

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350129

研究課題名(和文)水素分子の糖尿病改善効果と遺伝子発現誘導における作用機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms of the effect on diabetes and gene expression induction by molecular hydrogen.

研究代表者

上村 尚美 (KAMIMURA, Naomi)

日本医科大学・先端医学研究所・准教授

研究者番号：60283800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病モデルマウスにおいて、水素分子の長期投与により糖尿病や肥満が改善し、糖尿病や肥満の抑制因子であるFGF21の遺伝子発現が肝臓で増加することをこれまでの研究で報告した。本研究では、水素分子の投与期間を短くして効果が現れるより前の段階において遺伝子発現の変化をマイクロアレイにより網羅的解析を行い、水素分子による遺伝子発現誘導のメカニズムを解析した。その結果、水素分子は、PGC-1の遺伝子発現を誘導することによってFGF21、脂肪酸、およびステロイド代謝関連遺伝子の発現調節をしているPPAR $\alpha$  パスウェイを活性化し、糖尿病や肥満の改善につながる効果を発揮することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that long-term drinking of H<sub>2</sub>-water (water infused with H<sub>2</sub>) enhanced energy expenditure to improve obesity and diabetes in db/db mice. Here, the comprehensive gene expression profile in the liver of db/db mice was analyzed by DNA microarray. Pathway analyses revealed the increased expression of various genes involved in fatty acid and steroid metabolism. As a transcription pathway, the PPAR $\alpha$  signaling pathway was identified to up-regulate their genes by ingesting H<sub>2</sub>. As an early event, the gene expression of PGC-1 was transiently increased, followed by increased expression of FGF21 and other genes. The expression of PGC-1 might be regulated indirectly through sequential regulation by H<sub>2</sub>, 4-hydroxy-2-nonenal, and Akt/FoxO1 signaling, as suggested in HepG2 cell experiments.

研究分野：細胞生物学

キーワード：酸化ストレス 糖尿病 抗酸化剤

## 1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスは、糖尿病を誘発する原因のひとつと考えられている。また、糖尿病を発症すると酸化ストレスがさらに増加し、腎症や網膜症等の合併症を引き起こすことが知られている。我々は、これまでの研究により、水素分子 ( $H_2$ ) が有害な活性酸素種のみを選択的に還元することを見つけ、脳梗塞モデル動物において、水素分子の投与により急性酸化ストレスが軽減し、脳梗塞が改善することを報告した (Ohsawa et al., Nat. Med., 13, 688, 2007)。さらに、2型糖尿病のモデルマウス *db/db* において水素水 (水素分子を溶かした水) を飲用水として3ヶ月間自由摂取することにより肝臓で分泌されエネルギー代謝を調節するホルモン FGF21 の遺伝子発現が増加することを明らかにした (Kamimura et al., Obesity, 19, 1396, 2011)。しかしながら、この結果は水素分子の長期摂取によるものなので、FGF21 の遺伝子発現の増加が水素分子による効果の一次的な原因なのか、二次的な結果なのか不明であった。

## 2. 研究の目的

水素分子の投与期間を短くして遺伝子発現解析を行うことにより、水素分子によるエネルギー代謝調節のメカニズムの一端を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) モデル動物

レプチンレセプターに遺伝子変異を有する *db/db* マウスを2型糖尿病モデルマウスとして使用した。また、*db/+*マウス (肥満および糖尿病を発症しない) を対照群として使用した。

食餌誘導性肥満モデルでは、C57BL/6 マウスに高脂肪食 (D12451 リサーチダイエツ社) あるいは通常食 (D12450B リサーチダイエツ社) を与えた。

### (2) 水素分子の投与方法

#### 水素水投与

飲用水として水素水 (水素ガスを精製水に飽和レベルまで溶解させたもの) を与えて自由摂取させた。対照水は、水素水から水素ガ

スを脱気したものをを用いた。給水は毎日行い、給水瓶は水素が抜けないように特別に工夫してあるものを使用した。

#### 水素化マグネシウムの投与

水素化マグネシウム  $MgH_2$  を経口投与し、胃の中で水素分子を発生させた。 $MgH_2$  は海水から得られる岩塩中に含まれる水素吸蔵金属であり、以下の反応によって水素2分子を発生する。



