

引用元 URL	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40860880/		
学 術 雑 誌	Frontiers in Pharmacology	掲 載 年	2025
研 究 施 設	南京中医薬大学、南京中医薬大学附属病院 他	研 究 国	中国
題 名	Hydrogen gas (H₂) delivered by intraperitoneal injection alleviated methionine- and choline-deficient diet-induced metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease in mice via inhibiting GSDMD- and GSDME-mediated pyroptosis		

1分で読める研究のポイント

水素ガス腹腔内注射によるマウス脂肪肝改善効果

👉 マウス脂肪肝モデルに、14 日間にわたり毎日、腹腔内注射で水素ガスを投与し、肝障害や炎症が改善するかを調べた研究。

👉 水素ガスの腹腔内注射により、あらゆる側面から脂肪肝が改善した。

- ・ 肝機能改善： ALT/AST 低下。
- ・ 脂肪肝の改善： HE 染色/Oil Red O 染色で脂肪蓄積が減少。
- ・ 線維化の抑制： Masson 染色でコラーゲン沈着減少。
- ・ 酸化ストレス軽減： MDA や 3-NT 低下、GSH 増加。
- ・ 炎症の抑制： TNF- α , IL-1 β , IL-18 低下。
- ・ 炎症性細胞死の減少： GSDMD/GSDME の切断抑制を確認。

Abstract (原文と翻訳)

Background: Hydrogen gas (H₂), which is the lightest and diffusible gas molecule, has strong abilities to alleviate excessive oxidative stress, inflammation, and apoptosis. Inhalation of H₂ is beneficial for preventing the damage of the lung, heart, brain, liver, kidneys, and many other organs. However, the effect of intraperitoneal injection of H₂ on metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) is unclear.

【背景】水素ガス (H₂) は、最も軽く拡散性の高いガス分子であり、過剰な酸化ストレス、炎症、アポトーシスを緩和する強力な作用をもつ。水素ガス吸入は、肺、心臓、脳、肝臓、腎臓、その他多くの臓器の損傷予防に有益である。しかし、H₂の腹腔内注射が代謝異常関連脂肪性肝疾患 (MASLD) に与える効果については不明である。

Objective: The aim of this study is to investigate whether intraperitoneal injection of H₂ can improve MASLD, and if so, what are the key innate immune mechanisms involved?

【目的】H₂の腹腔内注射が MASLD を改善できるかどうか、またその際に関与する主要な自然免疫メカニズムを明らかにすること。

Methods: The MASLD mouse model was established by feeding a methionine- and choline-deficient (MCD) diet for 3 weeks. H₂ was daily given by intraperitoneal injection since the eighth day of MCD diet feeding, and lasted for 2 weeks. Serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were examined to evaluate liver injury. Hematoxylin and eosin (H&E) staining, Oil Red O staining, qPCR analysis of hepatic lipid metabolism genes, and detection of hepatic triglyceride (TG) levels were performed to evaluate hepatic steatosis. Masson trichrome staining and Collagen-I and Collagen-III protein levels were used to evaluate liver fibrosis. The liver 3-nitrotyrosine (3-NT) was detected by immunoblotting and immunofluorescence, and the levels of malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) were measured using kits to evaluate redox homeostasis. The activation of TLR4-mediated innate immune signaling and pyroptosis were tested by immunoblotting and immunofluorescence. Moreover, hepatic protective effect and anti-pyroptosis effect of H₂ were further confirmed by H₂-rich DMEM-treated HepG2 cells in vitro.

【方法】MASLD マウスモデルは、3 週間にわたりメチオニンとコリン欠乏 (MCD) 食を与えることで作製した。MCD 食開始から 8 日目以降、2 週間にわたり毎日 H₂を腹腔内注射した。肝障害の評価には血清アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) とアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) を測定した。肝脂肪変性評価には、H&E 染色、Oil Red O 染色、肝脂質代謝関連遺伝子の qPCR 解析、肝トリグリセリド (TG) 測定を行った。肝線維化は、マッソントリクローム染色と Collagen-I, III のタンパク質レベルで評価した。肝臓の 3-ニトロチロシン (3-NT) はイムノブロットングと免疫蛍光法で検出し、マロンジアルデヒド (MDA) と還元型グルタチオン (GSH) はキットで測定して酸化還元恒常性を評価した。さらに、TLR4 を介する自然免疫シグナルとパイロトーシスの活性化を免疫ブロットングと免疫蛍光で解析した。H₂の肝保護効果と抗パイロトーシス効果を、H₂豊富な DMEM で処理した HepG2 細胞を用いて in vitro でも確認した。

