

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350907

研究課題名(和文)水素分子による酸化ストレス防御機構と脳内レドックス動態の解析

研究課題名(英文) Analysis of hydrogen effects on oxidative stress defense mechanisms and redox dynamics in the brain

研究代表者

西槇 貴代美 (Nishimaki, Kiyomi)

日本医科大学・先端医学研究所・マネジメントサポートスタッフ

研究者番号：00465345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスの蓄積は、糖尿病などの生活習慣病や、アルツハイマー病、パーキンソン病に代表される神経変性疾患など、様々な疾患の発症に強く関与している。我々はこれまでの研究において、加齢により脳の酸化ストレスの蓄積が亢進するDALマウスと、生体内での酸化還元状態を蛍光イメージング法によりモニターできるroGFPマウスを開発した。本研究では、この2種類のマウスを掛け合わせて、脳の酸化還元状態を可視化できるroGFP/DALマウスを作製し、脳の酸化ストレスの蓄積を蛍光イメージング法で定量評価する方法の開発を試みた。

研究成果の概要(英文)：Accumulation of oxidative stress associated with aging is one of causative factors in the pathogenesis of major neurodegenerative diseases including Alzheimer's and Parkinson diseases (AD and PD). In animal experiments using mitochondrial oxidative stress enhanced mice (DAL mouse), hydrogen molecules revealed that it is effective in removing oxidative stress associated with aging. In this study, we developed a transgenic mouse that can quantitatively evaluate the oxidative stress in the body and crossed with DAL mouse. We tried to visualize removal of oxidative stress using this double transgenic mouse.

研究分野：分子生物学 生化学

キーワード：酸化ストレス 水素 トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

(1)糖尿病に代表される生活習慣病やアルツハイマー病、パーキンソン病に代表される神経変性疾患は、遺伝的要因の他に加齢に伴う酸化ストレスの蓄積が大きく関与している。酸化ストレスを除去することは、疾患の予防や治療につながり、優れた抗酸化剤の研究開発が求められている。

(2)酸化ストレスを引き起こす活性酸素種は、ヒドロキシラジカル(OH \cdot)、ペルオキシナイトライト(\cdot COOH)のような強力な酸化力を有するものの他、NOのように生理活性を持ち、生体内において必要不可欠なものも存在する。強力な抗酸化剤の過剰摂取は、生体に必要な活性酸素種までも取り除いてしまうことになり、むしろ死亡率が上昇する(*J. Am. Med. Assoc.*, 297, 842, 2007)。

(3)我々は水素分子が毒性の強い活性酸素種のみを選択的に還元することを見つけ、脳梗塞モデルラットでの動物実験で、水素分子の投与が急性酸化ストレスを軽減し、脳梗塞の予後を改善することを報告した(*Nat. Med.*, 13, 688, 2007)。さらに水素水の投与が、慢性的身体拘束ストレスにより誘発される脳の酸化ストレスを抑制した(*Neuropsychopharmacology*, 34, 2008)。他のグループからは、水素水を投与したマウスで脳の活性酸素種生成が減少すること(Sato, 他, *BBRC.*, 375, 2008)、パーキンソンモデルマウス、モデルラットへの水素水投与は、ドーパミン作動性神経細胞死に対して顕著な保護作用を有することなどが報告された(Fu Y., 他, *Neurosci. lett.*, 453, 2009)(Fujita, 他, *PLoS ONE* 4: e7247, 2009)。以上の研究は、水素分子が脳の酸化ストレス除去による神経変性疾患の予防・治療にきわめて有効であることを強く示唆している。

(4)慢性的な脳の酸化ストレスの蓄積に起因する認知障害への水素水の効果を調べるために、我々が作製した酸化ストレス亢進マウ

スへの水素水の長期投与実験を行った。このマウスの特徴である加齢に伴う認知機能の低下や海馬の神経変性が水素水の長期投与により抑制された。

(5)一方我々は、酸化還元状態により蛍光スペクトルが変化する roGFP タンパク質の遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製した。このマウスを用いれば、生体内の酸化還元状態の変化をリアルタイムで測定することが可能となった。

