

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09416

研究課題名(和文)ARDS亜急性期～慢性期の水素吸入による肺線維化抑制効果：モデルマウスによる検証

研究課題名(英文)Lung fibrosis suppression effect by hydrogen inhalation at ARDS subacute-chronic phase: Verification by model mouse

研究代表者

青景 聡之(Toshiyuki, Aokage)

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：30822358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：急性呼吸窮迫症候群(ARDS)では持続的な炎症により慢性期に肺胞線維化が生じる。抗炎症作用のある水素の吸入により、肺線維化を抑制できると考え、本研究を計画した。ARDSを模したブレオマイシン(BLM)肺傷害モデルに対して水素ガス吸入を1日6時間、21日間行い、呼吸生理、組織、炎症マーカー、およびマクロファージ(Mp)の表現型を調べた。水素投与群(BH群)では、対照(BA群)よりも高い静的コンプライアンスを示した。BLM投与7日後のIL-6、IL-4、IL-13 mRNA解析では、BH群はBA群より有意に低下した。組織解析ではBH群の肺胞間質におけるM2様Mp数は、BA群に比べ有意に低かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の高齢化社会の進行に伴って、肺炎患者は増加の一途であり、その中にはARDSに進展するものも少なくない。一方で、重症化した場合に要する集中治療管理や人工呼吸管理の物的・人的リソースは限られており、またそれらの医療費は莫大である。ARDSの重症化を抑制する新規治療法の開発機運は高まってきている。本研究の社会的意義としては、ARDSの患者に水素ガスを吸入させることで慢性期の線維化を抑制し、生命予後やADLの改善が期待されることにある。また、学術的意義の側面では、水素ガスの抗炎症効果の機序として、肺胞マクロファージ内のIL-6分泌抑制とその後のM2様マクロファージの分極抑制の重要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Acute respiratory distress syndrome causes alveolar fibrosis. We hypothesized that daily repeated inhalation of hydrogen gas could suppress persistent inflammatory and consequently inhibit lung fibrosis. To test this hypothesis, bleomycin lung injury model mouse, that is imitating ARDS, were exposed to hydrogen (3.2% in air) for 6 hours every day for 21 days. Respiratory physiology, tissue pathology, markers of inflammation, and macrophage phenotypes were examined. Mice with bleomycin-induced lung injury that received daily hydrogen therapy for 21 days (BH group) exhibited higher static compliance than mice with bleomycin-induced lung injury exposed only to air. When the mRNA levels of pro-inflammatory cytokines were examined 7 days after bleomycin administration, interleukin (IL)-6, IL-4 and IL-13 were significantly lower in the BH group than in the BA group. There were significantly fewer M2-biased macrophages in the alveolar interstitium of the BH group than in the BA group.

研究分野：救急医学

キーワード：水素ガス ブレオマイシンモデル 急性肺障害 急性呼吸促迫症候群

## 1. 研究開始当初の背景

急性呼吸窮迫症候群(ARDS)は、炎症が肺に波及し、肺毛細血管の血管内皮細胞と肺胞上皮細胞の血漿透過性が亢進することで生じる急性肺水腫である。しかし、炎症が持続する場合には、線維芽細胞の活性化と細胞外マトリックス蛋白の分泌(増殖期)を通して、最終的に不可逆的な線維化に至る(線維化期)。ARDSに対して有効な薬物治療は未だ存在せず、人工呼吸管理など生命維持に努めているが、甲斐なく肺線維化に至った場合には救命の望みは尽きる。つまり、ARDSから肺線維化への進行を抑制する治療開発は公衆衛生上の重要課題といえる。

2007年に大澤らが、水素ガスがヒドロキシラジカルやペルオキシナイトレイトなど毒性の強い活性酸素種を除去することで脳梗塞に対する臓器保護効果を示すことを報告した(Ohsawa I. Nat Med 2007)。この論文をきっかけとして、現在ではさまざまな疾患モデルに対して臓器保護作用を示すことが明らかになってきた。我々の研究室では、肺傷害に対する水素ガスの効果について継続して研究をすすめてきており、科研費・基盤研究Cで申請した「ラット出血性ショック蘇生後肺障害モデルにおける水素吸入療法の効果(研究代表者:中尾篤典 研究課題番号25462840)」をはじめ、様々な肺傷害モデルを用いて、水素の抗炎症作用や酸化ストレス軽減作用を示してきた。水素ガスは副作用が少なく安全性が高い。長期的な水素ガス吸入によって肺の持続炎症を軽減させることができれば、ARDS慢性期の肺線維化を抑制できると考えられ、本研究で検証・機序解明を目指す。

