

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500882

研究課題名(和文)健康長寿に向けた分子状水素の酸化ストレス防御機構解明

研究課題名(英文)Molecular hydrogen medicine: Possible mechanisms of hydrogen antioxidant activity

## 研究代表者

大澤 郁朗(Ohsawa, Ikuroh)

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・研究副部長

研究者番号：30343586

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文): 疾患の新規治療法として水素分子(H<sub>2</sub>)投与の可能性が数多く示されてきた。しかし、反応性の高い活性酸素種のみを無毒化するというH<sub>2</sub>の選択的還元作用のみで多様な疾患抑制効果を説明することは困難である。本研究では、H<sub>2</sub>存在下で培養した神経芽細胞SH-SY5Yが酸化ストレスにたいして抵抗性を獲得することを明らかにした。H<sub>2</sub>がミトコンドリアを活性化すると共に軽度の酸化ストレスが細胞に負荷され、Nrf2の活性化により抗酸化酵素類の発現が増加した。このような適応応答あるいはミトホルミシス効果が、水素水などを投与した場合の多様な疾患抑制効果に結びついているものと考えられる。

研究成果の概要(英文): Molecular hydrogen (H<sub>2</sub>) selectively reduces toxic reactive oxygen species including hydroxyl radical and ameliorates oxidative stress-induced injuries in vivo. However, precise mechanisms underlying the remarkable effect with a small amount of H<sub>2</sub> remain unclear. In the current study, we investigated the effect of H<sub>2</sub> on mitochondria in cultured neuroblastoma SH-SY5Y and found that H<sub>2</sub> enhanced mitochondrial membrane potential and cellular ATP accompanying a decrease in reduced glutathione and an increase in superoxide. Pretreatment of cells with H<sub>2</sub> suppressed the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death, whereas posttreatment did not. An increase in antioxidative enzymes of the pretreated cells indicated the possibility that a mild stress with H<sub>2</sub> induce an increased resistance to exacerbated oxidative stress. We propose here that H<sub>2</sub> functions both as a radical scavenger and "a mitohormetic effector" against oxidative stress.

研究分野：分子老化学・細胞生物学

キーワード：水素分子 酸化ストレス ミトコンドリア 培養細胞 抗がん剤副作用 マウスモデル

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会化の急速な進展により、高齢者医療・介護を支える研究の推進が焦眉の課題であり、健康長寿の為の疾患治療と予防に関する簡便で効果的な手法の開発が求められている。加齢に伴う多くの疾患の要因である酸化ストレスについて、これを効果的に軽減する方法に関する研究が進められている。我々は、水素分子 ( $H_2$ ) が生体内で活性酸素種を還元し酸化ストレスの軽減による疾患治療に応用できることを発見して、2007年に Nature Medicine 誌で発表した<sup>1)</sup>。

$H_2$  は生理的に不活な気体として扱われる。これは高等生物で  $H_2$  を酸化する酵素が見つかっていない為であり、水素細菌による代謝の研究を除けば生体への影響について論じられることは無かった。現時点で、生理的な抗酸化物質としての  $H_2$  の特徴は3つある。i) 細胞毒性の高いヒドロキシルラジカル ( $\bullet OH$ ) と選択的に反応：放射線化学の分野では水の放射線分解過程で生じる  $\bullet OH$  が  $H_2$  により還元されることが知られている<sup>2)</sup>。 $\bullet OH$  は生体内でも恒常的に生じているラジカルであるが、生体にはこれを効果的に無毒化する機構は無く、高度の細胞傷害性を示す。一方、他の活性酸素種/ラジカルであるスーパーオキシド、過酸化水素、一酸化窒素等については、酵素反応などにより無毒化するシステムが細胞内に存在するのみならず、これらはシグナル伝達や免疫機構において重要な役割を担っている。この為、必要以上の活性酸素種/ラジカル除去は副作用を伴う。しかし、 $H_2$  は  $\bullet OH$  などの反応性の高い活性酸素種/ラジカルのみと選択的に反応する為に安全性が高い。ii) 拡散速度の早さと透過性の高さ： $H_2$  は密度の小さな気体で拡散速度が非常に大きい為、細孔・薄膜等から容易に漏洩する。逆に、この性質によって水溶性、脂溶性を問わずに拡散することから生体内のどこへでも容易に到達可能で、細胞内の活性酸素/ラジカルの主要産生源であるミトコンドリアへも容易に到達する。この点も従来の生体物質と大きく異なる。iii) 生体新規性：ビタミン類等の抗酸化物質の大半は食品として常時摂取されている。一方、最軽量の気体である  $H_2$  はほとんど地表で検出されず、通常食品や医薬品に  $H_2$  が含まれることは無い。従って、供与される高濃度の  $H_2$  は生体にとって新規物質となる。

