

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11日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590873

研究課題名（和文）水素分子による抗酸化力を利用した肺疾患の新しい治療と予防

研究課題名（英文）

Protection by hydrogen therapy against oxidative stress induced various lung diseases.

研究代表者

寺崎泰弘（TERASAKI YASUHIRO）

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50332870

研究成果の概要（和文）：

多様な呼吸器疾患の病態には酸化ストレス関与が強く示唆されているが、水素分子(H₂)の抗酸化作用はヒドロキシラジカル(・OH)などの酸化力が強い活性酸素種への選択的還元性と高い生体膜透過性を特徴としている。今回・OHが主な傷害活性酸素種である放射線肺障害やイレッサ薬剤性肺障害モデルとなる培養細胞、マウスを用いたモデル実験においてH₂処理はいずれも抗酸化、傷害抑制効果をもたらした。副作用の少ない独創的な抗酸化剤としてその臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：

Various lung injuries such as irradiation or anticancer drug induced injuries are reportedly initiated and sustained by oxidative stress (reactive oxygen species:ROS), especially hydroxyl radicals (・OH), which are the primary cause of the damage. As yet, no ideal ROS scavenge therapy has been established. Because H₂ was recently reported as an efficient antioxidant that diffuses rapidly across cell membranes, selectively reduces ・OH, and suppresses oxidative stress-induced injury with no known toxicity, we studied the possibility that H₂ could protect against irradiation or anticancer drug induced lung damage. We show here that H₂ scavenged ・OH and protected against apoptotic damage related to oxidative stress induced by irradiation and anticancer drug in lung epithelial cells and in lungs of mice. H₂ treatment will thus be valuable for protection against oxidative stress induced various lung diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：酸化ストレス・水素還元力・呼吸器疾患

1. 研究開始当初の背景
水素分子(H₂)は還元物質として、燃焼により

酸素と反応して水になる。H₂は最小分子で電

子分布に偏りが無い為、両親媒性で拡散速度が速く、細胞膜を通過して核やミトコンドリアへ容易に到達できる。我々のグループはH₂のこの還元力(抗酸化力)や拡散力に着目し、H₂は生理的機能も担う酸化力が弱いO₂⁻・やH₂O₂は還元せず、hydroxyl radicals (・OH)やパーオキシナイトライト(ONOO-)などの酸化力が強い活性酸素種(ROS)を選択的に還元することを無細胞系や培養細胞系で示した。さらにH₂が細胞死を容量依存的に抑制する事も報告した。以降、虚血再灌流障害(脳、心、肝、網膜など)、薬剤性障害(脳、腎など)など様々な酸化ストレス障害動物モデルでH₂による障害抑制効果を示され、副作用の少ないこれまでにないタイプの独創的な抗酸化剤としてその臨床応用が期待されている。

2. 研究の目的

多様な呼吸器疾患の病態には酸化ストレスの関与が強く示唆されており、その効果的な除去は疾患治療における新たな手段となる。今回、H₂独特の抗酸化作用に着目し、呼吸器疾患領域での臨床治療応用を念頭において、特にOHが主な傷害活性酸素種である放射線肺障害や薬剤性肺炎として問題となっているゲフィチニブ副作用肺障害について動物モデル、培養細胞モデルを用いてH₂処理による抗酸化効果と、これに伴う傷害抑制効果の解析研究を立案した。

3. 研究の方法

(1) 放射線肺障害モデル

①放射線照射によりPBSや培地に生じるROS(・OH)の測定をElectron spin resonance (ESR)にて測定し、H₂-rich条件での違いを解析した。②放射線照射した培養肺上皮細胞内のROSとH₂処理による効果をFluorescent indicator (HPF)の強度の測定にて解析した。

③放射線照射した肺上皮細胞の傷害とH₂処理による効果を8-OHdG、4-HNE、active

caspase3、Baxの各抗体による免疫蛍光染色とWestern blot法にて評価した。④放射線肺障害C57BL/6Jマウスモデル作製し、照射中3% H₂の吸入および照射後H₂水自由飲水させて障害抑制効果を解析した。急性期は肺切片の8-OHdG免疫染色とTUNEL染色や凍結肺組織中のMDA、Bax、TGF-β1のWestern blot法による発現量を解析した。慢性期はMicro-computed tomography (micro-CT)で胸部全体の障害状況を観察し、HE染色、EMG染色でAshcroft scoreを測定し、Type III collagenの免疫染色を行った。

