

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670119

研究課題名(和文) 分子状水素によるグレリン産生亢進に關与する交感神経受容体シグナル活性化機構の解明

研究課題名(英文) Characterization of molecular hydrogen induced mechanism for ghrelin secretion through the sympathetic nerve system

## 研究代表者

松本 明郎 (Matsumoto, Akio)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60437308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、分子状水素(H<sub>2</sub>)の生体作用に注目が集まっているが、分子レベルでの作用機序は不明である。研究代表者は、経口摂取された水素水が胃におけるグレリン産生を転写レベルで活性化し、血中における活性型グレリン濃度を受容体刺激に依存して上昇させる事を明らかにした。そこで、分子状水素が受容体シグナルに対してどの様に影響を及ぼしているのかについて検討した。グレリン遺伝子5'上流域のプロモーター活性測定、細胞内cAMP濃度のリアルタイム測定、動物個体に対する水素ガスを吸引させ検討を行い、分子状水素が受容体刺激を増強させていることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The therapeutic potential of molecular hydrogen is emerging in a number of human diseases and in their animal models. However, the molecular mechanism in these hydrogen effects has not been elucidated enough. We showed that H<sub>2</sub> supplementation increases gastric expression of mRNA encoding ghrelin and ghrelin secretion, which are antagonized by the  $\alpha$ -1-adrenoceptor blocker. Thus, we focused on  $\alpha$ -adrenoceptor signaling to investigate the molecular mechanism of action induced by hydrogen. Ghrelin gene promoter activity assay, real-time analysis of intracellular cAMP measurements, and in vivo analysis with mouse provided evidence that molecular hydrogen enhances  $\alpha$ -adrenoceptor signal.

研究分野：ガス薬理学

キーワード：分子状水素 受容体 グレリン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、分子状水素 ( $H_2$ ) の生体作用に注目が集まり、脳梗塞・心筋梗塞などにおける虚血再灌流障害を水素吸入により低減させること、水素水飲水によるパーキンソン病の神経症状を改善させる、心肺停止後の蘇生率を改善するなどの効果が次々と報告されている。しかし、分子状水素がこれらの効果を発揮する分子レベルでの作用機序は不明である。分子状水素の直接作用としてヒドロキシラジカル ( $OH\cdot$ ) を消去する抗酸化能のみが強調されてきた。パーキンソン病モデル動物において、低濃度の水素水を経口で摂取させることによっても脳組織におけるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) の減少が抑制される事から、水素の作用機序を抗酸化能に限定して説明する事は難しいと考えられ始めた。そこで、研究代表者らは、経口摂取された水素水は、胃におけるグレリン産生を転写レベルで活性化し、血中における活性型グレリン濃度を上昇させ、グレリン受容体を介して脳神経における TH の減少を防いでいる事を明らかにした。 $\beta_1$  受容体阻害薬であるアテノロールを前処置した上で水素水を投与すると、グレリンの産生上昇が認められず、TH の減少を防ぐ保護効果も認められなくなることから、この経路には交感神経受容体が関与することが示唆された。しかし、分子状水素  $H_2$  と  $\beta$  受容体、アテノロールが、どのようにグレリン産生に結びついているのかについての知見は、皆無であった。

## 2. 研究の目的

そこで、分子状水素による  $\beta$  受容体を介したグレリン産生誘導をモデルとして、分子状水素の作用機序を分子レベルで解明することを目的とした。 $\beta$  受容体刺激がグレリン産生を亢進させることが報告されているため、分子状水素が  $\beta$  受容体シグナルに対してどの様に影響を及ぼしているのか、または  $\beta$  受容体シグナルを引き起こすリガンドとしての機能を持つのかどうかについても検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) グレリン遺伝子 5' 上流域のプロモーター活性測定

