

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592683

研究課題名(和文)重症脳損傷後におけるアルツハイマー病の発症機構の解明と新規予防法の開発

研究課題名(英文)Molecular Hydrogen in Drinking Water Protects against Neurodegenerative Changes Induced by Traumatic Brain Injury

研究代表者

土肥 謙二(DOHI, KENJI)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20301509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：水素水は飲水によって活性酸素を消去することによって、酸化ストレスに関連する病態に有効である。我々は水素水の飲水が頭部外傷による脳損傷後のアルツハイマー病の発症を予防するかについて検討を行った。外傷前の水素水の飲水によって脳浮腫は抑制され、外傷後におけるタウの蓄積を抑制した。さらに、グリアの活性化は抑制し、炎症性サイトカイン産生へ影響していた。また、水素水はミトコンドリアにおけるATP産生へも影響していた。水素水の頭部外傷における機能水として効果が確認された。これらの作用は単にフリーラジカル制御によるだけとは考えにくく、神経炎症やエネルギー代謝への影響などが複雑に関与していることが解明された。

研究成果の概要(英文)：Acute Traumatic brain injury (TBI) can transform into a chronic condition and be a risk factor for Alzheimer's diseases, probably through induction of oxidative stress and neuroinflammation. Here, we examined the ability of the antioxidant molecular hydrogen given in drinking water (mHW) to alter the acute changes after TBI in mice. We found that mHW reversed CCI-induced edema, completely blocked pathological tau expression, accentuated an early increase seen in several cytokines but attenuated that increase by day 7, reversed changes seen in the protein levels of aquaporin-4, HIF-1, MMP-2, and MMP-9, but not for amyloid beta peptide 1-40 or 1-42. Treatment with mHW also reversed the increase seen 4 h after CCI in gene expression related to oxidation/carbohydrate metabolism, cytokine release, leukocyte or cell migration, cytokine transport, ATP and nucleotide binding. These results suggest that it could be an easily administered, highly effective treatment for TBI.

研究分野：救急医学

キーワード：頭部外傷 アルツハイマー病 神経炎症 脳浮腫 ミトコンドリア 酸化ストレス 水素水 抗酸化療法

## 1. 研究開始当初の背景

重症頭部外傷においては現在まで急性期治療を中心に研究が進められてきた現状がある。しかし、近年頭部外傷患者の多くに高次脳機能障害を認めること、あるいは頭部外傷後アルツハイマー型痴呆を発症することが知られてきた。頭部外傷後における高次脳機能障害は一見正常に見えるため、診断や治療が行われないことも多い。その一方で復職や登校が困難となり、社会的経済的な損失は大きい。さらに、頭部外傷後における高次脳機能障害の発症機構や病態は不明な点が多く治療も未だ開発されていないために、その病態の解明や治療法の開発は社会的急務である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は実験的頭部外傷後のアルツハイマー症候群の発症機構と病態について詳細に検討を行うことである。さらにその原因のひとつと考えられている神経炎症の病態への関与と、さまざまな病態でその効果が期待される水素水の新規予防法や治療法への可能性について検討を行うことである。

## 3. 研究の方法

### (1). 直接的ラジカル消去能計測

水素水に直接的ラジカル消去能があるかについて電子スピン共鳴法を用いて計測した。

### (2). 頭部外傷と水素水飲水の効果

**雄野生型 C57BL/6 マウス (8 - 10w)** を用いる。本実験動物を用いて頭部外傷モデル【Controlled Cortical Impactor (CCI)】を作製した。具体的には麻酔下に頭部を固定し、頭頂側頭部に小開頭を施し硬膜を切開する。CCI (3-mm metal impounder at a velocity of 5.0 m/sec and at a depth of 1.0 mm) で頭部外傷を作製した。

次に同モデルマウスに水素水を投与して次

の検討を行った。

非投与群と投与群について脳損傷後の脳浮腫について重量乾燥法にて検討した。

免疫組織化学的手法を用いて外傷後のミクログリア、アストロサイトの活性化、さらにタウ蛋白の蓄積と発現について検討した。

脳浮腫や二次的脳損傷に関与する各種蛋白発現について検討した。さらに水素水飲水による A40、A42 産生抑制効果についてそれぞれ検討した。

炎症性サイトカイン (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF) について多重 ELISA 法を用いて測定する。

