

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月14日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658230

研究課題名（和文）硫化水素の消化管機能制御機構の解明：H₂S は内因性伝達物質か？研究課題名（英文）Regulatory mechanisms of hydrogen sulfide in gastrointestinal functions: Is H₂S an endogenous transmitter?

研究代表者

乙黒 兼一 (OTSUGURO KENICHI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：40344494

研究成果の概要（和文）：消化管機能の制御に関与する知覚神経細胞と腸管クロマフィン細胞のモデルRIN14B細胞を用い、硫化水素ドナーNaHSの作用の検討を行ったところ、硫化水素はTRPA1を活性化して細胞内Ca²⁺濃度を増加させ、神経の興奮及び分泌反応を生じることが明らかとなった。また神経細胞モデルPC12細胞には硫化水素合成酵素AST (aspartate aminotransferase)/MPST (mercaptopyruvate sulfurtransferase)が発現し、硫化水素を合成することが示された。腸管組織の神経系細胞は管腔内の硫化水素によって反応を引き起こすだけでなく、自ら硫化水素を合成することで消化管機能を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The effects of an hydrogen sulfide (H₂S) donor, NaHS, on the sensory neurons and model cells (RIN14B) for enterochromaffin cells were examined. H₂S increased intracellular Ca²⁺ levels via the activation of TRPA1, resulting in neuronal excitation and secretory responses. The neuronal model PC12 cells expressed AST (aspartate aminotransferase)/MPST (mercaptopyruvate sulfurtransferase) and generated H₂S. In the intestine, it is suggested that neuronal cells not only respond to intraluminal H₂S but also synthesizes H₂S to regulate gastrointestinal functions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：硫化水素, TRPA1, 細胞内カルシウム, RIN14B, 知覚神経, 5-HT

1. 研究開始当初の背景

硫化水素 (H₂S) は有毒ガスとしてよく知られているが、近年内因性のガス状伝達物質としての知見が蓄積しつつある。消化管の内腔には、腸内細菌によって産生される H₂S が定量的に存在し、炎症や腫瘍などの病態下でその濃度が上昇する。さらに、哺乳類細胞にも硫化水素産生酵素が発現していることが明らかとなり、消化管組織内でも H₂S 合成が行われている可能性がある。

H₂S は比較的高濃度で消化管平滑筋に対し

て直接作用を示すことが報告されている。一方、消化管機能を制御している神経系や腸管分泌細胞に対する効果はわかっていない。また、神経系細胞が硫化水素を自ら産生する可能性も考えられる。

2. 研究の目的

(1) H₂S の神経系細胞への作用を明らかにする。消化管機能の制御に関与する知覚神経の興奮や腸管分泌細胞の伝達物質放出反応に与える H₂S の効果を検討し、その分子機構

を明らかにする,

(2) 神経系細胞における H₂S 合成機構を明らかにする. 神経細胞における H₂S 産生を測定し, それに関わる合成酵素の発現と産生制御機構を明らかにする.

3. 研究の方法

(1) 知覚神経としてラット培養脊髄後根神経節細胞を, 腸管クロマフィン細胞のモデル細胞として RIN14B 細胞を, 神経系細胞のモデルとして PC12 細胞をそれぞれ用いた. H₂S ドナーとして水溶液中で H₂S を放出する NaHS を用いた.

(2) 知覚神経と RIN14B 細胞の細胞内カルシウム濃度 ([Ca²⁺]_i) は Ca²⁺ 蛍光指示薬 fura-2 を用いてイメージング法により測定した. 倒立蛍光顕微鏡のステージ上の実験槽に, カバーガラスに播種した細胞を置き, 栄養液で灌流した.

(3) 知覚神経の細胞膜電流反応は, ホールセルボルテジックランプ法により測定した. 膜電位を -80 mV に保持し, NaHS を適用した. また -120 mV から +120 mV までのランプ電位を用いて, NaHS 誘発電流の電流-電圧関係を検討した.

