

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月15日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08885

研究課題名(和文)一酸化炭素の脳毒性発現におけるNADPH oxidaseの役割

研究課題名(英文)Role of NADPH oxidase on brain damage due to carbon monoxide

研究代表者

原 修一 (Hara, Shuichi)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70208651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：一酸化炭素中毒による脳損傷に関与する脳内の活性酸素(特に細胞毒性の強いヒドロキシルラジカル)の生成促進は、cAMPシグナル伝達系によって活性化されるRac (RAS-related G3 botulinus toxin substrate)依存性NADPH oxidaseを介すること、また、これとは異なるレニン-アンジオテンシン(RA)系の活性化を介することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、一酸化炭素(CO)中毒による脳損傷に深く関与する脳内活性酸素の生成には、cAMPシグナル伝達系経由のRac依存性NADPH oxidase活性化を介する経路だけでなく、これとは異なるレニン-アンジオテンシン系の活性化を介する経路も存在することが明らかとなった。そのため、臨床で広く使用され、安全性も確立されているアンジオテンシンII受容体遮断薬およびアンジオテンシン変換酵素阻害薬によるCO中毒治療の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Carbon monoxide (CO) poisoning stimulates generation of reactive oxygen species, such as cytotoxic hydroxyl radical (OH), which plays a role in brain damage due to CO poisoning. The present results suggest that OH generation may be mediated through activation of NADPH oxidase (NOX) isoforms dependent on Rac (RAS-related G3 botulinus toxin substrate), such as NOX1 and NOX2, via cAMP signaling pathways and through activation of renin-angiotensin system (RAS), which is independent of the cAMP signaling pathways followed by NOX activation. Interference with the RAS with angiotensin II type 1 receptor antagonists or angiotensin converting enzyme inhibitors, which are clinically used with high safety, might be a novel therapeutic strategy for patients with CO poisoning.

研究分野：中毒学

キーワード：一酸化炭素中毒 活性酸素 ヒドロキシルラジカル ラット線条体 NADPH oxidase アンジオテンシンII

## 1. 研究開始当初の背景

一酸化炭素(CO)が一般生活の中で発生する身近な強毒性のガスであることはよく周知されているにもかかわらず、不注意などによる偶発的なCO中毒の事例が、頻繁にニュース報道されている。また、インターネットを介して、COが集団自殺や自殺を装った他殺のツールとして利用された事例は、センセーショナルに報道されたために“CO中毒”が衆目を集めたことは記憶に新しい。実際、CO中毒の発生頻度は高く、我が国で報告される中毒の約半数を占め(NEWエッセンシャル法医学、高取監修、医歯薬出版、2012)その傾向は多くの国々でも同様である(Varmaら、Handbook of toxicology of chemical warfare agents. Academic Press;p217,2009)。急性CO中毒では、死亡を免れた患者が遅発性の健忘やパーキンソン病様の神経症状を呈することから、急性中毒時の初期治療法に対する関心が非常に高く、そのため、脳におけるCOの毒性発現作用の機序について多くの研究がなされてきた。COが血液中のヘモグロビン(Hb)と結合してCOHbを形成し、血液から組織への酸素輸送を阻害することから、COの毒性機序は主に低酸素によるものと考えられ、血液中のCOHbレベルがCO中毒の重要な指標として臨床的に利用されてきた。確かに、短時間に起こる急性中毒死においては、低酸素がその死に大きく貢献するものと考えられるが、CO中毒による神経症状が必ずしもCOHbレベルとパラレルではないことから(Hampson & Hauff, Am J Emerg Med 26:665,2008)、CO毒性は、COHb形成に起因する低酸素よりも遊離したCO分子それ自体の作用に起因することが示唆された(Ernst & Zibrak, N Engl J Med 339:1603,1998)。研究代表者らが行ったラットの研究では(Arch Toxicol 85:1091,2011)、(1)COHbは、曝露したCO濃度(1000ppmおよび3000ppm)に依存して、それぞれ約50%および70%を超えるレベルまで上昇してプラトーに達し、特に後者では高COHbレベルが維持される、(2)この場合、脳(線条体)の酸素分圧の低下もプラトーに達して維持される、(3)このような状態にもにもかかわらず直ちに死亡することはない、(4)いずれのCO濃度においても、曝露中止後の減少過程にあるCOHbは、同レベルとなる(すなわち、CO曝露中止後のCOHbレベルは、必ずしも曝露CO濃度を反映しない)。このような動物実験の結果は、上述の臨床知見をある程度裏付けるものである。

