

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月8日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590747

研究課題名（和文） 一酸化炭素中毒による脳の酸化ストレス増加作用に関する研究

研究課題名（英文） Study on oxidative stress induced by carbon monoxide poisoning in the brain

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

研究成果の概要（和文）：一酸化炭素(CO)中毒において、血中 CO ヘモグロビン(CO_h)が約 50% の中程度 CO 中毒では脳の酸化ストレス(最強毒性の活性酸素種であるヒドロキシラジカルの生成)は増加せず、CO_h が約 70%となる重度 CO 中毒によって著明に増加した。この酸化ストレスの増加は、低酸素よりも一酸化炭素それ自体の作用に起因し、また、プリン P2Y₁₁ 受容体経路で活性化された細胞内 cAMP 情報伝達経路を介することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Oxidative stress (production of hydroxyl radicals, the most toxic reactive oxygen species) was enhanced in the brain during severe carbon monoxide (CO) poisoning with 70% CO-hemoglobin in blood, but not moderate CO poisoning with 50% CO-hemoglobin in blood. The present results suggest that the enhancement of oxidative stress might be due to CO itself, but not hypoxia induced by CO poisoning, and mediated through activation of intracellular cAMP signaling pathways via purine P2Y₁₁-like receptors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：一酸化炭素中毒、脳、酸化ストレス、ヒドロキシラジカル、cAMP、protein kinase A (PKA)、exchange protein directly activated by cAMP (Epac)

1. 研究開始当初の背景

一酸化炭素(CO)中毒では、脳の損傷が誘発されることが知られている。この場合、脳におけるヒドロキシラジカル(\cdot OH)の生成が著明に促進されることから、脳虚血や低酸素による脳損傷と同様に、酸化ストレスが重要な

役割を演じている可能性が示唆された(Haraら、Brain Res. 1016:281-284, 2004)。そこで、脳虚血や低酸素に関連する報告に基づき、 \cdot OH生成に関連する因子(dopamine、glutamate、nitric oxide、アスコルビン酸や遊離鉄)について検討を行ったが、CO中毒

による・OH 生成の機序を完全に解明するには至らなかった。その後、CO 中毒により細胞内情報伝達におけるセカンドメッセンジャーである cAMP の生成が促進され、その経時的変動が、・OH 生成の変動と一致するという予備的な結果を得たことから、cAMP を介する細胞内情報伝達経路が・OH 生成に関与する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、CO 中毒における・OH 生成と cAMP 系細胞内情報伝達経路との関連性を明らかにし、CO 中毒による脳損傷の機序について検討することであった。

3. 研究の方法

(1) 実験動物：Sprague-Dawley 系雄性ラット (体重 235–265g) を使用した。

(2) マイクロダイアリシス：ペントバルビタールあるいはイソフルラン麻酔下で、ラットの頭部を脳定位固定器に固定し、ガイドカニューレを植込んだ。約 1 週間の回復期間の後、ガイドカニューレを通してマイクロダイアリシス用透析プローブを線条体に刺入し (Paxinos & Watson のアトラス (1998) によるプローブ先端の座標：0.2 mm AP, 3.0 mm L, 6.5 mm DV)、modified Ringer solution (147 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂) を 2 μ/min の流速で灌流した。

(3) ・OH の定量：すでに報告している方法 (Hara ら, Brain Res. 1016:281, 2004) に従い、上述 (2) の灌流液に 5 mM サリチル酸 Na を添加して、灌流液中のサリチル酸と・OH との反応物である 2,3-dihydroxybenzoic acid (2,3-DHBA) を、化学電気検出器付高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD) を用いて、以下の条件で定量した。分離カラム：Eicompac SC-ODS (2.1 x 150 mm)、移動相：EDTA・2Na (5 mg/L) および 2% methanol を含む 0.1 M リン酸バッファー (pH6.0)、流速：230 μL/min、温度：25°C、電極：グラファイト (Eicom WE-3G)、電圧：+0.5 V、参照電極：Ag/AgCl。

