

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06960

研究課題名(和文)水素ガスによる虚血脳エネルギー代謝代償機転の分子機構の解明

研究課題名(英文)Effects of molecular hydrogen on ischemic brain injury

研究代表者

梶村 眞弓(Kajimura, Mayumi)

慶應義塾大学・医学部(日吉)・教授

研究者番号：10327497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：水素ガス(H₂)吸入は脳虚血時に神経保護作用を発揮することが知られているが、その機序は未解明である。本研究はH₂によるエネルギー代謝の代償機転の機序を解明することを目的とした。H₂で特異的に作動する受容体を洗い出すため、脳梗塞モデルマウス実験系を用いメタボローム解析を行った。虚血によって亢進するプリン体の分解が、H₂投与により抑制された。またクエン酸回路のメンバーであるコハク酸の集積が減少することが判明した。これらの結果は、H₂が虚血再灌流後のsuperoxide generationを抑制する可能性を示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞は可能な限り早期の治療開始が原則であるが、治療法は少なく、治療の開始が間に合わず神経症状が増悪することが多々ある。そのために入院期間やリハビリ加療が長期化することになり、今後の高齢化社会に伴って医療経済を圧迫する可能性が大きい。水素吸入療法は、従来型のtPAによる血栓溶解療法に比べ、経済的にも技術的にも有利である。水素は分子量2とすべての分子の中で最小であり、拡散によって虚血巣へも容易に到達できることから、drug deliveryの観点において、tPA静注など血流依存性薬剤の追従を許さない。救急車内での治療の早期化が実現でき、予後の改善に直結するものと期待する。

研究成果の概要(英文)：Although immediate inhalation of a low concentration of molecular hydrogen (H₂) is known to improve neurologic outcomes after cerebral ischemia in the mouse, etiology remains unknown. To decipher the mechanisms whereby H₂ regulates metabolic dynamics in the ischemic brain, we used a metabolomics to target metabolic pathways responding to H₂. Eight-week-old mice underwent the occlusion of the right common carotid artery for 30 min followed by exposure to 1.3% H₂ mixed with the normal air for further 60 min after reperfusion. The brain metabolic states were rapidly fixed using in-situ freezing. The profiling of 107 metabolites showed that H₂ improves energy metabolism. The treatment attenuated the purine breakdown which could lead to reduction of superoxide generation and to ameliorate an ischemic reperfusion injury.

研究分野：代謝生化学

キーワード：分子状水素 脳虚血 エネルギー代謝 Neurovascular unit 質量分析イメージング

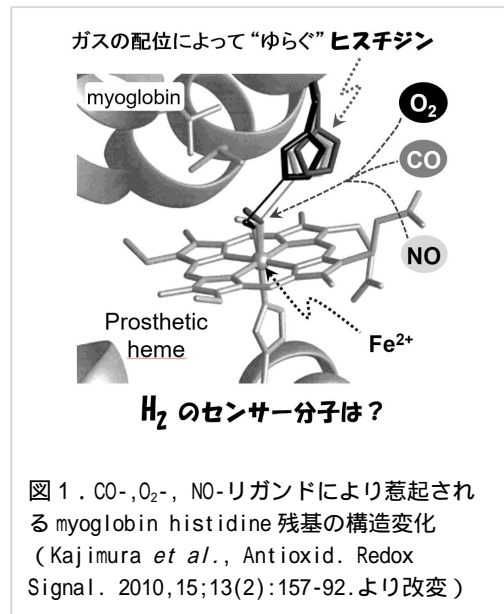
様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19, CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞（患者数：120万人）は、救命できたとしても重篤な後遺症のため予後は極めて不良である。2007年にOhsawaら（Nat Med. 13(6):688-94）により、水素ガスの吸入によって脳梗塞後の神経機能障害が著明に改善されることマウスにおいて示された。また、水素の抗酸化・抗炎症効果など多面的効果が注目を集めてきた。一方で、水素ガスの受容体・情報伝達機構と生理作用との因果関係の分子機序は手付かずの状態であり、臨床応用を展開するにあたり大きな障壁となっていた。

2. 研究の目的

本研究は、脳虚血病態における水素ガスの標的分子・受容機構を探究し、分子状水素（H₂）によるエネルギー代謝の代償機転の機序を解明することを目的とする。ガス分子は、高分子の構造内に比較的容易に浸透し、リドックス感受性ナノトランスデューサーである金属原子（*e.g.*, Fe²⁺, Fe³⁺）への配位結合や、官能基への特異的な結合を介して標的分子の機能を修飾し、生物活性を發揮する（**図1**）。ガス分子の作用は、可逆的・即効的である。また、多元的な標的をもつことを特徴とする。それ故に、複数のガス分子とその受容体が時間的・空間的に複雑な相互作用を形成する生体内において、ガス分子の生成・受容及び情報伝達機構と生理作用との因果関係は十分に立証されていない。