## 2. 研究の目的

- ①急性期の肺傷害から慢性期の線維化に至るモデル動物(以下ARDSモデル)を構築する。
- ②ARDSモデルを用いて、急性期から亜急性期(薬物投与～20日目)にかけて、長期的な水素ガス吸入を行い、慢性期の肺の線維化を評価する。
- ③ARDSモデルを用いて、急性期(薬物投与～6日目)にかけて水素ガス吸入を行い、7日目の肺内の炎症性サイトカインや細胞外マトリックスの構成タンパク質の分泌、マクロファージのフェノタイプを評価する。

## 3. 研究の方法

### <ブレオマイシンモデルの作成>

雄性 C57BL/6 マウスを用い、実験を行った。マウスに三種混合麻酔(ミダゾラム 4mg/kg、メドトミジン 0.75mg/kg、ブトルフェール 5mg/kg)を投与し、深鎮静にしたのち、気管前面を5mm縦切開し、32G針にてブレオマイシン(BLM)1.0mg/kg(生理食塩水希釈液)の気管内投与を行った。呼吸状態安定後にCyanoacrylates glueを用いて閉創した。ブレオマイシンモデルの対照(Sham)は同量の生理食塩水とした。

### <水素ガス吸入>

水素ガスの投与は、40cm×20cm×20cmの閉鎖チャンバーを用いて行った。水素ガス群は、4%水素・96%窒素ボンベを用いて、100%酸素ボンベと4:1の割合で混合、最終濃度として3.2%水素・76.8%窒素・20%酸素のガスを用いた。対照ガス群は100%窒素を用いて、100%酸素ボンベと4:1の割合で混合、最終濃度として80%窒素・20%酸素のガスを用いた。1日6時間の投与を21日間(肺線維化の評価実験)または7日間(肺内炎症の評価実験)行った。

実験群は以下の4群とした。SA群:Sham+対照ガス、SH群:Sham+水素ガス、BA群:BLMモデル+対照ガス、BH群:BLMモデル+水素ガス。

### <ブレオマイシンモデルの肺組織の経時変化の評価>

ブレオマイシンモデルの肺組織の経時変化を評価するため、ブレオマイシン投与2、4、7、21、35日後の左肺のHE染色の組織標本を作成した。

### <効果判定:肺線維化の評価>

肺線維化の評価は、ブレオマイシン投与後に水素(または対照ガス)投与を21日間(Day0～Day20)行い、21日目に評価を行った。呼吸機能の評価、肺CTの評価、組織の評価、細胞外マトリックス構成タンパク質の解析を行った。呼吸機能の評価は小動物用のスパイロメーターFlexVentを、肺CTの評価は、小動物用CT日立アロカLatheta LCT200を用いた。麻酔下に屠殺の上、肺組織を採取、左肺は4%PFAにて固定し、パラフィンブロックを作成、薄切標本(4mm)にHE染色およびエラスチカ・マッソン染色を行い、組織評価した。右肺は速やかに液体窒素に凍結し、粉碎、RIPAバッファーに溶解した。細胞外マトリックスの構成タンパクとして、 $\alpha$ SMA、I型コラーゲン、フィブロネクチンをウエスタンブロッティングの手法で定量評価した。

### <効果判定:肺内炎症の評価>

肺線維化の評価は、ブレオマイシン投与後に水素(または対照ガス)投与を7日間(Day0～Day6)行い、7日目に麻酔下に屠殺、気管肺胞洗浄液(BALF)および、右肺(組織評価)、左肺(生化学分析)を採取した。BALFの細胞数計測とタンパク量測定を行った。左肺より炎症性サイトカインおよび細胞外マトリックス構成タンパクのmRNA発現をRealtime RT-PCRの手法で評価した。右

肺の免疫染色を行い、TGF $\beta$ 、IL-6 の産生細胞の同定および、マクロファージの表現系(総マクロファージまたは M2) を評価し、細胞割合を測定した。

