

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

原 文彦より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号乙第 2737 号

学位申請者 : はら 原 ふみ 文 ひこ 彦

学位審査論文: Molecular hydrogen alleviates cellular senescence in endothelial cells

(水素分子は血管内皮細胞の老化を抑制する)

著 者 : Fumihiko Hara, Junko Tatebe, Ippei Watanabe, Junichi Yamazaki, Takanori Ikeda, Toshisuke Morita

公 表 誌 : Circulation Journal 80 (9) : 2037-2046, 2016

論文内容の要旨 :

【背景】これまで、molecular hydrogen (H_2)は、生体に何ら作用を及ぼすことのない物質と考えられてきた。しかし、最近の研究から一酸化窒素、一酸化炭素、硫化水素に続く生理活性をもつ第4のメディカルガスと考えられるようになり、動脈硬化の進展抑制作用や2型糖尿病患者の糖代謝改善作用などが報告されている。しかしながら、 H_2 についてはその研究の歴史も浅く、 H_2 分子の作用機序は不明なものも多い。実際に、生体における水素水飲水後の呼気ガス中水素濃度のピークは飲水後 10 分程度で、1時間後にはほぼ元に戻ることが報告されており、生体において H_2 の効果が長期間残存するメカニズムは不明である。

一方、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)は環境中に広く存在する残留性有機汚染物質ダイオキシン類のひとつであり、これらによる aryl hydrocarbon receptor (AhR)の活性化が reactive oxygen species (ROS)の産生を介して動脈硬化を進展させることが報告されている。また、我々はこれまでの研究で、血管内皮細胞において尿毒症物質インドキシル硫酸(IS)によって増加した ROS が細胞内 NAD⁺を減少させ長寿関連遺伝子 Sirtuin1 (Sirt1)活性の障害を惹起して細胞老化を促進することを明らかにしている。これらの背景に基づき、溶存した H_2 が血管内皮細胞における TCDD-AhR 経路を介した細胞老化に与える影響について臍帯静脈血管内皮細胞(HUVECs)を用いて検討した。

【方法と結果】 H_2 含有培養液は、高純度水素発生装置により作り出された H_2 を培養液に充填することにより作製した。培養液中の H_2 濃度は培養時間の経過とともに低下し、約 16 時間後には normal medium レベルの H_2 が認められるのみとなることが確認された。HUVECs は、 H_2 含有培養液で 1 時間培養したのち TCDD (1nmol/l)で刺激した。AhR 活性化の指標として AhR の核内移行を

western blot 法で、CYP1A1 と CYP1B1 の mRNA 発現を real-time RT-PCR 法で評価した。解毒化酵素や抗酸化酵素の発現を制御する転写因子である Nrf2-ARE 経路の活性化は Nrf2 のリン酸化で、抗酸化酵素 NQO-1 と HO-1 の誘導は Western blot 法で確認し、酸化ストレスは、細胞内の 8OHdG を ELISA 法で評価した。Sirt1 の脱アセチル化酵素活性は、ヒストン脱アセチル化活性を比色法で評価し、細胞老化は SA- β gal 染色で評価した。

酸化ストレスに対する効果を評価したところ、TCDD 刺激は HUVECs において、control と比較して 1 時間後から 48 時間後まで 8OHdG を有意に増加させた。その上で H₂ 含有培養液では、TCDD による細胞内の 8OHdG の増加を、培養液中から H₂ が消失した後も 24 時間後までは有意に抑制した。TCDD-AhR 経路を介した ROS 産生に対する効果を評価したところ、培養液中に H₂ が確認できている TCDD 刺激 1 時間後でも AhR の核内移行およびその活性化には影響を与えなかった。H₂ による AhR の活性化への直接的な作用は確認できなかったが、抗酸化物質として働くことで TCDD-AhR 経路を介した ROS の産生を抑制することが示唆された。H₂ の抗酸化作用に Nrf2/HO-1 系の活性化が関わっているか否かを検討した結果、phospho-Nrf2 ならびに抗酸化酵素 HO-1 と Nqo-1 の発現増強は、H₂ が培養液中に高濃度に存在している時点はもとより、培養液中から消失した 24 時間後においても継続していた。酸化ストレス軽減による細胞老化抑制に関わる可能性を、HUVECs における acetyl-p53 の発現から評価したところ、TCDD 刺激 24 時間後では H₂ は acetyl-p53 の発現増加を有意に抑制したが、TCDD 刺激 48 時間後では抑制しなかった。また、NAD⁺/NADH 比および Sirt1 活性に対する効果については培養液中に H₂ が残存する TCDD 刺激 24 時間後までは NAD⁺/NADH 比と Sirt1 活性を control と同等に維持するとともに、TCDD によって増加した SA β -gal-positive 細胞を control レベルにまで抑制した。さらに、SA β -gal 染色を用いて、HUVECs を TCDD 刺激、24 時間後の老化細胞数を評価したところ、TCDD 刺激 24 時間後の SA β -gal-positive 細胞は、control と比較して有意に増加していた。一方 H₂ は TCDD によって増加した SA β -gal-positive 細胞を control レベルにまで抑制した。