我々の発見以降、 $H_2$  の生理活性が多数報告された。このうち、脳、眼、心臓、肝臓等の虚血再灌流障害、臓器移植、放射線障害等については、水素ガスの吸引、 $H_2$  溶存生理食塩水の血中投与、移植臓器の  $H_2$  溶存保存液での保管、眼では  $H_2$  溶存点眼剤などを用いてそれぞれの障害が抑制されている<sup>3-7)</sup>。上記の  $H_2$  の特徴から、こうした作用は傷害部位で一過的に発生する大量の  $\bullet OH$  を一定濃度の  $H_2$  (およそ飽和の1%程度) が還元することで細胞傷害を抑制した結果と考えることがで

きる。一方、 $H_2$  を高濃度に溶存させた水(水素水)を飲ませることで、人における糖尿病の抑制<sup>8)</sup>、モデル動物における大動脈アテローム<sup>9)</sup>やアレルギーの抑制<sup>10)</sup>、さらにはパーキンソンモデル動物の顕著な治療効果<sup>11)</sup>が報告されている。しかし、こうした疾患での  $\bullet OH$  濃度は低く、また水素水として摂取した  $H_2$  は、飲料後30分程度で呼気として体外に排出されてしまう。この為、水素水の効果を  $\bullet OH$  の還元だけで説明するのは困難である。安価で容易に摂取することのできる  $H_2$  は、加齢に伴う神経変性疾患やメタボリックシンドロームの抑制に効果を発揮することが期待されている。しかし、 $H_2$  投与が最も効果的な疾患は何か、効果的な投与するにはどうすべきか、その答えを導く為の基礎となる  $H_2$  の作用機序解明が急務である。

## 2. 研究の目的

培養細胞で Fenton 反応により一過的に  $\bullet OH$  を発生させた場合、 $H_2$  は効果的に細胞死を抑制する<sup>1)</sup>。一方、反応性が低い過酸化水素による細胞死を  $H_2$  は抑制しない。ところが、我々は予め  $H_2$  存在下で培養した細胞が過酸化水素に対して抵抗性を示すことを発見した。1日間  $H_2$  存在下で培養した細胞ではミトコンドリア膜電位の上昇が認められ、呼吸活性が亢進されている可能性を示唆する結果が得られているが、同時にスーパーオキシドの産生が増大していた。これらの予備的知見から、 $H_2$  により僅かに増大した活性酸素種が酸化ストレス防御機構を誘導し、その結果、 $H_2$  存在下で培養した細胞が過酸化水素に対して抵抗性を獲得するというホルミシス効果が予想される。実際、ビタミンC欠乏老化促進マウスに水素水を飲ませた後に作製した脳スライスではスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)活性が上昇し<sup>12)</sup>、水素水をメタボリックシンドローム予備軍の被験者に投与した実験でも尿中のSOD活性の増加が認められ<sup>13)</sup>、*in vivo*でも  $H_2$  のホルミシス効果を示唆する報告が出ている。

