

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16765

研究課題名(和文) ヒト生体内分子状水素濃度が妊娠に与える影響に関する研究

研究課題名(英文) Research on the effect of molecular hydrogen in pregnant women

研究代表者

今井 健史 (IMAI, Kenji)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：20778295

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)：母体の生体内分子状水素濃度と免疫細胞の関わり、そして早産発症との関係を初めて明らかにした。具体的には、生体内分子状水素濃度が低い妊婦の集団が存在し、これらの妊婦は早産の高リスク群に分けられること、および、生体内分子状水素濃度測定が早産発症の予測マーカーとして有用である可能性を示した。さらに、免疫寛容において負の要因であるTh17とTh17産生炎症性サイトカインIL-26が、水素分子によって抑制される可能性があることも分かった。母体の水素濃度を測定することは、その簡便さから早産管理向上の一助となり得ると考える。さらに、分子状水素分子を外的な補給は早産予防に有効である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正期産に比べて、早産で出生した児は脳性麻痺や慢性肺疾患をはじめとする重篤な後遺症を発症するリスクが高い。日本においても全妊娠の約5-6%が早産にあり、早産の予防や発症予測は社会的要請度の高い課題である。本研究において、我々は生体内分子状水素濃度が早産発症に関わる因子であること、分子状水素が高いことは生体における免疫細胞のバランスを適切に保つ役割を担っていること、延いては、妊娠維持に有益となり得る可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We first demonstrated the relationship of maternal hydrogen levels to immune cells and clinical PTB. Our findings suggested that there is a population of pregnant women with low hydrogen levels, and these women are divided into a high-risk group for PTB. In addition, we have shown that Th17, which is a negative factor for maternal immune tolerance, and Th17-producing inflammatory cytokine IL-26 could be suppressed by molecular hydrogen. Due to the ease and simplicity, measuring maternal hydrogen levels could be a potential clinical tool in the management of PTB. Moreover, supplementation of molecular hydrogen may be beneficial in the prevention of PTB.

研究分野：産婦人科

キーワード：早産 分子状水素 Treg Th17

1. 研究開始当初の背景

早産は胎児期の炎症や感染を主因とし発症することが多く、脳性麻痺や慢性肺疾患などの重篤な後遺症をもたらす、児の長期予後に大きな影響を与える世界的な問題である。日本においても全妊娠の約 5-6%が早産にあり、早産の予防や発症予測、切迫早産治療は社会的要請度の高い課題である。現在、早産の予測は、過去の妊娠分娩既往歴、細菌性膣症の有無などからハイリスク群を抽出し、妊婦健診において内診・経膣超音波検査を用いて早期発見に努めることが推奨されているが、その予測精度は必ずしも十分とは言えない。また、早産を減少させる確立された治療法もない。一方で、近年になり腸内細菌叢の変化が糖尿病や炎症性腸疾患などの疾病発症と大きく関連することを示唆する報告が増えている。早産患者においても、腸内細菌の多様性が減少すること[1]や、腸内細菌叢が“乱れること”が報告されている[2]。具体的には、クロストリジウム属やバクテロイデス属が減少することが指摘されているが、これらの細菌は大腸内で分子状水素産生を担う菌でもあることは大変興味深い[3]。

我々は、兼ねてより早産や胎児脳障害に関する病態および炎症性サイトカインの関わりなどを研究してきた[4, 5]。これら知見をもとに、近年では分子状水素が抗酸化作用や抗炎症作用を有すること、すでに厚生労働省から食品添加物として認定を受けていること、および分子量が小さいため拡散により胎盤や脳血液関門を容易に通過できる特性を持つことに注目し、母児の予後改善を図る新規管理法開発としての経母体的分子状水素投与の有用性について研究している[6, 7]。分子状水素の経母体的投与が出生仔の長期的予後改善に寄与すること、具体的にはマウス行動実験にて自閉症様の行動異常の発症を軽減する効果を有することを報告した[8]。また、分子状水素投与が母体炎症に起因する胎児肺障害においても軽減効果を有し[9]、LPS 投与早産マウスモデルにおいて妊娠期間延長効果を有する可能性を示してきた[10]。

そして、胎児は母体にとって半異物であり、正常な妊娠維持、胎児発達のためには適切な免疫寛容が必須となり、獲得免疫である免疫細胞Tヘルパー17 (Th17) および制御性T細胞 (Treg) のバランスが重要と報告されている[11, 12]。さまざまな疾病発症に関わるとされる腸内細菌叢はこれらTh17/Tregの分化にも大きな影響を与えることがわかっており[13]、同時に腸内細菌叢は生体内における唯一の分子状水素供給源でもある[14]。つまり、Th17/Treg、腸内細菌叢、分子状水素は互いに密接な関係にある。

