

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月29日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500680

研究課題名（和文）酸化ストレス亢進マウスを用いた水素分子による認知症予防効果

研究課題名（英文）Protective effect of hydrogen molecule learning and memory function in oxidative stress induced mice.

研究代表者

西槇 貴代美（NISHIMAKI KIYOMI）

日本医科大学・老人病研究所・マネジメントサポートスタッフ

研究者番号：00465345

研究成果の概要（和文）：

アルツハイマー病、パーキンソン病に代表される神経変性疾患は、加齢に伴う酸化ストレスの蓄積が大きな要因である。一方、活性酸素種の中には一酸化窒素のように生理的に必要なものもある。従って抗酸化物質を摂取する場合、有害な活性酸素種のみを除去し、生理的に必要な活性酸素種を損なわないようにしなければならない。本研究では、アルツハイマー病モデルマウスにおいて、水素分子を長期摂取することにより、加齢に伴う脳の酸化ストレスが軽減され、神経変性疾患の発症が抑制されることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Accumulation of oxidative stress associated with aging is one of causative factors in the pathogenesis of major neurodegenerative diseases including Alzheimer's and Parkinson diseases (AD and PD). Hydrogen molecules (H₂) are superior antioxidants, selectively reduced the hydroxyl radical, the most cytotoxic Ros, without affecting the other oxygen-derived free radicals. In this study, we investigated the effect of an antioxidant, hydrogen molecule (H₂), using DAL mice as Alzheimer's disease animal model. We showed that the consumption of molecular hydrogen reduces brain oxidative stress levels and inhibit the cognitive decline and neurodegeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：スポーツ健康科学・応用健康科学

キーワード：老化・加齢、酸化ストレス、水素

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴う酸化ストレスの蓄積は、糖尿病などの生活習慣病や、アルツハイマー病、パーキンソン病に代表される神経変性疾患など、様々な疾患の発症に強く関与している。従って酸化ストレスの除去は、疾患の予防、治療につながり、すぐれた抗酸化物質の研究開発がさかんに行われている。しかしながら強力な抗酸化剤の過剰摂取は、生体に必要な活性酸素種までも取り除いてしまうことになり、むしろ死亡率が上昇することが報告されている (*J. Am. Med. Assoc.*, 297, 842, 2007)。

我々は、これまでの研究により、水素分子 (H₂) が毒性の強い活性酸素種のみを選択的に還元することを見つけ、脳梗塞モデルラットにおいて、2%水素ガス吸引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, Nishimaki, 他, *Nat. Med.*, 13, 688, 2007)。また水素水の投与は、慢性的身体拘束ストレスにより誘発される脳の酸化ストレスの蓄積を軽減し、神経幹細胞増殖の低下や、認知・記憶力の低下を抑制した (Nagata, 他, *Neuropsychopharmacology*, 34, 501-508, 2008)。他のグループからは、水素水を投与したマウスでは脳の活性酸素種生成が減少すること (Sato, 他, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 375, 346-50, 2008)、パーキンソンモデルマウス、モデルラットへの水素水投与は、ドーパミン作動性神経細胞死に対して顕著な保護作用を有することなどが報告されている (Fu Y., 他, *Neurosci. Lett.*, 453, 81-85, 2009) (Fujita, 他, *PLoS ONE* 4:e7247, 2009)。以上の研究は、水素分子が脳の酸化ストレスを除去し、神経変性疾患の予防・治療にきわめて有効であることを強く示唆している。

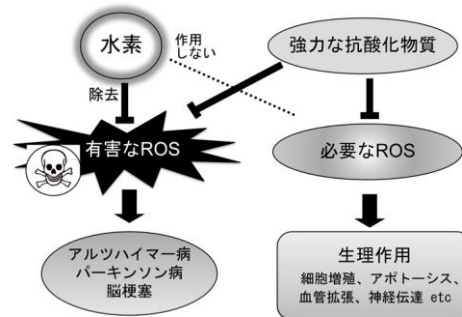
このような背景から、加齢と共に徐々に蓄積する酸化ストレスが発症の原因となるアルツハイマー病においても、水素分子が疾患を予防し、症状の改善に有効であることが予測された。

