

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590768

研究課題名(和文)紫外線障害に対する分子状水素を用いた新規予防法の開発と分子機構の解析

研究課題名(英文)Molecular hydrogen attenuates UV-induced tissue injury in *Caenorhabditis elegans* and mouse

研究代表者

市原 正智 (ICHIHARA, Masatoshi)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：00314013

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)：分子状水素(以下水素)を疾患モデル動物に投与して、疾患の予防・改善効果が得られたことを示した報告が多数ある。そこで本研究では紫外線障害に対する水素の効果を検討した。線虫を用いた検討では水素は紫外線照射に伴う寿命短縮作用を改善した。次にヘアレスマウスを用いて紫外線照射に伴う皮膚癌の発症に対する水素の作用を検討したが、水素非投与マウスに比べて、水素投与マウスでは腫瘍形成時期に有意な遅延がみられた。こうした作用は水素による炎症機転の軽減を介した作用であることが推察された。よって水素は紫外線照射により誘発される皮膚癌発症の初期過程を修飾し、皮膚癌発症を遅延させる効果が期待された。

研究成果の概要(英文)：Molecular hydrogen (H₂) is an agent with potential applications in oxidative stress-related and/or inflammatory disorders. In this study, we investigated whether H₂ attenuates UV-induced tissue injury. We first demonstrated that H₂ protected *Caenorhabditis elegans* from high-dose UV exposure and extends its lifespan. We next examined whether H₂ modified the history of UV-induced skin tumors in hairless mice and found that H₂ delayed skin tumor development in its early phase. We also found that H₂ repressed UV-induced skin inflammation, suggesting that modified skin inflammation may lead to delayed onset of UV-induced skin tumors. Therefore, we concluded that H₂ may prevent UV-induced tissue injury including UV-induced malignant skin tumors.

研究分野：実験病理

キーワード：分子状水素 紫外線 皮膚癌 線虫 炎症

1. 研究開始当初の背景

(1) 環境における紫外線量の増加と疾病

オゾン層破壊による地上における紫外線量の増加により、白内障などの眼障害に加えて皮膚癌(基底細胞癌、扁平上皮癌)および悪性黒色腫の増加が指摘されている。近年大規模なオゾンホールが発生により、紫外線増加に伴う発癌患者の増加はより身近に切迫した環境問題になりつつある。一方紫外線を照射された細胞では紫外線の直接作用、または活性酸素種の発生を介して核内 DNA に pyrimidine dimer の形成などの DNA 損傷を引き起こすとともに、生体内に多岐にわたる細胞内シグナルが惹起され遺伝子発現が変動しストレス反応が生じる。しかしその詳細な機構は依然不明な点が多いとされている。

(2) 分子状水素による疾病制御

2007 年以降より分子状水素を疾患モデル動物に投与して、疾患の予防・改善効果が得られたと多数報告されている。興味深いことに水素が電離放射線による生体の急性障害を軽減することを示した論文も報告されている。我々はこれまでパーキンソン病、即時型アレルギー疾患のモデル動物に対しての水素の効果を確認し報告している(Neurosci Lett 2009, BBRC 2009)。しかし水素の生体に対する効果の分子機構についての詳細はいまだ明かではないのが現状である。

(3) 研究の準備状況

我々は線虫を用いて、分子状水素の投与が生体内の酸化ストレスを軽減することで寿命延長につながるかどうかを検討した。空気中に 2%の濃度で水素を添加して野性株 N2、および酸化ストレス感受性株 mev-1 で検討したが有意な寿命延長効果は観察されなかった。しかし線虫幼虫期に UVB を照射してストレス負荷を行ったところ、紫外線障害に伴う線虫の生存率低下改善させることを見いだした。こうした水素の紫外線保護効果は、成虫期に照射した場合にも同様に観察された。こうした観察結果から分子状水素は紫外線による生体の障害を軽減することが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では紫外線障害に対する分子状水素を用いた新規予防法を提案することを目的とした。予備的検討で分子状水素は紫外線照射された線虫の生存を有意に改善することを見いだしているが、この作用を詳細に検討した。

