

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18325

研究課題名（和文）肺毛細血管内皮細胞障害に対する水素ガスの有効性の検討

研究課題名（英文）Investigation of the efficacy of hydrogen gas on pulmonary capillary endothelial cell injury

研究代表者

山田 太平（Yamada, Taihei）

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00465684

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）：侵襲下の急性呼吸窮迫症候群（以下ARDS）は、両側肺水腫、低酸素症を特徴とする致死率の高い急性病態である。ARDSでは様々な炎症性メディエーターが病態形成に関与するが、中でも活性酸素種（ROS）は肺毛細血管の拡張と血管透過性の亢進で直接的な役割を演じる。本研究では、ヒト肺毛細血管内皮細胞エンドトキシン血症モデルにおいて、血管透過性の亢進を水素含有培地は2時間程度の暴露で抑制できることを明らかにした。その機序は酸化ストレスの抑制にあると考えられた。我々の研究成果は水素投与による血管透過性の改善で、急性期病態の革新的な管理・治療の一助となる可能性を秘めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性呼吸窮迫症候群（acute respiratory distress syndrome; ARDS）は、肺毛細血管の透過性亢進に基づき肺水腫、低酸素症となる重篤な病態である。ARDSでは炎症性メディエーターが病態形成に関与するが、中でも活性酸素種（ROS）は肺水腫形成に直接的な役割を演じる。本研究では、LPSで炎症を惹起した肺毛細血管内皮細胞における血管透過性の亢進を水素含有培地は2時間程度の暴露で抑制できることが明らかにした。その機序は酸化ストレスの抑制にあると考えられた。我々の研究成果は水素投与による血管透過性の改善で、急性期病態の革新的な管理・治療の一助となる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：Invasive acute respiratory distress syndrome (ARDS) is a highly lethal acute condition characterised by bilateral pulmonary oedema and hypoxia. Various inflammatory mediators are involved in the pathogenesis of ARDS, among which reactive oxygen species (ROS) play a direct role in the expansion of pulmonary capillaries and increased vascular permeability. The present study demonstrated that hydrogen-containing media can inhibit increased vascular permeability in a model of human pulmonary capillary endotoxaemia after only 2 h of exposure. The mechanism was postulated to be the inhibition of oxidative stress. Our results indicate that hydrogen administration improves vascular permeability, which may facilitate the development of innovative management and treatment strategies for acute conditions.

研究分野：救急集中治療医学

キーワード：肺毛細血管内皮細胞障害 水素ガス 酸化ストレスシグナル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

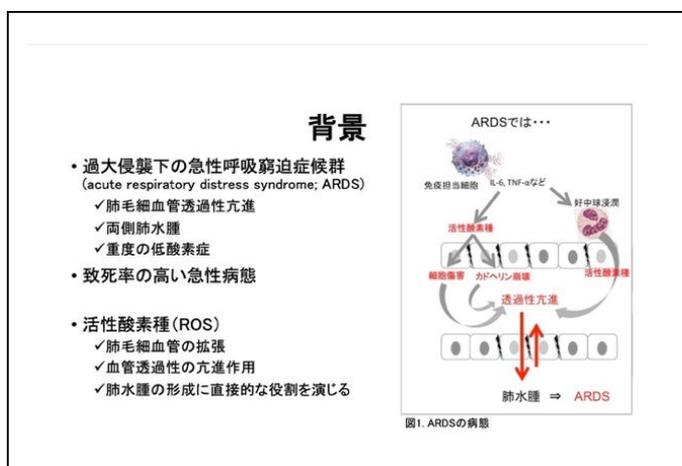
急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome; ARDS) は、肺毛細血管の透過性亢進に基づき両側肺水腫、ひいては重度の低酸素症となる重篤な病態である。ARDS では、活性化した好中球などの免疫担当細胞や血管内皮細胞から様々な炎症性メディエーターが分泌されるが、中でも活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) は、肺毛細血管内皮細胞傷害により血管透過性亢進を惹起し、組織への好中球遊走と活性化、さらに組織障害因子の分泌を誘導することにより、さらなる血管透過性を亢進させる悪循環に陥らせる。肺毛細血管内皮細胞傷害による血管透過性亢進は、VE-カドヘリンや α -カテニンにより規定される接着結合や ZO-1 や occludin により規定される密着結合といった、血管内皮細胞間接着因子の破綻により生じることが知られている。このように、ARDS において惹起される肺血管透過性亢進、その結果生じる肺胞内浸出液貯留や肺水腫には、活性酸素種や血管内皮細胞間接着因子の果たす役割が大きいと考えられている。我々は、水素ガスの出血性ショック・輸液蘇生に起因する急性肺障害に対する肺保護

