

機関番号：32666

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651055

研究課題名(和文)放射線内部被曝による遺伝子損傷を水素が軽減する。

研究課題名(英文)Protective effects of hydrogen against irradiation

研究代表者

太田 成男(Ohta, Shigeo)

日本医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00125832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：放射線によってヒドロキシルラジカルが生じ、それがトリIGGERとなってラジカル連鎖反応を生じさせ、主に細胞膜において細胞障害をあたえることが知られている。低濃度の水素は、ラジカル反応誘発剤による細胞障害も抑制したので、水素は少量でも脂質ラジカルを抑制することにより連鎖反応を抑制して細胞を保護することを明らかにした。さらに、低い水素濃度でも、細胞膜の脂質過酸化を抑制することを明らかにした。

本研究では、放射線障害を水素が抑制する可能性を示唆し、その分子機構の一端を明らかにしたが、それをそのまま社会に適用するためには不十分である。

研究成果の概要(英文)：Ionizing irradiation produces free radicals such as hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) by reacting with water. Then, these free radicals act as a trigger for initiating the free radical chain reaction, resulting in the generation of lipid peroxides, which cause the damages in cells. The author has shown that molecular hydrogen (H_2) reacts with $\cdot\text{OH}$ to protect cells. Moreover, H_2 protects cells, organs and mice against irradiation. This study revealed that a low concentration (~ 0.08 mM) of molecular hydrogen (H_2) terminates the free radical chain reaction to prevent lipid peroxides and to protect cells. The author would like to direct that this study is valuable as a basic investigation, but insufficient for the actual application in public.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：損傷 水素分子 抗酸化物質

1. 研究開始当初の背景

- (1) 放射線障害は、直接遺伝子に損傷を与える直接作用と、水と反応することによって、ヒドロキシルラジカルのようなフリーラジカルを発生させて、生体内物質に損傷を与える間接作用がある。体内は70%が水であるので、放射線障害の70～80%は間接作用であると見積もられている。
- (2) 間接作用を軽減させるための抗酸化物質の開発が努められている。例えば、アミフォスチン (J Clin Oncol. 2011;29:2590-7.) のような抗酸化物質は放射線障害に有効であることが示されたが、副作用が大きいため限定的にしか使用できない。
- (3) 水素を溶解した水(水素水)を飲ませたマウスは、高線量放射線に耐性となり、95%が死亡する放射線でも80%が生存した(J. Radial Res., 2010;51:741-747)。さらに、臨床試験でも放射線治療の副作用を軽減することが報告された(Medical Gas Research 2011,1;11)。私たちは、放射線被曝によるアポトーシスを水素が抑制することを報告した(Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2011;301:L415-26.)
- (4) 遺伝子の損傷を検出する方法として、p53抗体、抗ヒドロキシグアニン抗体、抗リン酸化SMC1抗体、抗リン酸化H2AX抗体が開発されていた。

2. 研究の目的

水素が放射線障害を低下させることが明らかにされているが、その分子機構は不明である。水素とヒドロキシルラジカルの反応性はそれほど高くなく、水素の効果をすべてヒドロキシルラジカルの除去では説明できない。

放射線によってヒドロキシルラジカルが生じ、それがトリIGGERとなってラジカル連鎖反応を生じさせ、主に細胞膜において細胞障害をあたえることが知られている。

水素が放射線障害から細胞を保護する分子機構を解明することによって、放射線障害防御のために水素が用いられるための基盤とすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 水素の生体膜への蓄積

不飽和脂肪酸と水の混合液に水素ガスを封入し、不飽和脂肪酸と水を分離させた。各々の層から一定量を取り出し、水素の量をガスクロマトグラフィーにより定量した。

(2) ラジカル誘導材による細胞障害への水素の効果

1,2,3,4-tetrahydro-fl-carboline (THBC)、2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH)のようなラジカル反応誘発剤を培養細胞に加え、同時に水素ガス封入下で細胞への影響をみる。細胞膜の障害は、細胞外へのLDH(乳酸脱水素酵素)の流出によって測定した。細胞の活性自体への効果は、アラマーブルーによって測定した。

(3) ラジカル誘導材による脂質過酸化と低濃度水素による防御

過酸化脂質は、蛍光色素 LiperFluo の蛍光変化によって測定した。培養細胞(THP-1)にラジカル誘導剤を加え、同時に水素ガスを封入した容器で培養した。過酸化脂質は、サイトフロメトリーにより、蛍光色素 LiperFluo の蛍光変化によって測定した。