さらにこの分子状水素の作用をマウスモデル動物にも応用して、皮膚癌の発症を抑制できるかを検証し同時にその分子機構を線虫の場合と対比して解析を行った。線虫で観察された現象を哺乳動物のモデル動物に応用することで最終的に分子状水素を用いた紫外線障害に対する保護方法の提唱に至ることを本研究の最終目的とした。

3. 研究の方法

(1) はじめに線虫の生存率を指標として、紫外線暴露に対する水素の生体保護効果を検討した。線虫は N2 株を用いて空気下のコントロール環境とこれに水素を 4%添加した水素添加環境で飼育し、UVC または UVB の紫外線を照射した後の経時的生存率を確認した。さらに線虫卵を用いて紫外線耐性を検討した。さらに SYTO12 を用いて水素投与に伴う生殖細胞における紫外線照射後のアポトーシスの差を検討した。long PCR の増幅率により DNA 損傷に与える影響を判定した。さらに pPD129.36 Vector を用いて RNAi 発現ベクターを作成し、長寿関連遺伝子、ストレス反応遺伝子、DNA 修復遺伝子などをノックダウンし水素の作用との関連についての検討を行った。

(2) 哺乳動物での紫外線暴露に際しての水素の保護効果を検討するために、ヘアレスマウスに UVB を照射し皮膚発癌を誘発し、水素投与が腫瘍形成に与える影響を検討した。6 週齢ヘアレスマウス 12 匹を 2 群に分け水素投与群には水素ガス及び水素水の投与を開始した。非投与群には、脱気水と空気にて飼育した。平成 26 年度の検討では 7 週齢より 1 回 450 mJ/cm² の UV 照射を開始した。UV 照射は 1 週間当たり 3 回の照射を 30 週間継続した。この検討では多発性の多数の発癌誘発が見られ水素の効果判定が困難であったため、平成 27 年度の検討では平成 26 年度の検討と比較して 60%程度の UVB 照射量に設定し 1 回 270 mJ/cm² の積算照射量で、7 週齢目から 20 週間にわたり週 3 回の頻度で行った。マウスへの水素投与は、UVB 照射開始 4 週間前(3 週齢)から行い、UVB 照射期間中の 27 週齢まで 20 週間にわたり投与した。観察期間中には皮膚発赤と肥厚を定量したほか、組織像・遺伝子発現の検討のため経時的に皮膚検体を採取して、免疫組織染色、real time PCR 等による検討を加えた。観察終了時には解剖し形成された皮膚癌の組織像の評価を行った。

(3) 水素による生体作用の分子機構を明らかにするために正常の肝臓を用いて分子状水素の投与の有無による細胞内シグナルと DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) 非 UV 照射の条件下では水素は線虫寿命をわずかに延長する可能性が示唆されたが有意差は観察されなかった。次に線虫が成虫になった生後 4 日目に紫外線照射を行い照射後の寿命を検討したところ、水素投与群で有意に生存期間の延長を見た。線虫卵を用いた紫外線耐性の検討でも生存率の増加が観察された。生殖腺での紫外線照射によりアポトーシスの誘導は水素投与で抑制された。また水素添加により DNA 損傷が有意に減少することも観察された。RNAi 発現ベクターを用いた検討では、*age-1*、*wdr-23*、*hif-1*、*rad-51* の J

ックダウンにより水素の保護作用が減弱し生存期間に有意差が観察されなくなったことより、これらの分子の関連経路が分子状水素の紫外線障害保護効果に重要であることが示唆された。