最近、脳虚血やパーキンソン病だけでなく急性CO中毒のモデル実験動物において、活性酸素種の中のヒドロキシルラジカル( $\cdot\text{OH}$ )を特異的に捕捉して無毒化する水素(一酸化窒素(NO)も捕捉するが、その作用は $\cdot\text{OH}$ に対するものよりもはるかに弱い)(Ohsawaら、Nat Med 13:688,2007)を投与すると脳損傷が軽減できることが報告された(Sunら、Crit Care Med 39:765,2011; Shenら、CNS Neurosci Ther 19:361,2013)。これは、 $\cdot\text{OH}$ 生成がCO中毒を含む種々の脳損傷の発現機序において共通因子として大きく寄与することを示唆している。しかし、脳虚血とは異なり、CO中毒による $\cdot\text{OH}$ 生成がグルタミン酸受容体を介さないことから(Hara et al, Brain Res 1016:281;2004)、各病態における $\cdot\text{OH}$ の生成機序は、必ずしも共通ではないと考えられる。興味深いことに、ラットのCO中毒モデルにおいて $\cdot\text{OH}$ 生成は3000ppm曝露では促進されるが、1000ppmではまったく促進されない(Hara et al., Arch Toxicol 85:1091,2011)。そのため、 $\cdot\text{OH}$ 生成は重度のCO中毒によってのみ促進されるものと考えられる。研究代表者は、これまでのラット線条体 $\cdot\text{OH}$ 生成に関する研究で、次のような結果を得ている。(1)グルタミン酸系だけでなく、ドパミン系およびNO系もCO中毒による $\cdot\text{OH}$ 生成に直接関与しない(Brain Res 1016:281;2004, Toxicology 239: 136;2007)。(2)CO中毒では、ATPの細胞外への顕著な放出促進は認められないが、P2Y11-likeプリン受容体を介して細胞内セカンドメッセンジャーのcAMP生成が促進され、このcAMPの変動は、 $\cdot\text{OH}$ 生成とパラレルである(Toxicology 288:49,2011)。(3) $\cdot\text{OH}$ スカベンジャーは、COによるcAMP生成促進に影響を及ぼさない(Toxicology 288:49,2011)。(4)cAMP情報伝達系において、Protein kinase A (PKA)の活性化および阻害は、 $\cdot\text{OH}$ 生成をそれぞれ抑制および促進し、Epac(exchange protein activated by cAMP)の活性化は $\cdot\text{OH}$ 生成を促進する(Free Rad Biol Med 52: 1086,2012)。(5)CO中毒による $\cdot\text{OH}$ 生成は、PKA阻害によりさらに促進され、PKAとEpacの両者の阻害により抑制される(Free Rad Biol Med 52: 1086,2012)。(6)CO中毒による $\cdot\text{OH}$ 生成およびcAMP生成を促進するフォルスコリン投与による $\cdot\text{OH}$ 生成は、いずれもNADPH oxidase (NOX)阻害により抑制される(Free Rad Res 48:1322,2014)。(7)1000ppmではなく3000ppm COによるCO中毒で、NOX familyの1つであるDual oxidase 2 (DUOX2)のmRNAが増加する(未発表)(DUOX1 mRNAは変動しないが、cAMPによりその活性化が制御されうる; Rigutto et al, J Biol Chem 284:6725,2009)。(8)DUOX2のsiRNA投与によりCO中毒による $\cdot\text{OH}$ 生成が抑制される(未発表)。このような知見から、重度のCO中毒のみによって生成が促進される $\cdot\text{OH}$ は、P2Y11-like受容体活性化によるcAMP生成促進を介し、cAMP情報伝達系を經由して最終的にはDUOXにより生成されると推察された。DUOXの関与を確認するために、この酵素の活性化には関与しないが、いくつかのNOX isoformの活性化に必要な因子、Rac1(RAS-related C3 botulinus toxin substrate 1)の阻害薬を用いて予試験を行ったところ、CO中毒による $\cdot\text{OH}$ 生成が非常に強く抑制された。これは、DUOX2ではなくNOXの関与を示唆しており、上述の仮説と矛盾する。確かに、Epac経路の情報伝達系下流にはRac1が位置する(Birukovaら、Microvasc Res 79:128,2010)。

一方、研究代表者は、PKAを阻害した場合、それのみでは $\cdot\text{OH}$ 生成を促進しない1000ppm COでも $\cdot\text{OH}$ 生成が著明に促進されることを見出した(未発表)。これは、ある病態や遺伝的な条件などによっては、 $\cdot\text{OH}$ 生成の閾値が低下して、低濃度のCOでも脳に対する毒性が強まることを