そこで本研究では、細胞及び動物モデルを用いて  $H_2$  のホルミシス効果の有無を検証し、特に活性酸素種の主要産生源であるミトコンドリアに着目して、 $H_2$  が酸化ストレス防御機構を誘導するメカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

(1)  $H_2$  が酸化ストレス防御機構を誘導するメカニズムについての細胞を用いた研究

細胞培養法と活性酸素種/ラジカルによる細胞死の測定

動物モデルで中枢神経系における水素分子の効果が多数報告されていることから、ヒト神経芽細胞 SH-SY5Y を用いた。  $H_2$  存在下で細胞を培養する為に図1に示す水素実験システムを用意した。  $H_2$  濃度は溶存水素センサー(Unisense社)でモニターした。また、酸素の過不足や pH の影響を排除する為、 $O_2$

濃度（10%）と CO<sub>2</sub> 濃度（5%）は全実験条件で同一となるよう各種センサーでモニターして厳密にコントロールした。ミトコンドリア機能への影響が予想される為、培地はグルコース（Glc）を炭素源とする通常の10%FCS含有DMEM培地と、解糖系を抑制することでミトコンドリアへの依存性を高めるガラクトース（Gal）培地を使用した。生細胞の定量には MTT による比色法を用いた。

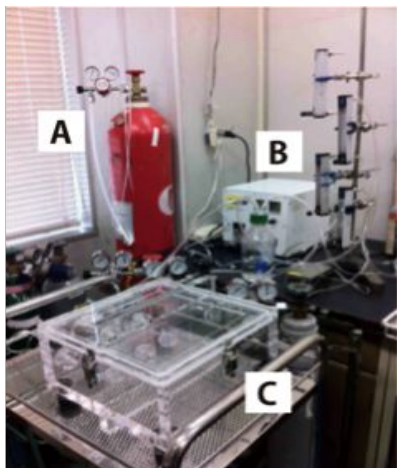


図1．ガス培養システム．A: 水素ボンベ，B: ガス混合器，C: 培養用アクリルボックス

#### 活性酸素種の定量

蛍光色素を用いて、プレートリーダーで測定。スーパーオキシドは MitoSOX、 $\bullet$ OH は HPF、過酸化水素は DCFDH を用いて定量した。

#### 酸化ストレス防御機構の定量

酸化型グルタチオンとグルタチオン総量（GSH）を測定し、総量と還元型 / 酸化型の比率について H<sub>2</sub> 添加による変化を定量した。Nrf2 の活性化については、細胞を抗 Nrf2 抗体で染色し核移行を観察した。次いで、TaqMan プローブを用いた qPCR 法により、酸化ストレス防御に関連する酵素群の H<sub>2</sub> による転写レベルの変化を定量した。測定する遺伝子は以下の通り：SOD1, SOD2, CAT, GCLC, GPX1, HMOX1, GSR, ACTB でノーマライズした。

#### ミトコンドリア活性とエネルギー代謝の測定

酸素電極を用いた呼吸活性の測定には高感度呼吸活性解析装置（OROBOROS 社）を用いて、細胞をジギトニン処理後に酸素消費を測定した。細胞の ATP はルシフェラーゼによる発光法で測定した。ミトコンドリア膜電位の測定には、膜電位感受性色素 JC-1 を用いた。

#### (2)動物モデルによる H<sub>2</sub> 作用機序の検討

新規抗がん剤として顕著な薬効を示す分子標的薬は一方で重篤な副作用が知られ、効果的抑制手段が医療現場で強く求められて

いる。ゲフィチニブは EGFR のチロシンキナーゼ選択的阻害剤で、非小細胞肺がんで顕著な治療効果を示すが、急性肺障害や間質性肺炎によって致死に至る副作用が知られる。そこで、ゲフィチニブ副作用モデルマウスに水素水を投与した。

#### ゲフィチニブ副作用モデルマウス

ナフタレン 200 mg/kg 体重を腹腔投与して肺で炎症を起こさせた C57BL/6 マウスにゲフィチニブを 200 mg/kg 体重で連日経口投与することで肺病変が進行するマウス副作用モデルを作製した。ナフタレン投与3日前から、飽和水素水またはコントロール水を自由摂取させた。

