

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462484

研究課題名(和文) 早産児の後遺症発症の減少を目指して～分子状水素を用いた新規治療法の開発～

研究課題名(英文) The new therapeutic approach for reduction of severe complication in preterm neonates

研究代表者

小谷 友美 (Kotani, Tomomi)

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：70359751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内炎症による胎仔の神経障害発症の動物モデルを形成し、このモデルの母獣に新規抗酸化剤である分子状水素を投与しその効果を検討してきた。母体炎症が、胎児の脳組織における前炎症性サイトカインの産生亢進や酸化ストレス亢進による細胞死を誘導し、神経障害発症に関与していること、またその傷害の中心に脳内の免疫応答細胞ミクログリアの過剰な活性化が関与している可能性が明らかとなった。さらに分子状水素の母体投与は、ミクログリアの過剰な活性化を抑制することにより、炎症、酸化ストレスによる神経障害を軽減する可能性が示唆された。またその効果の一部には母体胎児境界面における炎症を抑制する経路も存在することが示された。

研究成果の概要(英文)：In mouse model of fetal brain damage caused by maternal inflammation, the effect of prenatal administration of molecular hydrogen was examined. In this research, maternal inflammation raised overproduction of pro-inflammatory cytokines and the induction of oxidative stress in fetal brain, followed by increased number of apoptotic cells. In addition, excessive activated microglia is involved in this inflammation and oxidative stress induced brain damage. Molecular hydrogen repressed microglia, which is suggested to play a protective role against inflammation and oxidative stress induced brain damage. In addition, maternal administration of molecular hydrogen reduced the inflammation at the maternal-fetal interface, which is also related with the protective role against fetal brain damage.

研究分野：産婦人科学

キーワード：炎症 酸化ストレス IL-6 神経障害 LPS 分子状水素 ET-1

1. 研究開始当初の背景

過去10年間で在胎26週以下の早産児(超早産児)の生存率は39%から52%に改善した反面、脳障害をはじめとする後遺症を有する児が生存児に占める割合は、13%から23%へと増加していると報告されている<sup>1</sup>。したがって、こうした後遺症を減少させる努力は、社会的要請度の高い課題のひとつといえる。後遺症発症には、短い在胎週数、子宮内炎症などが関与し、子宮内炎症は早産の原因ともなる。子宮内炎症により亢進した炎症性サイトカイン、酸化ストレスが児に臓器障害を与え、脳障害、呼吸障害といった後遺症が発症すると考えられている。そのため、こうした後遺症軽減のために、これらの炎症や酸化ストレスを軽減させる治療法の開発が期待されるが、まだ臨床応用に至っていない治療法はない。

2. 研究の目的

本研究では、炎症性サイトカイン、酸化ストレスの産生を抑制する効果を有することが報告されている分子状水素(H<sub>2</sub>)に着目した。H<sub>2</sub>は体内ではクロストリジウム属などの一部の腸内細菌により産生されており、その産生量は呼気中H<sub>2</sub>濃度で測定できるとされる。H<sub>2</sub>は細胞内透過性が高い特徴を有するが、私たちは、母体投与したH<sub>2</sub>が胎児・胎盤へ移行することを確認している<sup>2</sup>。H<sub>2</sub>の主な作用機序は、細胞傷害性の高いヒドロキシラジカルやペルオキシナイトライトの選択的除去であり、これにより抗酸化ストレス作用・抗炎症作用を示すことが知られている。脳梗塞モデル動物での改善効果が報告されて以来、糖尿病やパーキンソン病など他の酸化ストレスが病態に関与する疾患において、臨床試験でも有用性が報告されている。また、食品として認可されており、妊婦への投与に制限がないことも臨床応用への実現可能性が高いと判断した。そこで、本研究の目的は、分子状水素を母体に投与し、子宮内炎症の制御および児の後遺症を減少させるかについて検討し、その作用機序を解明すること、および、得られた知見をもとに新たな早産の治療法の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体を用いた病態解明

