

氏 名	西 田 剛
(ふりがな)	(にしだ たけし)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙 第 号
学位審査年月日	平成30年7月11日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	Dual gas treatment with hydrogen and carbon monoxide attenuates oxidative stress and protects from renal ischemia-reperfusion injury (水素と一酸化炭素の混合ガスは腎臓の虚血再灌流障害による酸化ストレスを軽減することで組織を保護する)
論文審査委員	(主) 教授 石 坂 信 和 教授 高 井 真 司 教授 南 敏 明

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目 的》

虚血再灌流(I-R : ischemia-reperfusion)障害は、さまざまな臓器の損傷に関係性があると報告されている。軽減させる方法として数々の報告がされているが、医療ガスもその中の一つである。

最近、医療ガスが治療目的に使用されている報告がなされ、水素(H₂ : Hydrogen)ガス、一酸化炭素(CO : Carbon monoxide)ガスは、再灌流障害を引き起こす原因となっている活性酸素(ROS : reactive oxygen species)を早期に捕らえ障害を軽減するとされている。

I-R ラットに対して、H₂とCOを混合させた混合ガス(Dual gas)を吸入させ、I-Rにより誘発される腎障害を軽減させることを示し、H₂ガス(H₂ : 2%)の単独とDual gas (N₂ : 77.8%、O₂ : 20.9%、H₂ : 1.30%、CO : 250ppm)を吸入させた効果を評価する。

《方 法》

ラット（体重 250-280 g : n=20）を用いて以下 5 群の実験群を作成した。(1)コントロール群(n=3) 左腎摘出のみ、(2) Dual gas 群(n=3) 左腎摘出後にガス吸入のみ、(3) I-R 群(n=5) 左腎を摘出し、2 週間後に対側の腎動静脈をクリップにて閉塞させ虚血状態とし、45 分後に解放し再灌流を行った、(4) I-R+H₂ gas 群(n=4) I-R モデルに H₂ gas の単独吸入、(5) I-R+Dual gas 群(n=5) 再灌流の 15 分前より Dual gas 吸入を開始し、著明に腎機能の低下する 24 時間後に摘出。

統計処理に関しては、Kruskal-Wallis test、Tukey-Kramer multiple-comparison test を使用し、p 値 (p-value) に関しては 5%未満で有意差があると判断した。

《結 果》

組織学的所見

光学顕微鏡検査では、I-R 障害をうけた腎臓の組織は、尿細管の病変が主体であり、糸球体病変は比較的軽度であった。I-R 障害をうけた糸球体や尿細管の割合でスコア化(Grade 0-3)を行う HE grade score を使用して比較を行ったところ、I-R 群に対して I-R+H₂ 群で I-R 障害を有意に改善させ、I-R 障害の改善効果は I-R+Dual gas 群においてより著明に認められた。電子顕微鏡検査ではメザンギウム細胞の変性に関連する糸球体基底膜の肥厚や毛細血管内皮細胞の空胞変性が認められ、また、ミトコンドリアの変性やオートリソソームの増加を認めた。これらの変化は、Dual gas の吸入によって軽減された。TUNEL 染色では、主に I-R ラットの腎尿細管に陽性細胞が観察され、Dual gas 群で糸球体および尿細管の両方において TUNEL 陽性細胞数は有意に減少し(P<0.05)、H₂ gas 群よりも効果的であった(P<0.05)。

スーパーオキシド($\cdot O_2^-$: Superoxide)の産生

DHE(dihydroethidium)ラベリングによって測定された $\cdot O_2^-$ の産生量は、I-R 群において増加し、H₂ gas、および、Dual gas の吸入によって有意に抑制され、その抑制効果は H₂ gas に比較して Dual gas が有意に高かった。

腎機能検査

I-R 群に比べて I-R+Dual gas 群では、BUN 値の有意な減少効果を認めた。CRN 値に関しても、減少傾向はあったが有意差を認めなかった。

内因性のフリーラジカル測定

電子スピン共鳴(ESR : Electron Spin Resonance)を使用したフリーラジカルの測定値は、コントロール群に比較して I-R 群で 2 倍に増加しており、Dual gas の吸入によって有意に減少した。

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

I-R 障害によって proinflammatory cytokine である TNF- α 、IL-6、接着分子 ICAM-1、転写因子 NF- κ B、さらには、低酸素誘導因子である HIF-1 α やHO-1の遺伝子発現量は著明に増加し、Dual gas の吸入によって有意な減少を認めた。

