

令和 3 年 4 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：2017～2020

課題番号：17K00887

研究課題名(和文)水素分子の炎症制御機構解析 - 慢性炎症を基盤とした生活習慣病対策に向けて -

研究課題名(英文) Analysis of Inflammation Control Mechanism of Hydrogen Molecules - For Prevention of Lifestyle-related Diseases Based on Chronic Inflammation

研究代表者

上村 尚美 (Kamimura, Naomi)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60283800

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、新しい抗酸化剤として細胞を酸化ストレスから効果的に保護し、さらに、抗炎症、抗アポトーシス、抗アレルギーなど複数の機能を発揮することが明らかとなっている。本研究では、ヒト白血病由来単球細胞THP-1のフリーラジカル誘発細胞毒性に対する水素分子の効果を解析した。水素分子は、フリーラジカルによる細胞毒性から培養細胞を保護し、細胞の脂肪酸過酸化と細胞膜透過性を抑制し、ミトコンドリアのオキシドレダクターゼ活性と膜電位の低下を抑制し、細胞死から細胞を保護した。水素分子がフリーラジカルによって誘発される脂肪酸過酸化とミトコンドリア機能障害を改善することにより細胞死を抑制することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界中で水素分子の臨床応用を目的とした研究が盛んに行われており、日本でもいくつかの疾患で臨床試験の段階にまで研究が進んでいる。臨床試験と医師主導型治験が進行している今、ますます水素分子の医療への実用化の期待が高まっている。また、水素分子は食品添加物として認可されており水素水は市販されているため自由に飲むことができる。しかしながら、水素分子の作用メカニズムに関して未解明な部分が多い。本研究により水素分子の作用メカニズムの一端が明らかになれば、より安心して水素分子を摂取できるようになり、社会的な意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Molecular hydrogen (H₂) acts as a novel antioxidant and effectively protects cells against oxidative stress. Subsequently, it was revealed that H₂ exhibits multiple functions, including anti-inflammation, anti-apoptosis and anti-allergy, in addition to anti-oxidative functions. In this study we investigated the effect of H₂ on free-radical-induced cytotoxicity in a human acute monocytic leukemia cell line, THP-1. H₂ protected the cultured cells against the cytotoxic effects induced by free-radical; H₂ suppressed cellular fatty acid peroxidation and cell membrane permeability, mitigated the decline in mitochondrial oxidoreductase activity and mitochondrial membrane potential, and protected cells against cell death. These results suggested that H₂ suppresses free-radical-induced cell death through protection against fatty acid peroxidation and mitochondrial dysfunction.

研究分野：細胞生物学

キーワード：酸化ストレス 炎症 ミトコンドリア 糖尿病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスは、糖尿病等の生活習慣病を誘発する原因のひとつと考えられている。酸化ストレスは、強い酸化力をもつ活性酸素種やフリーラジカルが過剰に生じることにより起こる。なかでも強力なヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) は生体に悪い影響をもたらすので、抗酸化物質により取り除くことが重要である。一方、一酸化窒素 ($\text{NO}\cdot$) が神経伝達物質として機能する等、生理的に重要な活性酸素種もある。我々は、これまでの研究により、水素分子が有害な活性酸素種のみを選択的に還元することを見つけ、脳梗塞モデル動物において、水素分子の投与により急性酸化ストレスが軽減し、脳梗塞が改善することを報告した (Ohsawa et al., Nat. Med., 13, 688, 2007)。さらに、2型糖尿病のモデルマウス db/db において水素水 (水素分子を溶かした水) を飲用水として3ヶ月間自由摂取することにより肝臓で分泌されエネルギー代謝を調節するホルモン FGF21 の遺伝子発現が増加することを明らかにした (Kamimura et al., Obesity, 19, 1396, 2011)。水素分子による遺伝子発現調節機構を解明するために網羅的な遺伝子発現解析を行った結果、水素分子は、過酸化脂質である 4-HNE を起点とした Akt/FOXO1 シグナリングを介して PGC-1 の遺伝子発現を調節し、PPAR パスウェイを活性化して FGF21 や脂肪酸、およびステロイド代謝関連遺伝子の発現調節をしていることを明らかにした (Kamimura et al., Aging and Mechanisms of Disease., 2:1600, 2016)。この過酸化脂質に対する水素分子の効果が明らかになったことにより、次に着目したのは生体膜脂質の酸化に対する水素分子の効果である。多価不飽和脂肪酸を多く含む生体膜脂質は、生体内において非酵素的ラジカル連鎖反応によって過酸化が連鎖的に進み、一次生成物として過酸化脂質が生成される。近年の研究で、生体膜での過酸化リン脂質 (PCOOH) の生成が過剰となり生体膜脂質酸化ホメオスタシスが破綻すると、細胞死誘導へのシグナルが進み、疾患の原因となることが明らかになってきた。また膜を破壊しない程度の生理的レベルにおいても、膜物性を変化させて生体膜の機能に影響を与えることも分かってきた。過酸化脂質は、脂質メディエーター (生理活性を持つ脂質) として注目されている。水素分子は当初報告された抗酸化作用だけでなく、抗炎症作用、抗アポトーシス作用、抗アレルギー作用、脂質代謝改善作用、神経保護作用、血管拡張作用、シグナル伝達の調節作用などの新しい作用を示すことが報告されてきた (Ichihara et al., Med. Gas. Res., 5:12, 2015)。

