

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10982

研究課題名(和文)水素吸入療法を軸とした新たな頭部外傷の治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of novel therapy with hydrogen gas inhalation for traumatic brain injury

研究代表者

藤田 基 (FUJITA, Motoki)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50380001

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)：本研究では、重症頭部外傷後に脳梁部のオリゴデンドロサイトにおいてアポトーシスが生じることを明らかにし、有害な活性酸素種を抑制する水素吸入療法により脳梁部での軸索損傷とオリゴデンドロサイトのアポトーシスが抑制されることを明らかにした。また、頭部外傷において損傷を悪化させる要因となるHMGB1の抑制を目的としたグリチルリチン投与療法と水素吸入療法を組み合わせた結果、脳梁部での軸索損傷とオリゴデンドロサイトのアポトーシスがさらに抑制されることを明らかにした。水素吸入療法とHMGB1抑制療法の併用は重症頭部外傷の新たな治療法となりうることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we revealed that oligodendrocytic apoptosis occurred in corpus callosum after severe traumatic brain injury, and that hydrogen gas inhalation therapy which could scavenge toxic free radicals suppressed axonal injury in corpus callosum and oligodendrocytic apoptosis. Further, hydrogen gas inhalation therapy combined with glycyrrhizin administration which could suppress HMGB1 revealed more suppression of axonal injury and oligodendrocytic apoptosis. The combination therapy including hydrogen gas inhalation and HMGB1 suppression might be novel therapy for severe traumatic brain injury.

研究分野：救急医学

キーワード：頭部外傷 水素ガス 軸索損傷 オリゴデンドロサイト HMGB1

1. 研究開始当初の背景

重症頭部外傷の病態において活性酸素種であるスーパーオキシドアニオンラジカル(O₂^{·-})は酸化ストレスをきたし、組織傷害のイニシエーターとして重要である。しかしながら、頭部外傷の臨床現場で安全かつ効果的に使用できる活性酸素種消去剤はいまだ存在しない。

水素は強力な活性酸素種であるヒドロキシラジカルの選択的消去剤であり、近年多くの疾患で抗炎症作用・抗アポトーシス作用を持つことが報告されており、頭部外傷でもその効果が期待されている。

2. 研究の目的

ラット頭部外傷モデルにおいて頭部外傷急性期に水素ガス吸入療法を導入し、その効果を酸化ストレス抑制効果及び脳保護効果を解析することにより明らかにする。また、水素ガス吸入療法とその他の治療法の併用効果を検討することにより、重症頭部外傷の新たな治療法の確立を行う。

3. 研究の方法

(1) ラット頭部外傷モデルにおける水素吸入療法の脳保護効果の解析

Sprague-Dawley (SD) ラット(BW: 300-400 g)を用いて、lateral fluid percussion injury (LFPI) モデルで頭部外傷 (TBI) を作成した。

ラットを対照群(n=5)、水素吸入群(n=5)、水素輸液群(n=5)に分けた。ラットを麻酔下に気管挿管・人工呼吸管理とし、2.0atmの強度でLFPIを作成した。

水素吸入群は、LFPI作成30分後から2時間後まで90分間2%水素ガスの吸入を行った。

水素輸液投与群は、水素含有生理食塩水(1.3 ppm)をLFPI作成10分前に1mL静注し、LFPI作成15分後、30分後、45分後、60分後に0.5mLずつ静注し、合計3mLの投与を行った。

LFPI作成2時間後に抜管し、人工呼吸管理を離脱した。LFPI作成24時間後に血清を採取後、脳組織を灌流固定した。

血清中の High Mobility Group Box1 (HMGB1)、酸化ストレスマーカーであるマロン酸アルデヒド(MDA)、血管内皮傷害のマーカーである soluble intracellular adhesion molecule 1 (sIACM1)の測定をELISAキットを用いて行った。

