

200911016A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

臓器特異的ストレス応答探索マウスを用いた 疾病予防法の開発

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 佐野元昭

平成22年5月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

臓器特異的ストレス応答探索マウスを用いた
疾病予防法の開発

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 佐野 元昭

平成22年5月

目 次

I. 総括研究報告	
臓器特異的ストレス応答探索マウスを用いた 疾病予防法の開発に関する研究	1
佐野 元昭	
II. 分担研究報告	
臓器特異的ストレス応答探索マウスを用いた 疾病予防法の開発に関する研究	5
太田 成男	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	8
IV. 研究成果の刊行物・別刷	10

臓器特異的ストレス応答探索マウスを用いた疾病予防法の開発に関する研究

研究代表者 佐野元昭 慶應義塾大学医学部 再生医学教室講師

研究要旨

アルデヒド脱水素酵素 ALDH2 はミトコンドリアに局在するアルデヒドを解毒する重要な抗酸化酵素である。野生型 ALDH2 (ALDH2*1) に一塩基だけ置換した遺伝子多型 ALDH2*2 は不活性型で野生型 ALDH2*1 に対して優勢抑制的に働く。日本人の約 40% がこの遺伝子変異をホモかヘテロで持っている。ALDH2*2 の遺伝子多型を持つ人はアルコールフラッシング症候群（お酒弱い）を示すだけでなく、アルツハイマー病の罹患率や血中酸化脂質濃度が高くなる傾向が指摘されている。ALDH2*2 と疾患との関連は今だ明らかにされていない。我々は、臓器特異的に ALDH2*2 を過剰発現させたマウスを作製した。脳では加齢に伴って神経細胞が変性脱落しアルツハイマー病類似の記憶力障害を呈した。寿命は野生型と比べて短かった (Ohsawa I, 2007)。心臓では、ミトコンドリア酸化ストレスが高まっているにもかかわらず心機能は維持されていて、また代謝応答を介して虚血・再灌流障害に対して抵抗力を示した (Endo J, Sano M 2009)。肝臓では薬物代謝が活性化し、アセトアミノフェン肝障害後の治癒機転が亢進していた。血管では、アセチルコリンによる内皮依存性血管拡張反応が傷害され、ニトログリセリンによる血管拡張反応も低下していた。

分担研究者 太田成男
日本医科大学大学院 教授

この遺伝子操作マウスを使って ALDH2*2 を持つ人の健康維持に必要な注意点が導き出せるだけでなく、薬物のスクリーニングに使用することによって新規治療法、抗加齢療法を模索する。

A.目的

ALDH2*2 マウスは日本人に多い遺伝子多型 ALDH2*2 の疾患との関連を明らかにするだけでなく、アルツハイマー病や心不全、糖尿病の病態発症に深く関与するミトコンドリア酸化ストレスに対する代謝応答を検討するのに有用な用途の広い疾患モデル動物と位置づけられる。

B. 研究の方法

アルデヒド脱水素酵素 ALDH2 はミトコンドリアに局在するアルデヒドを解毒する重要な酸化酵素である。アルデヒドはミトコンドリアにおける酸化的エネルギー合成過程で産生され、加齢性疾患や老化と密接に関わっている。野生型 ALDH2 (ALDH2*1) に一塩基だけ置換した遺伝子多型 ALDH2*2 は不活性型で野生型 ALDH2*1 に対して優勢抑制的に働く。ALDH2*2 は東北アジアに限局して観察される遺伝子多型で日本人の約 40% がこの遺伝子変異をホモかヘテロで持っている。ALDH2*2 の遺伝子多型を持つ人はアルコールフラッシング症候群（お酒弱い）を示すだけでなく、アルツハイマー病の罹患率や血中酸化脂質濃度が高くなる傾向が指摘されている。我々は、臓器特異的に ALDH2*2 を過剰発現させたマウスを使って ALDH2*2 の細胞内代謝に及ぼす影響、ALDH2*2 と疾患との関連、なぜアジア人の中に ALDH2*2 の遺伝子多型が多く残ったのかを説明していく。

C. 研究結果

脳に ALDH2*2 を発現させると神経細胞が変性脱落しアルツハイマー病類似の記憶力障害を呈し寿命が短縮した (Ohsawa I. 2007)。心臓に ALDH2*2 を発現させるとミトコンドリア酸化ストレスが高まっているにもかかわらず心機能は維持されていて、また代謝応答を介して虚血・再灌流障害に対して抵抗力を示した (Endo J. & Sano M. 2009)。血管では、アセチルコリンによる内皮依存性血管拡張反応が傷害され、ニトログリセリンによる血管拡張反応も低下していた。肝臓では薬物代謝が活性化し、アセトアミノフェン肝障害後の代謝応答（抱合反応）が迅速で修復機転が亢進し

ていた。

D. 考察

ALDH2*2 マウスの解析からアルツハイマー病や心不全、糖尿病の病態発症に深く関与するミトコンドリア酸化ストレスに対する代謝応答を明らかにしてきた。これらの知見からこれらの疾病に対する新規予防法や治療法の標的分子が浮き彫りになった。

E. 結論

ALDH2*2 を持つ人はミトコンドリアにおけるアルデヒド代謝が低下しており過度な酸化ストレス障害に対する抵抗力は低下している。したがって、ALDH2 の活性を高めるような治療介入はアルツハイマー病や虚血再灌流障害の軽減に有効と考えられる。一方で、生涯にわたる低用量のアルデヒド刺激は内因性ストレス応答機構を活性化させて ALDH2*2 に対して代償時には酸化ストレスに対する抵抗力が野生型 ALDH2*2 を持つ人より増強されている可能性も示唆された。このメカニズムの解明は疾病予防やアンチエイジング医療に応用可能と考える。

F. 健康危険情報

該当しません。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Endo J, Sano M, Katayama T, Hishiki T, Shinmura K, Morizane S, Matsuhashi T, Katsumata Y, Zhang Y, Ito H, Nagahata Y, Marchitti S, Nishimaki K, Wolf AM, Nakanishi H, Hattori F, Vasiliou V, Adachi T, Ohsawa I, Taguchi R, Hirabayashi Y, Ohta S, Suematsu M, Ogawa S, Fukuda K. Metabolic Remodeling Induced by Mitochondrial Aldehyde Stress Stimulates Tolerance to Oxidative Stress in the Heart. *Circ Res.* 2009; 105(11):1118-1127.
2. Sano M. Mitochondrial protection and the reversal of left ventricular remodeling. *Circ J.* 2009 73(11):2017-2018.
3. Suzuki Y, Sano M, Hayashida K, Ohsawa I, Ohta S, Fukuda K. Are the effects of alpha-glucosidase inhibitors on cardiovascular events related to elevated levels of hydrogen gas in the gastrointestinal tract? *FEBS Lett.* 2009; 583(13): 2157-2159.

