

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：33910

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26870682

研究課題名(和文) 水素の経口投与を基盤とした非アルコール性脂肪肝炎の病態制御及び発癌の予防法の開発

研究課題名(英文) Molecular hydrogen control the disease state of nonalcoholic steatohepatitis and prevent cancer by modifying gene expression by influencing the epigenetic mechanism of histone methylation modification

研究代表者

祖父江 沙矢加 (SOBUE, Sayaka)

中部大学・臨床検査技術教育・実習センター・講師

研究者番号：50513347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は生活習慣病の一つとして近年注目される疾患であり、肥満や糖尿病・脂質異常症を背景に発症する。分子状水素は抗酸化剤としての作用に加えて抗炎症効果を示すことが明らかにされている。NASHモデルマウスにおいて肝臓癌の進展を水素により抑制可能であるか、また抑制可能な場合その分子機序について検証した。水素はNASH発症に至るsecond hitの炎症、酸化ストレスを制御するとともに、ヒストンメチル化修飾というエピジェネティックな機構に影響を与えて遺伝子発現を修飾し、同時にmtUPRを誘導することによりミトコンドリアを保護することで発癌に至る病態を軽減すると推察された。

研究成果の概要(英文)：Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is one of lifestyle-related diseases drawing more attention in recent years and develops in patients with diabetes and/or dyslipidemia based on obesity. Molecular hydrogen has been shown to exhibit anti-inflammatory effect as well as an antioxidative effect. Therefore, we investigated whether the progression of liver cancer in NASH model mice can be suppressed by molecular hydrogen. We found that molecular hydrogen controls second hit of inflammation and oxidative stress leading to the onset of NASH, as well as protecting the mitochondria by modifying gene expression by influencing the epigenetic mechanism of histone methylation modification, simultaneously inducing mtUPR.

研究分野：分子生物学

キーワード：水素

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は生活習慣病の一つとして近年注目される疾患であり、肥満や糖尿病・脂質異常症を背景に発症する。近年日本のみならず世界的に見ても患者数は急増しているが、NASH の決定的治療法は未だ確立されておらず、対策が急務となっている。現時点では酸化ストレスを軽減するための抗酸化療法が研究されつつある等、病態解析の知見に基づく試験的治療の試みが行われているが、こうした試験的治療が NASH 由来肝臓癌の発症を抑制できるかどうかの長期的臨床結果は未だ報告されていない。

2. 研究の目的

分子状水素は、活性酸素の中でヒドロキシルラジカルを選択的に消去する抗酸化剤として、生体への効果が証明された。その後の検討により抗酸化剤としての作用に加えて抗炎症効果を示すことが齧歯類を中心とした疾患モデル動物を用いた検討で明らかにされている。ヒトの病態に極めて近い NASH モデルマウスにおいて肝臓癌の進展を、水素の投与法を工夫した新規予防法により抑制可能であることを検証し、その分子機構を明らかにすることで、水素を取り入れた食餌療法の確立を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NASH および肝臓発症に対する水素の効果の検討
NASH モデルマウスに高脂肪食を投与し、通常環境下または水素環境下で飼育を行い経時的に観察した。NASH 時期および肝臓発症時期にそれぞれ解剖し、病理標本の作製、免疫組織化学染色および real-time PCR を実施した。

(2) DNA マイクロアレイを用いた定常状態、NASH 時期およびストレス環境下における水素投与の有無に伴う遺伝子発現の変化の網羅的解析
通常環境下または水素環境下で飼育した NASH モデルマウスおよび Balb/c マウスより肝臓を切除した。また F344 ラットに通常飼料または CDAA 食を投与し、それぞれ通常環境下または水素環境下で 3 週間飼育したのち肝臓を切除した。切除した肺または肝臓から RNA を抽出し DNA マイクロアレイで遺伝子発現を比較した。さらに Nakai et al.らが、ラットに水素水を投与して遺伝子発現を比較した結果(GSE26363)を GEO database よりダウンロードして同時に検討した。これらの DNA マイクロアレイの結果から、GSEA (BroadInstitute) を用いて、Molecular Signatures Database にある H: hallmark gene sets (50 gene sets) と H3K27 および H3K4 関連 (39 gene sets) で、遺伝子発現への水素の影響を検討した。