(4) RIN14B 細胞からの 5-HT 放出は, HPLC 法と電気化学的検出法により測定した. RIN-14B 細胞に NaHS を処置し, 30 分間 37°C でインキュベーションした後, 溶液中及び細胞内の 5-HT 量をそれぞれ測定し, 放出率を算出した.

(5) RIN14B 細胞における TRPA1 及び 5-HT の発現は, 免疫組織染色法により検討した.

(6) PC12 細胞, 脳及び肝臓の H₂S 合成酵素 CSE (cystathionine γ -lyase), CBS (cystathionine β -synthase), AST 及び MPST の発現は, それぞれの酵素に対する特異的な抗体を用い, ウェスタンブロット法により検討した.

(7) CSE, CBS 及び AST/MST 活性による H₂S 産生は, PC12 細胞, 脳及び肝ホモゲネートを用い, H₂S を亜鉛でトラップした後に, メチレンブルー産生法によって吸光度を測定することで算出した. H₂S 産生酵素の補因子 pyridoxal phosphate 存在下で CSE 活性はシステインを添加によって, CBS 活性はシステインとホモシステイン添加によって, AST/MST 活性はシステインと α -ケトグルタル酸, ジチオスレイトール (DTT) を添加し

それぞれ測定した.

4. 研究成果

(1) 知覚神経細胞における H₂S 作用

①ラット後根神経節から分離培養された細胞に NaHS を適用すると, 全ての細胞で [Ca²⁺]_i 増加反応が観察された. 高濃度 KCl に反応性を持つ全ての神経細胞で [Ca²⁺]_i の上昇が生じた. 一部の細胞 (約 20%) で顕著な [Ca²⁺]_i 増加反応が生じ, この NaHS 感受性細胞は TRPA1 アゴニストであるマスタードオイルにも反応した. 一方, マスタードオイルに反応しない細胞及び高濃度 KCl に反応しない非神経細胞では, NaHS はわずかな [Ca²⁺]_i 増加反応しか生じなかった. NaHS 感受性細胞は小型から中型の知覚神経細胞で, 大型細胞では NaHS の反応は認められなかった. 以下の実験はマスタードオイル感受性神経細胞を用いて行った.

②NaHS による [Ca²⁺]_i 増加反応は濃度及び時間依存性を示し, 10 分間の処置では nM レベルの NaHS によって反応が生じた (図 1).

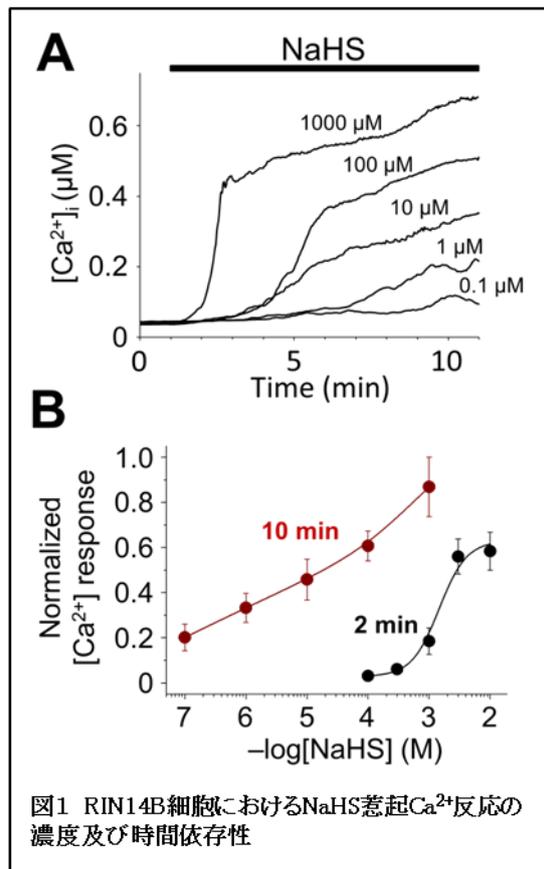


図1 RIN14B細胞におけるNaHS惹起Ca²⁺反応の濃度及び時間依存性

③NaHS 惹起 [Ca²⁺]_i 増加反応は外液 Ca²⁺ 除去とルテニウムレッド (RR: TRP アンタゴニスト) 及び HC-030031 (TRPA1 アンタゴニスト) で抑制されたが, TRPV1 アンタゴニスト

iodoresiniferatoxin (IRTX) や電位依存性 Ca^{2+} チャネル遮断薬 nifedipine (Nif), ω -conotoxin (ω -CTX), mibefradil (Mib) では抑制されなかった (図2).