(2) ヘアレスマウスを用いた紫外線照射皮膚発癌モデルでの平成 26 年度の検討では、13 週目ごろより皮膚上皮の肥厚性病変を認め、さらに 20 週目前後に皮膚癌形成が観察された。この検討では腫瘍の形成に明らかな差は観察されなかった。次に紫外線照射線量を減少して行った平成 27 年度の検討では水素非投与マウスに比べて、水素投与マウスでは腫瘍形成時期に有意な遅延がみられた。しかし、最終的に個体ごとに形成される腫瘍数には大差はなかった。また UVB 照射によって形成された腫瘍の組織型も両群間で差を認めなかった。一方この UVB 照射時期の皮膚の炎症を免疫組織染色で検討したところ T 細胞に対する抗 CD3 抗体による免疫染色では、非投与群と水素投与群で明らかな差は見られなかったが、好中球に対する抗 Gr-1 抗体による免疫染色では非投与群に比べて水素投与群で炎症細胞の減少傾向が見られた。水素は UVB により皮膚に惹起される炎症を軽減し、持続する炎症刺激に伴う皮膚表皮の反応性変化を減弱することが示された。こうした水素の作用は、紫外線照射により誘発される皮膚癌発症の初期過程を修飾し、皮膚癌発症を遅延させる効果が期待された。

(3) 肝臓における分子状水素による遺伝子変化と、その上流で影響を受けるとされるシグナル伝達機構の解析を行ったところ、正常肝臓においても ERK, p38 および NFκB のシグナルが減弱していることを明らかにした。さらに水素の生体への投与方法を水素水として飲水させる方法と、水素ガスとして吸入させる方法を比較したところ遺伝子発現に対して両者は相加的に作用すること、水素濃度が極めて低いとことが観察された腎臓、脳などにおいても同様の傾向で遺伝子変動が水素で観察される事などを認めた。こうした成果は *Mol Cell Biochem* に報告した (Sobue et al., *Mol Cell Biochem*, 2015)。

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 14 件)

1. Mizutani N, Omori Y, Kawamoto Y, Sobue S, Ichihara M, Suzuki M, Kyogashima M, Nakamura M, Tamiya-Koizumi K, Nozawa Y, Murate T. Resveratrol-induced transcriptional up-regulation of ASMPD1 (SMPD1) of human leukemia and cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*.

2016;470(4):851-856. doi:

10.1016/j.bbrc.2016.01.134. 査読有り

2. 祖父江沙矢加, 市原正智. 分子状水素によるマウス肝臓における遺伝子発現変化の解析. *中部大学生命健康科学研究所紀要* 2016;12:38-41, https://opac.bliss.chubu.ac.jp/e-Lib/catdbi.do?pkey=XB16000002&initFlg=_RESULT_SET_NOTBIB 査読無し
3. Sobue S, Yamai K, Ito M, Ohno K, Ito M, Iwamoto T, Qiao S, Ohkuwa T, Ichihara M. Simultaneous oral and inhalational intake of molecular hydrogen additively suppresses signaling pathways in rodents. *Mol Cell Biochem*. 2015;403(1-2):231-241. doi: 10.1007/s11010-015-2353-y. 査読有り
4. Ichihara M, Sobue S, Ito M, Ito M, Hirayama M, Ohno K. Beneficial biological effects and the underlying mechanisms of molecular hydrogen - comprehensive review of 321 original articles. *Med Gas Res*. 2015;5:12. doi: 10.1186/s13618-015-0035-1. 査読有り
5. Sakakura H, Murakumo Y, Mii S, Hagiwara S, Kato T, Asai M, Hoshino A, Yamamoto N, Sobue S, Ichihara M, Ueda M, Takahashi M. Detection of a soluble form of CD109 in serum of CD109 transgenic and tumor xenografted mice. *PLoS One*. 2014;9(1):e83385. doi: 10.1371/journal.pone.0083385. 査読有り
6. Qiao S, Fan K, Iwashita T, Ichihara M, Yoshino M, Takahashi M. The involvement of reactive oxygen species derived from NADPH oxidase-1 activation on the constitutive tyrosine auto-phosphorylation of RET proteins. *Free Radic Res*. 2014;48(4):427-434.

