

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893118

研究課題名(和文)水素ガスを用いた肺移植後虚血再灌流傷害への新たな治療法の開発

研究課題名(英文) Inhaled hydrogen gas therapy for the prevention of lung transplant-induced ischemia-reperfusion injury

研究代表者

川村 知裕 (Tomohiro, Kawamura)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30528675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：抗酸化作用を持つ水素ガスを吸入させることにより、肺移植後の虚血再灌流傷害を軽減することをラット肺移植実験モデルで証明してきた。本研究では、水素を肺移植後虚血再灌流傷害に対する新たな治療法とし人体に応用を目指すことを目的とした。施設倫理委員会の承認のもと、肺移植後患者に水素ガスを投与を開始した。現在現在データを蓄積中である。また水素の臓器保護効果の分子メカニズムを解明のために細胞実験系を用いた検討も開始した。

研究成果の概要(英文)： Our basic data have shown that hydrogen is a high potential therapeutic gas for the lung transplant-induced ischemia-reperfusion injury. To introduce the hydrogen gas therapy to clinical practice, we developed the ventilation system with hydrogen. And we have started to administer hydrogen gas to the patient. On the other hand, to elucidate the mechanism of the therapeutic effect of hydrogen gas, we also set up the cell experiment system with hydrogen.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：移植・再生医療 水素 肺移植 外科

## 1. 研究開始当初の背景

肺移植における虚血再灌流傷害は、移植後急性期・慢性期におこる病態（移植片機能不全、閉塞性細気管支炎など）の原因・リスクファクタであり、その制御は肺移植の治療成績向上のための重要課題である。しかし有効な治療法はいまだに無く、効果的かつ新たな治療戦略の確立が全世界的に求められている。近年水素分子は活性酸素種を除去するラジカルスカベンジャー作用を持つことが証明された。なかでも生体内に除去する酵素が存在しない強力な酸化作用を持つヒドロキシルラジカル( $\cdot\text{OH}$ )とパーオキシナイトライト( $\text{ONOO}^-$ )を、水素が選択的に除去することが示され、マウス脳梗塞モデルにおいて脳虚血再灌流傷害を軽減することが証明された[Nat Med. 2007; 13(6):688-94]。申請者はこれまでラット・マウスモデルを用い、水素ガス吸入が肺移植の各段階（ドナー治療、臓器保存、レシピエント治療）において治療効果を示すことを、系統的に証明してきた。水素ガスは 4.1 ~ 94%（酸素混合下）の範囲で爆発性を持つが、4%以下では爆発の危険はない[NASA; Safety Standard for Hydrogen and Hydrogen Systems]。また、水素ガス(49%)の吸入は、潜水病（潜函病）予防のために古くから用いられており、人体への安全性も確認されている[J Appl Physiol. 1994; 76(3):1113-8]。水素の臓器保護のメカニズムは不明な部分が多く、更なる解明が必要であるが、すでに生体に用いられているものであるため、メカニズムの解析と同時に臨床応用へ向けた検討が可能である。