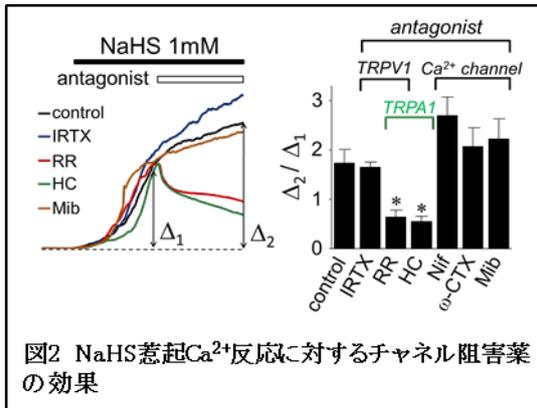


図2 NaHS惹起 Ca^{2+} 反応に対するチャンネル阻害薬の効果

④NaHS 惹起 Ca^{2+} 反応は、ジスルフィド結合を阻害する還元剤 DTT で阻害された。

⑤NaHS は保持電位 -80 mV で内向き電流反応を引き起こし、この反応は HC-030031 で抑制された。NaHS 惹起電流の逆転電位は約 0 mV であった (図3)。

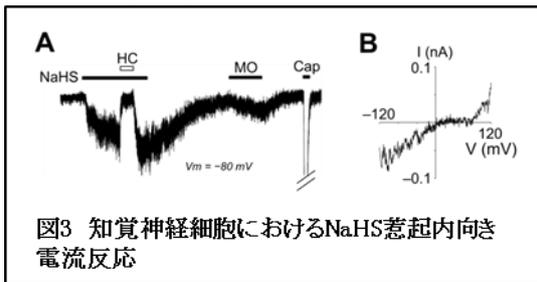


図3 知覚神経細胞におけるNaHS惹起内向き電流反応

⑥ H_2S は知覚神経で TRPA1 を活性化し、 Ca^{2+} 流入を引き起こすことが明らかになった。 H_2S による TRPA1 活性化メカニズムとして、システイン残基に対する共有結合修飾が関与していることが示唆された。TRPA1 は知覚神経の中でも、痛覚を受容する小型から中型の細胞に発現していることから、 H_2S が末梢の一次知覚神経を刺激し、痛みを惹起する可能性が考えられる

(2) RIN14B 細胞における H_2S 作用

①RIN14B 細胞に NaHS を適用すると、ほぼすべての細胞で $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応がみられた。この反応は、HC-030031 と外液 Ca^{2+} 除去によって阻害された (図4)。また多くの細胞は自発的な $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションを起こしていたが、NaHS は適用直後にこの自発活性を抑制した後に、 $[Ca^{2+}]_i$ の増加を引き起こした。

