

機関番号：33910

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2010

課題番号：20200021

研究課題名（和文）生活環境における吸入気体組成の調節に基づく健康維持と疾患制御の試み

研究課題名（英文）New approach for health maintenance and disease control by modification of inhaled air composition

研究代表者

市原 正智 (ICHIHARA MASATOSHI)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：00314013

研究成果の概要（和文）：

水素は新規抗酸化剤または新規抗炎症剤として機能することが示されている。パーキンソン病、即時型アレルギー、細菌毒肝障害などのモデル動物において水素は病態を軽減することを確認した。線虫をもちいた検討では、酸化ストレスが亢進した環境下（高濃度酸素下）の障害を軽減する傾向が観察された。DNA マイクロアレイを用いた検討では、短時間の水素暴露により遺伝子変動が引き起こされることが確認された。水素の投与法を工夫することで健康維持に適した新しい住環境を提案することが可能かもしれない。

研究成果の概要（英文）：

Recent studies demonstrated that molecular hydrogen functions as a novel antioxidant. We examined whether molecular hydrogen attenuates disease progression using model animals such as Parkinson disease, allergic reaction, liver damage by bacterial toxin and others and found that molecular hydrogen is effective for a wide variety of diseases including inflammatory diseases in which oxidative stress is not a major cause of the pathogenesis. We also found that hydrogen slightly extended the lifespan in *C. elegans* under 60% oxygen condition. DNA microarray analysis revealed that short-lasting hydrogen exposure by hydrogen-rich water induced more significant change in gene expression in the liver tissue. These results suggest that intermittent administration of hydrogen in living environment may serve as a new approach for health maintenance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2009年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2010年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
年度			
年度			
総計	22,400,000	6,720,000	29,120,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・生活科学一般

キーワード：住環境、分子状水素、活性酸素、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

過剰な活性酸素は生体の構造や機能を担っている脂質、蛋白質・酵素や、遺伝情報を担う遺伝子DNAを酸化・損傷し、生体の構造や機能

を乱し、病気を引き起こす。その結果老化が早まり、癌や、生活習慣病になりやすくなるといわれる。活性酸素を制御する抗酸化薬剤には、アスコルビン酸、ビタミンE、βカロ

チンなどが有名である。しかしこれらの薬剤が実際に、活性酸素が関与する疾患の制御に役立つという臨床結果はほとんど得られていないのが現状であり、逆に疾患のリスクを上昇させる場合もある。2007年に水素を用いた抗酸化療法が報告された。その後の検討で水素は、虚血還流モデルに加えて炎症性疾患などにも有効であることが多施設の検討で示されている。このことは、水素は当初考えられていたような抗酸化剤としての機能以外のメカニズムで生体に影響を及ぼすことが示唆される。水素の生体作用を検討する事で、将来の水素社会に向けての新しい住環境空間の提案が可能となるかもしれない。また疾患予防という観点から新規治療法の開発につながる可能性もある。

2. 研究の目的

(1) 各種疾患モデル動物に対する水素の効果を検討する。生体への水素の投与法は、本研究で取り上げた吸入空気への水素添加に加えて、水素を水に溶存させた水素飽和水として生体に取り込む方法がある。適宜2つの方法で生体に水素を投与して、まず水素の生体効果について検討を加え水素により疾患病態の制御が可能かどうかを明らかにする。

(2) ヒトでの検討で、水素は嫌気性菌により大腸で比較的多量に普段産生されていることが知られている。吸入空気への添加、水素飽和水として生体に水素を投与した場合の、生体内での水素動態は依然不明である。水素の効果を検証する前提として、水素投与後の生体内での水素動態を明らかにする。

(3) 水素は活性酸素のヒドロキシラジカルの選択的消去以外の生体作用があることが推察されているが、詳細な分子機構は依然謎である。そこでDNAマイクロアレイを用いて水素投与に伴う遺伝子発現の差を明らかにする事で水素の生体作用の詳細を検討する。

