

## 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25年 6月6日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590258

研究課題名（和文） 硫化水素の神経細胞保護作用機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of cytoprotective mechanisms of hydrogen sulfide in neuronal cells.

研究代表者

木村 由佳（KIMURA YUKA）

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所神経薬理研究部・研究補助員

研究者番号：60425692

研究成果の概要（和文）：

毒ガスとして知られる硫化水素（H<sub>2</sub>S）が、意外なことに細胞保護作用を持つことを私たちは発見した。H<sub>2</sub>Sは内在性抗酸化物質グルタチオン（GSH）を増やして抗酸化ストレス作用を發揮する。今回の研究から、H<sub>2</sub>Sの作用はGSH合成の基質システインを増やすこと、合成されたGSHをミトコンドリアに蓄積させることが分かった。H<sub>2</sub>Sの細胞保護作用は、in vitro、in vitroの複数のモデルで確認され、多方面での臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：

Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) is a well-known toxic gas. Recently, we found that H<sub>2</sub>S have a cytoprotective effect. H<sub>2</sub>S protects neurons by increasing the level of glutathione, a major endogenous antioxidant. In the present study, we found that H<sub>2</sub>S increases GSH level by increasing the transport of its substrate, cysteine, and accumulates GSH in mitochondria. Cytoprotective effect of H<sub>2</sub>S has been confirmed in various tissues and organs and is promising for clinical application.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、薬理学一般

キーワード：生理活性物質、硫化水素、酸化ストレス、グルタチオン、神経細胞、細胞保護

## 1. 研究開始当初の背景

硫化水素（H<sub>2</sub>S）は毒性ガスとして有名だが、約25年前にヒトなどの哺乳類の脳内にH<sub>2</sub>Sが存在することが報告され生理作用を持つことが示唆された。本研究室は世界で初めてH<sub>2</sub>Sの生理作用を報告し、「内在性生理活性物質としてのH<sub>2</sub>S」を提案した。私たちは、哺乳類

の脳内で生産されたH<sub>2</sub>Sが記憶のモデルである海馬長期増強の誘導を促進して脳内で神経伝達調節因子として働くことを報告した。一方、平滑筋で生産されたH<sub>2</sub>Sは平滑筋弛緩因子として複数の組織を弛緩させた。その後この先駆的な発見を確認すべく多くの研究者がこの分野に参入し、H<sub>2</sub>Sが多様な細胞、組織で

様々な生理活性を持つことが明らかとなった。

私たちは毒物と考えられているH<sub>2</sub>Sが、意外なことに酸化ストレスから細胞を保護することを世界で初めて報告した(Kimura Y and Kimura H:FASEB J, 18, 1165-1167, 2004; Kimura Y et al, Antioxid Redox Signal, 8, 661-70 2006)。神経細胞に高濃度のグルタミン酸をかけると、シスチン-グルタミン酸アンチポーターが抑制されシスチンの取り込みが減る。細胞内に取り込まれたシスチンは還元されてシステインとなりGSH合成の基質となるので、高濃度のグルタミン酸曝露によりGSH生産が低下し、活性酸素が処理できなくなり細胞死を招く。このグルタミン酸誘発性酸化ストレス下で、H<sub>2</sub>Sを共存させると細胞死が大きく低減し、GSH量が回復/増大した。

GSHは主要な内在性抗酸化物質で、その低下はアルツハイマー病、パーキンソン病、メタボリックシンドロームなどの多くの慢性疾患に関与すると考えられている。GSHを増やす方法は少なく、GSHの前駆体またはその誘導体投与が試みられているが生体利用率の低さなどの問題がある。H<sub>2</sub>Sは、タンパク質の発現変化を伴わずに速やかにGSHを上昇させる稀有な物質であるため、私たちの論文発表以降、H<sub>2</sub>Sの細胞保護作用に注目した薬理学的研究が活発となり、臨床応用を目指した創薬も始まった(Kimura H, Shibuya N, Kimura Y, Antioxid Redox Signal, 17(1), 45-57, Review 2012; 木村由佳, 木村英雄, PMDRS, 44 (3), 190-199)。