2. 研究の目的

水素分子は様々な疾患動物モデルで効果を発揮しているが、中でも抗炎症作用に注目した。本研究では、ヒト白血病由来単球細胞を用いて、酸化ストレスによって生じるミトコンドリア機能不全と細胞死に対する水素分子の効果を解析することにより、水素分子の抗炎症作用メカニズムを解明することを目的とした。さらに、培養細胞だけでなく動物レベルで解析ができるような実験系を新たに構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞

ヒト白血病由来単球細胞 (THP-1) を RPMI1640 (10% FBS) で 37℃、5% CO_2 で培養した。

(2) 水素分子処理

THP-1 細胞は水素分子を含む混合ガスの存在下で培養した。用いた混合ガスは3種類で、高濃度水素ガス (75% H_2 , 20% O_2 , 5% CO_2)、低濃度水素ガス (10% H_2 , 65% N_2 , 20% O_2 , 5% CO_2)、コン

トロールガス (75% N₂, 20% O₂, 5% CO₂) である。

(3) LDH (Lactate dehydrogenase) アッセイ

THP-1 細胞は上記の混合ガスの中で TBHP (tert-Butyl hydroperoxide) 処理を 18 時間行った。培養上清を回収し、上清中の LDH を測定キット (Roche) にて測定した。

(4)ヘキスト/PI 染色

細胞死はヘキスト 33342 と PI による染色で測定した。THP-1 細胞を上記の混合ガスの中で TBHP で 18 時間処理した後、ヘキスト 33342 (5 μg/mL) と PI (5 μg/mL) で 10 分間染色した。細胞死の判定は蛍光顕微鏡下にて行った。

(5)脂肪酸過酸化の測定

THP-1 細胞は、5 μM リパフロー、または、2 μM C11-BODIPY で 30 分間培養した後、上記の混合ガスの中で TBHP で 4.5 時間処理した。脂肪酸過酸化の測定はフローサイトメーターを用いて行った。

(6)アラマーブルーアッセイ

THP-1 細胞は上記の混合ガスの中で TBHP (tert-Butyl hydroperoxide) 処理を 18 時間行った。そこにアラマーブルーを加えて、さらに 6 時間培養した。アラマーブルーの蛍光強度を蛍光プレートリーダーで測定した。

(7)ミトコンドリア膜電位の測定

THP-1 細胞は上記の混合ガスの中で TBHP (tert-Butyl hydroperoxide) 処理を 6 時間行った。TMRM (tetramethylrhodamine, methyl ester) で 20 分間染色し、蛍光強度をフローサイトメーターを用いて測定した。

(8)酸化ストレスの測定

酸化ストレスモニタリングマウスを用いて酸化ストレスの測定を行った。このマウスは、酸化還元状態の変化により 405nm と 480nm 励起波長による蛍光強度の比率が変化する蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックマウスである。採取した臓器に 405nm と 480nm 励起波長を照射して蛍光画像を撮影し、2つの画像の蛍光強度の比率は ImageJ ソフトウェアにより解析した。