#### <統計学的解析>

統計解析は、IBM SPSS Statistics version 23.0 (IBM, Armonk, New York) を用いて実施した。単一比較の場合は、対応のない両側 Student-t 検定を用いた。複数比較は、Kruskal-Wallis 検定に続いて、2 群間の有意差検定には Dunn 検定を用いた。数値およびグラフ(エラーバー)は平均値 $\pm$ 95%信頼区間 (CI) で示す。結果は P < 0.05 で有意とした。

### 4. 研究成果

#### <プレオマイシンモデルの肺組織の経時評価>

BLM 投与後 2 日目の肺組織 HE 染色では、肺胞間質が肥厚し、肺胞と間質に好中球の浸潤がみられた。4 日目では間質性浮腫は減少していたが、肺胞に細胞を含む Protein-rich debris がみられた。7 日目では肺胞内に多数のマクロファージを認め、硝子膜形成がみられた(図 1-a)。21 日目には、肺胞間質に細胞外マトリックスの過形成と牽引性気管支拡張を認めた(図 1-b)。35 日目には肺胞間質の細胞外マトリックスが線維性組織に置き換わっており、肺胞構造が破壊され、ハニカム状になっていた(図 1-c)。

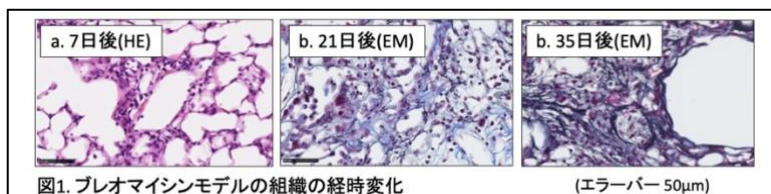


図1. プレオマイシンモデルの組織の経時変化

(エラーバー 50 $\mu$ m)

#### <効果判定：肺線維化の評価>

呼吸機能評価では、静的コンプライアンスは水素ガス投与を行った群において有意に高く (BH 群 : 0.056 mL/cmH<sub>2</sub>O [95% CI: 0.47-0.64] vs BA 群 : 0.042 mL/cmH<sub>2</sub>O [95% CI: 0.031-0.053], p=0.02)、静的エラスタンスは有意に低かった (BH 群 : 18.8 cmH<sub>2</sub>O/mL [95% CI: 15.4-22.2] vs BA 群 : 26.7 cmH<sub>2</sub>O/mL [95% CI: 19.6-33.8], p=0.02) (図 2-a, b)。また、CT による肺容量の評価では、BH 群の肺容量は BA 群と比べ有意に高値を示した (BH 群 : 269  $\mu$ L [95% CI: 228-309] vs BA 群 : 193  $\mu$ L [95% CI: 139-248], p=0.02) (図 2-c)。肺の組織評価として、線維化を数値化した Ashcroft score を用いて比較した。BA 群では BH 群よりも、著明な肺線維化を認めた(図 2-d)。細胞外マトリックス構成タンパク質として、フィブロネクチン、I 型コラーゲン、 $\alpha$ SMA の肺内タンパク量をウエスタンブロッティングの手法で比較した。水素吸入によって、フィブロネクチンの増加が抑制された (BH 群 0.294 [95% CI: 0.245-0.343] vs BA 群 0.371 [95% CI: 0.314-0.428], p=0.069) (図 2-e)。I 型コラーゲンおよび  $\alpha$ SMA の発現は、21 日目の時点ではいずれの治療群間でも差がなかった。

