

引用元 URL	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38745325/
学術雑誌/掲載年	European Journal of Medical Research /2024
研究施設/国	青島大学附属泰安市中心医院 /中国

## Hydrogen gas inhalation ameliorates LPS-induced BPD by inhibiting inflammation via regulating the TLR4-NF $\kappa$ B-IL6/NLRP3 signaling pathway in the placenta

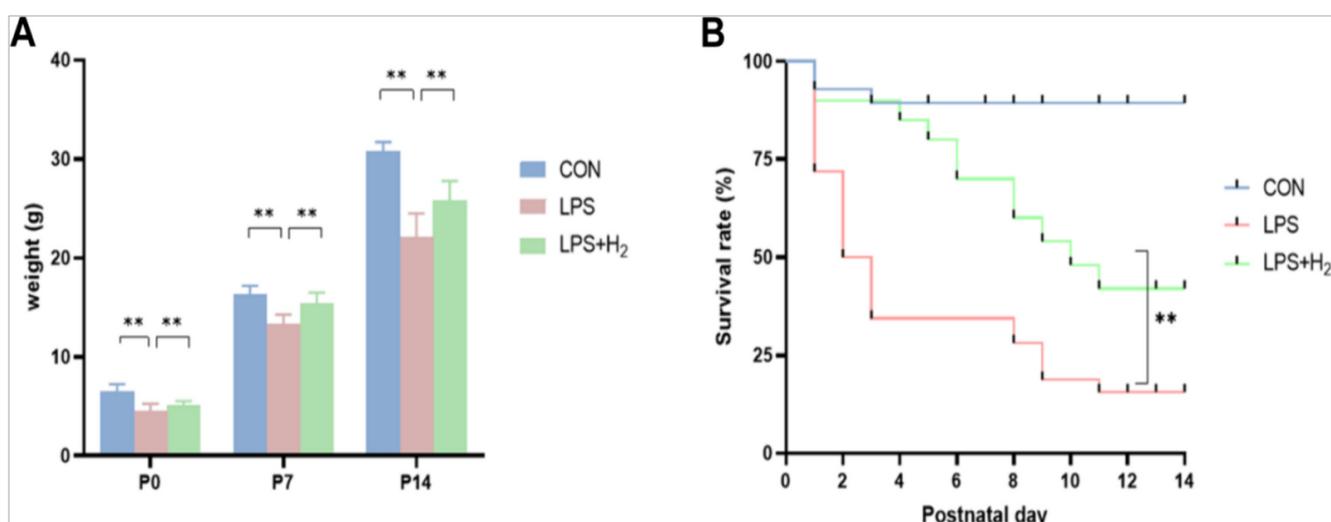
水素吸入は気管支肺異形成の発生を減少させる

### 10秒で読めるまとめ

「胎盤の炎症」が早産児の気管支肺異形成に関わることがわかっているため、妊娠ラットを用いて新生児気管支肺異形成に対する水素の保護効果を検証した結果、水素が胎盤の炎症を著しく抑え、肺の発達障害を正常化することが確認された。

### 1分で読めるポイント

- 早産を防ぐ効果的な方法が不足する中、気管支肺異形成は早産児に最も頻繁に見られる合併症であり、その発症には、出生前後を問わず胎盤の炎症（ケモカインの放出）が重要な要因となっている。
- 妊娠ラットを無作為に3グループに分け：対照群、LPS群(気管支肺異形成症モデル)、LPS+H<sub>2</sub>群(42%水素ガス、4時間/日)、新生児の気管支肺異形成症に対する水素の効果を検証した。
- 水素はLPSによる肺の発達障害を正常化し、胎児と新生児の死亡率を減少させた。
- 水素投与により、胎盤の浸潤度が著しく低下し、浸潤範囲も著しく狭まった。



A 仔ラットの体重の推移

B 仔ラットの生存曲線 (各グループ n=5)

## Abstract (原文と翻訳)

**Introduction:** Hydrogen (H<sub>2</sub>) is regarded as a novel therapeutic agent against several diseases owing to its inherent biosafety. Bronchopulmonary dysplasia (BPD) has been widely considered among adverse pregnancy outcomes, without effective treatment. Placenta plays a role in defense, synthesis, and immunity, which provides a new perspective for the treatment of BPD. This study aimed to investigate if H<sub>2</sub> reduced the placental inflammation to protect the neonatal rat against BPD damage and potential mechanisms.