脳組織は切片作成後、 β -amyroid precursor protein (APP、軸索損傷のマーカー)を用いて免疫染色を行い、軸索損傷の評価を行った。

(2) ラット頭部外傷モデルにおける水素吸入療法を軸とした頭部外傷の新規治療法の確立

ラットLFPIモデルを用いて、HMGB1抑制効果を持つグリチルリチン (GL) の投与と水素

吸入療法の併用療法の効果について検討した。

ラットを Sham 群、対照群、GL 投与群、水素吸入 (H2) 群、GL 投与と水素吸入の併用 (GL + H2) 群の5群に分けた。

ラットを麻酔下に気管挿管・人工呼吸管理とし、2.0atmの強度でLFPIを作成した。

GL群およびGL + H2群では、LFPI作成10分後に4mg/kgのGLを静注し、その他の群では生理食塩水1.0 mL/kgを投与した。

H2群およびGL + H2群では、LFPI作成直後から2.0%H2ガスの吸入を2時間行った。

60分間の低体温後、90分かけて復温した。

LFPI作成24時間後に血清、脳脊髄液(CSF)を採取後、脳組織を灌流固定した。

脳組織は切片作成後、APPの免疫染色を行い、軸索損傷の評価を行った。また、cleaved caspase-3 (アポトーシスのマーカー) および CC-1 (オリゴデンドロサイトのマーカー) を用いて免疫染色を行い、オリゴデンドロサイトのアポトーシスの評価を行った。

CSF中のHMGB1濃度と血清MDAの測定を行った。

4. 研究成果

(1) ラット頭部外傷モデルにおける水素吸入療法の脳保護効果について

図1にLFPIラットの血清中のHMGB1濃度を示す。

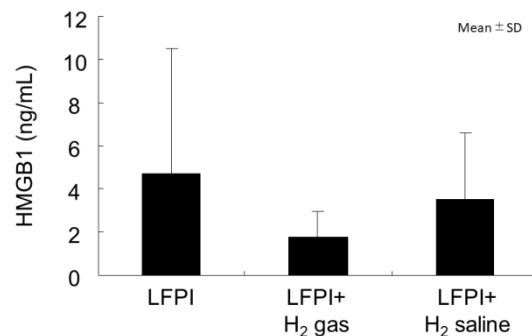


図1：ラットLFPIモデルにおける血清HMGB1濃度

水素吸入群のHMGB1濃度は、対照群に比べ、低い傾向にあったが、水素輸液投与群のHMGB1濃度は対照群と比べ差を認めなかった。

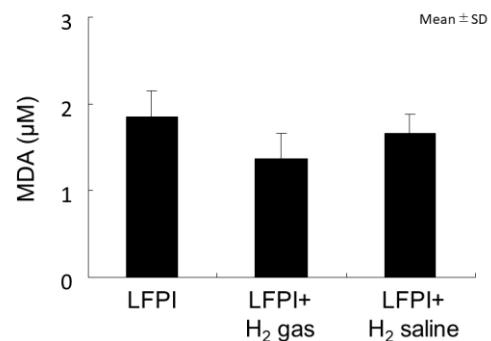


図2：ラットLFPIモデルにおける血清MDA濃度

図2に血清MDA値を示す。水素吸入群では対照群と比べ抑制傾向を認めたが、水素輸液投与群では抑制効果を認めなかった。

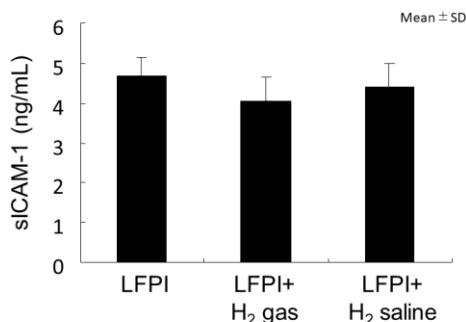


図3：ラットLFPIモデルにおける血清sICAM-1濃度

図3に血清sICAM-1濃度を示す。水素吸入群では対照群と比べ抑制傾向を認めたが、水素輸液投与群では抑制効果を認めなかった。

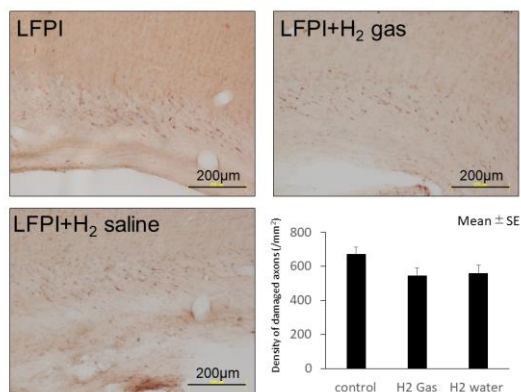


図4：ラットLFPIモデルの脳梁部における軸索損傷の評価

脳梁部におけるAPPスポット（軸索損傷を反映）の数は、水素吸入群および水素輸液投与群で対照群と比べ抑制されていた（図4）。

以上の結果より、ラット LFPI モデルにおいて水素ガス吸入および水素輸液投与は、酸化ストレス、神経炎症、血管内皮傷害を抑制し、軸索損傷を抑制した。脳保護効果としては、水素輸液投与よりも、水素ガス吸入の方がより効果を認めた。

