

機関番号：82674

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500345

研究課題名（和文）ストレスによって生じる脳機能障害の水素分子による改善

研究課題名（英文）Protective effects of molecular hydrogen on a stress-induced brain dysfunction

研究代表者

大澤郁朗（Ohsawa Ikuroh）

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長

研究者番号：30343586

研究成果の概要（和文）：本研究は、うつ病などを含む気分障害のモデルとなるストレス負荷動物に対して酸化ストレスの効果的な抑制剤である水素分子を投与することで、ストレスによって生じる酸化ストレスを抑制、海馬におけるニューロン新生の低下を回復し、海馬に依存した認知・記憶障害やうつ症状の抑制について検討するものである。主要な結果は、*Neuropsychopharmacology* 誌で報告した。マウスに6週間、1日10時間の拘束ストレスを負荷し、水素を飽和量含有する水（水素水）を与える実験を行った。水迷路テスト、受動回避テスト、新奇物体探索テストの結果から、ストレスで生じた認知・記憶障害が水素水の投与により抑制されることが判明した。また、拘束により海馬歯状回における神経前駆細胞新生低下が認められたが、これも水素水の投与群では抑制されていた。さらに拘束ストレスによって蓄積する海馬領域の酸化ストレス（4-HNE や MDA を指標とした）は、水素水の投与により抑制されていた。一方、複数のストレスを組み合わせるうつモデルでは水素水の効果を検証できなかった。しかし、このモデルでも神経前駆細胞新生低下が水素水の投与で抑制されたことから、神経細胞に対する水素の効果について分子機構を培養細胞で詳細に検討中である。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effect of molecular hydrogen on a stress-induced brain dysfunction including cognitive and memory impairment, depression, and anxiety. We have recently reported that molecular hydrogen reduces oxidative stress and can penetrate the blood-brain barrier to protect neurons. Oxidative stress is widely accepted as a contributor to neuronal vulnerability and prevents hippocampal neurogenesis, which may be involved in cognitive function. The main results in this study have been published in *Neuropsychopharmacology*. Immobilization stress was given to mice 10 hours per day for 6 weeks. Water containing high concentration of hydrogen molecule (hydrogen water) was available ad libitum. We examined learning and memory ability using the passive avoidance test, novel recognition test and Morris water maze, and found that hydrogen water improved a stress-induced decline of cognitive function. Hydrogen water also restored the neurogenesis declined by restraint stress and reduced oxidative stress in the brain. Furthermore, we made depression-model mice with a combination of mild stress and did not find any effect of hydrogen water on this model, whereas hydrogen water restored a decline of neurogenesis. Precise molecular mechanisms concerning the effect of molecular hydrogen on neuronal cells is under investigation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000

年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：精神・神経疾患の病態と治療

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の平成14年度患者調査によれば、我が国の受療中精神疾患患者数は約258万人に上り、このうち71万人はうつ病を含む気分障害である。年間4万人近くに上る自殺者の半数以上がうつ病に罹患しているとの報告もあり、疾患発症機構の解明とその効果的な予防・治療法の開発が早急に求められている。

海馬領域は記憶と記憶形成機構に関与する部位として注目され、多様な研究が進められてきた。気分障害やストレス障害の研究においても海馬は最も注目され、その萎縮と海馬に依存する空間記憶の低下がうつ病患者で報告されている。近年、動物を用いたストレスモデルで、三環系抗うつ薬や選択的セロトニン再取り込み阻害薬などの複数の抗うつ薬による海馬歯状回でのニューロン新生促進が示され、うつ病様症状の改善にニューロン新生が必須であることが報告された。ニューロン新生は頭部放射線治療、炎症、身体的精神的ストレスおよびグルココルチコイドなどにより減少する。これらはいずれも酸化ストレスを誘導し、特に放射線は直接的に最も毒性の高い活性酸素種であるヒドロキシラジカルを生み出す。従って、酸化ストレスがニューロン新生に影響を与える重要な因子であると考えられ、その効果的抑制はうつ病などの新たな予防・治療法として着目されている。

2007年に我々は水素分子が酸化ストレス除去に有効であり、顕著な神経保護効果があることをNature Medicineで報告した。水素は活性酸素種のなかで最も反応性に富んだヒドロキシラジカルを選択的に還元し、生

