

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：34450

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26350681

研究課題名(和文)水素水によるヒト皮膚細胞における細胞遊走現象と創傷治癒メカニズムの探索

研究課題名(英文) Exploratory study on cell migration and wound healing of human skin cells treated with hydrogen water

研究代表者

李 強 (Li, Qiang)

大阪物療大学・保健医療学部・准教授

研究者番号：60621860

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)：水素水(HW)を用い、損傷を与えたヒト培養細胞の移動能などを検証し、主に次の成果が得られた。1)スクラッチした皮膚線維芽細胞にHWと白金ナノコロイド(Pt-nc)を投与すると、HW群は48時間後糸状仮足を示し始め、また、HW+Pt-ncはBax/Bcl-2比を調節する可能性が示唆された。2)低濃度の固形シリカ吸蔵水素(H₂-silica)がスクラッチした正常食道上皮細胞(HEEpiC)には微絨毛形成や移動能の活性化がみられ、アポトーシスの誘導効果も確認された。3)H₂-silicaが食道扁平上皮癌細胞の移動を阻害し、高濃度のH₂-silicaがHEEpiCに毒性効果をもたらすことが確認された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the cell migration of wounded, cultured human cells treated with hydrogen water (HW), which exhibits antioxidant properties. First, HW and platinum nanocolloid (Pt-nc) were administered to the wound scratched dermal fibroblasts. Filopodia began to emerge after 48 hours in the HW group. It is possible that HW + Pt-nc regulates the Bax/Bcl-2 ratio. Secondly, hydrogen-occluding silica microparticles (H₂-silica) were administered at low concentrations to normal human esophageal epithelial cells (HEEpiCs) that were wound scratched. The results verified that microvilli formation and cell migration are associated with apoptosis induction. It was further confirmed that H₂-silica inhibits the cell migration of human esophageal squamous cell carcinoma, and H₂-silica at high concentrations exerts a toxic effect on HEEpiCs.

研究分野：リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：水素水 細胞移動 創傷治癒 固形シリカ吸蔵水素 アポトーシス 糸状仮足

1. 研究開始当初の背景

過去に、水素の溶解度は比較的低く、体内に吸収されることができず、生理的に不活性ガスであると考えられていたため、ヒトを含む高等生物における水素の役割はあまり注目されていなかった。1975年、Doleらは先鞭をとって、水素ガスを用いて皮膚がんへの治療を施した結果を報告した。1988年、Buxtonらは水素ガスの水溶液中におけるヒドロキシルラジカル($\text{HO}\cdot$)との反応を観察した。2007年になって、太田らは水素ガスの吸入が抗酸化、抗アポトーシス特性を有し、脳虚血及び再灌流障害を惹起させた動物実験においてショックに伴って生成する $\text{HO}\cdot$ から選択的に保護できることを見出した。これにより、安価な医療用水素ガスと分子状水素水 (hydrogen water, HW) が再び研究のトピックスとなり、日本に勃興した水素医学の発展にもなった。作製が簡単、薬物より安価、且つ無尽蔵の資源となるHWが広く応用されれば、画期的な、抗酸化に基づく多種多様な治療法になりえるものと予想される。

この背景において、本研究の一部では、バブリング式で精製された分子状水素を含有する培地を用い、各種ヒト培養細胞への生物学効果の検証を行った。ただし、水素ガスの使用はその物理化学的特性に起因して、実験研究室において取り扱い上に厳しい制限がある。このため、本研究は、高圧水素ガスを使用せず、水溶法で水素分子を産生させることが可能な固形シリカ吸蔵水素($\text{H}_2\text{-silica}$)を用いて、液体培地に溶かした分子状水素を含有する培地を作製して、細胞培養にも使用した。

2. 研究の目的

H_2 の分子量は最小でありながら、強力な拡散能力を有し、容易に体内小腸絨毛上皮細胞を通過する。一旦体内に吸収された水素分子は、血液循環を通じて、真皮組織や表皮組織に移動し、皮膚創傷の中の活性酸素種(ROS)を消去し、真皮の線維芽細胞(NHDF)やコラーゲンの構築促進、表皮の角化細胞の増殖により、血管形成及び組織修復の完成に至ると考えていたうえ、本研究はHW投与後の各種の細胞の移動率、糸状仮足や微絨毛の形成を観察し、アポトーシスや細胞骨格を中心とするシグナル経路から、リハビリテーション科学・福祉工学分野における褥瘡などによる皮膚潰瘍を始め、放射線被ばくによる食道ダメージに及び創傷治癒メカニズムを探索することを目的とした。

