

主論文の要旨

Hydrogen ameliorates pulmonary hypertension in rats by anti-inflammatory and anti-oxidant effects

分子状水素は、ラット肺高血圧を
抗炎症および抗酸化作用により改善する

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻

発育・加齢医学講座 小児科学分野

(指導：小島 勢二 教授)

岸本 泰明

【諸言】

肺高血圧症は稀ではあるが致死的な疾患であり、血管壁の肥厚とリモデリングにより肺血圧の上昇と右心不全をきたす。プロスタグランディン、エンドセリンレセプター拮抗薬、PDE-5 阻害薬などの治療薬があるが、治癒には至っていない。病態としては酸化ストレスや炎症の関与が報告されている。

分子状水素は抗炎症および抗酸化作用があり、さまざまな疾患にて有効性が報告されているが、肺高血圧症に対する効果は不明である。STAT3/NFAT 系は細胞増殖に関与し、平滑筋細胞の増殖を介して肺高血圧を悪化させる報告がある。今回我々は、分子状水素が STAT3/NFAT 系を介して抗炎症および抗酸化作用により肺高血圧が改善するという仮説を立てて実験を行った。

【対象および方法】

7 週齢オス SD ラットを次の 3 群に分けた：H 群，モノクロタリン（以下 MCT）＋飽和水素水；M 群，MCT＋脱水素水；C 群，生理食塩水＋脱水素水。MCT60mg/kg もしくは生理食塩水は皮下注による単回投与で、飽和水素水もしくは脱水素水の飲水は MCT 投与 7 日前より 16 日後まで行った。

MCT 投与後 16 日目にペントバルビタール麻酔下、経皮的に右室穿刺を行い、右室圧測定を行った。人工換気下に肺と心臓を摘出し、右室自由壁重量と左室自由壁および中隔の重量比により右室肥大を評価した。摘出した肺を 4%パラホルムアルデヒドにて固定をし、切片を作製した。免疫染色は一次抗体を使用したのち LSAB+ System キットを使用した。多重蛍光染色は肺の凍結切片を使用し、一次抗体を使用したのち蛍光二次抗体を使用して共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。一次抗体は抗 α 平滑筋抗体、抗 PCNA 抗体、抗 CD68 抗体、抗 80HdG 抗体、抗 NFAT1 抗体、抗 pSTAT3 抗体を使用した。肺動脈中膜の筋性化は外径 50-100 μ m の血管の中膜における α 平滑筋陽性の程度により非肥厚 (<25%)、部分肥厚 (25-75%)、肥厚 (>75%) に分けて評価した。血管密度は Elastica van Gieson 染色で肺胞 100 個当たりの血管数 (径 25-100 μ m) により評価した。SDF-1, MCP-1, BMPR2, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, Smad2, Smad3, Smad4 の発現は急速凍結した肺組織から RNA を抽出し、SYBR Green I によるリアルタイム PCR を行い評価した。

統計は値として平均±標準誤差で表示し、SPSS21 を使用して評価した。3 群間の評価では一元配置分散分析法に Bonferroni 調整を行い、 $P < 0.05$ を有意とした。

【結果】

右室圧、右室左室重量比、肺動脈筋性化率は M 群において、C 群と比較し有意に上昇し、H 群では改善した (Fig. 1A-C)。HE 染色、Elastica van Gieson 染色、抗 α 平滑筋抗体免疫染色による評価で、M 群にて肺動脈平滑筋の肥厚を認め、H 群で改善した (Fig. 1D-L)。PCNA 陽性細胞の割合は M 群で C 群と比較し有意に増加し、H 群で改善した (Fig. 1M)。一方、血管密度は M 群において C 群と比較し有意に減少し、H 群で改善