(2)ラット頭部外傷モデルにおける水素吸入療法を軸とした頭部外傷の新規治療法の確立

図5にCSF中のHMGB1濃度を示す。対照群のHMGB1はSham群に比べて高い傾向にあった。GL群、H2群、GL+H2群では、対照群に比べHMGB1濃度は抑制されていた。GL群、H2群、GL+H2群の3群間では、明らかな差は認めなかった。

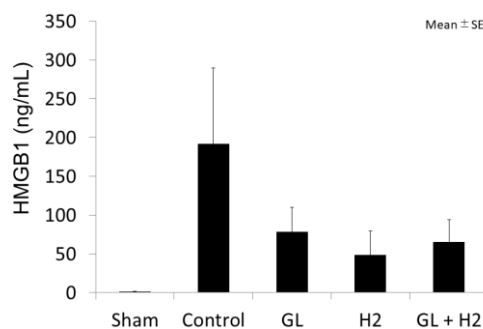


図5：ラットLFPIモデルの脳脊髄液中のHMGB1濃度

図6に血清MDA濃度を示す。対照群のMDAはSham群に比べて高い傾向にあった。GL群のMDAは対照群と変わらなかったが、H2群、GL+H2群では、対照群よりも低い傾向にあった。GL+H2群の方がH2群よりも低い傾向にあった。

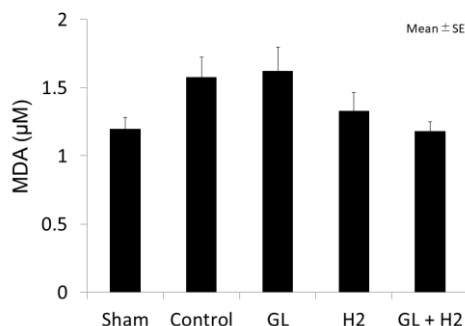


図6：ラットLFPIモデルにおける血清MDA濃度

図7に脳梁におけるAPP染色の結果を示す。

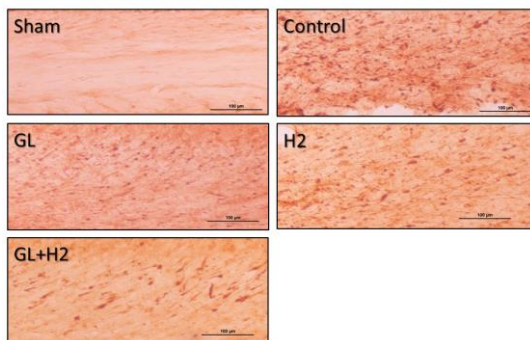


図7：ラットLFPIモデルの脳梁部におけるAPP染色（APPスポットは軸索損傷を示す）

図8、9に損傷部直下および傍脳室部の脳梁のAPP陽性面積を示す。

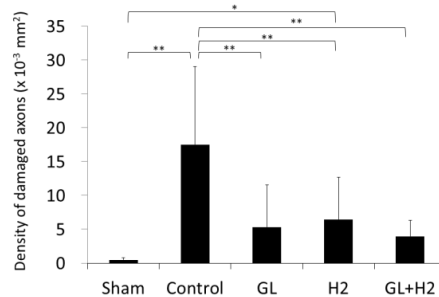


図8：ラットLFPIモデルの脳梁部(損傷直下部)における軸索損傷の評価
Mean ± SD, **P < 0.01, *P < 0.05

損傷部直下において、対照群は Sham 群に比べ、APP 陽性面積は有意に大きかった。GL 群、H2 群では対照群に比べ、APP 陽性面積は有意に抑制されていた。GL+H2 群では、GL 群、H2 群よりもさらに抑制されていた (図 8)。

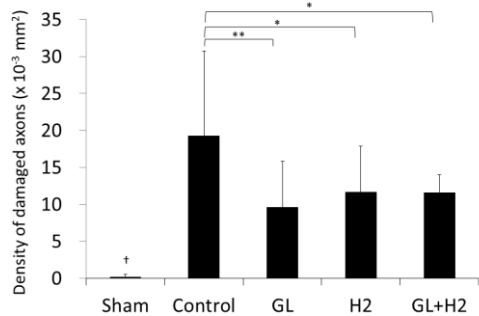


図9: ラットLFPIモデルの脳梁部(傍脳室部)における軸索損傷の評価 Mean ± SD, **P < 0.01, *P < 0.05, †P < 0.01 他の4群とそれぞれ