(2) 薬剤性肺障害モデル

①ナフタレン・ゲフィチニブ気道障害モデル作製した。マウス(C57BL/6J)を用い、Day0でナフタレンコーン油(記号:C0)を200mg/kgで腹腔内に投与した。ゲフィチニブ(記号:G)はゾンデを用いて、同様にDay0からDay6までの1週間、200mg/kgで経口投与し、副作用モデルマウスを作製した。この間、H₂水(記号:H)もしくはコントロール水(記号:C)をDay0から1週間自由摂取させ、(1)コーン油のみ(oil)、(2)ナフタレン+脱気水(N+C)、(3)ナフタレン+H₂水(N+H)、(4)ナフタレン+脱気水+ゲフィチニブ(N+C+G)、(5)ナフタレン+H₂水+ゲフィチニブ(N+H+G)の5群に分けて検証を行った。

② ナフタレン・ゲフィチニブ気道障害マウスモデルの評価。 Day0、Day4、Day7における体重の推移、気管支肺胞洗浄液(BALF)中の細胞数計測、病理学的検索としてBALFのギムザ染色、肺組織のHE染色とクララ細胞(CCSP)の免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) 放射線肺障害について

実際に放射線によってPBS内に・OHが産生されH₂によってその産生が抑制される事をESR

解析より直接確認した (図 1A-D)。さらに培養肺上皮細胞 A549 内においても同様に放射線によって産生される・OH が H₂ によって抑制する事を HPF signals 解析より確認した。また抗 8-OHdG 及び 4HNE 免疫染色から H₂ は A549 細胞において放射線による酸化ストレスを軽減し、Active caspase3 と Bax の Immunoblot 解析 (図 1E-G) , Bax translocation 解析、PI と Hoechst の 2 重蛍光発色解析から水素は放射線によるアポトーシスを介した細胞死を軽減した。以上の結果から培養肺上皮細胞 (in vitro) への放射線照射で生じる・OH などの酸化ストレスによるアポトーシスに対して H₂ 治療に抑制効果があることを示された。

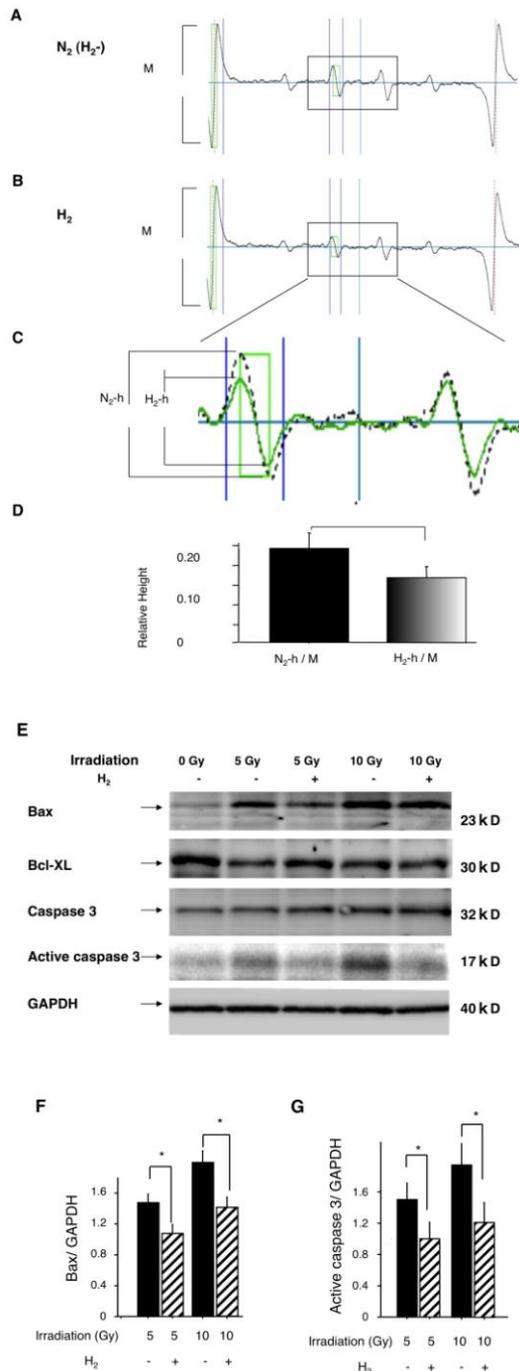
放射線肺障害は急性肺障害期とその後徐々に起こる慢性肺傷害期という時相の特徴がある。これには照射時に生じる ROS とその後持続して生じる局所の NADPH oxidase、xanthine oxidase、nitric oxide synthase (NOS) や mitochondrial respiratory chain の機能障害などから生じる ROS が関連している。先の in vitro のデータで、放射線照射により生じる酸化ストレスを主因とするアポトーシス抑制作用が H₂ 治療で認められたが、その抑制効果は不完全であった。そこでマウス肺放射線障害治療モデルでは、照射時に発生する ROS に対する H₂ 吸入に加え、その後持続して生じる局所 ROS の抑制を目的に H₂ 水飲水の治療を加えた。放射線照射後 7 日以内の急性肺障害期において、8-OHdG や TUNEL 染色、MDA、Bax や TGF-β1 の発現解析にて放射線照射で生じる肺内の酸化ストレスやアポトーシス所見は H₂ 治療で軽減された。これらは主に照射時などに急激に発生する・OH などによる傷害性の高い ROS の除去効果に起因するものと考えられる。さらに後期には肺線維化の抑制がみられたが、これは前期の抑制効果に加え後期における ROS (H₂O₂、