理的に必要な活性酸素種を還元しない。また、ガス特有の透過性から血液脳関門に遮られることなく容易に脳内に到達可能であり、脳虚血再還流モデルでも水素ガスの吸引により梗塞層の顕著な抑制が認められた。そこで、この水素が酸化ストレスを背景とする気分障害やストレス障害などの精神神経疾患にも応用可能であると考えに至った。

2. 研究の目的

本研究は、うつ病などを含む気分障害のモデルとなるストレス負荷動物に対して酸化ストレスの効果的な抑制剤である水素分子を投与することで、ストレスによって生じる酸化ストレスを抑制、海馬におけるニューロン新生の低下を回復し、海馬に依存した認知記憶障害を抑制する効果について検討するものである。この結果は、気分障害やストレス障害などの精神神経疾患に対して全く新しい予防、治療法の可能性を示すことになり、まだ分子レベルでの機序が未解明な酸化ストレスからニューロン新生抑制に至る経路、さらにうつ病の発症に至る経路の解明に水素分子という新たなツールを提供することになる。

3. 研究の方法

(1) 動物の行動解析による水素の脳機能障害抑制効果の検討

各種ストレスによる脳機能の変化に対して、水素の効果を検討する。ストレスの種類としては拘束ストレスを用いた。

水素投与方法：水素の投与は、水素を飽和した精製水を自由摂取させる。生体内水素濃度は、プローブにより水素濃度を直接測定するか、回収サンプル（臓器、血液など）に含まれる

水素をガスクロで測定する。

健康状態の確認：体重、体温、毛並み、感覚機能異常、協調運動異常及び運動失調、摂食量、飲水量などのチェックを行う。

行動テスト：学習や記憶に関するテストとしては、受動回避学習、新奇物体認識試験、Morris の水迷路などの実験を組み合わせで測定する。また、絶望感に関するテストとしては、学習性絶望感、強制水泳などを用いる。

(2) ニューロン新生と酸化ストレスに関する脳の病理学的解析

行動テスト終了後、脳の病理学的解析を行う。凍結切片を以下の染色で評価する。

神経変性：ヘマトキシリン・エオジン染色、クリューバ・バレラ染色、グリア細胞（活性型アストロサイト、ミクログリア）に対する免疫染色（抗 GFAP 抗体、抗 Iba1 抗体）。

ニューロン新生：予めブロモデオキシウリジン (BrdU) をマウスに投与し、抗 BrdU 抗体で染色する。また、他の細胞増殖マーカー

(Ki-67) などに対する抗体でも染色する。増殖細胞が神経幹細胞であることは抗 Nestin 抗体などを用いて確認する。

酸化ストレス：脂質の過酸化により生じる 4-ヒドロキシノネナール (4-HNE) や DNA の酸化で生じる 8-オキシグアニン (8-OHdG) などに対する抗体で染色する。

(3) 生化学的解析

脳、血清（血漿）及び尿中の酸化ストレスについてはマロンジアルデヒド (MDA) や 8-OHdG の濃度を測定する。

4. 研究成果

(1) 身体的拘束ストレスによる酸化ストレスの増大と水素水による抑制

拘束ストレスの実験には ICR マウスを用いた。水素水と、攪拌することで水素分子を脱気したコントロール用の水（脱気水）で、飲量に差が無いことを確かめた。

身体的拘束ストレスは、それぞれのマウスを 1 日 10 時間小ケージに入れ、水は自由に飲めるが身動きはまったくできないようにした。この処置を週に 6 日行った。また、残

りの時間は、ケージから 1 匹のみの小さな飼育箱に移動し、水と餌を自由摂取できるが、運動は制限された状態で飼育した。

脳の酸化ストレスについては、拘束ストレス 8 週後に過酸化脂質の最終産物である 4-HNE を免疫染色で (図 1 b, c)、MDA を生化学的方法で (図 1 d) 測定した。拘束ストレスは酸化ストレスを増大させたが、水素水の投与は、これを抑制した。

