

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500971

研究課題名(和文) 生体内酸化ストレスの定量的評価システムを用いた水素分子による糖尿病改善効果の解析

研究課題名(英文) Analysis of the effect of molecular hydrogen on diabetes using quantitative evaluation system of oxidative stress in vivo

研究代表者

上村 尚美 (Kamimura, Naomi)

日本医科大学・付置研究所・准教授

研究者番号：60283800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、これまでの研究により、水素分子(H<sub>2</sub>)が抗酸化物質として優れており、2型糖尿病モデル動物(db/dbマウス)に水素分子を投与することによって、高血糖や肥満が改善することを発見した。本研究では、生体内の酸化ストレスを定量評価できるトランスジェニックマウスを開発し、さらに糖尿病モデルマウス(db/db)との掛け合わせを行い、糖尿病モデルマウスでの生体内酸化ストレスを生きた状態のマウスで定量評価することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We have reported that molecular hydrogen (H<sub>2</sub>) has great potential for improving oxidative stress-related diseases by inhaling H<sub>2</sub> gas, injecting saline with dissolved H<sub>2</sub>, or drinking water with dissolved H<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>-water). In this study, we showed drinking H<sub>2</sub>-water improved obesity and hyperglycemia in db/db mice. Furthermore, we developed a transgenic mouse that can quantitatively evaluate the oxidative stress in the body. We crossed the mice with db/db mice to measure oxidative stress in living mice.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：糖尿病 酸化ストレス 抗酸化剤

### 1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスは、糖尿病を誘発する原因のひとつと考えられている。また、糖尿病を発症すると酸化ストレスがさらに増加し、腎症や網膜症等の合併症を引き起こすことが知られている。一方、ビタミンCや $\alpha$ -リポ酸等の抗酸化物質は、糖尿病や合併症の改善により作用をもつことが動物モデルおよび臨床例において報告されている(Ann. N. Y. Acad. Sci., 1031, 204, 2004; Cardiovasc. Diabetol., 4, 5, 2005)。

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( $\text{NO}\cdot$ )は神経伝達物質として機能し、血管の拡張に必須である(Biosci. Rep., 24, 452, 2004)。

これらの点を考えると、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、生理作用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。実際、強力な抗酸化物質を日常的に摂取していると、むしろ死亡率は上昇することが報告されている(J. Am. Med. Assoc., 297, 842, 2007)。

申請者らは、これまでの研究により、水素分子( $\text{H}_2$ )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(Nat. Med., 13, 688, 2007)。また、抗がん剤の副作用による腎障害の軽減や、ストレス負荷によって生じる記憶力の低下の

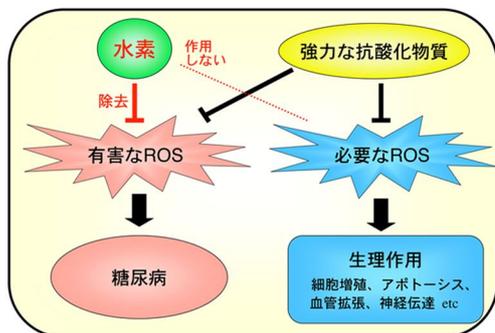


図1. 強力な抗酸化物質は必要なROS(活性酸素種)まで消去してしまうが、水素は有害なROSのみ選択的に除去する。

改善等、幅広い領域において酸化ストレスが関与する症状の改善に効果があることを報告した(Cancer Chemother Pharmacol., 64,753, 2009, Neuropsychopharmacology., 34, 501, 2009)。

以上の研究から、水素分子による酸化ストレス障害の軽減を明らかにしているため、酸化ストレスがその一因となっている糖尿病もまた改善できることが予想された。

### 2. 研究の目的

糖尿病の発症と進行における酸化ストレスの発生と蓄積、及び、水素分子による酸化ストレスの除去を明らかにする。そして、個体レベルでの酸化ストレスの定量的評価が可能なマウスを開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1) モデル動物