②NaHS は、RIN14B 細胞から 5-HT を濃度依存的に放出させ、この反応も HC-030031 及び外

液 Ca^{2+} 除去によって抑制された (図5)。

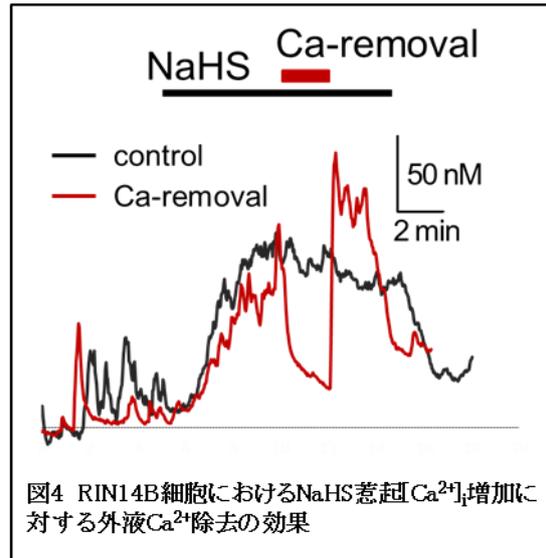


図4 RIN14B細胞におけるNaHS惹起 Ca^{2+} 増加に対する外液 Ca^{2+} 除去の効果

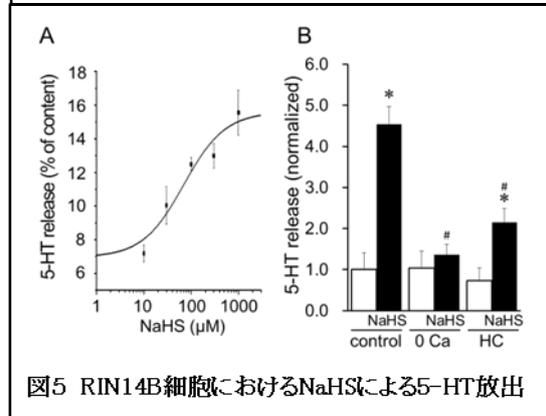


図5 RIN14B細胞におけるNaHSによる5-HT放出

③免疫染色によって、RIN14B は TRPA1 と 5-HT を発現していることが示された (図6)。

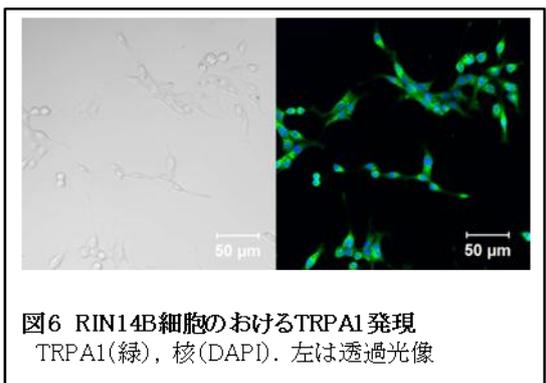


図6 RIN14B細胞におけるTRPA1発現
TRPA1(緑), 核(DAPI). 左は透過光像

④NaHS 惹起 Ca^{2+} 反応及び 5-HT 放出反応は、DTT により著しく抑制された。一方、DTT より還元力が強いが膜透過性が低い tris-(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) は DTT よりも抑制効果が弱かった (図7)。

⑤RIN14B 細胞において、 H_2S は TRPA1 の活性化を介して $[Ca^{2+}]_i$ 増加を生じ、 Ca^{2+} 依存性の 5-HT を放出させることが示された (図8)。

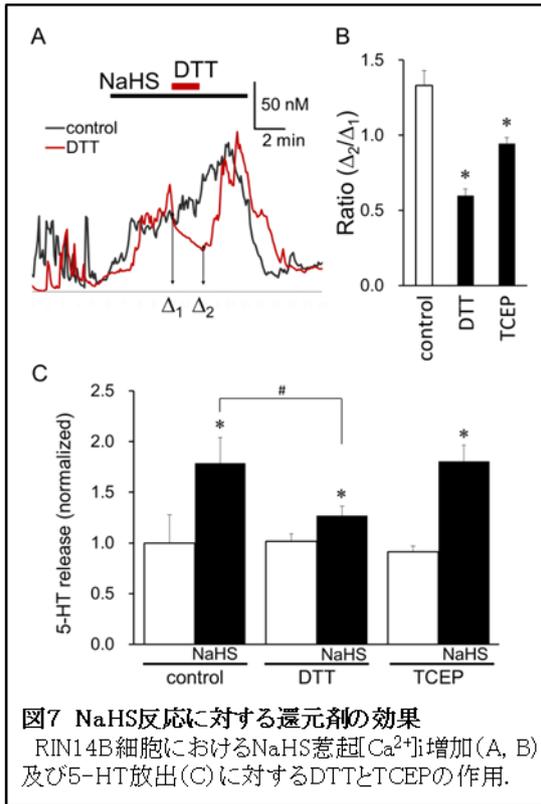


図7 NaHS反応に対する還元剤の効果
RIN14B細胞におけるNaHS惹起 $[Ca^{2+}]_i$ 増加(A, B)及び5-HT放出(C)に対するDTTとTCEPの作用。