経口摂取された水素水は、胃におけるグレリン遺伝子発現を亢進し、血中グレリン濃度を上昇させると考えられる。そこで、グレリン遺伝子の転写活性に与える分子状水素の影響を検討するために、グレリン遺伝子の 5' 上流域をクローニングし、培養細胞を用いたプロモーターアッセイを実施した。

### (2) 細胞内 cAMP 濃度のリアルタイム測定

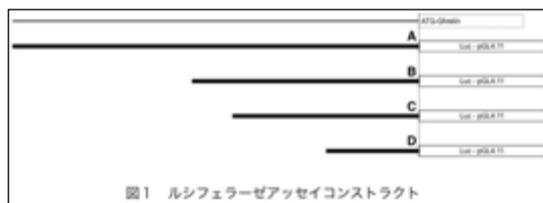
$\beta$  受容体刺激は細胞内 cAMP 量を変化させ、シグナルの変化を生じさせる。分子状水素そのものが  $\beta$  受容体刺激作用を有するのか検討することを目的として、 $\beta$  受容体を内因性に発現している培養細胞 (HEK293 細胞) に cAMP 濃度に応じた生物発光を示す系を作成し、細胞内 cAMP 濃度のリアルタイムモニターを可能にした。

### (3) 動物個体に対する水素ガス吸引の効果

マウスに水素ガスを自発呼吸により吸引させ、吸引前後での心拍数変化をモニターし、交感神経系に与える影響を観察した。マウスは自発呼吸を維持したまま麻酔下にて管理し、室内気に一定濃度 (5%) の水素ガスを混合した空気を呼吸させた。この際、肢誘導によるマウス心電図測定を継続して実施し、心拍数の測定に用いた。

## 4. 研究成果

### (1) グレリン遺伝子 5' 上流域のプロモーター活性測定



グレリン遺伝子の 5' 上流域 (約 1.5 kbp) を PCR にてルシフェラーゼアッセイ用ベクター (pGL4.11) にクローニングし、シークエンスを確認した。その後、図 1 に示す様に 3 種類の deletion mutant をそれぞれ作製した。これらのベクターを各々コントロールベクター (pGL4.74) とともに HEK293 細胞で共発現させルシフェラーゼ活性を指標としたプロモーターアッセイに供した。

HEK293 細胞は、内因性の  $\beta$  受容体を発現しており、これまでも  $\beta$  受容体シグナル研究に多用されてきた実績がある。

分子状水素の飽和水溶液濃度は 0.8 mM である。培養液中に水素ガスを飽和させるため、シリンジ内に培養液と水素ガスを吸引し十分に混和し、一定時間経過後に水素添加培養液とした。レポーター遺伝子を導入した細胞に、水素添加培養液を加え、3.5 時間経過後に細胞を回収し、ルシフェラーゼアッセイに用いた。水素添加のコントロールとして、 $\beta$  受容体刺激薬としてアドレナリン (1  $\mu$ M) による活性化も同様に検討した。

ルシフェラーゼ活性をコントロールベクターにより標準化し、水素添加培養液の有無による活性値の変化倍率としてデータを比較した。

アドレナリン添加 (図 3) による発現誘導が全長 A および B を共発現させた細胞では認

められるのに対して、C、Dでは認められなかった。一方、水素添加培養液（80  $\mu$ M 相当）を用いた場合にもアドレナリンと同様の反応性を示したが、増強効果は上回っていた（図2）。

