

令和 5 年 4 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17873

研究課題名（和文）水素ガスを利用した腸管虚血に対する新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel therapy using hydrogen gas for mesenteric ischemia and reperfusion injury

研究代表者

山元 良（Yamamoto, Ryo）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：90528853

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究によって、腸管虚血状態では小腸絨毛上皮が障害の首座であることに対して、再灌流障害では、それに加えて腸陰窩部分の細胞の障害が強いことが観察された。また、水素ガス吸入によって、小腸の組織障害の程度が軽減される組織造が観察された。また、再灌流によって障害されている細胞は腸幹細胞である可能性が高く、水素ガスの腸管虚血再灌流障害軽減作用は、腸幹細胞保護作用を介している可能性が示唆された。腸管虚血再灌流障害は特異的な薬剤治療は存在しないため、水素ガスが新規治療としての可能性を持つことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管虚血は腸管壊死から敗血症、循環動態の破綻などを併発し、時に死亡する重症疾患である。壊死腸管を切除するという外科治療以外には、虚血の原因に対する治療を行い腸管虚血時間を短縮させる有効な治療が存在しないが、虚血原因を取り除いた後も再灌流障害を引き起こし、時に腸管が壊死に至る。その再灌流障害に対する特異的や薬剤治療が存在しないなか、本研究は水素ガス吸入が新規治療として使用できる可能性を示した。今後、臨床研究によって新規治療薬が確立する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This study demonstrated that hydrogen gas inhalation preserves intestinal stem cells and mitigates oxidative stress caused by mesenteric ischemia and reperfusion. Ischemia damaged the epithelial layer at the tip of the villi, whereas reperfusion induced extensive apoptosis of the cells at the crypt base, which were identified as intestinal stem cells with double immunofluorescence stain.

研究分野：腸管虚血

キーワード：腸管虚血 水素ガス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腸管虚血 (Mesenteric Ischemia) は救急・集中治療領域で頻度の多い疾患であり、腸間膜動静脈の血栓閉塞などの明らかな血流遮断だけでなく、心不全、敗血症、大量出血などによるショック状態でも発症し、死亡率は 80% にまで及ぶといわれている。腸管壊死に至れば手術による切除を避けられないが、明らかな血流遮断を解除した後でも、腸管虚血から徐々に腸管壊死に至る症例も多い。また、近年、mesenteric ischemia によって腸管バリアが破綻し、バクテリアルトランスロケーションから敗血症などに進展することで、虚血の原因となった疾患の悪化をも引き起こすことが示唆されている。しかしながら、原疾患の治療以外に mesenteric ischemia の確立した治療法は存在せず、特異的治療の開発は急務である。また、開腹手術やカテーテルと血管拡張薬を組み合わせ、腸管血流を増幅させるなどの治療法は古くから示唆されているが、侵襲度を超えるほどの効果は得られておらず、特に侵襲度の低い新規治療の開発が求められている。

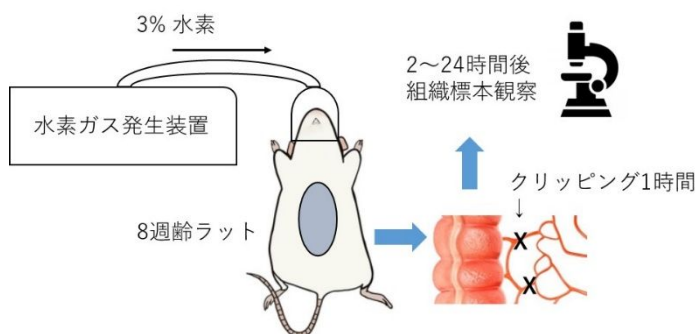
水素ガス吸入療法は、脳梗塞、心筋梗塞、および心肺停止モデルラットにおいて有効性が示されており、実臨床における安全性も確認されている。我々は、これまで多くの研究者が、水素ガス体内分布は拡散によるものと信じてきた通説を覆し、血流に依存する可能性を見出し、mesenteric ischemia などを含んだ虚血障害・再灌流障害疾患全般に水素ガス吸入療法が有効となる可能性を示してきた。水素ガスが虚血障害に対して治療効果を持つ可能性が極めて高いという基礎的研究結果を踏まえ、本研究において水素ガス吸入療法の mesenteric ischemia に対する治療効果を証明し、代替療法のない mesenteric ischemia に対する安全な新規治療として臨床研究へ移行させることで、社会に対する迅速な波及効果が生まれると考えられる。