効果 (Surgery. 2015) や、高濃度酸素誘発肺傷害軽減作用 (Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2013) 等、水素ガスが ROS の制御に重要な役割を果たすことを発信してきた。近年、水素ガスは、心筋梗塞や脳血管障害発症軽減効果をもつことが証明されており、その機序は抗酸化作用による酸化ストレス抑制にある。さらに我々は、エンドトキシン (lipopolysaccharide; LPS) 添加培

養肺毛細血管内皮細胞モデルを用いて、抗酸化作用を有する n-3 系多価不飽和脂肪酸の VE-カドヘリン保護作用および血管透過性亢進抑制作用を報告した (Int J Respir Pulm Med. 2014)。しかし即効性を要する救急医療の現場において、投与経路が腸管に限定される n-3 系多価不飽和脂肪酸の使用は、実用性に乏しすぎる現状にある。今回の我々の研究は、「より強力な抗酸化作用を有しつつ簡便に使用でき即効性のある水素ガスにより、肺毛細血管透過性が抑制される」との仮説を、*in vitro* の側面から証明しようというものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、培養肺毛細血管内皮細胞に LPS を添加して敗血症性 ARDS を *in vitro* で模倣し、侵襲時の肺毛細血管内皮細胞における水素の効果を判定することで、致死性臓器不全である ARDS に対する新たな治療戦略を見出すことにある。この仮説を証明するために、正常ヒト肺微小血管内皮細胞 (Normal Human Lung Microvascular Endothelial Cells; HMVEC-L) における活性酸素種を経時的に分析し、水素含有培地を用いて酸化ストレスを制御すると同時にその血管透過性抑制の効果を評価する。その時間的変化が確認されれば、その時間帯を狙った治療法などの展開も検討できる可能性がある。血管内皮細胞および活性酸素種は心血管系や中枢神経系など全身に分布していることから、我々の研究は ARDS のみならず、他の炎症性疾患の管理・治療の大きな一助となる可能性を秘めている。



3. 研究の方法

細胞培養

ヒト肺毛細血管内皮細胞(以下、HMVEC-L)を二層培養ディッシュである fibronectin-coated transwell の apical 底に播種し chamber 内に 100 μ L の専用培養液を充填して培養した。同時に basal chamber 内に 600 μ L の培養液を充填し、血管モデルを作成した。Confluent monolayer 形成は倒立顕微鏡による観察と TEER を 24 時間毎に測定しすることで確認し、単層形成したものを各種検討に用いた。