平滑筋収縮作用を有し、最近では、炎症性早産の治療ターゲットとしても報告が散見されている endothelin (ET)-1 および ET-1 産生系に属する endothelin converting enzyme-1 (ECE-1)に着目した。

組織学的絨毛膜羊膜炎と診断された早産症例(CAM群)と産科的合併症を伴わない早産症例(非CAM群)の2群で、胎盤におけるECE-1/ET-1の発現を免疫組織化学染色法で比較検討した。

ヒト羊膜細胞の初代培養においてLPS(リポ多糖、大腸菌、serotype O55:B5)お

よびToll like receptor4阻害剤投与によるECE-1/ET-1の発現変化をWestern blot法およびELISA法で検討した。

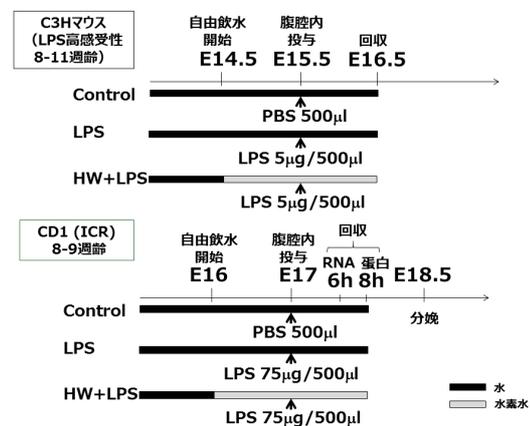
LPS刺激下でのECE-1/ET-1の発現がH<sub>2</sub>投与により影響をうけるかをと同様に検討した。

(2) 動物モデルによる飽和水素水の効果の検討

H<sub>2</sub>投与にあたり、飲用水および培養液中のH<sub>2</sub>濃度は0.2mM以上の濃度を維持するように調整した。

妊娠マウス(C3H/HeJ, CD-1)に、妊娠15日または17日目にLPSを腹腔内投与(炎症群)し、腹腔内投与6-24時間後に回収した胎仔脳組織を用いて、qRT-PCR法および免疫組織化学染色法により、各種炎症性サイトカイン発現、アポトーシス細胞数、DNA酸化ストレス障害の程度、ミクログリア数について評価し、対照群(LPSと同量のPBSを腹腔内投与)と比較検討した。

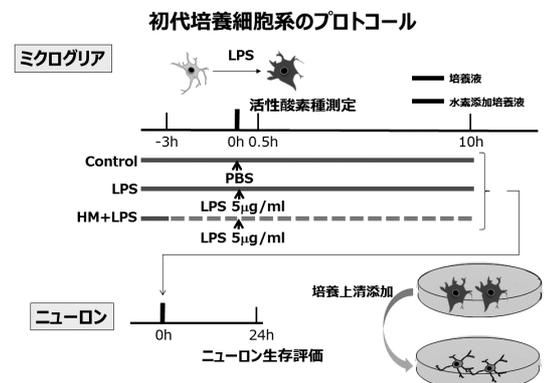
H<sub>2</sub>投与群(LPS腹腔内投与および投与24時間前からH<sub>2</sub>投与開始し分娩まで投与)において、と同様の評価を行い、比較検討した。



胎仔脳組織において、H<sub>2</sub>投与による抗酸化系の活性化の指標であるNrf(NF-E2-related factor)-2/HO(ヘムオキシゲナーゼ)-1発現への影響をELISA法で検討した。