H_2S は膜透過性が高いため、細胞膜を通過してTRPA1の細胞内ドメインに作用して、チャネルの開口を引き起こしていることが示唆された。 H_2S は腸管クロマフィン細胞のような腸管分泌細胞においても、 Ca^{2+} 依存性の開口放出を惹起する可能性がある。また、NaHSによって $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションの自発活性が抑制されたことから、 H_2S が放出反応に対して興奮性と抑制性の作用を併せ持っている可能性が示唆される。

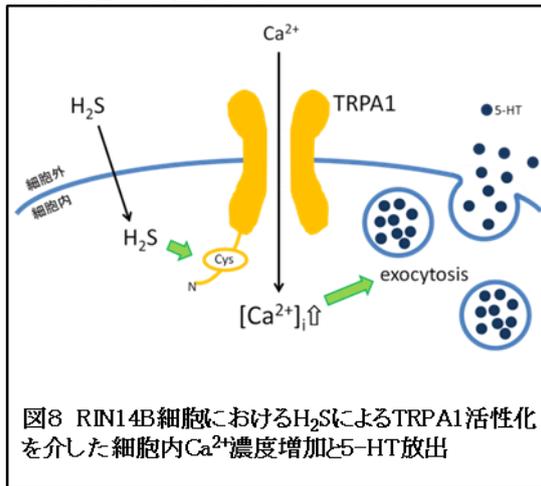


図8 RIN14B細胞における H_2S によるTRPA1活性化を介した細胞内 Ca^{2+} 濃度増加と5-HT放出

(3) PC12細胞における H_2S 産生

① H_2S 産生経路として知られている3つの経路(図9)に関与する酵素のうち、肝臓にはCSE, CBS及びAST/MPSTの全ての H_2S 合成酵素の発現が認められた。脳と神経細胞モデル

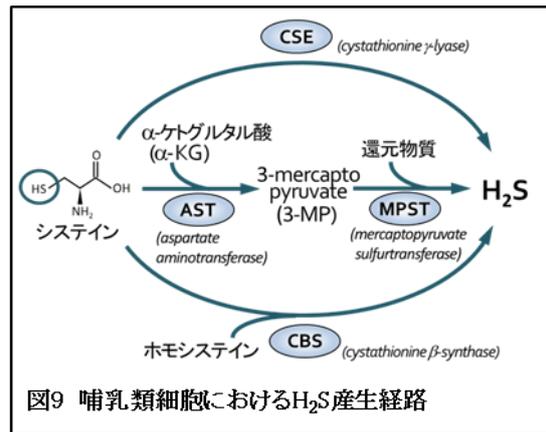


図9 哺乳類細胞における H_2S 産生経路

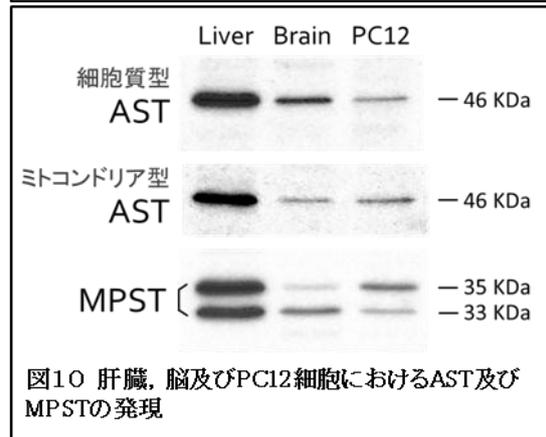


図10 肝臓, 脳及びPC12細胞におけるAST及びMPSTの発現

であるPC12細胞では、CBSとAST/MPST発現が検出された(図10)。

②肝臓ではCSE, CBS及びAST/MPST活性による H_2S 産生が生じた。脳ではCBS及びAST/MPST活性による H_2S 産生が生じたが、PC12細胞ではAST/MPST活性による H_2S 産生のみが認められた(図11)。