2. 学会発表

1. Sano M. Inadequate suppression of aldosterone biosynthesis after salt load is a primary cause of sodium-retention in Dahl-salt sensitive rat. The 2nd International Aldosterone Forum in Japan (2009) Tokyo

2. Sano M. Metabolic remodeling induced by mitochondrial aldehyde stress stimulates tolerance to oxidative stress in the heart. The 4th International Congress on Stress Response in Biology and medicine/The 4th Annual Meeting of The Biomedical Society for Stress Response (BSSR) 2009. Sapporo
3. Sano M. Mitochondrial oxidative stress induces an integrated stress response in the heart. The 26th Annual Meeting of International Society for Heart Research (ISHR) Japanese Section. (2009) Sapporo
4. Sano M. Metabolic Response To Lifelong Mitochondrial Oxidative Stress. The 74nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (2010) Kyoto
5. Sano M. Hormetic response to lifelong mitochondrial oxidative stress. The 9th Annual International Conference on DOSE-RESPONSE 2010 (2010) University of Massachusetts, MA
6. 佐野元昭. CREST 公開シンポジウム 代謝産物の変化動態に基づく心筋ストレス応答機構の解明 (2009) 東京
7. 佐野元昭. 日本抗加齢医学会講習会 水素で心疾患を予防 (2009) 東京
8. 佐野元昭. Meet the Specialist 2009代謝産物の変化動態に基づく心筋ストレス応答機構の解明 (2009) Orlando, USA
9. 佐野元昭. 第31回心筋生検研究会 ミトコンドリア酸化障害と心筋リモデリング (2009) 大阪

10. 佐野元昭 大阪バイオサイエンス研究所第2研究部・分子行動生物学部門セミナー「PGD2の心臓における病態生理作用の解明をめざして」(2010)大阪
11. 佐野元昭 東京医科歯科大学「代謝産物の変化情報に基づく心筋機能制御法の確立」(2010)東京
12. 佐野元昭 第16回日本小児肺循環研究会「細胞内代謝を標的とした肺高血圧治療」(2010) 東京
13. 佐野元昭 第26回岡山vascular Biology研究会「代謝モジュレーターを使った心疾患治療の可能性」(2010)岡山
14. 佐野元昭 第18回William Ganz Symposium「ミトコンドリアホルメシスによる心筋保護とアンチエイジング」

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許所得
2. 実用新案登録
3. その他

該当するものはございません。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

（分担）研究報告書

臓器特異的ストレス応答探索マウスを用いた疾病予法の開発

研究分担者 太田 成男 日本医科大学大学院 教授

研究要旨

ミトコンドリアに局在するアルデヒド脱水素酵素 2 (ALDH2)の酵素欠損型遺伝子 *Aldh2*2* を導入した遺伝子組み換え細胞とマウス(DAL マウス)を作製した。酸化還元状態で蛍光波長が変化する RoGFP を用いて観察すると、*Aldh2*2* 導入細胞では、ミトコンドリア内の酸化還元状態は酸化側に移行していた。次に、*Aldh2*2* 導入マウスで加齢とともに認知機能が低下する遺伝子組み換えマウス DAL101 に対して、クロレラと水素分子 (H₂)を与えると、認知機能の低下抑制効果があることがわかった。この結果から、DAL マウスは食餌や飲用によって酸化ストレスを改善する方法の評価に有効であることがわかった。

A. 研究目的

ミトコンドリアに局在するアルデヒド脱水素酵素 2 (ALDH2)の酵素欠損型遺伝子 *Aldh2*2* を導入した遺伝子組み換えマウス (DAL マウス)では酸化ストレスが上昇し、DAL101 系列では、アルツハイマー病に似た病態を示し、加齢に伴う認知機能の低下が認められた。DAL マウスは、認知機能低下を抑制する方法を探索するためのよいモデルであると期待される。

そこで、まず培養細胞を用いて、ミトコンドリア内の酸化還元状態をモニターした。さらに、抗酸化力が強くないクロレラと水素分子(H₂)を投与し、DAL101 マウスにおいて認知機能の低下が抑制できるかどうかを調べた。

B. 研究方法

ミトコンドリア内の酸化還元状態を調べるには、-S-S-結合（酸化状態）をもち、還元されると-SH 基に変化する緑色蛍光蛋白 (RoGFP) を用いた。この RoGFP は-S-S-と-SH によって蛍光波長が変化するので、酸化還元状態をモニターできる。さらに RoGFP にミトコンドリア標的シグナルをつけて、RoGFP をミトコンドリアに局在させた。蛍光励起波長 410nm と 490nm の蛍光の比の変化をモニターすることにより、ミトコンドリア内の酸化還元状態をモニターした。

加齢に伴い認知機能が低下する DAL101 にクロレラを食餌に混ぜて、長期間投与した。あるいは、水素分子を水に溶解し、投与した。

脳の酸化ストレスは、酸化ストレスマーカーの MDA と HNE により評価し、全身の酸化ストレスは尿中の 8-オキシグアノシンの定量により評価した。神経変性は、標的細胞を免疫染色により識別して評価した。認知機能は、モリスの水迷路法と新規物質探索法、により評価した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、動物実験指針に従って行い、日本医科大学実験動物委員会の承認を得た。

C. 研究結果

RoGFP の蛍光はミトコンドリア内の酸化還元状態により変化することが確認され、酸化還元状態のモニターに有効であることが示された。そして、RoGFP により Aldh2*2 導入細胞が酸化状態へ移行することが明確になった。

クロレラを生後 8 週齢から 16 週間投与した結果、脳の酸化ストレスマーカーである MDA と HNE が減少した。モリス水迷路法と物体認知試験で、クロレラ投与によって認知機能低下が抑制されることが判明した。さらに、活性化アストログリア細胞が減少していることから、脳内炎症をクロレラが抑制していることも判明した。

水素分子を生後 1 ヶ月から 18 ヶ月間投与した結果、尿の 8-オキシグアニン量が減少し、脳の MDA と HNE が減少したことから、酸化ストレスが軽減することが明らかとなった。さらに、物体認知試験と受動回避試験で、水素分子投与群では有意に認知機能低下が抑制されていることが明らかになった。さ

らに、脳の神経変性が水素分子により抑制された。

D. 考察

DAL マウスにおいては、ALDH2 活性低下により過酸化物質由来の有毒なアルデヒドを酸化することができないので、有毒アルデヒドの解毒作用が低下することが知られており、酸化ストレスの防御機構としての ALDH2 の役割が推測されていた。本研究によって、ALDH2 酵素欠損により、ミトコンドリアの酸化状態が亢進することがはじめて明らかになった。

抗酸化物質により酸化ストレスを軽減し、酸化ストレス関連疾患の予防に寄与しようとする試みがなされてきたが、実際には有効でなかった。本研究では、むしろ弱い還元力をもつクロレラ、あるいは水素分子を用いて、加齢に伴う認知機能低下を抑制できた。このことは、還元力が強い抗酸化物質よりも、抗酸化物質が到達できるシステムの方が有効であり、実際に抗酸化物質投与によって、酸化ストレスを軽減し、認知機能の低下を抑制できることを示した。

