

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K01840

研究課題名(和文)水素分子の虚血再灌流障害後の予後改善効果と作用機序の解明

研究課題名(英文)Effect of hydrogen molecule on prognosis after ischemia-reperfusion injury and its mechanism

研究代表者

横田 隆(yokota, takashi)

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：30445829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究で、心肺停止後に起こるダメージが水素分子(H₂)の投与によって生存率の増加や脳・心臓の機能障害を軽減したことを報告した。本研究では、H₂投与後の脳と心臓における遺伝子変化をDNAマイクロアレイ法を用いて解析した。心肺停止モデルラットによる解析は、Gene Ontologyによる遺伝子のアノテーション情報を基にした遺伝子解析とKEGG pathwayによる種々の代謝経路とシグナル伝達関連遺伝子の網羅的解析を行った。その結果、H₂によって有意に変化した代謝経路と関連する発現変動遺伝子を見出した。これらの遺伝子が虚血再灌流障害後の脳と心臓機能のダメージ改善につながる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、H₂ガス吸入療法が脳・心臓組織の虚血再灌流障害を軽減し、低体温療法との相乗効果による生命予後を改善して心肺停止症候群の新規治療法に成り得て、複数の心肺停止症候群患者に対するH₂ガス吸入療法の臨床研究がすでに開始されている。本研究で、H₂ガス吸入治療法の有効性におけるメカニズムが解明されることで、増加の一途をたどる心肺停止蘇生後患者の生命予後の改善に多大な貢献をもたらすことが期待される。さらに、本研究において全身性虚血再灌流障害後の生体内に生じる代謝経路の変化が解明され、さらなる新規治療法の提案が可能となれば、その社会的意義は極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that H₂ gas inhalation improved brain and cardiac function in a rat model of cardiac arrest. In this study, we examined the genes expression of post-cardiac arrest treated with H₂ using a DNA microarray based comprehensive approach. We investigated which differentially expressed gene on gene ontology (GO) terms and biological pathways were highly related to the effect of H₂ gas inhalation. List of differentially expressed gene were analyzed based on their enrichment scores for associated GO terms and KEGG pathways. As a result, we found several metabolic pathways and differentially Expressed Gene by effect of H₂ gas inhalation. It is suggested that these genes may contribute to the H₂ inhalation on brain and cardiac function after post-cardiac arrest syndrome.

研究分野：細胞生物学

キーワード：水素分子 全身性虚血再灌流障害 酸化ストレス 抗酸化作用

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病が引き金となり、脳梗塞や心筋梗塞を発症した後も、長期間の後遺症や再発を繰り返す患者が人口の増加とともに増えている。この脳梗塞や心筋梗塞の原因となる酸化ストレス (ROS) は活性酸素が過剰に発生することにより起こる。中でも最も酸化反応性の高いラジカル分子種であるヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) は、特に生体内機能に悪影響をもたらすため、除去することが重要である。一方、スーパーオキシド ($\text{O}_2\cdot^-$) や過酸化水素 (H_2O_2) などは体内の免疫機能や感染防御の重要な役割を担い、シグナル伝達・細胞の分化・アポトーシスなどの生理活性物質として関わっている。当研究室では、これまでの研究から水素分子 (H_2) は、 $\cdot\text{OH}$ などの有害な ROS を特異的に除去する一方で、他の生体内に必要な生物活性を持つ $\text{O}_2\cdot^-$ 、 H_2O_2 などの比較的酸化力の低い活性種を維持できることを見出し、 H_2 により脳梗塞が改善することを見出し、 H_2 の効果を世界で初めて報告した (Nat Med, 13:688, 2007)。その後、動脈硬化症、網膜神経障害、パーキンソン病など、広範囲に酸化ストレスが関与する症状改善に優れた効果があることを報告してきた (Biochem. Biophys. Res. Commun, 377:1195, 2008, Invest Ophthalmol. Invest Ophthalmol. Vis. Sci., 51:487, 2010, Mov Disord., 28:836, 2013)。さらに、虚血再灌流障害による足筋肉の炎症や損傷が H_2 ガス吸入によって抑制され、病状が緩和されたことで機能回復が促進された事や (Plast. Reconstr. Surg., 140:1195, 2017)、全身性虚血再灌流障害モデルを用いて、 H_2 ガス吸入療法が生存率を増加させ、脳や心臓の機能障害を軽減して生命予後を改善できることが判明し、心肺停止後症候群の新規治療法に成り得ることを報告した (Circulation, 132:e148, 2014)。しかしながら、生体内での全身性虚血再灌流障害後の H_2 の作用や改善効果における代謝経路や遺伝子変化については明らかにされていない。