《考 察》

酸化ストレスは、循環器疾患や癌などの多くの疾患や I-R 障害を引き起こすとされている。I-R 誘発性腎障害の分子的なメカニズムは、いまだ解明には至っていないが、いくつかの原因因子として ROS があると報告されている。

H₂ ガスの吸入は抗酸化酵素活性を有意に増加させ、脂質過酸化物レベルを減少させる。また、有害な ROS を選択的に中和し抗酸化や抗アポトーシスなどの特性があると報告もされている。H₂ は生体膜に浸透し、細胞質、ミトコンドリアや核に拡散することができる。

また水素のプロチウムイオンは、水を形成することによって・OH を選択的に不活性化することが示されている。また、低用量の CO は強力な抗炎症性、抗アポトーシス性や抗増殖性効果が指摘され、現在では細胞内シグナル伝達経路の調節物質として知られている。CO もミトコンドリアのシトクロム *c* オキシダーゼのへム部分に結合し、実質的にミトコンドリア由来の ROS を減少させると報告がある。さらに、CO は主要な細胞内抗アポトーシス物質としても報告されている。

心臓移植において、*in vivo* で H₂(1%~3%)、CO(50~250ppm)のいずれか、または両方を吸入させ評価したところ、H₂(2%)、CO(250ppm)単独で心筋損傷の程度が減弱したが、虚血が長期間続くと重度の心筋損傷が起こった。しかし、H₂+CO による Dual gas はこの I-R 移植傷害を有意に軽減し、梗塞面積を減少させ、トロポニン I およびクレアチンホスホキナーゼの血清レベルを低下させたと報告がある。さらに、CO(250ppm)は、移植された臓器における I-R 損傷を予防することが示されており、その有効性はラットの腎臓移植モデルでも報告されている。

本研究でも I-R によって誘発された腎組織障害所見は Dual gas 投与により著明に改善され、スーパーオキシド($\cdot O_2^-$: Superoxide)、および、フリーラジカルの産生増加の有意な抑制効果とアポトーシス細胞の有意な減少が認められた。また、RT-PCR 法による分子生物学的な検討では IR 障害によって増加した proinflammatory cytokine (TNF- α 、IL-6) や接着分子 (ICAM-1)、および、転写因子 (NF- κ B) の遺伝子発現量が、Dual gas の吸入によって有意に減少した。これらの所見から Dual gas 投与は I-R によって誘発された組織障害は、サイトカインカスケードを介した一連の炎症性反応を抑制することによって改善し、その結果、腎機能を改善させたことが示唆される。

以上より、今後さらなる検討が必要であるが、Dual gas 投与は腎臓移植における I-R 誘発障害を改善することによって、移植腎機能を改善させる新規治療となる可能性があると思われる。

論文審査結果の要旨

一酸化炭素(CO)は内生的に生成されるいくつかのガス伝達物質の一つである。過去数十年の報告では、ガス伝達物質は、組織や細胞傷害の種々のモデルにおいて強力な細胞保護作用を示す物質であるとされている。1969年に内因性のCOはヘムオキシゲナーゼ(HO : heme oxygenase)によるヘムの分解から誘導されると最初に同定された。ヘムはHOによって異化されてビリベルジン、一酸化炭素、鉄を生成する。低用量のCOは強力な抗炎症性を指摘されるようになり、現在では細胞内シグナル伝達経路の調節物質であり、主要な細胞内抗アポトーシス物質としても報告されている。

水素(H₂)は抗酸化酵素活性を有意に増加させ、脂質過酸化物レベルを減少させる。また、有害な活性酸素(ROS : reactive oxygen species)を選択的に中和し抗酸化や抗アポトーシスなどの特性があると報告もされている。H₂は良好な分布特性を有し、生体膜に浸透し、細胞質、ミトコンドリアや核に拡散することができる。また水素のプロチウムイオンは、水を形成することによって hydroxyl radical (・OH)を選択的に不活性化することが示されている。H₂は・OHラジカルとは反応するが、過酸化水素などの反応性の低い酸化剤とでは反応しにくいとされている。しかし、H₂ガスの吸入はI-Rや酸化ストレスに対して使用される現在の治療法に比べて、優れている可能性がある。

これらのガスを混合(Dual gas : COガス+H₂ガス)し、I-Rラットに吸入させ、組織学的評価や、dihydroethidium(DHE)を使用した蛍光法での活性酸素の測定、電子スピン共鳴を使用したフリーラジカルの測定、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応によるmRNAの定量を行い、ラット腎臓における虚血再灌流障害に対するDual gas投与の有効性を示した。

以上により、本論文は本学学位規程第3条第2項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Transplantation Proceedings 50(1): 250-258, 2018