

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16812

研究課題名（和文）早産減少を目指した新規管理法の検討～生体内水素産生能と免疫細胞Th17の関わり～

研究課題名（英文）Exploring Novel Management to Reduce Preterm Birth: The Role of In Molecular Hydrogen Production and Th17

研究代表者

今井 健史（IMAI, Kenji）

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20778295

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：我々は生体内分子状水素（H₂）濃度と早産の関連ならびに経母体的H₂投与の有用性について免疫学的な視点から研究した。マウス実験ならびにヒト妊婦検体（呼気、血清、T細胞、卵膜など）を用いた研究にて；生体内H₂濃度が早産発症の独立した寄与因子であること；H₂は、Tregには作用することなく、CD8やTh1、Th17などのeffector T cellに対する抑制効果があり、妊娠維持に必要な免疫寛容状態の維持に有益であることを実証した。ヒト妊婦において生体内H₂濃度が低い集団が存在し、それら妊婦は早産ハイリスク群であることならびにH₂の補充が早産予防・治療法の一助となる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内H₂濃度の低い妊婦は早産ハイリスクであった。生体内H₂濃度低下と出生児脳障害の関連も既に報告した。母獣や胎仔のH₂濃度の意義を世界に先駆けて報告してきたが、本研究はこれら知見をヒト妊婦で確認した初めての研究であろう。H₂濃度は呼気検査により簡便・低侵襲に測定でき、早産予測マーカーとして臨床応用する実現性は高い。母体の免疫細胞Th17、新規炎症性サイトカインIL-26が早産に関わること、生体内H₂がeffector T細胞の活性化を抑制することを初めて報告した。これら成果は腸管内H₂濃度の低い集団を対象としたH₂の補充・補充が早産減少や後遺症なき児生存の一助となる可能性を期待させる。

研究成果の概要（英文）： We investigated the association between molecular hydrogen (H₂) concentration and preterm birth, as well as the effectiveness of maternal H₂ administration from an immunological perspective. Using both mouse models and samples from pregnant women (breath, serum, T cells, amniotic membrane etc.), we demonstrated that in vivo H₂ concentration is an independent causal factor for preterm birth. H₂ was found to inhibit effector T cells such as CD8, Th1, and Th17, without affecting Tregs, thereby supporting the maintenance of immune tolerance necessary for pregnancy. The study also identified a subgroup of pregnant women with low in vivo H₂ levels who are at high risk for preterm birth and suggested that H₂ supplementation could be a potential preventive and therapeutic approach for preterm birth.

研究分野：産婦人科

キーワード：早産 分子状水素 T細胞 胎児脳障害 IL-26

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌叢は約 40 兆個、数百種類にも及ぶ細菌から成り、複合微生物系を構築するとともに、腸内で宿主であるヒトとの共生関係を築いている。生後、環境中や食事などから徐々に複雑な腸管内の生態系が形成され、生体の免疫システムの構築および誘導がなされる。この腸内細菌叢の乱れ (**Dysbiosis**) は、糖尿病や炎症性腸疾患などさまざまな疾病発症に関連することが分かっている。腸内細菌はヒトの消化酵素では分解できない難消化性成分の利用によって分子状水素ならびに短鎖脂肪酸を合成し、腸管内での感染防御や腸管免疫の制御を行うことが可能とされ、その多寡が疾病発症の大きな要因の一つとされている。

早産病態と **Dysbiosis** の関連は未解明な点が多い。早産は児に対して脳性麻痺や慢性肺疾患などの重篤な後遺症をもたらす、これらは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、早産を減少させることは社会的要請度の極めて高い課題だ。現在、早産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。しかし、その予測精度は必ずしも十分とは言えず、早産を減少させる確立された予防・治療法もないのが現状だ。早産は多因子により引き起こされる。近年、腸内細菌叢の変化と疾病発症の関連を示唆する報告が増えており、早産患者においても腸内細菌叢が変化、特にクロストリジウム属やバクテロイデス属が減少する可能性が指摘されている。我々が実施したヒト妊婦の前向き研究 (科研費 18K16765) では、生体内水素濃度を測定した 91 名 (うち早産が 18 名、正期産が 73 名) の検討結果から、正期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。これにより、生体内水素濃度測定が早産予測マーカーとして有用であり、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。さらに、胎児は母体にとって半異物であり、正常な妊娠維持には適切な免疫寛容が必須である。免疫寛容の一端として、**CD4** 陽性 **T** 細胞のサブタイプである **Th1**、**Th17** および **Treg** の適切なバランスが重要とされています (**Nat Immunol. 2016; Science 2018**)。 **CD8** 陽性 **T** 細胞などの他のエフェクター **T** 細胞も関わると言われている。早産を含めたさまざまな疾病発症に関わるとされる腸内細菌叢は、これらエフェクター **T** 細胞/**Treg** の分化誘導にも大きな影響を与える (**Nat Immunol. 2014**)。そして、腸内細菌叢は生体内における唯一の分子状水素ならびに短鎖脂肪酸の産生源でもある。つまり、エフェクター **T** 細胞/**Treg**、腸内細菌叢、分子状水素、短鎖脂肪酸は互いに密接な関係にある。しかし、生理的に腸管内で産生される分子状水素がヒト妊婦に与える影響は未だ解明されておらず、分子状水素と併行して産生される短鎖脂肪酸の役割についても十分な知見は得られていない。そのため、腸内細菌叢の乱れがもたらす生体内水素濃度低下と短鎖脂肪酸産生低下が早産にどのように関わるかを詳細に検討することが必要と考える。この検討結果を基盤とした新たな早産病態の理解、ならびに早産予防・治療へのアプローチの開発が期待される。特に、腸内細菌叢の改善を通じた生体内水素濃度と短鎖脂肪酸産生の回復が、早産予防に寄与する可能性があるため、これらの研究が進展することで、早産リスクの低減に向けた新規の介入方法が見出されるであろう。