レプチンレセプターに遺伝子変異を有するdb/dbマウスを2型糖尿病モデルマウスとして使用した。また、db/+マウス(肥満および糖尿病を発症しない)を正常群として使用した。

#### (2) 水素分子の投与方法

飲用水として水素水(水素ガス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したものをを用いた。給水は毎日行い、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(6週齢)より実験終了時(18週齢)まで連続して投与した。

#### (3) 肥満、糖尿病症状の解析

経時的に体重を測定し、体重変化を観察した。また、小動物用CTスキャンにて皮下脂肪と内臓脂肪を測定した。血糖値、血中インスリン、中性脂肪等の血液パラメーターについては解剖時に心臓より採血し測定を行った。

#### (4) 生体内酸化ストレスを定量評価できるトランスジェニックマウスの作製

roGFP(酸化還元状態により励起波長スペクトルが変化する緑色蛍光タンパク質)を発現するトランスジェニックマウスを作製する。酸化ストレスはミトコンドリアで酸素を

利用してエネルギーを産生する際に発生するため、ミトコンドリア内の酸化ストレスを測定できるように、ミトコンドリアターゲティングシグナルを付加した roGFP を発現するトランスジェニックマウスと細胞全体で roGFP を発現するトランスジェニックマウスの2種類を作製する。

(5) 生体内の酸化ストレスを時空間的に定量評価できる糖尿病モデルマウスの作製

(4) で作製した roGFP トランスジェニックマウスと2型糖尿病モデルマウス (db/db マウス) の掛け合わせを行い生体内酸化ストレスを定量評価できる糖尿病モデルマウスを作製する。

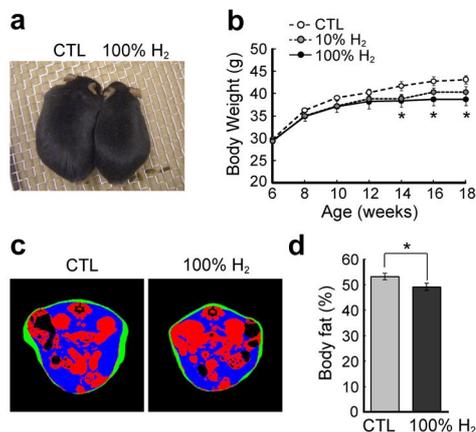


図2. 水素分子投与による肥満の改善

(a)100%水素水 (0.8mM)、または、対照水投与3ヶ月後 (18週齢) のマウスの外観。(b)100%水素水 (0.8mM)、10%水素水 (0.08mM)、または対照水を投与した場合の体重変化。(c)100%水素水、または、対照水投与3ヶ月後のマウスのCT画像。青、緑、赤色は、それぞれ内臓脂肪、皮下脂肪、筋肉を示す。(d)100%水素水、または、対照水投与3ヶ月後のマウスの体脂肪率。\* $p < 0.05$

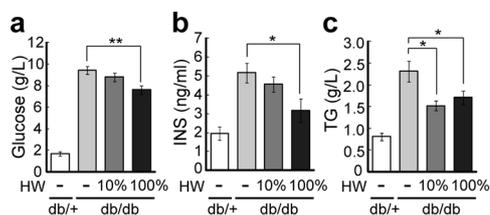


図3. 水素分子投与による血糖値、血中インスリン濃度、中性脂肪濃度の改善

100%水素水 (0.8mM)、10%水素水 (0.08mM)、または対照水投与3ヶ月後の(a)血糖値、(b)血中インスリン濃度、(c)血中中性脂肪濃度。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$

#### 4. 研究成果

##### (1) 肥満と高血糖について

2型糖尿病モデルマウス (db/db) に水素分子を投与したところ、初めは対照投与群と同様に体重が増加したが、途中から体重増加が抑制されるようになり肥満が改善されることが明らかとなった (図2)。この時、摂食量と飲水量については水素分子投与群と対照群で差は見られなかった。

