

主論文の要旨

**Neuroprotective potential of molecular hydrogen
against perinatal brain injury via suppression of
activated microglia**

〔 活性化ミクログリアの抑制を介した分子状水素の
周産期脳障害に対する神経保護の可能性 〕

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 産婦人科学分野

(指導：吉川 史隆 教授)

今井 健史

【緒言】

周産期脳障害は児に生涯にわたる神経学的障害を引き起こす重大な問題である。子宮内感染・炎症は満期産児および早産児の双方において周産期胎児脳障害の主要な危険因子である。感染や炎症により母体の免疫応答が引き起こされた結果に産生される過剰なサイトカインは胎児の細胞障害作用を有し、また胎児炎症反応症候群（Fetal inflammatory response syndrome ; FIRS）の原因となる。FIRS は臍帯血 IL-6 高値を定義とし、脳性麻痺や統合失調症など児の脳障害の原因と考えられている。胎児脳障害が引き起こされる機序は完全にはわかっていないが、過剰なサイトカインや酸化ストレスの直接的な作用およびミクログリア活性化を介した機序が指摘されている。そのため、これら炎症反応およびミクログリア活性化を制御することが胎児脳障害に対する新規治療法として有効と考えられている。

分子状水素（H₂）は抗酸化作用を有することが 2007 年に初めて報告された。活性酸素種（ROS）の中でも特に障害作用の強いヒドロキシラジカルやペルオキシナイトライトを特異的に消去することや、分子量が小さいためミトコンドリアや核内にも容易に到達することから大変注目を集め、以降様々な分野においてその有効性が報告されている。我々もこれまでに妊娠ラットの子宮虚血再灌流モデルにおいて H₂ が胎児脳障害軽減効果を有することを報告した。そこで、今回は FIRS モデルマウスを用いて、経母体的な分子状水素投与が炎症・酸化ストレスにより引き起こされる胎児脳障害に対して保護効果を有するかを研究した。また、初代培養細胞を用いて分子状水素のミクログリア活性化に対する直接的な効果を検討した。

【対象及び方法】

初めに、妊娠 17 日目 CD1 マウスを PBS 投与（Control 群）、Lipopolysaccharide ; LPS 投与（LPS 群）、飽和水素水（Hydrogen water ; HW）+LPS 投与（HW+LPS 群）の 3 群に分けた。LPS は 75µg/500µl を腹腔内投与し、HW はその 24 時間前から投与開始した。胎仔血清および胎仔脳における炎症性サイトカイン（ELISA、qRT-PCR）、胎仔脳における酸化ストレス障害およびミクログリア活性化（8OHdG、4HNE、Iba-1 免疫組織染色）を検討した。次に、マウス新生仔脳より分離培養した初代培養ミクログリアを通常（Normal media ; NM 群）または H₂ 培養液（Hydrogen media ; HM 群）で培養し、LPS 添加による炎症性サイトカイン、iNOS、ROS 産生を検討した。ROS 産生に関しては TNF-α、IL-6、IL-1β 添加でも検討した。さらに各培養上清をマウス胎仔脳より分離培養した神経細胞に添加し、その生存率を MTS アッセイおよび免疫染色にて評価した。また、DNA マイクロアレイ検査を行い、H₂ 投与による培養ミクログリアの活性化に関連する遺伝子発現変化を検討した。

【結果】

Control 群に比し LPS 群で胎仔血清 TNF-α、IL-6 濃度は有意に上昇しており、これを FIRS モデルとした。Control 群に比して LPS 群では炎症性サイトカイン mRNA

量 (Fig. 1)、酸化ストレスマーカーの陽性細胞数や組織学的スコア (Fig. 2)、ミクログリア数 (Fig. 3) の有意な増加を認めた。これら増加は、HW+LPS 群で有意に抑制されていた。培養ミクログリアの検討では、NM 群で認めた各種刺激による ROS 産生 (Fig. 4) の有意な増加、LPS 添加による炎症性サイトカイン mRNA および iNOS mRNA 量 (Fig. 5) の有意な増加が HM 群では有意に抑制された。また、LPS 刺激した NM 群ミクログリア上清添加により神経細胞の生存数は有意に減少したが、H₂ 投与により有意な改善を認めた (Fig. 6)。さらに、DNA マイクロアレイ検査にて、ミクログリア活性化に関連し、かつ H₂ 投与により抑制される複数の遺伝子を同定した (Table 2 and Fig. 7)。