2. 研究の目的

分子状水素に関する基礎研究から得られた知見 (科研費 18K16765) をさらに強固なものとする、ならびに、ヒトにて確認し応用すること。具体的には、マウス実験やヒト妊婦が生理的に産生す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。そして、新規の早産予防・管理法として、ヒト妊婦への分子状水素投与を実践に移すことである。さらには、新規に **Dysbiosis** 早産誘発マウスモデルの作成ならびに作成したマウスモデルを用いた実験ならびにヒト検体を用いた **16sRNA** 解析などのオミクス解析を行い、早産病態における腸内細菌叢、分子状水素、短鎖脂肪酸の相互関係について知見を深め、得られた知見をもとに新たな早産病態の解明と新規の予防・治療法を探索することである。

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。

<分子状水素と早産病態・予防・治療>

(1) 実験動物を用いた解析 (分子状水素投与による早産予防・治療効果の検討)

antiCD3 を妊娠マウス (**C57BL/6**) へ投与した早産誘発モデルマウスを使用。 **antiCD3** 投与群と **antiCD3+H2** 投与群を作成。分子状水素を経口投与 (自由飲水と強制飲水を併用) し、早産予防・治療効果を検討した。

フローサイトメトリーにより、 **antiCD3** 投与早産モデルマウスの子宮から **CD4** 陽性 **T cell**

を単離。遺伝子増幅処理を行った後に **RNA** シークエンス解析を実施した。

- (2) ヒト検体・情報を用いた解析（分子状水素の免疫代謝調整作用の検討）
ヒト妊婦の末梢血から **PBMC**（末梢血単核細胞）回収。Naïve CD4、**Treg**、**Th17** に加えて **Th1**、**CD8** を単離培養。培養液中への分子状水素投与が各細胞の分化誘導・エフェクター化に与える影響を検討した。
免疫代謝に着目。**Agilent Seahorse XF Analyzer** を用いて、ヒト妊婦から回収した **PBMC** 陽性細胞におけるミトコンドリア機能、**oxygen consumption rate (OCR)** ならびに **extracellular acidification rate (ECAR)**、**ATP** 産生量等を測定。培養液中への分子状水素投与の有無による影響を検討した。
ヒト妊婦の分子状水素を濃度測定するとともに、測定同日に妊婦糞便を回収し **16srRNA** 解析を実施。腸内細菌叢と分子状水素濃度の関連を検討した。
- (3) ヒトへの **H₂** 投与の臨床試験
特定臨床研究（ないし介入研究）としてヒト妊婦への分子状水素投与臨床試験を実践に移すべく、本学の先端医療センターと検討を開始したが、倫理委員会の許可が降りず、断念した。

< **Dysbiosis** マウスモデル作成 >

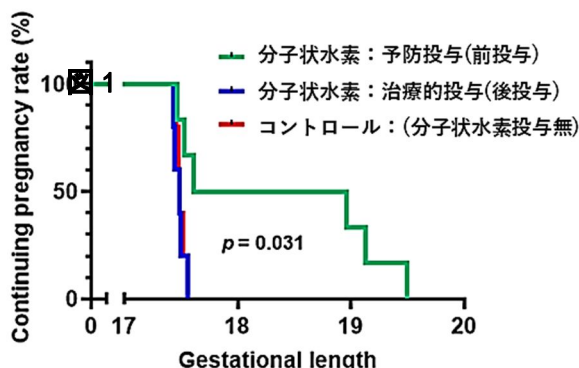
- (1) 分子状水素は腸内細菌叢の代謝産物であり、同時並行で短鎖脂肪酸も産生されることに着目。両者が協調して生体に与える影響を検討することを計画。しかし、これに適したマウスモデルが存在しないため、**Dysbiosis** 早産マウスモデル作成を試みた。