(4) cAMP の定量：上述 (2) のマイクロダイアリシス (この場合、透析プローブは両側の線条体に刺入した) で得られた線条体の灌流液を氷冷したプラスチックチューブに集め、市販の cAMP 測定用 Enzyme immunoassay キット (GE 社製) を用いて定量した。なお、細胞外 cAMP の変動は、細胞内 cAMP の変動を反映することが知られている (Egawa ら, Brain Res. 458:303-308, 1998; Rosenberg & Li, Brain Res. 458: 303-308, 1995)。

(5) CO および低酸素性低酸素の曝露：従来と

同様に (Hara ら, Arch. Toxicol. 76:596-605, 2002)、CO ガス (>99.5%) あるいは窒素ガス (>99.99%) を 1000 ppm CO、3000 ppm CO、5% O₂ あるいは 8% O₂ の濃度になるように室内の空気と混合・調製し、ラットを入れたチャンバー内に導入する方法で曝露実験を行なった。チャンバー内の CO あるいは O₂ 濃度は、各々の測定器で曝露中常時モニターした。なお、1000 ppm および 3000 ppm CO 曝露では、血中 CO-hemoglobin がそれぞれ約 50% および約 70% となる中程度および重度の CO 中毒を誘発する。また、それぞれの CO 曝露時の低酸素状態は、8% O₂ および 5% O₂ と同程度である (第 88 次日本法医学会および [雑誌論文] ③)。

(6) 試薬：和光純薬、ナカライテスク、Sigma-Aldorich、Tocris、Calbiochem および BIOLOG から購入した。

(7) 統計学的解析：2 群の場合は、Student's t-test を、3 群以上の場合には、one-way analysis of variance の後 Dunnett test あるいは Tukey-Kramer test を用いて行った。

4. 研究成果

(1) CO および低酸素性低酸素による・OH 生成：・OH 生成は、1000 ppm CO ではまったく影響を受けなかったが、3000 ppm CO では著明に促進された (図 1)。これに対し、低酸素性低酸素では O₂ 濃度低下に依存した・OH 生成の促進が観察されたが、5% O₂ の作用は 3000 ppm CO よりも有意に弱かった (図 1)。

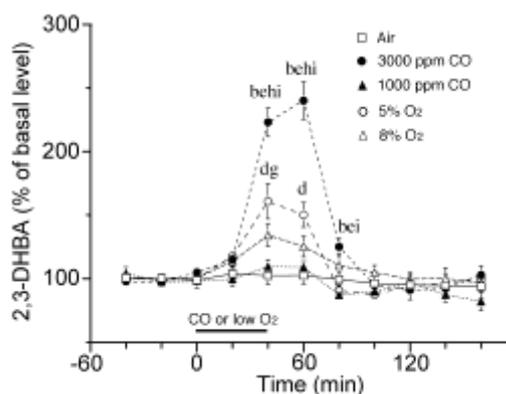


図 1

P<0.05: a, Air vs. 1000 ppm CO; b, Air vs. 3000 ppm CO; c, Air vs. 8% O₂; d, Air vs. 5% O₂; e, 1000 ppm CO vs. 3000 ppm CO; f, 1000 ppm CO vs. 8% O₂; g, 1000 ppm CO vs. 5% O₂; h, 3000 ppm CO vs. 8% O₂; i, 3000 ppm CO vs. 5% O₂; j, 8% O₂ vs. 5% O₂.

(2) CO および低酸素性低酸素による cAMP 生成：cAMP 生成は、1000 ppm CO によりまったく影響されなかったが、3000 ppm CO により強く促進された。cAMP 生成は、5% O₂ でも促進されたが、それは 3000 ppm CO よりも弱かった (図 2)。

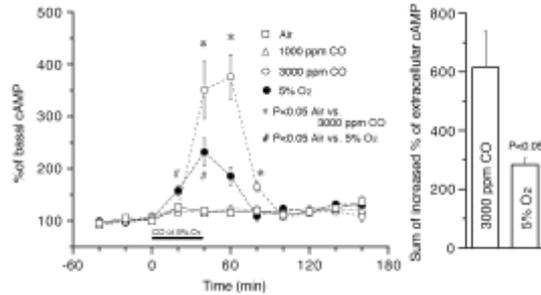


図 2

(3) CO による cAMP 生成促進に対する電位依存性 Na⁺チャンネル阻害剤 tetrodotoxin (TTX) の効果：TTX は、統計学的に有意ではないが、定常状態の cAMP 生成を抑制し、3000 ppm CO による cAMP 生成促進を強く、また有意に阻害した (図 3)。これらの結果は、 \cdot OH 生成の場合と類似する (Hara ら、Brain Res. 1016:281-284 (1994))。

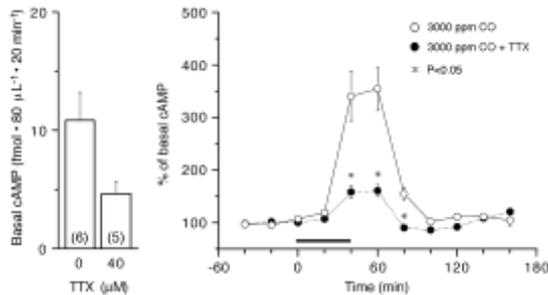


図 3

(4) CO による cAMP 生成促進に対する非特異的プリン P2 受容体阻害薬の効果：非特異的 P2 受容体阻害薬、suramin, pyridoxal phosphate-6-azophenyl-2,4-disulfonic acid (PPADS) および reactive blue 2 (RB2) のうち suramin と RB2 は定常状態の cAMP を上昇させ、suramin のみが CO による cAMP 生成促進を抑制した (図 4)。なお、cAMP 生成を促進する Gs 蛋白共役型神経伝達物質受容体の拮抗薬、propranolol (adrenergic β), SCH23390 (dopamine D1 & D5), ranitidine (histamine H2), 3,4-dimethyl-1-propargylxanthine (adenosine A2) および serotonin 合成阻害薬 p-chloro-L-phenylalanine あるいはプロスタグランジン合成阻害薬 indomethacin にはそのような効果は認められなかった。

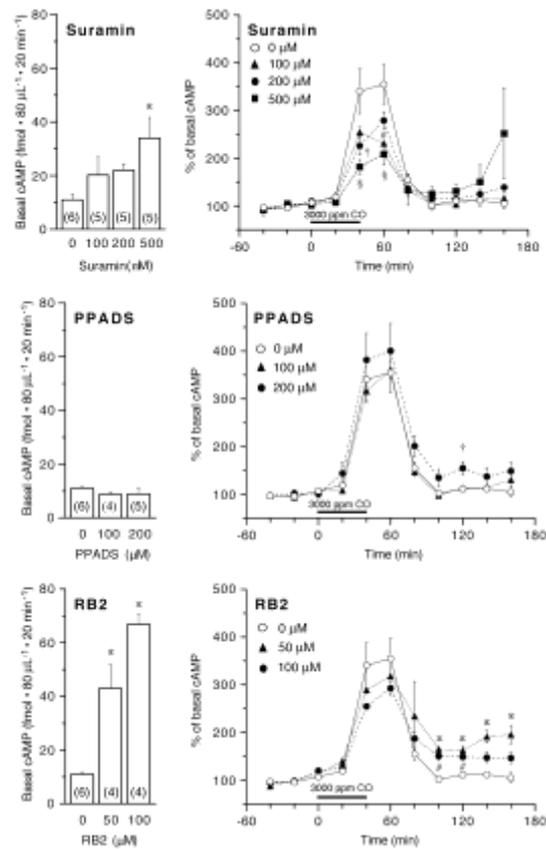


図 4

P<0.05: *, 0 μM vs. 50 μM RB2; #, 0 μM vs. 100 μM suramin or 100 μM RB2; †, 0 μM vs. 200 μM PPADS or 200 μM suramin; §, 0 μM vs. 500 μM suramin.

(5) CO による cAMP 生成促進に対する P2Y₁₁ 受容体阻害薬 NF157 の効果：NF157 は、用量依存的に定常状態の cAMP を上昇させ、また CO による cAMP 生成促進を抑制した (図 5)。

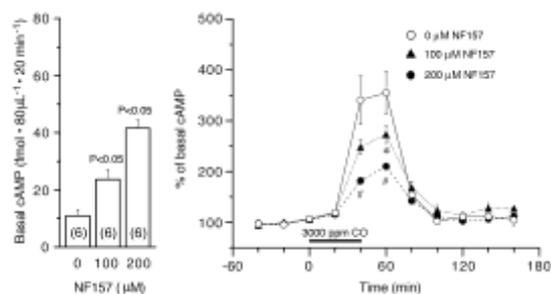


図 5

P<0.05: *, 0 μM vs. 100 μM NF157; #, 0 μM vs. 200 μM NF157

(6) 定常状態の \cdot OH 生成に対する細胞膜透過性 cAMP アナログ、8-bromo-cAMP (8-Br-cAMP) および dibutyryl-cAMP (db-cAMP) と内因性 cAMP 合成促進薬 forskolin の作用：8-Br-cAMP および forskolin は、 \cdot OH 生成を促進したが、

db-cAMP は低用量で・OH 生成を若干促進し、高用量では抑制した (図 6)。

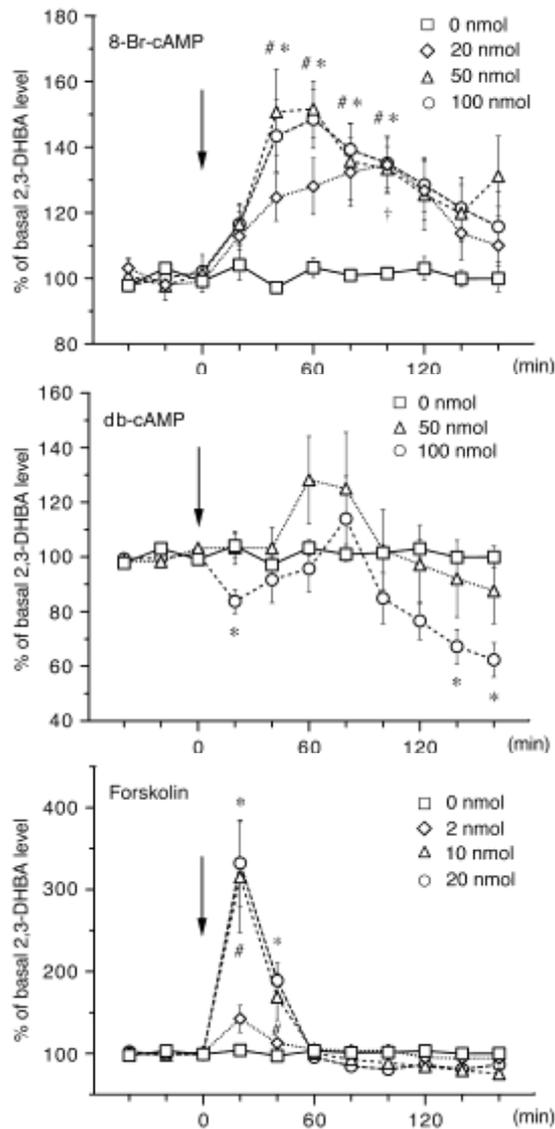


図 6

†, $P < 0.05$, 0 nmol vs 20 nmol 8-Br-cAMP; #, $P < 0.05$, 0 nmol vs 50 nmol 8-Br-cAMP or 10 nmol forskolin; *, $P < 0.05$, 0 nmol vs 100 nmol 8-Br-cAMP, 100 nmol db-cAMP, or 20 nmol forskolin