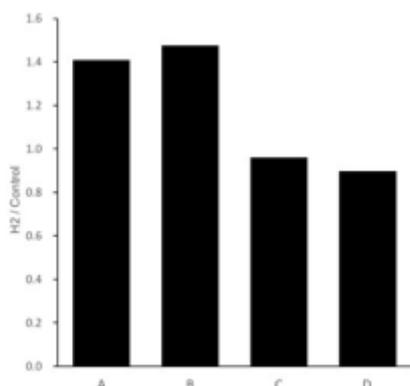


図2 H<sub>2</sub>添加によるルシフェラーゼ活性の増加

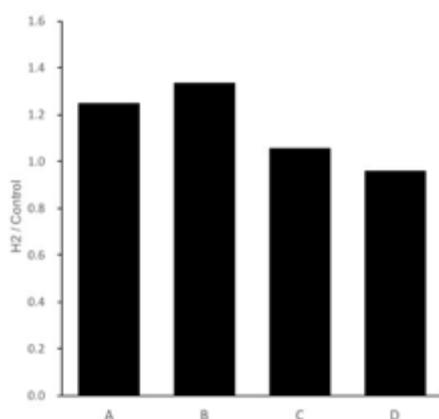


図3 Adrによるルシフェラーゼ活性の増加

これらのデータから、アドレナリン刺激によりグレリン転写活性は増大するが、アドレナリン反応性を示すエレメントはBとCの間の領域に存在すると考えられた。一方、水素添加によっても同様の活性変化が認められたことから、アドレナリン刺激と同じ経路を増強することが水素添加によるグレリン遺伝子の転写活性を増強させるメカニズムであることが示唆された。

B-C間の遺伝子配列における転写因子結合モチーフの存在を検索した。同部位には、CREB (cAMP Responsive Element Binding protein) が存在していることが報告されていた (Biochem. J. 420:403-411, 2009)。よって、アドレナリン刺激による増強効果とも同様の反応を示すことから、 $\beta$ 受容体シグナルを媒介するセカンドメッセンジャーである cAMP が分子状水素によるグレリン遺伝子発現の増強作用に関与していることが示唆された。

## (2) 細胞内 cAMP 濃度のリアルタイム測定

グレリン遺伝子の転写活性の解析から、cAMP の関与が示唆された。そこで、分子状水

素を細胞に作用させた際に、細胞内 cAMP 濃度の変化を観察する為に、細胞内 cAMP 濃度のリアルタイム測定系を導入した。

GloSensor-cAMP (Promega, Fan et al. ACS Chem. Biol., 2008) を安定に発現した HEK293 細胞 (HEK293-cMAP) を作製した。GloSensor-cAMP システムは、ホタルルシフェラーゼ内部に cAMP 結合タンパク質の一部が挿入されており、同部位に cAMP が結合すると、ルシフェラーゼタンパク質が構造変化を示し、生物発光量が増加する。そのため、基質を加えた上で、細胞に刺激を加え cAMP 量が変わると、リアルタイムに生物発光量が変わり、生細胞内での cAMP 濃度変化を連続して観察することが可能である。

HEK293-cAMP 細胞は、1 nM Adrenaline 刺激により増加する細胞内 cAMP 濃度変化をモニターすることもできるため、十分な感度と解像度を有していた。

まず、分子状水素が単独で  $\beta$  受容体刺激効果を示すかどうかを確認する為、HEK293-cAMP 細胞を水素添加培養液にて刺激したところ、いずれの濃度においても生物発光量に変化は認められなかった。すなわち、H<sub>2</sub> 単独では  $\beta$  受容体刺激作用を示さないことが明らかになった。

次に、代表的な  $\beta$  受容体刺激薬であるアドレナリン (Adr: 図4) とイソプロテレノール (Iso: 図5) により刺激する際に H<sub>2</sub> を共存させて検討した。いずれの刺激薬に対しても、H<sub>2</sub> は刺激薬単独で作用させた場合よりも cAMP 濃度を上昇させた。

さらに、cAMP 分解酵素である Phosphodiesterase (PDE) の非特異的阻害薬の 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) で処置した上で Adr や Iso により刺激を加えたところ、cAMP 濃度上昇に対する H<sub>2</sub> の併用効果が依然として認められた。よって、水素の作用点は PDE 阻害作用ではなく、 $\beta$  受容体から Adenylate cyclase までの間であると考えられた。

