

令和元年5月30日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01839

研究課題名(和文) 脂質ラジカル連鎖反応への水素分子の関与：水素の抗炎症作用メカニズムの解明に向けて

研究課題名(英文) The effect of hydrogen molecules in lipid radical chain reaction: For elucidation of the anti-inflammatory mechanism of hydrogen

研究代表者

西槇 貴代美 (Nishimaki, Kiyomi)

日本医科大学・先端医学研究所・マネジメントサポート・スタッフ

研究者番号：00465345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：水素分子は、抗炎症作用、抗アレルギー作用、代謝促進作用、細胞死抑制作用などの多彩な効果を有する。我々はこれまでの研究で、これらの多彩な効果は水素分子が様々な遺伝子発現を制御することで生じることを報告した。生体膜脂質は、酸化されると遺伝子発現制御を行う様々なメディエーターを生じる。本研究ではこの生体膜脂質に着目し、水素分子が炎症の際の細胞膜脂質ラジカル連鎖反応に介入し、脂質メディエーターを改変することで炎症に関わる遺伝子発現を制御することを明らかにした。また我々が開発した酸化ストレスモニタリングマウスを用いて、*ex vivo*で水素分子の抗炎症作用を解析する実験系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水素研究は、世界中の幅広い領域で進められ、この10年で水素の医療への応用研究が精力的に行われるまでに なった。我々は、ApoE4を保持する高齢者において1年間の水素水引用で、MCIの低下が優位に抑制されることを報告した(Nishimaki, K., 他, *Current Alzheimer Research.*, 2018)。水素予防医学の発展は、健康寿命を延ばすことにつながり、超高齢化社会を迎える我が国において、その社会的意義は大きい。さらに水素分子の遺伝子制御メカニズムの一端が明らかになったことで、今後の水素医療の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Hydrogen molecule have various effects such as anti-inflammatory, anti-allergic, and anti-cell death, as well as regulation of energy metabolism. We have reported that hydrogen molecule regulates various signal transduction pathways and the expression of many genes. In this study we focus on biomembrane lipids, which are oxidized to produce various mediators that regulate gene expression. We found that hydrogen molecules intervene in cell membrane lipid radical chain reaction during inflammation and modify gene mediators to regulate gene expression involved in inflammation. Furthermore, we investigate the influence of hydrogen molecule on spleen cells by using acute inflammation model mice. We also established an experimental system to analyze the anti-inflammatory effect of hydrogen molecule *ex vivo* using oxidative-stress monitoring mice.

研究分野：健康科学

キーワード：水素 免疫細胞 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、2007年に世界で初めて水素分子の優れた抗酸化作用と細胞死抑制作用を報告した(Ohsawa, Nishimaki, 他, *Nat. Med.*, 13, 688, 2007)。その特徴は、水素分子が毒性の高い活性酸素種のみを選択的に除去し、生理活性を有する活性酸素種を除去しない点であり、他の抗酸化剤とは大きく異なる。我々は様々な疾患モデル動物を用いて、酸化ストレスに起因する急性炎症性疾患(脳梗塞モデル、肝臓虚血再還流障害、心臓虚血再還流障害)慢性炎症性疾患(動脈硬化モデル、糖尿病モデル、アルツハイマー病モデル)への水素分子の効果を明らかにしてきた。水素研究は他のグループにおいても幅広い領域で活発に進められ、この10年で水素の医療への応用研究が精力的に行われるまでになった。水素分子は抗酸化作用をだけでなく抗炎症作用、抗アレルギー作用、代謝促進作用、細胞死抑制作用などの多彩な効果を有する。これらの多彩な効果は、水素分子が様々な遺伝子発現を制御することで生じるが、その遺伝子制御メカニズムは不明のままであった。我々は酸化されると様々な脂質メディエーターが生じる生体膜脂質に着目し、これまでに以下のことを明らかにした。水素分子は水溶液よりも脂質により溶けやすく、さらに不飽和脂肪酸を含む脂質からは相対的に離れにくい。水素分子が直接反応する部位が細胞膜脂質であることが示唆された。試験管内で空気酸化させた脂質メディエーターを培養細胞に作用させると、細胞内情報伝達を担うカルシウムを細胞内に流入させた。低濃度の水素存在下で空気酸化させた脂質メディエーターは、カルシウム流入効果が減少し、下流の遺伝子発現が異なった。特に転写因子であるNFAT(nuclear factor of activated T cells)の活性が低下し、様々な遺伝子発現を制御した。細胞膜の脂質酸化を誘導する薬剤によりフリーラジカル連鎖反応を人為的に生じさせた培養細胞では、カルシウムの流入とそれに伴うNFATの活性化が見られた。低濃度の水素分子下では、カルシウムの流入とNFATの活性化が抑制された。以上の結果より、本研究課題である水素分子の抗炎症作用のメカニズムの一端として、水素分子が炎症の際の細胞膜脂質ラジカル連鎖反応に介入し、脂質メディエーターを改変することで炎症に関わる遺伝子発現を制御するという遺伝子制御メカニズムを提唱した。(Iuchi, Nishimaki, 他, *Scientific Reports* 1605, 49-58, 2015)