4. 研究成果

(1)水素分子はフリーラジカルによる細胞膜透過性の亢進を抑制することが明らかとなった。

フリーラジカル誘発剤として TBHP (tert-Butyl hydroperoxide) を用いて LDH アッセイを行った。TBHP は細胞膜透過性を亢進させ細胞内から LDH が漏出するようになるが、水素分子は濃度依存的にその漏出を有意に抑制した (図 1)。

さらに、ヘキスト/PI 染色で細胞死を測定したところ、

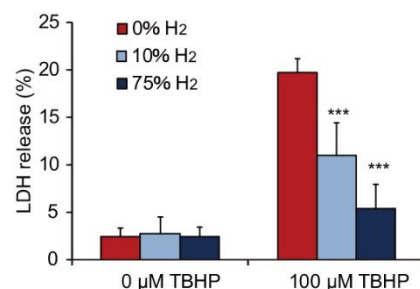


図 1

水素分子は細胞死も抑制していた（図2）。この時、核の断片化も抑制していたことから、水素分子はアポトーシスも抑制することが明らかとなった。

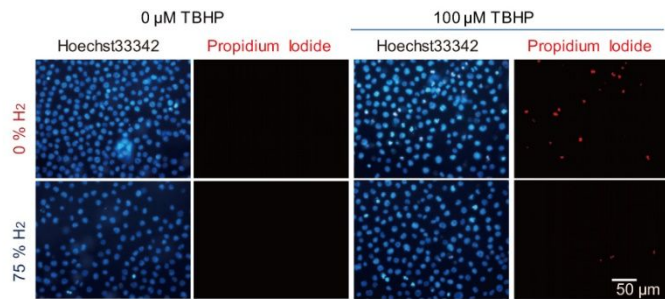


図2

(2)水素分子はフリーラジカルによる脂肪酸過酸化を抑制することが明らかとなった。

フリーラジカル誘発剤として TBHP (tert-Butyl hydroperoxide) を用い、細胞内の脂質の過酸化レベルは蛍光プローブのリパフローを用いて測定した。TBHP 処理によりリパフローの蛍光強度は増加したが、水素分子により蛍光強度が減少した。別の蛍光プローブである C11-BODIPY を用いて測定した実験においても、水素分子は TBHP による脂質過酸化を抑制することが示された（図3）。

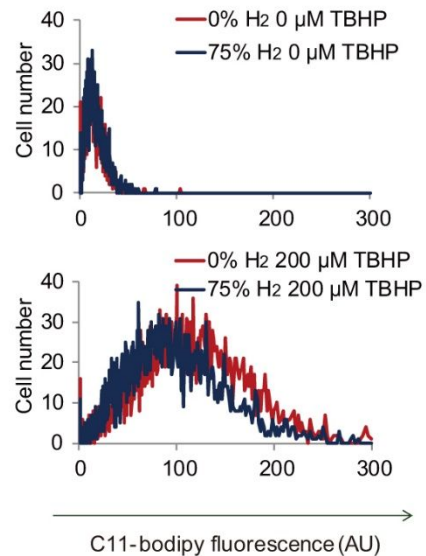


図3

(3)水素分子は TBHP により生じるミトコンドリア機能不全を改善することが明らかとなった。

ミトコンドリア機能における水素分子の効果はアラマーブルーアッセイにより解析した。このアッセイは、ミトコンドリアのオキシドレダクターゼ活性を測定するアッセイである。TBHP 処理によりオキシドレダクターゼ活性は減少するが、水素分子により活性低下が抑制されることが示された（図4）。さらに、ミトコンドリア膜電位を測定したところ、TBHP 処理によりミトコンドリア膜電位は低下するが、水素分子により膜電位の低下が抑制されることがわかった。