(4) 生体内において酸化還元状態を調べる核種を用いて、生体内での酸化還元状態の経時的追跡を行う試みが進められている。生体画像の観点より吸入空気改変による生体への効果を検証する新しい試みとして本手法を発展させる。

3. 研究の方法

(1) 各種疾患モデル動物に対する水素の効果の検討

パーキンソン病、即時型アレルギーモデル、糖尿病モデル、脂肪肝炎モデル、klotho早老マウスなどの疾患モデル動物を水素添加空気環境下の密閉チャンバー内で飼育、または水素飽和水の投与を行い疾患病態に対する影響を検討する。さらに線虫を水素環境下で培養し寿命に対する影響を検討する。

(2) 水素投与後の生体内での水素動態の検討
ラットの中心静脈、総頸動脈にカテーテルを留置して水素添加空気、水素飽和水の投与を行った後に経時的で血液サンプルを採取する。採取された血液サンプルはアルミニウムバッグ内で純空気と飽和した純空気に移行した水素をガスクロマトグラフィーで測定し血中の水素濃度を算出し生体内への水素投与後の動態を検討する。さらに肝臓、腎臓の水素の臓器濃度を針タイプの水素電極で経時的に測定すると共に、血液と同様にガスクロマトグラフィーを用いて臓器における水素濃度を測定する。

(3) 水素投与に伴う生体内変化に関する分子機構の解析

水素が生体に及ぼす影響を分子レベルで明らかにするために、水素の投与に伴うマウスまたはラットの肝臓における遺伝子発現変化についてDNAマイクロアレイを用いて比較する。発現変動の可能性のある遺伝子はreal time PCRで実際の遺伝子発現レベルを検証する。さらにラットにコリン欠乏アミノ酸(CDAA)食を投与し、肝臓を高酸化ストレス状態に暴露した際の水素投与の有無による遺伝子変動を、同様にDNAマイクロアレイで検討し、通常状態とストレス環境下での遺伝子変動を比較することで、水素の生体作用の分子機構を解明する手がかりを探る。

(4) 生体内における酸化還元状態の可視化と水素投与による影響の検討

⁶²Cu-ATSM-PETは、生体におけるミトコンドリア機能障害による酸化ストレスを直接評価できる方法として有用である。水素投与を行ったモデル動物での生体内における酸化還元状態の可視化による水素効果の評価を最終目的として、患者生体脳をもちいたパーキンソン病患者の評価を行う過程で本方法が酸化スト

レスイメーシングとして利用可能であるかどうかの検証を進める。

4. 研究成果

(1) 各種疾患モデル動物に対する水素の効果の検討

①ラットの片側線条体に6-hydroxydopamine (6-OHDA)を投与してパーキンソン病モデル動物を作成した。このモデル動物に水素飽和水を投与して、6-OHDAによる黒質・線状体の神経毒性に対する水素の効果を検討した。コントロールとして脱水素水を投与した場合は、健側と比較して40%程度にドーパミン作動性ニューロンは減少した。一方水素水の前投与を行った場合は、ドーパミン作動性ニューロンは80%程度の減少に留まった。実際のパーキンソン病でも同様の病態が生じていると推定されているので、水素飽和水にパーキンソン病の予防効果が期待される結果であった。パーキンソン病モデルラットでは興味有ることに2%水素ガスとして投与した場合は、パーキンソン病発症が抑制されたものが1匹、中程度に改善がみられたものが1匹、発症したものが4匹と効果が不十分であり水素飽和水においては全てのラットで発症抑制効果みられることから、2%水素ガスの吸入では作用が異なることが示唆されている。

②即時型アレルギーの疾患モデル動物に水素飽和水を自由摂取させることで組織障害及びアレルギー反応を抑制することを見いだした。RBL-2H3 マスト細胞株をもちいた検討では、水素はHigh-affinity IgE receptor下流のLynおよび下流のシグナル伝達機構が抑制されその結果NADPH oxidase活性が低下し H_2O_2 等の産生低下が観察された。これらの結果は水素がNOの様にガスシグナル分子として機能している可能性を示唆していると考えられた。