炎症刺激と水素処理

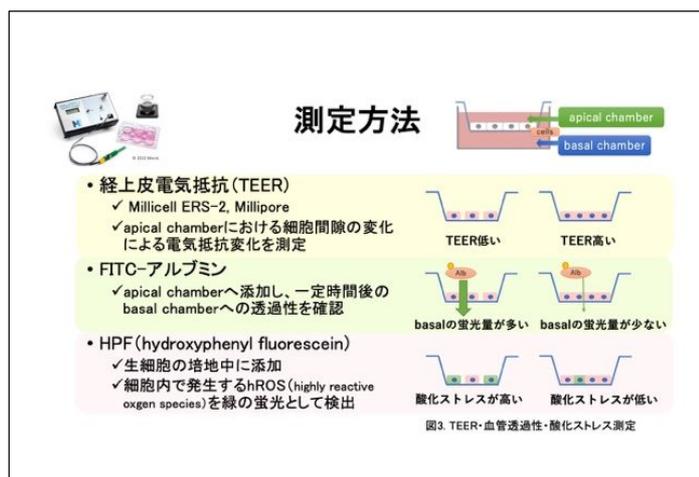
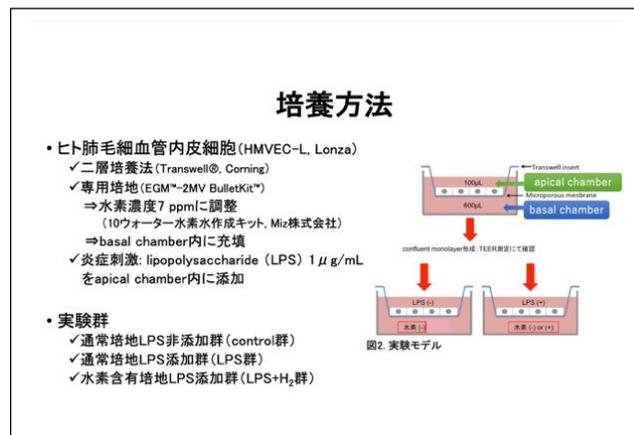
LPS (E.coli) は培地に濃度 1 μ g/mL で混じたものを、apical chamber に投与した。飽和水素培地は Miz 株式会社の「10 ウォーター水素水作成キット」を用い、500 mL の培地に対しキットの手順に沿って水素を含有させた。キット付属の溶存水素濃度判定試薬により 7 ppm を確認し、basal chamber 内に充填した。対照群は水素非含有の通常培地とした。検討群はコントロール; LPS(-)+水素(-)群、LPS 単独; LPS(+)+水素(-)群、水素含有; LPS(+)+水素(+)群とした。

血管透過性の検討

メルクミリポア社の TEER 測定装置 Millicell ERS-2 を用いて、LPS・水素投与から 1 または 2 時間後に、電気抵抗変化を測定することで、apical chamber で単層形成している細胞間隙の変化を推定した。また、実際の物質透過性の変化を確認するため、FITC 標識アルブミンを用いて apical chamber に添加したアルブミンが basal chamber に透過する量を basal chamber 培養液の蛍光強度を測定することで確認した。具体的には、LPS・水素投与から 1 または 2 時間後に、apical chamber 内の培養液を FITC-アルブミン(800 μ g/mL)を混じた培養液に置換し、30 分後に basal chamber から培養液を採取し、励起: 485nm/蛍光: 535nm にて蛍光光度計 (Flex Station 3, Morecular Devices) を用いて測定した。

蛍光染色による酸化ストレスの測定

LPS・水素投与から 2 時間後に apical chamber の培地中に N,N -dimethylformamide (DMF) 0.47 mL に溶解された 5 mmol/L の HPF (hydroxyphenyl fluorescein)溶液を終濃度が 10 μ mol/L になるように添加した。添加 30 分後に蛍光顕微鏡を用い、励起波長 490 nm、測定波長 515 nm で蛍光を測定した。核染色には DAPI を用いた。応じて緑蛍光色を示すた

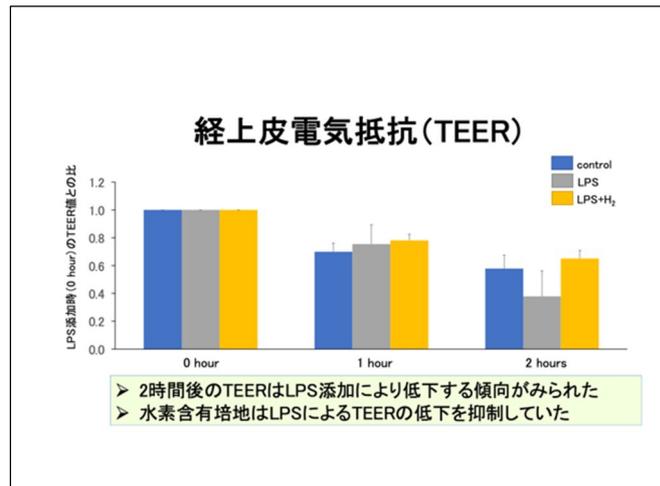


め、得られた画像から緑蛍光色を示す領域を陽性、青蛍光色を示す領域を核の領域とした。

統計解析 正規性を確認し、多群間比較は Tukey-Kramer's post-hoc test を用いた。2 群間比較には student t-test または Welch's t-test を用いた。正規性が認められない場合には Wilcoxon の順位和検定を行った。

