

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22819

研究課題名（和文）硫黄呼吸経路に着目した横隔膜機能不全予防メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanisms of hydrogen sulfide prevents mechanical ventilation-induced diaphragm atrophy and dysfunction

研究代表者

関根 紀子（Ichinoseki-Sekine, Noriko）

順天堂大学・スポーツ健康科学部・客員教授

研究者番号：10393175

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：主な呼吸筋である横隔膜は、人工呼吸器の装着などにより自発的な収縮を軽減すると、短時間に著しく萎縮し機能不全を呈する。本研究は、ミトコンドリアの硫黄呼吸経路に着目し、硫化物による横隔膜機能不全の予防メカニズムを明らかにすることを目的とした。ラット横隔膜萎縮実験モデルを用い、人工換気前のラットに硫化物を単回投与した。その結果、硫化物の投与は横隔膜の萎縮と機能不全を強力に予防することを確認した。また、これら予防効果にはミトコンドリアComplex IおよびIIが関わっており、硫化物の投与により活性酸素種の産生が抑制されることが関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、近年報告されたミトコンドリアの硫黄吸経路が横隔膜機能不全の予防に関与すると仮説し、検証を試みたものである。心血管系に対する硫化物投与の効果については研究が進められているが、骨格筋を対象としたものは少なく、中でも横隔膜について取り上げ報告したのは本研究が初めてである。生体内で硫化物がミトコンドリア機能を保護するという新たな知見を提供したことは学術的に意義があると考えられる。

本研究の成果は、横隔膜の機能および人工呼吸器からの離脱不全の予防に貢献するのみならず、四肢骨格筋の廃用性萎縮や加齢性萎縮（サルコペニア）に対する新たな予防用や治療法の開発に繋がる可能性を持っている。

研究成果の概要（英文）：Prolonged MV results in the rapid development of inspiratory muscle weakness due to both diaphragmatic atrophy and contractile dysfunction, termed “ventilator-induced diaphragm dysfunction (VIDD).” This study examined whether and mechanisms of treatment with hydrogen sulfide (H₂S) donor will prevent VIDD. Sodium sulfide as a hydrogen sulfide donor or saline was injected into male rats intraperitoneally before mechanical ventilation. Our results showed that the administration of H₂S donor prevented VIDD via a protected mitochondrial function of Complexes I and II.

研究分野：運動生理学

キーワード：筋萎縮 横隔膜 ミトコンドリア 硫化物 機械的人工換気

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は可塑性に富む組織であり、運動刺激に対して筋肥大や筋力向上などの適応を示す一方で、不活動には筋萎縮(廃用性筋萎縮)や筋力低下を示す。一般に、骨格筋から連想されるのは腕や脚の筋肉であることが多いが、横隔膜や肋間筋などの呼吸筋も同じく骨格筋である。主な呼吸筋である横隔膜は、人工呼吸器の装着などにより自発的な収縮を軽減すると、12時間で20%程度も萎縮し機能不全を呈するといった大きな応答を示す。呼吸筋の機能低下は易疲労感や生活活動量の低下をもたらすことから、呼吸筋機能の維持・向上は腕や脚の筋肉と同様に重要である。

我々はこれまで、ラット横隔膜萎縮実験モデルを用いて横隔膜機能不全メカニズムの解明と予防法の開発に取り組み、予め行う運動トレーニングや温熱刺激が横隔膜機能不全を予防することを明らかにしてきた(Ichinoseki-Sekine 2014, Yoshihara 2015)。しかしながら、実際の臨床現場では事故などの不測の事態により人工呼吸器の装着に到ることがしばしば発生するため、人工呼吸器装着直前や使用中に呼吸筋の機能不全を防ぐ手段が求められていた。