E. 結論

DAL マウスは、ミトコンドリア内の酸化ストレスが上昇し、酸化ストレスの影響を調べるのに有効なモデルマウスであることが明らかになった。

さらに、酸化ストレスを軽減させる抗酸化物質の探索にも有効である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oharazawa, H., Igarashi, T., Yokota, T., Fujii, H., Suzuki, H., Machide, M., Takahashi, H., Ohta, S., Ohsawa, I.: Protection of the retina by rapid diffusion of hydrogen: administration of hydrogen-loaded eye drops in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010; 51(1): 487-492.
- 2) Nakajima, S., Ohsawa, I., Ohta, S., Ohno, M., Mikami, T.: Regular voluntary exercise cures stress-induced impairment of cognitive function and cell proliferation accompanied by increases in cerebral IGF-1 and GST activity in mice. *Behav. Brain Res.* 2010, in press.
- 3) Endo, J., Sano, M., Katayama, T., Hishiki, T., Shinmura K., Morizane, S., Matsuhashi, T., Katsumata, Y., Zhang, Y., Ito, H., Nagahata, Y., Marchitti, S., Nishimaki, K., Wolf, AM., Nakanishi, H., Hattori, F., Vasiliou, V., Adachi, T., Ohsawa, I., Taguchi, R., Hirabayashi, Y., Ohta, S., Suematsu, M., Ogawa, S., Fukuda, K.: Metabolic Remodeling Induced by Mitochondrial Aldehyde Stress Stimulates Tolerance to Oxidative Stress in the Heart. *Circ Res.* 2009; 105(11):1118-1127.
- 4) Nakashima, Y., Ohsawa, I., Konishi, F., Hasegawa, T., Kumamoto, S., Suzuki, Y., Ohta, S.: Preventive effects of *Chlorella* on cognitive decline in age-dependent dementia model mice. *Neurosci. Lett.* 2009; 464(3): 193-198.
- 5) Nakajima, S., Ohsawa, I., Nagata, K., Ohta, S., Ohno, M., Ijichi, T., Mikami, T.: Oral supplementation with melon superoxide dismutase extract promotes antioxidant defences in the brain and prevents stress-induced impairment of spatial memory. *Behav. Brain Res.* 2009; 200(1):15-21.
- 6) Suzuki, Y., Sano, M., Hayashida, K., Ohsawa, I., Ohta, S., Fukuda, K.: Are the effects of alpha-glucosidase inhibitors on cardiovascular events related to elevated levels of hydrogen gas in the gastrointestinal tract? *FEBS Lett.* 2009; 583(13): 2157-2159.
- 7) Nakashima-Kamimura, N., Mori, T., Ohsawa, I.,

Asoh, S., and Ohta, S. : Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009; 64(4): 753-761.

- 8) Fu, Y., Ito, M., Fujita, Y., Ito, M., Ichihara, M., Masuda, A., Suzuki, Y., Maesawa, S., Kajita, Y., Hirayama, M., Ohsawa, I., Ohta, S., Ohno, K.: Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 2009; 453(2): 81-85.

2. 学会発表

- 1)太田成男：水素水の経口投与によるシスプラチンの副作用軽減、第41回日本臨床分子形態学会総会.2009.9.4.
- 2)太田成男：水素分子による抗酸化治療・予防医学への可能性、第28回分子病理学研究会.2009.7.19.
- 3)太田成男：ミトコンドリアから発せられる酸化ストレスと水素分子による抗加齢治療・予防。第9回日本抗加齢医学会総会.2009.5.28.
- 4)太田成男：水素分子による抗酸化治療法・抗酸化予防法の開発、第51回日本基礎老化学会.2009.6.19.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

特許番号：7.626.003(USA)

名称：A genetically engineered Cdna of RAT bcl-x gene and an improved protein.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
太田成男	水素ガスと水素水による新しい概念の抗酸化治療法と予防医学	日本老年医学会	老年医学update2009-10	メジカルレビュー	東京	2009	89-99

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
佐野元昭	「心不全発症のメカニズム」酸化ストレスと心筋老化	Bio Clinica	24 (10)	891-896	2009
佐野元昭	心筋ミトコンドリアの酸化的障害に対する代 謝応答	医学のあゆみ 「心不全—研究 と臨床の最前 線」	232(5)	8887-8891	2010
Endo J, Sano M, Kawayama T, Hishiki T, Shinmura K, Morizane S, Matsuhashi T, Katsumata Y, Zhang Y, Ito H, Nagahata Y, Marchetti S, Nishimaki K, Wolf AM, Nakanishi H, Hattori F, Vasiliou V, Adachi T, Ohsawa I, Taguchi R, Hirabayashi Y, Ohta S, Suematsu M, Ogawa S, Fukuda K.	Metabolic Remodeling Induced by Mitochondrial Aldehyde Stress Stimulates Tolerance to Oxidative Stress in the Heart.	Circulation Research	105(11)	1118-1127	2009
Sano M	Mitochondrial protection and the reversal of left ventricular remodeling.	Circulation Journal	73(11)	2017-2018	2009
太田成男	ミトコンドリア医学の広がり と発展	医学のあゆみ	232(6)	642-656	2009
太田成男	水素水は老化を防げるか?	BIO Clinica	25(2)	47-51	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Oharazawa H, Igarashi T, Yokota T, Fujii H, Suzuki H, Machide M, Takahashi H, Ohta S, Ohsawa I..	Protection of the retina by rapid diffusion of hydrogen: administration of hydrogen-loaded eye drops in retinal ischemia-reperfusion injury.	Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.	51(1)	487-492	2010
Nakajima S, Ohsawa I, Ohta S, Ohno M, Mikami T.	Regular voluntary exercise cures stress-induced impairment of cognitive function and cell proliferation accompanied by increases in cerebral IGF-1 and GST activity in mice.	Behav Brain Res	in press		2010
Nakashima Y, Ohsawa I, Konishi F, Hasegawa T, Kumamoto S, Suzuki Y, Ohta S.	Preventive effects of Chlorella on cognitive decline in age-dependent dementia model mice	Neurosci. Lett.	464(3)	193-198	2009
Nakajima S, Ohsawa I, Nagata K, Ohta S, Ohno M, Ijichi T, Mikami T.	Oral supplementation with melon superoxide dismutase extract promotes antioxidant defences in the brain and prevents stress-induced impairment of spatial memory.	Behav. Brain Res	200(1)	15-21	2009
Suzuki Y, Sano M, Hayashida K, Ohsawa I, Ohta S, Fukuda K.	Are the effects of alpha-glucosidase inhibitors on cardiovascular events related to elevated levels of hydrogen gas in the gastrointestinal tract?	FEBS Lett.	583(13)	2157-2159	2009
Nakashima-Kamimura N, Mori T, Ohsawa I, Asoh S, Ohta S.	Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice.	Cancer Chemother Pharmacol.	64(4)	753-761	2009
Fu Y, Ito M, Fujita Y, Ito M, Ichihara M, Masuda A, Suzuki Y, Maesawa S, Kajita Y, Hirayama M, Ohsawa I, Ohta S, Ohno K	Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease.	Neurosci. Lett.	452(2)	81-85	2009

水素ガスと水素水による新しい概念の抗酸化治療法と予防医学

Hydrogen gas and hydrogen water act as a therapeutic and preventive antioxidant with a novel concept