ミトコンドリアにおける酸素代謝とエネルギー代謝 (ATP 産生) について検討した。

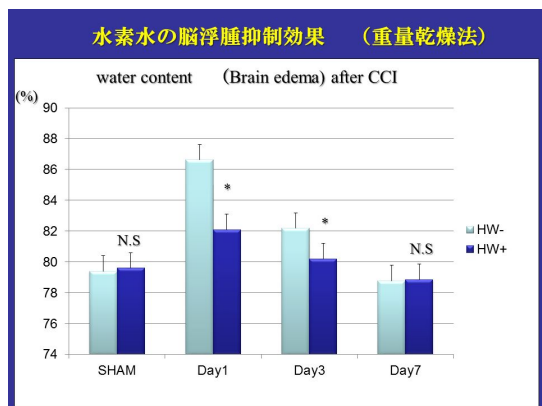
## 4. 研究成果

### 結果 1.

水素水における直接的ラジカル消去能はビタミン C や E と比較してきわめて弱かった。水素水の外傷前飲水の効果は非常に興味深い結果となった。

### 結果 2.

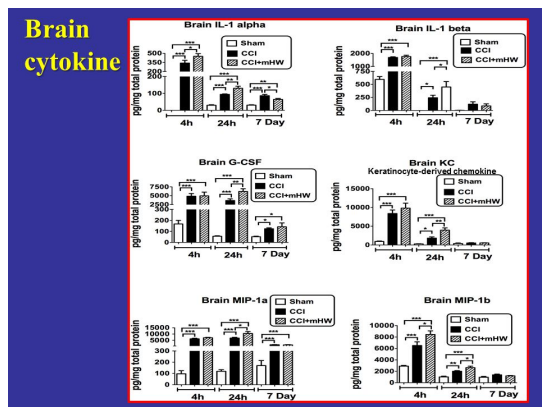
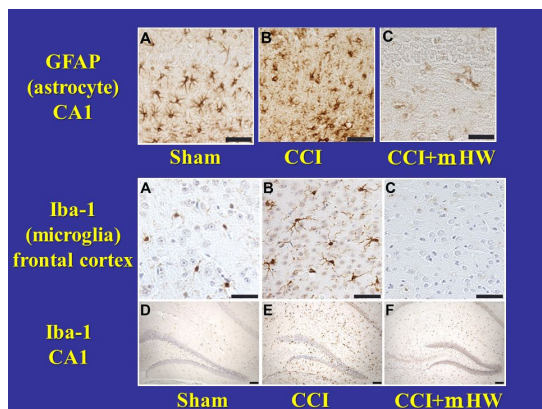
水素水飲水群では外傷後の脳浮腫は抑制されており水素水の抗浮腫効果を認めた。



### 結果 3.

水素水飲水群では外傷周囲におけるミクログリアとアストロサイトの活性化が抑制されていた。また、タウ蛋白の蓄積について

も抑制されていた。また、aquaporin-4, HIF-1, MMP-2, and MMP-9 の発現について両群間に有意差を認めた。その一方で A 40、A 42 産生抑制効果については認められなかった。



結果 4.

水素水飲水群では脳における様々な炎症性サイトカインの発現に影響していた。

**Brain Cytokine levels after TBI**

Cytokine	4 h Post CCI			24 h Post CCI			7 Days Post CCI		
	Sham (n=6)	CCI (n=6)	CCI+mHW (n=6)	Sham (n=7)	CCI (n=7)	CCI+mHW (n=7)	Sham (n=6)	CCI (n=6)	CCI+mHW (n=6)
IL-1α	510	3381.66**	481.447**	201.9	861.27**	133.127**	81.12	841.87**	61.47**
IL-1β	392.24	7663.22**	7193.22**	731.16	264.48*	491.102**	212	1212.62	217.48
IL-2	301.19	64.18	50.6	91.5	31.1	14.24	142.7	18.8	81.4
IL-3	65.4	68.3	81.6	20.2	181.7**	89.9**	271.2	281.7	31.7**
IL-4	119.2	165.11*	128.87*	50.9	87.2**	77.8**	60.9	84.4**	61.9*
IL-5	138.2	133.16	127.12	87.5	92.4	91.2	89.15	88.15	87.16
IL-6	70.7	498.18*	1083.28**	23.9	376.18**	1138.27**	22.2	381.9*	342.9
IL-8	497.26	471.37	462.41	160.19	196.24	200.26	140.11	180.17	182.19
IL-9	340.3	1887.22**	2291.82**	281.23	698.47**	618.47**	387.25	881.92**	670.26*
IL-10	87.13	747.76**	464.73**	101.23	268.42*	240.54*	62.38	141.20	181.15
IL-12	2271.22	2191.14	2389.23	510.88	898.42	880.88*	552.41	470.21	484.41
IL-17	590.24	610.13	560.29	260.4	298.18	190.21	230.22	290.12	250.20
G-CSF	184.12	484.12**	491.104**	54.6	340.147**	421.230**	52.15	120.1*	141.2*
KC	387.12	782.22**	1083.22**	110.17	212.86	230.24	84.86	81.8	81.8
MIP-1a	461.12	636.12**	665.122**	264.15	1871.26*	398.164**	301.165	151.80	151.80
MIP-1b	2710.162	1083.116**	1493.182**	346.26	1083.126**	1083.126**	1387.110	2083.127**	2183.142**
MIP-1α	81.28	620.142**	709.182**	120.18	602.182**	1083.126**	120.14	140.118*	131.124**
MIP-1β	2084.115	1097.182**	842.122**	1084.112	2001.119*	2638.127**	594.120	1371.113	1380.116
MIP-2	61.8	110.14*	126.11*	81.9	160.11**	141.23**	121.19	182.14**	200.14**
MIP-4	1030.111	812.162	788.158*	7239.176	6631.152	6241.118	8109.1309	7188.134	7209.168