(7) 定常状態の・OH 生成に対する 8-Br-cAMP、db-cAMP あるいは forskolin と protein kinase A (PKA) 阻害薬 H89 併用の効果: H89 は、8-Br-cAMP および forskolin の・OH 生成促進作用をさらに増強し、db-cAMP の・OH 生成抑制作用を解除して促進に転じさせた (図 7)。なお、H89 は、定常状態の・OH 生成に対してまったく影響を及ぼさなかった。

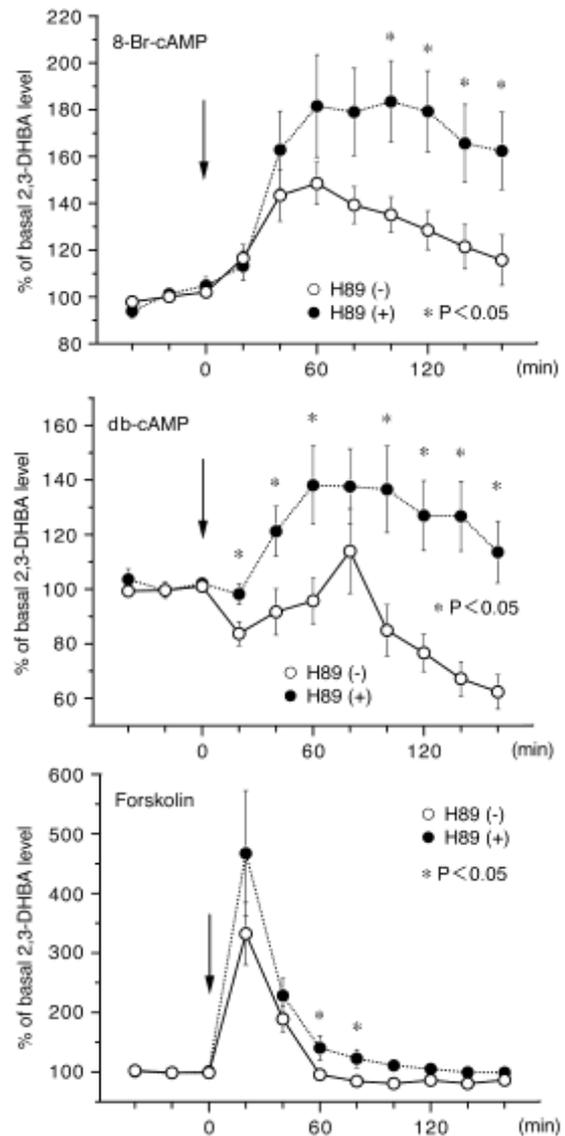


図 7

(8) 定常状態の・OH 生成に対する cGMP 単独および H89 併用の作用: cGMP は、単独で・OH 生成を若干抑制したが、この作用は H89 併用でほとんど影響を受けなかった (図 8)。

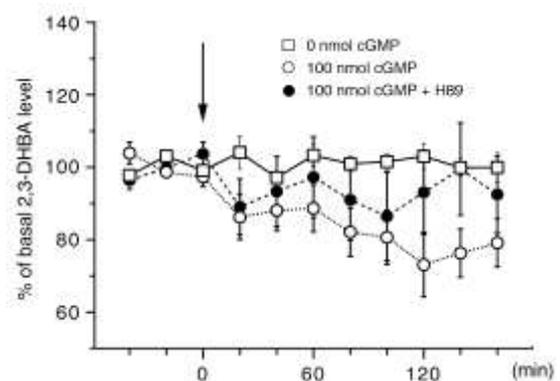


図 8

(9) 定常状態の・OH 生成に対する優先的 PKA 阻害薬であり、Epac (exchange protein directly activated by cAMP) 阻害作用をも有する 8-bromo-adenosine-3',5'-cyclic monophosphorothionate, Rp-isomer (Rp-8-Br-cAMPS) および優先的 PKA 活性化薬 6-phenyl-cAMP の作用: Rp-8-Br-cAMPS は、・OH 生成を促進し、6-phenyl-cAMP は抑制した (図 9)。