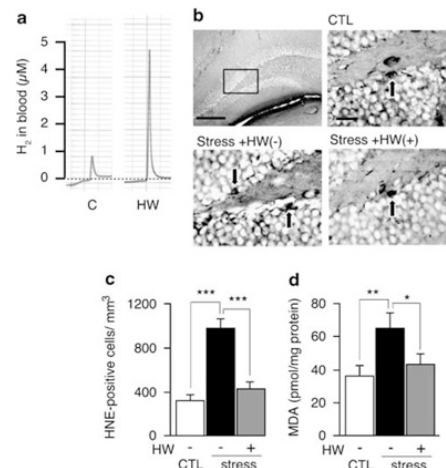


図1 水素水 (HW) による酸化ストレスの抑制。(a) 水素水投与 3 分後の血中水素濃度。(b, c) 海馬歯状回での拘束ストレスによる 4-HNE 陽性細胞の増加と水素水による抑制。(d) 全脳の MDA 量。

(2) 身体的拘束ストレスによる認知・記憶能の低下と水素水による抑制

受動回避試験は、暗所に入った時に電気ショックを与えることで、マウスがこれを記憶して移動を躊躇するようになる。拘束ストレスにより記憶障害が生じ、拘束ストレスを受けたマウスは短時間で暗所に入りようになり学習・記憶能力が低下したが、水素水投与群では低下が抑制された (図 2)。

新奇物体認知試験は、マウスが新しいもの (新奇物体) を好んで探索する性質を利用している。拘束ストレス 6 週後には、拘束ストレスにより新奇物体への興味は失われ、認知・記憶力の低下が認められたが、水素水の投与はこれを抑制した。

モーリス水迷路試験で、海馬に依存していると考えられている空間認知・記憶能を調べた。拘束ストレス 4 週後には、6 日のトレー

ニング後に見えないプラットフォームまで辿り着く時間が未処置マウスよりも長く、ほとんどプラットフォームの位置を記憶できなかった。しかし、水素水の投与は空間認知・記憶能力の低下を抑制した。

(3) 水素水は筋力と行動量には影響しない

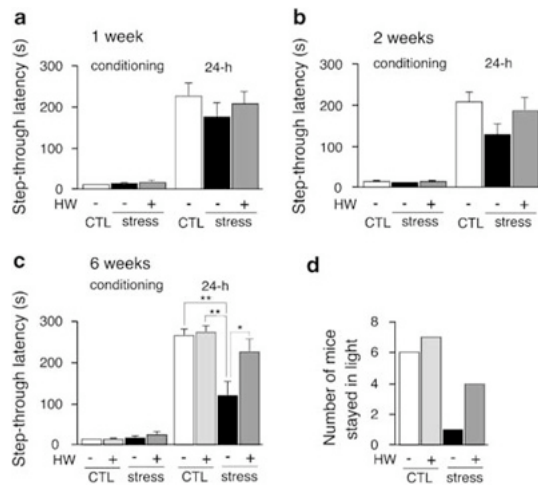


図2 水素水 (HW) による認知・記憶力低下の抑制：受動回避試験。(a-c) 拘束ストレス1、2、6週後の暗室への移行時間。(d) 拘束ストレス6週後、5分間、明室に留まった匹数。

拘束ストレスにより、マウスの体重増加は抑制された。しかし、水素水の投与による体重の回復は見られなかった。また、ぶる下がり試験やオープンフィールド試験でも水素水と脱気水との間で差は認められなかった。これらの結果は、水素水が筋力や運動量の低下を改善した為に認知・記憶能力に関する試験の結果が改善したのではないことを示している。

(4) 身体的拘束ストレスによる神経新生の低下と水素水による抑制

認知機能は海馬における神経新生と密接に関わっていると考えられている。そこで、拘束ストレス8週後の海馬歯状回における神経前駆細胞の増殖をチミジンアナログである BrdU の取り込みと、増殖細胞での高発現が知られている Ki-67 の検出で調べた。BrdU は6週目以降から投与を開始した。それぞれの抗体によって免疫染色した結果を図3に示す。いずれも陽性細胞数が拘束ストレスによって減少したが、水素水がこれを回

