

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500871

研究課題名(和文)水素水の網膜神経保護効果と酸化ストレスの定量的評価システムによる解析

研究課題名(英文)Neuroprotective effect of H₂ and in vivo redox state recording system of oxidative stress

研究代表者

横田 隆(YOKOTA, TAKASHI)

日本医科大学・付置研究所・その他

研究者番号：30445829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：眼科領域における酸化ストレスの増加は、緑内障や神経変性疾患の病因において重要な役割を有する。我々は、ラット網膜組織の器官培養系においてペルオキシナイトライトによる酸化ストレスに対する選択的な水素分子の網膜細胞保護効果を検討した。水素分子は、ペルオキシナイトライトによる網膜細胞のミトコンドリア膜電位の消失、酸化損傷およびチロシンのニトロ化を抑え、網膜組織の萎縮や網膜細胞のアポトーシスを抑制した。その結果、水素分子はペルオキシナイトライトを選択的に消去することで、網膜細胞の酸化損傷に対する神経保護効果を有することを示唆し、水素分子が緑内障や網膜神経変性疾患の治療に有効である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Oxidative and nitrative processes have an important role in the pathogenesis of glaucomatous neurodegeneration. Exposure of a nitric oxide donor, S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) induce neuronal damage independently of peroxynitrite. We cultured rat retinal tissues in an organotypic culture system with SNAP, in the presence or absence of Molecular hydrogen (H₂). H₂ suppressed loss of mitochondrial membrane potential and apoptosis in retinal cells. Moreover, H₂ decreased the tyrosine nitration level and suppressed oxidative stress damage in retinal cells. SNAP treatment decreased the cell numbers in the retinal cell layer, but the presence of H₂ inhibited this reduction. These findings suggest that H₂ has a neuroprotective effect against retinal cell oxidative damage, presumably by scavenging peroxynitrite.

Thus, H₂ may be an effective and novel clinical tool for treating glaucoma and other oxidative stress-related diseases.

研究分野：細胞生物学

キーワード：水素分子 酸化ストレス 抗酸化

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスと関連づけられる眼科疾患は多く、緑内障、糖尿病性網膜症、加齢黄斑変性白内障などが代表的疾患である。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発生することにより起こる。中でも毒性の高いヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)やペルオキシナイトライト($\cdot\text{ONOO}\cdot$)は、特に中枢神経等に悪影響をもたらすため、除去することが重要である。一方、一酸化窒素(NO)は網膜神経細胞に対して低濃度では保護作用を有しており、神経伝達物質としても機能し、血管の拡張に必須である(Biosci.Rep., 24,452, 2004)。