2. 研究の目的

酸化ストレス亢進に起因するアルツハイマー病モデルマウスに対する水素分子の効果は、脳内の酸化ストレスの除去によるものと思われる。実際水素水投与群では、採取した脳における過酸化脂質の蓄積が減少していた。しかしながら現在のところ、生体内の酸化ストレスを生きた個体の脳で観察する手法は開発されていない。そこで加齢による脳の酸化ストレスの蓄積と水素水による酸化ストレスの除去を評価するために、個体レベルで酸化ストレスの定量的評価が可能なマウスを開発し、加齢による酸化ストレスの蓄積と、水素分子による酸化ストレスの除去を時空間的に評価する。

3. 研究の方法

(1)アルツハイマー病モデルマウス(DAL マウス): 我々が開発した、酸化ストレス亢進マウス-DAL マウス(DAL: Dominant-negative of ALDH2)を用いた。このマウスは、ミトコンドリア ALDH2 活性を低下させたマウスである。脳の酸化ストレスが亢進して、海馬での神経変性、学習記憶力の低下、寿命の短縮が認められる神経変性疾患モデル動物である(*J. Neurosci.*, 28: 6239-49, 2008)。

(2)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 マウス): roGFP は、酸化ストレスにより励起波長

スペクトルが変化する緑色蛍光タンパク質である。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ットリ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(mito-roGFP 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(cyto-roGFP マウス)の2種類を作製する。mito-roGFP マウスと cyto-roGFP マウスは、脳での roGFP タンパクの発現している系統を選別して用いる。

(3)生体内酸化ストレスを時空間的に定量評価できるアルツハイマー病モデルマウスの作製: DAL マウスと roGFP 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アルツハイマー病モデルマウス(mito-roGFP/DAL マウス、cyto-roGFP/DAL マウス)を作製する。

(4) 脳の酸化ストレスの定量評価: roGFP/DAL マウスを用いて、加齢による脳の酸化ストレスの蓄積を時空間的に定量評価する。

4. 研究成果

(1)roGFP タンパクは酸化還元状態により立体構造中の S-S 結合の形成や切断が起き、S-S 結合の有無によって立体構造が変化する。そのため、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。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。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わり、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。

(2) 脳の酸化ストレスの蓄積を評価するために、mito-roGFP/DAL マウス、cyto-roGFP/DAL マウスを作製した。マウスはペンタバルビタール、キシラジン麻酔下で頭皮切開し、頭蓋骨を介して大脳皮質の roGFP タンパク質の蛍光強度を測定した。脳のミトコンドリアと細胞質での酸化還元状態を生きた状態で定量評価することに成功した。

(3)さらに加齢による脳の酸化還元状態を評価するために 6 ヶ月齢、12 ヶ月齢、15 ヶ月齢、18 ヶ月齢の mito-roGFP/DAL マウス、cyto-roGFP/DAL マウスで、脳の roGFP の蛍光強度を測定した。若いマウスに比べ、高齢のマウスの脳では ROS の発生が多いことが知られている。しかしながら roGFP/DAL マウスを用いて、加齢という慢性的な酸化ストレスの蓄積を酸化還元状態の変化で評価することは困難であった。そこで、roGFP/DAL マウスに急性ストレスを負荷し、継時的な蛍光スペクトルの変化で脳の酸化のストレスの発生を測定することを試みている。既に、皮膚、肝臓において、酸化ストレスが発生するような負荷(UV 照射、薬剤投与など)を与えて、継時的な酸化ストレスの変化の測定に成功している。

5. 主な発表論文等(計5報)