日本医科大学大学院医学研究科加齢科学系専攻細胞生物学分野 太田成男

KEY WORD ▶

活性酸素種, 酸化ストレス, 水素, 虚血再灌流, 予防医学

要約

酸化ストレスは、老化や癌を始めとする多くの一般的な疾患、とくに生活習慣病の一要因と考えられている。さらに、虚血再灌流や炎症によって誘導される急性の酸化ストレスは組織に重篤な損傷を引き起こす。筆者らは、水素分子 (H_2) が有効な抗酸化剤として治療および予防に使用可能であることを示唆した。特に H_2 は、細胞傷害性のきわめて高い活性酸素種 (ROS) であるヒドロキシルラジカルを選択的に還元して細胞を有効に保護し、一方、シグナルとして働くなど生理学的に重要な役割をもつ他のROSとは反応しないことを明らかにした。この結果は、 H_2 の副作用がきわめて小さいことを示唆する。また、局所的虚血と再灌流によって脳内で誘導される急性酸化ストレスラットモデルを使用し、実際に水素ガス吸引による抗酸化治療が可能であることを示した。さらには、肝臓の虚血再灌流モデル、心筋梗塞モデル動物、小腸移植モデル動物に水素ガスを吸入させ、酸化ストレスの作用を弱めることで組織の損傷が顕著に抑制されることを示した。したがって H_2 は、効果的な抗酸化療法として多様な目的に対して使用することが可能であることが示唆された。これは H_2 が速い拡散によって細胞膜を通過可能なために、細胞傷害性のROSと接触して反応することで効果的に酸化的損傷を防ぐためであると考えられる。さらに、 H_2 を水溶液に高濃度に溶解して経口投与による水素水の有効性が多方面で追求され、確立しつつある。ここでは、動脈硬化促進モデルにおける動脈硬化の予防、身体的拘束による認知機能低下の予防効果、抗癌剤の副作用の軽減効果に言及する。さらに、パーキンソンモデル動物に対しては水素水の飲用は治療効果をも示した。 H_2 が抗酸化治療と抗酸化予防として発展することが期待される。

はじめに

酸化ストレスは活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) の増加によってもたらされる過度の酸化状態による一種のストレスで、“老化の進行を促進する”や“生活習慣病の一因である”ことが広く認識されている。酸化ストレスを軽減させる抗酸化物質によって、老化の進行を抑制し、生活習慣病の予防ができるのではないかと考えられ、そのた

めに多くの抗酸化物質が探索されてきた。筆者らは、水素分子 (H_2) が細胞内で活性酸素種を選択的に還元することを見出し、酸化ストレスによって生じる虚血再灌流障害を軽減することを見出した¹⁾。さらに、モデル動物に水素を高濃度に溶解した水を自然摂取させることで、生活習慣病などの予防に水素が応用できる可能性を示唆した²⁾。ここでは、その原理と応用の可能性を述べる。

活性酸素種の生成と消去

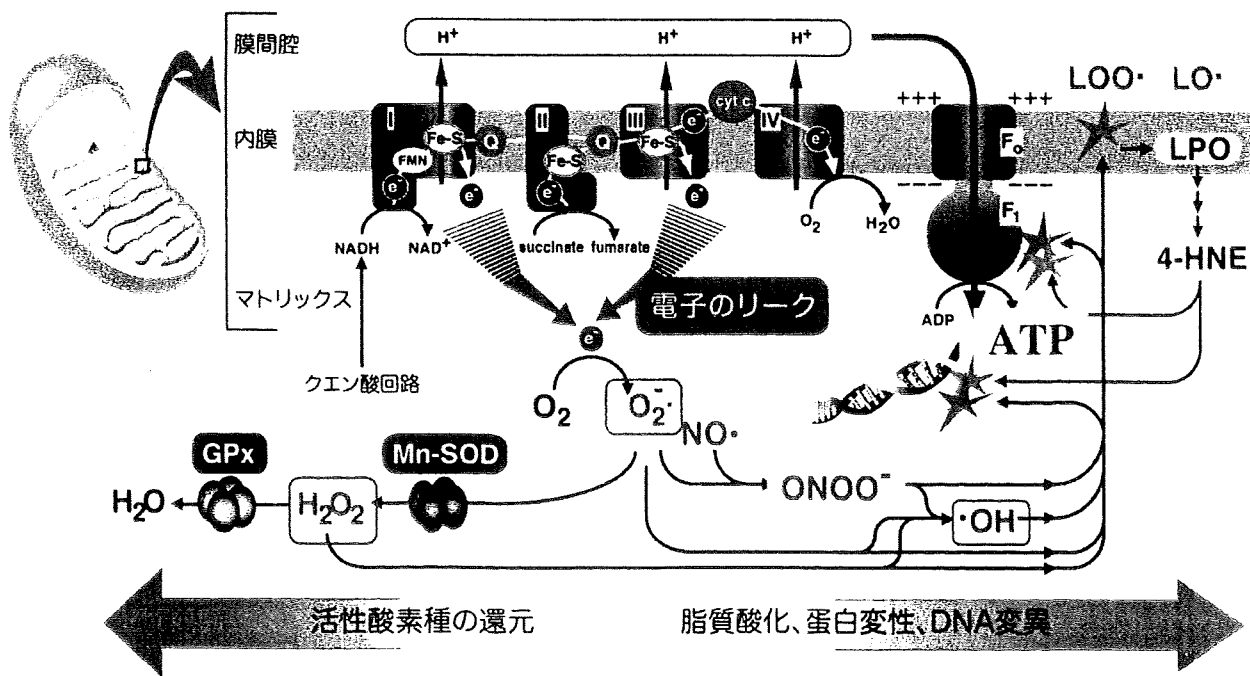
ミトコンドリアでは、電子伝達系（あるいは呼吸鎖ともいう）により内膜間に電気化学的ポテンシャルを生じさせ、この電気化学的エネルギーをATPの化学エネルギーに変換する。ミトコンドリア内膜は優れた絶縁体であり、この膜間電気エネルギーは1cmの厚さの絶縁体に21万ボルトの電圧をかけるに等しい。しかし、いくら優れた絶縁体であっても、この電圧下では、ある頻度で電子が漏れ出てしまう（図1）。この漏れ出た電子はミトコンドリア内の酸素と反応してスーパーオキシド陰イオンラジカル（superoxide anion free radical： O_2^- ）となる。あるいは、ミトコンドリア内の反応系であるクエン酸回路においても、 α -ケトグルタル酸脱水素酵素によって、ある頻度で O_2^- が生成する。したがって、 O_2^- はミトコンドリアにおいてエネルギー代謝の必然的な副産物であるといえる^{3, 4}。 O_2^- はミトコンドリア以外にも発生源があり、NADPHオキシダーゼやキサンチンオキシダーゼなどの代謝に必要な酸

化酵素によっても生じる^{5, 6}。

活性酸素種は酸化力が強く、他の生体物質を酸化してしまうので、生体内ではこの危険な活性酸素の消去系がよく発達している。 O_2^- は、Mn-SOD（Mn依存性スーパーオキシドジスムターゼ）によって、過酸化水素（ H_2O_2 ）に変換され、 H_2O_2 はグルタチオンペルオキシダーゼあるいはカタラーゼにより水へ変換され解毒される。このとき、 O_2^- は Fe^{3+} や Cu^{2+} などの遷移金属イオンを還元し（ $\text{O}_2^- + \text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{O}_2 + \text{Cu}^+$ ）、これらの還元型金属イオン（ Fe^{2+} や Cu^+ ）は H_2O_2 に作用し、ヒドロキシルラジカル（ $\text{OH}\cdot$ ）を生じさせる（Fenton反応、 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cu}^+ \rightarrow \text{OH}\cdot + \text{OH}^- + \text{Cu}^{2+}$ ）。あるいは遷移金属を触媒として O_2^- と H_2O_2 が反応して、 $\text{OH}\cdot$ が生成される（Haber-Weis反応、 $\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}\cdot + \text{OH}^- + \text{O}_2$ ）⁷。 $\text{OH}\cdot$ は最も強力な酸化力をもつフリーラジカルであり、無差別的に核酸や脂質、蛋白質と反応する。この $\text{OH}\cdot$ を解毒する機構は生体内には存在することが知られておらず、 $\text{OH}\cdot$ を除去することは生体内の酸化作用にとって最も重要である。