③2%水素の吸入および水素水の摂取は非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) モデルマウスの肝臓において、酸化ストレスを軽減させることが可能であることを8-OHdG, 4-HNEに対する免疫染色で確認することが出来た。また継続的に2%水素ガスを投与することで炎症、腫瘍形成が軽減する一方、形成された肝臓癌の病型にも水素投与による修飾が観察された。これらは更に検討を重ねている。

④klotho早老マウスを2%水素下で飼育したところ、寿命の延長効果は確認出来なかったが

ホモマウスに観察される異所性石灰化の減弱傾向が観察された。また線虫の寿命に泰知る水素の効果を検討したが、吸入空気に2%, 20%を添加した条件では寿命の延長効果も短縮効果も観察されなかった。一方高濃度酸素(O_2 60%)の環境下では2%水素添加することで軽微な寿命延長傾向を認めた。この機構について更に検討を重ねている。

⑤食中毒毒素であるセレウリド毒素による肝障害モデルでは、水素ガスの吸入、溶存水素水の腹腔内投与により肝障害が軽減されることを病理組織像、血清生化学的に確認した。ヒト肝臓癌由来HepG2細胞などを用いた解析により、水素はカリウムイオンフォアであるセレウリド毒素によるミトコンドリア膜電位低下を防ぎ、その結果ミトコンドリア膜電位低下に伴うチトクロームCの放出に始まるカススペース活性化を抑制し、アポトーシスから細胞を保護する可能性が示唆された。

⑥成人呼吸窮迫症候群 (ARDS) モデルマウスでは水素がLPSの気管内投与に伴い引き起こされる肺水腫の病態を軽快させることを示した。さらに水素が炎症性サイトカインであるTNFの発現を転写レベルで抑制していることを見いだした。TNFの発現の転写レベルで抑制メカニズムの検討を続けている。

(2) 水素投与後の生体内での水素動態の検討
生体内における水素動態の検討を行うために、ガスクロマトグラフィーをもちいて血液中の水素の測定系を確立した。この方法をもちいてラットの外頸動脈および頸静脈よりカテーテルを留置し、経時的に血液を採取し水素吸入および水素水投与後の血中濃度を測定した。まず2%水素を吸入させたラットでは5分で水素溶存飽和量の50分の1程度の相当する $14.4 \mu M$ に動脈、静脈血ともに水素濃度が上昇した。次に $0.65mM$ の水素水を $4ml$ 胃ゾンデでラットに投与し、経時的に動脈血、静脈血を採取し測定したところ静脈血では2分をピークに $4 \mu M$ 前後の水素濃度の上昇が確認された。動脈血では2分にピークを見たが上昇は $0.4 \mu M$ 程度に留まった。一方呼吸を停止させて動脈血を採取すると静脈血と同程度の上昇が認められたことより、静脈系の多くの水素は呼吸より排出されると思われた。肝臓、腎臓における臓器水素濃度の推移も水素濃度計、ガスクロマトグラフィーを用いた検討とも血液の結果と同程度の上昇であった。

(3) 水素投与に伴う生体内変化に関する分子機構の解析

ラットのNASHモデルで通常飼育時、CDA食の投与による酸化ストレス負荷時、それぞれ2つの条件で水素の投与の有無に伴う遺伝子発現の差をDNA microarrayで検討したところ100以上の遺伝子が水素投与により遺伝子変動を示すことが明らかとなった。同時にマウス肝臓においても水素投与の有無に伴う遺伝子発現の差の検討も行った。これらの結果では水素は多くの遺伝子発現を負に抑制する傾向があった。興味深いことに肝臓において発現変動が観察された遺伝子について、腎臓、脳での変動、さらに水素飽和水、水素ガス、水素飽和水と水素ガスの同時投与と比較してみたところ水素飽和水の投与下で特に目立った遺伝子発現の減弱が各臓器で同様に観察されたものがあった。水素飽和水を投与した場合の動脈系での水素濃度の上昇は微弱かつ短時間であったため、水素に組織が暴露されている時間、濃度等により生体は異なった影響を受ける可能性が示唆された。またこうした結果は水素は当初報告された活性酸素の消去とは異なる機構で生体に作用することを示唆している。