O₂-・、ONOO-など) の局所持続的発生に対する H₂ 水飲水による抗酸化効果が寄与した可能性があげられた。実際にはマウスの H₂ 水飲水実験では飲水 3 分後に酸化ストレスを軽減する報告があるものの、H₂ は短時間で低濃度になる為、H₂ 水飲水の効果は・OH の消去以外のいくつかの機序が考えられる。例えば、肺や唾液腺では放射線照射で持続して生じる局所の ONOO-発生の報告があるので、H₂ 水は後期に生じる ONOO-を軽減した可能性がある。また H₂ 水飲水では SOD 活性が増加する報告があり、放射線肺障害として後期に生じる可能性ある局所の H₂O₂ や O₂-・の抑制に影響した可能性などが挙げられる。

Free radical scavengers による放射線肺障害の抑制報告が数多くあるが、効果、毒性、耐性、選択性などから、臨床的に有効な理想的な放射線障害防御剤は見いだされていない。H₂ は生理的機能も担う酸化力が弱い O₂-・や H₂O₂ を還元せず、・OH や ONOO-などの強い活性酸素種を選択的に還元するので生理機能に大きな影響を与えない事が想定され、実際、潜水病でヒトにも大きな問題はなく使用されている。また現在までの動物実験で明らかかな問題となるような副作用は報告されていない。このように H₂ 治療は放射線による肺障害において副作用のない治療として極めて有望である。

(2) ゲフィチニブ副作用について

上皮増殖因子受容体 (EGFR) とそのリガンドは傷害上皮の再生および種々の上皮系腫瘍増殖に重要な役割を果たしている。肺がん治療薬である EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) ゲフィチニブは EGFR 変異を伴う非小細胞肺癌に対して効果的だが、しばしば重篤な肺傷害を来し、びまん性肺胞傷害 (DAD) や急性肺傷害 (ALI) の病理像を呈する。図 1



年齢、喫煙歴、慢性間質性肺炎合併などが増悪させる危険因子として指摘されている。

気道の障害と肺胞の障害、機能低下との関係の詳細ははまだ不明な部分が多いが、例えば細気管支上皮の傷害と修復の不全が肺胞の障害、機能低下をひき起こすと想定されている。肺局所の幹細胞、前駆細胞として細気管支に存在するクララ細胞、気道-肺胞境界

部に存在する bronchio alveolar stem cell などの傷害が考えられているが、幹細胞の異常が正常な修復を阻害し肺損傷をさらに誘導するとも考えられている。