2. 研究の目的

脳での酸化ストレスが亢進している神経変性疾患モデルマウスを用いて、水素分子の効果を検証する。具体的には、酸化ストレスの除去効果、認知機能障害の抑制効果、神経変性の抑制効果を調べ、水素分子が神経変性

疾患の予防、治療に有効であるか否かを総合的に評価する。

3. 研究の方法



強力な抗酸化物質は必要なROS(活性酸素種)まで消去してしまうが、水素は有害なROSのみ選択的に除去する。

(1) 神経変性疾患モデルマウス-DAL マウス

我々がこれまでの研究で開発した酸化ストレス亢進マウス-DAL マウス (DAL: Dominant-negative of ALDH2) を使用した。このマウスはミトコンドリア ALDH2 活性を低下させたマウスで、脳の酸化ストレスが亢進して、海馬での神経変性、学習記憶力の低下、寿命の短縮が認められる神経変性疾患モデルマウスである (Ohsawa, Nishimaki, 他, *J. Neurosci.*, 28: 6239-49, 2008)。

(2) 水素分子の投与方法

飲用水として水素水 (水素水を精製水に飽和レベルまで溶解させたもの) を与えて自由摂取させた。対照水は、水素水から水素ガスを脱気させたものを用いた。給水は週6日行い、給水瓶は水素が抜けないように特別に工夫してあるものを使用した。実験開始時 (1ヶ月齢、または8ヶ月齢) より実験終了時 (18ヶ月齢) まで連続して投与した。

(3) 酸化ストレスの解析

全身の酸化ストレスレベルは、酸化ストレスマーカーである尿中の 8-OHTG を定量することにより行った。脳の酸化ストレスレベルは、解剖時 (18ヶ月齢) に脳を採取し、過酸化脂質のマーカーであるマロンジアルデヒドの量を定量することにより行った。

(4) 学習、記憶障害の解析

学習、記憶障害の程度を判断する2種類の行動試験を行った。すべての行動試験はマウ

スの行動が盛んになる 19 時以降に行った。

①新奇物体認識試験：13-14 ヶ月齢、17-18 ヶ月齢の 2 回行った。

②受動回避学習試験：17-18 ヶ月齢にて行った。

(5) 脳の組織学的解析

18 ヶ月齢にて解剖し、脳を取り出して組織標本を作製した。HE 染色、免疫染色 NeuN 抗体 (a neuronal marker)、GFAP 抗体 (an astrocytic marker)、Iba1 抗体 (a microglial marker)) を行い、海馬 CA1 領域の神経変性の程度を評価した。

(6) 寿命解析

DAL マウスは水素水群、対照群に分け、5 週齢より水素水飲用を開始した。水素水摂取は死亡するまで継続し、寿命解析は Kaplan-Meier 法にて行った。

4. 研究成果

(1) 酸化ストレスについて

全身の酸化ストレスレベルを評価するために、14-15 ヶ月齢にて尿中の 8-OHTG を定量した。その結果、水素水群が対照群に比べて全身の酸化ストレスレベルが低かった。そこで、脳における酸化ストレスレベルを評価するために、18 ヶ月で解剖し、脳の MDA を定量した。その結果、水素水の投与が脳の酸化ストレスの蓄積を軽減していることが明らかとなった (図 1)。

(2) 学習、記憶障害について

DAL マウスは、野生型マウスに比較して学習、記憶能力が低下しているのが特徴である。DAL マウスに 1 ヶ月齢から水素水を投与したところ、新規物体認識試験、受動回避試験の

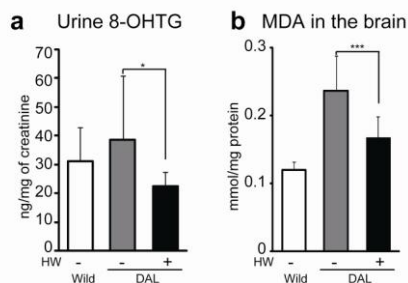


図 1. 水素分子投与による酸化ストレスの軽減
1 ヶ月齢から水素水自由摂取にて飼育したマウスの酸化ストレスマーカーを測定した。
(a) 尿中 8-OHTG 濃度 (14-15 ヶ月齢) * $p < 0.05$
(b) 脳のマロンジアルデヒド濃度 (18 ヶ月齢) *** $p < 0.001$