### 2. 研究の目的

水素ガスの、腸管虚血再灌流における組織保護効果を明らかにする目的で研究を行った。本研究では、水素ガスの吸入時間や、組織障害の軽減効果、並びにその際に障害が軽減される細胞の種別を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

図の通り、水素ガス吸入の治療効果を解明するため、腸管虚血モデルラットを用いて腸管粘膜組織の観察を行った。8 週齢の SD ラットを小開腹し、腸間膜動脈根部と腸管辺縁動脈を最低三カ所クリッピングすることで腸管虚血モデルを作成した。クリッピングの時間は 1 時間とし、吸入水素ガスの濃度は、細胞もしくは動物を使用した水素ガス吸入効果の研究において、2% で効果が最大でありそれ以上では上乗せ効果が認められないこと、人体において無害であることが証明されていることから、2% とした。



クリッピングによる阻血を解除すると、腸管虚血後の再灌流状態が再現されるため、虚血状態に加えて、原因解除後の状況も観察した。水素ガス吸入によって腸管粘膜の虚血再灌流障害が軽減される可能性が高いと判断されたため、組織学的 (H-E 染色) に観察を行った。また、組織の特殊染色 (CAS3 染色) や二重染色を用いて、腸管組織のどの種類の細胞が水素ガスによって保護されているのかを解明する。また、細胞特異的な遺伝子に注目し PCR 定量検査を行うことで、虚血・再灌流による腸管組織のダメージと、水素ガス吸入によってそれが保護される効果を定量的に評価した。

特に、腸幹細胞に注目するため、腸幹細胞障の特異遺伝子である LGR5 を含めた二重染色を行い、また、組織中の LGR5、OLFM4、Hes1、Jag2、Notch1 などを real-time PCR で定量評価し、虚血再灌流による細胞障害経路、ならびに水素ガスの作用機序に関して評価した。

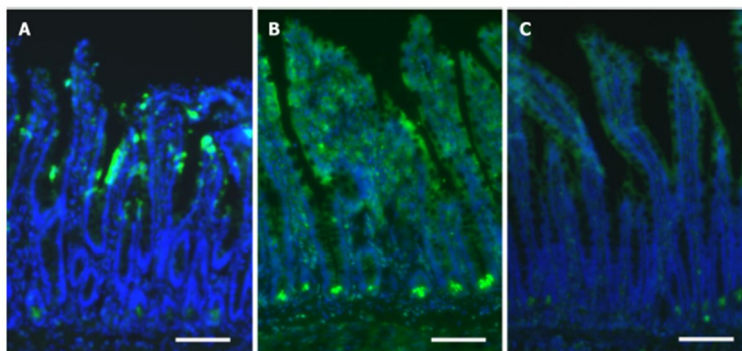
さらに、局所および全身の虚血再灌流障害の程度と、水素ガスによるそれらの軽減効果を測定するため、血中活性酸素 (Reactive Oxygen Species) によって誘導される 8-OHdG を組織染色および ELISA 法にて評価した。

### 4. 研究成果

腸管組織の虚血再灌流障害を観察すると、H-E 染色にて、腸管虚血状態では小腸絨毛上皮が障害の首座であることに対して、再灌流障害では、それに加えて腸陰窩部分の細胞の障害が強いことが観察された。また、水素ガス吸入によって、小腸の組織障害の程度が軽減される組織造りが観察された。

