

引用元 URL	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38915069/		
学術雑誌	Biological Research	掲載年	2024
研究施設	天津市眼科研究所、天津中医药大学附属南開中医院眼科	研究国	中国
題名	Molecular hydrogen promotes retinal vascular regeneration and attenuates neovascularization and neuroglial dysfunction in oxygen-induced retinopathy mice		

1分で読める研究のポイント

水素吸入は網膜症において血管再生と神経保護の両方を安全に実現する

- ✦ 酸素に曝露した網膜症マウスモデルに水素ガスを吸入させ、網膜血管や神経グリア細胞の機能を観察した研究。
- ✦ 遺伝子発現解析や免疫/組織染色により、水素治療による血管再生（正常な血管の修復）の促進と新生血管形成（病的な網膜血管の過剰増殖）の抑制、グリア細胞保護効果が実証された。
- ✦ 従来の治療法（抗 VEGF 薬、レーザー治療）は合併症や副作用を伴う一方、水素ガスは酸化ストレスを軽減し、正常な血管形成と神経保護の両方をより安全に実現できる。

Abstract (原文と翻訳)

Background: Retinopathy of Prematurity (ROP) is a proliferative retinal vascular disease occurring in the retina of premature infants and is the main cause of childhood blindness. Nowadays anti-VEGF and retinal photocoagulation are mainstream treatments for ROP, but they develop a variety of complications. Hydrogen (H₂) is widely considered as a useful neuroprotective and antioxidative therapeutic method for hypoxic-ischemic disease without toxic effects. However, whether H₂ provides physiological angiogenesis promotion, neovascularization suppression and glial protection in the progression of ROP is largely unknown. This study aims to investigate the effects of H₂ on retinal angiogenesis, neovascularization and neuroglial dysfunction in the retinas of oxygen-induced retinopathy (OIR) mice.

【背景】未熟児網膜症（Retinopathy of Prematurity, ROP）は、早産児の網膜に生じる増殖性の網膜血管疾患で、子供の失明の主な原因である。現在、ROP 治療には抗 VEGF 薬や網膜光凝固が主流だが、さまざまな合併症が発生することがある。一方、水素（H₂）は、低酸素虚血性疾患に対する神経保護と抗酸化治療法として広く有用とされており、毒性がないにもかかわらず、ROP 進行において H₂ が生理的な血管新生を促進し、新生血管を抑制し、神経グリア細胞を保護するかどうかはほとんど知られていない。この研究では、酸素誘発網膜症（OIR）モデルマウスの網膜において、H₂ が網膜の血管新生、新生血管形成、神経グリア機能障害にどのような影響を与えるかを調査した。

Methods: In this study, mice that were seven days old and either wild-type (WT) or Nrf2-deficient (Nrf2^{-/-}) were exposed to 75% oxygen for 5 days and then returned to normal air conditions. Different stages of hydrogen gas (H₂) inhalation were administered. Vascular obliteration, neovascularization, and blood vessel leakage were analyzed and compared. To count the number of neovascularization endothelial nuclei, routine HE staining of retinal sections was conducted. Immunohistochemistry was performed using DyLight 594 labeled GSL I-isolectin B4 (IB4), as well as primary antibodies against proliferating cell nuclear antigen (PCNA), glial fibrillary acidic protein (GFAP), and Iba-1. Western blots were used to measure the expression of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), vascular endothelial growth factor (VEGF), Notch1, Dll4, and HIF-1 α . Additionally, the expression of target genes such as NQO1, HO-1, Notch1, Hey1, Hey2, and Dll4 was measured. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) treated with H₂ under hypoxia were used as an in vitro model. RT-PCR was used to evaluate the mRNA expression of Nrf2, Notch/Dll4, and the target genes. The expression of reactive oxygen species (ROS) was observed using immunofluorescence staining.

【方法】生後 7 日の野生型 (WT) と Nrf2 欠損 (Nrf2^{-/-}) マウスを使用し、75%の酸素に 5 日間さらした後、通常の空気条件に戻した。さまざまな段階で水素ガス (H₂) を吸入させた。血管閉塞、新生血管形成、血管漏出を分析し比較した。新生血管内皮核の数を数えるため、網膜切片の HE 染色を行なった。また、DyLight 594 で標識された GSL I-アイソレクチン B4 (IB4) や、増殖細胞核抗原 (PCNA)、グリア線維性酸性タンパク質 (GFAP)、Iba-1 に対する一次抗体を用いて免疫組織化学を行なった。さらに、Nrf2、血管内皮成長因子 (VEGF)、Notch1、Dll4、HIF-1 α の発現をウエスタンブロットで測定した。加えて、NQO1、HO-1、Notch1、Hey1、Hey2、Dll4 などの標的遺伝子の発現も評価した。低酸素状態で水素処理されたヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を in vitro モデルとして使用し、RT-PCR で Nrf2、Notch/Dll4、標的遺伝子の mRNA 発現を評価した。活性酸素種 (ROS) の発現は免疫蛍光染色で観察した。

Results: Our results indicate that 3-4% H₂ does not disturb retinal physiological angiogenesis, but ameliorates vaso-obliteration and neovascularization in OIR mice. Moreover, H₂ prevents the decreased density and reverses the morphologic and functional changes

in retinal astrocytes caused by oxygen-induced injury. In addition, H₂ inhalation reduces microglial activation, especially in the area of neovascularization in OIR mice. H₂ plays a protective role in vascular regeneration by promoting Nrf2 activation and suppressing the Dll4-induced Notch signaling pathway in vivo. Also, H₂ promotes the proliferation of HUVECs under hypoxia by negatively regulating the Dll4/Notch pathway and reducing ROS levels through Nrf2 pathway aligning with our findings in vivo. Moreover, the retinal oxygen-sensing mechanisms (HIF-1 α /VEGF) are also involved in hydrogen-mediated retinal revascularization and neovascularization suppression.