今回、ナフタレン単独およびナフタレン・ゲフィチニブ副作用モデルマウスで1週間内に体重低下 (図 2A) や BALF 中の細胞数の増加 (図 2B, C)、肺組織のクララ細胞の減少、周囲炎症細胞浸潤がみられた。マウスへのゲフィチニブ単独投与だけでは大きな病変は観察されなかった (図 2A-C)。このようにナフタレン気道傷害マウスモデルにゲフィチニブを投与するモデルは、細気管支上皮の急性肺損傷の増悪を認めたが、このことは加齢、喫煙歴や慢性間質性肺炎の合併など細気管支を含めた上皮傷害を背景にもつ非小細胞肺癌患者にゲフィチニブによる急性肺損傷が発症しやすいことに通じるため、臨床的に非常に重要な障害モデルであると考えられた。

H_2 水投与ではナフタレン単独でも体重低下や BALF 中の細胞数の増加の抑制傾向があった (図 2A-C)。ナフタレンによるクララ細胞の障害は酸化ストレスによる機序の報告があり、特にクララ細胞に特異的な CYP2F2 の酸化反応によりナフタレンは選択的にエポキシ化され、このエポキシド (1R, 2S-naphthalene oxide) が自殺基質となりクララ細胞のアポトーシスを起こす事が報告されている。クララ細胞は phospholipase A2 など炎症性サイトカインの産生や線維芽細胞の遊走を抑制する効果があるクララ細胞分泌蛋白 (Clara cell secretory protein:CCSP) をはじめ、サーファクタント蛋白 (surfactant protein: SP-A, B, D) やプロテアーゼインヒビターである secretory leukoprotease inhibitor (SLPI) や elafin などの分泌能を持っている。また肺内で最も

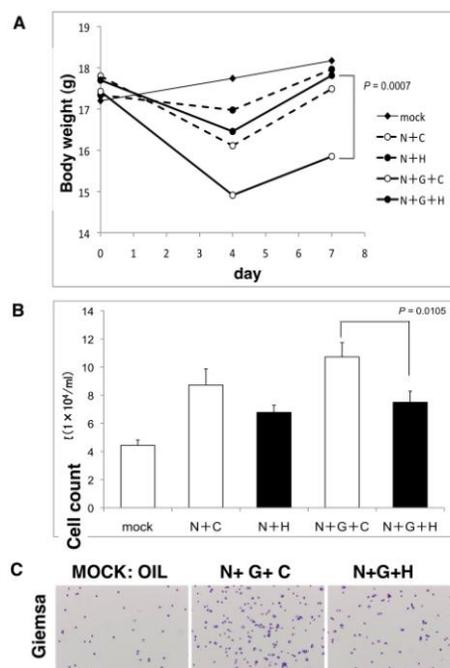
多種の cytochrome P-450 monooxygenase (CYP) 活性を持ち、末梢気道傷害時に気道上皮前駆細胞となると考えられており、代謝や傷害を含め末梢気道を中心とした肺の多彩な病態に重要な役割を果たすと考えられている。H₂水の今回の障害抑制効果はナフタレンによる酸化ストレス障害の抑制によるクララ細胞障害と付随する炎症の抑制の影響が考えられる。

ナフタレン単独よりナフタレン・ゲフィチニブ副作用モデルマウスはさらに障害が強い結果であったが (図 2A-C)、これは上皮増殖因子受容体 (EGFR) とそのリガンドが傷害上皮の再生に重要な為、末梢気道傷害時に気道上皮の前駆細胞として重要なクララ細胞を中心とした上皮再生を抑制した影響が挙げられる。このナフタレンとゲフィチニブの併用による顕著な体重低下、BALF 中細胞数の顕著な増加、さらには死亡率の上昇のいずれも水素治療が有意に抑制した (図 2A-C)。肺組織でもクララ細胞の減少、周囲炎症細胞浸潤が抑制されていた。マウスへのゲフィチニブ単独投与で大きな病変は観察されなかった為、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤としてのゲフィチニブの作用効果を考慮するとナフタレンでのクララ細胞障害と付随する炎症の酸化ストレスに対する H₂水の抗酸化効果が、よりゲフィチニブによる再生障害でより顕著化した炎症、障害所見に対してさらに明確化した可能性があげられる。また近年ゲフィチニブによる培養肺上皮細胞での HSP70 発現抑制作用が報告されており、これに伴って増大する酸化ストレスと炎症の増強に H₂が作用した可能性もある。

今後、酸化ストレスと炎症病態以外にもゲフィチニブの肺上皮における EGFR や HSP70 に対する作用やその抗がん作用自身に対する H₂の影響などを解析し、臨床応用への可能性