図1 ミトコンドリアにおける活性酸素種の生成と消去の概略

ミトコンドリアの内膜の電子伝達系から遊離した電子（ e^- ）は O_2 に吸収され、 O_2^- が生じる。 O_2^- は、MnSODによって H_2O_2 に変換され、GPxによって水になり解毒される。 NO と O_2^- が反応すると ONOO^- となる。 $\text{OH}\cdot$ は、 ONOO^- の分解によって、 H_2O_2 からFenton反応によって、あるいは、 H_2O_2 と O_2^- からHaber-Weis反応によって生じる。



活性酸素種の害と必要性

強い酸化力をもつ活性酸素種やフリーラジカルが過剰に生じることにより細胞内に酸化ストレスが生じる。持続的な酸化ストレスは、癌と多くの生活習慣病の一因と考えられている。酸化ストレスにより遺伝子も酸化されるので、老化の進行に酸化ストレスが関わっていると考えられる。そのため、活性酸素を消去する抗酸化物質が健康の増進や老化の抑制に効果的であることが推測されていた。

さらに、虚血再灌流や炎症によって誘導される急性の酸化ストレスは組織に重篤な損傷を引き起こす。酸化力を比べると、 $\cdot\text{OH}$ は $\text{O}_2^{\cdot-}$ の100倍の酸化力がある⁹⁾。実際、 $\cdot\text{OH}$ はDNAを酸化するが、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ や H_2O_2 はDNAを直接酸化するほどの酸化力はない。したがって、酸化力によって生体に障害を与えて問題となるのは $\cdot\text{OH}$ である。

$\text{O}_2^{\cdot-}$ や H_2O_2 は、高濃度では細胞毒性効果がある一方、低濃度においては重要な生理的役割を担っている⁹⁾。すなわち、多くのシグナル伝達カスケードで制御シグナル分子として機能して、アポトーシスや細胞増殖、分化といった生物によって重要なプロセスを制御している^{10, 11)}。また別の活性酸素種である一酸化窒素(NO)は神経伝達物質として機能し、血管の拡張にも必須である¹²⁾。

したがって、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 や NO などの活性酸素種をすべて除去してしまうと、何らかの生体内機能が損ねられ、いわば副作用が生じることが予測される。高濃度の H_2O_2 はミエロペルオキシダーゼにより次亜塩素酸に変換され細菌の侵襲から防御する¹³⁾。実際、ミエロペルオキシダーゼ欠損動物では、細菌の侵襲から防御することができない。 H_2O_2 から前述のような無酵素的反応によって生じる $\cdot\text{OH}$ の寿命は短いために、距離が離れている侵入してきた細菌を排撃するよりも、むしろ、近くの自らの細胞に障害を与えてしまう。すなわち、 $\cdot\text{OH}$ の消去は、細菌の侵襲を阻害するよりも、 $\cdot\text{OH}$ によって生じる炎症の障害を抑えることが期待される。

安全で効果的な抗酸化物質の条件

従来、健康に効果的な抗酸化物質として還元力が

強い物質が探求されてきた。しかし、細胞内の実際の役割を分子レベルで研究されることは少なかった。還元力が強い物質を外から導入すると生体内での反応系を攪乱する可能性があり、前にも述べたような生体内に必要なシグナルを正常に機能させなくなる可能性もある。また、ビタミンCなどの還元力の強い物質は還元反応後に酸化力の強い物質を作り出し、DNAに損傷を与える^{14, 15)}。実際、大規模疫学調査で抗酸化サプリメントを摂取している人はむしろ短命であった¹⁶⁾。したがって、 $\cdot\text{OH}$ などの細胞に有害なフリーラジカルを無毒化しようとするときは、生理的に有益な活性酸素種の生物活性を損なわないようにしなければならないはずである。

安全で効果的な抗酸化物質の条件を考えると、繰り返しになるが、安全性に関しては、還元力が強すぎて生体内反応を攪乱することはなく、さらに必要な活性酸素種を除去せずに有害な活性酸素種のみを選択的に消去することである。効果的な抗酸化物質としての性質は、細胞内に入り込み、遺伝子の保管庫である核や活性酸素種の発生源であるミトコンドリアへ速やかに到達できることである。実際、ミトコンドリアへ到達できる抗酸化物質の開発が進められている¹⁷⁾。多くの物質は疎水性か親水性である。疎水性物質は脂質で構成される膜にとどまり、親水性物質は膜を通過できない。抗酸化物質が生体内で効果的かどうかを決めるのは、還元力の強さではなく、必要な場所へ到達できるかどうかである。

水素分子の性質

水素は酸素と反応して水になることはよく知られている。水素に火をつけると燃えるし、適当な水素ガスと酸素ガスの混合ガスは爆発もする。この場合は570℃以上の高温に限られる。また、水素の還元力を用いて発電することも可能であり、燃料電池の原料として用いられる。すなわち、水素を電子供給体とし、空気中の酸素を電子受容体として反応させれば、電流として電子を取り出すことができる。しかし、この場合は触媒が必要である。水素には、ある程度の還元力があるにしても、体温で触媒なしでは、水素は酸素と反応しないことを強調しておく。

また、水素分子は電子受容体がない限り水中で解

離することはなく、水素イオン（プロトン： H^+ ）になることはない。ミトコンドリアの内膜間には水素イオン濃度勾配が生じて、電気エネルギーポテンシャルが生じるが、本稿で述べる水素分子とは異なることも注意したい。

H_2 は水に不溶と信じている人が少なくないが、モル濃度では酸素と比べて遜色ない程度水に溶解する。水素が水に溶ける分子は1気圧で0.8mM程度である。大気中で1%の水素ガスを吸引すると実際血液中の水素濃度は8 μ Mになる。

H_2 は、分子内電子の分布の偏りがなく（極性がない）、分子量が小さいので脂溶性であり水溶性である。また、拡散速度は他の物質に比べてはるかに速い。すなわち、 H_2 は細胞膜を通過して細胞内の核やミトコンドリアに到達できるはずであり、筆者らは実際に H_2 がミトコンドリア機能を低下させないこと、核遺伝子を保護することを証明している（図2）。

筆者らは、 H_2 の還元力（抗酸化力）をまず無細胞系で調べた¹⁾。 \dot{O}_2^- 、 H_2O_2 、 NO 、 $\dot{O}H$ 、 $ONOO^-$ （ペルオキシナイトライト）をそれぞれ特異的な反応系によって生じさせ、蛍光色素などによって検出した。そのとき、反応液に H_2 を溶解させ、直接 H_2 がそれぞれの活性酸素種（あるいは活性窒素種）を還元するかどうかを調べた。すると、 H_2 は \dot{O}_2^- 、 H_2O_2 、 NO を還元せず、 $\dot{O}H$ 、 $ONOO^-$ を還元した。 $\dot{O}H$ 、 $ONOO^-$ は \dot{O}_2^- 、 H_2O_2 、 NO に比べると酸化力が強く、水素は $\dot{O}H$ のような酸化力の強い活性酸素

種を選択的に還元することがわかった。上述のように \dot{O}_2^- 、 H_2O_2 、 NO は生体内でシグナルとしての機能があるので、 H_2 は必要な活性酸素種は除去しないということになる。

ここで、水素分子が何故選択的に $\dot{O}H$ のような酸化力の強い活性酸素のみを選択に還元できるかを考えてみる。酸化還元反応は電子のやりとりの反応である。電子を与えるのが還元剤（抗酸化剤）、電子を受け取るのが酸化剤である。電子を「奪う力」が大きければ、電子を「押し付ける力」が弱くても、電子を奪うことになる。つまり、 $\dot{O}H$ のような電子を奪う力が強ければ、 H_2 のように電子を与える適度な力があれば、酸化還元反応は進行する。

すなわち、酸化力が強大な酸化剤を還元するには還元力がそれほど大きくなくてもよい。 $\dot{O}H$ を還元するには還元力の強い物質を追い求める必要はなかったのである。

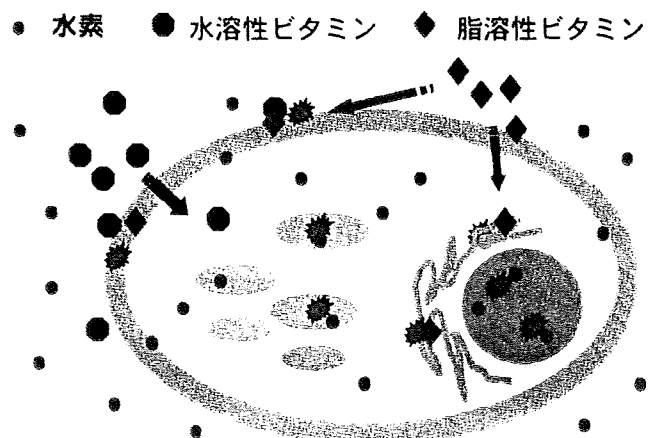
培養細胞における水素による $\dot{O}H$ の消去

無細胞系の実験結果が細胞中でも同じ結果を示すとは限らない。従来、抗酸化物質の研究は、無細胞実験系で抗酸化力を調べて、その後、動物に食べさせるか飲ませるかによってその効果を判定する研究が多かった。

実際の作用を分子レベルで確認するには、培養細胞における抗酸化物質の作用を明らかにすることが必須である。最近、活性酸素種の種類ごとに特異

図2 水素の拡散による抗酸化剤としての有効性を示す図

水溶性ビタミンは疎水性の膜を通過できず、脂溶性ビタミンは膜にとどまる。水素は水にも油にも溶けるので、細胞内のどこへでも速やかに到達できる。活性酸素種の発生源であるミトコンドリアや遺伝子を保管する核内にも水素は入り込むので、抗酸化作用が有効である。



的に反応する蛍光試薬が開発されてきた。そこで、活性酸素を種類ごとに可視化することが可能になってきた。そこで、蛍光試薬を指標に、 H_2 が培養細胞における $\cdot OH$ を選択的に消去できるか調べた。自然自発的な $\cdot OH$ の発生では細胞毒性を示す量には至らないので呼吸鎖阻害剤を用いてミトコンドリアから強制的に $\cdot OH$ を発生させた。最初に、 H_2 および O_2 でそれぞれ飽和した培地を用意し、水素電極および酸素電極でモニターしながらそれぞれの濃度が適量となるように混合し、培養液として用いた。さらに容器を H_2 および O_2 が適量濃度になるように調製した気体で満たし、溶存気体濃度が変化しないようにした。PC12細胞ではミトコンドリア呼吸鎖阻害剤であるア

ンチマイシンAを添加することでミトコンドリア内で O_2^- を発生させ、細胞内反応により $\cdot OH$ を増加させた。 $\cdot OH$ は蛍光色素HPF (hydroxyphenyl fluorescein) によって検出した⁸⁾。 H_2 で処理すると他の活性酸素種は減少せずに細胞内 $\cdot OH$ だけが減少し(図3)、PC12細胞の細胞死は容量依存的に抑制された(図4)。 H_2 はミトコンドリアを保護したこと、核の $\cdot OH$ を減少させ、核DNAを酸化から保護したこと、 H_2 はミトコンドリア膜と核膜を透過し、ミトコンドリアと核へ到達したことが示された。また、水素分子が過酸化脂質の最終産物である4-ヒドロキシ-2-ノネナール(HNE)の蓄積を抑制したことは、脂質の過酸化も抑制していることを示す。

図3 水素分子による細胞内ヒドロキシルラジカルの消去の証明

培養細胞PC12に電子伝達系の阻害剤である antimycinA によって O_2^- を強制的に発生させ、 O_2^- から H_2O_2 と $\cdot OH$ を生じさせた。HPF は $\cdot OH$ と反応して蛍光を発する試薬であり、水素が 0.6mM 培養液に存在する場合、HPF の蛍光強度が低くなることから水素は $\cdot OH$ を消去することが示された。(文献1より改変)

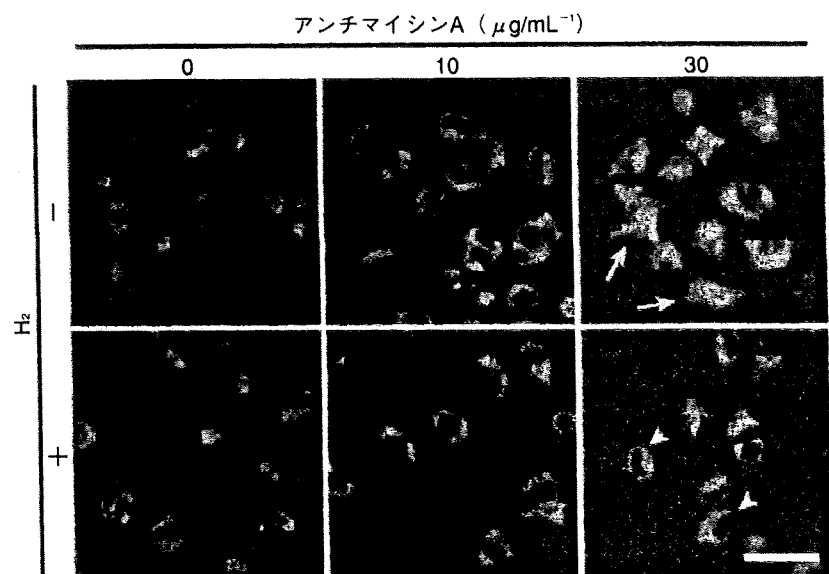
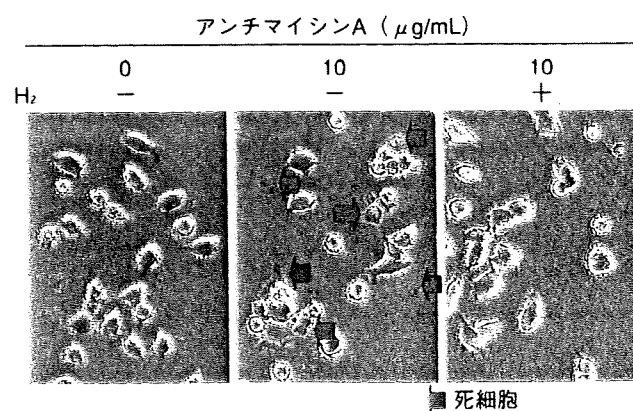


図4 水素分子による細胞内酸化ストレスによる細胞死の抑制

培養細胞PC12に電子伝達系の阻害剤である antimycinA によって O_2^- を強制的に発生させ、 O_2^- から H_2O_2 と $\cdot OH$ を生じさせた。1日後の顕微鏡写真。矢印が死細胞で、水素を含む培養液では細胞死を抑制している。(文献1より改変)