#### 水素水の効果判定法

1 週または 2 週後に全採血後、気管支肺胞洗浄液（BALF）を回収した。BALF 中の全細胞数を計測後、細胞種はギムザ染色で判定した。肺胞洗浄液中の炎症マーカー（CCL2, TNF, IL-6）は ELISA で測定した。肺は一部を固定し組織標本作製し、クララ細胞（CCSP）と炎症細胞の免疫染色を行った。

#### 4．研究成果

##### (1) 水素分子による細胞内酸化ストレス防御系の変化検証

SH-SY5Y 細胞を 50% の H<sub>2</sub> 存在下で 24 時間培養後、過酸化水素 0.1 又は 0.3 mM を添加してさらに 2 4 時間培養した。すると H<sub>2</sub> 非存在下で培養した場合に比して細胞死が抑制された（図 2B）。しかし、過酸化水素添加後に 50% の H<sub>2</sub> 存在下で培養しても細胞死を抑制することはできなかった（図 2A）。この H<sub>2</sub> 前処置による細胞死抑制効果は用量依存的で 5 % の H<sub>2</sub> でも有意な効果を示した（図 2C）。また、処置時間は 3 時間で有効であった（図 2D）。以上の結果は、H<sub>2</sub> が過酸化水素添加で増加する活性酸素種を還元することで細胞死を抑制すると考えるより、H<sub>2</sub> 存在下で培養することにより細胞に酸化ストレス防御能が備わる可能性を強く示唆している。

次いで、H<sub>2</sub> 前処置によるミトコンドリア機能変化を調べた。24 時間 50% の H<sub>2</sub> で前処置した細胞をミトコンドリア膜電位感受性色素 JC-1 で染色しミトコンドリア膜電位を計測したところ有意な上昇が認められた（図 3A）。さらに細胞あたりの ATP 量が増加していた（図 3B）。細胞あたりの state 3 における酸素消費を計測すると H<sub>2</sub> 前処置による消費速度の増加が認められた（図 3C）。このとき、ミトコンドリア DNA のコピー数は増加していないことを qPCR で確認している。また、H<sub>2</sub> 前処置によりグルタチオンの一過的な減少（図 3D）とスーパーオキシドの増加（図 3E）が認められた。さらに Nrf2 の核移行が認められたことから（図 3F）酸化ストレス関連酵素遺伝子の発現を定量的 PCR 法で確かめたところ、カタラーゼとグルタチオン還元酵素が有意に増加していた。これらの結果は、細胞が H<sub>2</sub> の前処置により酸化ストレス