4. 研究成果

水素は脂質部分に水溶液よりも2倍蓄積すること、5倍も保持されることを明らかにした。この結果は、水素は生体膜上でヒドロキシルラジカルのような連鎖反応を誘起する反応に対してより効果を発揮できることを示唆している。

1,2,3,4-tetrahydro-fl-carboline (THBC) や2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH)のようなラジカル反応誘発剤による細胞障害を10%程度の濃度の水素が抑制したので、水素は少量でも脂質ラジカルを抑制することにより連鎖反応を抑制して細胞を保護することを明らかにした。

さらに、3%程度の低い水素濃度にて、細胞膜の脂質過酸化を抑制することを明らかにした。

以上の結果から、水素は低濃度でも細胞膜において脂質フリーラジカル連鎖反応を抑制することによって、細胞を保護することが明らかになった。

本研究では、放射線障害を水素が抑制する可能性を示唆し、その分子機構の一端を明ら

かにしたが、それをそのまま社会に適用するためには不十分であることを記したい。

5. 主な発表論文等

〔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. doi: 10.1038/jid.2013.428.

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. doi:10.1371/journal.pone.0066996.

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. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.06.016.

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. doi: 10.1002/mds.25375.

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. doi: 10.1371/journal.pone.0069178.

Lee H, Kiuchi T, Muto J, Ohta S, Mikami T.: Intense exercise enhances the hippocampal proliferation of progenitor cells via activating the Fk1 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 tRNA^{Lue(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. https://www.jstage.jst.go.jp/browse/tonyoby/56/3/_contents/-char/ja/

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. *J. Am. Heart Assoc.* 査読有 2012;1(5):e003459. doi:10.1161/JAHA.112.003459.

Hoshi H, Hao W, Fujita Y, Funayama A, Miyauchi Y, Hashimoto K, Miyamoto K, (他 21 名、16 番目 Ohta S): Aldehyde-stress resulting from Aldh2 mutation promotes osteoporosis due to impaired osteoblastogenesis. *J. Bone Miner Res.* 査読有 2012;27(9):2015-2023. doi: 10.1002/jbmr.1634.

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. https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/51/24/51_51.7529/_pdf

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. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.01.008.

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. doi: 10.1038/gt.2011.204.

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. doi: 10.1016/j.brainres.2011.10.041.

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.

doi:
10.1016/j.theriogenology.2012.06.005.

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.
doi: 10.1038/oby.2011.6.

Terasaki Y, Ohsawa I, Terasaki M, Takahashi M, Kunugi S, Dedong K, Urushiyama H, (他7名, 5番目 Kamimura N, 6番目 Ohta S.): 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.
doi: 10.1152/ajplung.00008.2011.

Shimura K, Tamaki K, Sano M, Nakashima-Kamimura N, Wolf AM, Amo T, Ohta S, (他5名): 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.
doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243097.

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.
doi:10.1186/2045-9912-1-18.

Nagare T, Sakaue H, Matsumoto M, Cao Y, Inagaki K, Sakai M, Takashima Y, (他11名, 8番目 Kamimura N, 9番目 Ohta S.): 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.
doi: 10.1074/jbc.M111.242651.

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.
doi: 10.1016/j.nbd.2010.08.027.

⑲ 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*. 査読有 2011;78(1):13-21.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21389643>

⑳ 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.
doi: 10.1016/j.bbagen.2011.05.006.

㉑ Ohta, 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.
doi: 10.1186/2045-9912-1-10.

㉒ 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.
doi: 10.2174/138161211797052664

[学会発表](計 20 件)

Shigeo Ohta: Molecular hydrogen as a preventive and therapeutic medical gas: Initiation, development and potential of hydrogen medicine. 1th academic exchange and inaugural meeting on Hydrogen Molecule Biomedicine of the Hydrogen Molecular Biomedicine Professional Committee of Chinese Healthcare International Exchange Promotion Association. Chinese 2014.3.19.

太田成男:水素医学研究 update:2013 第4回分子状水素医学シンポジウム 東京 2014.2.1

太田成男:ミトコンドリアと生物活性物質との相互作用 京都-NPO 法人国際医科学研究会第7回フォーラム 2013.12.1.