さらに、 H_2 がOHを消去していることを示すために、Fenton反応によって直接OHを発生させ、 H_2 の効果調べた。 Cu^{2+} で前処理してビタミンCを加えるとビタミンCの還元力によって Cu^{2+} が還元され、 Cu^+ となる。ミトコンドリアで自然発生的に生成した H_2O_2 と Cu^+ によってOHが細胞内で生成する。 H_2 による細胞内OHの減少はスピントラップ法によって証明した。さらに H_2 はOHによる細胞の致死率も低下させた。

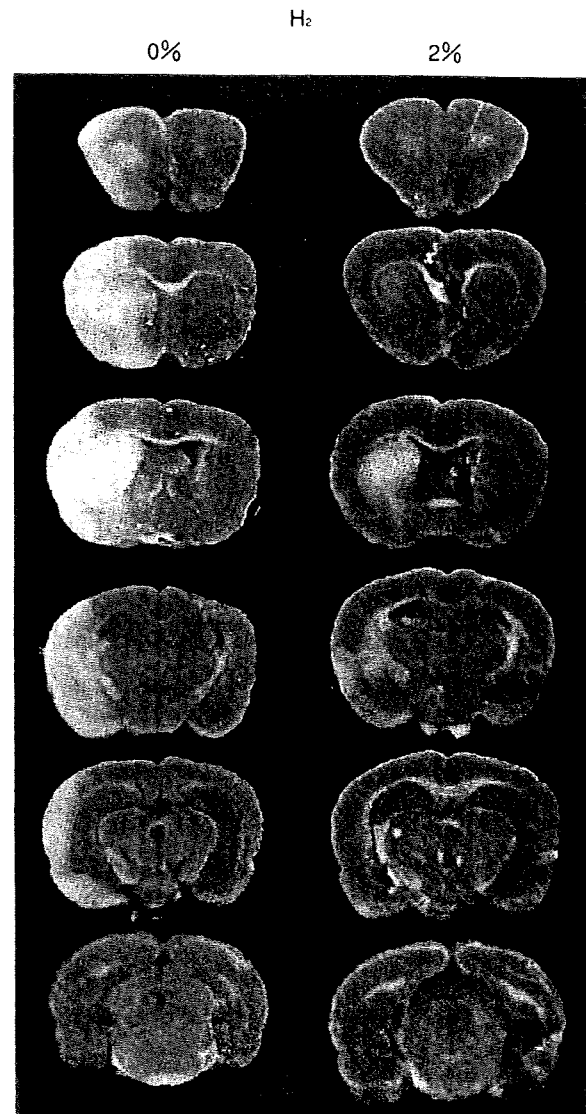
脳梗塞モデル動物に対する水素ガスの吸引効果

抗酸化物質としての水素分子を医療へ応用できるか調べるためにラットの虚血再灌流モデルを用いた。大脳虚血においては多様なメカニズムで活性酸素種が発生し、虚血再灌流後に $\cdot OH$ が発生する。われわれはラットを軽度大脳動脈閉塞によって90分間局所的に虚血し、次いで30分間再灌流した。その際、水素ガスを全120分間吸引させた。1日後に脳をスライスし、ミトコンドリアにおける呼吸過程で基質である2, 3, 5-トリフェニルテトラゾリウム塩 (TTC) で染色し、梗塞体積が水素濃度依存的に減少することを確かめた (図5)。軽度大脳動脈閉塞1週間後、水素処置群と未処置群での梗塞体積の違いはより顕著になった。

水素処置ラットは体重および体温でも未処置に比して改善がみられた。このように水素分子は初期の脳障害を改善したのみならず障害の進行も抑制した。閉塞1週間後の脳を用いて、水素分子による保護効果により生じた分子レベルでの変化を核酸の酸化を表す抗8-OH-G抗体と脂質の過酸化を示す抗HNE抗体で脳スライスを染色して調べた。水素処置ラットではどちらの酸化マーカーの染色についても有意に減少していた。脳の同一領域をミクログリア特異的抗Iba-1抗体で染色したところ、抗Iba-1抗体による染色は水素処置によって顕著に減少していた。ミクログリアの集積は脳障害の指標であり、こうした結果は水素分子が酸化ストレスと、さらには脳障害を顕著に抑制することを強く示唆している¹⁾。また、最近、上海のグループからも脳梗塞に対する水素ガスの吸引効果が示され、さらにアポトーシス

図5 ラット中大動脈脳梗塞モデルへの水素ガス(2%)の吸引効果

ラットの脳中大動脈を閉塞し、再灌流させた。1日後、脳の連続切片を作製し、TTC染色した。梗塞時と再灌流時に2%の水素ガスを吸引させると梗塞巣(白い部分)が著しく減少した(左図)。(文献1より改変)



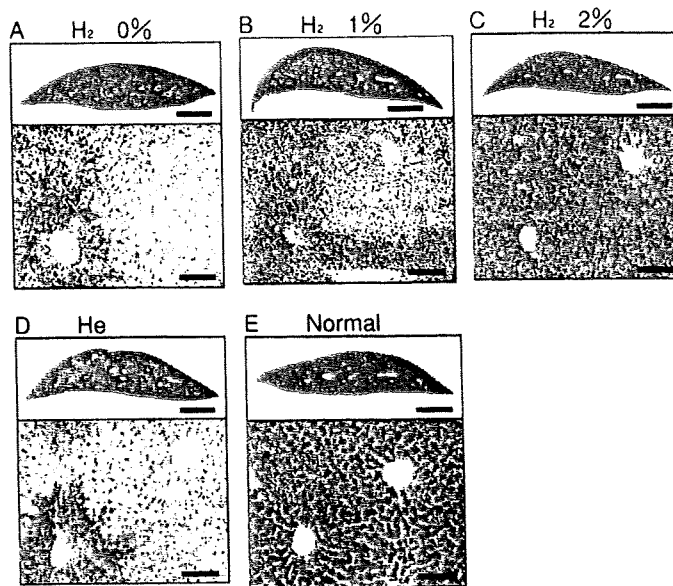
の抑制効果も示された¹⁸⁾。

さらに、虚血再灌流障害の抑制効果の一般的な可能性を探るために、肝臓の虚血再灌流障害に対する水素ガスの効果を調べた。ここでは、ヘリウムガスは効果がないことを明確にした¹⁹⁾ (図6)。つまり、 H_2 が小さいために生じる効果ではなく、 H_2 の還元力が虚血再灌流に対して防御効果を発揮するのである。

さらに、心筋梗塞モデルラットに対しても、水素ガスを吸引させることで著明な効果を示した²⁰⁾。ま

図6 肝臓虚血再灌流に対する水素吸引効果

マウスの肝臓の血流を90分間停止し、再灌流を180分行った。その間、水素ガス0% (A)、水素ガス1% (B)、水素ガス2% (C)、ヘリウムガス4% (D) を吸わせた。Eは虚血を行わなかった肝臓のH&E染色。下が拡大図で、白く抜けている領域は死細胞領域である。
(文献19より改変)