復させた (図3)。

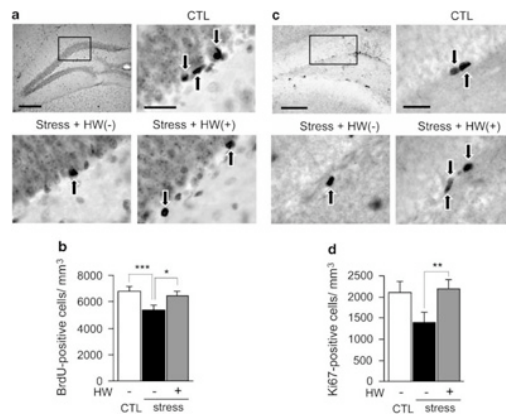


図3 拘束ストレス負荷マウスにおける海馬歯状回神経新生低下の水素水投与による回復。(a、c) BrdU 陽性細胞。(b、d) Ki-67 陽性細胞。

(5) 考察

拘束ストレスモデルでは、水素水による認知・記憶能力の抑制効果が観察された。この時、酸化ストレスの抑制と海馬神経新生の回復が見られたことから、水素水による酸化ストレスの抑制が神経変性を抑制し、その結果、高次機能の損傷が妨げられたものと考えられることができる。さらに複数の軽度嫌忌事象を組み合わせたストレスによるうつモデルでは、水素水のうつ抑制効果を検証できなかった。しかし、このモデルでも神経前駆細胞新生低下が水素水の投与で抑制された。

ストレスでは、脳内ストレス伝達系との関連を考慮する必要がある。血漿から視床下部-下垂体-副腎皮質 (HPA) 系に関連するコルチコステロンや副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) が水素水の投与により変化している可能性もある。特に視床下部室傍核のコルチコトロピン放出ホルモン (CRH) や慢性ストレスとの関連が指摘されているバズプレッシンへの影響等が興味深い。

一方、酸化ストレスの抑制から、水素水の効果はコルチコステロンやグルタミン酸による神経変性を引き起こす活性酸素の発生を直接抑制している可能性が高い。水素分子はヒドロキシルラジカルを還元するが、それだけで水素分子の神経保護効果を説明できるのか、現在、細胞培養系をもちいた詳細な分子

メカニズムを解析中である。

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 27 件)