細胞生物学範疇において、HWに対して主に抗酸化効果、創傷治癒効果、抗がん効果、アポトーシス誘導効果の4つの方面から検証を行った。

3. 研究の方法

本研究は、*in vitro* 的に対数増殖期になる数種類の細胞を培養してHW投与の有無などの

実験条件の下で処置した。処置した直後及び時間経過後に各群にそれぞれ細胞の生存率(WST-8 Assay)、ROS産生率(NBT stain)、遊走能(ibidi Insert Culture™ Assay, Wound Healing Assay)、DNA断片化(Hoechst Assay)を計量的指標として検証した。一方、細胞移動、細胞骨格を同定したため、phalloidin / DAPI AssaysやCrystal Violet Stainにて細胞形態学的変化を確認した。なお、ウエスタンブロット分析を用いて、Bcl-2やBaxを含むアポトーシス関連因子、並びにfascinや β -actinを含む細胞骨格や糸状仮足のシグナル関連因子の発現を調べた。

4. 研究成果

従来の分子状水素に関する研究は、細胞移動能及びアポトーシスと細胞骨格との間の関係を調べていない。我々は、まず、特製のバブリング水素水精製装置を用いて、より一層安全性を高めたプロトコルに従い、バブリング水素水の精製を行った。精製した水素水と既知の抗酸化剤である白金ナノコロイド(Pt-nc)と併用して、NHDFに及ぼした影響を、主に細胞移動率とシグナル伝達経路から検証した。創傷治癒アッセイを実施した後、HW群では、48時間後に特徴的な糸状仮足を示し始めた。スクラッチの場合、HW + Pt-nc群のBcl-2やBax、fascin / tubulinに一定の変化が見られた。HW + Pt-ncがBax/Bcl-2比を調節している可能性も示した。発表に値する結果が得られたため、関連学会に応募して演題発表を行った。この成果について国際誌への投稿作業も進んでいる。

また、我々はヒト正常食道上皮細胞(HEEpiC)における細胞移動運動性及び細胞骨格(F-アクチン)の変化に対する $\text{H}_2\text{-silica}$ の影響を調べた。低濃度のスクラッチ群において微絨毛の形成が活性であって、細胞移動が促進されたという結果が見受けられた。創傷修復効果が $\text{H}_2\text{-silica}$ の抗酸化能力に起因し得ることが示唆された。また、スクラッチ群では、比較的高いレベルの活性化カスペーゼ-3が発現され、300 ppm群でBax / Bcl-2比を増加させる傾向を示した結果から、 $\text{H}_2\text{-silica}$ がHEEpiC、特にスクラッチした細胞においてアポトーシスを誘導することが示唆された。さらに、100、300及び600 ppmのスクラッチ群と非スクラッチ対照群のfascin / tubulin比は、増加する傾向があったので、 $\text{H}_2\text{-silica}$ は正常上皮細胞に対するファスチン作用を促進することができ、増殖効果を有し得ると考えられた。この成果は英文原著論文として国際学術誌にアクセプトされた。

一方、水素の無尽蔵の特性、人体への有効性が注目されているが、その使用上の安全性が広範な応用に対して敬遠される「ボトルネック」にもなる。我々はバブリングHW製造装置の開発過程を総説して、精製されたHWを含有する培地を用い、各種ヒト培養細胞への生物学効果の検証を行った。精製後、開封

しておく時間の推移に従い溶存している水素が抜けていき、試験において2時間で水素溶存度(DH)が約半分になることが分かった。従来の精製水に水素ガスを噴出して作られた水素水を用いて培地を調製する方法では、調製の過程の中ですでに水素が一部蒸散し、酸化還元電位(ORP)値はプラス方向へ著しく上昇したことも確認された。また、バブリング前のPt-nc添加DMEM培地の測定では+176 mVのORPを示し、Pt-nc添加だけでは還元活性は生じず、Pt-ncを添加後に水素をバブリングすることが重要であることが確認された。

なお、日本の水素水精製装置の開発技術を国際水素医学分野に発信するため、我々はHWを製造している過程の中で心得た精製法及びその安全性、また精製されたHW及び分子状水素を含有する培地の物理化学特性を掌握した。そのうえ、使用してきた水素水精製装置に関する既報論文や公開特許公報を基に作成したレビュー論文が国際学術誌に掲載された。