傍脳室部においても、対照群は Sham 群に比べ、APP 陽性面積は有意に大きかった。GL 群、H2 群、GL+H2 群では対照群に比べ、APP 陽性面積は有意に抑制されていたが、GL+H2 群での相乗効果は認めなかった(図 9)。

図 10 に脳梁部における cleaved caspase-3 及び CC-1 の共染色像を示す。

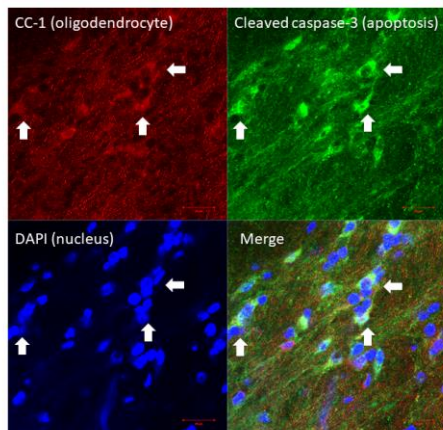


図10: LFPI24時間後の脳梁部でのオリゴデンドロサイトへのCleaved caspase-3の発現

Cleaved caspase-3 陽性細胞は、CC-1 陽性細胞と一致しており、脳梁部における cleaved caspase-3 はオリゴデンドロサイトに発現していることが明らかになった。

図 11 に脳梁部における Cleaved caspase-3 染色の結果を示す。

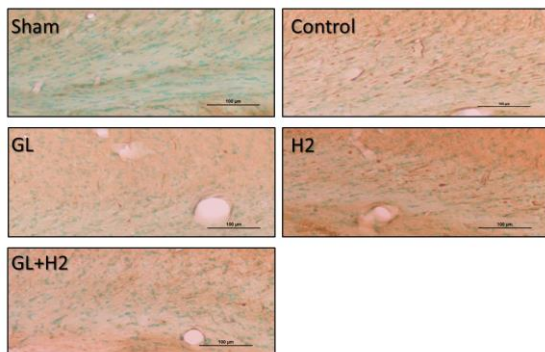


図11: ラットLFPIモデルの脳梁部におけるCleaved Caspase-3染色

図 12、13 に損傷部直下および傍脳室部の脳梁の Caspase-3 陽性細胞数を示す。

損傷部直下および傍脳室部ともに、対照群は Sham 群に比べ、Caspase-3 陽性細胞数は有意に多かった。GL 群、H2 群では対照群に比べ、Caspase-3 陽性細胞数は有意に抑制されていた。GL+H2 群では、GL 群、H2 群よりもさらに抑制されていた。

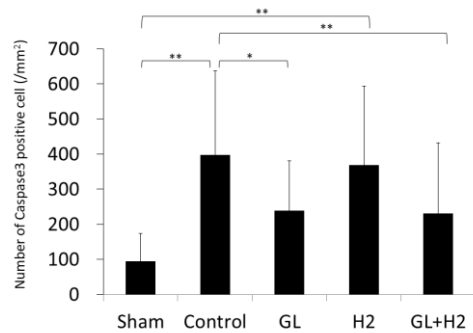


図12: ラットLFPIモデルの脳梁部(損傷直下部)におけるアポトーシスの評価 Mean ± SD, **P < 0.01, *P < 0.05

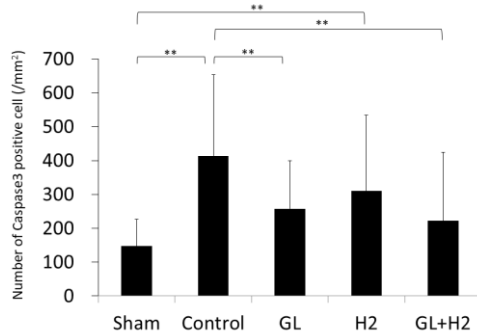


図13: ラットLFPIモデルの脳梁部(傍脳室部)におけるアポトーシスの評価 Mean ± SD, **P < 0.01, *P < 0.05

以上の結果から、グリチルリチンの投与および水素ガス吸入は、脳梁部の軸索損傷を抑制するだけでなく、オリゴデンドロサイトのアポトーシスも抑制することが明らかになった。また、グリチルリチンの投与および水素ガス吸入の併用療法は、各々の単独療法よりも強い脳保護効果を示しており、重症頭部外傷の新たな治療となりうることを示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 基 (FUJITA, Motoki)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50380001

(2) 研究分担者

小田 泰崇 (ODA, Yasutaka)
山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：40397998

宮内 崇 (MIYAUCHI, Takashi)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40380000

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし