

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09221

研究課題名(和文)長時間の高濃度酸素吸入が幹細胞の動員と臓器虚血再灌流傷害に与える影響

研究課題名(英文) Effects of prolonged oxygen exposure on stem cell mobilization and cardiac ischemia/reperfusion injury.

研究代表者

稲富 千亜紀 (Inadomi, Chiaki)

長崎大学・病院(医学系)・講師

研究者番号：20508444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：幹細胞/前駆細胞および心臓の虚血再灌流(I/R)傷害に対する高濃度酸素曝露の潜在的な影響を評価するために、我々は健康なマウスを100%酸素に20分間または60分間曝露した。長時間の酸素曝露は、幹細胞/前駆細胞の動員および機能障害を誘発し、おそらく炎症反応を促進して健康なマウスの心臓I/R障害を悪化させる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

周術期管理において、しばしば患者に行われている高濃度酸素吸入は低酸素血症の予防に有効である一方、長時間の高濃度酸素投与が生体に悪影響を及ぼす可能性を完全に否定できない。特に臓器I/R傷害への悪影響は、患者の生命予後に繋がるのが危惧される。本研究は、マウスでの長時間の高濃度酸素投与が、血液中の骨髄由来幹細胞の経時的な動態変化と心臓のI/R傷害に与える影響に関してその機序を明らかにしており、その結果は、麻酔科・外科に加え救急領域などを含めた全身管理に役立つ可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the potential effect of oxygen exposure on circulating stem/progenitor cells and cardiac ischemia/reperfusion (I/R) injury, we exposed healthy mice to 100% oxygen for 20 or 60 min. Prolonged oxygen exposure induced the mobilization and functional impairment of stem/progenitor cells and likely enhanced inflammatory responses to exacerbate cardiac I/R injury in healthy mice.

研究分野：医歯薬学 麻酔蘇生学

キーワード：循環・高血圧 虚血再灌流傷害 高濃度酸素 幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身麻酔下での外科手術などで、臓器虚血によって術後に臓器 I/R 傷害を生じることがあり、これまでさまざまな努力がなされているが、未だ完全には解決されていない。心臓の I/R 傷害を軽減する方策として虚血(低酸素)プレコンディショニング効果が知られており、その機序として末梢血中の骨髄由来幹細胞の動員と虚血再灌流組織への集積の増大が寄与していることが明らかとなった。一方で周術期や蘇生後では長時間の高濃度酸素投与を行う状況が生じるが、逆に高濃度酸素投与により、濃度依存性・時間依存性に様々な臓器が傷害されることも報告されている。現時点においては、長時間の高濃度酸素投与による生体への影響についてのコンセンサスは得られていない。

我々は、短時間の高濃度酸素曝露による生体への影響について、健康なマウスを用いて高濃度酸素を曝露させる実験を行い、5 分間の高濃度酸素曝露では早い時期(1-3 時間後)に末梢血中の骨髄由来幹細胞の軽度な増加が観察されたが、血漿中の心筋保護液性因子には有意な変化がなく、心臓の I/R 傷害への明らかな影響も認められないことを報告した(Yano et al., PLoS One 2018;13:e0192733)。面白いことに、より長い時間(20 分間)の高濃度酸素曝露では、マウス血漿中の血管内皮細胞増殖因子(VEGF)が一過性(曝露終了 3 時間後)に有意に低下することが認められた。このことから、長時間の高濃度酸素曝露は低酸素誘導因子(HIF-1)など Signal Pathway の活性化への影響を介して VEGF の産生を抑制し、生体に影響を与える可能性が推測される。

2. 研究の目的

高濃度酸素の曝露が細胞や生体に与える影響についてはこれまでにあまり詳しく調べられておらず、特に周術期や心肺蘇生後などの長時間の高濃度酸素投与が臓器 I/R 傷害に与える影響については、調べられる範囲で生体レベルでの研究報告が見当たらない。本研究は以下の点を明らかにすることを目的とする。

- (1)長時間(60 分まで)の高濃度酸素曝露後の末梢血中の骨髄由来幹細胞、心筋保護液性因子およびサイトカイン/ケモカインの経時的な動態変化
- (2)長時間の高濃度酸素曝露が心臓 I/R 傷害へ及ぼす影響とその機序