(3) 培養ミクログリアを用いた分子学的機構の解明

マウス初代培養ミクログリアを用いて、



ミクログリアのニューロン障害活性に対する H<sub>2</sub> の影響を検討した。

機序に関与する分子についてマイクロアレイ法で網羅的検索を行った。

#### 4. 研究成果

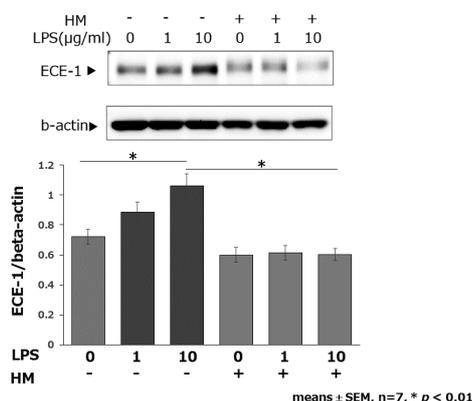
##### (1) 臨床検体を用いた病態解明

CAM 群においては、非 CAM 群に比し、羊膜における ECE-1/ET-1 の有意な発現増加、絨毛膜における発現増加傾向を認めた。

ヒト羊膜細胞において、LPS 刺激による ECE-1/ET-1 発現亢進を認め、これは TLR-4 阻害剤により抑制され、TLR-4 を介して ECE-1/ET-1 発現亢進することが示された。

H<sub>2</sub> 投与は、LPS 刺激による ECE-1/ET-1 発現亢進を抑制した。

培養ヒト羊膜細胞におけるLPSによるECE-1/ET-1の発現亢進と水素による抑制



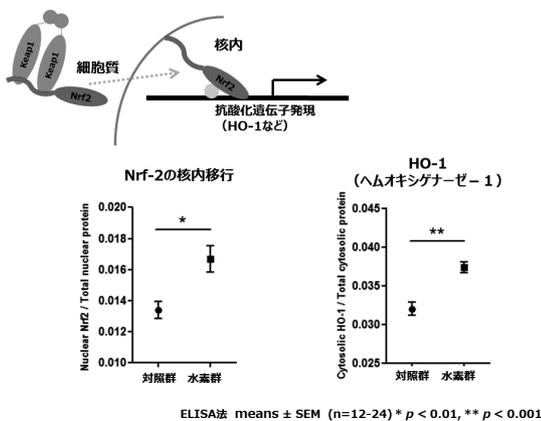
##### (2) 動物モデルによる飽和水素水の効果の検討

C3H/HeJ マウスモデルにおいて、LPS 群では胎仔の肉眼所見で頭部還流の低下を認めた。また、脳組織の TUNEL 法において、control 群と比較して LPS 群では TUNEL 陽性細胞数の著明な増加 (p < 0.01) を認めた。8-OHdG 発現は、control 群と比較して LPS 群で亢進していた。また、CD1 マウスモデルにおいて、LPS 群では、control 群と比較して、胎仔血 IL-6 値が有意に亢進しており (3.986 ± 1.080 vs. 0.168 ± 0.07 ng/ml; p < 0.01) 4, これは FIRS の定義である臍帯血中 IL-6 高値 (> 11 pg/ml) という所見に一致していた 12。また、脳組織における TNF-α, IL-1β, IL-6 の mRNA 産生は有意に亢進していた (p < 0.05, p < 0.01, p < 0.001)。また、8-OHdG および 4HNE の発現も有意に亢進していた (いずれも p < 0.001)。以上より、子宮内炎症曝露モデルの仔脳組織において、前炎症性サイトカイン産生亢進、酸化ストレス傷害亢進およびそれに伴うアポトーシス細胞の増加を認められた。

C3H/HeJ マウスモデルにおいて、LPS 群で認められた胎仔の肉眼所見で頭部還流の低下は、HW+LPS 群において改善を認めた。また、脳組織における TUNEL 陽性細胞数は control 群と同程度にまで減少していた (p < 0.01)。また、CD1 マウスモデルにおいて、LPS