H<sub>2</sub>SによるGSH産生増大機構として、私たちは①シスチンの細胞取込み増加、②GSHの前駆体である $\gamma$ -グルタミルシステイン ( $\gamma$ -GC)の増大を見いだした。また酸化ストレス実験に汎用される海馬由来HT22細胞では、これに加え③ATP依存性K<sup>+</sup>チャネル及びこれと構造が類似するCFTR(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)Cl<sup>-</sup>チャネルの活性化を報告したが、H<sub>2</sub>S細胞保護機構については不明な点が多い。

また本研究室では最近3-mercaptopyrivate sulfurtransferase (MST)がcysteine aminotransferase (CAT)と共同して第3のH<sub>2</sub>S合成酵素として働くことを報告した。MSTは脳に多く発現し、特に神経細胞に局在する。また酸化ストレスで重要なミトコンドリアでの発現が多いので、MSTによる産生したH<sub>2</sub>Sがミトコンドリアでの酸化ストレスを調節することが考えられる。このような背景のもと、本研究ではH<sub>2</sub>Sによる細胞保護機構の解明を進め、in vivoでの検証を実施した。

## 2. 研究の目的

本研究では、新規生理活性物質であるH<sub>2</sub>Sの細胞保護作用因子としての機能と機序を細胞レベルから個体レベルでの解明することを目的とした。具体的には

(1) in vitroでのH<sub>2</sub>Sの神経細胞保護作用の解明

H<sub>2</sub>Sの還元作用により生じる直接的な抗酸化作用が、その細胞保護作用にどの程度関与するかを調べるため、①システイン取り込みの寄与、②GSH合成酵素の酵素活性に対する作用、③ミトコンドリアにおけるH<sub>2</sub>Sの抗酸化作用を、強力な還元物質である $\beta$ -メルカプトエタノール、ジチオスレイトールと比較した。

(2) in vivo、in vitroでのH<sub>2</sub>Sの神経細胞保護作用の検証

マウス胎児脳における虚血再還流モデルおよび、神経細胞におけるグルタミン酸以外の酸化ストレスに対するH<sub>2</sub>Sの細胞保護作用を検討する。

## 3. 研究の方法

(1)細胞培養と細胞毒性アッセイ法

17日齢のラット胎児より大脳皮質を取り出し初代神経細胞を調製した。酸化ストレス実験では、グルタミン酸誘発性酸化ストレスに対する薬剤の作用をwstアッセイ (Cell1 counting kit-8, Dojindo)により評価した

硫化水素合成酵素 (CBS, MST, CAT)を過剰発現させたマウス神経芽細胞腫Neuro2a、マウス海馬由来HT22細胞でも同様に実験した。

(2)システイン、 $\gamma$ -GC、グルタチオンの定量  
初代神経細胞に薬剤を添加し、4時間後に細胞を回収しライセート調製。細胞内のシステイン、 $\gamma$ -GC、グルタチオンをモノプロモビメイン (mBr)で誘導、標識化後、HPLCにより分離定量した。

(3)  $\gamma$ -GC合成酵素 (GCS)およびグルタチオンシンターゼ (GS)の酵素活性の測定

①間接作用；初代神経細胞に薬剤を添加し、4時間後にライセートを調製。ライセートとGCS反応液を混ぜ、基質システイン添加により酵素反応を開始した。反応生成物はmBrで誘導化し、HPLCにて分離定量した。GSの酵素活性は、基質 $\gamma$ -GCを添加し同様に測定した。

②直接作用；初代神経細胞のけん濁液に薬剤を添加し、基質添加により酵素反応を開始した。①と同様に反応生成物を定量した。

またRT-PCR法により遺伝子発現量の変化を評

価した。

#### (4)細胞分画

薬剤処置した細胞からホモジネートを調製し1000 gで5分遠心し沈殿を核画分とした。上清は濾過後11000gで10分遠心。上清を細胞質分画、沈殿をミトコンドリア分画とした。マウス脳ホモジネートからはパーコール密度勾配遠心法にて細胞を分画した。

#### (5) In vivoでの神経保護作用

妊娠マウスの子宮血管を結紮して胎児への血流を一時的に遮断後、再還流して胎児脳における虚血再還流モデルを作製した。再還流24時間後の胎児の生存率、脳ホモジネート中のGSHを測定した。虚血再還流直前に母体にH2Sを投与し作用を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) in vitroでのH2Sの神経細胞保護作用の解明

##### ①システイン取り込みの寄与

システインは、細胞外液では主として酸化型のシスチンとして存在し、細胞内取り込み後にシステインに還元される。ところがプラズマには約  $20 \mu\text{M}$  のシステインが存在し、これは多種類の細胞に広く発現するアミノ酸トランスポーターにより細胞内に取り込まれる。つまり細胞外シスチンが H2S などで還元されてシステインとなれば、このアミノ酸トランスポーターにより速やかに取り込まれる可能性がある。この可能性を検討するため、H2S の細胞保護作用を強力な還元物質である  $\beta$ -メルカプトエタノール ( $\beta\text{me}$ ) およびジチオスレイトール (DTT) と比較した。

細胞培地に H2S、 $\beta\text{me}$ 、DTT を加えると、培地のシスチンが還元されてシステイン濃度が急激に上昇した。また神経細胞に  $\beta\text{me}$ 、DTT を添加すると、H2S と同様にグルタミン酸誘発性酸化ストレスによる細胞死が低下し、細胞内システイン、GSH が上昇した。これより、細胞外からシステインが取り込まれ GSH 産生が供されることが示された。それでは、H2S による細胞保護作用は、そのシスチン還元能のみに依存するのだろうか？

そこで細胞内システイン量と GSH 量をプロットして、GSH の合成効率を検討したところ、H2S は  $\beta\text{me}$  よりも低量のシステインから GSH を合成することが分かった。一方  $\beta\text{me}$  の合成効率は、外液に加えたシステインと同様であり、 $\beta\text{me}$  による GSH 増大はシスチンの還元能に依存することが示唆された。一方、H2S による細胞保護作用は、還元作用によるものと、

よらないものがあることが示された。次に還元能によらない、H2S の細胞保護作用を検討した。

##### ②GSH 合成酵素の酵素活性に対する作用

GSH は2つの酵素、 $\gamma$ -GCS と GS により段階的に合成される。H2S はこの2つの酵素の反応産物を増やすため、これら合成酵素の活性を調節する可能性がある。そこで律速酵素  $\gamma$ -GCS を BSO により阻害してみると GSH の合成効率が低下した。これは H2S により部分的に回復したが、 $\beta\text{me}$  は全く効果がなかった。つまり H2S は  $\beta\text{me}$  とは異なり、 $\gamma$ -GCS 活性を増加させた。この作用は、 $\gamma$ -GCS RNA 量の変化を伴わない早い作用であった。一方 H2S は GS の活性は変化させなかった。

##### ③ミトコンドリアにおける H2S の抗酸化作用

GSH は主として細胞質に存在し、一部がミトコンドリアに存在する。そこで細胞画分による GSH 増加の違いを調べるため、細胞を分画して GSH 量を測定した。H2S は、 $\beta\text{me}$  と比べて、ミトコンドリアおよび核 GSH を大きく増加させ、これら画分に GSH が蓄積することが分かった。

また H2S 合成酵素 MST とミトコンドリア型 CAT を過剰発現させた Neuro2a 細胞では、グルタミン酸誘発性酸化ストレスで死にくくなり、耐性が獲得された。これより H2S により特にミトコンドリア GSH が増えることが分かった。

#### (2) in vitro、in vivoでのH2Sの神経細胞保護作用の検証

H2S が、グルタミン酸毒性だけでなく、他の酸化ストレスに対しても細胞保護作用を持つかを検討した。Neuro2a 細胞に過酸化水素 (H2O2) を加えると、酸化的ストレスにより細胞死が起こる。H2S 共存により細胞死が顕著に低下した。H2O2 により細胞内 GSH 量も低下したが、これも H2S 共存で正常量以上に増加した。同様の結果は HT22 細胞でも確認された。これより H2S は、多様な酸化ストレスから細胞を保護することが分かった。

次に in vivo における H2S の神経細胞保護作用を検討した。マウス胎児脳に虚血再還流を施すと、再還流 24 時間後には全例が死亡し、脳内 GSH 量が激減する。ところが虚血再還流直前に母体に H2S を投与しておく、再還流 24 時間後の胎児の死亡率は 24% にとどまり、死亡例と生存例を合わせた脳内 GSH 量は対照の 75% に維持された。このように H2S は胎児脳においても GSH 量の低下を阻止して、

虚血再還流より細胞を保護することが示された。

本研究より、H<sub>2</sub>S が複数のメカニズムにより細胞内 GSH 量を増大/維持して、酸化ストレス障害から細胞を保護することがわかった。GSH は抗酸化と解毒に重要で、多くの疾患と関わるが GSH を増やす方法は少ない。このため H<sub>2</sub>S は GSH を増やす稀有な物質として有用である。H<sub>2</sub>S により、特に酸化ストレス負荷が大きいミトコンドリアで GSH が増えることは興味深い。また H<sub>2</sub>S の細胞保護作用は、複数の *in vitro*, *in vivo* モデルで再現されたため、H<sub>2</sub>S の細胞保護作用は多くの細胞/組織で発揮される普遍的なものと考えられる。

H<sub>2</sub>S による細胞保護作用は、既に多くの細胞、組織、虚血再還流モデルで再現されており、H<sub>2</sub>S の細胞保護作用を創薬応用する試みも進んでいる。H<sub>2</sub>S 徐放剤と非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) のハイブリッド剤では、副作用の低減と親化合物にはなかった心筋保護作用が発現した。パーキンソン病治療薬 L-DOPA と H<sub>2</sub>S 徐放剤のハイブリッド剤では、親化合物にはなかった炎症の低減と GSH 増大により神経変性の遅延/低減が期待されている。このように H<sub>2</sub>S の創薬、臨床応用はさらに進むものと期待される。

#### 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 9 件)

1. 木村由佳、木村英雄 (2013) 生理活性物質硫化水素 (H<sub>2</sub>S) の医療応用 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス、PMDRS, 44(3), 190-199, 査読なし

2. Kimura Y, Mikami Y, Osumi K, Tsugane M, Oka JI, Kimura H. 2013 Feb 14 [Epub ahead of print] Polysulfides are possible H<sub>2</sub>S-derived signaling molecules in rat brain FASEB J. 2013 Feb 14. doi:10.1096/fj.12-226415、査読あり

3. Shibuya N, Koike S, Tanaka M, Ishigami-Yuasa M, Kimura Y, Ogasawara Y, Fukui K, Nagahara N, Kimura H. (2013) A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. Nat Commun. 4:1366. doi: 10.1038/ncomms2371. 査読あり

4. Kimura H, Shibuya N, Kimura Y. (2012) Hydrogen sulfide is a signaling molecule and a cytoprotectant. Antioxid Redox Signal. 17(1):45-57. doi: 10.1089/ars.2011.4345. Review. 査読あり

5. Taniguchi S, Kimura T, Umeki T, Kimura Y, Kimura H, Ishii I, Itoh N, Naito Y, Yamamoto H, Niki I. (2012) Protein phosphorylation involved in the gene expression of the hydrogen sulphide producing enzyme cystathionine  $\gamma$ -lyase in the pancreatic  $\beta$ -cell. Mol Cell Endocrinol. 350(1):31-8. doi: 10.1016/j.mce.2011.11.016. 査読あり