これら背景にあり、本研究ではヒト妊婦において生理的に産生される分子状水素と早産の関係を免疫学的観点、特にTh17/Tregの観点、から検討し作用機序の解明を目的とした。そして、得られた知見をもとに新規の早産、切迫早産の予防・管理法開発を目指す。

2. 研究の目的

本研究の目的は、前述のとおり分子状水素に関する基礎研究から得られた知見をヒトにて確認、応用すべく、ヒト妊婦において生理的に産生される分子状水素量と早産の関係を調べ、免疫学的観点からこれを検討・解析し、作用機序を解明することで、新規の早産予防・管理法としてのヒト妊婦への分子状水素投与を実践に移すための基盤となる知見を得ることである。

3. 研究の方法

所属研究機関にて生命倫理審査委員会の承認、患者説明同意および動物実験計画承認を得て、具体的には以下を実施した。

(1)前向き観察研究として、妊娠 26～33 週の単胎ヒト妊婦 100 名から絶食下に呼気を収集。ガスクロマトグラフィーで呼気中水素ガス濃度を測定し(図 1)、妊婦における生体内分子状水素濃度の日内/妊娠週数による変動、早産との関連、および、早産予測マーカーとしての可能性について単/多変量解析、ROC 曲線等を用いて検討した。

(2)生体内分子状水素濃度の測定同日にヒト母体血を回収、マルチプレックスアッセイにより40種のサイトカイン/ケモカイン濃度を解析し、各種濃度と分子状水素量との相関関係を検討した。

(3)マルチプレックスアッセイにて分子状水素濃度と有意な相関を示した IL-26、TNFS13、sIL-6Ra、IL-35に着目。これらサイトカインが獲得免疫であるTh17、および、Th17と相互に排他的な関係にあるTregに関連するサイトカインであることから、ヒト健常人の末梢血から末梢血単核

図1：生体内における分子状水素の動態

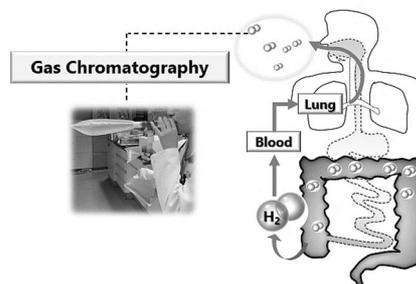
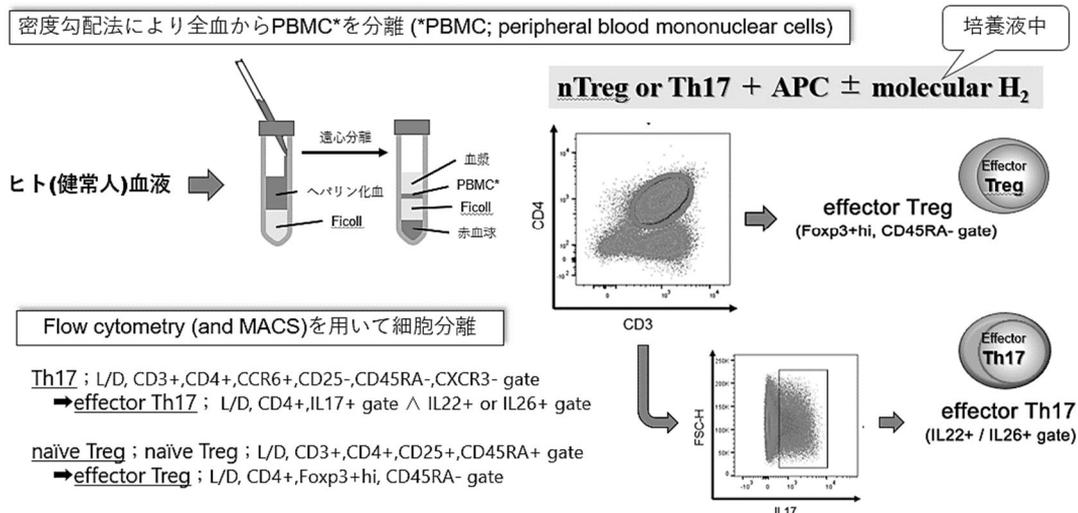