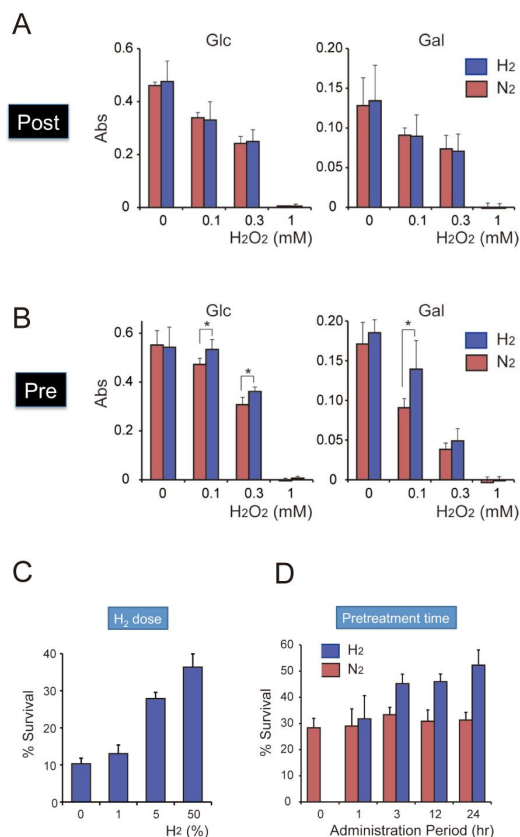


図2．水素分子の細胞死抑制効果．過酸化水素添加後に 50%の H<sub>2</sub> 存在下で培養 (A)．50%の H<sub>2</sub> 存在下で 2 4 時間培養後，過酸化水素を添加 (B)．2 4 時間 H<sub>2</sub> 前処置時の用量依存的性 (C)．50%の H<sub>2</sub> 存在下で前処置時間を比較 (D)．

に対する防御能を獲得している可能性を示している。以上の細胞実験の結果から、ミトコンドリアを介した適応応答（ミトホルミシス効果）が、水素水などを投与した場合の抗酸化効果に結びついているものと考えられる。

(2) ゲフィチニブ副作用モデルマウスでの水素水による肺障害抑制効果

コントロール水摂取群ではナフタレンとゲフィチニブの併用により急激な体重低下が観察され、1週間以内に12.5%のマウスが死亡した。水素水摂取群で死亡した個体は無く、体重低下も有意に抑制された。また、ナフタレンとゲフィチニブの併用によりBALF中の主に好中球・マクロファージからなる細胞数が顕著に増加し、肺組織では単球・マクロファージやT細胞などの増加が認められるが、水素水の摂取はこれを抑制した(図4A、B)。BALF中のケモカインCCL2とサイトカインIL-6量の増加も水素水は抑制した(図4C)。さらに興味深いことにゲフィチニブ及び水素水の両方がTNF-αの増加を抑制した。その抑制機構はまったく異なる物と予想され、水素分子の作用機序解明に向けて重要な知見である。

こうした動物モデルにおいても水素水の

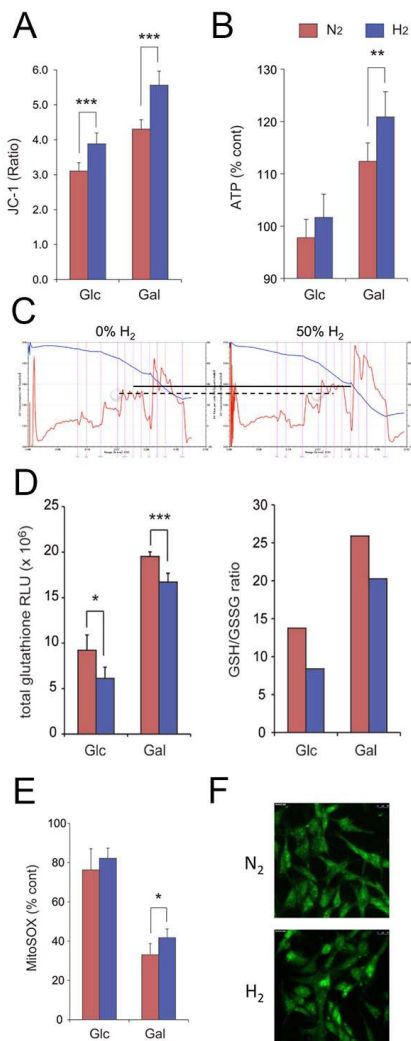


図3．2 4 時間 50%の H<sub>2</sub> で前処置した細胞での抗酸化酵素誘導・ミトコンドリア膜電位感受性色素 JC-1 染色による膜電位の計測 (A)．細胞あたりの ATP 量 (B)．酸素消費の計測 (C)．グルタチオンの一過的な減少 (D)とスーパーオキシドの増加 (E)．Nrf2 の核移行 (F)．

前投与が有効であるという予備的な結果を得ており、現在、水素水の飲用による Nrf2 経路の活性化と下流シグナルの変化を詳細に解析中である。

<引用文献>

Ohsawa I 他, Nat Med 13:688, 2007.  
 Elliot AJ, AECL-11073:COG-94-167, 1994.  
 Oharazawa H 他, Invest Ophthalmol Vis Sci 51:487, 2010.  
 Hayashida K 他, Biochem Biophys Res Commun 373:30, 2008.  
 Fukuda K 他, Biochem Biophys Res Commun 361:670, 2007.  
 Cardinal JS 他, Kidney Int 77:101, 2010.