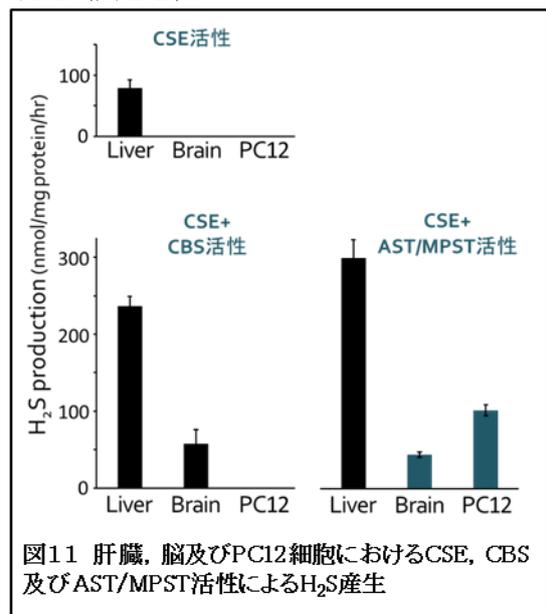


図11 肝臓, 脳及びPC12細胞におけるCSE, CBS及びAST/MPST活性による H_2S 産生

③PC12細胞におけるH₂S産生は、AST/MPST経路を介したH₂S産生に必要な α -ケトグルタル酸及びDTTの濃度依存性を示し、それぞれの物質単独の存在下では、H₂S産生量はわずかであった(図12)。

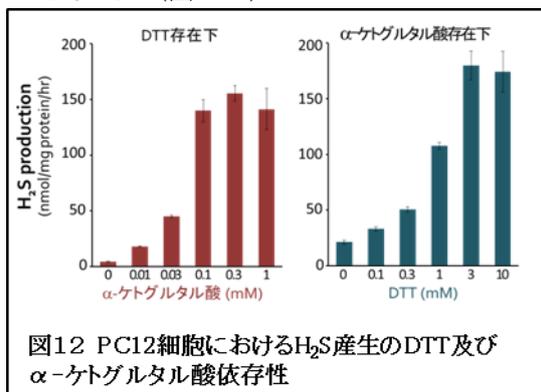


図12 PC12細胞におけるH₂S産生のDTT及び α -ケトグルタル酸依存性

④H₂S産生は、AST活性を阻害するアスパラギン酸あるいはアミノオキシ酢酸によって抑制された(図13)。また、AST活性によってシステインから産生されMPSTの基質となる3-メルカプトピルビン酸の添加によっても、H₂S産生が生じた。siRNAによるMPSTのRNA干渉によってPC12細胞のMPST発現量を減少させると、H₂S産生量は減少した。

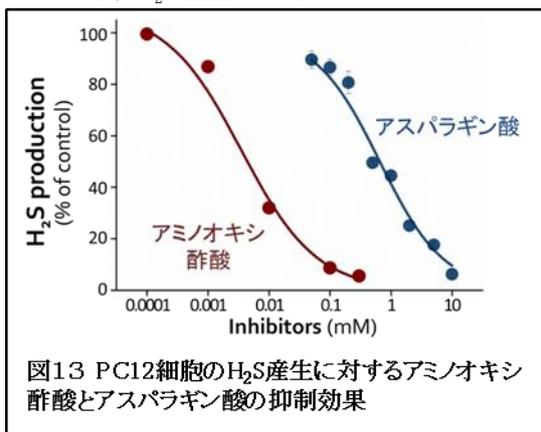


図13 PC12細胞のH₂S産生に対するアミノオキシ酢酸とアスパラギン酸の抑制効果

⑤PC12細胞におけるH₂S産生は、pH 8.5付近をピークとするベルシェイプ状のpH依存性を示した(図14)。

⑥神経細胞モデルであるPC12細胞では、AST/MPST経路を介して、H₂Sが産生されることが示された。AST/MPSTの主な発現部位がミトコンドリアであることや、細胞質のpHが7.2前後であるのに対して、ミトコンドリアのpHは8.0前後であることから、H₂Sの産生部位としてミトコンドリアが重要な役割を果たしていることが示唆される。神経細胞で産生されたH₂Sは、細胞内情報伝達分子として産生細胞内で作用するだけでなく、細胞外に放出され周辺の神経細胞やその他の組織に作用している可能性が考えられる。

