

平成30年5月7日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20119

研究課題名(和文) 硫化水素代謝が低酸素環境下で細胞の代謝リプログラミングに与える影響の研究

研究課題名(英文) The impact of sulfide on metabolic reprogramming during hypoxia

研究代表者

甲斐 慎一 (Kai, Shinichi)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：30770177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、硫化水素代謝が低酸素下におけるエネルギー産生に与える影響について検討した。まず、硫化水素代謝に関わる酵素であるSulfide quinone reductase (SQR) を過剰発現させ硫化水素代謝の亢進した細胞を作成した。この細胞を用いた実験によりSQR発現量増加が低酸素下でのエネルギー産生維持に関わることを示した。

次に、マウスに硫化水素を5日間断続的に吸入させ、脳におけるSQR発現量を増加させた。通常マウスは5%酸素下では短時間で瀕死となるが、この硫化水素を吸入させたマウスは5%酸素下でも長時間生存した。硫化水素代謝亢進が低酸素に対する抵抗性獲得に関与した可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study examined the impact of sulfide on energy homeostasis during hypoxia. First, we checked energy production on hypoxia using the cells overexpressing sulfide quinone reductase(SQR), which is the important enzymes in sulfide oxidation. A series of observations suggest that the enhanced sulfide oxidation by SQR maintains energy homeostasis during hypoxia in cells.

Second, mice were exposed to hydrogen sulfide for 5 days intermittently. These sulfide-preconditioned mice exhibited marked tolerance to severe hypoxia (5% O₂) during which mice exhibit signs of severe distress. We found that SQR protein levels in brains of sulfide-preconditioned mice than that in brains of control mice. Our observations suggest that acceleration of sulfide oxidation via upregulation of SQR in the brain may confer tolerance.

研究分野：麻酔科学

キーワード：代謝 硫化水素 低酸素

1. 研究開始当初の背景

周術期には、呼吸循環動態の変化や貧血などにより組織への酸素供給が低下し、臓器を構成する細胞が低酸素に陥る危険性がある。臓器が低酸素に陥れば、臓器レベルだけでなく細胞レベルでも様々な低酸素応答が生じエネルギー需給バランスを維持するように働く。細胞レベルでは、様々な低酸素遺伝子応答を起こすことが明らかにされており、その一つには低酸素誘導性因子1 (HIF-1) の活性化を介した好気性代謝から嫌気性代謝への代謝リプログラミングがある。周術期管理において、この低酸素下での細胞内エネルギー需給バランスを維持する制御システムを理解することは重要である。

硫化水素は、一酸化窒素や一酸化炭素に次ぐ第3のガス状分子とされ、その生理薬理的な作用が明らかにされてきた。硫化水素は高用量でミトコンドリアのシトクロムCオキシダーゼを抑制しATP産生を低下させる。この機序に関して申請者は、硫化水素ドナーを用いた実験を通して硫化水素がミトコンドリア呼吸鎖の抑制を介して低酸素によるHIF-1活性化を抑制することを報告した。その一方で、近年低用量または内因性硫化水素がヒト由来培養細胞を用いた実験においてミトコンドリア呼吸鎖に電子を供給し、ATP産生を促すことが明らかになってきた。

硫化水素は Sulfide quinone reductase (SQR) によって代謝 (酸化) され、この過程で2つの電子をミトコンドリア呼吸鎖にあるコエンザイムQ (Q/QH₂) に供給する。この硫化水素を代謝し電子を供給する過程は、糖質を分解しTCA回路を経由しミトコンドリア呼吸鎖に電子を供給して電子伝達系による酸化的リン酸化を経てATP産生を行うものは別経路であり、ATP産生において新たな経路である。硫化水素はSQRにより酸化された後 sulfite (SO₃²⁻)、sulfate (SO₄²⁻) や tiosulfate (S₂O₃²⁻) に更に代謝 (酸化) されるが、代謝における律速酵素はSQRと考えられている。

SQRの活性は低酸素刺激により亢進するとの報告がある。SQR活性が上昇すればミトコンドリアへの電子供与体が増えたと考えられる。これまで硫化水素代謝の亢進による低酸素下でのエネルギー産生に与える影響については未だ明らかにされていなかった。そこで本研究では、SQR発現量を増加させ硫化水素代謝を亢進させた実験系を用い低酸素下でのエネルギー産生に与える影響を検討することとした。

2. 研究の目的

周術期には、臓器が低酸素に陥る危険があるため低酸素下におけるエネルギー需給バランス維持への理解は患者管理に不可欠である。本研究の目的は、電子供与体として硫化水素が低酸素下においてエネルギー産生に与える影響を検討し明らかにすることである。