- doi: 10.3109/10715762.2014.884278. 査読有り
7. Miyata M, Ichihara M, Tajima O, Sobue S, Kambe M, Sugiura K, Furukawa K, Furukawa K. UVB-irradiated keratinocytes induce melanoma-associated ganglioside GD3 synthase gene in melanocytes via secretion of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;445(2):504-510. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.02.038. 査読有り
8. 岩田晃裕、土本詩織、市原正智、祖父江沙矢加. Photoshop を用いた画像解析の検討. 社団法人 愛知県臨床衛生検査技師会誌 らぼ 2014;65:11-14, 査読無し
9. Mizutani N, Kobayashi M, Sobue S, Ichihara M, Ito H, Tanaka K, Iwaki S, Fujii S, Ito Y, Tamiya-Koizumi K, Takagi A, Kojima T, Naoe T, Suzuki M, Nakamura M, Banno Y, Nozawa Y, Murate T. Sphingosine kinase 1 expression is downregulated during differentiation of Friend cells due to decreased c-MYB. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(5):1006-1016. 査読有り
10. Takaoka Y, Shimizu Y, Hasegawa H, Ouchi Y, Qiao S, Nagahara M, Ichihara M, Lee JD, Adachi K, Hamaguchi M, Iwamoto T. Forced expression of miR-143 represses ERK5/c-Myc and p68/p72 signaling in concert with miR-145 in gut tumors of Apc(Min) mice. *PLoS One.* 2012;7(8):e42137. doi: 10.1371/journal.pone.0042137. 査読有り
11. Ohno K, Ito M, Ichihara M, Ito M. Molecular hydrogen as an emerging therapeutic medical gas for neurodegenerative and other diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:353152. doi: 10.1155/2012/353152. 査読有り
12. Mii S, Murakumo Y, Asai N, Jijiwa M, Hagiwara S, Kato T, Asai M, Enomoto A, Ushida K, Sobue S, Ichihara M, Takahashi M. Epidermal hyperplasia and appendage abnormalities in mice lacking CD109. *Am J Pathol.* 2012;181(4):1180-1189. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.06.021. 査読有り
13. Ito M, Hirayama M, Yamai K, Goto S, Ito M, Ichihara M, Ohno K. Drinking hydrogen water and intermittent hydrogen gas exposure, but not lactulose or continuous hydrogen gas exposure, prevent 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease in rats. *Med Gas Res.* 2012;2(1):15. doi: 10.1186/2045-9912-2-15. 査読有り
14. Ito H, Tanaka K, Hagiwara K, Kobayashi M, Hoshikawa A, Mizutani N, Takagi A, Kojima T, Sobue S, Ichihara M, Suzuki M, Tamiya-Koizumi K, Nakamura M, Banno Y, Nozawa Y, Murate T. Transcriptional regulation of neutral sphingomyelinase 2 in all-trans retinoic acid-treated human breast cancer cell line, MCF-7. *J Biochem.* 2012;151(6):599-610. doi: 10.1093/jb/mvs037. 査読有り

〔学会発表〕(計 17 件)

1. Sobue S, Ichihara M. Development of effective method for preventing life environment factor-induced diseases using molecular hydrogen. ICITE for SD-2015, Chubu University (Aichi, Kasugai), 2015年11月7日
2. Sobue S, Inoue C, Hori F, Ito M, Ohno K, Ichihara M. Molecular hydrogen is a novel antioxidant to reduce oxidative