示唆している。研究代表者らは、CO 中毒死が最も疑われるにもかかわらず血中 COHb が致死レベルに達していなかったことから死因の診断に苦慮した事例を経験している（向井ら、法医学の実際と研究 41:207,1998）。このような事例では CO 毒性の閾値が低下していた可能性が考えられることから、CO 毒性の発生機序をさらに明らかにすることが必要である。本研究は、CO の脳毒性に大きく関与する・OH 生成について cAMP 情報伝達系下流における機序を明らかにするために行うものである。

## 2. 研究の目的

CO の脳に対する毒性発現には、活性酸素の中で最も毒性が強い・OH が重要な役割を担う。この・OH は cAMP 情報伝達系を介して生成され、重度の CO 中毒によってのみ認められる。本研究の目的は、cAMP 情報伝達系下流に位置すると考えられる NOX family の・OH 生成における役割とその制御機構を検討することにより CO の脳毒性発現機序を明らかにし、死因診断、さらに臨床での治療戦略に情報を提供することである。

## 3. 研究の方法

- (1) 動物：Sprague-Dawley 系雄性ラット（体重 235～265g）を購入して使用した。
- (2) CO 曝露：既報（Hara et al., Arch. Toxicol. 85:1091;2011）と同様に、マイクロダイアリシス実験（下述）で用いる円筒形プラスチックケージにラットを入れ、1000 ppm あるいは 3000 ppm の CO を含む空気を導入して 40 分間曝露した。
- (3) マイクロダイアリシス：既報（Hara et al., Arch. Toxicol. 85:1091;2011）と同様に、ガイドカニューレを通してマイクロダイアリシス用プローブを線条体（左側あるいは両側）に刺入、固定し、フリーズピッキングの状態で行った。・OH および cAMP は、それぞれ既報（Hara et al., Brain Res. 1016:281;2004 および Toxicology 288:49;2011）と同様にして測定した。Angiotensin II は、両側の線条体に刺入した PEP-8-03 透析プローブを 0.15% bovine serum albumin 添加マイクロダイアリシス用灌流液で灌流して回収し、市販の RayBio Human/Mouse/Rat AT-II EIA Kit により測定した。
- (4) ウェスタンブロット：CO 曝露終了後速やかにペントバルビタール投与による深麻酔下で左心室からカニューレを挿入して冷生理食塩水で脳を灌流、摘出後、氷上で線条体を採取し、-80℃で保存した。この線条体を、タンパク分解酵素阻害薬カクテルを含む市販のタンパク抽出用試薬でホモジナイズし、遠心分離後の上清を市販のキットを用いてウェスタンブロットを行なった後、画像解析にて、該当するタンパクの分子量のバンドを GAPDH に対して標準化して定量した。

## 4. 研究成果

- (1) CO 曝露による DUOX1 および DUOX2 タンパク量の変動  
CO 曝露によりラット線条体の DUOX1 mRNA は変動せず、DUOX2 mRNA 発現は抑制されるというこれまでの結果に基づき、これらのタンパク量に対する CO 曝露の効果を検討したところ、いずれのタンパク量も CO 濃度の上昇に伴って減少し、DUOX2 タンパク量減少は、3000 ppm CO 曝露で統計学的に有意となった。
- (2) Ca<sup>2+</sup>-free 条件下における CO 曝露による・OH  
DUOX1 および 2 の活性化は Ca<sup>2+</sup>依存性であると報告されていることから（Altenhöfer ら, Antioxid. Redox. Signal. 23:406;2015; Nayernia ら, Antioxid. Redox. Signal. 20:2815;2014）、Ca<sup>2+</sup>-free の条件下で 3000 ppm CO による・OH 生成を観察したが、著明な影響は認められなかった。
- (3) CO 曝露による・OH 生成に対する chelerythrine および SB230580 の効果  
DUOX2 活性化の上流に位置する protein kinase C (PKC) の阻害薬、chelerythrine および DUOX1 を upregulate する p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) 阻害薬、SB230580 はいずれも CO 曝露による・OH 生成に対して著明な影響を及ぼさなかった。
- (4) CO 曝露による・OH 生成に対する EHT1864 の効果  
NOX1～NOX3 の活性化に必要とされる Rac (Ras-related C3 botulinum toxin substrate; NOX3 活性化における Rac 依存性については未確定)（Altenhöfer ら, Antioxid. Redox. Signal. 23:406;2015; Nayernia ら, Antioxid. Redox. Signal. 20:2815;2014）の阻害剤である EHT1864 は、CO 曝露による・OH 生成を強く抑制した。この抑制効果は、非特異的 NOX 阻害剤である DPI と同程であり、EHT1864 と DPI の併用は、それぞれ単独の場合よりもさらに強い抑制効果を示した。
- (5) NOX1～NOX4 および Rac1 タンパク量に対する CO 曝露の影響  
NOX1～NOX4 タンパク量は、CO 曝露により著明には変動しなかった。Rac1 タンパク量は、曝露する CO 濃度の増加に伴い減少したが、統計学的に有意ではなかった。