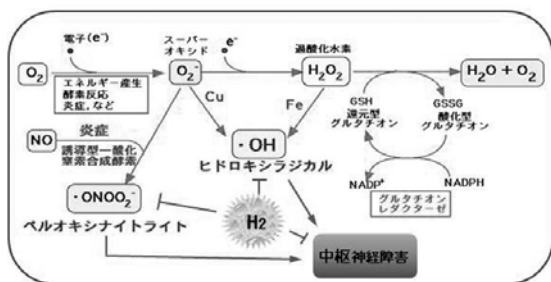


図1 水素分子は中枢神経障害を引き起こす酸化ストレスを選択的に除去する。

気体である水素分子 (H_2) は、生体内のどこにも自由に拡散でき、毒性の高い活性酸素種を選択的に還元する新しい概念の抗酸化物質である(図 1)。以前の研究で、 H_2 分子を溶解させた H_2 水の点眼がラットの虚血 - 再還流によるヒドロキシラジカルを標的とした急性網膜神経障害の保護に有効であったことを示した(Invest Ophthalmol Vis Sci., 51,487, 2010)。本研究では、緑内障の代表的なグルタミン酸 N-メチル-D-アスパラギン酸受容体刺激に伴いラジカルストレスの誘発が起こり、網膜組織の NO が活性化し、ミトコンドリアの呼吸鎖が抑制されて発生したスーパーオキシド ($\cdot\text{O}_2\cdot$) が毒性の強い $\cdot\text{ONOO}\cdot$ に変換されて、徐々に網膜神経細胞へ障害を与えることが報告されている(Invest Ophthalmol vis Sci., 40, 2391, 1999)。そこで $\cdot\text{ONOO}\cdot$ による網膜組織傷害に対する H_2 分子の網膜神経細胞保護作用についてラットの網膜組織の器官培養による *ex vivo* での検討を行った。また、眼球内の酸化ストレスを個体レベルで観察する手法は現在まで開発されていないことからマクロレベルでの酸化ストレスの定量的評価が可能なトランスジェニックマウスを開発することにより、緑内障や白内障などの発症と進行における眼球内の酸化ストレスの蓄積をリアルタイムでモニタリングして評価できるシステムが開発されれば有効なスクリーニング方法に成る。

2. 研究の目的

緑内障は、網膜神経のアポトーシスを伴う

神経変性疾患でその発症機序に酸化ストレスが関与することが指摘されている。本研究では、*ex vivo* での $\cdot\text{ONOO}\cdot$ の暴露による酸化ストレスが原因で起こる網膜組織の酸化損傷やアポトーシスに対して、 H_2 分子の選択的な活性酸素種の除去作用によって、網膜の神経細胞保護作用を示すことを明らかにする。さらに眼球内の酸化ストレスの蓄積と減少を定量評価できるトランスジェニックマウスを開発する。

3. 研究の方法

(1-1) ラット網膜の単離と器官培養

SD ラット (7 週齢、雄) の眼球を麻酔下で摘出後、すぐに網膜神経組織用培地に移して網膜を傷つけないように眼球から剥離し、視細胞層側を下にしてまるごと 0.4 μm フィルター付き培養皿上に乗せて一定の早さで培養液を揺らしつづけることで培地からの栄養素や O_2 交換を行い、なるべく *in vivo* に近い培養条件下で新鮮さを保った状態での器官培養を行った (図 2A)。

(1-2) 培地内への $\cdot\text{ONOO}\cdot$ の発生と H_2 分子の溶解方法

網膜組織は O_2 分子に H_2 分子を溶解させた (95% H_2 +5% O_2) 培地と N_2 分子を溶解させた (95% N_2 +5% O_2) 培地に別々に培養し、その培地に S-nitroso-N-acetylpenicillamine

(SNAP) を投与して $\cdot\text{ONOO}\cdot$ を発生させ、37 $^{\circ}\text{C}$ の条件下で 1~72 時間培養して比較検討した。

(1-3) 酸化ストレスに対する網膜細胞保護作用の評価方法

①網膜細胞のミトコンドリア機能評価

培地内の網膜細胞に $\cdot\text{ONOO}\cdot$ を暴露させた後、ミトコンドリアの膜電位変化検出キット MitoTMRE と共焦点レーザー顕微鏡によるミトコンドリア膜の赤色蛍光を測定する。
②網膜細胞の病理組織学的酸化ダメージの評価

TUNEL アポトーシスキットによる細胞死、酸化ストレスマーカー (8-OHdg と 4 HNE 抗体) による免疫染色およびニトロチロシン抗体による網膜細胞のニトロ化を測定する。

(2) 眼球内の酸化ストレスを時空間的に定量評価できるトランスジェニックマウスを開発し、網膜障害の発症と進行における酸化ストレスの発生と蓄積を随時、モニタリングする。

4. 研究成果

(1) H_2 分子による $\cdot\text{ONOO}\cdot$ 暴露後の網膜細胞保護作用

H_2 分子存在下および非存在下で培養している網膜組織に $\cdot\text{ONOO}\cdot$ を暴露させた後で両者の網膜組織を比較すると H_2 分子を溶解した培地での網膜細胞のミトコンドリアの膜電位の消失が有意に抑制されていた (図 2B,C)。さらに H_2 分子によって細胞死の減少

と酸化ストレスマーカーの 4HNE と 8-OHdG 陽性細胞の減少が認められた(図 3)。また、網膜組織に・ONOO-暴露した後、継続的に網膜細胞のニトロ化を調べた結果、H₂分子によって 24 時間以降の網膜細胞のニトロ化が有意に抑制されていた(図 4)