1. Kamimura, N., Nishimaki, K., Ohsawa, I., and Ohta, S. (2011) Molecular Hydrogen Improves Obesity and Diabetes by Inducing Hepatic FGF21 and Stimulating Energy Metabolism in db/db Mice. *Obesity. in press* (査読有り)
2. 大澤郁朗 (2011) 水素分子医学の現状と展望. 基礎老化研究 35, 1-7. (査読有り)
3. Wu, I.-C., Ohsawa, I., Fuku, N., and Tanaka, M. (2010) Metabolic analysis of ¹³C-labeled pyruvate for noninvasive assessment of mitochondrial function. *Anal. N.Y. Academy Sci.* 1201, 111-120. (査読有り)
4. Wolf, A.M., Asoh, S., Hiranuma, H., Ohsawa, I., Iio, K., Satou, A., Ishikura, M., and Ohta, S. (2010) Astaxanthin protects mitochondrial redox state and functional integrity against oxidative stress. *J. Nutr. Biochem.* 21, 381-389. (査読有り)
5. Mitsuishi, T., Iwabu, Y., Tokunaga, K., Sata, T., Kaneko, T., Ohara, K., Ohsawa, I., Oda, F., Yamada, Y., Kawana, S., Ozaki, K., Nakatake, M., and Yamada, O. (2010) Combined analysis of cell growth and apoptosis-regulating proteins in HPV-associated anogenital tumors. *BMC Cancer. in press* (査読有り)
6. Nakajima, S., Ohsawa, I., Ohta, S., Ohno, M., and Mikami, T. (2010) Regular voluntary exercise cures stress-induced impairment of cognitive function and cell proliferation accompanied by increases in cerebral IGF-1 and GST activity in mice. *Behav. Brain Res.* 211, 178-184. (査読有り)
7. Oharazawa, H., Igarashi, T., Yokota, T., Fujii, H., Suzuki, H., Machide, M., Takahashi, H., Ohta, S., and Ohsawa, I. (2010) 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. (査読有り)
8. 大澤郁朗 (2010) 酸化ストレス防御系の破壊とアルツハイマー型認知症. 医学のあゆみ 232, 698-704. (査読無し)
9. Endo, J., Sano, M., Katayama, T., Hishiki, T., Shinmura, K., Morizane, S., Matsubashi, T., Katsumata, Y., Zhang, Y., Ito, H., Nagahata, Y., Marchitti, S., Nishimaki, K., Wolf, A.M., Nakanishi, H., Hattori, F., Vasiliou, V., Adachi, T., Ohsawa, I., Taguchi, R., Hirabayashi, Y., Ohta, S., Suematsu, M., Ogawa, S., and Fukuda, K. (2009) Metabolic remodeling induced by mitochondrial aldehyde stress stimulates tolerance to oxidative stress in the heart. *Circ Res.* 105, 1118-1127. (査読有り)
10. Nakashima, Y., Ohsawa, I., Konishi, F., Hasegawa, T., Kumamoto, S., Suzuki, Y., and Ohta, S. (2009) Preventive effects of Chlorella on cognitive decline in age-dependent dementia model mice. *Neurosci. Lett.* 464, 193-198. (査読有り)
11. Suzuki, Y., Sano, M., Hayashida, K., Ohsawa, I., Ohta, S., and Fukuda, K. (2009) Are the effects of α -glucosidase inhibitors on cardiovascular events related to elevated levels of hydrogen gas in the gastrointestinal tract? *FEBS Lett.* 583, 2157-2159. (査読有り)
12. Nakajima, S., Ohsawa, I., Nagata, K., Ohta, S., Ohno, M., Ijichi, T., and Mikami, T. (2009) Oral supplementation with melon superoxide dismutase extract promotes antioxidant defences in the brain and prevents stress-induced impairment of spatial memory. *Behav. Brain Res.* 200, 15-21. (査読有り)
13. Fu, Y., Ito, M., Fujita, Y., Ito, M., Ichihara, M., Masuda, A., Suzuki, Y., Maesawa, S., Kajita, Y., Hirayama, M., Ohsawa, I., Ohta, S., and Ohno, K. (2009) Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 453, 81-85. (査読有り)
14. Nagata, K., Nakashima-Kamimura, N., Mikami, T., Ohsawa, I., and Ohta, S. (2009) Consumption of molecular hydrogen prevents the stress-induced impairments in hippocampus-dependent learning tasks during chronic physical restraint in mice. *Neuropsychopharmacology.* 34, 501-508. (査読有り)
15. Murakami, Y., Ohsawa, I., Kasahara, T., and Ohta, S. (2009). Cytoprotective role of mitochondrial amyloid β peptide-binding alcohol dehydrogenase against a cytotoxic aldehyde. *Neurobiol. Aging.* 30, 325-329. (査読有り)
16. Harita, Y., Kurihara, H., Kosako, H., Tezuka, T., Sekine, T., Igarashi, T., Ohsawa, I., Ohta, S., and Hattori, S. (2009) Phosphorylation of nephrin triggers Ca²⁺ signaling by recruitment and activation of phospholipase C- γ 1. *J. Biol. Chem.* 284, 8951-8962. (査読有り)
17. Nakashima-Kamimura, N., Mori, T., Ohsawa, I., Asoh, S., and Ohta, S. (2009) Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 64, 753-761. (査読有り)
18. Ohsawa, I., Nishimaki, K., Murakami, Y., Suzuki, Y., Ishikawa, M., and Ohta, S. (2008) Age-dependent neurodegeneration accompanying memory loss in transgenic mice defective in mitochondrial ALDH2 activity. *J. Neurosci.* 28, 6239-6249. (査読有り)
19. Wolf, A.M., Asoh, S., Ohsawa, I., and Ohta, S. (2008) Imaging mitochondrial redox environment and oxidative stress using a redox-sensitive fluorescent protein. *J. Nippon Med. Sch.* 75, 66-67. (査読有り)
20. Katsura, K.I., Takahashi, K., Asoh, S., Watanabe, M., Sakurazawa, M., Ohsawa, I., Mori, T., Igarashi, H., Ohkubo, S., Katayama, Y., and Ohta, S. (2008) Combination therapy with transductive anti-death FNK protein and FK506 ameliorates brain damage with focal transient ischemia in rat. *J. Neurochem.* 106, 258-270. (査読有り)
21. Watanabe, M., Katsura, K.I., Ohsawa, I., Mizukoshi, G., Takahashi, K., Asoh, S., Ohta, S., and Katayama, Y. (2008) Involvement of mitoK(ATP) channel in protective mechanisms of cerebral ischemic tolerance. *Brain Res.* 1238,

