

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04147

研究課題名(和文)水溶性一酸化炭素発生剤を用いた新規毒性機序の探索

研究課題名(英文)Analysis of carbon monoxide toxicity using water-soluble CORMs

研究代表者

秋 利彦(Aki, Toshihiko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：60304474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：一酸化炭素はヘムへの酸素の結合に競合し、人体に重篤な障害をもたらす猛毒である。一方で、低濃度の一酸化炭素は生体内でも産生されており、臓器・細胞保護作用を示す。各種一酸化炭素発生剤が開発されている。水溶性一酸化炭素発生剤は投与が容易であることから注目されている。水溶性一酸化炭素発生剤であるCORM-3を高濃度(1mM)にて培養細胞に暴露すると、細胞内においてp62、細胞外においてフィブロネクチンが凝集体を形成することを見出した。p62はオートファジーの、フィブロネクチンは細胞外マトリクス形成の、それぞれ必須分子でありこれらの過程がCORM-3を高濃度で用いた場合は阻害される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一酸化炭素は近年、その毒性よりむしろ低濃度における細胞・臓器保護作用が注目を集め、各種一酸化炭素発生剤が開発されてきた。その中でも水溶性一酸化炭素発生剤であるCORM-A1、CORM-3はその実用性から注目を集めている。本研究で、CORM-3には高濃度で用いた場合にある特定のタンパク質に凝集体形成を誘導する作用があることが判明し、水溶性一酸化炭素発生剤の適正な使用法への一助になったものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Carbon monoxide is a toxic gas, due to its high affinity to heme and resultant inhibition of binding of oxygen to heme. On the other side, carbon monoxide is generated in human body and has protective roles against stresses. Water soluble carbon monoxide releasing molecules (CORMs) has been attracted much attention due to its easy use for experiments. We found that exposure of a high concentration of CORM-3 to cells resulted in the aggregation of p62 as well as fibronectin. Since these two molecules are essential to autophagy as well as formation of extracellular matrix, CORM-3 should impairs these processes when applied to cells at high concentrations.

研究分野：法医学・分子細胞毒性学

キーワード：一酸化炭素 CORM-3 フィブロネクチン p62

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一酸化炭素(CO)はよく知られた毒性ガスである。ヘムへの結合において酸素と競合し、結果としてヘムによる酸素の運搬を妨げる。また細胞内においてもヘム結合タンパク質の機能を阻害し、ミトコンドリア呼吸鎖などの機能を低下させる。一方で、生体内においても少量の一酸化炭素がヘムオキシゲナーゼによるヘムの分解の際に生じており、血管の弛緩・収縮の制御に関与していることが知られている。このような背景から一酸化炭素はその毒性と細胞・臓器保護作用の両面から近年注目されているが、一酸化炭素ガスは猛毒であり取り扱いに危険を伴うことから、研究には困難が伴っていた。一酸化炭素ガスの危険を回避する方法として、一酸化炭素発生剤が開発され実験に使用されてきたが、それらは脂溶性であり実際に人体へ応用することは困難と考えられることから、水溶性の一酸化炭素発生剤が待望されることとなり、CORM-3、CORM-A1などの水溶性一酸化炭素発生剤が開発された。これらは主として一酸化炭素の細胞・臓器保護作用を利用するために開発されたものであるが、一酸化炭素の毒性機序の研究に活用することもできる。実際、一酸化炭素ガス暴露実験の危険性から一酸化炭素の毒性機序は、教科書の記述から大きな進展がないのが現状である。分子細胞生物学の進展に伴い、新規な細胞死経路をはじめとし、様々な細胞障害についてその分子的な機序が次々と明らかになっている。一酸化炭素についても、水溶性一酸化炭素発生剤という手軽に一酸化炭素を用いた実験を行える薬剤が開発されたことから、これらを有効に用いることで一酸化炭素の毒性及び保護作用の研究に新たな局面を見いだすことができると考えられた。しかしながら一酸化炭素そのものを用いる一酸化炭素ガス暴露実験と異なり、一酸化炭素発生剤は一酸化炭素以外の分子を含むため、一酸化炭素を放出した後に残る分子骨格が細胞に与える影響について検討することも重要である。実際、CORM-3はルテニウム原子を中心元素とする錯体型の分子であり、ルテニウムが血清アルブミンなどと相互作用することが知られていた。ルテニウムは複数の酸化状態を取り得る分子であり、相互作用する分子に電子の授受を通じて酸化状態の変化、ひいては立体構造・活性に大きな影響を与えることも予想される。一方でCORM-A1は主にホウ素を用いて設計された分子であり、CORM-3に比べ、一酸化炭素の発生以外の作用は比較的少ないと考えられる。水溶性一酸化炭素発生剤を実際に人体に用いるためには、これらの点について実証実験を行いより適切な一酸化炭素発生剤の目星をつけておく必要もあった。

2. 研究の目的

これら水溶性一酸化炭素発生剤を用いて、一酸化炭素の毒性機序および保護作用の機序についても検討した。そもそも、細胞内で一酸化炭素が結合する分子はヘム以外には未だ知られていない。しかしながら一酸化炭素には抗アポトーシス作用、抗炎症作用など様々な作用が報告されている。一酸化炭素がミトコンドリアの呼吸を抑制することは周知だが、それだけで抗炎症作用や細胞保護作用を説明できるのかも不明である。それらを明らかにするためには、まず培養細胞を用いて実験を行う必要がある。その際に、先にも述べた一酸化炭素発生剤の一酸化炭素発生以外の作用には十分な考慮をする必要があった。分子骨格の全く異なるCORM-A1、CORM-3二種を用いることにより、この問題をクリアすることとした。しかしながら予想した通り、CORM-A1、CORM-3は大きく異なる作用を示し、CORM-3には高濃度で用いた場合、その中心元素であるルテニウムに由来する作用が無視できないほど大きく、CORM-3による細胞毒性の主要な部分を占めることがわかった。水溶性一酸化炭素発生剤を用いた一酸化炭素の作用機序研究のためには、このCORM-3の一酸化炭素発生以外の作用について詳細を知っておく必要があると考え、以後はその機序の研究を中心とした。

3. 研究の方法

各種臓器由来の培養細胞を用い水溶性一酸化炭素を最大1mMにて暴露し、誘起される細胞死の機序とそれに付随して起きる細胞内情報伝達経路の変動などを調べた。細胞としてはマウス胎児由来線維芽細胞(mouse embryonic fibroblasts, MEF)、ラット心筋由来細胞(H9c2)、ヒト肺ガン由来肺胞上皮細胞(A549)の三種類を用い、動物種と細胞種によらない普遍的な作用を探索することとした。水溶性一酸化炭素発生剤としてはルテニウム錯体であるCORM-3とホウ素化合物であるCORM-A1の二種を用いた。細胞内外のタンパク質の変動はウエスタンブロット法で検討した。また、遺伝子発現変動はSYBRGreen法による定量リアルタイムPCRにより測定し、細胞死はMTT法とLDHの細胞外放出率の両方で評価した。また、オートファジーの関与を調べるためにオートファジーの必須遺伝子であるAtg5を欠損したMEF細胞も用い、野生型MEF細胞と比較することでオートファジーの関与も検討した。

4. 研究成果

MEF細胞に0, 0.1, 1mMのCORM-3を暴露したところ、~72時間後にアポトーシスによる細胞死を認めた。細胞内タンパク質を回収しCBB染色を施したところ250kDa付近にCORM-3暴露