## 2. 研究の目的

本研究では申請者がこれまでにアメリカで行ってきた研究を継続し、特に下記の2点について発展させ、国内での研究開始を目的とした。

(1) 水素分子の臓器保護効果のメカニズムの解析。

(2) 肺移植患者への水素投与臨床試験のセットアップと開始。

## 3. 研究の方法

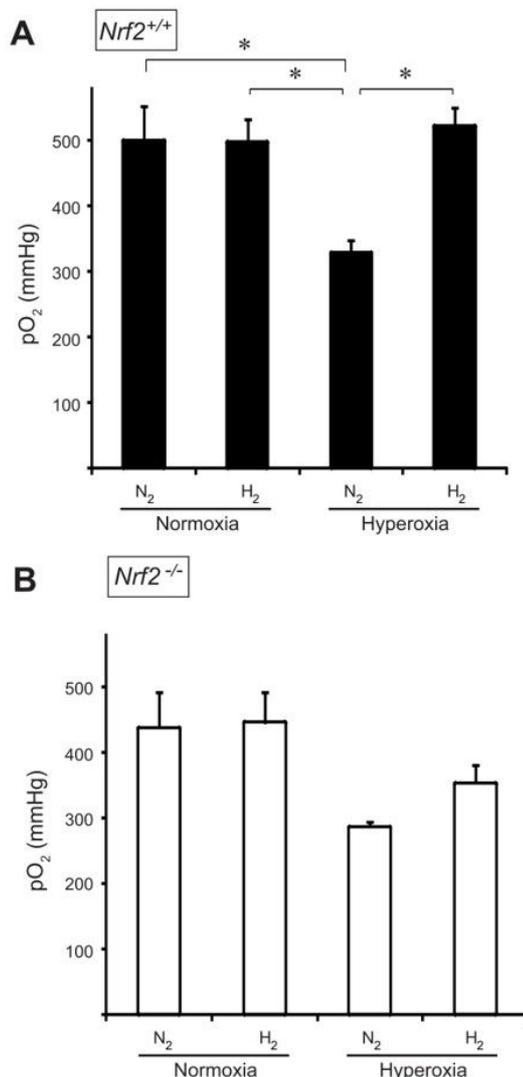
(1) 水素の臓器保護効果のメカニズムを解析するために、強い酸化ストレスモデルかつ単純な動物実験モデルとして、高濃度酸素肺傷害モデルを用い、酸化ストレス応答で重要である、NF-E2-related factor 2 (Nrf2) シグナルに注目し解析を行った。C57BL/6J マウス ( $Nrf2^{+/+}$ ) もしくは Nrf2 ノックアウトマウス ( $Nrf2^{-/-}$ ) を以下の4グループに分け、それぞれの混合ガスに60時間曝露した：1) 2%酸素 + 空気(Normoxia), 2) 2%水素 + 空気, 3) 2%酸素 + 98%酸素(Hyperoxia), 4) 2%水素 + 98%酸素。60時間後の動脈血酸素濃度( $\text{pO}_2$ )、組

織像、脂質過酸化の指標であるマロンジアルデヒド、リアルタイム RT-PCR にて Nrf2 依存性タンパク質の遺伝子発現について解析を行った。

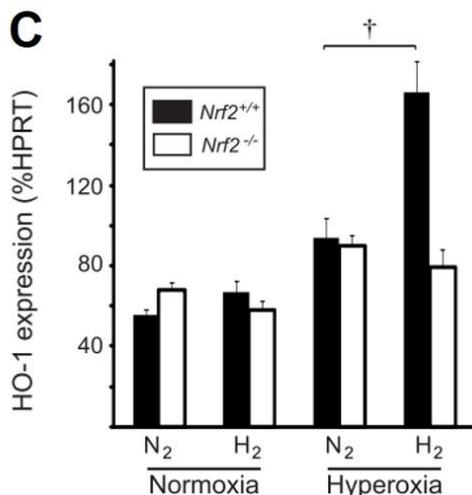
(2) 市販の人工呼吸器回路 (Servo i<sup>®</sup>, MAQUET) に対し、吸気ラインから 4%水素、96%酸素の混合ガスラインを接続。さらに呼吸器設定を測定するための、酸素濃度計、水素濃度計、一回換気量モニターラインを接続し、水素接続人工呼吸器回路を構築した。肺移植後、集中治療室にて人工呼吸管理中で、吸入酸素濃度が  $\text{FiO}_2 < 0.67$  で、 $\text{SpO}_2 > 90\%$  が維持できる比較的呼吸状態が安定した患者に対し、1.3%の水素ガスを24時間継続投与する臨床試験をデザインした。目標登録症例数は6例で、4年間の研究期間とした。

## 4. 研究成果

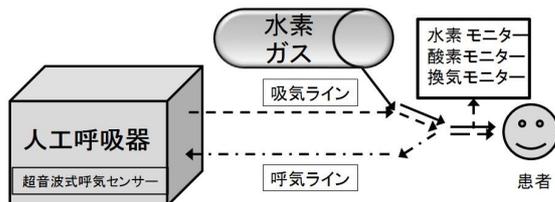
(1)  $Nrf2^{+/+}$ 、 $Nrf2^{-/-}$  とともに、窒素を含む Hyperoxia 曝露は Normoxia に比べ、 $\text{pO}_2$  を低下させ、間質肥厚などの組織学的変化を認め、マロンジアルデヒドを増加させた。水素は  $Nrf2^{+/+}$  において  $\text{pO}_2$ ・組織像を有意に改善したが、 $Nrf2^{-/-}$  では保護効果はなかった(図 A, B)。



HO-1 を含めた Nrf2 依存性タンパク遺伝子群 (Nqo-1,GSTA2) の発現が *Nrf2*<sup>+/+</sup>において水素により有意に増加したが *Nrf2*<sup>-/-</sup>ではこれらの誘導はみとめなかった(図 C).これらの実験結果から水素の臓器保護効果は Nrf2 シグナルを介したものであることが明らかとなった.