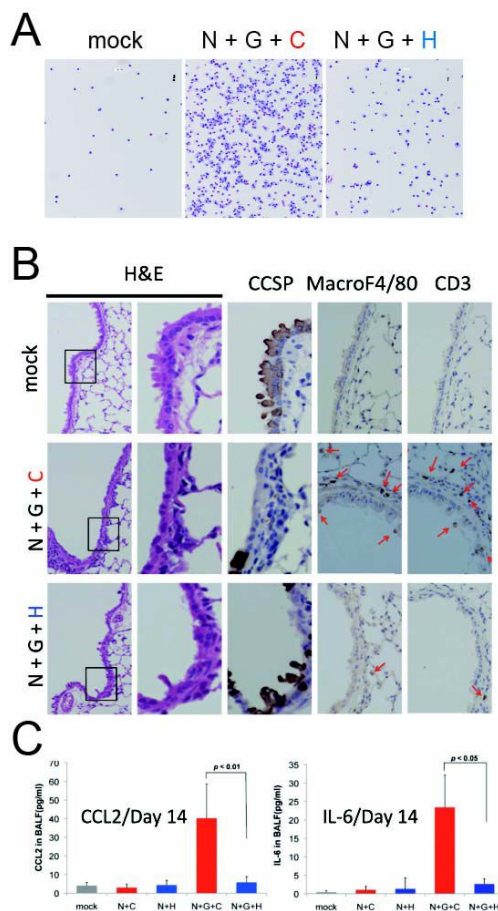


図4 . ゲフィチニブ副作用モデルマウス . N + G + C はコントロール水、N+G+H は水素水飲用群 . ナフタレン投与1週間後のBALFギムザ染色 (A) と肺組織 (B) . 2週間後のBALF中CCL2量とIL-6量 (C) .

Qian L 他, Free Radical Res 44:275, 2010.  
 Kajiyama S 他, Nutr Res 28:137, 2008.  
 Ohsawa I 他, Biochem Biophys Res Commun 377:1195, 2008 .  
 Itoh T 他 , Biochem Biophys Res Commun 389:651, 2009.  
 Fu Y 他, Neurosci lett 453:81, 2009.  
 Sato Y 他 , Biochem Biophys Res Commun 375:346, 2008.  
 Nakao A 他, J Clin Biochem Nutr 46:140, 2010.

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6件)

Nakata K, Yamashita N, Noda Y, Ohsawa I, Stimulation of human damaged sperm motility with hydrogen molecule, Med Gas Res、査

読有、5巻、2015、2 doi:10.1186/s13618-014-0023-x  
 Noda M, Fujita K, Ohsawa I, Ito M, Ohno K、Multiple Effects of Molecular Hydrogen and its Distinct Mechanism、J Neurol Disord、査読有、2巻、2014、189 doi: 10.4172/2329-6895.1000189  
 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巻、2013、6 doi: 10.1186/2045-9912-3-6  
大澤郁朗、水素分子の疾患予防・治療効果、日本透析医会雑誌、査読有、28巻、2013、261-267  
大澤郁朗、神経系における水素分子の抗酸化、抗炎症作用:研究の現状、Clinical Neuroscience、査読無、30巻、2012、1320-1321  
大澤郁朗、水素分子の生理作用と水素水による疾患防御、日本老年医学会雑誌、査読有、35巻、2012、680-688

[学会発表](計18件)