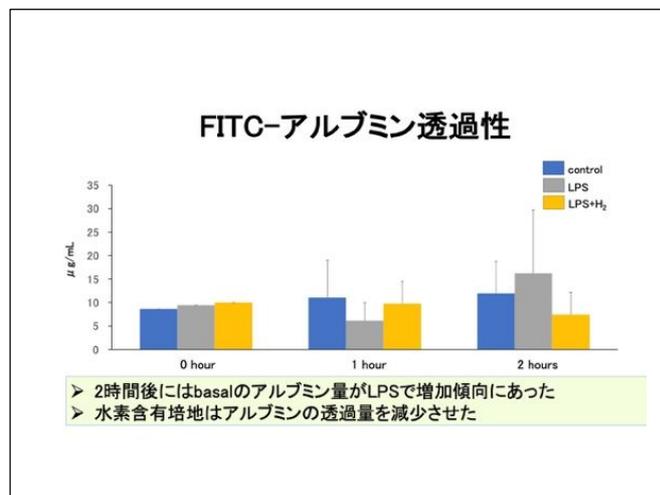
4. 研究成果

培養終了後実験開始直前(0 時間)の TEER は各群で等しく、各群とも同程度の単層培養が実施できていた。LPS・水素添加後 1 時間では各群ともやや TEER の減少が認められた。2 時間後にはコントロール群、水素添加 LPS 群では TEER の減少が 0 時間に比べ緩やかであったのに対し、LPS 単独添加群では TEER の減少が顕著であった。

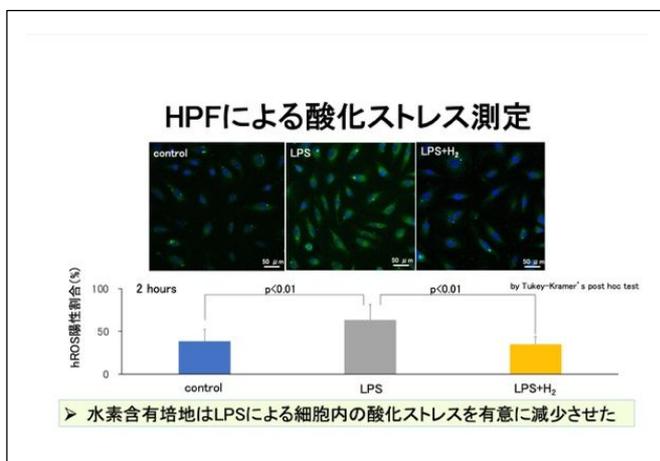


次に、血管透過性を確認したところ、

実験開始前の任意の well (0 時間) に FITC-アルブミンを添加して basal chamber における蛍光量を測定したところ、どの well も概ね同じ透過性を示し、本研究の培養法にて well 間の透過性誤差はあまり大きくないことが示された。LPS・水素を添加して 1 時間後に FITC-アルブミンを添加した well では basal chamber における蛍光量は群間に大きな差は認められなかった。一方で、2 時間後に FITC-アルブミンを添加した群では、LPS 群で basal chamber の蛍光量が増大し、水素添加 LPS 群では basal chamber の蛍光量の減少が顕著であった。



そこで、LPS・水素添加 2 時間後における細胞酸化ストレスを測定したところ、コントロール群に比べて LPS 単独添加群では緑蛍光色の領域が増大し、有意に酸化ストレスが増加していることが確認できた。一方で、水素添加 LPS 群では緑蛍光領域はコントロール群と同程度しか存在せず、LPS により誘導された酸化ストレスが水素添加で有意に減少することが明らかとなった。



本研究により、LPS で炎症を惹起した肺毛細管血管内皮細胞における血管透過性の亢進を水素含有培地は 2 時間程度の暴露で抑制できることが明らかとなった。その機序として、酸化スト

レスの抑制が考えられ、我々の仮説に合致する結果であった。本研究成果は ARDS など急性期病態における血管透過性の改善において、血漿への水素含有など、新しい治療発想を生む礎となるデータが構築できたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 山田太平、渡邊暁洋、瀬谷海月、中弘智華、石川倫子、東英樹、小濱圭祐、満保直美、井上岳人 |
| 2. 発表標題 ヒト肺毛細血管内皮細胞傷害に対する水素含有培地の有効性の検討 |
| 3. 学会等名 第37回日本外傷学会総会・学術集会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|