2. 研究の目的

全身性虚血再灌流障害後に起こる脳・心臓機能障害に対する H_2 の作用機序について、心肺停止後症候群モデルを作製して、DNA マイクロアレイ法による網羅的な遺伝子発現の解析を行い、 H_2 ガス吸入による脳および心臓内の遺伝子発現変化や H_2 の代謝経路や作用機構を解明し、包括的検討を試みる。

3. 研究の方法

ラット心肺停止後症候群モデルの作製

Wistar ラット (雄, 15 週齢) を用い、経胸壁の電気刺激装置を用いて心室細動を誘発、6 分間の心停止状態後、3 分間胸骨圧迫 + 電氣的除細動を行うことで心拍再開を得てラット心肺停止後症候群モデルを確立した。 H_2 ガス吸入は、心拍再開後と同時に 1.3% H_2 を開始して 4 時間 37℃ に体温を保った後に人工呼吸器離脱して経過観察を行い、7 日間生存したラットについて解析した (図 1)。

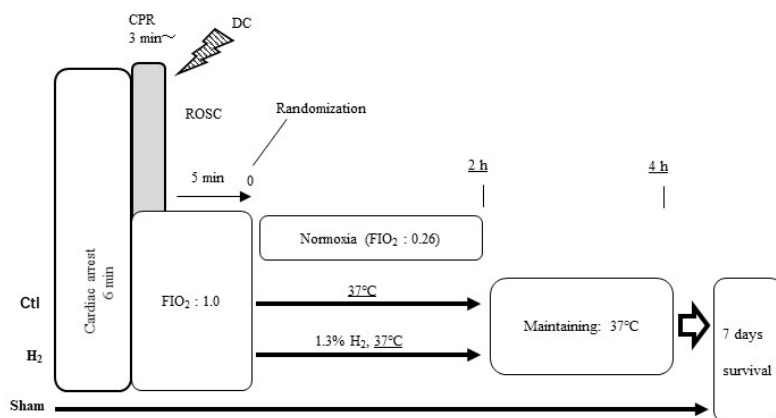


図 1 心肺停止後症候群モデルの作製と H_2 ガス吸入療法

DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の解析

上記疾患モデルを蘇生 7 日後に屠殺して脳および心臓を摘出後、サンプルとして無処置 (Sham) 群、コントロール (CTL, 酸素ガス $\text{FIO}_2: 0.26$) 群および H_2 ガス吸入 (1.3% H_2 ガス) 群の各組織から得られたサンプルデータを比較することで組織における各群の遺伝子発現変化を解析した。

(1) 遺伝子発現量の測定

各組織から mRNA を抽出・精製 (OD 260/280 比) した後に cDNA を合成して Agilent 2100 Bioanalyzer で解析した。サンプルの標識と生成については、RNA 標識とハイブリダイゼーションは、Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Agilent Technology, V 6.5, 2010) と Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis を使用して、ハイブリダイズされたアレイのスキャンは、Agilent Microarray Scanner (Agilent Technologies, Inc.) で解析した。