た、小腸移植時に水素ガスを吸入することによって酸化ストレス障害が著しく軽減した²¹⁾。以上のことより、水素ガスの吸引効果は、脳、心臓、肝臓、小腸で、4つのグループにより確認されたことになり、水素ガスの吸引効果は、少なくとも動物実験では一般的な効果として、確立したものといえる。効果を発揮する水素ガス濃度はいずれも1~2%であった。1~2%の水素ガスは決して燃えることはなく、爆発することもない。水素ガスは空気よりも軽いですが、2%の水素ガスが2%以上に濃縮されることはない。例えば、濃度の異なる砂糖水を重層することはできるが、一度攪拌してしまうと、自然には砂糖の濃度勾配ができないのと同じである。さらに、水素ポンペを病室に搬入することは法的には何ら問題はない。

水素生食の静脈注射の効果

上海グループでは、生理的食塩水にH₂を溶解し、静脈注射によってH₂を注入した^{22), 23)}。この効果は水素ガスの吸引効果を上回るもので、緊急時にはH₂を溶解した溶液の点滴が治療に使われるようになるかもしれない。水素ガスの吸引に比べると点滴では、体内に取り込まれる水素分子の量は少なく、何故少ない量のH₂でこのような効果が発揮できるのかは今後注目すべき点である。

水素水の有効性と医学的利用の将来性

水素ガスを部屋に満たして生活することも将来は可能になるかもしれない。しかし、現段階では日常的に水素ガスを吸引することは難しい。H₂を体内に取り入れて、抗酸化作用を発揮するには、H₂を溶かした水(水素水)を飲むことは簡便であり、日常生活を変えずに疾患を予防するという面からみれば現実的であるかもしれない。そこで、生活習慣病の予防のために、水素水を飲むことが有効かどうかをモデル動物を用いて調べた。

砂糖を溶かした水を砂糖水といい、食塩を溶かした水を食塩水という。そこで、水素分子を溶かした水を水素水ということにする。前述のようにH₂は大気圧下で0.8mM程度溶ける。水素水をラットの胃に強制的に送り込むと血液中にH₂を検出することができた。また、水素水を飲むと呼気に水素ガスが出現する。

まず、最初に水素水をマウスに自由摂取で飲ませ、体内の酸化ストレスマーカーを調べると4週間で酸化ストレスマーカーの4-HNEが減少することが明らかとなった(図7)。

動脈硬化は、LDLが酸化されそれをマクロファージが取り込むことにより生じる。ApoE欠損マウス(apoE^{-/-})では6カ月ほどで動脈硬化がみられるようになる。その間、水素水を飲ませ続けると、心

臓に近い大動脈では水素水の摂取により動脈硬化巣が著しく小さくなった²⁴⁾ (図8)。

肉体的あるいは心理的ストレスにより酸化ストレスが亢進することが明らかにされている。そして、長期にわたってマウスを拘束すると記憶力が損なわれる。身体的拘束ストレスを与えながらマウスに水素水を飲ませると脳の酸化ストレスが軽減された。そして、記憶力低下が抑制された²⁵⁾ (図9)。また、抗癌剤(シスプラチン)は腎臓に酸化ストレスを亢進させる²⁶⁾。その副作用(腎障害)を水素ガスの吸引、

水素水の飲用によって抑制できた²⁶⁾ (図10)。

パーキンソン病モデル動物に対する水素水の飲用効果は顕著であり、病態を生じさせた後に水素水を飲ませても病態の改善が認められた。すなわち、予防効果のみならず、治療効果も認められた²⁷⁾。

ビタミンC合成欠損マウスに水素水を飲ませると脳からの活性酸素の発生が抑制された²⁸⁾。したがって、水素水は抗酸化作用があると同時に活性酸素の発生も抑制する良循環(悪循環の逆)によって、抗酸化作用を高める可能性も示唆される。

現在、多くの研究室からH₂の効果についての情報が寄せられており、今後も多くの学術論文が発表されることになるだろう。

水素水の飲用による臨床試験の結果は一報だけ報告されている²⁹⁾。毎日900mLを糖尿病患者に飲ませ、酸化ストレスマーカーが減少することが示された。また、軽度糖尿病の改善がみられた。この結果は、単に動物実験の結果にとどまらず、人にも水素水の飲用が効果的であることを示している。詳細な動物実験と臨床試験のさらなる結果が期待される。水素水の利点は、日常生活を変えずにH₂を摂取できることであり、動物実験でも過剰な水素水を強制的に飲ませているわけではなく、自然摂取の効果をみている。

図7 水素水の自然摂取による酸化ストレスの低下

酸化ストレス亢進マウス(DALマウス)に飽和水素水を自然摂取させた。対照としては脱気水を飲ませた。4週間後、酸化ストレスマーカーの4-HNEを定量した。筋肉、血液双方とも水素水の摂取により、4-HNEが低下した。

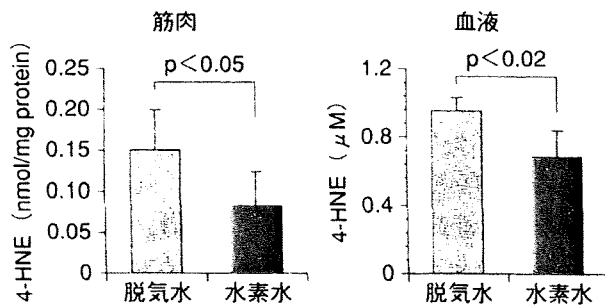
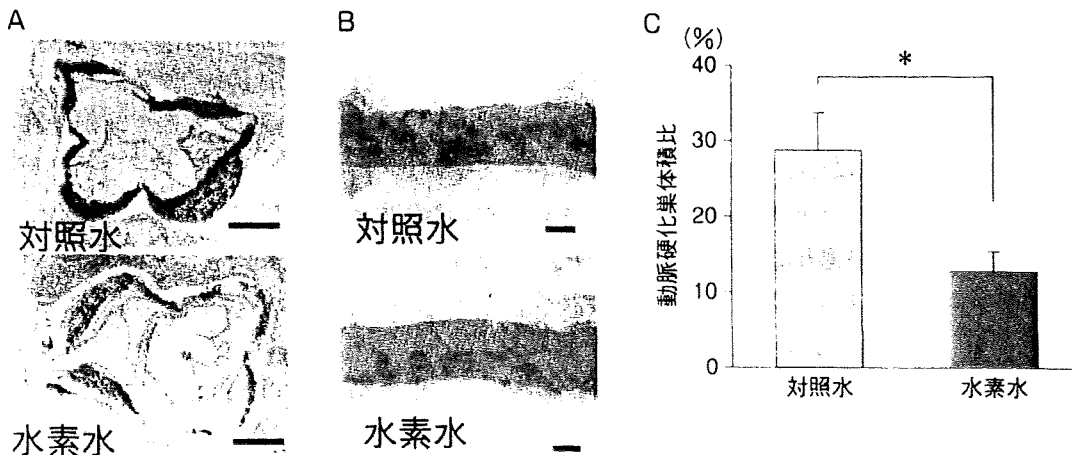


図8 動脈硬化の抑制効果

動脈硬化促進マウス(apoE欠損マウス; 2カ月齢)に4カ月間、水素水あるいは対照水を飲ませ動脈切片を脂質染色した。
 A: 心臓との結合部の動脈の垂直切片の染色。染色(茶色の部分が動脈硬化巣)。
 B: 動脈の水平切片の染色。
 C: 連続切片による血管内の動脈硬化巣の体積比。
 水素水を飲んでいると動脈硬化が抑制されていることがわかる。



(Ohsawa, et al.: Biochem Biophys Res Commun 2008. より改変)