Maki Shibata, Kensi Koide, Mayumi Takahashi, Masumi Iketani, Hideo Kawaguchi, Ikuroh Ohsawa、Physiological isotope effects of deuterium、第5回分子状水素医学シンポジウム 2015年3月21~22日、名古屋  
 Masumi Iketani, Kozue Tonaki, Tetsuya Suzuki, Jumi Ohshiro, Yasuhiro Terasaki, Mayumi Takahashi, Hideo Kawaguchi, Seisuke Hattori, Ikuroh Ohsawa、Hydrogen water inhibits gefitinib-induced lung injury by anti-inflammatory effects、第5回分子状水素医学シンポジウム、2015年3月21~22日、名古屋  
大澤郁朗、水素分子による生体機能制御、第27回代用臓器再生医学研究会(招待講演)、2015年2月28日、札幌  
大澤郁朗、中田久美子、野田義博、村上弥生、水素分子のミトホルミシス効果と精子機能改善、第14回日本ミトコンドリア学会年会、2014年12月3~5日、福岡  
 中田久美子、山下直樹、大澤郁朗、水素分子処置によるヒト不動精子の運動性回復、第55回日本卵子学会、2014年5月17~18日、神戸  
 野田義博、中田久美子、倉本和直、遠藤玉夫、山下直樹、大澤郁朗、分子状水素は活

性酸素によるマウス精子前進性運動機能低下を抑制する、第55回日本卵子学会、2014年5月17～18日、神戸  
大澤郁朗、活性酸素障害の新たな防御法、第54回日本呼吸器学会(招待講演)、2014年4月25～27日、大阪  
寺崎泰弘、大澤郁朗、鈴木徹也、渡名喜梢、漆山博和、寺崎美佳、功刀しのぶ、福田悠、清水章、高濃度水素水によるゲフィチニブの急性肺傷害抑制、第103回日本病理学会総会、2014年4月24～26日、広島  
大澤郁朗、分子状水素による神経疾患の予防と治療、第10回認知症サプリメント研究会(招待講演)、2014年4月6日、東京  
小出賢志、村上弥生、高橋真由美、川口英夫、大澤郁朗、高濃度重水素含有水による炎症抑制効果の検討、第4回分子状水素医学シンポジウム、2014年2月1～2日、東京  
渡名喜梢、鈴木徹也、寺崎泰弘、村上弥生、高橋真由美、川口英夫、大澤郁朗、高濃度水素水はゲフィチニブの薬効を阻害することなく急性肺障害を抑制する、第4回分子状水素医学シンポジウム、2014年2月1～2日、東京  
Ohsawa I、 Overview on new medical gases: molecular hydrogen medicine for neuroprotection and slow aging、Neuro2013、2013.6.20-23、Kyoto  
大澤郁朗、Molecular hydrogen as a radioprotector: Possible mechanisms of hydrogen antioxidant activity、第90回日本生理学会大会(招待講演)、2013年3月27～29日、東京  
鈴木徹也、寺崎泰弘、川口英夫、大澤郁朗、水素水による抗がん剤ゲフィチニブの副作用抑制、第3回分子状水素医学シンポジウム、2013年2月9～10日、東京  
村上弥生、大澤郁朗、分子状水素によるNrf2を介した酸化ストレス抑制機構、第3回分子状水素医学シンポジウム、2013年2月9～10日、東京  
大澤郁朗、ガスメディエーターである水素分子の最新科学、第6回電解水透析研究会(招待講演)、2013年2月2日、東京  
大澤郁朗、村上弥生、水素分子による酸化ストレス防御の分子機構、第12回日本ミトコンドリア学会年会、2012年12月19～21日、筑波  
大澤郁朗、村上弥生、分子状水素による酸化ストレス抑制の分子機構、日本基礎老化学会第35回大会、2012年7月26～27日、船橋

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
[http://www.tmg Hig.jp/J\\_TMIG/kenkyu/team/seitaikankyoutou.html](http://www.tmg Hig.jp/J_TMIG/kenkyu/team/seitaikankyoutou.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大澤 郁朗 (OHSAWA, Ikuroh)  
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・研究副部長  
研究者番号：30343586

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：