3. 研究の方法

培養細胞を用いた *in vitro* 実験とマウスを用いた *in vivo* 実験に分けて実験を遂行した。

A) 培養細胞を用いた *in vitro* 実験

A-1 硫化水素代謝亢進させた細胞の確立
神経芽細胞由来 SH-SY5Y cell は、硫化水素代謝の律速酵素と考えられている SQR の発現量が少ない細胞である。この SH-SY5Y cell にプラスミドを用いて SQR を過剰発現させた細胞を作成した。コントロールの細胞には mock (空ベクター) を導入した。Lipofectamine による化学的手法を用いて遺伝子導入を行った。

A-2 細胞内エネルギー産生の検討

エネルギー産生に関する以下の項目について、市販のキットを用いて測定した。
ATP : Luminescent ATP detection assay kit
乳酸 : Colorimetric assay kit
NADH/NAD : NAD/NADH quantitation colorimetric kit

A-3 低酸素暴露

SH-SY5Y cell をチャンバー内で 1% 酸素または 21% 酸素下に 3 時間インキュベートさせた。

B) 実験小動物を用いた *in vivo* 実験

実験小動物として C57/BL6 マウスを用いた。

B-1 断続的な硫化水素吸入

マウスをチャンバー内に入れた後 80 ppm の硫化水素を 4 時間吸入させた。硫化水素濃度は、ポータブルのガスモニター (ITX multi-gas monitor) で適宜確認した。硫化水素の吸入前後に直腸温を各マウスで測定した。

B-2 低酸素下での二酸化炭素消費量測定

硫化水素を吸入させたマウス (硫化水素プレコンディショニングマウス) とコントロールマウスを一匹ずつチャンバー内に入れた。1 時間空気を吸入させ、二酸化炭素消費量が安定するのを待った。その後 5% 酸素に変更し、マウスの二酸化炭素消費量の変化を測定した。二酸化炭素の測定は、LI-820 CO₂ ガスアナライザーを用いた。

B-3 硫化水素関連酵素の発現量

マウスの脳と心臓を確保し、mRNA 発現量を Real time RT PCR 法で、蛋白発現量をウエスタンブロット法で解析した。検討した蛋白は以下の通りである。リファレンス遺伝子として 18S を、リファレンス蛋白として vinculin を用いた。

<解析を行った遺伝子及び蛋白>

硫化水素の合成に関わる酵素：

CBS (cystathionine β -synthase)

CSE (cystathionine γ -lyase)

3MST

(3-mercaptopyruvate sulfurtransferase)

硫化水素の代謝に関わる酵素：

SQR (sulfide quinone oxidoreductase)

TST (thiosulfate sulfurtransferase)

ETHE1 (persulfide dioxygenase)

SUOX (sulfite oxidase)

B-4 ミトコンドリア DNA 量の検討

マウスの脳と心臓のミトコンドリア DNA のコピー数を qPCR で測定した。ミトコンドリア DNA は COX1 遺伝子の発現量を、核 DNA は NDUFV1 遺伝子の発現量を求め、相対的なミトコンドリア DNA/ 核 DNA 比でコピー数を算出した。

B-5 ヘマトクリット(HCT), ヘモグロビン(Hb)値と P50 の測定

マウスをイソフルランで麻酔した後、迅速に心臓からヘパリンシリッジを用いて採血した。HCT, Hb 値は血液ガス分析器で測定した。Hb の酸素解離曲線を Hemox-analyzer で測定し、P50 を計算した。

B-6 HIF-1 標的遺伝子の発現量

HIF-1 活性を検討するために、標的遺伝子発現の解析を Real-time RT PCR 法で解析した。検討した遺伝子は、以下の通りである。リファレンス遺伝子として、18S を用いた。

<解析した HIF-1 標的遺伝子>

EPO (erythropoietin)

GLUT-1 (glucose transporter1)

HO-1 (hemoxygenase-1)

VEGF (vascular endothelial growth factor)

4. 研究成果

本研究は、硫化水素代謝が低酸素下におけるエネルギー産生に与える影響について検討した。

A: 培養細胞を用いた in vitro 実験

神経芽細胞由来 SH-SY5Y cell にプラスミドを用い SQR を過剰発現させた細胞を作成した。この細胞を用い、空ベクターを導入した SHSY5Y cell をコントロールとして、硫化水素代謝能の亢進がエネルギー産生に与える影響を検討した。

A-1 細胞内 ATP 産生量

細胞内 ATP 濃度について空ベクターを導入した細胞と SQR を過剰発現させた細胞で比較した。硫化水素ドナーである Na₂S を投与したところ、SQR を過剰発現させた細胞では ATP 濃度は増加した。また、Na₂S 投与無しの場合は ATP 濃度に両群に差を認めなかった。

この結果は、硫化水素代謝が十分に代謝できる細胞においては少量の硫化水素が電子供与体として ATP 産生に寄与することを示した。

A-2 低酸素下でのエネルギー産生の変化

両細胞を低酸素(1%酸素)下で3時間培養し、乳酸値、NADH/NAD⁺比、ATP濃度を測定した。空ベクターを導入した細胞では、低酸素下で乳酸値、NADH/NAD⁺比の上昇を認め、ATP産生は低下した。それに対し、SQRを過剰発現させた細胞では乳酸値、NADH/NAD⁺比の上昇は抑制され、ATP産生は維持された。

これらの結果は、硫化水素代謝亢進が低酸素下におけるエネルギー産生の維持に関与していることを示した。低酸素下では内因性硫化水素合成が増加ことから、ミトコンドリアへの電子供給が増えたのではないかと推測された。

< B: マウスを用いた in vivo 実験 >

C57BL6/J マウスを用いて実験を行った。

B-1 硫化水素の断続的吸入による変化

チャンバー内でマウスに 80ppm 硫化水素 4 時間暴露を 5 日間行った。第 1 日目はマウスの体温低下及び二酸化炭素産生量低下(代謝低下)を認めた。しかし、吸入毎に体温及び代謝は低下しにくくなり、第 5 日目には体温及び代謝の低下は認めなくなった。

この結果は、硫化水素を繰り返す暴露させることで、硫化水素吸入による体温及び代謝低下に抵抗性を獲得することを示した。

B-2 低酸素(5%酸素)暴露による影響

硫化水素を 5 日間吸入させたマウス(硫化水素プレコンディショニングマウス)を最後の吸入から 24 時間経過した第 6 日に重度の低酸素(5%酸素)に暴露した。空気を吸入させたマウス(コントロールマウス)を 5%酸素下に暴露したところ、30 分以内で全マウスが瀕死に陥った。それに対し、硫化水素プレコンディショニングマウスは、5%酸素に暴露した全てのマウスが生存した。

また、5%酸素環境下における代謝変化を解析するために、二酸化炭素産生量を測定した。コントロールマウスでは、低酸素に曝露後急激に二酸化炭素産生量が低下したのに対し、硫化水素プレコンディショニ

ングマウスでは、二酸化炭素産生量は 20% 酸素環境下に比べて少し低下したが維持された。

これらの結果は、硫化水素によるプレコンディショニングが低酸素に抵抗性をもたらすことを示した。また、硫化水素を吸入させても代謝が低下していないことや吸入終了から 24 時間後に低酸素に暴露していることから、この効果はこれまでに報告されている硫化水素の代謝抑制とは別の機序によるものだと考えられた。また、二酸化炭素産生量が維持されたことからミトコンドリア機能がある程度維持されていたのではないかと推測された。

B-3 硫化水素吸入による硫化水素に関する酵素の発現量変化

硫化水素プレコンディショニングマウスは硫化水素吸入による代謝低下及びその後の低酸素暴露に対し抵抗性を示した。そこで、硫化水素プレコンディショニングマウスの硫化水素代謝に関わる酵素の脳と心臓における発現量をコントロールマウスと比較した。

Real-time RT PCR を用いて mRNA 発現量を測定したところ、SQR のみ遺伝子誘導を認め、他の酵素はコントロールマウスとの差を認めなかった。

次に、ウエスタンブロット法を用いて蛋白の発現量を比較した。mRNA 発現量と同様、SQR のみ硫化水素プレコンディショニングマウスの脳で発現量増加を認め、他の酵素では変化を認めなかった。心臓においてはどの酵素も発現量に変化はなかった。

これらの結果は、硫化水素プレコンディショニングにより脳の SQR の発現量が増加していることが示された。このことから、脳の硫化水素代謝が亢進していたと推測された。

B-4 硫化水素によるミトコンドリア量の変化

硫化水素がミトコンドリア生合成を増加させるという報告があること、また低酸素下で二酸化炭素消費量は維持されていたことから、ミトコンドリア量について硫化水素プレコンディショニングマウスの脳と心臓でコントロールマウスと比較した。脳と心臓におけるミトコンドリア DNA の copy 数を測定したが、両者に差は認めなかった。