(4) 生体内における酸化還元状態の可視化と水素投与による影響の検討

酸化ストレスのイメージングとして ^{62}Cu -ATSM をパーキンソン病の患者に投与して検討した結果、パーキンソン病の患者群では側頭葉皮質に比べ、線条体への強い ^{62}Cu -ATSM の集積が認められた。また、各群の平均画像でも、パーキンソン病の患者群では正常対象群に比べ、線条体への集積が高度であった。両側 S/C 比(両側線条体への集積)の平均は、パーキンソン病の患者群 (1.15 ± 0.10) で正常対象群 (1.08 ± 0.02) より有意に高かった (P < 0.05)。こうした結果を踏まえて水素投与における生体内における酸化還元状態の変化について今後更に検討を加える。

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 16 件)

- ① Ikawa M, Okazawa H, Kudo T, Kuriyama M, Fujibayashi Y, Yoneda M. Evaluation of striatal oxidative stress

in patients with Parkinson's disease using [^{62}Cu]ATSM PET. *Nucl Med Biol*. (in press) 査読有り

- ② Matsushita E, Asai N, Enomoto A, Kawamoto Y, Kato T, Mii S, Maeda K, Shibata R, Hattori S, Hagikura M, Takahashi K, Sokabe M, Murakumo Y, Murohara T, Takahashi M. Protective role of Gipie, a Girdin family protein, in endoplasmic reticulum stress responses in endothelial cells. *Mol Biol Cell*. 2011;22(6):736-747. 査読有り
- ③ Fu Y, Masuda A, Ito M, Shinmi J, Ohno K. AG-dependent 3'-splice sites are predisposed to aberrant splicing due to a mutation at the first nucleotide of an exon. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(10):4396-4404. 査読有り
- ④ Murakami M, Ito H, Hagiwara K, Yoshida K, Sobue S, Ichihara M, Takagi A, Kojima T, Tanaka K, Tamiya-Koizumi K, Kyogashima M, Suzuki M, Banno Y, Nozawa Y, Murate T. ATRA inhibits ceramide kinase transcription in a human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y cells: the role of COUP-TFI. *J Neurochem*. 2010;112(2):511-520. 査読有り
- ⑤ Qiao S, Iwashita T, Ichihara M, Murakumo Y, Yamaguchi A, Isogai M, Sakata K, Takahashi M. Increased expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin in a case of colon adenocarcinoma associated with diffuse ganglioneuromatosis. *Clin Neuropathol*. 2009;28(2):105-112. 査読有り
- ⑥ Matsuguchi T, Chiba N, Bandow K, Kakimoto K, Masuda A, Ohnishi T. JNK activity is essential for Atf4 expression and late-stage osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res*. 2009;24(3):398-410. 査読有り
- ⑦ Kato T, Shimono Y, Hasegawa M, Jijiwa M, Enomoto A, Asai N, Murakumo Y, Takahashi M. Characterization of the HDAC1 complex that regulates the sensitivity of cancer cells to oxidative stress. *Cancer Res*. 2009;69(8):3597-3604. 査読有り
- ⑧ Itoh T, Fujita Y, Ito M, Masuda A, Ohno K, Ichihara M, Kojima T, Nozawa Y, Ito M. Molecular hydrogen suppresses FcepsilonRI-mediated signal transduction and prevents