Results: Supplementing with H₂ by intraperitoneal injection protected MCD diet-fed mice against hepatic steatosis and fibrosis by down-regulating de novo lipogenesis and fatty acid uptake genes, as well as hepatic Collagen-I and Collagen-III protein levels, while up-regulating lipid export genes. Mechanistically, H₂ modulated hepatic redox homeostasis by suppressing 3-NT and MDA levels, while increasing the reduced GSH levels. Subsequently, reactive oxygen species (ROS)-related innate immune signaling, including the

expression of TLR4, and the activation of NF- κ B, ERK1/2, p38 MAPK, and JNK in the liver, were all inhibited by H2 treatment. These further contributed to inhibiting the expression of TNF- α , IL-1 β , and IL-18 in the liver. The maturation of IL-1 β and IL-18, the full-length of the classical pyroptosis trigger GSDMD, and the cleavage of GSDMD processed by Caspase-1 in NLRP3 inflammasome (including NLRP3, ASC, Caspase-1) were all blocked by H2. In addition, H2 decreased both the full-length and cleaved forms of Caspase-11, Caspase-8, Caspase-3 and GSDME, and thus inhibiting the non-canonical pyroptosis signaling in the liver of MASLD mice. The anti-pyroptosis effects of H2 in vitro were further confirmed by the reduced expression of inflammatory cytokines, the decreased full-length and cleaved forms of GSDMD and GSDME, and the reduced number of HepG2 cells with pyroptotic morphology.

【結果】H₂を腹腔内注射すると、MCD食を与えたマウスの肝脂肪変性と線維化が抑制され、脂肪酸新生や取り込み関連遺伝子と Collagen-I/III タンパク質がダウンレギュレーションされ、脂質輸送関連遺伝子はアップレギュレーションされた。メカニズム的には、H₂は肝臓の 3-NT と MDA レベルを抑制し、GSH レベルを上昇させることで酸化還元恒常性を調節した。その結果、TLR4 の発現や NF- κ B、ERK1/2、p38 MAPK、JNK の活性化を含む活性酸素種 (ROS) 関連自然免疫シグナルが抑制された。これにより、肝臓における TNF- α 、IL-1 β 、IL-18 の発現が低下した。さらに、IL-1 β と IL-18 の成熟、古典的パイロトーシスのトリガーである GSDMD 全長タンパク質、NLRP3 インフラマソーム (NLRP3, ASC, Caspase-1) により Caspase-1 を介して切断される GSDMD の断片化がすべて阻害された。また、Caspase-11, Caspase-8, Caspase-3, GSDME の全長・切断型タンパク質の両方が減少し、肝臓における非古典的パイロトーシス経路も抑制された。さらに、H₂の抗パイロトーシス効果は in vitro の HepG2 細胞でも確認され、炎症性サイトカインの発現低下、GSDMD と GSDME の全長・切断型の減少、パイロトーシス形態を示す細胞数の減少が観察された。

Conclusion: H2 is an anti-pyroptosis gas molecule, intraperitoneal injection of H2 is a novel therapeutic strategy for MASLD that deserves further investigation.

【結論】H₂は抗パイロトーシス作用をもつガス分子であり、H₂の腹腔内注射は MASLD に対する新しい治療戦略となり得ることが示され、さらなる研究が必要である。

Copyright © 2025 Chen, Wang, Guo, Lu, Suo, Li, Deng, Chen, Dai, Zhang, Xu, Su, Yang, Yang, Yan, Liu and Zhang.