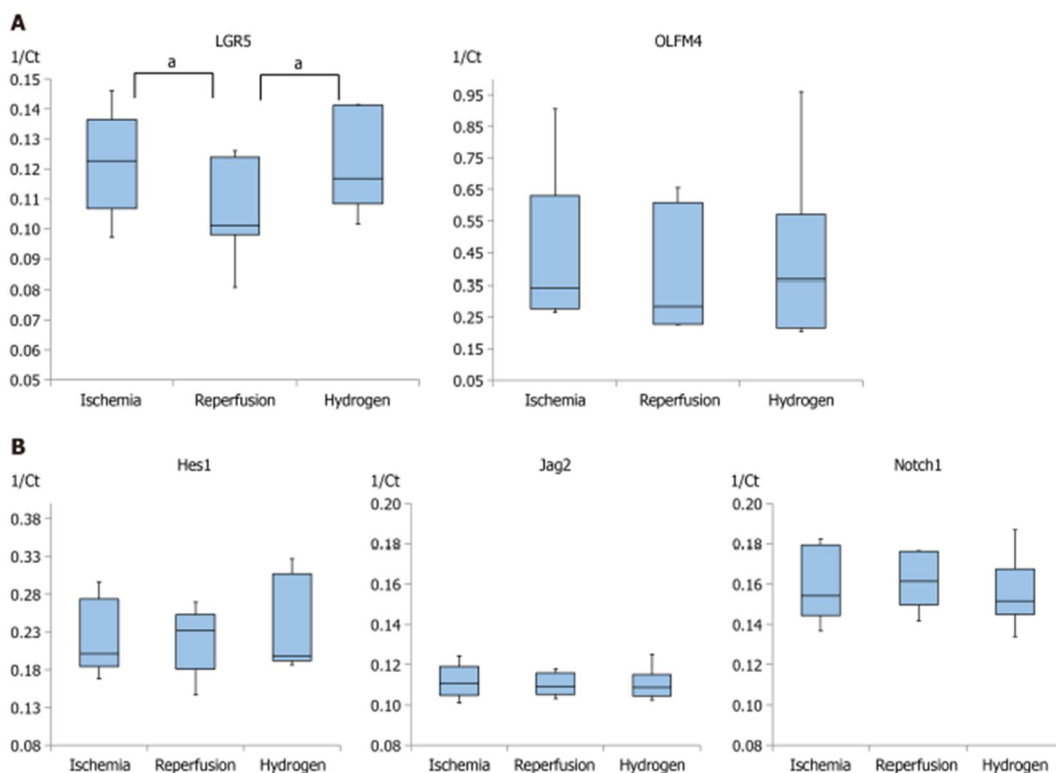
また、虚血状態 (図 A) では障害されていない腸陰窩部分の細胞が、再灌流にて障害されている (図 B) ことが観察された (緑が CAS3 染色で、障害を受けた細胞を示す)。この位置には腸幹細胞

胞が位置しており、腸幹細胞に特異的は LGR5 にたいする免疫染色の結果、再灌流で障害される細胞が腸幹細胞であることが示唆された。また、水素ガス吸入モデル(図C)では、同部位の細胞障害は軽減され、水素ガス吸入による腸幹細胞の虚血再灌流障害の軽減が示唆された。



さらに、real-time PCR による組織中の LGR5 定量評価

では、再灌流障害によって LGR5 量の減少が見られ、また、水素ガス吸入によってその減少が認められなくなることが見出された。OLFM4 に関しては、水素ガス吸入でやや多く発現しており、虚血および再灌流ではやや少ない発現が観察されたが、統計学的には有意ではなかった。一方 Hes1 は再灌流障害にて多く発現しており、Jag2 と Notch1 は、三群で同等の発現量であった。



8-OHdG の免疫染色によって、酸素ストレスは再灌流障害にて最も強く、それは水素ガス吸入によって軽減されることが観察された。しかしながら、全身の酸素ストレス障害に関しては、水素ガス吸入による軽減効果は認めなかった。

本研究によって、水素ガスは腸管の虚血再灌流障害においても保護作用があることが示唆された。また、その作用は腸幹細胞である可能性が高いことを示唆する所見も得られた。腸管虚血再灌流障害は特異的な薬剤治療は存在しないため、水素ガスが新規治療としての可能性を持つことが示された。研究計画当初予定していた臨床研究に関しては、基礎的研究の時間を要したことから、取り組むことができなかったが、臨床研究へ移行し、新規治療薬の開発に進めることができる結果を得られた。

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 Ryo, Suzuki Sayuri, Homma Koichiro, Yamaguchi Shintaro, Sujino Tomohisa, Sasaki Junichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Hydrogen gas and preservation of intestinal stem cells in mesenteric ischemia and reperfusion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 World Journal of Gastrointestinal Surgery	6. 最初と最後の頁 1329 ~ 1339
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4240/wjgs.v14.i12.1329	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山元良
2. 発表標題 腸管虚血に対する水素ガスの治療効果の検討
3. 学会等名 第57回日本腹部救急医学会総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------