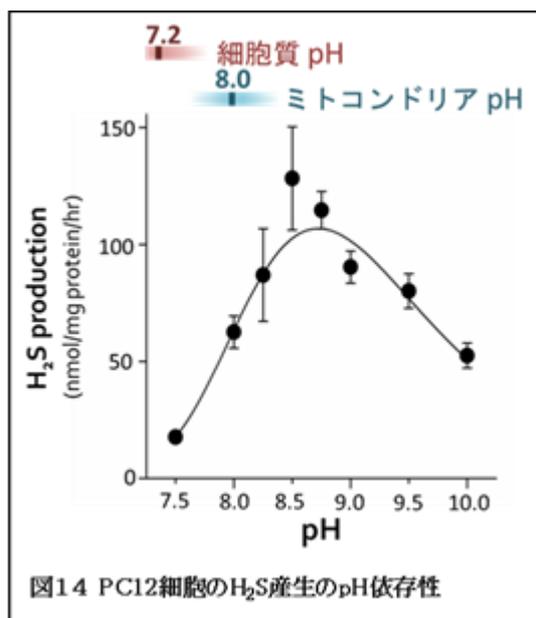


図14 PC12細胞のH₂S産生のpH依存性

(4) まとめ

今研究によって、知覚神経細胞や分泌細胞に対して、H₂Sが興奮性と抑制作用を示すことが明らかとなった。H₂Sは非選択的陽イオンチャネルであるTRPA1を活性化し、内向き電流反応を引き起こすことによって、神経細胞の興奮性の上昇や、Ca²⁺依存性の開口放出反応を生じると考えられる。これらの反応は、平滑筋などへ作用する濃度よりも低濃度のH₂Sで生じた。また神経細胞はH₂S産生酵素を発現し、自ら産生したH₂Sによっても作用を引き起こしていると考えられる。神経や分泌細胞は消化管機能の制御に重要な役割を果たしているため、これらの細胞に発現しているTRPA1がH₂Sセンサーとして働き、消化管運動や粘液分泌に影響を与えている可能性が示された。

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2件)

- ①Iwasaki T, Otsuguro K, Kobayashi T, Ohta T, Ito S. Endogenously released 5-HT inhibits A and C fiber-evoked synaptic transmission in the rat spinal cord by the facilitation of GABA/glycine and 5-HT release via 5-HT_{2A} and 5-HT₃ receptors. Eur. J. Pharmacol. (2013) 702, 149-157. 査読有
- ②Miyamoto R, Otsuguro K, Ito S. Time- and concentration-dependent activation of TRPA1 by hydrogen sulfide in rat DRG neurons. Neurosci. Lett. (2011) 499, 137-142. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

- ①宮本 亮, PC12 細胞における硫化水素産生について, 第 154 回日本獣医学会学術集会, 平成 24 年 9 月 16 日, 岩手大学 (盛岡市)
- ②宮本 亮, 神経系細胞におけるシステインを基質とした硫化水素産生について, 第 26 回北海道薬物作用談話会, 平成 24 年 7 月 28 日, 北海道大学 (札幌市)
- ③氏家 絢子, 硫化水素の RIN14B 細胞の細胞内カルシウム濃度に対する作用, 第 153 回日本獣医学会学術集会, 平成 24 年度 3 月 28 日, 大宮ソニックシティ (大宮市)
- ④Ayako Ujike, Increase in $[Ca^{2+}]_i$ induced by H_2S in RIN14B cells, 第 85 回日本薬理学会年会, 平成 24 年 3 月 15 日, 国立京都国際会館 (京都市)

〔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〕

研究室ホームページ:

<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/pharmacol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

乙黒 兼一 (OTSUGURO KENICHI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号: 40344494

(2) 連携研究者

伊藤 茂男 (ITO SHIGEO)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号: 40109509