対照群では、 $Mg(OH)_2$  を投与した。

### (3) マイクロアレイ解析とパスウェイ解析

マウス肝臓より total RNA を単離し、マイクロアレイ解析を行った (SurePrint G3 Mouse GE 8x60 k v2 アジレントテクノロジー社)。得られたマイクロアレイの結果は、KEEG パスウェイ情報により解析を行った。

### (4) 定量 PCR 解析

マイクロアレイ解析に用いた RNA より cDNA を合成し、定量 PCR による解析を行った (Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 タカラバイオ社)。

### (5) 培養細胞と細胞の処理

#### AAPH 処理

ヒト肝癌由来細胞株である HepG2 細胞を用い、2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH) で6時間処理して酸化ストレスを誘導し、水素分子の効果を調べた。

#### 4-HNE 処理

HepG2 細胞を過酸化脂質である 4-HNE 処理し、1時間後にリン酸化シグナル解析、6時間後に遺伝子発現解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 水素分子の摂取により、*db/db* マウスの肝臓において様々な代謝関連遺伝子の発現が増加することを明らかにした。

水素水あるいは対照水を飲用水として2週間摂取した *db/db* マウスの肝臓の遺伝子発現の違いをマイクロアレイ解析により比較した。その結果、2倍以上の大きな発現変動をする遺伝子は見られなかったが、2倍以下であっても有意に変動している遺伝子群についてパスウェイ解析を行った結果、脂肪酸代

謝や PPAR シグナリングパスウェイに関連する遺伝子群の発現が水素水飲水により優位に増加していることが明らかとなった。

(2) 水素分子の摂取により、*db/db* マウスの肝臓において PGC-1 の遺伝子発現が誘導されることを明らかにした。

水素水 2 週間の摂取で発現変動した遺伝子について、水素分子の投与期間を短くし、定量 PCR により遺伝子発現を解析した。水素分子の投与期間を短くするにあたって、自由摂取は適していないので、水素化マグネシウムを 1 日 1 回経口投与した。その結果、水素化マグネシウム投与 3 ~ 7 日後に PGC-1 の遺伝子発現が誘導されることが明らかとなった (図 1)。

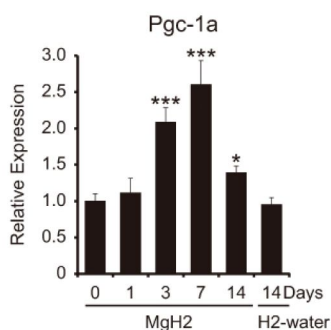


図 1. *db/db* マウスに水素水あるいは水素化マグネシウムを投与し、肝臓での PGC-1 $\alpha$  遺伝子発現量の変化を定量 PCR により解析

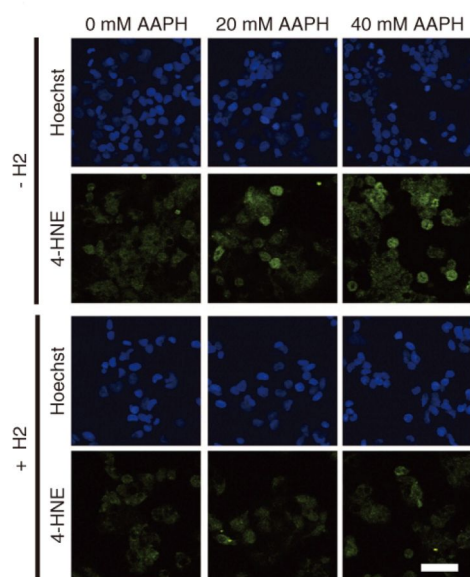


図 2. HepG2 細胞に AAPH 処理を行い、水素分子存在下での 4-HNE 発現量を解析

(3) 水素分子による PGC-1 の発現誘導は、4-HNE、AKT、FoxO1 シグナルにより調節されていることを明らかにした。

PGC-1 の発現誘導メカニズムについて HepG2 培養細胞を用いて解析した。水素分子はヒドロキシラジカルを消去することがわかっていたため、ヒドロキシラジカルに起因する細胞内の過酸化脂質である 4-HNE に着目し解析を行った。HepG2 細胞を AAPH 処理して酸化ストレスを誘導し、細胞内で発生する 4-HNE 量を測定したところ、水素分子添加により 4-HNE の発生が抑制された (図 2)。4-HNE の下流のシグナル因子である AKT と FoxO1 のリン酸化を解析したところ水素分子添加による変化はなかったため、水素分子は 4-HNE の発生を抑えることにより PGC-1 の遺伝子発現調節を行っていることが明らかとなった。