群では胎仔死亡率が 62.7% (79/126) に対し、HW+LPS 群においては、31.5% (35/111) と著明な低下を認めた。HW+LPS 群においては、LPS 群と比較して、脳組織における TNF-α, IL-1β, IL-6 の mRNA 産生は有意に低下しており (各々, p < 0.05, p < 0.01, p < 0.005)、8-OHdG 陽性細胞数 (mm<sup>2</sup> あたり) および 4HNE 染色スコアも有意に低下していた (各々, p < 0.001, p < 0.005)。LPS 群では control 群と比較して、Iba1 (ミクログリアのマーカー) 陽性細胞数 (mm<sup>2</sup> あたり) が、約 3 倍の有意な増加 (p < 0.01) を示したのに対し、HW+LPS 群では control 群とほぼ同程度にまで低下を認めた (p < 0.01)。また、活性型ミクログリアの所見である膨大化したミクログリア数も同様の変化を認め、H<sub>2</sub> が活性化ミクログリア数の過剰な増加を抑制する可能性が示唆された。

他の研究チームから、H<sub>2</sub> の作用として抗酸化系 Nrf2 の活性化が報告されている。転写因子 Nrf2 (NF-E2 関連因子 2) は、細胞質蛋白質 Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) と結合することで抑制されているが、活性化すると核内へ移行し、antioxidant responsive element (ARE) に結合しヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) などの抗酸化を担う物質の転写が活性化される。脳組織において、H<sub>2</sub> 投与により、Nrf-2 の核内発現量の有意な増加、HO-1 蛋白の発現亢



進が認められた (p < 0.01)。

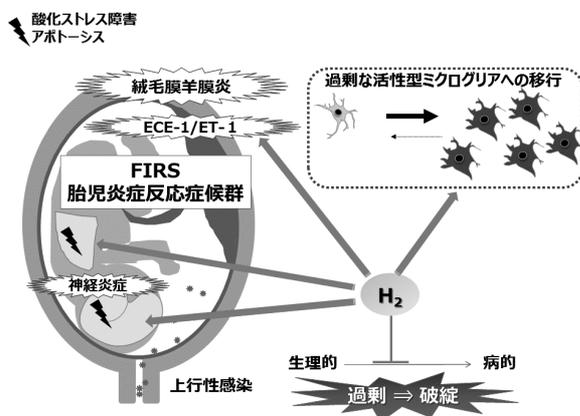
##### (3) 培養ミクログリアを用いた分子学的機序の解明

HM 添加単独でも、活性酸素種の産生低下傾向を認めたが、HM 添加なしと比較して、有意差はなかった。LPS, TNF-α, IL-1β, IL-6 の添加により、培養ミクログリアの細胞内活性酸素種産生は約 2 倍程度亢進を認め (各々, p < 0.05, p < 0.01, p < 0.05, p < 0.05) HM 添加によりほぼ control と同程度まで抑制された (各々, p < 0.01, p < 0.05, p < 0.05, p < 0.05)。さらに細胞外活性酸素種産生に関しても、LPS 投与により約 6 倍程度に亢進を認めたが、これは HM 添加群では有意な減少を認めた (p < 0.01)。これらミクログリ

アのニューロン傷害作用について検討したところ、HM 添加単独で変化は認められなかったものの、LPS 刺激したミクログリアの培養上清添加により約 2 割程度にまで生存ニューロン数が減少したものの、HM + LPS 刺激のミクログリアの培養上清添加では、生存ニューロン数は約 8 割程度にまで回復していた ( $p < 0.05$ )。

網羅的解析により、 $H_2$  が発現抑制作用を示す遺伝子が同定され、Cacna1C (L 型カルシウムチャンネルのサブユニット)、Lepr (レプチン受容体)、ギャップ結合蛋白である Gja5 および Gja8、増殖因子およびその受容体の Fgf1、Fgfr2 のいった遺伝子発現が HM + LPS 刺激ミクログリアでは著明に抑制されていることが明らかとなった。

