

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16631

研究課題名（和文）腸管虚血に対する水素ガス吸入療法

研究課題名（英文）Hydrogen gas therapy for mesenteric ischemia

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） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：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部位が腸陰窩部分であることが観察された。この位置には腸幹細胞が位置しており、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。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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。

研究成果の概要（英文）：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. Hydrogen mitigated such apoptosis at the crypt base, and the LGR5 expression of the tissues was higher in the hydrogen group than in the reperfusion group.

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 (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。さらに、明らかな血流遮断を解除した後でも、血流の再灌流によって腸管障害が生じることが分かっており、血流再開後に腸管壊死に至る症例も多い。また、血流障害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重症化する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、侵襲度を越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。

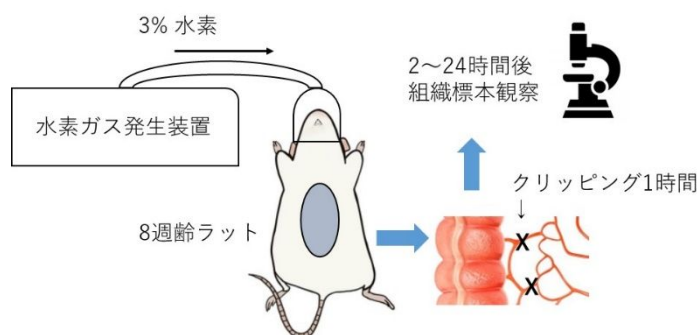
水素ガス吸入療法は、脳梗塞、心筋梗塞、および心肺停止モデルラットにおいて有効性が示されており、実臨床における安全性も確認されている。研究代表者は、これまで多くの研究者が、水素ガス体内分布は物理的な拡散によるものと信じてきた通説を覆し、血流に依存する可能性を見出した。この結果から、mesenteric ischemia などの虚血状態で水素吸入を行うと、血流再開の後に水素ガスが組織に分布し、虚血・再灌流障害疾患における治療効果を発揮するという可能性を示した。

### 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。さらに本研究では、水素ガスの腸管虚血再灌流における組織保護効果は、主に腸管のどの細胞の保護効果に起因しているかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

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(右図)。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。このモデルラットに2%の水素ガスを吸入投与した。2%の根拠は、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が理由となっている。



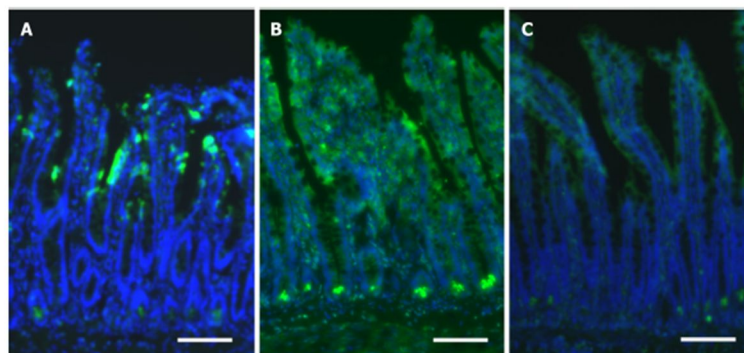
水素ガスの腸管保護作用を明確にするため、組織の特殊染色 (CAS3 染色) や二重染色を用いて、腸管組織のどの種類の細胞が水素ガスによって保護されているのかを観察した。また、細胞特異的な遺伝子に注目し PCR 定量検査を行うことで、虚血・再灌流による腸管組織のダメージと、水素ガス吸入によってそれが保護される効果を定量的に評価した。

また、腸管虚血モデルへ水素ガス投与し、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うことで、虚血・再灌流による腸幹細胞の障害は、水素ガス吸入療法によって軽減される可能性を予備実験において見出していたため、水素ガスの腸管保護作用は、腸幹細胞の保護作用に起因している可能性が高いと考えた。腸幹細胞である Lgr5 幹細胞は Paneth 細胞に挟まれ、Paneth 細胞から細胞増殖、分化において重要な役割を担っている Notch-Wnt シグナルの活性化を受ける。Notch シグナルは Hes1 を活性化し、Atoh1 を抑制する。Atoh1 は Lgr5 の発現を抑制するため、Notch シグナルの活性化は Lgr5 幹細胞の維持に必須である。そこで、それら転写因子の発現を定量的 PCR で評価した。