【はじめに】水素(H<sub>2</sub>)は、その固有の生体安全性により、いくつかの疾患に対する新しい治療剤と見なされている。気管支肺異形成(BPD)は妊娠の悪影響の一つとして広く認識されているが、効果的な治療法がないままである。胎盤は防御、合成、免疫において役割を果たし、気管支肺異形成の治療に新たな視点を提供する。本研究の目的は、水素が胎盤の炎症を軽減し新生児ラットをBPDの損傷から保護されるかどうか、また、その潜在的なメカニズムを調査すること。

**Methods:** We induced neonatal BPD model by injecting lipopolysaccharide (LPS, 1 μg) into the amniotic fluid at embryonic day 16.5 as LPS group. LPS + H<sub>2</sub> group inhaled 42% H<sub>2</sub> gas (4 h/day) until the samples were collected. We primarily analyzed the neonatal outcomes and then compared inflammatory levels from the control group (CON), LPS group and LPS + H<sub>2</sub> group. HE staining was performed to evaluate inflammatory levels. RNA sequencing revealed dominant differentially expressed genes. Bioinformatics analysis (GO and KEGG) of RNA-seq was applied to mine the signaling pathways involved in protective effect of H<sub>2</sub> on the development of LPS-induced BPD. We further used qRT-PCR, Western blot and ELISA methods to verify differential expression of mRNA and proteins. Moreover, we verified the correlation between the upstream signaling pathways and the downstream targets in LPS-induced BPD model.

【方法】胚齢 16.5 日に羊水内にリポポリサッカライド (LPS, 1μg) を注入することで新生児 BPD モデルを誘導した (LPS 群)。LPS+H<sub>2</sub> 群はサンプル収集まで 42% の H<sub>2</sub> ガスを吸入した (4 時間/日)。主に新生児の結果を分析し、次に対照群、LPS 群、LPS+H<sub>2</sub> 群の炎症レベルを比較した。炎症レベルは HE 染色で評価した。RNA シーケンスにより主な差次的発現遺伝子を明らかにした。RNA シーケンスの生命情報解析 (GO・KEGG) を使用して、LPS 誘導 BPD の進行に対する H<sub>2</sub> の保護効果に関与するシグナル伝達経路を探った。さらに、qRT-PCR、ウェスタンブロット、ELISA 法を使用して、mRNA とタンパク質の差次的発現を検証した。また、LPS 誘導 BPD モデルにおける上流のシグナル伝達経路と下流の標的との関連を検証した。

**Results:** Upon administration of H<sub>2</sub>, the inflammatory infiltration degree of the LPS-induced placenta was reduced, and infiltration significantly narrowed. Hydrogen normalized LPS-induced perturbed lung development and reduced the death ratio of the fetus and neonate. RNA-seq results revealed the importance of inflammatory response biological processes and Toll-like receptor signaling pathway in protective effect of hydrogen on BPD. The over-activated upstream signals [Toll-like receptor 4 (TLR4), nuclear factor kappa-B p65 (NF-κB p65), Caspase1 (Casp1) and NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome] in LPS placenta were attenuated by H<sub>2</sub> inhalation. The downstream targets, inflammatory cytokines/chemokines [interleukin (IL)-6, IL-18, IL-1β, C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2) and C-X-C motif chemokine ligand 1 (CXCL1)], were decreased both in mRNA and protein levels by H<sub>2</sub> inhalation in LPS-induced placentas to rescue them from BPD. Correlation analysis displayed a positive association of TLR4-mediated signaling pathway both proinflammatory cytokines and chemokines in placenta.