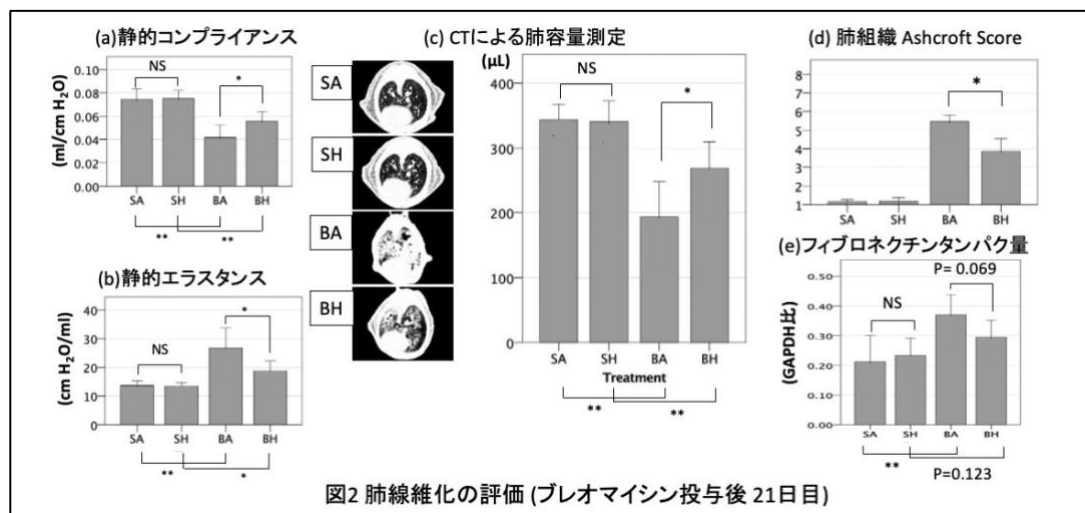


図2 肺線維化の評価(プレオマイシン投与後 21 日目)

#### <効果判定：肺内炎症の評価>

肺組織内に発現するサイトカインの mRNA を評価するため、Realtime RT-PCR の手法を用いた。炎症性サイトカイン IL-6、IL-4、IL-13 の mRNA の発現は、BLM 投与により上昇するが、水素ガス投与はそれを有意に低下させた。IL-10 の mRNA 発現は BA 群と BH 群間では統計学的な差はなかった(図 3-a)。次に免疫染色を用いてサイトカインの局在を評価した。BLM モデルでは肺胞間質に TGF- $\beta$ 1 陽性細胞が認められたが、水素ガス投与によってそれらは抑制された(図 3-b)。IL-6 の免疫染色では、肺における IL-6 産生細胞は肺胞マクロファージであった(図 3-c)。BALF の評価では、BA 群と BH 群間では、単離細胞数とタンパク量に差はなかった。BLM 投与後の BALF 細胞は主にマクロファージであった。その IL-6 mRNA 発現を Realtime RT-PCR を用いて測定し

たところ。BH 群はBA 群に比べて、IL-6 の発現が低下していた(図 3-d)。肺胞および肺胞間質におけるマクロファージの表現型を同定するために、抗 Iba-1 抗体を用いて総マクロファージを検出し、抗CD163抗体を用いてM2様マクロファージを特異的に検出した。BLM 投与 7 日後の肺胞では、Iba-1 陽性、CD163 陰性のマクロファージの増加がみられたが、水素ガス投与の有無でそれらの細胞数は変わらなかった (BA 13.0% [95% CI: 9.3%-16.8% ] vs BH 11.5% [95% CI: 7.8%-15.1% ], p=0.74)。一方、BLM 投与により肺胞内の Iba-1 陽性、CD163 陽性マクロファージも増加するが、水素ガス投与によりそれらは有意に減少した (BA 3.1% [95% CI: 1.6%-4.5% ] vs BH 1.1% [95% CI: 0.3%-1.8% ], p=0.008) (図 3-e)。