(2) データ処理と統計解析

上記測定後の raw データは、Agilent Feature Extraction Software (v11.0.1.1) を用いて抽出し、Agilent feature extraction protocol に従って発現遺伝子のデータを得た。発現データの統計的有意性は、Turkey 検定によって算出された各群の平均値から p value を算出した。解析に用いた値は、倍数変化 (fold-change, FC) が 2.0 以上あるいは 0.5 以下で、危険率 5% 以下 ($p < 0.05$) の遺伝子を有意に変化したと判断して Local Pooled Error (LPE) 検定を用いて Bonferroni, FDR (False Discovery Ratio) 法で補正して算出した。また発現遺伝子のデータは、Gene Ontology (GO map) と KEGG pathway 解析によるデータベース解析を行った。

階層的クラスタ分析は、complete linkage と Euclidean distance に基づいて分析した。DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) ツールを使用して、重要な probe list の Functional Annotation を実行した。発現する遺伝子のすべてのデータ分析と視覚化は、R 3.0.2 (www.r-project.org) ソフトを用いて行った。

4 . 研究成果

(1) H₂ 投与後に脳と心臓において発現変動を示した遺伝子数

心肺停止蘇生直後から H₂ ガス吸入による治療を行って 7 日後のラットの脳 (H₂B group) および心臓 (H₂H group) における遺伝子発現変化をコントロール群 (CTLB group, CTLH group) と比較した。また、無処置群ラットを negative control group として脳 (SHMB group) および心臓 (SHMH group) 群を用いた。その結果、コントロール群と比較して H₂ 吸入群の脳で発現が上昇した遺伝子は、470 個、減少した遺伝子が 484 個見られた。また、心臓では発現上昇した遺伝子が 533 個、減少した遺伝子は 472 個認められた (図 1)。

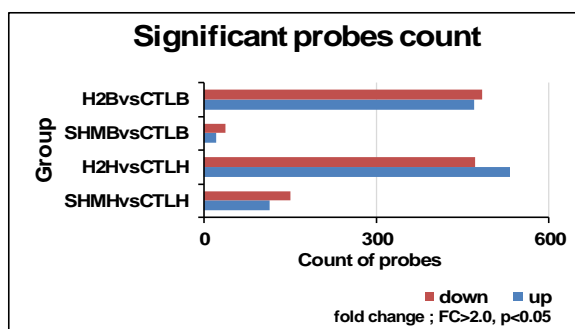


図 2 心肺停止蘇生 7 日後の脳および心臓における発現変動遺伝子数

(2) H₂ 投与後に脳と心臓において細胞内で発現変動を示した遺伝子の機能や局在部位および代謝経路

解析手順は、GO map のアノテーションを行い、それを基に Enrichment 解析を行い、遺伝子を生物学的プロセス・細胞の構成要素・分子機能のカテゴリーに分けて、各々のカテゴリーで共通して発現変動率が高かった遺伝子機能と細胞内の局在部位を算出した。そして、最初に無処置群とコントロール群を比較した結果、コントロール群で有意に変化が認められた遺伝子群を算出した。次に、それらの遺伝子群の中でコントロール群と H₂ 投与群を比較して変動した遺伝子群を抽出した。その結果、Gene Ontology による GO map の解析から Neuron projection development, Regulation of actin cytoskeleton organization, Intrinsic apoptotic signaling pathway, Ion transmembrane transporter activity, Focal adhesion, Cellular response to oxygen-containing compound, Cardiac muscle contraction において、発現変動遺伝子が、有意に最も多く認められた。

一方、KEGG Pathway map を用いた代謝経路のデータベース解析からは、ECM-receptor

interaction, Cardiac muscle contraction signaling pathway, Regulation of actin cytoskeleton, Oxytocin signaling pathway, Focal adhesion pathway の各代謝経路やシグナル伝達系に関わる遺伝子に最も発現変動があることが認められた。