ns: NS; \*p<0.05 for CCI vs Sham and for CCI+mHW vs Sham; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 for CCI+mHW vs CCI. Values are the means of three groups.

結果 5.

水素水飲水群においてミトコンドリアにおける酸素代謝とエネルギー産生 (ATP 産生) に影響しており、外傷後の ATP の枯渇を防ぐ役割を持っていることが新たに解明された。

以上の結果より、外傷前からの水素水の飲水によって外傷後の脳浮腫や神経炎症、さらにはミトコンドリアのエネルギー代謝にも影響することが分かった。本研究結果は、水素水が機能水として頭部外傷のみならず脳卒中などの急性脳障害重症化の軽減、あるいは神経変性疾患などの予防効果を有する可能性があることを意味する。今後の臨床応用へ向けてさらなる検討が必要である。

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2件)

Miyamoto K, Ohtaki H, Dohi K, Tsumuraya T, Song D, Kiriyama K, Satoh K, Shimizu A, Aruga T, Shioda S. Therapeutic time window for edaravone treatment of traumatic brain injury in mice. Biomed Res Int. 2013;2013:379206.

Dohi K, Kraemer BC, Erickson MA, McMillan PJ, Kovac A, Flachbartova Z, Hansen KM, Shah GN, Sheibani N, Salameh T, Banks WA. Molecular hydrogen in drinking water protects against neurodegenerative changes induced by traumatic brain injury. PLoS One. 2014. 24;9(9):e108034.

(学会発表)(計7件)

土肥謙二, 林宗貴, 鈴木涼平, 難波義知, 佐々木純, 佐藤和恵, 有賀徹. マウス頭部外傷モデルにおける水素水の脳浮腫抑制効果. 第40回日本救急医学会総会・学術集会. 2012年11月13日. 京都

土肥謙二, 宮本和幸, 有賀徹, 小川武希. マウス頭部外傷モデルにおける水素水の脳浮腫抑制機構. 第36回日本脳神経外傷学会. 2013年3月9日. 愛知

土肥謙二, Banks A Williams, 宮本和幸, 小川武希. 外傷性脳損傷における水素水 (mHW) の効果について. 第41回日本集中治療学会学術集会. 2014年2月28日. 京都

土肥謙二，宮本和幸，佐藤和恵，小川武希．神経機能予後改善を目的とした水素水の効果について．第 67 回日本酸化ストレス学会学術集会．2014 年 9 月 4 日．京都．

土肥謙二，小川武希．神経機能予後改善を目的とした水素付加機能水の効果について．第 42 回日本救急医学会総会・学術集会．2014 年 10 月 28 日．福岡

Dohi K. Hydrogen in drinking water reduces brain edema after traumatic brain injury . SFRBM2014. 2014 年 11 月 21 日.Seattle, USA

土肥謙二，バンクス ウィリアムス，小川武希．水素水の外傷前飲料が頭部外傷後におけるグリア活性化とサイトカイン誘導に与える効果について．第 38 回日本脳神経外傷学会，2015 年 3 月 6 日．徳島．

〔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〕  
ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

土肥 謙二 (DOHI KENJI) 東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20301509

### (2)研究分担者

塩田 清二 (SHIODA SEIJI) 昭和大学・医学部・教授

研究者番号：80102375

有賀 徹 (ARUGA TOHRU) 昭和大学・医学部・教授

研究者番号：40266086

### (3)連携研究者