4. 研究成果

< 分子状水素と早産病態・予防・治療 >

- (1) 分子状水素投与による早産予防・治療効果の検討

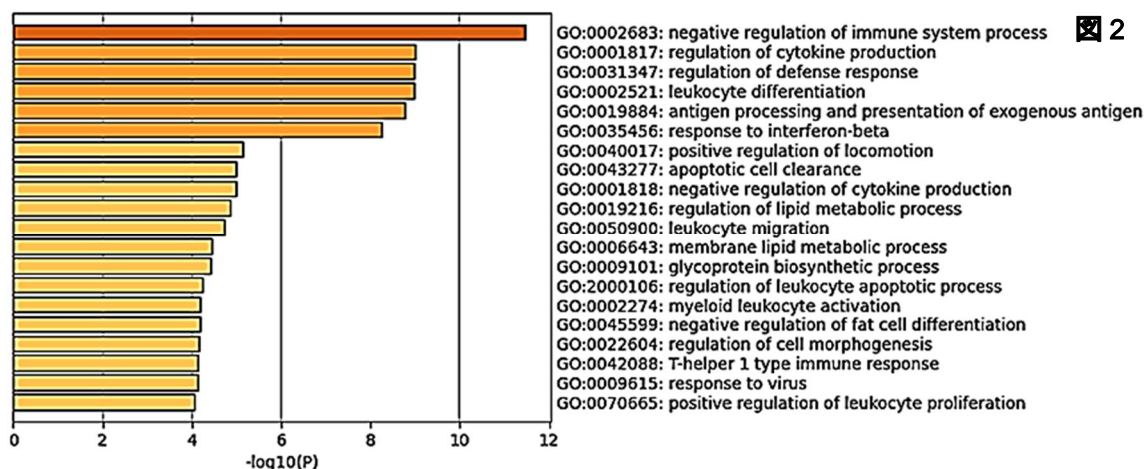
antiCD3 投与群を **Control** 群（疾患群）とし、**antiCD3** 投与の後に分子状水素投与を開始した群を治療的投与群、**antiCD3** 投与の 2 日前から分子状水素を投与させた群を予防投与群と設定。1 匹目の胎仔娩出が確認された時点を経産終結と定義し、妊娠継続率を Kaplan-Meier 法



により解析した結果、**Control** 群に比して予防投与群で有意な妊娠延長を認めた。一方で、治療投与群では妊娠延長効果を認めなかった（図 1）。有意な差を認めた **Control** 群と分子状水素-予防投与群で比較した結果、後者において子宮における **CD4** 陽性細胞数は有意に減少していた。なお、**CD8** 陽性細胞数には有意差を認めなかった。子宮における **COX-2** 発現はおよび脾臓における **T** 細胞エフェクター機能に関連するサイトカイン；**IFN- γ** 、**IL-4**、**GZMB** の発現は、予防投与群において有意な減少が確認された。これらから、分子

状水素は **T** 細胞活性化の抑制作用を有し、早産予防効果を有することが示唆された。

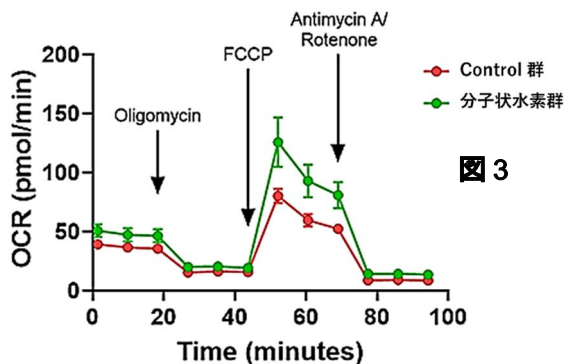
子宮局所の **CD4** 陽性細胞について分子状水素投与の有無による遺伝子発現差を解析。免疫制御に関わる複数のパスウェイが関与することが示された（図 2）。



(2) 分子状水素の免疫代謝調整作用の検討

フローサイトメトリーを用いて、T細胞エフェクター化の指標として、Th17陽性細胞におけるIL-26およびIL-22陽性細胞数、Th1ならびにCD8陽性細胞におけるIFN-γ陽性細胞数を測定。分子状水素がTh1、Th17、CD8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。

フラックスアナライザーを用いた生細胞の経時的な観察により、ヒト妊婦PBMCにおいて分子状水素添加に伴いミトコンドリアにおける基礎呼吸値、ATP産生、最大呼吸能、予備呼吸能が有意に上昇することが分かった。さらに、エネルギー代謝における電子伝達系と解糖系のバランスが電子伝達系有意になることを見出した。これにより、分子状水素が免疫代謝バランスをT細胞エフェクター化の抑制方向に誘導し得ることが示唆された(図3)。