により存在量が著減するバンドを見出した。バンドを切り出し MALDI-TOF-MS で解析したところ、フィブロネクチンであることが判明した。フィブロネクチンは細胞外マトリクスの構成成分で細胞外に存在するタンパク質であるが、細胞表面に結合したフィブロネクチンが CORM-3 により結合が外れることがわかった。更に、CORM-3 はフィブロネクチンを凝集させ、凝集体となったフィブロネクチンは細胞に結合できないこともわかった。このフィブロネクチンの凝集は CORM-3 のみならずルテニウム単独でも観察され、一酸化炭素発生剤の一酸化炭素によらない作用であることがわかった。実際に、この凝集体形成は CORM-A1 では観察されなかった。多くの実験において、CORM-3 は 200-400 マイクロ M 程度で保護作用を発揮している。しかしながら 1mM まで濃度をあげるとこのような予期せぬ作用がありかえって細胞にダメージを与えてしまうことを示すことができた。また、CORM-3 より CORM-A1 の方が一酸化炭素発生剤としてベターな選択であるとも考えられる。引き続き細胞内タンパク質の変動を調べたところ、オートファジーに必須のタンパク質である p62 も凝集体を形成していることがわかった。この凝集体はオートファジーにより分解・処理されており、オートファジー欠損細胞 (Atg5^{-/-}MEF) では野生型に比べてより蓄積されていた。p62 の凝集体形成は H9c2、A549 細胞でも観察され、各種細胞に普遍的な現象であると予想された。p62 の凝集体形成もフィブロネクチンと同じようにルテニウムでも見られる一方 CORM-A 1 では見られず、以上のことから、CORM-3 には中心原子であるルテニウムの作用として細胞内外のいくつかのタンパク質を凝集させてしまうことがわかった。一酸化炭素発生剤は治療目的で将来有望な薬剤として期待されているが、このような作用があることから、より毒性の少ない水溶性一酸化炭素発生剤の開発が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Aki Toshihiko, Unuma Kana, Noritake Kanako, Hirayama Naho, Funakoshi Takeshi, Uemura Koichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Formation of high molecular weight p62 by CORM-3	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0210474
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0210474	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Unuma Kana, Aki Toshihiko, Yamashita Ayaka, Yoshikawa Ayaka, Uemura Koichi	4. 巻 44
2. 論文標題 Hydrogen sulfide donor NaHS causes bronchitis with enhanced respiratory secretion in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 107 ~ 112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2131/jts.44.107	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Aki Toshihiko, Unuma Kana, Noritake Kanako, Kurahashi Hatsumi, Funakoshi Takeshi, Uemura Koichi	4. 巻 50
2. 論文標題 Interaction of carbon monoxide-releasing ruthenium carbonyl CORM-3 with plasma fibronectin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Toxicology in Vitro	6. 最初と最後の頁 201 ~ 209
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.03.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Unuma Kana, Aki Toshihiko, Nagano Suguru, Watanabe Ryo, Uemura Koichi	4. 巻 495
2. 論文標題 The down-regulation of cardiac contractile proteins underlies myocardial depression during sepsis and is mitigated by carbon monoxide	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1668 ~ 1674
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Naho Hirayama, Toshihiko Aki, Takeshi Funakoshi, Kanako Noritake, Kana Unuma, Koichi Uemura.	4. 巻 43
2. 論文標題 Necrosis in human neuronal cells exposed to paraquat	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 193-202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2131/jts.43.193	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Toshihiko Aki, Kana Unuma, and Koichi Uemura.	4. 巻 1
2. 論文標題 Emerging roles of mitochondria and autophagy in liver injury during sepsis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Stress.	6. 最初と最後の頁 79-89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.15698/cst2017.11.110	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kanako Noritake, Toshihiko Aki, Moe Kimura, Takeshi Funakoshi, Kana Unuma, Koichi Uemura	4. 巻 42
2. 論文標題 Restoration of YAP activation rescues HL-1 cardiomyocytes from apoptotic death by ethanol	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 545-551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2131/jts.42.545	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kana Unuma, Toshihiko Aki, Ryo Watanabe, Koichi Uemura
2. 発表標題 Down-regulation of cardiac contractile protein is involved in cardiac dysfunction during sepsis and is mitigated by carbon monoxide.
3. 学会等名 IALM 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平山菜穂、秋利彦、上村公一
2. 発表標題 神経細胞SH-SY5Yにおけるパラコート曝露による細胞死とそのメカニズムの検討
3. 学会等名 第86回日本法医学会学術関東地方集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 則竹香菜子, 秋 利彦, 上村公一
2. 発表標題 エタノールによる心筋細胞死は YAP 活性化により抑制される
3. 学会等名 第52回 日本アルコール・アディクション医学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Toshihiko Aki, Kanako Noritake, Kana Unuma, Koichi Uemura	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Humana press	5. 総ページ数 18
3. 書名 Autophagy in health and disease	

1. 著者名 Toshihiko Aki, Kanako Noritake, Takeshi Funakoshi, Koichi Uemura.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 25
3. 書名 Comprehensive Toxicology 3rd ed Volume 1 (General subjects).	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鵜沼 香奈 (Unuma Kana) (30586425)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師 (12602)	
研究分担者	船越 丈司 (Funakoshi Takeshi) (40444715)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教 (12602)	
研究分担者	則竹 香菜子 (Noritake Kanako) (40758067)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任助教 (12602)	