を更に検討する。

図 2



以上、水素分子 (H₂) 治療により放射線肺障害やゲフィチニブ肺障害が抑制された。副作用のない治療薬としての臨床応用の可能性が示された。現在マウス関節リウマチ肺モデルを使用した慢性肺線維症モデルへ効果も検討中であり、急性モデルと併せて臨床応用の可能性について研究展開予定である。

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] (計 6 件)

① 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* 30, 1320-1321 (2012) 査読無し

② 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* 35, 680-688 (2012) 査読あり

③ Terasaki Y, Ohsawa I, Terasaki M, Takahashi M, Kunugi S, Dedong K, Urushiyama H, Amenomori S, Kaneko-Togashi M, Kuwahara N, Ishikawa A, Kamimura N, Ohta S, Fukuda Y. Hydrogen therapy attenuates irradiation-induced lung damage by reducing oxidative stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 査読有り、Oct;301(4):L415-26. 2011 4.

④Kamimura, 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*. 19, 1396-1403 (2011) 査読あり

⑤大澤郁朗 水素分子医学の現状と展望. 基礎老化研究 35, 1-7 (2011) 査読あり

⑥Oharazawa, H., Igarashi, T., Yokota, T., Fujii, H., Suzuki, H., Machide, M., Takahashi, H., Ohta, S., and Ohsawa, I. Rapid Diffusion of Hydrogen Protects the Retina: Administration to the Eye of Hydrogen-Containing Saline in Retinal Ischemia-Reperfusion Injury. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 487-492. (2010). 査読あり

〔学会発表〕(計13件)

① 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. 東京、2013.3.27-29

②Suzuki T, Hideo Kawaguchi H, Ohsawa I: Control by the hydrogen water of pulmonary damage by antineoplastic drug gefitinib. 国際シンポジウム「水・海洋・地球環境—俯瞰的に考えるための知的体験」. 群馬県板倉&東京、2013.3.16-19

③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 2013.02、9-10 東京

④ 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. 東京、2013.2.9-10

⑤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. 東京、2013.2.2

⑥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. 筑波、2012.12.19-21

⑦大澤郁朗: 眼科領域における水素水の可能性. 第6回眼抗加齢医学研究会. 東京、2012.9.16

⑧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. 船橋、2012.7.26-27

⑨Ohsawa I, Murakami Y, Aoki S, Tanaka M: Molecular Hydrogen Medicine: Possible Mechanisms of Hydrogen Antioxidant Activity. Annual Conference of the Korean Society for Gerontology, the 12th Korea-Japan Joint symposia. Osong, Republic of Korea, 2012.6.14-15

⑩大澤郁朗、寺崎泰弘、村上弥生: 分子状水

素による放射線障害抑制とその分子機構. 第2回分子状水素医学シンポジウム, 2012.02 (東京)

⑫寺崎泰弘、寺崎美佳、漆山博和、雨森俊介、福田悠 抗酸化力を利用した水素分子治療による放射線肺障害の抑制 日本病理学会総会, 2011,04 (横浜)

⑬Terasaki Y, Ohsawa I, Terasaki M, Kang D, Kuwahara N, Ishikawa, A, Takahashi M, Kunugi S, Fukuda Y. Hydrogen therapy attenuates radiation-induced pulmonary injury in C57/B16 mice through reducing oxidative stress. ATS International Conference (New Orleans, USA), 2010.05.

〔図書〕(計1件)

①寺崎泰弘、鈴木徹也、大澤郁朗、漆山博和、寺崎美佳、高橋美紀子、功刀しのぶ、石川吾利美、桑原尚美、福田悠 抗酸化力を利用した水素分子治療による肺障害の抑制と応用 びまん性肺疾患に関する調査研究 平成24年度研究報告書 平成25年3月 P.335-P.344

6. 研究組織

(1) 研究代表者)

寺崎泰弘 (TERASAKI YASUHIRO)
日本医科大学、医学部、准教授
研究者番号: 50332870

(2) 研究分担者

大澤郁朗 (OHSAWA IKURO)
日本医科大学、老人病研究所、教授
研究者番号: 30343586

福田悠 (FUKUDA YUH)
日本医科大学、大学院医学研究科、教授
研究者番号: 60097037

寺崎美佳 (TERASAKI MIKA)
日本医科大学、医学部、助教
研究者番号: 50372785