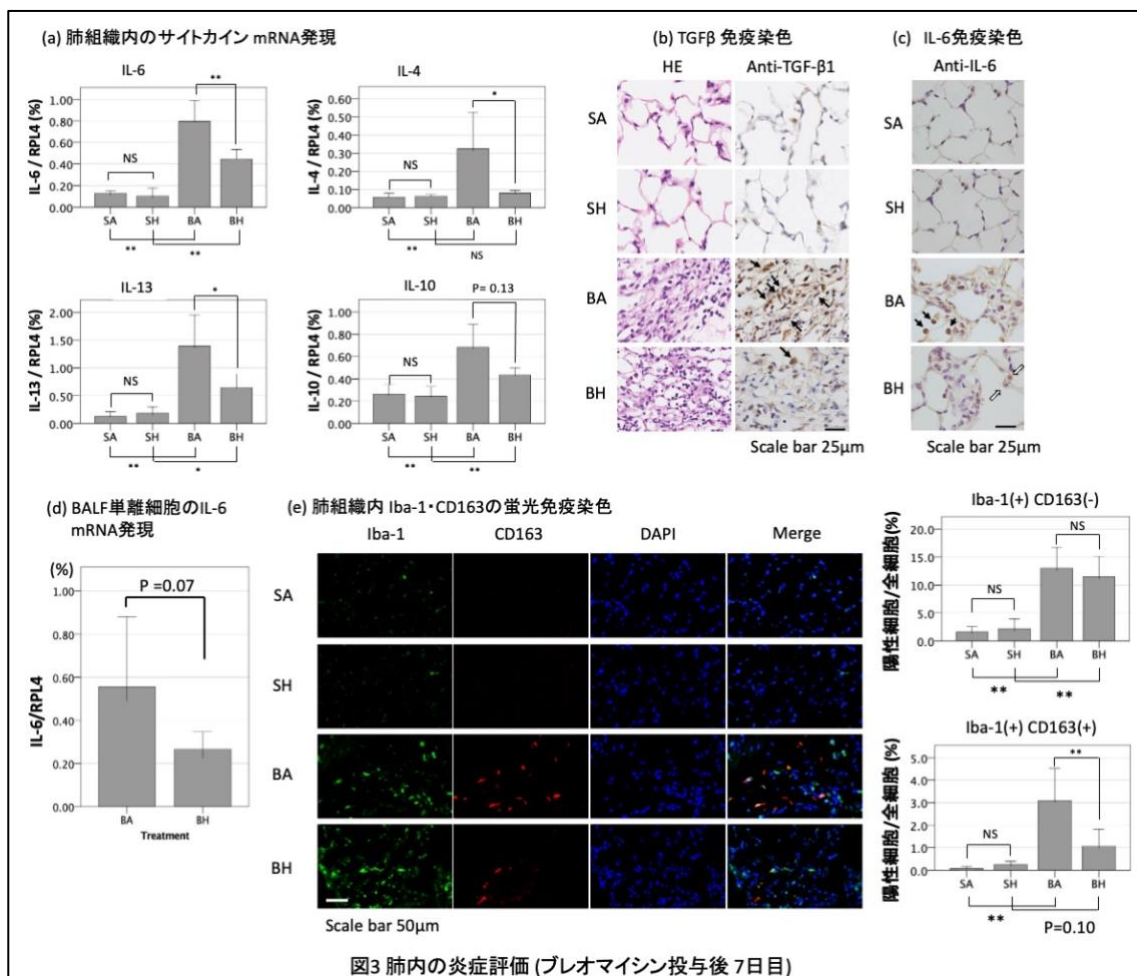


図3 肺内の炎症評価(プレオマイシン投与後7日目)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamamoto Hirotsugu, Aokage Toshiyuki, Igawa Takuro, Hirayama Takahiro, Seya Mizuki, Ishikawa Aoyama Michiko, Nojima Tsuyoshi, Nakao Atsunori, Naito Hiromichi	4. 巻 24
2. 論文標題 Luminal preloading with hydrogen rich saline ameliorates ischemia reperfusion injury following intestinal transplantation in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Transplantation	6. 最初と最後の頁 e13848
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ptr.13848	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 青景聡之、平山隆浩、池谷真澄、大澤郁朗、内藤宏道、中尾篤典
2. 発表標題 水素吸入療法は間質性肺炎遠隔期の呼吸機能を温存する: プレオマイシン処理マウスを用いた研究
3. 学会等名 第48回日本救急医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青景聡之、瀬谷海月、池谷真澄、寺崎泰弘、石川倫子、大澤郁朗、中尾篤典
2. 発表標題 間質性肺炎急性期における間欠的・連日の水素吸入は肺間質の炎症と肥厚を抑制する
3. 学会等名 第9回日本分子状水素医学生物学会大会 2019年9月1日開催
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青景聡之、池谷真澄、瀬谷瑞樹、平山隆浩、石川倫子、内藤宏道、大澤郁朗、中尾篤典
2. 発表標題 急性肺傷害に対する治療開発 - 水素吸入療法の炎症・線維化の抑制効果: マウスを用いた検証
3. 学会等名 第47回日本集中治療医学会学術集会 2020年3月7日開催
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中尾 篤典 (Nakao Atsunori)  (40648169)	岡山大学・医歯薬学域・教授  (15301)	
研究分担者	大澤 郁朗 (Ohsawa Ikuroh)  (30343586)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長  (82674)	
研究分担者	宮原 信明 (Miyahara Nobuaki)  (70335610)	岡山大学・保健学域・教授  (15301)	
研究分担者	石川 倫子 (Ishikawa Michiko)  (40566121)	兵庫医科大学・医学部・非常勤講師  (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------