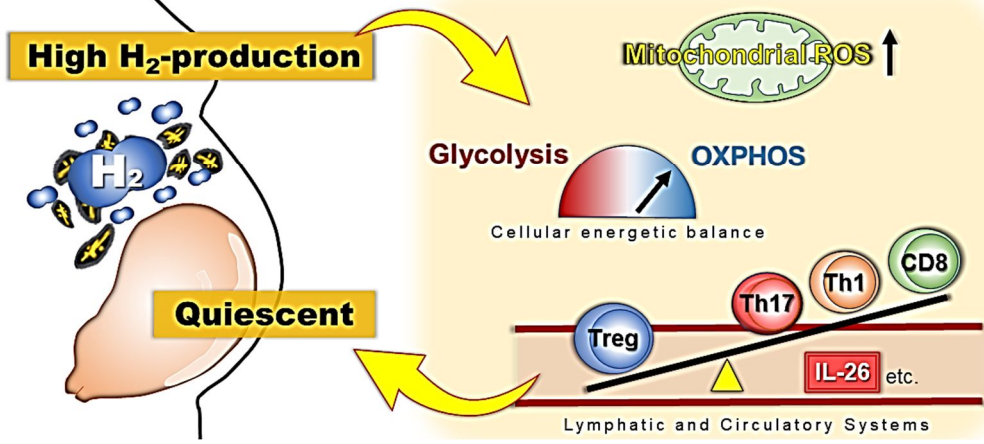


既に得られている知見(今井: 科研費 18K16765)から生体内分子状水素濃度 Cut-off を 6.62ppm と設定。分子状水素濃度と腸内細菌叢 f_Lachnospiraceae が関連することが示された。

これら成果は、第73回日本産科婦人科学会学術講演会シンポジウム、第36回日本生殖免疫学会ワークショップ、第11回日本分子状水素医学生物学会大会 Leading Edge Talk の場で発表するとともに、英文報告した[Aoki C, Imai K (Co-First author), et al. Molecular hydrogen has a positive impact on pregnancy maintenance through enhancement of mitochondrial function and immunomodulatory effects on T cells. Life Sci. 2022 Nov 1;308:120955.] (図4)。

Maternal production of Molecular hydrogen

図4



< Dysbiosis マウスモデル作成 >

(1) 非腸管吸収性の抗生物質であるポリミキシン B (B) もしくはバンコマイシン (V) をマウスへ経口投与した後にメイティング。抗生物質を投与しない群を Control (C) とし、これら 3 群に対して妊娠 16 日目に antiCD3 を腹腔内投与すると、バンコマイシン投与群においてのみ早産が約 50% で誘発された。また、バンコマイシン投与群において腸内細菌叢の多様性が著しく低下しており、Dysbiosis が引き起こされていることが分かった。このマウスモデルにおける分子状水素濃度を測定したが、3 群ともにガスクロマトグラフィーの検出感度以下であったため、測定系の改善に取り組んでいる。また、3 群の腸内細菌叢解析 (16srRNA)、腸内細菌叢の機能類推解析 (PICRUSt2)、腸管内の短鎖脂肪酸濃度解析が遂行中である。

本研究成果により、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。分子状水素はミトコンドリア機能・免疫代謝に直接的に作用し、T細胞のエフェクター化を抑制する作用を有していること、エフェクターT細胞/Tregバランスを調整して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こと、分子状水素の外的投与が新規の早産予防法となる可能性が示唆された。今後は、腸内細菌叢の代謝産物としての分子状水素ならびに短鎖脂肪酸にターゲットを拡大。新規に作成した Dysbiosis 早産モデルを用いて、分子状水素がヒト妊婦に与える有用性について解析を重ねる。

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 Aoki Chieko, Imai Kenji, Mizutani Teruyuki, Sugiyama Daisuke, Miki Rika, Koya Yoshihiro, Kobayashi Tomoko, Ushida Takafumi, Iitani Yukako, Nakamura Noriyuki, Owaki Taro, Nishikawa Hiroyoshi, Toyokuni Shinya, Kajiyama Hiroaki, Kotani Tomomi	4. 巻 308
2. 論文標題 Molecular hydrogen has a positive impact on pregnancy maintenance through enhancement of mitochondrial function and immunomodulatory effects on T cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 120955 ~ 120955
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2022.120955	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3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今井健史
2. 発表標題 妊娠における分子状水素の意義と可能性
3. 学会等名 第11回日本分子状水素医学生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井健史
2. 発表標題 妊娠維持における母体腸内細菌水素産生能の重要性 -免疫細胞Th17/Tregおよび新規炎症性サイトカインIL-26に注目した検討-
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今井健史
2. 発表標題 妊娠維持における獲得免疫の関わり ~生体内分子状水素の役割を中心に~
3. 学会等名 第36回日本生殖免疫学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------	---------