【結果】H<sub>2</sub> 投与により、LPS 誘導の胎盤の炎症性浸潤程度が減少し、浸潤が著しく狭まった。水素は LPS による肺の発達障害を正常化し、胎児と新生児の死亡率を減少させた。RNA シーケンスの結果、BPD に対する水素の保護効果において炎症応答の生物学的プロセスと Toll 様受容体シグナル伝達経路が重要であることが明らかになった。LPS 胎盤において、過剰に活性化された上流シグナル (TLR4、NF-κB p65、カスパーゼ 1、NLRP3 インフラマソーム) は、H<sub>2</sub> 吸入によって抑制された。下流の標的である炎症性サイトカイン/ケモカイン (IL-6、IL-18、IL-1β、CCL2、CXCL1) も、H<sub>2</sub> 吸入により mRNA とタンパク質レベルの両方で減少した。相関解析により、胎盤における TLR4 媒介シグナル伝達経路と炎症性サイトカインおよびケモカインの間に正の関連が示された。

**Conclusion:** H<sub>2</sub> inhalation ameliorates LPS-induced BPD by inhibiting excessive inflammatory cytokines and chemokines via the TLR4-NFκB-IL6/NLRP3 signaling pathway in placenta and may be a potential therapeutic strategy for BPD.

【結論】水素吸入は、胎盤において TLR4-NFκB-IL6/NLRP3 シグナル伝達経路を介して過剰な炎症性サイトカインとケモカインを抑制することで、LPS 誘導 BPD を改善し、BPD の潜在的な治療戦略となり得る。

**Keywords:** BPD 気管支肺異形成; Hydrogen 水素; Inflammation 炎症; NFκB; NLRP3; Placenta 胎盤; TLR4.

**Conflict of interest statement:** The authors declare no competing interests. 【利益相反】なし

英語	日本名	説明
Bronchopulmonary dysplasia (BPD)	気管支肺異形成	早産児(未熟児)に生じる慢性の肺疾患。出生後に肺がうまく発達しないことが主な原因で、生後1カ月を過ぎても酸素吸入を必要とするような呼吸困難症状が続き、長期間の呼吸補助(酸素投与など)が必要となる。
placental inflammation	胎盤の炎症	胎盤内の炎症。母体から胎児への栄養や酸素の移動を阻害し、胎児の正常な発育を妨げ、早産や低出生体重のリスクを高める。
amniotic fluid	羊水	胎児が包まれ、保護されている液体。胎盤から分泌され、胎児の保護、衝撃吸収、温度調節、胎児の運動、肺の発達の促進、栄養の供給などの機能を持つ。
embryonic day	胚齢	受精卵発生からの経過期間。
lipopolysaccharide (LPS)	LPS (リポ多糖体)	細菌細胞壁の一部。特にグラム陰性細菌によって産生される毒性成分で、炎症反応を引き起こし、免疫応答を活性化し、感染症の症状を誘発する。
HE staining	HE 染色	組織の細胞や構造を染色して可視化するための一般的な組織染色法。形態学的特徴や病理学的変化を評価するために使用される。
RNA sequencing	RNA シーケンス	生物学的サンプルから RNA 配列を決定し、遺伝子発現パターンや RNA の種類を解析するための手法。遺伝子の発現量が解析できる。
Bioinformatics analysis	生命情報解析	生物学的データを処理し、生物学的意味を理解するためのコンピューター科学の手法。GO と KEGG は生物学的過程や分子機能のカテゴリを定義し、遺伝子の関連性やシグナル伝達経路を解析できる。
qRT-PCR	定量的リアルタイム PCR	転写物の量を定量化するための PCR の方法。リアルタイムで反応の進行をモニタリングし、定の遺伝子の発現レベルを定量化し、遺伝子発現の変化を迅速かつ正確に解析する。