太田成男:水素療法の神経系疾患に対する効果:基礎医学から治療および予防への臨床適用へ向かって 第31回日本神経治療学会総会 東京 2013.11.22.

Shigeo Ohta: Molecular Hydrogen is an Efficient Antioxidant Accompanied with Anti-inflammatory and Energy Metabolism-enhancing Roles. International Drug Discovery Science & Technology, Therapy and EXPO Hainan International Convention and

Exhibition Center, IDDST Part of WGC China 2013.11.15.

Shigeo Ohta: Molecular Hydrogen has Potential for Preventive and Therapeutic Applications for Neurological Diseases. International Drug Discovery Science & Technology, Therapy and EXPO Hainan International Convention and Exhibition Center, MolMed Part of WGC China 2013.11.15.

太田成男:水素医学の展開:基礎医学から臨床実施へ 第41回日本救急医学会総会東京国際フォーラム 2013.10.21.

太田成男:ミトコンドリア機能と老化・疾患制御 第13回抗加齢医学会総会 横浜パシフィコ横浜 2013.6.28.

太田成男:水素医学の発展と健康への貢献 第86回日本薬理学会年会 福岡 2013.3.22.

Shigeo Ohta: Hydrogen Medicine Group: Molecular Hydrogen Prevents Learning- and Memory-deficits Declined by Physical Restraint Stress. AD/PD2013 (The 11th International Conference On Alzheimer's & Parkinson's Diseases) Florence Italy, 2013.3.9.

Shigeo Ohta: Recent progress toward hydrogen medicine. International symposium of Mitochondrial biomedicine China, 2012.4.8.

太田成男:水素医学の展開 日本N0学会学術集会 神戸. 2012.6.29

太田成男:水素医学の発展と健康への貢献 日本アンチエイジング歯科学会 名古屋. 2012.5.19.

太田成男:ミトコンドリアを維持し、増やすための生活の知恵 東洋はり医学会東京. 2012.5.13.

太田成男:健康・老化へのミトコンドリアの関与 第8回日本加圧トレーニング学会 東京 2012.1.29.

太田成男:ミトコンドリアが制御する健康・老化 第153回日本体力医学会関東会 川崎 2011.12.16.

太田成男:ミトコンドリアに起因する酸化ストレス 第39回日本肝臓学会西部会岡山 2011.12.10.

太田成男:ミトコンドリアと酸化ストレス 第23回分子糖尿病シンポジウム 熊本 2011.11.26.

太田成男:水素医学の進展:酸化ストレス軽減によるアポトーシス抑制のメカニズム 第20回日本Cell Death学会シンポジウム 東京 2011.7.30.

Shigeo Ohta: Molecular hydrogen is a novel antioxidant to efficiently reduce oxidative stress for the therapeutic and preventive potential in lifestyle-related and mitochondrial diseases. The eighth European Meeting on Mitochondrial Pathology(Euromit 8) Spain スペイン 2011.6.20-23.(22)

〔図書〕(計2件)

太田成男:水素水とサビない身体、小学館 2013、186.

太田成男:NHKサイエンスZERO-ミトコンドリアの新常識、NHK出版、2011、128

〔産業財産権〕
出願状況(計1件)

名称:細胞死抑制活性強化タンパク質FNKを用いた脱毛の防止

発明者:太田成男・麻生定光・上村尚美

権利者:同上

種類:特許

番号:PCT/JP2006/305326

出願年月日:2006年3月13日

国内外の別:国際出願

取得状況(計2件)

名称:生体内の有害な活性酸素及び/またはフリーラジカル除去剤

発明者:太田成男 室田渉

権利者:同上

種類:特許

番号:5106110

取得年月日:2012年10月12日

国内外の別:国内

名称:ミトコンドリア病の予防又は治療薬

発明者:太田成男

権利者:同上

種類:特許

番号:5028639

取得年月日:2012.7.6

国内外の別:国内

〔その他〕

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2)連携研究者

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

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・
講師
研究者番号：20434136

西槇 貴代美 (Nishimaki Kiyomi)
日本医科大学・老人病研究所生化学部門・
マネジメントスタッフ
研究者番号：00465345

一宮 治美 (Ichimiya Harumi)
日本医科大学・老人病研究所生化学部門・
アシスタントサポートスタッフ
研究者番号：40553251

横田 隆 (Yokota Takashi)
日本医科大学・老人病研究所分子生物学部
門・マネジメントスタッフ
研究者番号：30445829