近年、哺乳類のミトコンドリアにおいて酸素によらない硫黄呼吸経路が存在する可能性が報告され(Akaike 2017)、硫化物がミトコンドリアを保護する可能性が浮上した。我々はこれまで、横隔膜機能不全にミトコンドリア機能不全が関与していることを明らかにしていることから(Smuder 2012, Morton 2018)、硫化物の投与によりミトコンドリアを保護することで、横隔膜機能不全を予防できる可能性が考えられた。そこで予備実験を行ったところ、人工呼吸器装着直前の単回投与で横隔膜機能不全を予防する可能性が示唆されたが、そのメカニズムについては不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、ミトコンドリアの硫黄呼吸経路に着目し、硫化物による横隔膜萎縮・機能不全の予防メカニズムを明らかにすることを目的とした。硫化物が虚血再環流によるダメージから心筋や血管を保護する作用を持つことは多くの研究で示されているが、骨格筋を対象とした研究はほぼ皆無である。硫化物が持つ横隔膜機能不全に対する予防効果とそのメカニズムを解明することができれば、臨床現場において不測の事態により人工呼吸器の装着を要する場合にも応用できることが期待できる。

3. 研究の方法

(1) 横隔膜萎縮実験

横隔膜機能不全の誘導には我々が構築したラット横隔膜萎縮実験モデルによる人工換気(MV)を用いた。16週齢の雄性ラットをMV群と対照群に振り分け、さらに、それぞれの条件に対して硫化物投与群と生理食塩水投与群を設定し、計4種類の実験群(各群9~10匹)を設定した。MV群には、麻酔下で気管切開したのち呼吸用チューブを装着し、小動物用ベンチレータを用いて12時間の人工換気を行った。その間、頸静脈に麻酔用のカテーテルを留置して麻酔を維持するとともに、頸動脈に留置したカテーテルより血圧のモニタと血ガス分析用の血液を採取した。なお、呼吸管理下の血ガスは PO_2 70~90mmHg、 PCO_2 35~40mmHgとなるように維持した。また、手掌より心電図をモニタし、体温保持装置を用いて直腸温を36.5~37°Cに維持した。

(2) 腹腔内投与条件

MV群には人工換気直前に、対照群には横隔膜摘出12時間前に、硫化物または生理食塩水を腹腔内投与した。硫化物は強力な血管拡張作用を持ち血圧を低下させるため、投与量には十分な注意を払う必要がある。予備実験により、16週齢のラットに対して硫化ナトリウム Na_2S を投与量50 μ M/体重kgにて腹腔内投与することで、急激な血圧の低下を防ぎ安定した生体内環境を維持できる事を確認した。

(3) 分析項目

12時間の人工換気もしくは腹腔内投与後12時間後、直ちに下大静脈より採血したのち横隔膜を摘出した。横隔膜の一部は横隔膜機能評価、ミトコンドリア酸素消費速度評価、および活性酸素種産生評価に用い、残りは液体窒素で凍結したのち-80°Cで保存した。横隔膜機能評価として、酸素化したクレブス溶液中での電気刺激により横隔膜収縮能を測定した。また、横隔膜よりミトコンドリアを単離し、ミトコンドリア酸素消費速度評価および活性酸素種産生評価を行った。さらに、凍結サンプルより凍結切片を薄切し、免疫組織化学法を用いて横隔膜の萎縮の程度を評価するとともに、ウェスタンブロット法によるタンパク質発現評価を行った。

4. 研究成果

(1) 横隔膜機能および表現型評価

ベンチレータによる12時間の呼吸管理により、全ての刺激周波数で横隔膜収縮能が低下した(図1)。しかしながら、収縮能の低下は硫化物の投与により予防できることが示された。一方、二つの対照群(生理食塩水もしくは硫化物投与)の間に硫化物の投与による影響はみられなかった。

筋線維横断面積にも収縮能と同様の結果が示され、全ての筋線維タイプにおいて、呼吸管理により生じた筋萎縮は硫化物の投与で予防できることが示された(図2)。

(2) ミトコンドリア酸素消費速度および活性酸素種産生評価

横隔膜より単離したミトコンドリアサンプルを用いて Complex I および II の呼吸調節比(RCR)を比較したところ、両 Complex において呼吸管理により RCR が低下した。しかしながら、硫化物の投与により呼吸管理による RCR の低下が軽減される傾向がみられ、対照群においては RCR が増加する傾向が示された。