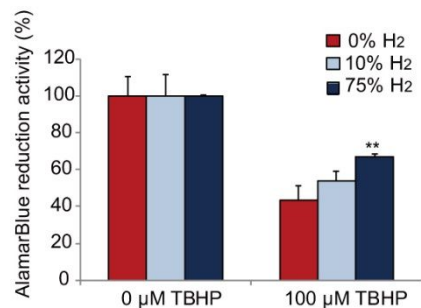


図4

(4)動物レベルでの酸化ストレス測定系の構築

酸化ストレスモニタリングマウスを用いて糖尿病モデルマウスの db/db マウスを交配し、酸化ストレスが測定可能な糖尿病モデルマウスを作製した。酸化ストレスモニタリング糖尿病マウスを用いて、全身の様々な臓器の酸化還元状態を解析したところ、脾臓やリンパ節が糖尿病モデルマウスにおいて最も変化していることが明らかとなった（論文投稿準備中のため詳細な結果は割愛）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Katsuya, Nishimaki Kiyomi, Kamimura Naomi, Ohta Shigeo	4. 巻 97
2. 論文標題 Molecular hydrogen suppresses free-radical-induced cell death by mitigating fatty acid peroxidation and mitochondrial dysfunction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Canadian Journal of Physiology and Pharmacology	6. 最初と最後の頁 999 ~ 1005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1139/cjpp-2018-0741	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 Rho Seung-Sik, Kobayashi Isao, Oguri-Nakamura Eri, Ando Koji, Fujiwara Masakazu, Kamimura Naomi, Hirata Hiromi, Iida Atsuo, Iwai Yoshiko, Mochizuki Naoki, Fukuhara Shigetomo	4. 巻 49
2. 論文標題 Rap1b Promotes Notch-Signal-Mediated Hematopoietic Stem Cell Development by Enhancing Integrin-Mediated Cell Adhesion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 681 ~ 696.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2019.03.023	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
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 Kamimura N, Wolf AM, Iwai Y.	4. 巻 86
2. 論文標題 Development of Cancer Immunotherapy Targeting the PD-1 Pathway.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Nippon Med Sch.	6. 最初と最後の頁 10-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1272/jnms.JNMS.2019_86-2.	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 Ohsawa Y, Hagiwara H, Nishimatsu SI, Hirakawa A, Kamimura N, Ohtsubo H, Fukai Y, Murakami T, Koga Y, Goto YI, Ohta S, Sunada Y; KN01 Study Group.	4. 巻 90
2. 論文標題 Taurine supplementation for prevention of stroke-like episodes in MELAS: a multicentre, open-label, 52-week phase III trial.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neurol Neurosurg Psychiatry.	6. 最初と最後の頁 529-536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jnnp-2018-317964.	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 Amo Taku, Kamimura Naomi, Asano Hiromasa, Asoh Sadamitsu, Ohta Shigeo	4. 巻 7
2. 論文標題 Cisplatin selects short forms of the mitochondrial DNA OriB variant (16184?16193 poly-cytosine tract), which confer resistance to cisplatin	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 46240 ~ 46240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep46240	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 Plastic and Reconstructive Surgery	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 Kiyomi, Asada Takashi, Ohsawa Ikuroh, Nakajima Etsuko, Ikejima Chiaki, Yokota Takashi, Kamimura Naomi, Ohta Shigeo	4. 巻 15
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 Current Alzheimer Research	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14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Naomi Kamimura, Kiyomi Nishimaki, Yoshiko Iwai
2. 発表標題 Analysis of oxidative stress in immune cells
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西槇貴代美、上村尚美、岩井佳子
2. 発表標題 酸化ストレスモニターマウスを用いた免疫細胞のin vitro解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上村尚美、西槇貴代美、Alexander M Wolf、横田隆、岩井佳子
2. 発表標題 酸化ストレスモニターマウスを用いた免疫細胞の解析
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
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 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 (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 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Taku Amo, Naomi Kamimura, Asano H, Asoh S, Ohta S.
2. 発表標題 Cisplatin selects short forms of the mitochondrial DNA OriB variant (16184-16193 poly-cytosine tract), which confer resistance to cisplatin.
3. 学会等名 EUROMIT2017 (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 (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 (国際学会)
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 Yoko Funasaka, Alexander M. Wolf, Naomi Kamimura, Yoichi Yabuki, Fumino Oda, Shigeo Ohta, Hidehisa Saeki
2. 発表標題 UVA and UVB-induced oxidative stress in live mouse skin - lack of XPA prolongs recovery from oxidative stress -
3. 学会等名 第42回日本研究皮膚科学会年次学術大会・総会
4. 発表年 2017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
研究 分担者	井内 勝哉 (Iuchi Katsuya) (40553847)	成蹊大学・理工学部・助教 (32629)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------