12:644, 2012.
 5. Ito M, Hirayama M, Yamai K, Goto S, Ito M, Ichihara M, Ohno K. Drinking hydrogen water and intermittent hydrogen gas exposure, but not lactulose or continuous hydrogen gas exposure, prevent 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease in rats. *Med Gas Res* 査読有 2:15, 2012.
 6. Iio A, Ohguchi K, Iinuma M, Nozawa Y, Ito M. Hesperetin upregulates ABCA1 expression and promotes cholesterol efflux from THP-1 macrophages. *J Nat Prod* 査読有 75:563-566, 2012.
 7. Iio A, Ohguchi K, Maruyama H, Tazawa S, Araki Y, Ichihara K, Nozawa Y, Ito M. Ethanolic extracts of Brazilian red propolis increase ABCA1 expression and promote cholesterol efflux from THP-1 macrophages. *Phytomedicine* 査読有 19:383-388, 2012.
 8. Ito M, Ibi T, Sahashi K, Ichihara M, Ito M, Ohno K. Open-label trial and randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial of hydrogen-enriched water for mitochondrial and inflammatory myopathies. *Med Gas Res* 査読有 1:24, 2011.
 9. Itoh T, Terazawa R, Kojima K, Nakane K, Deguchi T, Ando M, Tsukamasa Y, Ito M, Nozawa Y. Cisplatin induces production of reactive oxygen species via NADPH oxidase activation in human prostate cancer cells. *Free Radic Res* 査読有 45:1033-1039, 2011.
 10. Itoh T, Hamada N, Terazawa R, Ito M, Ohno K, Ichihara M, Nozawa Y, Ito M. Molecular hydrogen inhibits lipopolysaccharide/interferon γ -induced nitric oxide production through modulation of signal transduction in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 査読有 411:143-149, 2011.
 11. Hamada N, Tanaka A, Fujita Y, Itoh T, Ono Y, Kitagawa Y, Tomimori N, Kiso Y, Akao Y, Nozawa Y, Ito M. Involvement of heme oxygenase-1 induction via Nrf2/ARE activation in protection against H₂O₂-induced PC12 cell death by a metabolite of sesamin contained in sesame seeds. *Bioorg Med Chem* 査読有 19:1959-1965, 2011.
 12. Itoh T, Tsukane M, Koike M, Nakamura C, Ohguchi K, Ito M, Akao Y, Nozawa Y, Wakimoto T, Nukaya H, Suwa Y. Inhibitory effects of whisky congeners on IgE-mediated degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells and passive cutaneous anaphylaxis reaction in mice. *J Agric Food Chem* 査読有 58:7149-7157, 2010.
 13. Tanaka A, Hamada N, Fujita Y, Itoh T, Nozawa Y, Iinuma M, Ito M. A novel kavalactone derivative protects against H₂O₂-induced PC12 cell death via Nrf2/ARE activation. *Bioorg Med Chem* 査読有 18:3133-3139, 2010.
 14. Iio A, Ohguchi K, Inoue H, Yoko A, Nozawa Y, Ito M. Ethanolic extracts of

Brazilian red propolis promote adipocyte differentiation through PPAR γ activation. *Phytomedicine* 査読有 17:974-979, 2010.

15. Ohguchi K, Nakajima C, Oyama M, Inuma M, Itoh T, Akao Y, Nozawa Y, Ito M. Inhibitory effects of flavonoid glycosides isolated from the peel of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* 'Fuyu') on melanin biosynthesis. *Biol Pharm Bull* 査読有 3:122-124, 2010.

[学会発表] (計 9 件)

1. Ito M, Itoh T, Ohno K, Nozawa Y. Symposium: Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by a new gas mediator: Molecular mechanism of the inhibitory effect of hydrogen on inflammation. 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Tokyo, Japan. 2013. 3. 27-29.
2. 伊藤雅史 シンポジウム: 水素によるシグナル伝達の制御 抗酸化とシグナル伝達—水素の作用機序解明を目指して: 水素によるシグナル伝達の制御 第3回分子状水素医学シンポジウム、東京、2013. 2. 9-10.
3. Sobue S, Yamai K, Ito M, Ohno K, Ito M, Ohkuwa T, Ichihara M. Molecular hydrogen alters signaling pathways and gene expression profiles in multiple mouse organs. 52nd Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco, USA. 2012. 12. 15-19.
4. 伊藤雅史、伊藤智広、伊藤美佳子、大野欽司、野澤義則 分子状水素はシグナル伝達の抑制を介して LPS/IFN- γ により誘導される NO の産生を抑制する 第2回分子状水素医学シンポジウム、東京、2012. 2. 11.
5. 伊藤美佳子、市原正智、伊藤雅史、大野欽司 水素水飲用をシュミレーションする水素ガス間欠投与は水素ガス持続投与よりもパーキンソンモデルラットに対して有効である 第2回分子状水素医学シンポジウム、東京、2012. 2. 11.
6. 伊藤雅史、伊藤智広、伊藤美佳子、大野欽司、野澤義則 分子状水素による炎症反応抑制の分子機構 第34回日本基礎老化学会、名古屋、2011. 6. 15-17.
7. 衣斐達、佐橋功、大野欽司、小澤史子、伊藤雅史 筋疾患における水素水経口投与の臨床効果 分子状水素医学シンポジウム、名古屋、2011. 2. 18-19.
8. 伊藤雅史、伊藤智広、野澤義則、伊藤美佳子、大野欽司 水素医学の展開: 分子状水素による細胞内シグナル伝達の調節 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、神戸、2010. 12. 7-10.
9. 伊藤智広、藤田泰典、伊藤美佳子、増田章男、市原正智、小島俊男、野澤義則、大野欽司、伊藤雅史 分子状水素による I 型アレルギー抑制機構の解明 第33回日本基礎老化学会、名古屋、2010. 6. 17-18.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 雅史 (ITO MASAFUMI)
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・研究部長
研究者番号: 80393114

(2) 研究分担者

大野 欽司 (OHNO KINJI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 80397455

(3) 連携研究者

大口 健司 (OHGUCHI KENJI)
椋山女学園大学・生活科学部・准教授
研究者番号: 80359257

藤田 泰典 (FUJITA YASUNORI)

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 : 30515888

伊藤 智広 (ITOHI TOMOHIRO)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号 : 30435854

飯尾 明生 (IIO AKIO)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・発生障害学部・リサーチレジデント

研究者番号 : 80344349

伊藤 美佳子 (ITO MIKAKO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 60444402