コハク酸による活性酸素種産生は呼吸管理により増加したが、硫化物の投与によりその増加は抑制された。対照群においては、投与条件による違いは示されなかった。

(3) タンパク質発現評価

ウェスタンブロット法によるタンパク質発現評価により、 α -II-spectrin における 145kDa (カルパイン) と 120kDa (カスパーゼ3) のタンパク質発現量が呼吸管理により増加することが示された。一方、抗酸化酵素(SOD1 よび SOD2) に群間の差は見られず、生体内 H₂S 産生酵素(CSE, CBS, 3MST)にも群間の差は見られなかった。

本研究の結果から、硫化物が持つ横隔膜機能不全に対する保護作用は、ミトコンドリア Complex I および II の機能が保護され、活性酸素種の産生が抑制されるためであることが示唆された。また、硫化物の投与は筋タンパク質の分解を抑制するが、生体内の H₂S 産生能には影響しない可能性が示唆された。今後も更なる詳細な分析を行う予定である。

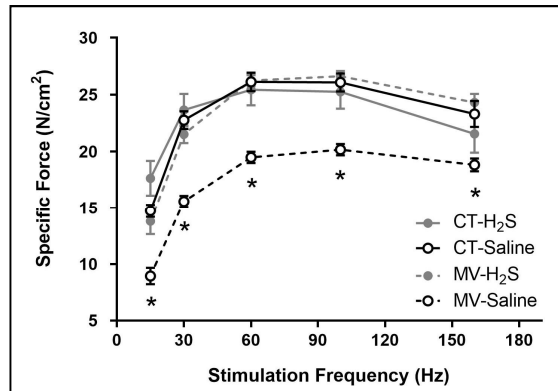


図1 横隔膜収縮能評価 (in vitro)

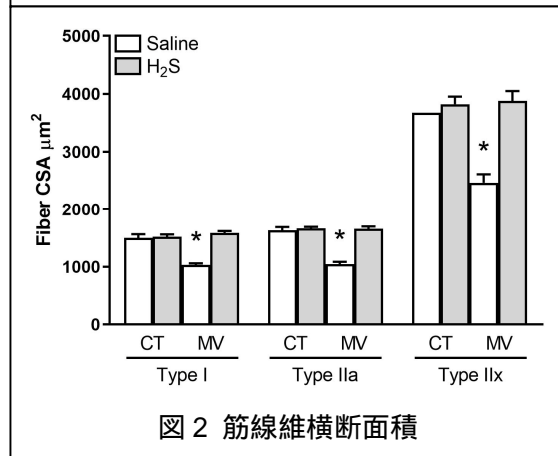


図2 筋線維横断面積

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 Ichinoseki Sekine Noriko, Smuder Ashley J., Morton Aaron B., Hinkley James M., Mor Huertas Andres, Powers Scott K. | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Hydrogen sulfide donor protects against mechanical ventilation induced atrophy and contractile dysfunction in the rat diaphragm | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Clinical and Translational Science | 6. 最初と最後の頁 2139 ~ 2145 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cts.13081 | 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2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 関根紀子 |
| 2. 発表標題 骨格筋ミトコンドリア酸素消費速度と ROS産生速度の測定：横隔膜機能評価の場合 |
| 3. 学会等名 第76回日本体力医学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 関根紀子, Morton AB, Smuder AJ, Hinkley JM, Powers SK |
| 2. 発表標題 横隔膜萎縮・機能不全における硫化物の予防効果の検討 |
| 3. 学会等名 第74回日本体力医学会 |
| 4. 発表年 2019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 | 吉原 利典 (Yoshihara Toshinori) (20722888) | 順天堂大学・スポーツ健康科学部・助教 (32620) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 | 栗 寿喜 (Natsume Toshiharu) (90761841) | 順天堂大学・大学院スポーツ健康科学研究科・非常勤助教 (32620) | |

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 |
|---------|---------|
| | |