【考察】 H₂ は酸化ストレスが関係するさまざまな病態に有効であると考えられているが、今回の研究で、血管内皮細胞老化の抑制にも有効であり、その効果は H₂ の消失後もしばらくは継続することが示された。これらのことは、生体が H₂ に曝露される時間が短時間であってもその効果が一定期間は継続することを示しており、定期的な H₂ 水の飲水が H₂ の効果を長時間継続させる可能性が示唆された。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号乙第 2737 号	氏名	原文彦
学位審査担当者	主査	諸井雅男
	副査	中村正人
	副査	渡邊善則
	副査	杉山篤
	副査	中野裕康

学位審査論文の審査結果の要旨：

水素分子には、動脈硬化の進展抑制作用や 2 型糖尿病患者の糖代謝改善作用があることが報告されているが、その作用機序は明かではない。一方、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) は環境中に広く存在する残留性有機汚染物質ダイオキシン類のひとつであり、これによる aryl hydrocarbon receptor (AhR) の活性化が reactive oxygen species (ROS) の産生を介して動脈硬化を進展させることが知られている。本研究では、水素分子が血管内皮細胞における TCDD-AhR 経路を介した細胞老化に与える影響について培養臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) を用いて検討した。培養液中の水素分子濃度は充填後から時間経過とともに低下し、約 16 時間後にはゼロとなった。TCDD 刺激後には酸化ストレスの指標である 8OHdG は 48 時間後まで増加し、24 時間後までの増加は水素分子 1 回の暴露により抑制された。また、この水素分子による抗酸化作用は AhR 阻害薬にて抑制されなかった。次に TCDD-AhR 経路の下流に位置する Nrf2 の活性化に与える影響について検討した。TCDD による Nrf2 の活性化は水素分子暴露により抑制され、Nrf2 の下流である抗酸化物質 (NQO-1 および HO-1) の産生も水素分子暴露により増大した。さらに水素分子は P53 のアセチル化 (酸化ストレスを介した老化と関係する) を 24 時間にわたって抑制した。また、水素分子は TCDD による NAD⁺ の低下と Sirt 1 活性低下を抑制し、さらに TCDD による SA β-gal 染色陽性細胞 (細胞老化のマーカー) の増加を抑制した。これらの水素分子による抗酸化物質の増強作用や細胞老化抑制作用は、Nrf2 阻害薬である chrysin により抑制された。以上より、水素分子は、1 回の培養液中の充填のみで 24 時間にわたって Nrf2 の活性化を介して酸化と細胞老化を抑制することが示された。

平成 30 年 3 月 26 日において開催された学位審査会において、申請者による論文の論旨の説明後に、審査委員からいくつかの質問がなされた。Nrf2 が活性化される既知の分子機序はどのようなものであるのか、現在知られている Nrf2 を活性化させる物質にはどのようなものがあるのか、一般的には抗酸化物質によって Nrf2 の活性は抑制されるはずであるが水素分子が抗酸化物質であるならば今回なぜ Nrf2 の活性が上昇したのか、水素分子は、生体内ではどの部分に作用すると考えられるのか、などの質問に対して申請者は適切に誠意をもって回答した。水素水を経口摂取することによって血管内皮細胞において持続した抗酸化作用・抗老化作用が期待できることおよびその機序として Nrf2 活性化を介していることを明らかにしたことは、血管生物学、動脈硬化学において新しい重要な知見であり、学位に値すると評価された。