がん細胞の周りの正常細胞をできるだけ傷つけずに、多剤併用、放射線と化学療法のコンプレックス治療法として制がん医学への応用の可能性を探るため、ヒト食道上皮に由来するKYSE-70細胞とHEEpiCを実験対象にした。この研究では、H₂-silica投与48時間後KYSE-70細胞の増殖に対する阻害効果が見出された。活性化カスパーゼ-3及びBax/Bcl-2 ratioの実験結果から、H₂-silicaがKYSE-70細胞のアポトーシスを誘導する効果を有することが確認された。高濃度のH₂-silicaは、HEEpiCにおいて顕著なアポトーシスを引き起こした。これらの結果は、H₂-silicaががん細胞に対して阻害効果を有するが、高濃度のH₂-silicaのみがHEEpiCに細胞毒性効果をもたらすことが示唆された。H₂-silicaは、特に処理後最初の48時間に、KYSE-70細胞に対して抗増殖効果を有した。

そのほか、我々はHWと同様で新規な抗酸化剤であるPt-ncのヒト食道上皮由来細胞株に関する放射線防護効果の有無を検討した。実験結果は、抗酸化剤と放射線との併用はがん細胞の抑制に適用するが、正常細胞に増殖の抑制ないし毒性をもたらす可能性が示唆された。

最後に、HWの挙動とモダリティについては、未だに不明な点が多い。これからの研究展望としては、HW投与の際の、上皮細胞成長因子、線維芽細胞増殖因子がROSとの関係、損傷した正常細胞の増殖やがん細胞への殺傷効果とアポトーシスとの関係、細胞移動と細胞骨格との関係を、シグナル経路からより広範に現象観察の域を超えたメカニズムに関する探索に参る所存である。

(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 7 件)

李強, 田中良晴, 田中博司, 三羽信比古. 水素医学研究概況及び関連文献のビブリオメトリックス解析. 大阪物療大学紀要, 2015, 3:31-40.

Li Q, Tanaka Y, Saitoh Y, Miwa N. Effects of platinum nanocolloid in combination with gamma irradiation on normal human esophageal epithelial cells. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2016, 16:5345-5352.

李強, 朝田良子, 小縣裕二, 小水満, 山口功, 山田八重子, 出原明歩, 黒田夏希, 新免彩優美, 田中博司. - 日本学術振興会平成 27 年度研究成果の社会還元・普及事業 - 「ひらめき ときめきサイエンス in 大阪物療大学」実施報告. 大阪物療大学紀要, 2016, 4:29-33.

朝田良子, 村岡高行, 中西志郎, 後藤英和, 田中良晴, 李強. バブリング水素水製造装置の安全性及び実用性を再考する. 大阪物療大学紀要, 2016, 5:33-41.

Li Q, Asada R, Tanaka Y, Miwa N. Fundamental insight into the methodology of hydrogen water in biological studies. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2017, 17:5134-5138.

Li Q, Tanaka Y, Miwa N. Influence of hydrogen-occluding-silica on migration and apoptosis in of human esophageal cells *in vitro*. Medical Gas Research, 2017, 7:76-85.

Li Q, Tanaka Y, Miwa N. Effects of hydrogen-occluding silica microparticles on wound repair and cell migratory behavior of normal human esophageal epitheliocytes. Medical Gas Research, 2018, 8:in press.

〔学会発表〕(計 2 件)

Li Q, Asada R, Tanaka Y, Miwa N. Biological effects of hydrogen-occluding silica in combination with gamma-ray radiation or X-ray on human esophageal squamous cell carcinoma (KYSE-70 cells) and normal human esophageal epithelial cells (HEEpiC). 第 59 回日本放射線影響学会学術大会, 2016 年 10 月 26-28 日, JMS アステールプラザ, 広島市(広島県).

李強, 朝田良子, 田中良晴, 三羽信比古. バブリング水素水が正常ヒト線維芽細胞の移動能に及ぼす影響について. 第 7 回日本分子状水素医学生物学会大会, 2017 年 10 月 29 日-30 日, ホテル名古屋ガーデンパレス, 名古屋市(愛知県).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李 強 (LI Qiang)

大阪物療大学・保健医療学部・准教授

研究者番号：60621860

(2) 研究分担者

田中 良晴 (TANAKA Yoshiharu)

大阪府立大学・高等教育推進機構、工学研究科量子放射線系放射線生物学専攻・准教授

授

研究者番号：60236651

研究分担者

朝田 良子 (ASADA Ryoko)

大阪物療大学・保健医療学部・講師

研究者番号：60546349