## 2. 研究の目的

個体レベルで水素分子のフリーラジカル連鎖反応への関与を証明する。また、水素分子が生体内で直接作用する部位は、生体内免疫細胞の細胞膜脂質であることが予想される。そこで免疫細胞に焦点を当て、水素分子の抗酸化作用、抗炎症作用を直接検出できる実験系を構築する。

## 3. 研究の方法

個体レベルでの水素分子のフリーラジカル連鎖反応への関与：

C57BL/6 マウスに酵母細胞壁抽出物であるザイモサン(15mg/kg)を腹腔内投与して、急性炎症を誘導する。水素分子は、2%水素ガス Box で吸入させる。水素ガス投与30分後に転写因子NFAT上流のカルシニューリンの阻害剤であるシクロスポリンA(10mg/kg)を腹腔内投与し、さらに30分後にザイモサンを投与、1時間後に肝臓を採取し、RT-PCRによる遺伝子発現を調べる。(fig, a)

## 水素分子の免疫細胞への影響

C57BL/6 マウスへの水素分子の投与は、体内で水素ガスを発生する水素化マグネシウム (9mg/kg) と、水素分子を発生しない水酸化マグネシウム (9mg/kg) を経口投与する。抗原刺激としてザイモサン (0.5g/kg) を腹腔内投与して、免疫細胞を活性化させる。6 時間後に脾臓から免疫細胞を単離し、フローサイトメーターで解析する。

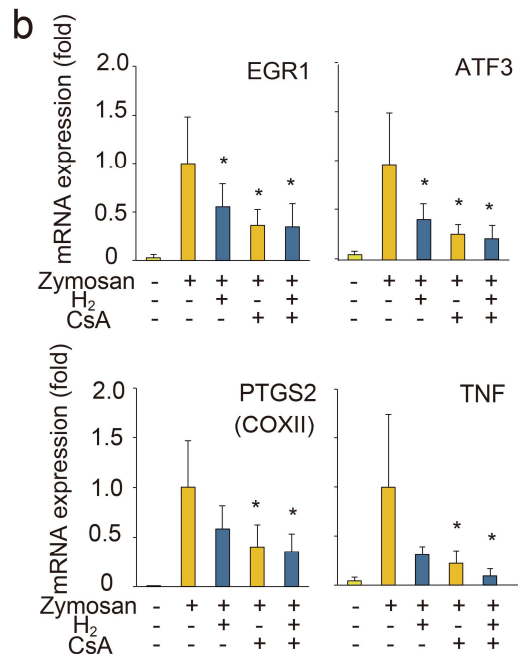
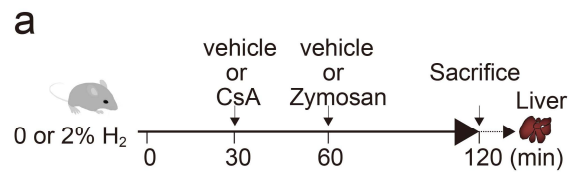
## 免疫細胞の酸化ストレス状態をモニターする実験系の構築

我々が開発した生体内の酸化ストレスを可視化して定量評価できるマウス(roGFP マウス) (Wolf, Nishimaki, *J. Invest. Dermatol.*, 1, 2014) を用いる。roGFP マウスの免疫系組織での roGFP たんぱく質の発現を調べる。

## 4. 研究成果

### 個体レベルでの水素分子のフリーラジカル連鎖反応への関与

ザイモサン投与 1 時間後の肝臓における遺伝子発現を調べた。転写因子 NFAT の下流の遺伝子である EGR1, ATF3, PTGS2, TNF は、ザイモサン投与で急激に増加したが、水素ガス投与群ではこれらの遺伝子発現が抑制された。カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリン(CsA)を事前投与した群では、水素ガス投与群と同じようにこれらの遺伝子発現が抑制された(fig,b)。これらの結果は、水素分子がカルシウムの細胞内への流入-カルシニューリンの活性化-NFAT の活性化の経路を抑制するという培養細胞での結果と一致した。水素分子の炎症時の脂質フリーラジカル連鎖反応への関与が裏づけられた。



## 水素分子の免疫細胞への影響

ザイモサン投与により免疫細胞が活性化した時の水素分子の影響をフローサイトメーターで解析した。水素分子の有無により、脾臓免疫細胞の FSC、SSC のパターンが変化した。これにより、水素分子が免疫細胞の細胞膜に、直接影響を及ぼす可能性が示唆された。

## 免疫細胞の酸化ストレス状態をモニターする実験系の構築

水素分子の免疫細胞の酸化ストレス除去と、免疫細胞の活性化への影響を調べる実験系の構築を試みた。我々が開発した酸化ストレスモニタリングマウスである roGFP マウスの免疫組織での roGFP タンパク質の発現を調べた。roGFP たんぱく質は、酸化還元状態により立体構造中の S-S 結合の形成、切断が起こり、405nm と 480nm 励起波長による蛍光強度の比率が変化する。

ミトコンドリアで roGFP を発現する MRO マウスと、細胞質で roGFP を発現する CRO マウスのどちらの免疫系組織においても 405nm, 480nm の励起波長での roGFP たんぱく質の発現が確認された。さらに roGFP マウスの脾臓から免疫細胞を単離し、フローサイトメーターで解析を行った。各種免疫細胞での roGFP たんぱく質の発現が確認された。還元剤である DTT、酸化剤である過酸化水素で処理した免疫細胞は、処理前に比べて 405nm と 480nm の蛍光比率が変化し、酸化ストレス状態の測定が可能なが分かった。roGFP マウスの免疫細胞を用いて、炎症、アレルギー、細胞死を誘導し、水素分子を処理して ex vivo での水素分子の免疫細胞への影響を調べる実験系を確立した。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 3 件)

Nishimaki K., Asada T., Ohsawa I., Nakajima E., Ikejima C., Yokota T., Kamimura N., Ohta S.: Effects of Molecular Hydrogen Assessed by an Animal Model and Randomized Clinical Study on Mild Cognitive Impairment. *Current Alzheimer Research*. 査読有 2018 15 5, 1; 482-492. doi: 10.2174/1567205014666171106145017.

Watanabe M., Kamimura N., Iuchi K., Nishimaki K., Yokota T., Ogawa R., Ohta S.: Effect of Hydrogen Gas Inhalation on Muscular Damage using Mouse Hind Limb Ischemia Reperfusion Injury Model. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 査読有 2017 140, 6, 1195-1206. doi: 10.1097/PRS.00000000000003878

Iuchi K., Imoto A., Kamimura N., Nishimaki K., Yokota T., Ichimiya H., Ohta S.: Molecular hydrogen regulates gene expression by modifying the free radical chain reaction-dependent generation of oxidized phospholipid mediators. *Scientific Report*. 査読有 2015; 1605, 49-58. doi:10.1038/srep18971

### 〔学会発表〕(計 11 件)

Kamimura N., Nishimaki K., Yokota T., Iwai Y.: Analysis of immune cells using redox-state monitoring mice. 第92回日本薬理学会年会 2019.

上村尚美、西槇貴代美、Alexander M Wolf、横田隆、岩井佳子：酸化ストレスモニターマウスを用いた免疫細胞の解析 第41回日本分子生物学会年会 2018

西槇貴代美、朝田隆、大澤郁朗、中嶋恵久子、池島千秋、横田隆、上村尚美、太田成男：水素水の飲用によってApoE4遺伝子保因者の軽度認知障害が改善する 第7回日本分子状水素医学生物学会 2017

上村尚美、Alexander M Wolf、西槇貴代美、横田隆、井内勝哉、太田成男：糖尿病モデルマウスのin vivo酸化ストレス解析 第40回日本分子生物学会年会/第90回日本生化学会大会 2017

Iuchi K., Kamimura N., Nishimaki K., Yokota T., Hisatomi H., Ohta S. : Oxidized arachidonic acid activates an anti-inflammatory pathway and a pro-cell death signal. ICBL2017 58th International Conference on the Bioscience of Lipids. 2017 (国際学会)

Kamimura N., A.M. Wolf, Nishimaki K., Yokota T., Ichimiya H., Iuchi K., Ohta S.: In vivo measurement of mitochondrial redox state in type 2 diabetes model mice.

EUROMIT2017 International Meeting on Mitochondrial Pathology.2017 (国際学会)

Nishimaki K., Kamimura N., Ohsawa I., Yokota T., Ohta S.: Drinking hydrogen water prevents the progression of dementia in transgenic model mice with age-dependent memory impairment. EUROMIT2017 International Meeting on Mitochondrial Pathology. 2017 (国際学会)

上村尚美、A.M. Wolf、西槇貴代美、横田隆、一宮治美、井内勝哉、太田成男: In vivo 酸化ストレスモニターマウスを用いた糖尿病モデルマウスの酸化ストレス測定と分子状水素の効果 第17回 日本抗加齢医学会総会 2017

井内勝哉、西槇貴代美、Hyunjin Lee、一宮治美、横田隆、上村尚美、太田成男: 酸化アラキドン酸のRAW264.7細胞に対する抗炎症作用と細胞死誘導作用 第90回日本薬理学会年会 2017

西槇貴代美、井内勝哉、井本明美、上村尚美、一宮治美、横田隆、太田成男: 水素分子は多価不飽和脂肪酸のフリーラジカル連鎖反応に介入しジエン生成を抑制する 第39回 日本分子生物学会 2016

井内勝哉、西槇貴代美、井本明美、上村尚美、一宮治美、横田隆、太田成男: 分子状水素はフリーラジカル連鎖反応に介入して酸化脂質メディエーターを改変することを介して遺伝子発現を制御する 第6回 分子状水素医学生物学会設立記念大会 2016

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。