6. Sasakura K, Hanaoka K, Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, Komatsu T, Ueno T, Terai T, Kimura H, Nagano T. (2011) Development of a highly selective fluorescence probe for hydrogen sulfide. J Am Chem Soc. 133(45):18003-5. doi: 10.1021/ja207851s. 査読あり

7. Mikami Y, Shibuya N, Kimura Y, Nagahara N, Yamada M, Kimura H. (2011) Hydrogen sulfide protects the retina from light-induced degeneration by the modulation of Ca<sup>2+</sup> influx. J Biol Chem. 286(45):39379-86. doi: 10.1074/jbc.M111.298208. 査読あり

8. Mikami Y, Shibuya N, Kimura Y, Nagahara N, Ogasawara Y, Kimura H. (2011) Thioredoxin and dihydrolipoic acid are required for 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase to produce hydrogen sulfide. Biochem J. 1;439(3):479-85. doi: 10.1042/BJ20110841. 査読あり

9. Kimura Y, Goto Y, Kimura H. (2010) Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. Antioxid Redox Signal. 12(1):1-13. doi: 10.1089/ars.2008.2282. 査読あり

[学会発表] (計 24 件)

1. 木村由佳、後藤雄一、木村英雄 (2013 年 3 月 22 日) 神経細胞における硫化水素の細胞保護作用 ; グルタチオンの産生の増大

と、ミトコンドリアにおける酸化ストレスの抑制. 第86回日本薬理学会 (福岡)

2. 木村 英雄、三上 義礼、渋谷 典広、木村 由佳、小笠原裕樹、永原 則之、山田 雅弘 (2013年3月22日) 硫化水素 (H<sub>2</sub>S) の生合成と光障害からの視神経保護. 第86回日本薬理学会 (福岡)

3. 渋谷 典広、湯浅 (石上) 磨里、田中真紀子、木村 由佳、小笠原裕樹、福井 清、木村 英雄 (2013年3月23日) マウスにおける生理活性物質 H<sub>2</sub>S の生産経路. 第86回日本薬理学会 (福岡)

4. Norihiro Shibuya, Mari Ishigami, Makiko Tanaka, Yuka Kimura, Yuki Ogasawara, Kiyoshi Fukui, Hideo Kimura (2012年12月16日) Another pathway to produce H<sub>2</sub>S in the brain 第85回日本生化学会大会(福岡)

5. Yuka Kimura, Yu-ichi Goto, Hideo Kimura (2012年12月16日) Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress by increasing glutathione production and suppresses mitochondrial oxidative stress. 第85回日本生化学会大会(福岡)

6. Hideo Kimura, Yoshinori Mikami, Norihiro Shibuya, Yuka Kimura, Yuki Ogasawara, Noriyuki Nagahara (2012年12月16日) Regulation of H<sub>2</sub>S production by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. 第85回日本生化学会大会(福岡)

7. 木村 由佳、後藤 雄一、木村 英雄 (2012年9月19日) 神経細胞における硫化水素の細胞保護作用. 第35回日本神経科学大会(名古屋)

8. 三上 義礼、渋谷 典広、木村 由佳、永原 則之、山田 雅弘、木村 英雄 (2012年9月20日) 硫化水素 (H<sub>2</sub>S) は網膜光受容細胞を光障害から保護する. 第35回日本神経科学大会 (名古屋)

9. 渋谷 典広、石上 磨里、田中 真紀子、木村 由佳、小笠原 裕樹、福井 清、木村 英雄 (2012年9月21日) マウス脳における H<sub>2</sub>S の生産経路. 第35回日本神経科学大会(名古屋)

10. 木村 由佳、後藤 雄一、木村 英雄 (2012年3月15日) 硫化水素は、グルタチオンの産生の増大と、ミトコンドリアにおける酸化的ストレスの抑制により、神経細胞死を軽減する. 第85回日本薬理学会年会(京都)