した (Fig. 1N)。外膜マクロファージ、外膜 8OHdG 陽性細胞は M 群において C 群と比較し有意に増加し、H 群にて正常化した。さらに、8-OHdG は外膜 CD68 陽性細胞と共発現していた (Fig. 2)。一方、qRT-PCR による SDF-1 と MCP-1 の発現は、M 群にて増強しており、H 群にて減弱していた (Fig. 3A, B)。さらに、BMPR2 の発現は M 群で減弱しており、H 群でわずかに回復していた (Fig. 3C)。しかしながら TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, Smad2, Smad3, Smad4 の発現には 3 群間で有意差は認めなかった。多重蛍光染色において、平滑筋細胞における NFAT および pSTAT3 の発現はともに M 群で増加しており、H 群で低下していた (Fig. 4)。

【考察】

本研究では、分子状水素の経口投与が MCT 誘発ラット肺高血圧を改善することを示した。本研究の新しい知見としては、分子状水素は STAT3/NFAT 経路の修飾を伴い、炎症抑制と酸化ストレスの抑制を介して MCT 誘発ラット肺高血圧を改善するという点である。

我々はまず、分子状水素による肺高血圧の改善を、右室圧の低下、右室肥大の改善、肺動脈筋性化の減少により確認した。加えて、組織学的にも分子状水素による肺動脈平滑筋細胞増殖の抑制を認めた。炎症は肺高血圧症において重要な役割を果たしており、抗炎症薬による MCT 誘発ラットの肺高血圧の改善の報告もされている。外膜マクロファージは肺高血圧病変の炎症に関わっており、外膜マクロファージの減少や病変にマクロファージを動員する MCP-1, SDF-1 の発現の低下も今回の実験で示された。また、酸化ストレスも同様に肺高血圧の進行に重要な役割を果たしているが、酸化ストレスマーカーである 8-OHdG が陽性のマクロファージが、分子状水素により減少していた。最後に我々は、分子状水素が STAT3/NFAT 経路を抑制することにより肺高血圧を改善することを示した。肺高血圧病変において NFAT 活性化は炎症性血管リモデリングや平滑筋細胞の増殖を引き起こすことや、STAT3/NFAT 経路の活性化がヒトでも MCT 誘発ラットでも肺高血圧において上昇していることが報告されている。Plumbagin が MCT 誘発肺高血圧において、STAT3/NFAT 経路の修飾と BMPR2 の発現の増強を伴って改善することが報告されているが、分子状水素は BMPR2 の有意な発現増強を認めなかった。

臨床応用という視点では、分子状水素はすでに減圧症や動脈塞栓患者にて安全に使用されている報告があり、副作用としての報告は低血糖など限られている。本研究の肺高血圧モデルは特に炎症の関与が強い、特発性肺高血圧症、膠原病や感染症に伴う肺高血圧で有用な可能性がある。また、現在の肺高血圧治療薬は経口他、持続点滴や頻回の吸入などの投与経路がある中で、分子状水素は経口で投与できることは臨床応用に有利であると言える。分子状水素の効果は、これまで酸化ストレスの中でも特に強力な過酸化亜硝酸やヒドロキシラジカルの除去が重要な役割であると報告されているが、これまでのところ、直接的な標的はまだわかっていない。分子状水素の直接的な標的が分かると関与するサイトカインやシグナルパスウェイの理解が深まり、標的の下流が新しい治療ターゲットになることが期待できる。

【その他】

MCT 誘発肺高血圧ラットモデルは肺高血圧モデルとして一般的で、再現性や費用面で利点があるが、シングルヒットモデルでありヒトの肺高血圧症で考えられているような複数の機序を介したマルチヒットモデルとは異なる。また、進行した肺高血圧症においてみられる内膜肥厚や叢状変化は認めないモデルである。低酸素モデルや Sugen 低酸素モデルのような他のモデルによる評価が欠けていることが本研究の限界として挙げられる。

【結論】

分子状水素は、ラット MCT 誘発肺高血圧を STAT3/NFAT 系を介して抗炎症および抗酸化作用により改善する。