3. 研究の方法

- (1)長時間(60 分まで)の高濃度酸素曝露後の末梢血中の骨髄由来幹細胞、心筋保護液性因子およびサイトカイン/ケモカインの経時的な動態変化

実験動物と酸素曝露、および血液サンプルの採取

11~12 週齢の健康な雄の C57BL/6 マウスを 100%酸素にそれぞれ 20 分間、60 分間曝露させる。高濃度酸素曝露から 3 時間、または 24 時間後に全身麻酔下のマウスの腹部下大静脈より末梢血を採取する。ヘパリン化した血液を遠心分離後、血漿サンプルを採取し-20 で保存する。また、細胞ペレットから密度勾配遠心法を用いて末梢血単核細胞(PBMNC)を単離する。

末梢血中幹細胞数の定量評価、PBMNC の細胞内活性酸素種(ROS)の検出、およびコロニー形成アッセイ

単離した直後の PBMNC を用いて、フローサイトメトリーによる c-kit 陽性幹細胞数の定量測定を行う。また、同様に単離した直後の PBMNC と CM-H₂DCFDA(酸化によって蛍光を発する活性酸素インジケーター)をインキュベートし、フローサイトメトリーで細胞内 ROS レベルを蛍光強度に基づいて測定する。さらに、5×10⁵個の PBMNC を 37、5%CO₂のインキュベーターで 12 日間培養し、各培養ディッシュのコロニー総数をカウントし比較する。

血漿中の心筋保護因子とサイトカイン/ケモカインの測定

ELISA 法により血漿中の VEGF、ストローマ細胞由来因子-1(SDF-1)、インスリン様成長因子 1(IGF-1)の濃度を測定する。また、血漿中のサイトカイン/ケモカインのレベルをメンブタン抗体アレイで検出し評価する。

- (2)長時間の高濃度酸素曝露が心臓 I/R 傷害へ及ぼす影響とその機序

高濃度酸素曝露と心臓 I/R 傷害モデルの作製

11~12 週齢の健康なオスの C57BL/6 マウスに 100%酸素を 60 分間曝露させ、3 時間後に全身麻酔下で気管挿管を行い、室内空気で人工呼吸とする。左開胸施行し前下行枝を 30 分間

結紮後に再灌流を行う。酸素曝露をさせないマウスで同様に心臓 I/R モデルを作製し、コントロール群とする。

心臓 I/R 傷害に及ぼす作用の評価

I/R の 3 日後および 14 日後にマウスを犠牲死させ、心臓の凍結切片を組織学的解析に使用する。

高濃度酸素曝露が心臓 I/R 傷害に及ぼす作用について、マッソントリクローム染色による心筋内線維化組織面積の測定、TUNEL 染色による心筋アポトーシス細胞数の測定、抗 Ly6g 抗体と抗 CD11c 抗体を用いた蛍光免疫染色による炎症細胞数の測定で行い、群間比較検討で評価する。

4. 研究成果

(1) 長時間(60 分まで)の高濃度酸素曝露後の末梢血中の骨髄由来幹細胞、心筋保護液性因子およびサイトカイン/ケモカインの経時的な動態変化

末梢血中の c-kit 陽性幹細胞/前駆細胞数は、20 分間または 60 分間の酸素曝露を行ったマウスでは、コントロール群と比較して、3 時間後、24 時間後ともに c-kit 陽性細胞の割合が有意に増加した。

幹細胞/前駆細胞の機能障害の可能性を評価するために行ったコロニー形成アッセイでは、20 分ではコロニー形成能は損なわれなかったが、60 分間酸素曝露したマウスの PBMC で形成したコロニーの総数が 3 時間後、24 時間後ともに有意に減少し、長時間の酸素曝露が幹細胞/前駆細胞に有害な影響を与える可能性が示唆された。

予想外に、PBMC の細胞内 ROS レベルは、20 分間または 60 分間の酸素曝露の 3 時間後と 24 時間後では有意に変化しなかった。本研究ではマウスの酸素飽和度を測定していないが、長時間の酸素曝露による有害な影響は、主に幹細胞/前駆細胞に対する酸化ストレスの増強と関連していないのではないかと推測される。