2 種類の行動試験において、水素水群で学習、記憶能力の低下が抑制されていた。さらにマウスが熟年期に達した 8 ヶ月齢から水素水を投与した群においても、新規物体認識試験において、学習、記憶能力の低下が抑制されていた (図 2)。この結果より、水素水投与が学習、記憶障害の予防だけでなく、改善の効果があることが示唆された。

(3) 脳の組織学的解析について

免疫染色標本脳海馬 CA1 領域の神経変性の程度を評価した。その結果、水素水の投与が神経変性を抑制することが明らかとなった (図 3)。

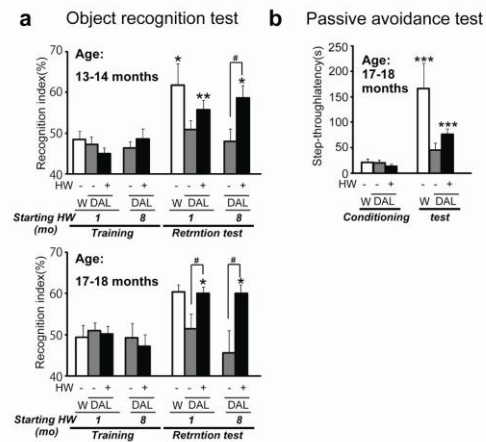


図 2. 水素分子投与による学習・記憶障害の改善
(a) 新奇物体認識試験 (13-14 ヶ月齢および 17-18 ヶ月齢)
Starting HW は水素水投与を開始した月齢を示す。
(b) 受動回避学習試験 (17-18 ヶ月齢)
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, # $p < 0.05$

(4) 寿命について

DAL マウスは野生型マウスに比べて寿命が短いのが特徴である。この DAL マウスを水素水の自由摂取にて飼育したところ、平均寿命が延長することが明らかとなった (図 4)。しかしながら最終の死亡年齢に差は見られなかった。

以上の結果より、水素分子が加齢に伴う神経変性疾患の予防、治療に有効であることが明らかとなった。

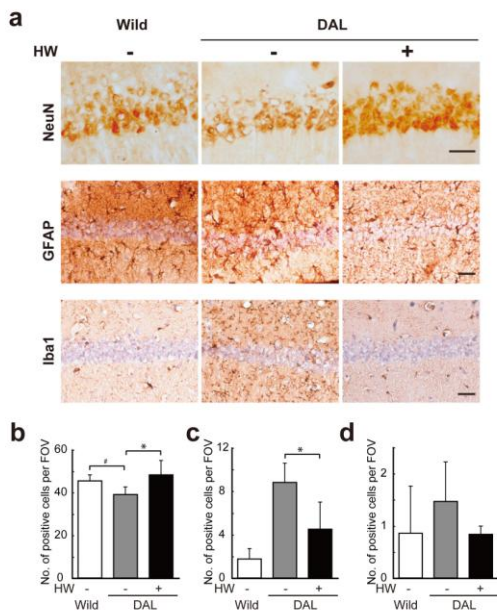


図3. 水素分子投与による神経細胞変性の抑制
 (a) 18ヶ月齢での脳海馬CA1領域の免疫染色
 (b) NeuN, (c) GFAP, (d) Iba1は単位面積当たりの陽性細胞の数を示す。* $p < 0.01$, # $p < 0.05$

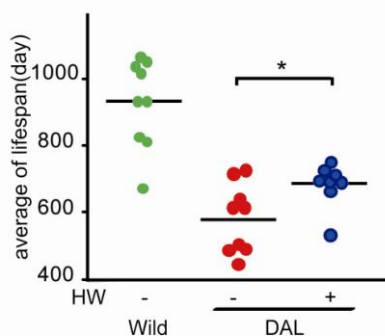


図4. 水素分子投与による寿命の延長効果
 * $p < 0.05$

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2件)

① Rikimaru N, Ohsawa Y, Wolf AM, Nishimaki K, Ichimiya H, Kamimura N, Nishimatsu S, Ohta S, Sunada Y.: Taurine ameliorates impaired mitochondrial function and prevents stroke-like episodes in patients with MELAS. *Intern Med.* (査読有) 2012;51(24):3351-3357. (DOI:10.2169/internalmedicine.51.7529)

② Kamimura N, Nishimaki K, Ohsawa I, Ohta

S.: Molecular Hydrogen Improves Obesity and Diabetes by Inducing Hepatic FGF21 and Stimulating Energy Metabolism in db/db Mice. *Obesity.* (査読有) 2011;19(7):1396-1403. (DOI: 10.1038/oby.2011.6.)