Western blot	ウェスタンブロッティング	タンパク質を分析し、その量とサイズを特定する実験手法。
ELISA methods	ELISA 法	血清、尿、組織抽出物などの試料中の特定のタンパク質や分子を定量化するための方法。
mRNA	mRNA	DNA から情報を転写し、細胞質内でタンパク質合成に関与する RNA の一種。遺伝子の転写産物として細胞内でタンパク質合成の指示を持つ。
signaling pathways	シグナル伝達経路	細胞内で情報を伝達し、特定の生物学的応答を引き起こす化学的/生物学的プロセス。上流から下流へとシグナルを伝達する一連の分子イベント。細胞の応答を調整する重要なメカニズム。
upstream signaling pathways	上流シグナル伝達経路	シグナル伝達経路の初期段階に関与する分子やプロセスのこと。細胞内のさまざまな分子や酵素を介して伝達される経路の最初の部分。
downstream targets	下流標的	上流シグナル伝達経路によって活性化された後に影響を受ける分子やプロセスのこと。シグナルが伝達された結果として、特定の遺伝子の発現が変化したり、特定のタンパク質が活性化されたりする。
TLR4	Toll 様受容体 4	細胞外からの刺激（例えば LPS など）を受け取ってシグナルを伝達し始める上流のプロセス。下流標的（IL-6、IL-18、IL-1 $\beta$ 、CCL2、CXCL1）の発現や機能を変化させる。
NF- $\kappa$ B p65	NF- $\kappa$ B p65	NF- $\kappa$ B（核因子 $\kappa$ B）シグナル伝達経路の重要な構成要素。細胞質内に存在し、外部からの刺激や炎症性サイトカインのシグナルに応答して核に移行し、そこで様々な遺伝子の転写を促進する（=炎症性遺伝子の発現を調節する）。
Caspase1	カスパーゼ-1	アポトーシス（細胞死）や炎症応答を制御するために重要なプロテアーゼ（タンパク質を分解する酵素）。
NLRP3 inflammasome	NLRP3 インフラマソーム	炎症性応答を制御する複合体の 1 つ。細胞内に存在し、異物や細菌などの外部からの刺激に応答して活性化される。
IL	インターロイキン	サイトカイン（細胞間通信分子）の一種。リンパ球や食細胞（マクロファージ）が分泌し、免疫系細胞の分化、増殖、細胞死に働く。30 種類以上ある。
IL-6	インターロイキン-6	炎症性サイトカインの一種。免疫応答の調節、急性炎症反応の開始、白血球の増殖、炎症性サイトカイン産生の促進をする。
IL-18	インターロイキン-18	炎症反応や免疫応答における重要な役割を果たすタンパク質。炎症反応の誘導をする。
IL-1 $\beta$	インターロイキン-1 $\beta$	炎症性や免疫応答における主要な調節因子。炎症性サイトカインとしての役割としては、白血球の遊走を誘導し、他の炎症性因子の産生を促進し、炎症反応を増強する。
CCL2、CXCL1	CCL2、CXCL1	ケモカインとして知られる化学シグナルタンパク質。炎症や免疫細胞の遊走を促進し、炎症部位への細胞の移動を誘導する。
chemokine	ケモカイン	サイトカインの一種。白血球の遊走を誘導するタンパク質。異なる種類の細胞が必要な場所に移動するのを助け、炎症反応や免疫応答において、免疫細胞が感染部位や損傷した組織に移動し、炎症や組織修復のプロセスを調節する。
TLR4-mediated signaling pathway	TLR4 媒介シグナル伝達経路	細菌成分などの病原体の存在を感知し、TLR4 受容体を介して活性化され、炎症性サイトカインの産生を誘発し、炎症応答を引き起こす細胞内シグナル伝達経路。
inflammatory cytokines	炎症性サイトカイン	炎症反応や免疫応答の調節に関与するサイトカインの一群。
	サイトカイン	細胞間の情報伝達作用を持ち、免疫反応の調整を行うタンパク質のこと。熱を出す、炎症を起こす、血圧を上げるなど様々な反応を引き起こし、身体に侵入した細菌やウイルス等の異物を排除しようとする。