(3) 全身の臓器におけるヒストン H3K27 関連制御遺伝子の発現量と水素投与に伴う変

動

BALB/c マウスを水素水と 2%水素ガス投与または非水素投与環境で 3 週間飼育し、脳、肺、肝、腎を採取した。採取した各種臓器より RNA を抽出し、これを用いて real-time PCR を実施した。

(4) 水素投与に伴う Jmjd3 発現量の経時的変化

BALB/c マウスに生理食塩水または水素添加生理食塩水を腹腔内投与し、それぞれ通常環境下または水素添加空気環境下で飼育した。一定時間経過後解剖し、肝を採取した。採取した肝より RNA を抽出し、これを用いて real-time PCR を実施した。

(5) 水素投与に伴う H3K27 のメチル化状態およびミトコンドリア UPR 関連分子の変動

F344 ラットおよび BALB/c マウスを通常食を与えて 3 週間飼育した。その際、通常環境下にて通常水を投与または水素添加空気環境下にて水素水を投与した。解剖後肝臓を採取し、これを用いて免疫組織化学染色、ウェスタンブロットティング、real-time PCR を実施した。

4. 研究成果

水素環境下で飼育した NASH モデルマウスは通常環境下で飼育したマウスと比較して NASH 時期の炎症細胞の浸潤および肝臓の発症が抑えられている傾向にあった。続いて DNA マイクロアレイおよび GSEA の結果から、水素は生体内で広範な抗酸化ストレス関連分子を誘導することを確認した。水素はこれまでに Nrf2 を誘導し抗酸化作用を示すことが報告されている。興味深いことに本検討では Nrf2 の下流で制御される遺伝子がすべて誘導されているわけではないことが観察され、他の分子機構の存在が示唆された。そこでさらに GSEA 解析を進めたところ、水素は多岐にわたるシグナル関連遺伝子群の発現を修飾すると共に、ヒストン H3K27 下流で制御される遺伝子群の発現を亢進させることが明らかになった (図 1)。

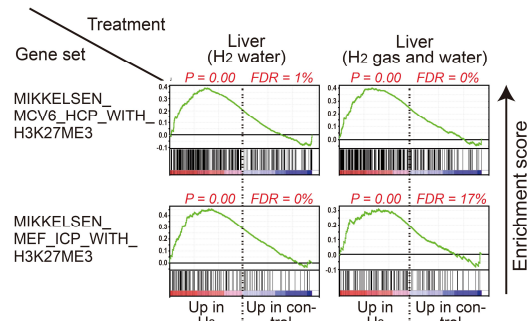


図 1 水素投与に伴うヒストン H3K27 のメチル化関連遺伝子群の発現変動

ヒストン H3K27 の下流で制御される遺伝子が水素投与により変動することを確認するために real-time PCR により検討したところ、水素はマウスの全身の臓器でこの遺伝子の

発現を増加させることが確認された。
また、水素を投与されたラットまたはマウスの肝臓を用いた組織染色およびウエスタンブロット法により、実際に H3K27 のメチル化状態が水素投与により変化することを観察した。さらに、水素がヒストン H3K27 の脱メチル化酵素を誘導し、同時に mitochondrial unfolded protein response (mtUPR) 関連分子を誘導することも確認した。2016 年に Merkwirth らによりミトコンドリア障害がヒストンメチル化修飾を引き起こし、mtUPR を誘導することが報告されているが、水素は同様の機構で mtUPR を誘導すると推察された。これらを総合すると、水素は NASH 発症に至る second hit の炎症、酸化ストレスを制御するとともに、ヒストンメチル化修飾というエピジェネティックな機構に影響を与えて遺伝子発現を修飾し、同時に mtUPR を誘導することによりミトコンドリアを保護することで発癌に至る病態を軽減すると推察された。

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)

Nishiwaki H, Ito M, Negishi S, Sobue S, Ichihara M, Ohno K.