- degranulation of mast cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;389(4):651-656. 査読有り
- ⑨ Ikawa M, Okazawa H, Arakawa K, Kudo T, Kimura H, Fujibayashi Y, Kuriyama M, Yoneda M. PET imaging of redox and energy states in stroke-like episodes of MELAS. *Mitochondrion.* 20 査読有り 09;9(2):144-148.
- ⑩ Fu Y, Ito M, Fujita Y, Ito M, Ichihara M, Masuda A, Suzuki Y, Maesawa S, Kajita Y, Hirayama M, Ohsawa I, Ohta S, Ohno K. Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2009;453(2):81-85. 査読有り
- ⑪ Enomoto A, Asai N, Namba T, Wang Y, Kato T, Tanaka M, Tatsumi H, Taya S, Tsuboi D, Kuroda K, Kaneko N, Sawamoto K, Miyamoto R, Jijiwa M, Murakumo Y, Sokabe M, Seki T, Kaibuchi K, Takahashi M. Roles of disrupted-in-schizophrenia 1-interacting protein girdin in postnatal development of the dentate gyrus. *Neuron.* 2009;63(6):774-787. 査読有り
- ⑫ Yamazaki H, Yoshida K, Yoshioka Y, Isohashi F, Ozeki S, Koizumi M, Yoneda M, Inoue T. Impact of mitochondrial DNA on hypoxic radiation sensitivity in human fibroblast cells and osteosarcoma cell lines. *Oncol Rep.* 2008;19(6):1545-1549. 査読有り
- ⑬ Masuda A, Shen XM, Ito M, Matsuura T, Engel AG, Ohno K. hnRNP H enhances skipping of a nonfunctional exon P3A in CHRNA1 and a mutation disrupting its binding causes congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet.* 2008;17(24):4022-4035. 査読有り
- ⑭ Ito M, Masuda A, Jinno S, Katagiri T, Krejci E, Ohno K. Viral vector-mediated expression of human collagen Q in cultured cells. *Chem Biol Interact.* 2008;175(1-3):346-348. 査読有り
- ⑮ Hasegawa T, Enomoto A, Kato T, Kawai K, Miyamoto R, Jijiwa M, Ichihara M, Ishida M, Asai N, Murakumo Y, Ohara K, Niwa Y, Goto H, Takahashi M. Roles of induced expression of MAPK phosphatase-2 in tumor development in RET-MEN2A transgenic mice. *Oncogene.* 2008;27(43):5684-5695. 査読有り
- ⑯ Gao K, Masuda A, Matsuura T, Ohno K. Human branch point consensus sequence is yUnAy. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(7):2257-2267. 査読有り
- [学会発表] (計 17 件)
- ① 市原正智、祖父江沙矢加、山井一晃、大桑哲男：水素水投与後の血中・臓器濃度と肝臓内酸化ストレス軽減効果の検討. BMB2010、2010年12月7-10日、神戸.
- ② 祖父江沙矢加、岡本陽、安形則雄、市原正智：Cereulide毒素による肝障害に対する分子状水素の肝保護効果の検討. BMB2010、2010年12月7-10日、神戸.
- ③ Yoshiki Murakumo, Sumitaka Hagiwara, Shinji Mii, Minako Hagikura, Masahide Takahashi: Role of CD109 in the regulation of TGF-beta signaling. BMB2010、2010年12月7-10日、神戸.
- ④ Ikawa M, Okazawa H, Kudo T, Kuriyama M, Fujibayashi Y, Yoneda M. [62Cu]-ATSM PET demonstrates increase of striatal oxidative stress in patients with Parkinson's disease. EANM'10 - Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine. Oct 9-13, 2010, Vienna, Austria.
- ⑤ 村雲芳樹、高橋雅英：転写因子TFII-IとhREV7との相互作用とその生理学的意義の解析. 第69回日本癌学会総会. 2010年9月22-24日、大阪
- ⑥ Ikawa M, Okazawa H, Kudo T, Kuriyama M, Fujibayashi Y, Yoneda M. [62Cu]ATSM PET Demonstrates Increase of Striatal Oxidative Stress in Patients with Parkinson's Disease. World Molecular Imaging Congress 2010. Sep 8-11, 2010, Kyoto, Japan.
- ⑦ 増田章男、Henriette Skovgaard Andersen、Thomas Koed Doktor、Brage Storstein Andresen、大野欽司：HITS-CLIP法により同定したスプライシング因子CUGBP1およびMBNL1の標的RNA配列の機能解析. 第12回日本RNA学会年会. 2010年7月27-29日、東京.
- ⑧ 伊藤智広、藤田泰典、伊藤美佳子、増田章男、市原正智、小島俊男、野澤義則、大野欽司、伊藤雅史：分子状水素による