(1)～(5)の結果から、NOX family の mRNA 発現は必ずしも各 isoform のタンパク発現量を反

映しておらず、DUOX1 および DUOX2 タンパク量は、CO 暴露により CO 濃度に依存して減少するのに対し、NOX1~NOX4 タンパク量は、著明には変動しないことが明らかとなった。さらに、NOX1~NOX3 の活性化に必要とされる Rac1 タンパク量も CO 濃度依存的な減少傾向を示したことから、CO は、NOX family を介して生成する活性酸素の生成を抑制する方向に作用すると考えられる。しかし、CO 暴露による $\cdot\text{OH}$ 生成は、これら NOX family の阻害薬(DPI および AEBSF)で強く抑制されるだけでなく、Rac 阻害薬によっても強く抑制された。これは、CO 暴露による $\cdot\text{OH}$ 生成には、NOX family (NOX1~NOX5 および DUOX1, DUOX2; NOX5 はラットでの発現が認められていない)の中で、NOX1~NOX3 のような Rac 依存性の isoform が介在することを示唆する。これまでの研究結果を総合すると、CO 暴露では、P2Y11-like プリン受容体活性化による cAMP 生成とそれに続く cAMP 情報伝達系の活性化を介し、最終的に Rac 依存性 NOX isoform が活性化されることにより $\cdot\text{OH}$ 生成が促進されると考えられる。しかし、この経路の最上流に位置する物質については不明であった。NOX に関しては、angiotensin II(AT-II)による活性化の報告が多い(Chan & Chan, *Antioxid. Redox. Signal.* 19:1074, 2013)。AT-II 受容体の 1 型(AT1R)および 2 型(AT2R)は、それぞれ cAMP 生成に対して抑制的およびまったく関与しない (Karnikら, *Pharmacol. Rev.* 67:754, 2015) にもかかわらず、in vitro において、培養細胞に AT-II 添加すると cAMP 生成が促進し、AT1R および AT2R 拮抗薬はこの促進を抑制すると報告されている(Afroze et al., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 308:G691, 2015; Liら, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 300:F1255, 2011; Sharma et al., *Am. J. Physiol.* 274:F623, 1998)。また、AT-II 代謝物 AT(1-7)は、MAS 受容体を介して cAMP 生成を促進するという報告もある (Karnik et al., *Br. J. Pharmacol.* 174:737, 2017)。そこで、CO 暴露による $\cdot\text{OH}$ 生成に対する AT-II 系の役割について検討した。

#### (6) CO 暴露による $\cdot\text{OH}$ 生成に対する AT1R 拮抗薬の効果

AT1R 拮抗薬、losartan および ZD7155 はいずれも CO 暴露による $\cdot\text{OH}$ 生成を用量依存的に抑制した。特に losartan は強い抑制効果を示した。Losartan を含む AT1R 拮抗薬は、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) 活性化作用を有することから、その関与について PPAR 阻害薬、SR202 を併用して検討したが、SR202 の効果は全く認められなかった。

#### (7) CO 暴露による $\cdot\text{OH}$ 生成に対する AT2R 拮抗薬および Mas 受容体拮抗薬の効果

AT2R 拮抗薬、PD123319 は、CO 暴露による $\cdot\text{OH}$ 生成を有意に抑制したが、Mas 受容体拮抗薬、A779 は、まったく影響を与えなかった。

#### (8) CO 暴露による $\cdot\text{OH}$ 生成に対する angiotensin converting enzyme (ACE) 阻害薬の効果

ACE 阻害薬、benazepril および lisinopril はいずれも用量依存的に CO 暴露による $\cdot\text{OH}$ 生成を抑制した。

#### (9) CO 暴露による線条体細胞外 AT-II の変動

AT-II は、空気のみでの暴露により若干増加し、CO 暴露によりさらに増加したが、これらの変動は統計学的に有意ではなかった。なお、測定された AT-II 濃度は、検出限界値に近いものであった。

#### (10) AT-II 線条体内投与による $\cdot\text{OH}$ 生成

AT-II を線条体内に直接投与すると、用量依存的な $\cdot\text{OH}$ 生成が観察された。しかし、 $\cdot\text{OH}$ 生成に必要な AT-II の用量は、(9)の項で測定された内因性 AT-II 濃度よりもはるかに高かった。

#### (11) AT-II 投与による $\cdot\text{OH}$ 生成に対する losartan および PD123319 の効果

AT-II 投与による $\cdot\text{OH}$ 生成は、CO 暴露による $\cdot\text{OH}$ 生成を抑制する losartan の濃度の 20 倍濃度においても抑制されなかった。また、PD123319 には AT-II 投与による $\cdot\text{OH}$ 生成に対する抑制効果は認められず、むしろ $\cdot\text{OH}$ 生成時間を延長した。

#### (12) AT-II 線条体内投与による $\cdot\text{OH}$ 生成に対する NOX 阻害薬および Rac 阻害薬の効果

非選択的 NOX 阻害薬、DPI は、AT-II による $\cdot\text{OH}$ 生成を有意に抑制したが、選択的の高い NOX 阻害薬、AEBSF にはそのような抑制効果はまったく認められなかった。また、Rac 阻害薬、EHT1864 にも抑制効果はまったく認められなかった。

#### (13) CO 暴露による cAMP 生成に対する losartan および PD123319 の効果

losartan は CO 暴露による cAMP 生成を増加させたが、統計学的に有意ではなかった。一方、PD123319 は、この cAMP 生成に対してまったく影響を与えなかった。

#### (14) forskolin 投与による $\cdot\text{OH}$ 生成に対する losartan および PD123319 の効果

cAMP 生成を促進する forskolin を線条体内投与すると $\cdot\text{OH}$ 生成が促進される(Hara et al., *Free Rad Res* 48:1322, 2014)。Losartan は、forskolin による $\cdot\text{OH}$ 生成を増加させたが、統計学的に有意ではなかった。一方、PD123319 は、この cAMP 生成に対してまったく影響を与えなかった。

(6)~(8)の結果より、CO 暴露では、AT-II 生成が促進され、AT1R および AT2R を介して $\cdot\text{OH}$ 生成が促進されることが示唆された。しかし、(9)では、EIA 感度の問題から CO による AT-II 生成促進を確認することができなかった。(10)~(12)の結果から、生理学的濃度の AT-II 投与では $\cdot\text{OH}$ 生成は認められず、非生理学的な高濃度の AT-II 投与で用量依存的に $\cdot\text{OH}$ が生成されることを明らかとなった。(13)および(14)の結果を合わせて考慮すると、AT1R および AT2R を介した $\cdot\text{OH}$ 生成促進の経路には、cAMP 情報伝達系とその下流に位置する NOX の活性化は含まれない。

いものと考えられる。

以上のような知見から、重度のCO中毒における・OH生成には、purine 2Y11-like受容体 cAMP生成 cAMP情報伝達系 Rac依存性NOX活性化を介する経路に加え、これとは異なるAT-II生成AT1RおよびAT2Rを介する経路が存在するものと考えられる。これらの経路の相互作用については、さらなる検討が必要であるが、臨床的に広く使用され、安全性も確立されているAT1R拮抗薬とACE阻害薬により後者の経路を遮断して活性酸素生成を抑制することは、CO中毒患者の治療法として有望であると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

1. Hara S., Kobayashi M., Kuriwa F., Ikematsu K., Mizukami H., Hydroxyl radical production via NADPH oxidase in rat striatum due to carbon monoxide poisoning. Toxicology (査読あり) Vol.394, 63-71, 2018, doi.org/10.1016/j.tox.2017.12.002.
2. Hara S., Kobayashi M., Kuriwa F., Kurosaki K., Mizukami H., Gene expression in rat striatum following carbon monoxide poisoning. Genomics Data (査読あり) Vol.12, pp.74-75. 2017, doi.org/10.1016/j.gdata.2017.03.007.

〔学会発表〕(計 2件)

1. 原 修一、小林 正宗、栗岩 ふみ、水上 創、「急性一酸化炭素中毒によるヒドロキシルラジカル生成におけるRac依存性NADPH oxidaseの関与」、第103次日本法医学会学術全国集会(仙台プラザ)2019年6月13日
- 2.
3. Hara S., Kobayashi M., Kuriwa F., Kurosaki K., Mizukami H., Microarray analysis of gene expression in rat striatum exposed to carbon monoxide and hypoxic hypoxia. 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine. (Fukuoka, Japan) 2018年6月6日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：栗岩 ふみ

ローマ字氏名：Fumi Kuriwa

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。