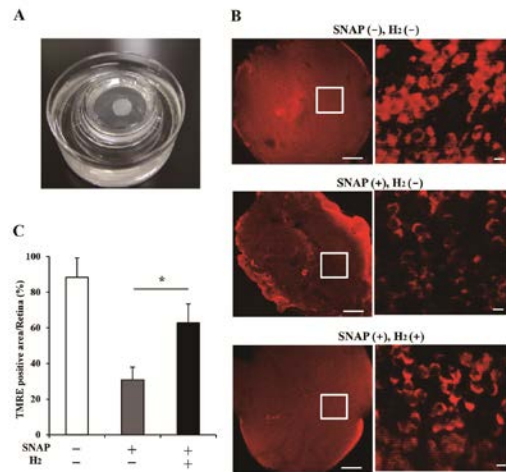


図 2 ペルオキシナイトライトによる暴露と水素分子による網膜細胞のミトコンドリア膜電位消失抑制作用

(A) 網膜組織器官培養皿 (B) 各培養条件下での網膜細胞のミトコンドリア膜上の共焦点レーザー顕微鏡による赤色蛍光の観察。上;ペルオキシナイトライト非存在下のミトコンドリア膜赤色蛍光像、中;水素分子非存在下のミトコンドリア膜赤色蛍光像、下;水素分子存在下のミトコンドリア膜赤色蛍光像。(C) 各培養条件下での網膜細胞のミトコンドリア膜電位消失量の比較。

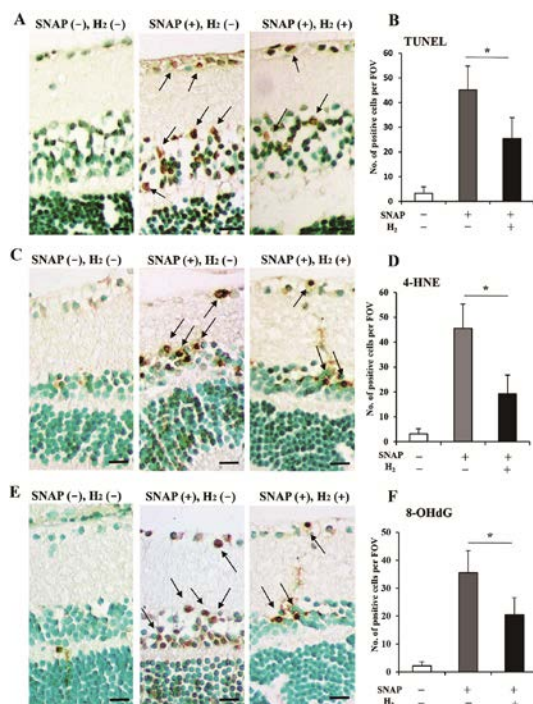


図 3 ペルオキシナイトライトによる暴露と

水素分子による網膜細胞の酸化的損傷の抑制作用

(A,B)各培養条件下での網膜組織の TUNEL 染色とアポトーシス陽性細胞数。(C,D) 各培養条件下での網膜組織の 4HNE 抗体免疫染色とその陽性細胞数。(E,F) 各条件下での網膜組織の 8-OHdG 抗体免疫染色とその陽性細胞数。

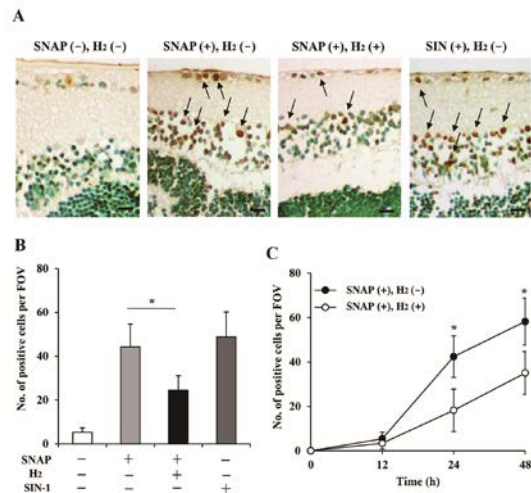


図 4 ペルオキシナイトライトによる暴露と水素分子による網膜細胞のニトロ化抑制作用

(A) 各培養条件下での網膜組織のニトロチロシン抗体免疫染色 (B) ニトロチロシン抗体陽性のニトロ化細胞数 (C) H₂分子存在下・非存在下の網膜組織のニトロ化細胞数の継続的变化

(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 タンパク質は、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。そして S-S 結合の有無により立体構想が変化し、405nm と 480nm 励起波長における蛍光強度の比率が変化する。この roGFP タンパク質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 5a,b)。また、励起波長の 405nm と 480nm、さら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、動物麻酔装置等を備えた測定装置を作製した。細胞内の roGFP タンパク質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って酸化還元状態を示す(図 5c)。そこで 405nm と 480nm の蛍光強度の比率を色変換して、roGFP マウスの眼球や各臓器が肉眼で確認できる画像が得られるようなプログラミングソフトを作製した(図 6a,b)。この roGFP 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 で処理した場合に酸化還元状態により臓器の色が青色～赤色に変化していることが示された(図 6c)。この結果、この roGFP マウスを利用するこ

とで各臓器の酸化還元状態のスクリーニングに利用可能であることが示唆された。

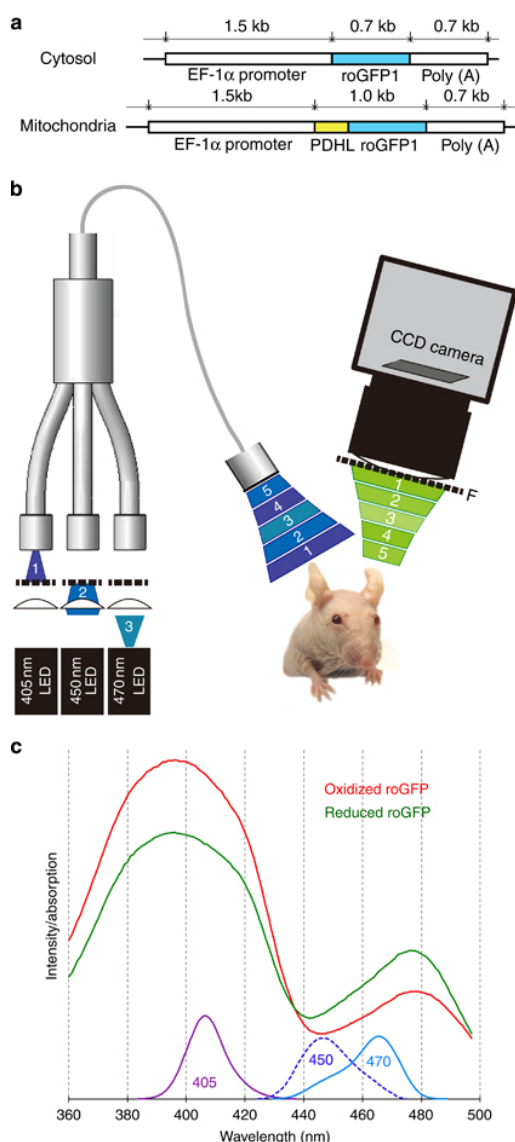


図5 roGFP マウス作製の原理

(a) トランスジェニックマウスに導入した遺伝子を用いて導入ターゲットを Cytosol と mitochondria の 2 か所にした 2 種類の roGFP マウスを作製した。(b) roGFP タンパク質の蛍光強度の測定。(c) 酸化と還元状態の roGFP の吸収スペクトルの違い。

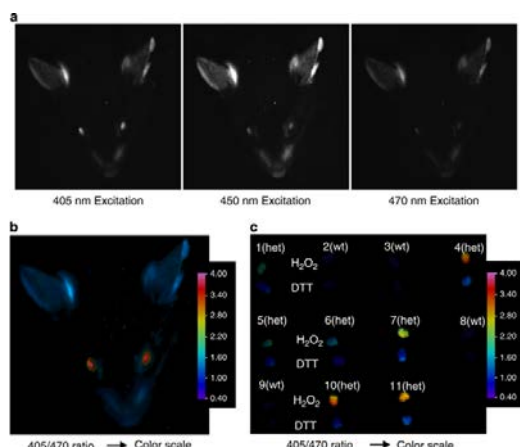


図6 roGFP マウスの眼球蛍光画像

(a) 405,450,480nm 励起波長で撮影した画像。(b) 405nm と 480nm 励起波長における蛍光強度の比率をカラー色画像に変換。(c) 野生型マウスと roGFP マウスの組織を過酸化水素と DTT で処理した際の 405/480nm 蛍光強度の比率をカラー色に変換した画像。

(3) 網膜障害の発症と進行における酸化ストレスの発生と蓄積を解析。

トランスジェニックマウスの作製に成功したことから現在、この roGFP マウスを用いて種々の網膜傷害における網膜組織の酸化還元状態を解析中である。

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 22 件)

1 Yokota, T., Kamimura, N., Igarashi, Takahashi, H., Ohta, S., Oharazawa, S.: Protective effect of molecular hydrogen against oxidative stress caused by peroxynitrite derived from nitric oxide in rat retina. Clin Experimental Ophthalmol. (査読有) 2015 in press.

2 Kanamaru, T., Kamimura, N., Yokota, T., Nishimaki, K., Katsuya Iuchi, K., Lee H., Takami, S., Akashiba, H., Shitaka, Y., Ueda, M., Katsura, KI., Kimura, K., Ohta, S.: Intravenous transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells prevents memory impairment in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. Brain Res. (査読有) 1605:49-58. (2015)

3 Kanamaru, T., Kamimura, N., Yokota, T., Iuchi, K., Nishimaki, K., Takami, S., Akashiba, H., Shitaka Y., Katsura K., Kimura, K., Ohta, S.: Oxidative stress accelerates amyloid deposition and memory impairment in a double-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. (査読有) Neurosci Lett.

- 587:126-31. (2015)
- 4 Hayashida K, Sano M, Kamimura N, Yokota T, Suzuki M, Maekawa Y, Kawamura A, Abe T, Ohta S, Fukuda K, Hori S. Delayed application of H₂ gas starting after resuscitation under normoxia improves neurological outcomes, independently of targeted temperature management, in a rat cardiac arrest model. *Circulation* . (査読有) 130(24):2173-2180 (2014)
- 5 Yokoyama M, Okada S, Nakagomi A, Moriya J, Shimizu I, Nojima A, Yoshida Y, Ichimiya H, Kamimura N, Kobayashi Y, Ohta S, Fruttiger M, Lozano G, Minamino T. Inhibition of endothelial p53 improves metabolic abnormalities related to dietary obesity. *Cell Rep*. (査読有) 7:1691-1703 (2014).
- 6 Wolf AM, Nishimaki K, Kamimura N, Ohta S. Real-Time Monitoring of Oxidative Stress in Live Mouse Skin. *J Invest Dermatol*. (査読有)134:1701-1709 (2014).
- 7 Nakashima Y, Ohsawa I, Nishimaki K, Kumamoto S, Maruyama I, Suzuki Y, Ohta S. Preventive effects of *Chlorella* on skeletal muscle atrophy in muscle-specific mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 activity-deficient mice. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14:390.
- 8 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) 8(7):e66996. (2014)
- 9 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) 8:e69178 (2013).
- 10 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) 28(6):836-9. (2013)
- 11 Takahashi, M., Wolf, AM., Watari, E., Norose, Y., Ohta, S., Takahashi, H.: Increased mitochondrial functions in human glioblastoma cells persistently infected with measles virus. *Antiviral Res*. (査読有) 99(3):238-244.(2013)
- 12 Hayashida K, Sano M, Kamimura N, Yokota T, Suzuki M, Maekawa Y, Kawamura A, Abe T, Ohta S, Fukuda K, Hori S. H₂ Gas Improves Functional Outcome After Cardiac Arrest to an Extent Comparable to Therapeutic Hypothermia in a Rat Model. *J Am Heart Assoc*. (査読有) 1:e003459-e003471 (2012)
- 13 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)1820(5):586-594.(2012)
- 14 Rikimaru M, Ohsawa Y, Wolf AM, Nishimaki K, Ichimiya H, Kamimura N, Nishimatsu S, Ohta S, Sunada Y. Taurine ameliorates impaired the mitochondrial function and prevents stroke-like episodes in patients with MELAS. *Intern Med*. (査読有) 51:3351-3357 (2012).
- 15 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)1430:86-92. 2011
- 16 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)1(1):18.(2011)
- 17 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) 19:1396-1403 (2011).
- 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 in adipocytes of mice results in down-regulation of SCD1 expression in adipocytes and consequent enhancement of glucose-induced insulin secretion. *J Biol Chem*. (査読有) 286:37458-37469 (2011)
- 19 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) 301:L415-L426 (2011).
- 20 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) 109:396-406 (2011).

21 Oharazawa, H., Igarashi, T., Yokota, T., Fujii, H., Suzuki, H., Machide, H., Ohta S. and Ohsawa I.: Protection of the retina by rapid diffusion of Hydrogen: Administration of Hydrogen-loaded eye drops in retinal ischemia-reperfusion injury. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* (査読有) 51:487-92 (2010)

22 Wolf, AM., Asoh, S., Hiranuma, H., Ohsawa, I., Iio, K., Satou, A., Ishikura, M., Ohta, S. : Astaxanthin protects mitochondrial redox state and functional integrity against oxidative stress. *J Nutr Biochem.* (査読有) 21:381-389 (2010)

[学会発表] (計2件)

1 Yokota T., Oharazawa H., Kamimura N., Igarashi T., Takahashi H., Ohta S. ; Molecular hydrogen protects retina from oxidative stress and mitochondrial damage through reducing peroxynitrite derived from nitric oxide. *Euromit Finland 2014*,15-19

2 Nishimaki, K., Wolf AM, Yokota T., Kamimura N. and Ohta S.: Transgenic mice expressing the redox-sensitive green fluorescent protein in the cytosol and mitochondria. *Euromit Finland 2014*,15-19

3 Yokota T. , Nishimaki K., Ohsawa I., Ohta S. ; Hydrogen molecule improves learning and memory function in mitochondrial oxidative stress-induced Alzheimer model mice. *The 11th International Conference AD/PD 2013 Italy 2013*.3.

4 Kamimura N, Kanamaru T, Yokota T., Iuchi K, Nishimaki K, Takami S, Akashiba H, Shitaka Y, Katsura K-I, Katayama Y, Ohta S.: APP transgenic mice with oxidative stress. *AD/PD2013 (The 11th International Conference On Alzheimer's & Parkinson's Diseases) Italy, 2013*.3.7.

5 Kanamaru T, Kamimura N, Iuchi K, Nishimaki K, Yokota T., Takami S, Akashiba H, Shitaka Y, Katsura KI, Katayama Y, Ohta S.: 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) Italy, 2013*.3.7.

6 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、片山泰朗、太田成男

Effect of Intravenous Transplantation of Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells in the Prevention and Treatment of Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. 第36回日本分子生物学会 神戸 2013.12.3-6

7 横田隆、上村尚美、五十嵐勉、高橋浩、小原澤英彰、太田成男

水素分子による網膜保護効果—ラット *ex vivo* 網膜培養系での解析—第4回分子状水素医学シンポジウム 東京 2014.2.1.

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

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 *J-mit2012* つくば. 2012.12.19

9 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 福岡. 2012.12.11

[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/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横田 隆 (Yokota Takashi)

日本医科大学・

先端医学研究所分子生物学部門

マネージメントサポートスタッフ

研究者番号：30445829

(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

ウォルフアレキサンダー (Wolf Alexander)

日本医科大学・

先端医学研究所細胞生物学部門

講師

研究者番号：20434136