(4) 水素水の長期摂取により血中の中性脂肪濃度が抑制され寿命が延びることを明らかにした。

食餌誘導性肥満マウスに水素水を飲料水として長期間与えたところ、摂餌量や体重に変化はなかったが、血中の中性脂肪濃度が抑制され平均寿命が延伸した (図 3)。

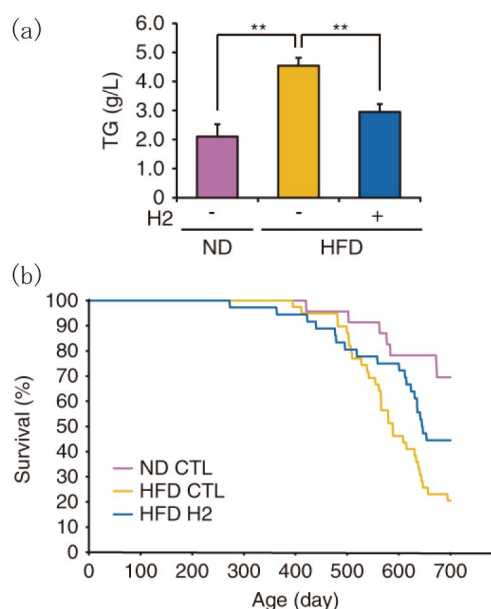


図 3. C57BL/6 マウスに高脂肪食 (HFD) あるいは通常食 (ND) を給餌し、水素水あるいは対照水を飲用水として与えた。(a) 血中中性脂肪濃度 (b) 生存曲線

## 5. 主な発表文等

(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 12 件)

Amo T, Kamimura N, Asano H, Asoh S, Ohta S. Cisplatin selects short forms of the mitochondrial DNA OriB variant (16184-16193 poly-cytosine tract), which confer resistance to cisplatin. *Sci Rep*. 査読有 7: 46240 (2017) doi: 10.1038/srep46240.

Ono T, Kamimura N, Matsuhashi T, Nagai T, Nishiyama T, Endo J, Hishiki T, Nakanishi T, Shimizu N, Tanaka H, Ohta S, Suematsu M, Ieda M, Sano M, Fukuda K, Kaneda R. The histone 3 lysine 9 methyltransferase inhibitor chaetocin improves prognosis in a rat model of high salt diet-induced heart failure. *Sci Rep*. 査読有 7: 39752 (2017) doi: 10.1038/srep39752.

Yokota T, Nomura K, Nagashima M, Kamimura N. Fucoidan alleviates high-fat diet-induced dyslipidemia and atherosclerosis in ApoE(shl) mice deficient in apolipoprotein E expression. *J Nutr Biochem*. 査読有 32: 46-54 (2016) doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.01.011.

Kamimura N, Ichimiya H, Luchi K, Ohta S. Molecular hydrogen stimulates the gene expression of transcriptional coactivator PGC-1 to enhance fatty acid metabolism. *npj Aging and Mechanisms of Disease* 査読有 2: 16008 (2016) doi: 10.1038/npjamd.2016.8

Luchi K, Imoto A, Kamimura N, Nishimaki K, Ichimiya H, Yokota T, Ohta S. Molecular hydrogen regulates gene expression by modifying the free radical chain reaction-dependent generation of oxidized phospholipid mediators. *Sci Rep*. 査読有 6: 18971 (2016) doi: 10.1038/srep18971.

Hayashida K, Sano M, Kamimura N, Yokota T, Suzuki M, Ohta S, Fukuda K, Hori S. Response to Letter Regarding Article, "Hydrogen Inhalation During Normoxic Resuscitation Improves Neurological Outcome in a Rat Model of Cardiac Arrest Independently of Targeted Temperature Management". *Circulation*. 査読無 132(11): e148. (2015) doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016785.