さらに、血糖値、血中インスリン濃度、中性脂肪濃度の低下にも効果を有することがわかった (図3)。これらの効果は、飽和水素水 (0.8mM) を投与した場合、対照群と比べ有意な差であった。また、10倍に薄めた水素水 (0.08mM) については、有意ではないものの差がある傾向にあった。

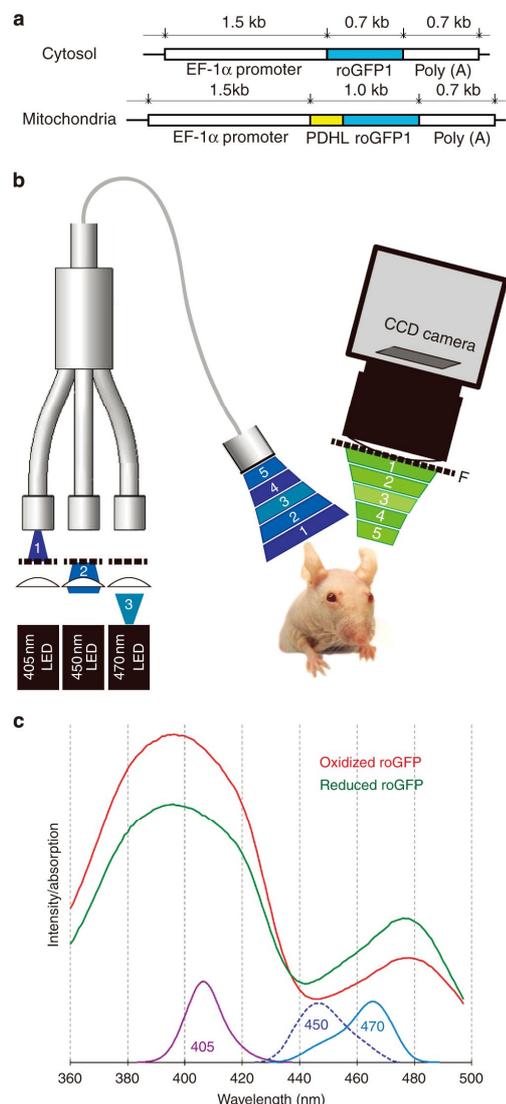


図4. (a) トランスジェニックマウスに導入した遺伝子。PDHLはミトコンドリアターゲティングシグナル。(b) roGFP蛋白質の蛍光の測定方法。(c) 酸化状態と還元状態のroGFPの吸光スペクトルの違い。

(2) 生体内の酸化ストレスを定量評価できるモデルマウスの開発について

roGFP 蛋白質は、酸化還元状態により立体構造中の S-S 結合の形成、切断が起こる。S-S 結合の有無により立体構造が変化し、405nm と 480nm 励起波長による蛍光強度の比率が変化する。この roGFP を発現しているトランスジェニックマウスを作製した(図4)。励起波長の 405nm と 480nm、さらに自家蛍光を測定するための波長である 450nm の LED ランプや CCD カメラ、動物麻酔装置等を測定用の暗箱に設置し測定装置を組み立てた。roGFP は酸化状態と還元状態において 405nm と 480nm で励起した場合の吸光スペクトルが異なるため、2つの励起波長による蛍光強度の比率により酸化還元状態を表すことができる。そこで、405nm と 480nm の蛍光強度の比率を色に変換して視覚的に理解できるようにした(図5)。このマウスの組織を酸化剤である過酸化水素と還元剤である DTT で処理した時に酸化還元状態により予想通り色が変化し、酸化還元状態の測定にこのトランスジェニックマウスが利用できることがわかった。