(3) H₂ 投与後に脳および心臓において発現変動を示した遺伝子

コントロール群と H₂ 投与群を比較して上記 GO map と KEGG Pathway に基づいたアノテーションとデータベース解析結果から、両者に共通して同様の部位で有意に発現変動が著明に認められた遺伝子を抽出した。その結果、脳において H₂ 投与群の中でコントロール群に比較して著明に発現が上昇していた遺伝子は、6 個認められ、減少していた遺伝子は 8 個であった。同様に、心臓で H₂ 投与によって上昇していた遺伝子数は 12 個で、発現が減少していた遺伝子数は 24 個であった (図 3)。

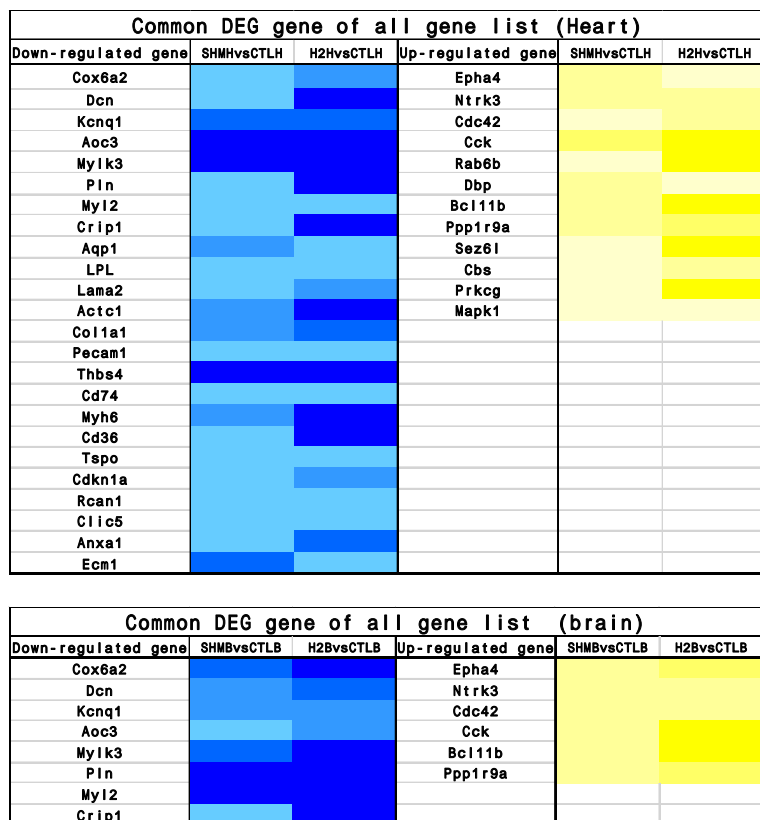


図 3 心肺停止蘇生 7 日後の脳および心臓において H₂ 投与によって著明に発現変動した遺伝子

以上の結果から、本研究での心肺停止後症候群モデルによる全身性虚血再灌流障害後の脳と心臓のダメージを回復させている H₂ の作用は、主にこれらの細胞内の機能や代謝経路およびシグナル伝達系とその関連遺伝子を調節しながら制御している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iuchi K, Imoto A, Kamimura N, Nishimaki K, Ichimiya H, Yokota T, Ohta S	4. 巻 Jan 7;6: 18971
2. 論文標題 Molecular hydrogen regulates gene expression by modifying the free radical chain reaction-dependent generation of oxidized phospholipid mediators.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/srep18971	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Mai, Kamimura Naomi, Iuchi Katsuya, Nishimaki Kiyomi, Yokota Takashi, Ogawa Rei, Ohta Shigeo	4. 巻 140
2. 論文標題 Protective Effect of Hydrogen Gas Inhalation on Muscular Damage Using a Mouse Hindlimb Ischemia-Reperfusion Injury Model	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plast. Reconstr. Surg.	6. 最初と最後の頁 1195~1206
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/PRS.00000000000003878	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishimaki K, Asada T, Ohsawa I, Nakajima E, Ikejima C, Yokota T, Kamimura N, Ohta S	4. 巻 15(5)
2. 論文標題 Effects of Molecular Hydrogen Assessed by an Animal Model and a Randomized Clinical Study on Mild Cognitive Impairment.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Curr Alzheimer Res.	6. 最初と最後の頁 482-492.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/1567205014666171106145017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 井内勝哉、井本明美、上村尚美、西楨貴代美、一宮治美、横田隆、太田成男
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第6回 日本分子状水素医学生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 西槇貴代美、井内勝哉、上村尚美、横田隆、太田成男
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第39回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Katsuya Iuchi, Hyunjin Lee, Kiyomi Nishimaki, Harumi Ichimiya
2. 発表標題 Anti-inflammatory and pro-cell death effects of oxidized arachidonic acid in RAW264.7 cells.
3. 学会等名 第90回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 横田隆、野村浩一、永島幹夫、上村尚美
2. 発表標題 高脂肪食投与ApoE 欠損マウスの脂肪肝および動脈硬化病変に対するフコイダンの軽減作用
3. 学会等名 第71回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上村尚美、Alexander M Wolf、西槇貴代美、横田隆、一宮治美、井内勝哉、太田成男