- 199-207. (査読有り)
22. Hayashida, K., Sano, M., Ohsawa, I., Shinmura, K., Tamaki, K., Kimura, K., Endo, J., Katayama, T., Kawamura, A., Kohsaka, S., Makino, S., Ohta, S., Ogawa, S., and Fukuda, K. (2008) Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373, 30-35. (査読有り)
23. Ohsawa, I., Nishimaki, K., Yamagata, K., Ishikawa, M., and Ohta, S. (2008) Consumption of hydrogen water prevents atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 1195-1198. (査読有り)
24. Kogiku, M., Ohsawa, I., Matsumoto, K., Sugisaki, Y., Takahashi, H., Teramoto, A., and Ohta, S. (2008) Prognosis of glioma patients by combined immunostaining for survivin, Ki-67 and epidermal growth factor receptor. *J. Clin. Neurosci.* 15, 1198-1203. (査読有り)
25. 大澤郁朗, 太田成男 (2008) 加齢. 日本臨床 66増刊 1, 169-174. (査読無し)
26. 村上弥生, 大澤郁朗, 太田成男 (2008). ミトコンドリアに局在する A6 結合アルコール脱水素酵素による酸化ストレスからの防御機構. 日本臨床 66 増刊 1, 113-119. (査読無し)
27. 太田成男, 大澤郁朗 (2008) 水素分子による新しい概念の抗酸化治療法と予防医学. 実験医学 26, 2074-2080. (査読無し)

[学会発表] (計 10 件)

1. 大澤郁朗. 水素水による認知・記憶障害抑制効果のモデル動物を用いた検討. 分子水素医学シンポジウム. 2011.2.18-19. 名古屋
2. Ohsawa, I. Consumption of hydrogen water prevents the age-dependent impairment in learning and memory tasks in AD model mice. International Conference on Alzheimer's Disease 2010 (ICAD2010). 2010.7.10-15. ホノルル (米国)
3. 上村尚美. 水素分子は、肝臓グリコーゲン中に蓄積し、糖尿病モデルマウスの症状を改善する. BMB2010. 2010.12.7-10. 神戸
4. Nishimaki, K. Consumption of hydrogen water prevents the age-dependent impairment in learning and memory tasks in Alzheimer model mice. 7th ASMRM & 10th J-mit. 2010.12.16-18. 福岡
5. Kamimura, N. Molecular hydrogen improves obesity and diabetes by inducing FGF21 through reducing oxidative stress in *db/db* mice. 7th ASMRM & 10th J-mit. 2010.12.16-18. 福岡
6. Ohsawa, I. Rapid diffusion of hydrogen molecule from hydrogen-containing eye drops reduces retinal ischemia-reperfusion injury. 7th ASMRM & 10th J-mit. 2010.12.16-18. 福岡
7. 大澤郁朗. 水素分子の還元力を利用した新しい医療. 第44回日本高気圧環境・潜水医学会学術総会. 2009.11.1. 東京
8. 大澤, 郁朗. 酸化ストレスを伴う認知・記憶障害の水素分子による抑制.
9. 第27回日本認知症学会. 2008.10.11. 前橋
10. Ohsawa, I. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant in the brain ischemia and restores learning- and memory-deficits declined by physical restraint stress. International Conference on Alzheimer's Disease 2008 (ICAD2008). 2008.7.28. シ

カゴ (米国)

[図書] (計 0 件)
[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

http://www.tmig.or.jp/J_TMIG/j_research/DA24.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大澤 郁朗 (Ohsawa Ikuroh)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長

研究者番号 : 30343586

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

太田 成男 (Ohta Shigeo)

日本医科大学・医学研究科・教授

研究者番号 : 00125832

三上 俊夫 (Mikami Toshio)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 60199966