Iuchi, K., Imoto, A., Kamimura, N., Nishimaki, K., Yokota, T., Ichimiya, H., Ohta, S.: Molecular hydrogen regulates gene expression by modifying the free radical chain reaction-dependent generation of oxidized phospholipid mediators. *Scientific Report*. 査読有

2015; 1605, 49-58. doi:10.1038/srep18971

Kanamaru, T., Kamimura, N., Yokota, T., Nishimaki K., Katsuya Iuchi, K., Lee H., Takami, S., Akashiba, H., Shitaka, Y., Ueda, M., Katsura, K.I., 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 2015; 1605, 49-58.

doi:10.1016/j.brainres.2015.02.011

Kanamaru, T., Kamimura, N., Yokota, T., Iuchi, K., Nishimaki K., Takami, S.¹⁾, Akashiba, H.¹⁾, Shitaka Y.¹⁾, Katsura K.²⁾, Kimura, K.²⁾, Ohta, S.: Oxidative stress accelerates amyloid deposition and memory impairment in a double-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 査読有 2015; 587,126-31. doi:10.1016/j.neulet.2014.12.033

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.* 査読有 2014;14,390.

doi:10.1186/1472-6882-14-390

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;134, 1701-1709. doi:10.1038/jid.2013.428

6.学会発表 (計10件)

Nishimaki K.: Drinking effect of hydrogen water prevents progression of Alzheimer's disease. The 2015 Gordon Research Conference Biology of Aging. Sunday River, USA, July19-24,2015

Kamimura N., Nishimaki K.: Molecular hydrogen improves obesity and diabetes by regulating hepatic gene expression and stimulating energy metabolism in db/db mice. The 2015 Gordon Research Conference Biology of Aging. Sunday River, USA, July19-24,2015

上村尚美、西槇貴代美、他：糖尿病モデルマウスにおけるミトコンドリアの in vivo 酸化還元状態の測定と分子状水素の効果。第15回日本ミトコンドリア学会、2015年11月19-20日、福井県立国際交流会館

上村尚美、西槇貴代美、他：糖尿病モデルマウスの in vivo 酸化還元状態の測定と分子状水素の効果。第38回日本分子生物学会 第88回日本生化学会 合同大会、2015年12月1-4日、神戸ポートアイランド

井内勝哉、西槇貴代美、他：分子状水素はフリーラジカル連鎖反応で生じる脂質メディエーターを調節して遺伝子発現を制御する。第88回日本生化学会 合同大会、2015年12月1-4日、神戸ポートアイランド

Nishimaki K.: Transgenic mice expressing the redox-sensitive green fluorescent protein in the cytosol and mitochondria. International meeting of mitochondrial pathology. June 15-19, Tampere Finland
井内勝哉、西槇貴代美、他：低濃度の分子状水素はフリーラジカル連鎖反応に介入してシグナル伝達と遺伝子発現を制御する。第5回分子状水素医学シンポジウム、2015年3月22日、名古屋(ウインクあいち)

井内勝哉、西槇貴代美、他：低濃度の分子
状水素による連鎖的脂質酸化の抑制効果。
第4回分子状水素医学シンポジウム、2014
年2月1日、東京（品川区きゅりあん）
上村尚美、西槇貴代美、他：アルツハイマ
ー病モデルマウスに対する骨髄単核球移
植の予防効果。第36回日本分子生物学会、
2013年12月3-6日、神戸国際会議場
Kamimura N., Nishimaki K.: Accelerated
Alzheimer-type Phenotype in transgenic
mice carrying both mutant amyloid
precursor protein and
dominant-negative form of
mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2.
International Symposium on
Mitochondria 2013. November 6-7. Tokyo
Japan

〔その他〕

[http://home.nms.ac.jp/ig/saiboseibutsu/
index.html](http://home.nms.ac.jp/ig/saiboseibutsu/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西槇 貴代美 (KIYOMI NISHIMAKI)

日本医科大学・先端医学研究所・マネージメ
ントサポートスタッフ

研究者番号：00465345

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし