

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591349

研究課題名（和文） 免疫複合体病における治療ターゲットとしての活性酸素種及び NO, CO, H<sub>2</sub>S の解析研究課題名（英文） Analysis of reactive oxygen species, NO, CO and H<sub>2</sub>S as therapeutic targets in the immune complex diseases

研究代表者

清水 和宏 (SHIMIZU KAZUHIRO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80170968

研究成果の概要（和文）：

今回我々は炎症の代表例である免疫複合体病の一つであるアルザス反応の動物モデルを用いて炎症における Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) の役割を検討した。H<sub>2</sub>S の供給源として NaHS を選択し、野生型マウス腹腔内に投与したところ有意に炎症反応を抑えた。また接着分子の一つである selectin の欠損マウスを用いた同様の実験にて E-, P-selectin 欠損マウスでは H<sub>2</sub>S の炎症抑制作用は認められたが、L-selectin 欠損マウスでは認められなかった。同様の結果は 3 種の selectin に対する抗体を用いた blocking study でも認められた。即ち H<sub>2</sub>S は炎症において抗炎症性に働き、その働きは L-selectin を介して行われる事が明らかになった。

現在査読論文に投稿中である。

研究成果の概要（英文）：

To assess the roles of H<sub>2</sub>S in the IC induced diseases, reverse passive cutaneous Arthus reaction was conducted using NaHS as an H<sub>2</sub>S donor. Furthermore, we conducted similar experiments using selectin-deficient (selectin<sup>-/-</sup>) mice to determine the involvement of selectin molecules in the H<sub>2</sub>S mediated pathway. Exogenous application of H<sub>2</sub>S dramatically attenuated inflammatory reactions in wild type (WT) mice associated with Arthus reaction. Namely, mRNA expressions of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interferon- $\gamma$  and neutrophil numbers were significantly reduced in the lesional skins of NaHS treated WT mice relative to untreated ones. NaHS treatment significantly reduced these three parameters in the lesional skins of E- and P-selectin<sup>-/-</sup> mice, but not in those of L-selectin<sup>-/-</sup> mice. Quite similar results were obtained in the blocking study using WT mice injected with monoclonal antibodies to E-, P- and L-selectin. Our results indicated that exogenous application of H<sub>2</sub>S attenuates inflammatory responses in reverse passive Arthus reaction through L-selectin involved pathways, but not through E- or P-selectin pathways.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：アルサス反応、活性酸素種、一酸化窒素、一酸化炭素、硫化水素

1. 研究開始当初の背景

硫化水素(H<sub>2</sub>S)は一酸化窒素(NO)、一酸化炭素(CO)に次ぐ第3のガス状内因性情報伝達物質として注目を集めている。しかしながらその役割は特に炎症の場では炎症性か抗炎症性か議論の分かれる所である。また H<sub>2</sub>S は P-selectin に作用してその役割を果たすとの報告があるが、まだまだ不明の点も多い。

2. 研究の目的

H<sub>2</sub>S の炎症における役割、及び接着分子である selectin family との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 外部より H<sub>2</sub>S を投与するため H<sub>2</sub>S の供与体として NaHS を採用し腹腔内投与を行った。
- (2) 免疫複合体(IC)病の動物モデルである cutaneous reverse passive Arthus reactions を採用した。まず野生型マウスを用いて IC チャレンジ後4及び8時間経過してのサンプリングを行い H<sub>2</sub>S 投与群、H<sub>2</sub>S 非投与群間での比較検討を行った。

(3) 炎症の評価項目としては tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-6, C-X-C motif ligand (CXCL)-2, interferon (IFN)- $\gamma$  mRNA を real time RT-PCR 法で解析し、好中球数を HE 染色にて計数し評価した。

(4) selectin family と H<sub>2</sub>S の関係を解明するために E-, P-, L-selectin 欠損(selectin<sup>-/-</sup>)マウスを用いて同様の検討を行い4時間のみで H<sub>2</sub>S 投与群、非投与群間の比較検討を行った。

(5) 3種 selectin に対する単クローン抗体を用いた野生型マウスによる4時間のみの blocking study も同様に行った。

4. 研究成果

- (1) 野生型マウスを用いた病変皮膚の検討では4時間、8時間ともに H<sub>2</sub>S 投与群が有意に好中球数の減少を示していた(Fig. 1)。mRNA の検討では4時間において TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  の有意な低下を H<sub>2</sub>S 投与群において示していたが、IL-6, CXCL-2 では有意差を認めなかった(Fig. 2)。

しかしながら8時間の mRNA 検討では TNF-

$\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, CXCL-2 の4項目すべて H<sub>2</sub>S 投与群において有意な低下を示していた (Fig. 3)。

(2) E-, P-, L-selectin<sup>-/-</sup>マウスを用いた4時間の検討ではE-, P-selectin<sup>-/-</sup>マウスにおいて好中球数の有意な低下を H<sub>2</sub>S 投与群で認めたが、L-selectin<sup>-/-</sup>マウスにおいては有意差を認めなかった (Fig. 4)。

同時に行った mRNA の検討では E-, P-selectin<sup>-/-</sup>マウスにおいては TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  mRNA の有意な低下を H<sub>2</sub>S 投与群で認めたが、L-selectin<sup>-/-</sup>マウスにおいては有意差を認めなかった (Fig. 5)。

(3) E-, P-, L-selectin に対する単クローン抗体を用いた野生型マウスにおける blocking study では抗 E-, P-selectin 抗体投与マウスにおいて H<sub>2</sub>S 投与群での有意な好中球数の減少を認めたが、抗 L-selectin 抗体投与マウスにおいて好中球数の有意差を認めなかった (Fig. 6)。

同時に行った mRNA の検討でも抗 E-, P-selectin 抗体投与マウスにおいて H<sub>2</sub>S 投与群での有意な TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  mRNA の低下を認めたが、抗 L-selectin 抗体投与マウスにおいては TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  mRNA の有意差を認めなかった (Fig. 7)。