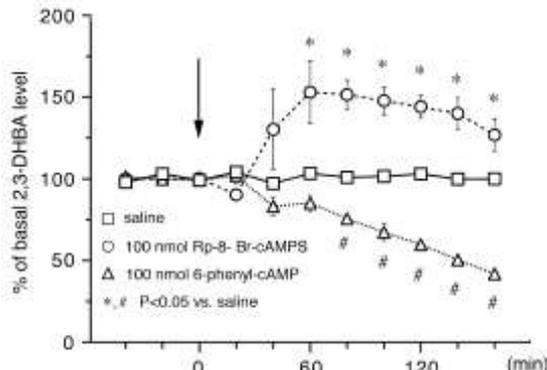


図 9

(10) 定常状態の・OH 生成に対する選択的 Epac 活性化薬 8-(4-chlorophenyl-thio)-2'-O-methyl-cAMP (8-cPT-2'-OMe-cAMP) の作用: 8-cPT-2'-OMe-cAMP は、用量依存的に・OH 生成を促進した (図 10)。

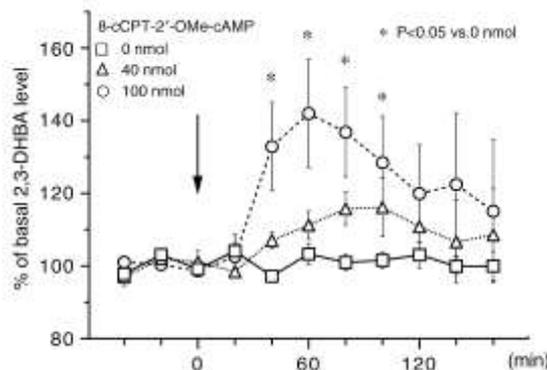


図 10

(11) CO による・OH 生成促進に対する H89 および Rp-8-Br-cAMPS の効果: H89 は、CO による・OH 生成促進を増強したが、Rp-8-Br-cAMPS は、単独で促進作用を有するにもかかわらずこれを抑制した (図 11)。

(12) まとめ: 以上の結果より次のように結論した。

① CO 中毒による脳の・OH および cAMP の生成促進は、低酸素よりも CO それ自体の作用に起因する。また、この促進作用は、重度の CO 中毒においてのみ誘発されることから、これには閾値が存在する可能性がある。

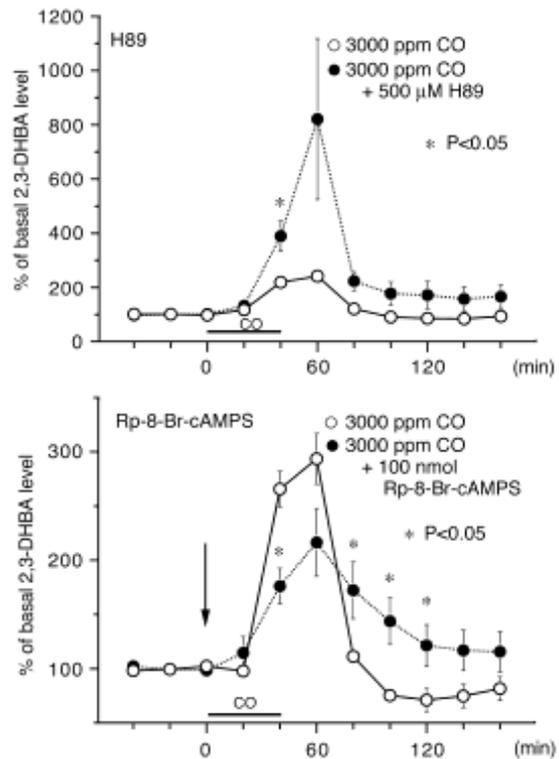


図 11

② CO 中毒による脳の cAMP 生成促進は、プリン P2 受容体のうち P2Y11 様受容体を介する。
③ 脳の cAMP 系細胞内情報伝達経路は、・OH 生成に対して相反する作用、すなわち、PKA 系の活性化は・OH 生成を抑制し、Epac 系の活性化はこれを促進すること、また、cyclic nucleotide-regulated ion channels 系は、・OH 生成にあまり関与しない。