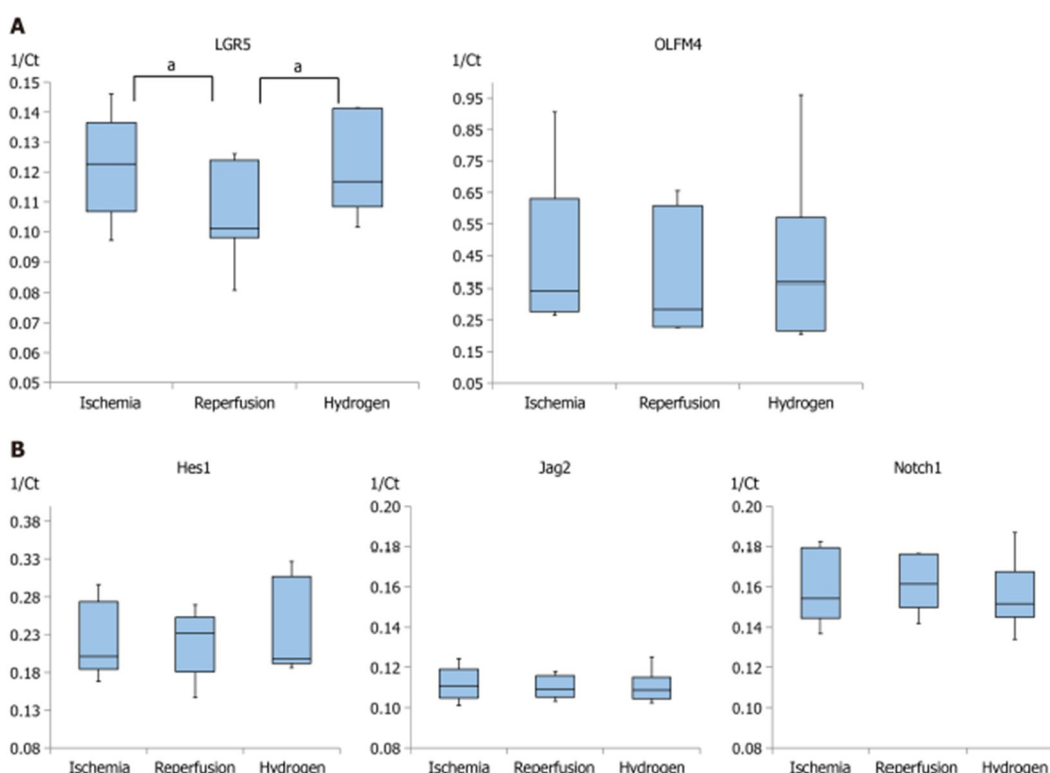
### 4. 研究成果

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部位が腸陰窩部分であることが観察された。

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。

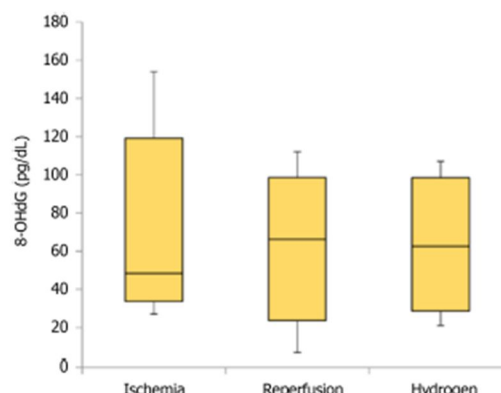


さらに、real-time PCR による組織中の LGR5 定量評価では、再灌流障害によって LGR5 量の減少が見られ、また、水素ガス吸入によってその減少が認められなくなることが見出された。OLFM4 に関しては、水素ガス吸入でやや多く発現しており、虚血および再灌流ではやや少ない発現が観察されたが、統計学的には有意ではなかった。一方 Hes1 は再灌流障害にて多く発現しており、Jag2 と Notch1 は、三群で同等の発現量であった。



さらに、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。また、ELISA による 8-OHdG の組織内定量測定では、組織の Reactive Oxygen Species (ROS) 自体は水素ガス吸入では減少しないことが確認され、再灌流障害によって発生した ROS を減少させることが水素ガスの治療効果ではないことが確認された（右下図）。

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0件

〔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
---------	---------