Molecular hydrogen upregulates heat shock response and collagen biosynthesis, and downregulates cell cycles: meta-analyses of gene expression profiles. *Free Radic Res.* 査読有、Vol.52、No.4、2018、434-445
DOI: 10.1080/10715762.2018.1439166

Sobue S, Inoue C, Hori F, Qiao S, Murate T, Ichihara M.

Molecular hydrogen modulates gene expression via histone modification and induces the mitochondrial unfolded protein response. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有、Vol.493、No.1、2017、318-324
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.09.024

Sobue S, Sakata K, Sekijima Y, Qiao S, Murate T, Ichihara M.

Characterization of gene expression profiling of mouse tissues obtained during the postmortem interval. *Exp Mol Pathol.* 査読有、Vol.100、No.3、2016、482-92
DOI: 10.1016/j.yexmp.2016.05.007

祖父江沙矢加、市原正智

分子状水素によるマウス肝臓における遺伝子発現変化の解析、中部大学生命健康科学研究所紀要、査読無、Vol.12、2016、

38-41

Ichihara M, Sobue S, Ito M, Ito M, Hirayama M, Ohno K.

Beneficial biological effects and the underlying mechanisms of molecular hydrogen - comprehensive review of 321 original articles.

Med Gas Res. 査読有、Vol.5、2015、12
DOI: 10.1186/s13618-015-0035-1

Sobue S, Yamai K, Ito M, Ohno K, Ito M, Iwamoto T, Qiao S, Ohkuwa T, Ichihara M.

Simultaneous oral and inhalational intake of molecular hydrogen additively suppresses signaling pathways in rodents.

Mol Cell Biochem. 査読有、Vol.403、No.1-2、2015、231-241
DOI: 10.1007/s11010-015-2353-y

[学会発表](計7件)

祖父江沙矢加、井上千聖、堀文子、村手隆、市原正智

分子状水素は H3K27 のメチル化状態を変化させ遺伝子発現を修飾し mtUPR を誘導する、第 40 回日本分子生物学会年会、2017 年(ポスター発表)

祖父江沙矢加、井上千聖、堀文子、西沢祐治、村手隆、市原正智

分子状水素はエピジェネティックに遺伝子発現を修飾するとともに mtUPR を誘導し生体を保護する、第 7 回日本分子状水素医学生物学会大会、2017 年(口頭発表)

Sayaka Sobue, Chisato Inoue, Fumiko Hori, Takashi Murate, Masatoshi Ichihara

4. Molecular hydrogen activates the mitochondrial unfolded protein response via epigenetic histone modification and ameliorates ultraviolet light-induced damage in *Caenorhabditis elegans*、8th World Congress on Targeting Mitochondria 2017、Berlin, Germany、2017 年(ポスター発表)

祖父江沙矢加、岡本陽、安形則雄、市原正智

分子状水素による肝障害軽減作用の背景にあるミトコンドリア保護効果に関与する分子機構の解析、第 89 回日本生化学会大会、2016 年(ポスター発表)

Sayaka Sobue, Masatoshi Ichihara

Development of effective method for

preventing life environment
factor-induced diseases using
molecular hydrogen, ICITE for SD-2015、
2015年（ポスター発表）

Sayaka Sobue, Chisato Inoue, Fumiko
Hori, Mikako Ito, Kinji Ohno,
Masatoshi Ichihara

Molecular hydrogen is a novel
antioxidant to reduce oxidative
stress and attenuate disease
progression through modification of
cell signaling and gene expressions、
15th International Conference on
Oxidative Stress Reduction, Redox
Homeostasis &Antioxidants、Paris,
France、2015年（ポスター発表）

祖父江沙矢加、井上千聖、伊藤美佳子、
大野欽司、伊藤雅史、市原正智
水素ガスおよび水素水の併用投与が細
胞内シグナル伝達に与える影響の検討、
第5回分子状水素医学シンポジウム、
2015年（口頭発表）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

祖父江 沙矢加 (SOBUE, Sayaka)

中部大学・臨床検査技術教育・実習センタ
ー・講師

研究者番号：50513347