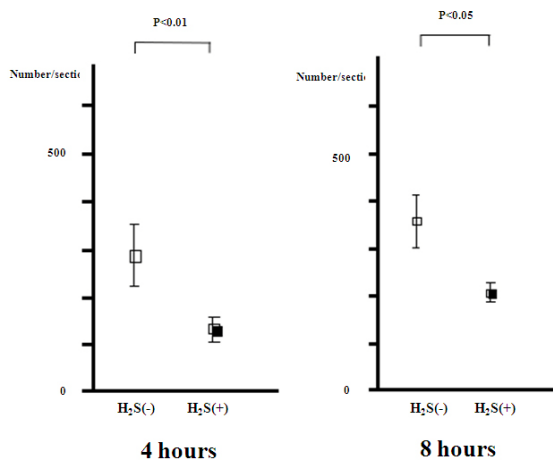


Fig. 1

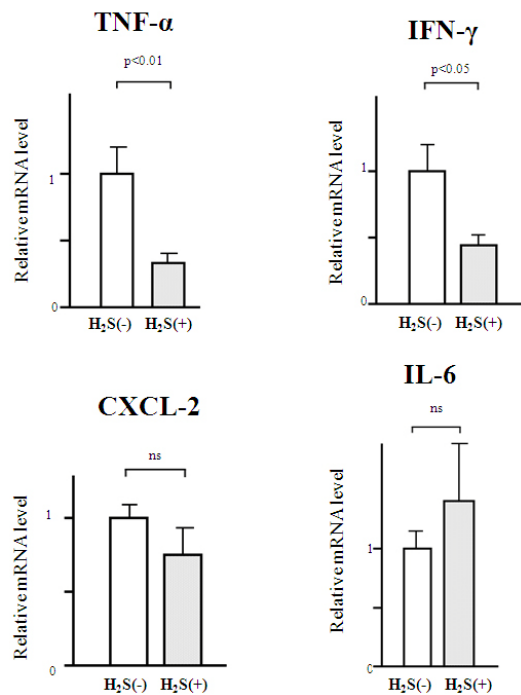


Fig. 2

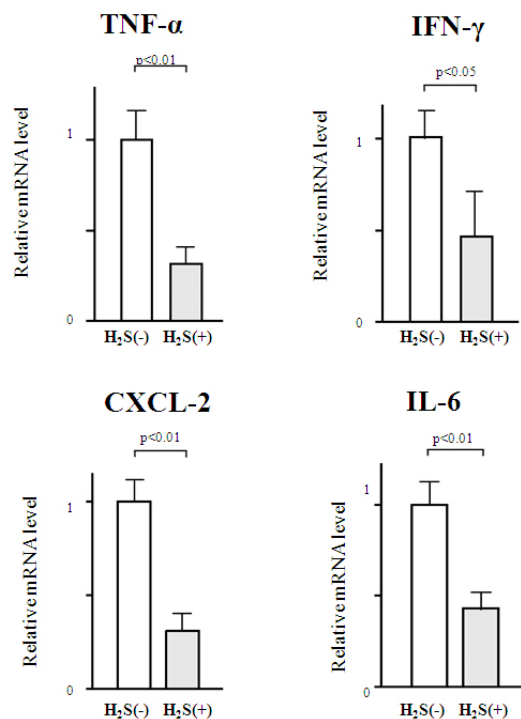


Fig. 3

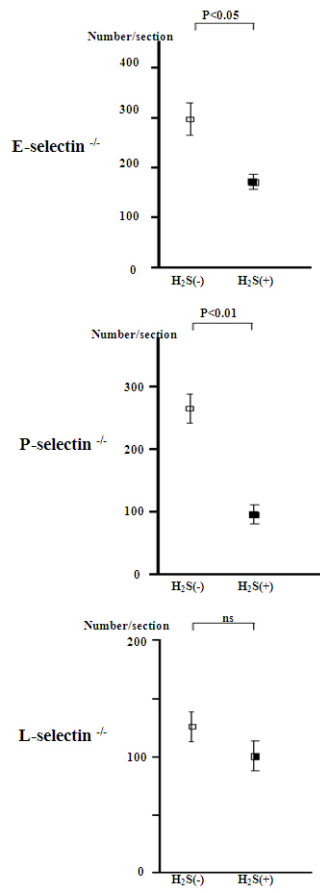


Fig. 4

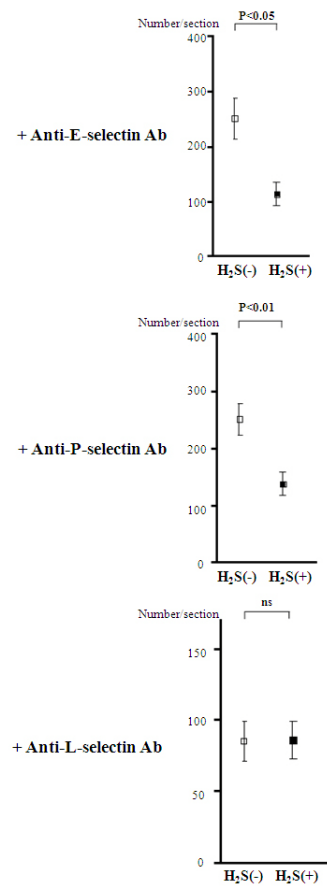


Fig. 6

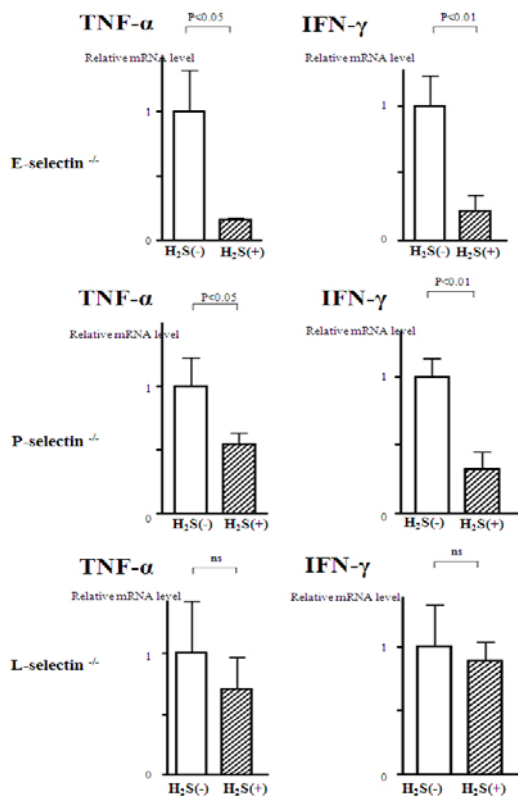


Fig. 5

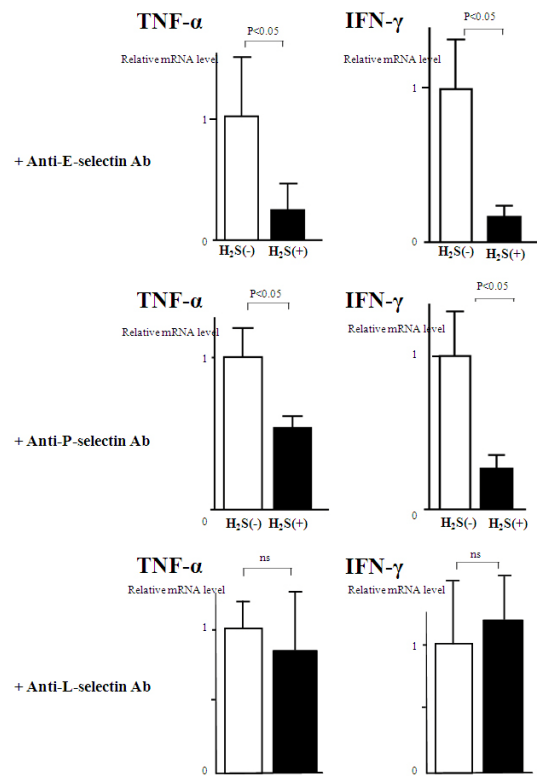


Fig. 7

結論: H<sub>2</sub>S は炎症において抗炎症性に働き、その働きはL-selectin を介して行われる事が明らかになった

#### 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) 全て査読あり

1. Hara T, Shimizu K, Ogawa F, Yanaba K, Iwata Y, Muroi E, Takenaka M, Komura K, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S : Platelets control leukocyte recruitment in a murine model of cutaneous arthus reaction. Am J Pathol. 2010 Jan; 176(1):259-69. Epub 2009 Dec 11
2. Ishii T, Fujita T, Matsushita T, Yanaba K, Hasegawa M, Nakashima H, Ogawa F, Shimizu K, Takehara K, Tedder TF, Sato S, Fujimoto M: Establishment of experimental eosinophilic vasculitis by IgE-mediated cutaneous reverse passive arthus reaction. Am J Pathol. 2009 Jun; 174(6):2225-33. Epub 2009 Apr 23.
3. Shimizu K, Bae SJ, Hara T, Iwata Y, Yamaoka T, Komura K, Muroi E, Takenaka M, Ogawa F, Sato S: Involvement of gaseous low molecular monoxides in the cutaneous reverse passive Arthus reaction: cytoprotective action of carbon monoxide. Clin Exp Immunol. 2008 Aug; 153(2): 245-57. Epub 2008 May 26.

[学会発表] (計 1 件)

Shimizu K et al.: Hydrogen sulfide attenuates the inflammatory reactions in the cutaneous reverse passive Arthus reaction. 日本研究皮膚科学会第 34 回年次学術大会・総会 (2009/12/04-12/6, 福岡市・JAL リゾートシーホークホテル福岡)

#### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

清水 和宏 (SHIMIZU KAZUHIRO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号 : 80170968

#### (2) 研究分担者

佐藤 伸一 (SATO SHINICHI)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号 : 20215792