血漿中の VEGF 濃度は 20 分または 60 分の酸素曝露により、3 時間後は有意に低下したが、24 時間後は低下していなかった。先行研究 (Yano et al., 2018) の知見と同様に、20 分間または 60 分間の酸素曝露は、血漿 VEGF 濃度の一過性の低下につながった。酸素曝露は HIF-1 シグナル伝達経路の阻害のために高酸素血症を誘発する可能性があるため、HIF-1 の直接標的である VEGF のレベルの一過性の低下は妥当であると考えられる。血漿中の SDF-1 濃度は、20 分間または 60 分間の酸素曝露の 24 時間後でわずかに増加したが、対照群で得られた値と比較して有意差はなかった。SDF-1 は、幹細胞の動員を制御することが広く知られている。我々のデータでは、60 分までの酸素曝露は SDF-1 レベルの変化を引き起こさないことが示された。したがって、酸素曝露がどのようにして幹細胞/前駆細胞の末梢血への急速な動員を誘導するのかは不明である。興味深いことに、心筋保護に重要な因子である血漿中の IGF-1 濃度は、20 分間の酸素曝露では減少しなかったが、60 分間の酸素曝露の 24 時間後で有意に減少していた。

これまでの研究で、酸素毒性は炎症性サイトカインの放出の増加と関連していることが知られており、我々は血漿中の炎症性サイトカイン/ケモカインレベルの変化をスクリーニングすることを試みた。60 分間の酸素曝露から 24 時間後のマウスの血漿中サイトカイン/ケモカインのスクリーニングでは、炎症性サイトカイン/ケモカインの CCL27、CXCL16、CCL11、CXCL6 の濃度がコントロールと比較して 1.5 倍以上増加していることが分かった。血管新生や線維化などの様々な生物学的プロセスに関与することが示されている CXCL6 のレベルは 4 倍以上増加していた。この結果より、長時間酸素曝露後のマウスでは血漿中のサイトカインレベルが上昇し、全体的に炎症反応が高い状態にある可能性が示唆された。

(2) 長時間の高濃度酸素曝露が心臓の I/R 傷害に及ぼす作用とそのメカニズム

I/R から 14 日後のマウスでは、60 分間の酸素曝露群・コントロール群ともに左心室前壁の線維化組織が明らかに示された。線維化組織面積では、60 分間の酸素曝露群がコントロール群と比較して有意に大きかった。

I/R から 3 日後のマウスでは、左心室前壁のアポトーシス細胞は、60 分間の酸素曝露を群とコントロール群の間で有意な差はなかった。しかし、I/R から 3 日後の左心室前壁の Ly6g 陽性好中球と CD11c 陽性単球の数は、60 分間の酸素曝露群で有意に増加した。

以上より、C57BL/6 マウスにおいて長時間の高濃度酸素曝露は、幹細胞/前駆細胞の動員および機能障害を誘発し、心臓の I/R 傷害を悪化させる炎症反応を促進することが示唆された。

これまでの実験結果をまとめ論文を作成し、Journal of Cellular Physiology に投稿し掲載された。

我々は、60 分までの長時間の酸素曝露が、幹細胞/前駆細胞の動員や機能的な障害を引き起こすだけでなく、全身および局所的な炎症反応を促進し、心臓の I/R 障害を悪化させること

を確認した。その分子メカニズムはまだ完全には解明されていないが、本研究で得られたデータは、未熟な幹細胞 / 前駆細胞の機能障害や感作された炎症反応の誘発など、健常人に対する長時間の酸素曝露の有害な影響の可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 0件）

1. 著者名 Li Yu, Luo Na Chuan, Zhang Xu, Hara Tetsuya, Inadomi Chiaki, Li Tao Sheng	4. 巻 236
2. 論文標題 Prolonged oxygen exposure causes the mobilization and functional damage of stem or progenitor cells and exacerbates cardiac ischemia or reperfusion injury in healthy mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 6657 ~ 6665
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcp.30317	査読の有無 有
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〕

-

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	李 桃生 (Li Tao-Sheng) (50379997)	長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授 (17301)	

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