④ 重度 CO 中毒では、P2Y11 様受容体活性化を介して細胞内 cAMP 合成が促進され、増加した cAMP が PKA 系および Epac 系を同時に活性化するが、前者よりも後者の作用の方が優位となるために・OH 生成が促進される。

なお、図 1～図 11 は、Copyright Clearance Center を介して Springer (図 1、License #:2853290402736) および Elsevier (図 2～5、License#:2876750049499; 図 6～11、License #:286741337654) の各出版社の許可を得、一部改変して示した。

(13) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクトおよび今後の展望: 本研究で得られた成果は、新しい知見であり、これらに関する論文は、国際的な学術雑誌の編集者および査読者の支持を得て次項に示す各雑誌に掲載された。“まとめ”の項で示した CO 中毒による・OH および cAMP 生成促進における閾値の存在の可能性は、CO 研究を行う場合、用いる CO 濃度に留意する必要があることを

強く示唆するものである。最近、Sun らは、 $\cdot\text{OH}$ と特異的に結合して無毒化する水素の投与により CO 中毒による脳損傷が軽減されたと報告した (Crit. Care Med. 39:765-769, 2011)。これは、 $\cdot\text{OH}$ が CO 中毒による脳損傷に主要な役割を演じているという本研究の仮説を強く支持するものである。そのため、本研究で得られた重度 CO 中毒でのみ促進される $\cdot\text{OH}$ 生成についてのさらなる検討は、CO 中毒による脳損傷の機序の解明につながるものと考えられる。

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 Hara S, Kobayashi M, Kuriwa F, Mukai T, Mizukami H, Dual contradictory roles of cAMP signaling pathways in hydroxyl radical production in the rat striatum. Free Radical Biology & Medicine (査読有) 52 巻 1086-1092 (2012); doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.002

② Hara S, Mizukami H, Kuriwa F, Mukai T, cAMP production mediated through P2Y11-like receptors in rat striatum due to severe, but not moderate, carbon monoxide poisoning. Toxicology (査読有) 288 巻 49-55 (2011); doi:10.1016/j.tox.2011.07.001

③ Hara S, Mizukami H, Kurosaki K, Kuriwa F, Mukai T, Existence of a threshold for hydroxyl radical generation independent of hypoxia in rat striatum during carbon monoxide poisoning. Archives of Toxicology (査読有) 85 巻 1091- 1099

(2011); doi:10.1007/s00204-010-0637-2

[学会発表] (計 3 件)

① 原 修一、ラット線条体ヒドロキシルラジカル生成における cAMP の役割、第 95 次日本法医学会学術全国集会、平成 23 年 6 月 15 日、コラッセ福島 (福島)

② 原 修一、一酸化炭素によるラット線条体 cAMP 増加におけるプリン受容体の関与、第 94 次日本法医学会学術全国集会、平成 22 年 6 月 25 日、タワーホール船堀 (東京)

③ 原 修一、一酸化炭素曝露によるラット線条体 cAMP の増加とヒドロキシルラジカル生成、第 93 次日本法医学会学術全国集会、平成 21 年 5 月 15 日、千里ライフサイエンスセンター (大阪)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 連携研究者

栗岩ふみ (KURIIWA FUMI)
東京医科大学・医学部・助手
研究者番号：30468665

(3) 研究協力者

水上 創 (MIZUKAMI HAJIME)
東京医科大学・医学部・准教授
向井敏二 (MUKAI TOSHIJI)
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
小林正宗 (KOBAYASHI MASAMUNE)
東京医科大学・医学部・助教