Conflict of interest statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest. 【利益相反】なし

英語	日本名	説明
metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD)	代謝異常関連脂肪性肝疾患	代謝の異常によって肝臓に脂肪がたまる病気。以前は NAFLD と呼ばれていた。
methionine- and choline-deficient (MCD) diet	メチオニン・コリン欠乏食	メチオニンとコリンを含まない餌。マウス脂肪肝 (MASLD) モデルが作れる。
intraperitoneal injection	腹腔内注射	お腹の中 (腹腔) に直接注射する方法。
alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST)	アラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ	血液で測れる肝臓酵素。肝細胞が傷むと血中で増えるため、肝障害の指標になる。
H&E staining	ヘマトキシリン・エオシン染色	組織を一般的に染める方法。肝細胞の形や異常を観察できる。
Oil Red O staining	オイルレッド O 染色	脂肪を赤く染める特殊染色。肝臓にたまっている脂肪を調べる。
qPCR analysis of hepatic lipid metabolism genes	肝脂質代謝遺伝子の qPCR 解析	肝臓の脂質代謝に関わる遺伝子の働きを調べる分子生物学的手法。
hepatic triglyceride (TG) levels	肝トリグリセリド量	肝臓の中にある中性脂肪の量。
evaluate hepatic steatosis	肝脂肪化の評価	肝臓に脂肪がたまっている (脂肪肝) 状態を調べること。
Masson trichrome staining	マッソントリクローム染色	線維 (コラーゲン) を青く染め肝臓の線維化＝硬さの進行を見る。
Collagen-I, III protein levels	コラーゲン I・III タンパク質レベル	肝臓に沈着する線維タンパク質。増える＝線維化が進んでいる。
liver 3-nitrotyrosine (3-NT)	肝臓 3-ニトロチロシン	酸化ストレスによるタンパク質損傷の指標。増える＝酸化ストレスが強い。
immunoblotting and immunofluorescence	免疫ブロッティング・免疫蛍光法	特定のタンパク質を調べる実験方法。炎症や細胞死の分子を確認するのに使う。
malondialdehyde (MDA)	マロンジアルデヒド	脂質が酸化して壊れるとできる物質。酸化ストレスのマーカー。
reduced glutathione (GSH)	還元型グルタチオン	体内の代表的な抗酸化物質。多いほど細胞を酸化ストレスから守る力が強い。
evaluate redox homeostasis	酸化還元恒常性の評価	酸化 (傷つける作用) と抗酸化 (守る作用) のバランスを調べること。
TLR4-mediated innate immune signaling	TLR4 を介する自然免疫シグナル	免疫細胞が病原体やダメージを認識するときに働くシグナル。炎症を強める。
pyroptosis	パイロトーシス	炎症性の細胞死の一種。細胞が壊れると炎症物質が放出される。
H2-rich DMEM-treated HepG2 cells	水素豊富 DMEM 処理 HepG2 細胞	実験室で使う肝がん細胞 (HepG2) を水素入り培養液で育て、効果を調べた試験。
lipid export genes	脂質輸出関連遺伝子	肝臓から脂肪を外へ出す働きを持つ遺伝子。活性化すると脂肪肝が改善し易い。
TNF- α , IL-1 β , IL-18	TNF- α , IL-1 β , IL-18	炎症性サイトカイン。体内で炎症を引き起こすタンパク質。
TLR4	トール様受容体 4	自然免疫のセンサー。刺激されると炎症が始まる。
NF- κ B, RK1/2, p38 MAPK, JNK	NF- κ B, RK1/2, p38 MAPK, JNK	炎症関連シグナル伝達分子。細胞内で炎症やストレス応答を起こす分子経路。
NLRP3, ASC, Caspase-1	NLRP3, ASC, Caspase-1	炎症を強め、パイロトーシスを誘導するたんぱく質群。
Caspase-11, Caspase-8, Caspase-3	カスパーゼ群	細胞死を調節する酵素。非典型的パイロトーシスやアポトーシスに関与。
GSDMD and GSDME	ガスダーミン D・E	パイロトーシスを起こす「穴あけタンパク」。切断されると細胞膜に穴を開けて炎症を引き起こす。

(A) 肝臓の H&E 染色、(B) Oil Red O 染色では、H₂の低用量・高用量のいずれもが MCD 食による肝脂肪化を軽減したことを示した。
 (C) 脂肪化のグレードスコア (各群 n=8 匹)。 (D) 肝組織中の TG 量、(E) 血清 ALT 値、(F) 血清 AST 値 (各群 n=8 匹)。
 (G) *Acaca*、(H) *Fasn*、(I) *CD36*、(J) *Cpt1α*、(K) *Fabp1*、(L) *Acox*、(M) *Ppar-α*、(N) *Mtp*、(O) *Apob* の相対的 mRNA 発現量 (*Gapdh* 比、各群 n=3 匹)。 脂肪化グレードスコアのデータは中央値±四分位範囲で表され、その他の結果は平均値±標準偏差で表される。