Yokota T, Kamimura N, Igarashi T, Takahashi H, Ohta S, Oharazawa H. Protective effect of molecular hydrogen against oxidative stress caused by peroxynitrite derived from

nitric oxide in rat retina. *Clin Exp Ophthalmol*. 査読有 43(6): 568-77. (2015) doi: 10.1111/ceo.12525.

Kanamaru T, Kamimura N, Yokota T, Nishimaki K, Luchi K, Lee H, Takami S, Akashiba H, Shitaka Y, Ueda M, Katsura K, 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) doi: 10.1016/j.brainres.2015.02.011.

Kanamaru T, Kamimura N, Yokota T, Luchi 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. *Neurosci Lett*. 査読有 587: 126-31. (2015) doi: 10.1016/j.neulet.2014.12.033.

Hayashida K, Sano M, Kamimura N, Yokota T, Suzuki M, Ohta S, Fukuda K, Hori S. Hydrogen inhalation during normoxic resuscitation improves neurological outcome in a rat model of cardiac arrest independently of targeted temperature management. *Circulation*. 査読有 130(24): 2173-80. (2014) doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.011848.

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(5): 1691-703. (2014) doi: 10.1016/j.celrep.2014.04.046.

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(6): 1701-9. (2014) doi: 10.1038/jid.2013.428.

[学会発表](計 9 件)

Naomi Kamimura: Molecular hydrogen induces expression of the PGC-1 gene, followed by stimulation of the PPAR pathway that regulates FGF21, and the fatty acid and steroid metabolism. 第90回日本薬理学会年会(2017年3月15-17日)長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)

上村尚美: 糖尿病モデルマウスにおいて水素分子により誘導される脂肪酸代謝メカニズムの解明 第39回日本分子生物学会年会(2016年11月30日 - 12月2

日) パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)  
上村尚美: 水素水による脳機能維持効果  
と健康増進への展望 第 71 回 日本体力  
医学会 (2016 年 9 月 23-25 日) いわて県  
民情報交流センター(岩手県・盛岡市)  
上村尚美: 水素分子は転写活性化コアク  
チペーターである PGC-1 遺伝子の発現  
を誘導することにより脂肪酸代謝を高め  
る 第 6 回 日本分子状水素医学生物学会  
年会 (2016 年 5 月 28-29 日) ワークピア  
横浜(神奈川県・横浜市)  
上村尚美: 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 日本分子生物学会年会  
第 88 回 日本生化学会大会合同大会  
(2015 年 12 月 1-4 日) 神戸ポートアイラ  
ンド(兵庫県・神戸市)  
上村尚美: 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年会 (2015 年 11  
月 19-20 日) 福井県国際交流会館(福井  
県福井市)  
Naomi Kamimura: Molecular hydrogen  
improves obesity and diabetes by  
regulating hepatic gene expression and  
stimulating energy metabolism in *db/db*  
mice. Aging, Biology of Gordon  
Research Conference (2015 年 7 月 19-24  
日) Newry, ME (アメリカ)  
上村尚美: 水素分子は糖尿病モデルマウ  
スにおいて肝臓での脂質代謝関連遺伝子  
発現を誘導し酸化ストレスを抑制し肥満  
を改善する 第 88 回 日本薬理学会年会  
(2015 年 3 月 18-20 日) 名古屋国際会議場  
(愛知県名古屋市)  
Naomi Kamimura: Molecular hydrogen  
induces hepatic PGC-1 expression and  
reduces oxidative stress, improves  
obesity in *db/db* mice. International  
meeting of mitochondrial pathology  
(2014 年 6 月 15-19 日) Tampere (フィン  
ランド)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上村 尚美 (KAMIMURA, Naomi)  
日本医科大学・先端医学研究所・准教授  
研究者番号: 60283800

### (2) 研究分担者

なし

### (2) 連携研究者

太田 成男 (OHTA, Shigeo)  
日本医科大学・大学院医学研究科・准授  
研究者番号: 00125832

ウォルフ アレクサンダー (WOLF,  
Alexander)

日本医科大学・先端医学研究所・講師  
研究者番号: 20434136

井内 勝哉 (IUCHI, Katsuya)

日本医科大学・先端医学研究所・助教  
研究者番号: 40553847