- stress and attenuate disease progression through modification of cell signaling and gene expressions. 15th International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis & Antioxidants, Paris (France), 2015年6月24日
3. 祖父江沙矢加、井上千聖、伊藤美佳子、大野欽司、伊藤雅史、市原正智、水素ガスおよび水素水の併用投与が細胞内シグナル伝達に与える影響の検討、第5回分子状水素医学シンポジウム、ウインクあいち (愛知県、名古屋市)、2015年3月21日
 4. 古川圭子、宮田麻衣子、田島織絵、神戸真理子、市原正智、祖父江沙矢加、古川鋼一、UVB照射ケラチノサイトは炎症性サイトカインを分泌してメラノサイトにおける癌関連GD3合成酵素遺伝子の発現を誘導する、第73回日本癌学会、パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)、2014年9月27日
 5. Furukawa K, Miyata M, Ichihara M, Tajima O, Sobue S, Kambe M, Sugiura K, Furukawa K, UVB-irradiated keratinocytes induce melanoma-associated ganglioside GD3 synthase gene in melanocytes via secretion of tumor necrosis factor and interleukin 6, Porto (Portugal), 2014年6月18日~2014年6月21日
 6. 三井伸二、村雲芳樹、坂倉寛紀、浅井真人、浅井直也、市原正智、高橋雅英、遺伝子改変マウスを用いた癌関連タンパクCD109の機能解析および新規腫瘍マーカーへの応用可能性、第103回日本病理学会総会、広島国際会議場 (広島県、広島市)、2014年4月25日
 7. 白木之浩、市原正智、三井伸二、浅井直也、榎本篤、岩田洋介、伊藤雅文、高橋雅英、肺に著明な panmyelosis が認められ、呼吸不全によって死亡した atypical CML の1剖検例、第103回日本病理学会総会、広島国際会議場 (広島県、広島市)、2014年4月25日
 8. 祖父江沙矢加、井上千聖、市原正智、水素ガスおよび水素水の併用療法の検討、第4回分子状水素医学シンポジウム、きゅりあん (東京都、品川区)、2014年2月1日
 9. 祖父江沙矢加、井上千聖、望月利晃、長谷川浩一、大桑哲男、市原正智、線虫を用いた分子状水素の紫外線に対する生体保護効果の検討、第36回日本分子生物学会年会、神戸国際会議場 (兵庫県、神戸市)、2013年12月5日
 10. 宮田麻衣子、田島織絵、神戸真理子、市原正智、祖父江沙矢加、杉浦一充、古川鋼一、古川圭子、Induction of GD3 synthase gene expression by TNF in melanocytes and melanomas、第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)、2013年10月5日
 11. 古川圭子、宮田麻衣子、田島織絵、神戸真理子、祖父江沙矢加、市原正智、杉浦一充、古川鋼一、メラノサイトとメラノーマのGD3合成酵素遺伝子発現におけるTNFおよび紫外線の影響、第86回日本生化学会大会、パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)、2013年9月13日
 12. 岩田晃裕、土本詩織、祖父江沙矢加、市原正智、Photoshopを用いた画像解析の検討、第14回愛知県医学検査学会、刈谷市総合文化センター (愛知県、刈谷市)、2013年6月16日
 13. 市原正智、祖父江沙矢加、関島優樹、坂田慶太、剖検を模した条件下での死後変

化に伴う経時的遺伝子発現変化のパラフィン標本由来RNAなどを用いた検討、第102回日本病理学会総会、ロイトン札幌（北海道、札幌市）、2013年6月7日

14. 三井伸二、坂倉寛紀、村雲芳樹、市原正智、高橋雅英、癌関連タンパク質 CD109 の新規血清腫瘍マーカーとしての可能性の検討、第102回日本病理学会総会、ロイトン札幌（北海道、札幌市）、2013年6月7日

15. 祖父江沙矢加、土肥健太郎、望月利晃、大桑哲男、市原正智、急性呼吸窮迫症候群モデルマウスを用いた分子状水素の炎症軽減効果の検討、第3回分子状水素医学シンポジウム、きゅりあん（東京都、品川区）、2013年2月9日

16. Sobue S, Yamai K, Ito M, Ohno K, Ito M, Ohkuwa T, Ichihara M. Molecular hydrogen alters signaling pathways and gene expression profiles in multiple mouse organs, ASCB 2012, San Francisco, CA, (USA)、2012年12月18日

17. 祖父江沙矢加、井上千聖、星川あすか、古川圭子、村手隆、市原正智、Egr-1 による CD109 遺伝子の発現制御機構の解析、第85回日本生化学会大会、福岡国際会議場（福岡県、福岡市）、2012年12月15日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市原 正智 (ICHIHARA, Masatoshi)
中部大学・生命健康科学部・教授
研究者番号：00314013

(2) 研究分担者

村雲 芳樹 (MURAKUMO, Yoshiki)
北里大学・医学部・教授
研究者番号：40324438

祖父江 沙矢加 (SOBUE, Sayaka)
中部大学・臨床検査技術教育・実習センター・助教
研究者番号：50513347

岩本 隆司 (IWAMOTO, Takashi)
中部大学・生命健康科学部・教授
研究者番号：60223426