【結果】3-4%の H₂ は網膜の生理的な血管新生を妨げることなく、OIR マウスにおいて血管閉塞および新生血管形成を改善した。さらに、H₂ は酸素誘発性の網膜星状細胞の密度減少と形態的・機能的変化を予防し、これを逆転させた。H₂ 吸入は、特に新生血管領域において、ミクログリアの活性化を減少させた。H₂ は、Nrf2 の活性化を促進し、Dll4 誘導の Notch シグナル伝達経路を抑制することで、血管再生に保護的な役割を果たした。また、H₂ は低酸素下で HUVEC の増殖を促進し、体内での結果と一致する形で、Dll4/Notch 経路を負に調節し、Nrf2 経路を介して ROS レベルを低下させた。さらに、網膜の酸素感知機構 (HIF-1 α /VEGF) も水素による網膜再血管新生と新生血管抑制に関与していることが示された。

Conclusions: Collectively, our results indicate that H₂ could be a promising therapeutic agent for POR treatment and that its beneficial effect in human ROP might involve the activation of the Nrf2-Notch axis as well as HIF-1 α /VEGF pathways.

【結論】総じて、H₂ は ROP 治療における有望な治療薬となる可能性があり、その有益な効果は Nrf2-Notch 軸と HIF-1 α /VEGF 経路の活性化に関連している可能性が示された。

Keywords: Dll4; HIF-1 α ; Notch; Nrf2; Angiogenesis 血管新生; H₂ 水素; OIR 酸素誘発網膜症; Retinal glia cell 網膜グリア細胞; Revascularization 再血管新生; neovascularization 新生血管形成.

© 2024. The Author(s).

Conflict of interest statement: The authors declare that they have no conflict of interest. 【利益相反】なし

英語	日本語	説明
Retinopathy of Prematurity (ROP)	未熟児網膜症	早産児の網膜で異常な血管増殖が生じる疾患で、失明の主な原因になる。
proliferative retinal vascular disease	網膜血管疾患	網膜で異常な血管増殖が起こり、視力障害を引き起こす疾患の総称。
anti-VEGF	抗 VEGF	血管内皮成長因子 (VEGF) の作用を抑える薬剤。新生血管形成を抑制するため、ROP 治療に使用される。
vascular endothelial growth factor (VEGF)	血管内皮成長因子	血管新生を促進するタンパク質で、ROP の新生血管形成に関与する。低出生体重児への使用には成長発達への影響や、脳、肺、心臓などの血管形成に問題が生じるリスクが懸念されている。
retinal photocoagulation	網膜光凝固	レーザーを用いて網膜の一部を焼き、異常な血管の成長を抑制する治療法。副作用として正常な網膜組織が損傷され視野が狭くなる、暗い場所での視覚が低下する、などが起こることがある。
hypoxic-ischemic disease	低酸素虚血性疾患	酸素不足や血流不足により、臓器や組織が損傷を受ける病態。ROP の原因にも関与。
retinal angiogenesis	網膜血管新生	網膜に新たな血管が形成される過程。ROP では異常に進行することが多い。
neovascularization	新生血管形成	病的に新しい血管が異常形成される現象。
neovascularization endothelial nuclei	新生血管内皮核	新生血管の内皮細胞の核。これを数えることで、血管増殖の程度が評価される。
neuroglial dysfunction	神経膠機能障害	グリア細胞の機能異常。神経細胞のサポートが不十分になり、網膜に損傷を与える。
glial fibrillary acidic protein (GFAP)	グリア線維性酸性タンパク質	神経膠細胞に特異的に存在するタンパク質で、グリア細胞の活性化の指標。
NF-E2-related factor 2 (Nrf2)	NF-E2 関連因子 2	酸化ストレスに対する細胞の防御機構を調整する転写因子で、抗酸化反応を促進する。
GSL I-isolectin B4 (IB4)	GSL I-アイソレクチン B4	血管内皮細胞に結合するタンパク質。血管構造の観察に用いられる。
proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	増殖細胞核抗原	細胞分裂時に発現するタンパク質で、細胞増殖の指標として用いられる。
Iba-1	Iba-1	ミクログリア (免疫細胞) のマーカー。炎症反応や神経損傷の評価に用いられる。
Notch1	Notch1	細胞間のシグナル伝達に関与するタンパク質で、血管形成や神経細胞の発達を調節する。
Dll4	Dll4	Notch シグナル伝達経路のリガンドで、血管新生の調整に重要。
HIF-1 α	低酸素誘導因子 1 α	酸素不足に反応して発現する因子。血管新生や細胞生存に関与する。
Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)	ヒト臍帯静脈内皮細胞	血管内皮細胞のモデルとして使用される細胞。
reactive oxygen species (ROS)	活性酸素種	細胞にダメージを与える酸素由来の分子。酸化ストレスに関連する。
HE staining	HE 染色	組織学的な解析で一般的に使用される染色法。細胞核や細胞質の観察に用いられる。
DyLight 594	DyLight 594	蛍光標識の一種で、特定のタンパク質や細胞構造の可視化に使用される。
RT-PCR	逆転写ポリメラーゼ連鎖反応	RNA を DNA に逆転写し、その後特定の遺伝子の量を測定する方法。
immunofluorescence staining	免疫蛍光染色	特定のタンパク質を蛍光標識抗体で染色し、蛍光顕微鏡で観察する方法。
Western blots	ウェスタンブロット	タンパク質の発現量や分子量を調べるための分析法。