図2：ヒトPBMCを用いたFlow cytometry実験



細胞 (PBMC) を回収し、以下実験を実施した；

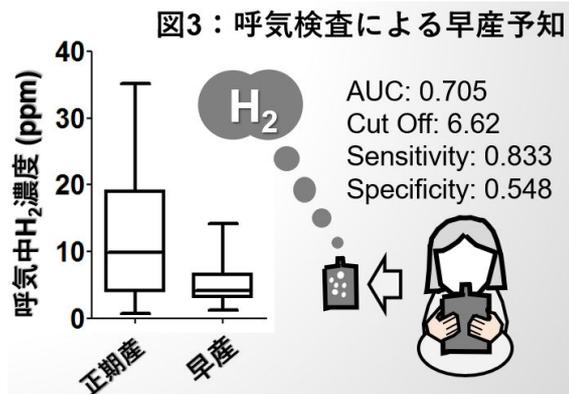
- ナイーブ CD4 を分離し、in vitro で Th17 および Treg への分化誘導
- Th17、Treg、抗原提示細胞 (antigen presenting cell; APC) を分離、共培養し Th17、Treg をエフェクター化

培養液中の分子状水素の有無が a)、b) に与える影響をフローサイトメトリーで検討した(図2)。

(4)上記マルチプレックスアッセイの結果を受けて母体血中IL-26に注目。保存資料から妊娠26～30週ヒト母体血清；35週未満の早産11例、正常産44例を用いてIL-26濃度をELISAで測定。早産との関連を検討した。さらに、予定帝王切開のヒト妊婦から羊膜・絨毛脱着膜を回収して組織培養。リコンビナントIL-26添加の有無によるTNF-、IL-6、PTGS2、mPGES1、MMP1/2/9、CCL2/3発現変化をqRT-PCRで検討、また卵膜からのPGE2産生をELISAで測定・検討した。

4. 研究成果

(1)生体内における分子状水素濃度は日内変動が大きいこと、および、早朝空腹時に最も高くなることが分かった。そのため、以降の測定は早朝空腹時の濃度を持って検討することとした。また、今回の測定対象期間である妊娠26週から33週において、同一妊婦における分子状水素濃度に有意な変動がないことを確認した。前向き観察研究として生体内水素濃度を測定した100名の内、人工早産や転院により分娩転帰が追えなかった9症例を除外し、91名(うち早産が18名、正常産が73名)で検討した結果、正常産に比して早産妊婦における分子状水素濃度が有意に低いことが分かった。生体内水素濃度が高値の妊婦において分娩転帰が早産となった者はいなかった。さらに、多変量解析によって生体内水素濃度が早産発症に関連する独立した因子であった。上記結果を受けてROC解析を実施。AUC 0.705にあり、Cut-off 6.62ppmに設定した際の感度が0.833、特異度が0.548となった。生体内水素濃度測定が早産予測マーカーとして有用、特に早産スクリーニング検査として有用であることが示唆された(図3)。



(2)マルチプレックスアッセイ解析にて40種のサイトカイン濃度と生体内水素濃度との相関関係を検討。その結果、IL-26、TNFS13、sIL-6Ra、IL-35の4つのサイトカインが有意な相関を有していた。

(3)上述べたとおり、既報告および今回の実験解析結果を受けて、生体内の分子状水素がTh17およびTregに対して直接的な影響を有する可能性があるかと仮説、検証した。

- ナイーブ CD4 から Th17 への分化誘導実験では、分子状水素添加に伴い分化が抑制される傾向は認められたものの有意差は見出せなかった。
- Th17 エフェクター化の指標として IL-26 および IL-22 陽性細胞数を検討。分子状水素添加に伴い、IL26、IL-22 とともに陽性細胞数が有意に減少。分子状水素が Th17 細胞のエフェクター化に対して直接的な抑制効果を有することが示された。一方で、分子状水素添加に伴い Treg エフ

エフェクター化が促進される傾向を認めたが、有意差は見出せなかった。

総じて、分子状水素が Treg に対して有意な影響を当てることなく、Th17 エフェクター化を直接的に抑制し得ること、つまり Th17/Treg バランスを相対的に Treg 側に傾けることが判明した。

これら結果から、生体内分子状水素濃度は早産発症の独立した寄与因子であること、分子状水素は Th17 エフェクター化を抑制する作用を有しており、Th17/Treg バランスを調整、免疫寛容状態を適切に保つことで妊娠維持に有益となり得る可能性が示唆された。