この結果は、ミトコンドリアの生合成に硫化水素プレコンディショニングは関与しておらず、低酸素暴露による二酸化炭素消費量の維持にミトコンドリアの量が関与しているわけではないと考えられた。

B-5 血液への変化の検討

硫化水素プレコンディショニングマウスが低酸素に抵抗性を獲得した原因を検討するため、赤血球増多やヘモグロビンの酸素

解離曲線の変化を検討した。硫化水素プレコンディショニングマウスから血液を確保し、HCT と Hb 値を測定した。コントロールマウスと比較したが、変化はみられなかった。また、Hb の酸素解離曲線を解析し、P50 を算出したが変化はなかった。

これらの結果は、低酸素に抵抗性を示した原因として、赤血球の増加や Hb の酸素解離曲線の移動により組織への酸素運搬能の上昇を予想したが、影響はみられなかった。

B-6 低酸素遺伝子応答の検討

遺伝子レベルでの変化の可能性を考え、低酸素遺伝子応答に重要な役割を果たす HIF-1 活性化について検討した。HIF-1 の標的遺伝子 (EPO, GLUT-1, HO-1, VEGF) の遺伝子発現量を Real time RT PCR で測定した。マウスの脳と心臓における遺伝子発現量を比較したが、両者に差はみられなかった。

この結果は、硫化水素プレコンディショニングは HIF-1 を活性化しておらず、本研究で得られたマウスの低酸素抵抗性の獲得の原因ではないと考えられた。

以上の実験結果から、次の知見を得た。

1. 硫化水素 (Na₂S) 投与で ATP 産生が増加したことから、これまでの報告通り硫化水素が ATP 産生に関与することを示した。SQR を過剰発現した細胞でしか上昇しなかったため、硫化水素が細胞内で代謝されることが必要である。

2. 低酸素下では、SQR の過剰発現により ATP 産生が維持された。硫化水素代謝の亢進は低酸素下でのエネルギー産生に影響を与えることが示された。低酸素下で増加した内因性硫化水素がミトコンドリアへの電子供給を増加させた可能性がある。

3. マウスに繰り返し硫化水素を吸入させると脳の SQR 発現量が増加し、このマウスは低酸素に抵抗性を示した。低酸素中でも二酸化炭素消費量は維持されていたため、ミトコンドリア機能は維持されていたと推測される。ただし、ミトコンドリア数は変化を示さなかった。

4. 低酸素に抵抗性を示す理由を検討したが、赤血球の増加、酸素解離曲線の変化も見られなかった。これらは、硫化水素プレコンディショニングが組織への酸素運搬能を上昇させていないことを示した。

5. HIF-1 活性化には影響を与えなかった。硫化水素プレコンディショニングは低酸素遺伝子応答に影響を与えず、硫化水素代謝の亢進が低酸素に対する抵抗性獲得の要因とはならないと推測された。

本研究では、硫化水素代謝の亢進が低酸素下におけるエネルギー産生を維持に關与することが示された。その詳細な機序については、今後の検討課題として残る。硫化水素代謝が低酸素下でのエネルギー産生に与える機序を解明することで、低酸素に対する抵抗性を獲得する方法を見出すことも期待出来る。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1) 広田喜一、甲斐慎一 . 硫化水素による低酸素シグナル修飾 別冊「医学のあゆみ」レドックス UPDATE. 2015;112-7. (査読無)

2) Thiosulfate Mediates Cytoprotective Effects of Hydrogen Sulfide Against Neuronal Ischemia. Marutani E, Yamada M, Ida T, Tokuda K, Ikeda K, Kai S, Shirozu K, Hayashida K, Kosugi S, Hanaoka K, Kaneki M, Akaike T, Ichinose F. J Am Heart Assoc. 2015; 4(11): e002125.

3) 甲斐慎一・広田喜一. 硫化水素はミトコンドリア依存的に低酸素誘導性遺伝子応答を調節する. ICU と CCU 2016; 40 (8): 549-554,医学図書出版株式会社

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

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

〔その他〕
ホームページ等

京都大学医学部附属病院麻酔科(侵襲反応制御医学講座)のホームページ、研究室案内 (<http://anesthesia.kuhp.kyoto-u.ac.jp/>)において、本研究の内容について記載している。

6. 研究組織

(1)研究代表者

甲斐慎一 (KAI, SHINICHI) 京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教
研究者番号 :

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し

(4)研究協力者

広田喜一 (HIROTA, KIICHI)
関西医科大学医学部生命科学教授
研究者番号 : 00283606