- I型アレルギー抑制機構の解明. 日本基礎老化学会第33回大会. 2010年6月17, 18日、名古屋.
- ⑨ 村雲芳樹、高橋雅英：ヒト神経膠芽腫細胞におけるCD109発現の生物学的意義の検討. 第99回日本病理学会総会. 2010年4月27-29日、東京.
- ⑩ Murakumo Y, Zhang JM, Takahashi M. CD109 expression promotes cell activity and enhances EGF signaling in human glioblastoma cells. 101th Annual Meeting, American association for Cancer Research. April 17-21, 2010, Washington D. C., USA.
- ⑪ 伊藤智広、藤田泰典、伊藤美佳子、増田章男、市原正智、小島俊男、野澤義則、大野欽司、伊藤雅史：分子状水素によるI型アレルギー抑制の分子機構. 第130回日本薬学会. 2010年3月28-30日、岡山
- ⑫ 山井一晃、祖父江沙矢加、大桑哲男、市原正智：水素水投与後の血中水素濃度動態の検討. 第2回水素研究会学術集会. 2010年2月12日、東京.
- ⑬ 村雲芳樹、萩原純孝、高橋雅英：ヒト神経膠芽腫細胞におけるCD109発現の生物学的意義の検討. 第68回日本癌学会総会. 2009年10月1-3日、横浜.
- ⑭ 井川正道、辻川哲也、清水幸夫、植松秀昌、豊岡麻理子、工藤崇、岡沢秀彦、栗山勝、木村浩彦、米田誠：MELAS脳卒中様発作のMRI(CASL)・MRSによる代謝・血流の啓示的变化. 第50回日本神経学会総会. 2009年5月20-22日、仙台.
- ⑮ 井川正道、岡沢秀彦、工藤崇、福村利光、栗山勝、藤林靖久、米田誠：パーキンソン病における酸化ストレスイメージング. 第4回日本分子イメージング学会. 2009年5月14-15日、東京.
- ⑯ 祖父江沙矢加、村上真史、坂野喜子、伊藤裕美、高四強、古畑彩子、高木明、小嶋哲人、野澤義則、村手隆、市原正智：v-SrcによるSPHK1 mRNA安定化と発現増強. BMB 2008. 2008年12月9-12日、神戸.
- ⑰ Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Masuda A, Yoshimura T, Takeda S, Krejci E, Ohno K. Adeno-associated virus serotype 8-mediated targeting of asymmetric acetylcholinesterase to the synaptic basal lamina at the neuromuscular junction. The 38th Annual Meeting, Society for Neuroscience. Nov 15-19, 2008, Washington D. C., USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市原 正智 (ICHIHARA MASATOSHI)
中部大学・生命健康科学部・教授
研究者番号：00314013

(2) 研究分担者

竹内 環 (TAKEUCHI TAMAKI)
中部大学・生命健康科学部・助手
研究者番号：90392018

村雲 芳樹 (MURAKUMO YOSHIKI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：40324438

増田 章男 (MASUDA AKIO)
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：10343203

米田 誠 (YONEDA MAKOTO)
福井大学・医学部・准教授
研究者番号：70270551

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

大野 欽司 (OHNO KINJI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80397455

伊藤 雅史 (ITO MASAFUMI)
岐阜県国際バイオ研究所・部長
研究者番号：80393114