本研究において、絨毛膜羊膜炎で発現亢進を認めた ECE-1/ET-1 に対し、 $H_2$  投与は母児境界面において抑制的に作用する可能性が示唆された。また、母体への  $H_2$  投与は炎症や炎症に起因する酸化ストレスによる児の神経障害を軽減する効果があることが示された。その機序としては、抗酸化ストレス・抗炎症作用に加え、抗酸化系の誘導が関与していると



考えられた。また、今回初めて、 $H_2$  がミクログリアの活性化に関わる遺伝子発現に対し抑制作用を有することが明らかとなった。したがって、破綻した血液脳関門を通過した LPS、炎症性サイトカインなどがミクログリアを活性化させ神経細胞への障害が惹起される過程において、上記の遺伝子発現への抑制作用を介してミクログリア活性化を抑制し、神経保護効果を示す機序が存在する可能性も示唆された。以上より、炎症性早産が予測される妊婦への  $H_2$  投与は、児の神経学的予後改善につながることを期待される。

#### < 引用文献 >

1. Moore T, Hennessy EM, Myles J, et al. Neurological and developmental outcome in extremely preterm children born in England in 1995 and 2006: the EPICure studies. *BMJ*.

Dec 04 2012;345:e7961.

2. Mano Y, Kotani T, Ito M, et al. Maternal molecular hydrogen administration ameliorates rat fetal hippocampal damage caused by in utero ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med*. Apr 2014;69:324-330.

#### 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6件)

Ushida T, Kotani T, Tsuda H et al. Molecular hydrogen ameliorates several characteristics of preeclampsia in the Reduced Uterine Perfusion Pressure (RUPP) rat model. 査読有、*Free Radic Biol Med*. 2016;101:524-533.

DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.491

Imai K, Kotani T, Tsuda H et al. Neuroprotective potential of molecular hydrogen against perinatal brain injury via suppression of activated microglia. 査読有、*Free Radic Biol Med*. 2016;91:154-63.

DOI:10.1016/j.freeradbiomed.

<http://ir.nul.nagoya-u.ac.jp/jspui/handle/2237/24436>

小谷友美 【周産期とバイオマーカー-病態と最新の治療を知ろう】【産科】治療 分子状水素. 査読無、*周産期医学* 2016 ; 46 : 1349-1353.

小谷友美 【難治性の周産期 common disease への挑戦】 反復後期流・早産の治療 絨毛膜羊膜炎に対する薬物療法の有効性と限界について. 査読無、*臨床婦人科産科* 2016;70:36-41.

Nakano T, Kotani T, Mano Y et al. Maternal molecular hydrogen administration on lipopolysaccharide-induced mouse fetal brain injury. 査読有、*J Clin Biochem Nutr*. 2015;57(3):178-82.

DOI:10.3164/jcfn.15-90.

Hattori Y, Kotani T, Tsuda H et al. Maternal molecular hydrogen treatment attenuates lipopolysaccharide-induced rat fetal lung injury. 査読有、*Free Radic Res*. 2015;49(8):1026-37.

DOI:10.3109/10715762.2015.1038257.

[学会発表](計3件)

シンポジウム 小谷友美 早産児の後遺症発症の減少を目指して～分子状水素による炎症制御の観点から～ 第 33 回周産期学シンポジウム 2015.1.24. アクトシティ浜松（静岡県浜松市）

Tomomi Kotani et al. The enzymes regulating endothelin-1 in chorioamnionitis. IFPA2014 2014.9.9-12. Paris (France)

Tomomi Kotani et al. The new insights of preterm labor with chorioamnionitis (CAM). The 61st Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation (SGI). 2014.3.26-29. Florence (Italy)

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical\\_J/laboratory/clinical-med/growth-aging/obstetrics-gynecology/](https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/laboratory/clinical-med/growth-aging/obstetrics-gynecology/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小谷 友美 (KOTANI, Tomomi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：7 0 3 5 9 7 5 1