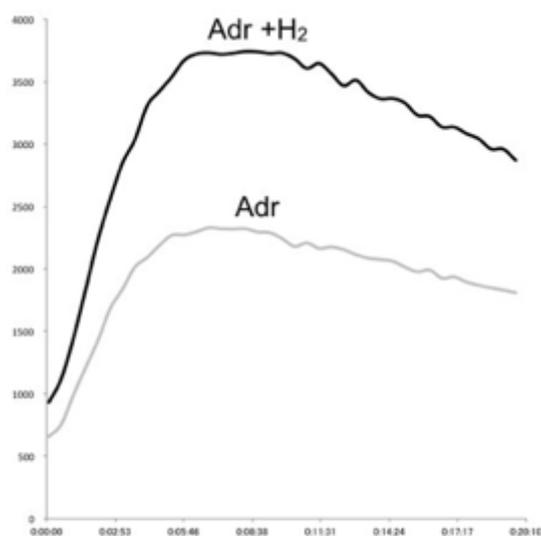


図4 Adrによる細胞内cAMP濃度変化

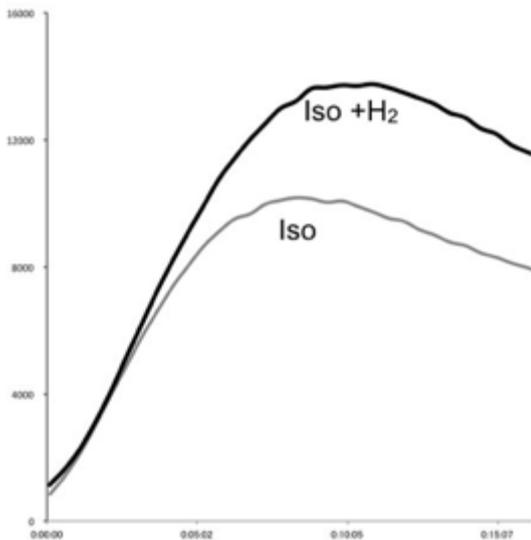


図5 Isoによる細胞内cAMP濃度変化

また、Propranololにより $\beta$ 受容体を遮断したところ、cAMP濃度上昇はいずれの処置によっても認められなかった。よって、 $\beta$ 受容体刺激が加わった条件下で分子状水素はその増強効果を示す協働作用が作用機序であると考えられた。

### (3) 動物個体に対する水素ガスを吸引の効果

マウスに対し、メドトミジン・ブトルファンール・ミダゾラムを混注し、自発呼吸を保ったままの状態を麻酔した。保温器にて体温を保ったまま、肢誘導体表心電図を測定し心拍数を連続的にモニターした。さらに、水素ガスを室内気で希釈し5%水素ガスを作製した。マウス頭部を覆う形のフェースマスクを通して5%水素ガスを自発呼吸下にて投与した。吸入開始から30分間心電図をモニターし、心拍数変化を観察した。

全例では無いが、一定の割合で水素ガス吸入を行うことにより心拍数に変化が生じる個体が認められたが、実施例全てを含めた際には統計学的に有意な変化を示すことはなかった。

自発呼吸を保つ麻酔深度のため、麻酔下でもヒゲに対する刺激等が心拍数に変化を示すことや、フェースマスク装着による顔面付近の温度上昇などが生じ、心拍数に影響が生じたものとも考えられた。時間的な制約から、マウス個体を用いた実験では、十分な解析を行うことはできなかった。