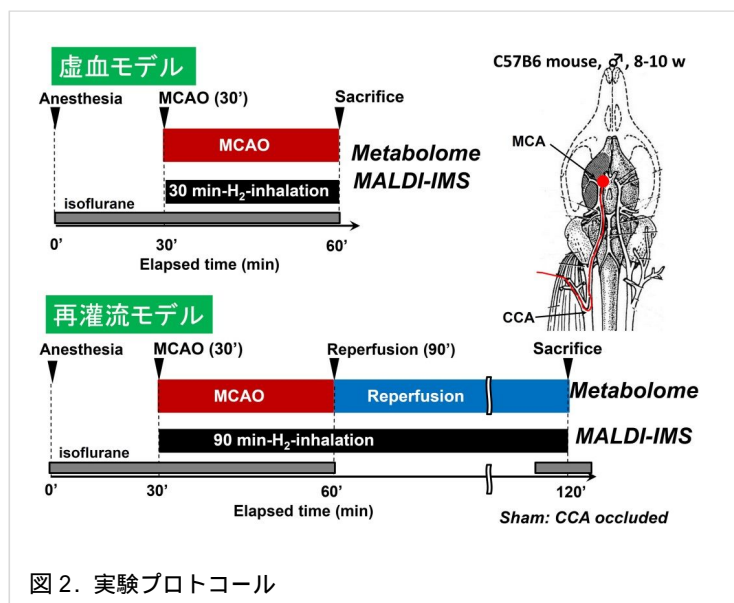


ガス分子群は元来原始地球の大気組成を構成し、微生物の生体構成成分の生合成基質に利用される一方で情報伝達分子として利用されてきた。わずか数原子で構成される極小分子でありながら、その微細な違いを識別し特異的な警報信号に増幅させる「しくみ」が存在すると考えられる（**図1**）。本研究では、分子状水素（H₂）が代謝とリンクして脳の恒常性を維持する機序を、生化学的に解明する。「なぜ水素ガスが脳虚血病態を改善するのか」という根本的疑問の解明を目指した。

3. 研究の方法

マウス中大脳動脈閉塞モデル

マウス右中大脳動脈閉塞モデル(MCAO)を作製し、水素ガス吸入の効果を検討した。虚血開始後すぐに1.3% 水素/空気混合ガスを吸入させた。虚血30分で再灌流し、その後60分間継続して1.3% 水素混合ガスを投与した後、normal air の環境に戻した（**図2**）。以後2週間にわたって、次ページの**図3**に示す機能評価を行った。



メタボローム解析

水素ガスによる脳保護作用の鍵分子を洗い出すため、Hattoriらが開発したin-situ freezing 法 (Antioxid Redox Signal. 2010, 13(8):1157-67) により代謝物の分解を最小限に抑えた状態で脳組織を採取した。キャピラリー電気泳動質量分析法を用い、107種類の水溶性代謝物を測定し、虚血の度合いに呼応して惹起される代謝リモデリングを、水素投与群と対照群で比較した。時間軸は、MCAO後30分、再灌流後60分とした(図2)。複数の代謝物の組織内分布及び量的・質的な変化を解析し、水素ガスがどの酵素の活性を修飾するののかを探った。

4. 研究成果

図3に示すように、虚血直後に1.3% H_2 を吸入させるとエネルギー代謝(ATP)は改善され、梗塞巣の縮小が認められた。また水素投与により、neurological scoreが正常化した。さらに、左片感覚性失調の正常化も認められた。当該マウスは、左片麻痺のため左片感覚性運動失調を呈するが、corner testによる右回転の割合が、水素投与により顕著に減少した。Hanging wire testやrotarodによる運動機能テストの結果も良好であり、水素の作用機序を検討するモデル系として適切であると判断した。