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第17回 日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Naomi Kamimura, Alexander M Wolf, Kiyomi Nishimaki, Takashi Yokota, Harumi Ichimiya, Katsuya Iuchi, Shigeo Ohta
2. 発表標題 In vivo measurement of mitochondrial redox state in type 2 diabetes model mice.
3. 学会等名 EUROMIT2017 International Meeting on Mitochondrial Pathology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kiyomi Nishimaki, Naomi Kamimura, Ikuroh Ohsawa I, Takashi Yokota, Shigeo Ohta
2. 発表標題 Drinking hydrogen water prevents the progression of dementia in transgenic model mice with age-dependent memory impairment.
3. 学会等名 EUROMIT2017 International Meeting on Mitochondrial Pathology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Katsuya Iuchi, Naomi Kamimura, Kiyomi Nishimaki, Takashi Yokota, Hisashi Hisatomi, Shigeo Ohta
2. 発表標題 Oxidized arachidonic acid activates an anti-inflammatory pathway and a pro-cell death signal.
3. 学会等名 ICBL2017 58th International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takashi Yokota, Katsuya Iuchi, Naomi Kamimura
2. 発表標題 Sulfated polysaccharide (Fucoidan) from brown seaweeds alleviates dyslipidemia and atherosclerosis in ApoEsh1 mice deficient in apolipoprotein E expression.
3. 学会等名 ICBL2017 58th International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 永島幹夫、脇いづみ、横田 隆
2. 発表標題 市販サプリメントを用いたアトピー性皮膚炎に対する改善効果の検討
3. 学会等名 第24回日本未病システム学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上村尚美、Alexander M Wolf、西槇貴代美、横田隆、井内勝哉、太田成男
2. 発表標題 糖尿病モデルマウスのin vivo酸化ストレス解析
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会/第90回日本生化学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 横田隆、Alexander M Wolf、上村尚美、小原澤英彰、五十嵐勉、高橋浩、太田成男
2. 発表標題 青色光照射後の酸化ストレスによるマウス網膜組織への影響
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会/第90回日本生化学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 本間康一郎、林田敬、佐野元昭、有吉理、東聖也、岡健太郎、高橋志達、横田隆、多村知剛、鈴木昌、佐々木淳一
2. 発表標題 心停止後症候群に対する水素ガス投与効果の分子機序をメタボローム解析から解明する試み
3. 学会等名 第46回 日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naomi Kamimura, Kiyomi Nishimaki, Takashi Yokota, Yoshiko Iwai
2. 発表標題 Analysis of immune cells using redox-state monitoring mice
3. 学会等名 第92回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Yokota, Kei Hayashida, Koichiro Homma, Motoaki Sano, Osamu Ariyoshi, Shigeo Ohta, Junichi Sasaki, Yoshiko Iwai
2. 発表標題 Identification of differentially expressed genes in post-cardiac arrest syndrome treated with H2 inhalation in rats: A DNA microarray study
3. 学会等名 第92回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----