【文献】

- [1] L.H. Wardwell, C. Huttenhower, W.S. Garrett, Current concepts of the intestinal microbiota and the pathogenesis of infection, *Current infectious disease reports* 13(1) (2011) 28-34.
- [2] A. Shiozaki, S. Yoneda, N. Yoneda, R. Yonezawa, T. Matsubayashi, G. Seo, S. Saito, Intestinal Microbiota is Different in Women with Preterm Birth: Results from Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis, *Plos One* 9(11) (2014).
- [3] F. Carbonero, A.C. Benefiel, H.R. Gaskins, Contributions of the microbial hydrogen economy to colonic homeostasis, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 9(9) (2012) 504-518.
- [4] Y. Niwa, K. Imai, T. Kotani, R. Miki, T. Nakano, T. Ushida, Y. Moriyama, F. Kikkawa, Relationship between cytokine profiles of cord blood and cord S100B levels in preterm infants, *Early Human Development* 129 (2019) 65-70.
- [5] K. Imai, T. Kotani, H. Tsuda, T. Kobayashi, T. Ushida, Y. Moriyama, F. Kikkawa, Determination of the cytokine levels in fetal pleural effusion and their association with fetal/neonatal findings, *Cytokine* 127 (2020).
- [6] K. Imai, T. Kotani, H. Tsuda, Y. Mano, T. Nakano, T. Ushida, H. Li, R. Miki, S. Sumigama, A. Iwase, A. Hirakawa, K. Ohno, S. Toyokuni, H. Takeuchi, T. Mizuno, A. Suzumura, F. Kikkawa, Neuroprotective potential of molecular hydrogen against perinatal brain injury via suppression of activated microglia, *Free Radical Biology and Medicine* 91 (2016) 154-163.
- [7] T. Ushida, T. Kotani, H. Tsuda, K. Imai, T. Nakano, S. Hirako, Y. Ito, H. Li, Y. Mano, J. Wang, R. Miki, E. Yamamoto, A. Iwase, Y.K. Bando, M. Hirayama, K. Ohno, S. Toyokuni, F. Kikkawa, Molecular hydrogen ameliorates several characteristics of preeclampsia in the Reduced Uterine Perfusion Pressure (RUPP) rat model, *Free Radical Biology and Medicine* 101 (2016) 524-533.
- [8] K. Imai, T. Kotani, H. Tsuda, T. Nakano, T. Ushida, A. Iwase, T. Nagai, S. Toyokuni, A. Suzumura, F. Kikkawa, Administration of molecular hydrogen during pregnancy improves behavioral abnormalities of offspring in a maternal immune activation model, *Scientific Reports* 8 (2018).
- [9] Y. Hattori, T. Kotani, H. Tsuda, Y. Mano, L. Tu, H. Li, S. Hirako, T. Ushida, K. Imai, T. Nakano, Y. Sato, R. Miki, S. Sumigama, A. Iwase, S. Toyokuni, F. Kikkawa, Maternal molecular hydrogen treatment attenuates lipopolysaccharide-induced rat fetal lung injury, *Free Radical Research* 49(8) (2015) 1026-1037.
- [10] T. Nakano, T. Kotani, K. Imai, Y. Iitani, T. Ushida, H. Tsuda, H. Li, A. Iwase, S. Toyokuni, F. Kikkawa, Effect of molecular hydrogen on uterine inflammation during preterm labour, *Biomedical Reports* 8(5) (2018) 454-460.
- [11] A.S. Figueiredo, A. Schumacher, The T helper type 17/regulatory T cell paradigm in pregnancy, *Immunology* 148(1) (2016) 13-21.
- [12] M. Salvany-Celades, A. van der Zwan, M. Benner, V. Setrajic-Dragos, H.A.B. Gomes, V. Iyer, E.R. Norwitz, J.L. Strominger, T. Tilburgs, Three Types of Functional Regulatory T Cells Control T Cell Responses at the Human Maternal-Fetal Interface, *Cell Reports* 27(9) (2019) 2537-+.
- [13] D.P. Zheng, T. Liwinski, E. Elinav, Interaction between microbiota and immunity in health and disease, *Cell Research* 30(6) (2020) 492-506.
- [14] M.D. Levitt, PRODUCTION AND EXCRETION OF HYDROGEN GAS IN MAN, *New England Journal of Medicine* 281(3) (1969) 122-&.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 青木智英子、今井健史、大脇太郎、牛田貴文、小林知子、小谷友美
2. 発表標題 ヒトにおける生理的分子状水素産生の減少が早産に与える影響
3. 学会等名 第44回日本女性・栄養代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kenji Imai, Tomomi Kotani, Hiroyuki Tsuda, Tomoko Kobayashi, Takafumi Ushida, Yoshinori Moriyama, Fumitaka Kikkawa
2. 発表標題 comprehensive profile of cytokines in fetal pleural effusion and its association with fetal/neonatal findings
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究成果は2021年度の第73回日本産科婦人科学会学術講演会にてシンポジストとして発表予定である。また、研究成果の一部を英語論文にて提出し査読の最中にある。
--

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