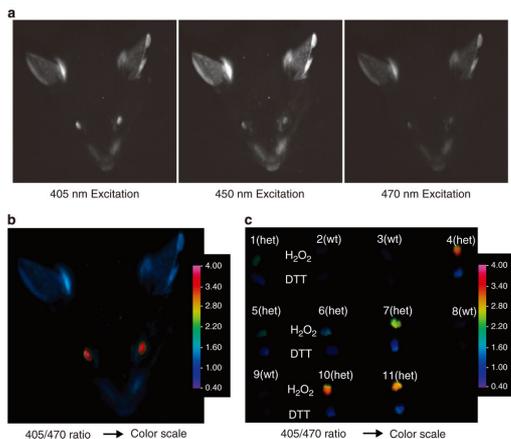


図5. (a) 405、450、470nm励起波長で撮影した画像。(b) 405nmと470nm励起波長における蛍光強度の比率を色に変換。(c) 野生型マウスとヘテロマウスを過酸化水素とDTTで処理した際の405/470nm蛍光強度の比率を色に変換。

(3) 生体内の酸化ストレスを時空間的に定量評価できる糖尿病モデルマウスの作製について

上記のトランスジェニックマウスを2型糖尿病モデルマウスの db/db マウスと掛け合

わせを行い、糖尿病モデルマウスでの生体内酸化ストレスを生きた状態のマウスで定量評価することに成功した。Db/db マウスでは、血糖値が上昇するよりも早い時期に酸化ストレスへの感受性が高まっていることが明らかとなった。また、ミトコンドリアは酸素を利用してエネルギーを産生する際に活性酸素を発生するが、抗酸化機能が備わっているため酸化ストレスへの感受性は細胞質より低いことも明らかとなった。(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

(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24件)

Wolf AM, Nishimaki K, Kamimura N, Ohta S: Real-Time Monitoring of Oxidative Stress in Live Mouse Skin. *J Invest Dermatol*. 査読有 2014; 34(6): 1701-1709

Lee H, Ohno M, Ohta S, Mikami T: Regular Moderate or Intense Exercise Prevents Depression-Like Behavior without Change of Hippocampal Tryptophan Content in Chronically Tryptophan-Deficient and Stressed Mice. *PLoS One*. 査読有 2013; 4:8(7): e66996.

Takahashi M, Wolf AM, Watari E, Norose Y, Ohta S, Takahashi H: Pilot study of H2 therapy in Parkinson's disease: A randomized double-blind placebo-controlled trial. *Mov Disord*. 査読有 2013; 28(6): 836-839.

Yoritaka A, Takanashi M, Hirayama M, Nakahara T, Ohta S, Hattori N: Pilot study of H2 therapy in Parkinson's disease: A randomized double-blind placebo-controlled trial. *Mov Disord* 査読有. 2013; 28(6): 836-839.

Nojima A, Yamashita M, Yoshida Y, Shimizu I, Ichimiya H, Kamimura N, Kobayashi Y, Ohta S, Ishii N, Minamino T: Haploinsufficiency of akt1 prolongs the lifespan of mice. *PLoS One*. 査読有 2013; 8(7): e69178.

Lee H, Kiuchi T, Muto J, Ohta S, Mikami T: Intense exercise enhances the hippocampal proliferation of progenitor cells via activating the Flk1 signaling cascade in mice. *GAZZETA MEDICA ITALIANA ARCHIVIO PER LE SCIENZE MEDICHE A Journal on Internal Medicine and Pharmacology* 査読有 2013 in press.

鈴木吉彦、島田朗、佐野元昭、太田成男: 3271番位 tRNALue(UUR)変異を有するミト

コンドリア糖尿病の 15 年を超えた追跡経過観察 糖尿病学会誌 査読有 2013; 56(3): 173-8.

Hayashida K, Sano M, Kamimura N, Yokota T, Suzuki M, Maekawa Y, Kawamura A, Abe T, Ohta S, Fukuda K, Hori S.: H<sub>2</sub> gas improves functional outcome after cardiac arrest to an extent comparable to therapeutic hypothermia. *J. Am. Heart Assoc.* 査読有 2012; 1(5): e003459.

Hoshi H, Hao W, Fujita Y, Funayama A, Miyauchi Y, Hashimoto K, Miyamoto K, Iwasaki R, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto H, Yoshida S, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Kitagawa K, Nakayama KI, Kawamoto T, Sano M, Fukuda K, Ohsawa I, Ohta S, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Toyama Y, Miyamoto T.: Aldehyde-stress resulting from Aldh2 mutation promotes osteoporosis due to impaired osteoblastogenesis. *J. Bone Miner Res.* 査読有 2012; 27(9): 2015-2023.

Rikimaru M, 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.

Koga Y, Tanaka M, Ohta S, Wei YH.: Biochemistry of mitochondria, life and intervention 2010. *Biochim Biophys Acta.* 査読有 2012; 1820(5): 551-552.

Kashio A, Sakamoto T, Kakigi A, Suzuki M, Suzukawa K, Kondo K, Sato Y, Asoh S, Ohta S, Yamasoba T. Topical application of the antiapoptotic TAT-FNK protein prevents aminoglycoside-induced ototoxicity. *Gene Ther.* 査読有 2012; 19(12): 1141-1149.

Sakurazawa M, Katsura K, Saito M, Asoh S, Ohta S, Katayama Y.: Mild hypothermia enhanced the protective effect of protein therapy with transductive anti-death FNK protein using a rat focal transient cerebral ischemia model. *Brain Res.* 査読有 2012; 1430: 86-92.

Shimokawa K, Oshiro R, Yamanaka K, Ashizawa K, Ohta S, Tatemoto H.: Improvement of the post-thaw qualities of Okinawan native Agu pig sperm frozen in an extender supplemented with antiapoptotic PTD-FNK protein. *Theriogenology.* 査読有 2012; 78(7): 1446-1455.

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 (Silver Spring).* 査読有 2011; 19(7): 1396-1403.

Terasaki Y, Ohsawa I, Terasaki M, Takahashi M, Kunugi S, Dedong K, Urushiyama H, Amenomori S, Kaneko-Togashi M, Kuwahara N, Ishikawa A, Kamimura N, Ohta S, Fukuda, Y.: Hydrogen Therapy Attenuates Irradiation-induced Lung Damage by Reducing Oxidative Stress. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 査読有 2011; 301(4): L415-L426.

Shinmura K, Tamaki K, Sano M, Nakashima-Kamimura N, Wolf AM, Amo T, Ohta S, Katsumata Y, Fukuda K, Ishiwata K, Suematsu M, Adachi T.: Caloric restriction primes mitochondria for ischemic stress by deacetylating specific mitochondrial proteins of the electron transport chain. *Circ Res.* 査読有 2011; 109(4): 396-406.

Hanaoka T, Kamimura N, Yokota T, Takai S, Ohta S.: Molecular hydrogen protects chondrocytes from oxidative stress and indirectly alters gene expressions through reducing peroxynitrite derived from nitric oxide. *Med. Gas Res.* 査読有 2011; 1(1): 18.

Nagare T, Sakaue H, Matsumoto M, Cao Y, Inagaki K, Sakai M, Takashima Y, Nakamura K, Mori T, Okada Y, Matsuki Y, Watanabe E, Ikeda K, Taguchi R, Kamimura N, Ohta S, Hiramatsu R, Kasuga M.: Overexpression of KLF15 transcription factor in adipocytes of mice results in down-regulation of SCD1 protein expression in adipocytes and consequent enhancement of glucose-induced insulin secretion. *J Biol Chem.* 査読有 2011; 286(43): 37458-37469.

Amo T, Sato S, Saiki S, Wolf AM, Toyomizu M, Gautier CA, Shen J, Ohta S, Hattori N. Mitochondrial membrane potential decrease caused by loss of PINK1 is not due to proton leak, but to respiratory chain defects. *Neurobiol. Dis.* 査読有 2011; 41(1): 111-118.

② Chihara N, Amo T, Tokunaga A, Yuzuriha R, Wolf AM, Asoh S, Suzuki H, Uchida E, Ohta S.: Mitochondrial DNA alterations in colorectal cancer cell lines. *J Nippon Med. Sch.* 2011; 78(1): 13-21.

② Ohta S.: Molecular hydrogen is a novel antioxidant to efficiently reduce oxidative stress with potential for the improvement of mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta.* 査読有 2012; 1820(5): 586-594..

③Ohta S., Nakao, A., Ohno, K.: The 2011 Medical Molecular Hydrogen Symposium: An Inaugural Symposium of the Journal Medical Gas Research. 査読有 Med. Gas Res. 2011; 1(1): 10..

④ Ohta S.: Recent Progress Toward Hydrogen Medicine: Potential of Molecular Hydrogen for Preventive and Therapeutic Applications. Curr. Pharm. Des. 査読有 2011; 17(22): 2241-2252.

〔学会発表〕(計 8 件)

研究代表者が筆頭演者として発表した演題のみ記載。その他の演題は割愛。

上村尚美、金丸拓也、横田隆、井内勝哉、西槇貴代美、高見新也、赤芝洋紀、志鷹義嗣、桂研一郎、片山泰朗、太田成男 アルツハイマー病モデルマウスに対する骨髄単核球移植の予防・治療効果 第 36 回日本分子生物学会 2013 年 12 月

Naomi Kamimura, Takuya Kanamaru, Takashi Yokota, Katsuya Iuchi, Kiyomi Nishimaki, Shinya Takami, Hiroki Akashiba, Yoshitsugu Shitaka, Ken-ichiro Katsura, Yasuo Katayama, and Shigeo Ohta Double transgenic mutants carrying a mutant gene of amyloid precursor protein and dominant-negative gene of mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 accelerates Alzheimer-like phenotypes in transgenic mice. 第 13 回日本ミトコンドリア学会年会 2013 年 11 月

Naomi Kamimura, Takuya Kanamaru, Takashi Yokota, Katsuya Iuchi, Kiyomi Nishimaki, Shinya Takami, Hiroki Akashiba, Yoshitsugu Shitaka, Ken-ichiro Katsura, Yasuo Katayama, and Shigeo Ohta. APP TRANSGENIC MICE WITH OXIDATIVE STRESS. AD/PD2013 (The 11th International Conference On Alzheimer's & Parkinson's Diseases) March, 2013

上村尚美、一宮治美、太田成男 糖尿病モデルマウスにおける分子状水素の効果と遺伝子発現誘導の網羅的解析 第 3 回分子状水素医学シンポジウム 2013 年 2 月

上村尚美、金丸拓也、横田隆、井内勝哉、西槇貴代美、高見新也、赤芝洋紀、志鷹義嗣、桂研一郎、片山泰朗、太田成男 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

Naomi Kamimura, Kiyomi Nishimaki, Harimi Ichimiya, Shigeo Ohta. The effect of molecular hydrogen on various gene expression in liver in db/db mice. 第 34 回日本分子生物学会 2011 年 12 月

Naomi Kamimura, Kiyomi Nishimaki,

Harimi Ichimiya, Ikuroh Ohsawa, Shigeo Ohta. Molecular hydrogen upregulates hepatic mitochondrial lipid metabolism-related genes, reduces oxidative stress, improves obesity in type2 diabetes model mice. 5th SFRR (Society for Free Radical Research)-Asia, 8th ASMRM (Asian symposium of Mitochondrial Research and Medicine), 11th J-mit(Japanese Mitochondrial Research and Medicine) August, 2011

Naomi Kamimura, Kiyomi Nishimaki, Ikuroh Ohsawa, Shigeo Ohta. Molecular hydrogen enhances the expression of a wide variety of lipid metabolism-related genes in liver and reduces oxidative stress, improves obesity in db/db mice. EUROMIT 8 (The eighth European Meeting on Mitochondrial Pathology) June, 2011.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上村 尚美 (Kamimura Naomi)  
日本医科大学・老人病研究所生化学部門  
准教授  
研究者番号: 60283800

### (2) 研究分担者

太田 成男 (Ohta Shigeo)  
日本医科大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 00125832

### (3) 連携研究者

ウォルフ アレクサンダー (Wolf Alexander)  
日本医科大学・老人病研究所生化学部門  
助教  
研究者番号: 20434136