11. 渋谷 典広、石上 磨里、田中 真紀子、木村 由佳、小笠原 裕樹、福井清、木村 英雄 (2012年3月15日) マウス脳における硫化水素の生産経路. 第85回日本薬理学会年会 (京都)

12. 木村 英雄、三上 義礼、渋谷 典広、木村 由佳、永原則之、小笠原 裕樹 (2012年3月15日) 生体内硫化水素合成酵素 3-メルカプトピルビン酸イオウ転移酵素の補因子、チオレドキシシンとジヒドロリポ酸. 第85回日本薬理学会年会 (京都)

13. 三上 義礼、渋谷典弘、木村由佳、永原則之、山田雅弘、木村英雄 (2012年3月16日) 網膜光障害における硫化水素(H<sub>2</sub>S)の細胞保護作用. 第85回日本薬理学会年会(京都)

14. Yuka Kimura, Yu-ichi Goto, Hideo Kimura (2011年9月23日) Neuroprotection by Hydrogen sulfide; Suppression of oxidative stress in mitochondria by increasing glutathione levels. 第84回日本生化学会大会 (京都)

15. 渋谷 典広、田中 真紀子、石上 磨里、木村 由佳、小笠原 裕樹、木村 英雄 (2011年9月24日) マウス脳における新規のH<sub>2</sub>S生産経路. 第84回日本生化学会大会(京都)

16. 三上 義礼、渋谷典弘、木村由佳、永原則之、山田雅弘、木村英雄 (2011年9月22日) 網膜における硫化水素の生合成と細胞保護作用. 第84回日本生化学会大会(京都)

17. 木村 英雄、三上 義礼、渋谷典弘、木村由佳、永原則之、小笠原 裕樹 (2011年9月23日) 3-メルカプトピルビン酸イオウ転移酵素の硫化水素生産補因子. 第84回日本生化学会大会 (京都)

18. 木村 由佳、後藤 雄一、木村 英雄

(2011年9月17日) 硫化水素は、酸化的ストレスから神経細胞を保護する. 第34回日本神経科学大会 (横浜)

19. 木村 英雄、三上 義礼、渋谷 典広、木村 由佳、小笠原 裕樹 (2011年9月17日) H<sub>2</sub>S 生産酵素 3MST の補因子の探索. 第34回日本神経科学大会 (横浜)

20. 渋谷 典広、石上 磨里、田中 真紀子、木村 由佳、小笠原 裕樹、木村 英雄 (2011年9月16日) 脳における硫化水素生産酵素の探索. 第34回日本神経科学大会 (横浜)

21. 三上義礼、渋谷典弘、木村由佳、永原則之、山田雅弘、木村英雄 (2011年9月16日) 網膜における H<sub>2</sub>S の生産制御とその細胞保護作用の解析 第34回日本神経科学大会 (横浜)

22. 木村由佳、後藤 雄一、木村 英雄 (誌上開催 2011年3月22日発表予定) 硫化水素は、グルタチオンの産生の増大と、ミトコンドリアにおける酸化的ストレスの抑制により、神経細胞を酸化的ストレスから保護する 第84回日本薬理学会年会 (横浜)

23. 渋谷 典広、石上 磨里、田中 真紀子、木村 由佳、小笠原 裕樹、木村 英雄 (誌上開催 2011年3月22日発表予定) 脳における硫化水素の生産経路 第84回日本薬理学会年会 (横浜)

24. 三上 義礼、渋谷 典広、木村 由佳、小笠原 裕樹、永原 則之、木村 英雄 (誌上開催 2011年3月23日発表予定) H<sub>2</sub>S の生産制御と細胞保護作用 第84回日本薬理学会年会 (横浜)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 由佳 (KIMURA YUKA)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所神経薬理研究部・研究補助員

研究者番号 : 60425692

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

木村 英雄 (KIMURA HIDEO)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所神経薬理研究部・部長

研究者番号 : 30321889

(平成 23、24 年度のみ)