## 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5件)

1. Kojima A, Matsumoto A, Nishida H, Reien Y, Iwata K, Shirayama T, Yabe-Nishimura C, and Nakaya H. A protective role of Nox1/NADPH oxidase in a mouse model with hypoxia-induced bradycardia. *Journal of Pharmacological Sciences* (査読有) 127: 370-376, 2015. doi:10.1016/j.jphs.2015.02.007
2. Sanayama Y, Matsumoto A, Shimojo N, Kohno Y, and Nakaya H. Phenylalanine sensitive K562-D cells for the analysis of the biochemical impact of excess amino acid. *Scientific Reports* (査読有) 4: 6941, 2014. doi:10.1038/srep06941
3. Suzuki K, Matsumoto A, Nishida H, Reien Y, Maruyama H, and Nakaya H. Termination of Aconitine-Induced Atrial Fibrillation by the  $K_{ACh}$ -Channel Blocker Tertiapin: Underlying Electrophysiological Mechanism. *Journal of Pharmacological Sciences* (査読有) 125(4):406-414, 2014. doi:10.1254/jphs.14023FP
4. Sunagawa T, Shimizu T, Matsumoto A, Tagashira M, Kanda T, Shirasawa T, and Nakaya H. Cardiac electrophysiological alterations in heart/muscle-specific manganese-superoxide dismutase-deficient mice: prevention by a dietary antioxidant polyphenol. *Journal of Pharmacological Sciences* (査読有) 2014: 704291, 2014 doi:10.1155/2014/704291
5. 松本明郎. 一酸化窒素(NO)による生理機能調節とその破綻 基礎老化研究 (査読有) 38(3): 11-18, 2014. [http://www.jsbmg.jp/products/product\\_s\\_back2014.html](http://www.jsbmg.jp/products/product_s_back2014.html)

[学会発表] (計10件)

1. 松本明郎. ガス薬理学の発展の経緯 第89回日本薬理学会年会 薬理学会・毒性学会共催シンポジウム「ガス状分子と活性イオウによる病態制御機構の解明」2016年03月09日~2016年03月11日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

2. 松本明郎、清水建、霊園良恵、立花知子、渡部恭大、野田公俊、中谷晴昭 第 89 回日本薬理学会年会 2016 年 03 月 09 日～2016 年 03 月 11 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
3. 松本明郎 マウス腸管内における NO 産生と感染防御系としての役割 第 708 回九大生医研セミナー(招待講演) 2016 年 02 月 24 日 九州大学(福岡県・福岡市)
4. 松本明郎 マウス腸管での NO 産生と感染防御系としての機能 第 210 回 BSJM 2016 年 02 月 02 日 千葉大学(千葉県・千葉市)
5. 松本明郎、霊園良恵、立花知子、清水健、渡部恭大、野田公俊、中谷晴昭 マウス腸管内における NO 産生の可視化による殺菌機構の解析 133 回日本薬理学会関東部会 2015 年 10 月 10 日 柏の葉カンファレンスセンター (千葉県・柏市)
6. 渡部恭大、霊園良恵、立花知子、清水健、中谷晴昭、松本明郎 マウス腸管における NO 依存性殺菌機構の解析 132 回日本薬理学会関東部会 2015 年 07 月 04 日 明海大学浦安キャンパス(千葉県・浦安市)
7. 松本明郎 臨床応用を目指したガス状分子の機能解析 第 88 回日本薬理学会年会 2015 年 03 月 18 日～2015 年 03 月 20 日 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
8. 松本明郎 アミノ酸過負荷によるエネルギー代謝異常 第 692 回 生医研セミナー(多階層生体防御システム拠点) スクレオチドプール研究センターセミナー(招待講演) 2015 年 03 月 05 日 九州大学生体防御医学研究所(福岡県・博多市)
9. 松本明郎 NO の生理活性制御因子としてのガス状分子の役割 第 14 回日本 NO 学会学術集会 2014 年 05 月 16 日～2014 年 05 月 17 日 ホテルニューオータニ佐賀(佐賀県・佐賀市)
10. 松本明郎 血管組織における NO による抗酸化能制御 第 14 回日本 NO 学会学術集会 2014 年 05 月 16 日～2014 年 05 月 17 日 ホテルニューオータニ佐賀(佐賀県・佐賀市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 明郎 (MATSUMOTO, Akio)  
千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60437308