(2) 構築した水素吸入人工呼吸器回路を用いて,人工呼吸器モニター上の表示・設定と実際の一回換気量,酸素濃度,水素濃度,水素流量などの差違を測定・検証し,換算表を作成した.



水素吸入人工呼吸システム模式図

申請者の所属施設(大阪大学)の倫理委員会に申請し承認を得た(受付番号 839).UMIN に登録し,臨床試験対象者の募集を開始した(UMINID: 000014630).現在症例データを蓄積中である.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Kawamura T, Wakabayashi N, Shigemura N, Huang CS, Masutani K, Tanaka Y, Noda K, Takahashi T, Billiar TR, Okumura M, Toyoda Y, Kensler TW, Nakao A. Hydrogen gas reduces hyperoxic lung injury via the Nrf2 pathway in vivo. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology. 304;

L646-L656, 2013

DOI: 10.1152/ajplung.00164.2012

2. Noda K, Tanaka Y, Shigemura N, Kawamura T, Wang Y, Masutani K, Sun X, Toyoda Y, Bermudez CA, Nakao A. A novel method of preserving cardiac grafts using a hydrogen-rich water bath. J Heart Lung Transplant. 32(2); 241-50,2013

DOI: 10.1016/j.healun.2012.11.004

[学会発表](計 5 件)

1. Tomohiro Kawamura, Norihisa Shigemura, Yoshiya Toyoda, Masayoshi Inoue, Meinoshin Okumura, Atsunori Nakao. Hydrogen gas reduces hyperoxic lung injury via the Nrf2 pathway.(The Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery.2013/4/4-4/7, Kobe)

2. Tomohiro Kawamura, Norihisa Shigemura, Yoshiya Toyoda, Masaoshi Inoue, Soichiro Funaki, Tomoyuki Nakagiri, Yasushi Shintani, Noriyoshi Sawabata, Masato Minami, Meinoshin Okumura, Atsunori Nakao. Inhaled hydrogen gas therapy for prevention of lung transplant-induced ischemia/reperfusion injury. (The 13<sup>th</sup> Congress of the Asian Society of Transplantation. 2013/9/3-9/6, Kyoto)

3. Tomohiro Kawamura, Norihisa Shigemura, Yoshiya Toyoda, Masayoshi Inoue, Meinoshin Okumura, Atsunori Nakao. Hydrogen gas reduces hyperoxic lung injury via the Nrf2 pathway.(American thoracic Society 2013 .2013/5/17-5/22, Philadelphia)

4. 川村知裕, 重村周文, 田中雄悟, 須崎剛行, 舟木壮一郎, 中桐伴行, 新谷 康, 井上匡美, 澤端章好, 南 正人, 奥村明之進 水素ガス吸入は Nrf2 シグナルを介して高濃度酸素肺傷害を軽減する(第 30 回日本呼吸器外科学会総会 2013/5/9-5/10, 名古屋)

5. 川村知裕, 桃實 徹, 舟木壮一郎, 別所俊哉, 新谷 康, 井上匡美, 南 正人, 中尾篤典, 奥村明之進 肺移植ドナーに対する水素ガス吸入による肺移植後虚血再灌流傷害軽減 (第 41 回日本臓器保存生物学会定期学術集会 2014/11/28-11/29, 大阪)

[図書](計 3 件)

1. Kawamura T, Wakabayashi N, Shigemura N, Huang CS, Masutani K, Tanaka Y, Noda K, Takahashi T, Billiar TR, Okumura M, Toyoda Y, Kensler TW, Nakao A. 水素ガスは in vivo で Nrf2 シグナルを活性化することにより高濃度酸素肺傷害を減少させる. 住友精化医

療ガス情報ファイル 32-33, 2013

2. Kawamura T , Tanaka Y, Shigemura N, Toyoda Y, Nakao A. Experimental Organ transplantation (Chapter ; Lung transplantation in rats) . Nova Science Publishers, Inc. 159-173, 2013

3. 川村知裕 肺移植における新たな治療戦略としての水素ガス吸入の可能性 (今日の移植 129-130 2015年1月号)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

川村 知裕 (KAWAMURA TOMOHIRO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30528675

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：