[学会発表] (計14件)

① Kiyomi Nishimaki: Consumption of hydrogen water is effective for the progression of Alzheimer's disease. AD/PD2013 (The 11th International Conference On Alzheimer's & Parkinson's Diseases) Florence, Italy, March 6-10, 2013

② Takashi Yokota: Hydrogen Molecule improves leaning and memory function in mitochondrial oxidative stress-induced Alzheimer model mice. AD/PD2013 (The 11th International Conference On Alzheimer's & Parkinson's Diseases) Florence, Italy, March 6-10, 2013

③ Naomi Kamimura: APP transgenic mice with oxidative stress. AD/PD2013 (The 11th International Conference On Alzheimer's & Parkinson's Diseases) Florence, Italy, March 6-10, 2013

④ Takuya Kanamaru: Effects of intravenous transplantation of bone marrow mononuclear cell on Alzheimer's disease mouse models. AD/PD2013 (The 11th International Conference On Alzheimer's & Parkinson's Diseases) Florence, Italy, March 6-10, 2013

⑤ 金丸拓也: ミトコンドリアアルデヒド脱水素酵素2活性欠損マウス(DAL101マウス)に対する骨髄単核球移植の認知機能改善効果. 第12回日本ミトコンドリア学会年会. 2012年12月19-21日 つくば

⑥ Wolf Alexander M: Optical recording of oxidative stress in live mice. 第12回日本ミトコンドリア学会年会. 2012年12月

19-21日 つくば

⑦上村尚美：ヒト変異APP高発現マウスと酸化ストレス亢進マウスとの掛け合わせマウスの解析. 第35回日本分子生物学会 2012年12月11-14日 福岡

⑧金丸拓也：アルツハイマーモデルマウスに対する他家骨髄単核球投与の認知機能改善効果. 第35回日本分子生物学会 2012年12月11-14日 福岡

⑨Wolf Alexander M: Optical recording of oxidative stress in live Mice. 第35回日本分子生物学会 2012年12月11-14日 福岡

⑩ Kiyomi Nishimaki, : Transgenic mice expressing roGFP have potential to estimate oxidative stress in vivo. 第34回日本分子生物学会. 2011年.12月13-16日 横浜

⑪Alexander Wolf: IN vivo measurements of skin oxidative stress using mice expressing redox-sensitive GFP. 5th SFRR-Asia, 8th ASMRM, 11th J-mit, 2011Symposium. Kagoshima 2011.8.31-9.4

⑫ Kiyomi Nishimaki: Transgenic mice expressing the redox-sensitive green fluorescent protein. 5th SFRR-Asia, 8th ASMRM, 11th J-mit, 2011 Symposium Kagoshima 2011.8.31-9.4

⑬Kiyomi Nishimaki: Preventive effect of hydrogen-dissolved water on age-dependent decline of learning and memory in Alzheimer model mice. The eighth European Meeting on Mitochondrial Pathology (Euromit 8) スペイン 2011.6.20-23.

⑭ Kiyomi Nishimaki: Consumption of hydrogen water prevents the age-dependent impairment in learning and memory tasks in Alzheimer model mice. 7th ASMRM (Asian symposium of Mitochondrial Research and

Medicine) and 10th J-mit (Japanese Mitochondrial Research and Medicine) 福岡. 2010.12.16-18.

[その他]

<http://home.nms.ac.jp/ig/saiboseibutsu/gyoseki.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

西槇 貴代美 (KIYOMI NISHIMAKI)

日本医科大学・老人病研究所・マネージメントサポートスタッフ

研究者番号：00465345