【考察】

今回の結果は、H₂ の経母体的投与がミクログリア活性化を抑制し FIRS における胎児脳障害の軽減に有効である可能性を示した初めての研究である。

我々は、FIRS モデルマウス作成に LPS を母獣腹腔内投与した。このモデルでは胎仔脳において酸化ストレス障害が生じ、活性化ミクログリア細胞数が上昇することが確認された。また、胎仔血中および胎仔脳において IL-6 をはじめとする炎症性サイトカイン産生が上昇することや、胎仔死亡率の上昇も認めた。これらから、このマウスモデルがヒトにおける FIRS の臨床的特徴をある程度再現していることが確認された。そして、経母体的 H₂ 投与により、胎仔における H₂ 濃度は有意に増加し FIRS モデルにおいて確認されたすべての障害が有意に軽減されていた。

次に、我々は *in vivo* 実験結果におけるミクログリアの変化に着目した。新生仔マウスから初代培養ミクログリアを作成し H₂ がミクログリア活性化に及ぼす直接的な作用を研究した。FIRS マウスモデルにおいて産生増加が確認された各種炎症性サイトカインおよび LPS を培養ミクログリアへ添加したところ、すべての刺激においてミクログリア細胞内 ROS 産生の有意な増加を認めた。細胞内 ROS は NF-κB 活性化を引き起こすセカンドメッセンジャーともなることが指摘されていたため、我々は LPS 添加された培養ミクログリアでの炎症性サイトカイン産生についても検討し、その増加を確認した。これら ROS 産生上昇および炎症性サイトカイン産生増加が H₂ 前投与により有意に抑制されており、H₂ 前投与がミクログリア活性化に対して抑制的に働くことがわかった。なお、既報告として、ミクログリア cell line である BV-2 細胞に対する H₂ の直接的効果を検討したものがあがるが、その報告では H₂ はミクログリア活性化を抑制したもののサイトカイン産生の有意な抑制を示さなかった。この点は今回の我々の結果とは異なる内容であるが、今回は cell line ではなく初代培養を用いた研究であることがその要因と考えられた。さらに、初代培養神経細胞を作成しミクログリア培養上清の添加実験を行った結果、H₂ 前投与によるミクログリア活性化抑制が神経保護的に働くこともわかった。

既報告および今回の研究からも H₂ の分子標的は未だ不明である。一方で、今回の *in vitro* 実験結果では、LPS 群で認めた ROS の一種であるスーパーオキシドの増加

が H₂ 前投与によって抑制されていた。しかし、H₂ 投与の有無でミクログリアの抗酸化関連酵素の発現量に変化はなかった。既報告から H₂ はスーパーオキシドを直接的に消去する作用はないと考えられている。そのため、H₂ は産生された ROS（ヒドロキシラジカル）の直接的な消去作用に加えて、ミクログリアからの ROS 産生そのものを抑制する作用をもつと考えられた。さらに、*in vitro*での DNA マイクロアレイ検査結果から H₂ が影響を与え得る標的として新規に 6 つの遺伝子が確認されており、これら結果は H₂ の分子標的に関する今後の研究の一助となる可能性がある。

今回の研究では H₂ 投与による胎児期の障害改善効果を示したが、これら児の出生後の長期的な神経学的予後改善効果については検討出来ていない。また、今回研究では H₂ を障害発生の前段階で投与しているが、実際臨床を考えると H₂ の投与開始時期に関しても検討が必要と思われた。

【結論】

今回の結果より、経母体的 H₂ 投与はミクログリア活性化を抑制することにより FIRS 胎児脳障害を軽減する可能性が示唆された。