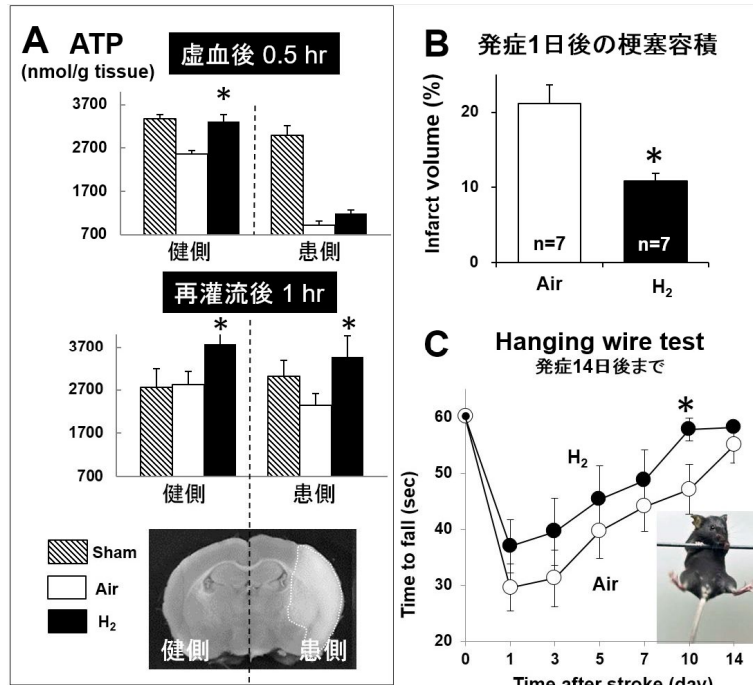


図3. 水素吸入は脳梗塞の予後の改善 虚血直後の H_2 吸入(1.3%)は、エネルギー代謝を維持し、梗塞巣を縮小させる(未発表データ)

メタボローム解析においては、時間軸を、MCAO後30分、再灌流後60分の2点に限定し、虚血の度合いに呼応して領域特異的に惹起される代謝リモデリングを水素投与群と対照群で比較した。水素ガスが顕著な効果を示したのは以下の代謝系である；(1)虚血時に亢進するプリン体分解の抑制、(2)虚血時に亢進するコハク酸(クエン酸回路)集積の減少、さらには、(3)虚血時に亢進するアセチルコリンを減少である。これらの結果は虚血時のredox managementなど代償機転の分子機構の糸口となることが期待される。

H_2 は分子量2と、全ての分子の中で最小である。虚血巣に水素電極を埋め込み水素を吸入させ、脳局所での水素濃度を測定したところ、単純拡散によって虚血巣へと容易に到達することが示唆された(図4)。

“Time is brain”の言葉が示す通り、脳梗塞は早期の治療開始が原則であるが、未だに治療は少なく、治療の開始が間に合わないこと(血栓溶解療法は、発症後4.5時間以降

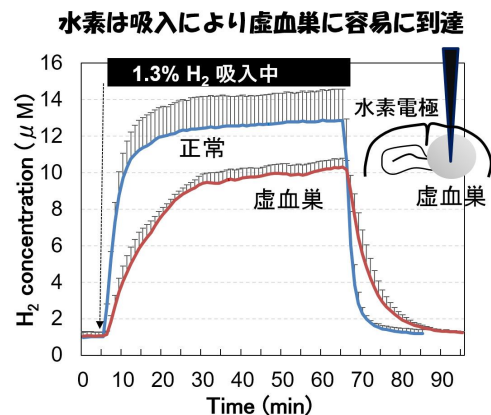


図4. マウス脳局所のリアルタイム水素濃度測定(未発表データ)

は適応外)、治療を開始しても神経症状が増悪することが多々ある。そのために入院期間やリハビリ加療が長期化し、高齢化社会に伴って医療経済を圧迫する可能性が高い。水素吸入療法は、従来型のtPAによる血栓溶解療法に比べ、経済的にも技術的にも有利である。この特徴は、虚血巣へのdrug deliveryの観点において、tPA静注など血流依存性薬剤の追隨を許さない。

代謝変動を包括的に解析することは、「特定の構造を有する低分子がどのような生体高分子のこういった構造を認識して機能を制御するか？」を検証することであり、そのような機能ドメインを見出す研究は、新しい創薬研究の標的を広げる。また脳循環障害や神経疾患の病態において、時空間依存的に起こる代謝変動の包括的情報の収集は、治療のターゲットを絞りこむための布石となりえ、臨床医学研究への波及効果が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Tamura T, Sano M, Matsuoka T, Yoshizawa J, Yamamoto R, Katsumata Y, Endo J, Homma K, Kajimura M, Suzuki M, Kobayashi E, Sasaki J	4. 巻 54
2. 論文標題 Hydrogen Gas Inhalation Attenuates Endothelial Glycocalyx Damage and Stabilizes Hemodynamics in a Rat Hemorrhagic Shock Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Shock	6. 最初と最後の頁 377-385
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/SHK.0000000000001459	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 -

1. 著者名 梶村 真弓	4. 巻 54
2. 論文標題 一酸化炭素と脳微小循環代謝	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 月刊 細胞	6. 最初と最後の頁 20-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

慶應義塾大学 自然科学研究教育センター http://www.sci.keio.ac.jp/en/people/detail.php?eid=00181&katagaki=3&bunya2_color=6&status=1
--

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
研究分担者	菱木 貴子 (Hishiki Takako) (10338022)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師 (32612)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	久保 亜紀子 (Kubo Akiko) (50455573)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教 (32612)	

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