

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31日現在

機関番号：32622
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659068
 研究課題名（和文） 薬毒物による三種の生理的ガス状物質産生の相互調節に関する研究
 研究課題名（英文） Mutual regulation of physiological gases by xenobiotics
 研究代表者
 吉田 武美 (YOSHIDA TAKEMI)
 昭和大学・薬学部・名誉教授
 研究者番号：90006354

研究成果の概要（和文）：

ガス状物質である一酸化炭素、硫化水素、一酸化窒素は、生体内において生理的に産生され、様々な細胞機能の調節を担っていると考えられている。本研究では、ガス状物質産生酵素の薬毒物や生体内因子による発現調節および病態における役割について検討を行い、酸化ストレス誘発物質、生体内抗炎症物質、増殖因子により一酸化炭素合成酵素および硫化水素合成酵素が発現誘導されることを見出した。また、これらの酵素が肝傷害および動脈硬化に対して抑制的に機能する可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Physiologically produced gaseous substances such as carbon monoxide, hydrogen sulfide, and nitric oxide have been assumed to play roles in controlling biological functions. In the present study, we examined up-regulation of gaseous substance-generating enzymes by xenobiotics and biologic factors, and its roles in disease developments. An oxidative stress inducer, a physiological antioxidant, and a growth factor induced carbon monoxide- and hydrogen sulfide-generating enzymes. Furthermore, we have uncovered possible roles of these enzymes in inhibiting liver injury and arteriosclerosis.

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：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：ガス状物質，一酸化炭素，硫化水素，Nrf2，肝傷害，動脈硬化，血管平滑筋細胞

1. 研究開始当初の背景

生理的に産生されるガス状物質として、一酸化窒素 (NO)、一酸化炭素 (CO) および硫化水素 (H₂S) が明らかとなっており、それぞれ脳神経系、心血管系、肝臓機能、炎症反応等の調節において重要な機能を有することが明らかになりつつある。NOは一酸化窒素合

成酵素 (iNOS)、COはヘムオキシゲナーゼ (HO)、H₂Sはシスタチオンγリアーゼ (CSE) とシスタチオンβ合成酵素 (CBS) がそれぞれ産生を触媒する。

申請者らは、これまで薬毒物によるCO産生を触媒する誘導型HO (HO-1) の誘導機構や酸化ストレス防御に関して、多くの成果を挙げている。またHO-1とNO産生を触媒する誘

導型 NOS (iNOS) の相互調節の存在を解明してきた。これら結果は、NO と CO に加え H₂S の三者のガス状物質の相互調節の可能性への発展を示唆するものであり、各ガス状物質が重要な機能を果たしていると考えられるマクロファージ、脳神経系、肝臓および心血管系での機能調節のさらなる解明への期待につながる。

NO に関しては、これまで循環系はじめ多くの疾患との関係、さらに医薬品としての役割も含め、国内外で膨大な研究成果が挙げられている。また、CO に関しても、申請者らの研究も含め、国内外において、薬毒物や食品成分などによる研究が進められ、神経変性疾患はじめ各種病態時での増加、サイトカイン等による誘導作用、さらに転写因子 Nrf2/Keap1 を介した誘導調節機構など、CO 産生酵素である HO の重要性が確認されている。一方、H₂S 産生系に関しては、国内外での研究が進められているのであるが、前二者のガス状生理的物質に比べると、その調節に関する研究は未だ途上にあると言える。

本研究は、これまでの各ガス状生理物質の個々に関して得られてきている研究成果、あるいは申請者らが示した CO と NO の二者間での調節など一部得られつつある相互調節の成果を基に、各組織における三者の相互調節の実態を解明する。特に薬毒物による H₂S 産生系への影響に関する報告は、それほど多くなく、さらには薬毒物により二者あるいは三者間が、同一組織でどうなっているのかを解析することにより、薬毒物投与時における各臓器における生理的ガス状物質の動態に関する有意義な情報収集が期待できる。

2. 研究の目的

本研究は、誘導性の生理的ガス状物質産生を触媒する酵素への薬毒物および生体内物質の作用を明らかにし、生体内におけるこれらのガス状物質の相互調節を明確にすること、また病態の進展におけるガス状物質産生酵素の役割についての解明を目指す。これらを明らかにすることで、病態時での解析、医薬品あるいは食品成分の有用性や問題点を提示できると考えられる。以下に具体的な目標を示す。

- (1) 酸化ストレス誘発物質、生体内抗炎症因子、成長因子等の処置による一酸化炭素および硫化水素産生酵素の発現変動
- (2) 血管平滑筋細胞遊走における硫化水素の役割
- (3) 薬毒物により誘発される肝傷害に対す

る CO 産生酵素 HO-1 の保護的役割

- (4) HO-1 転写因子 Nrf2 の血管内膜肥厚および血管平滑筋細胞遊走における役割

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ラット血管平滑筋細胞 (RASM 細胞) は、雄性 Sprague-Dawley ラット胸部大動脈からコラゲナーゼ/エラスターゼ溶液を用いた酵素消化法により単離した。RASM 細胞は、10%ウシ血清含有 DMEM 培地で培養し、薬物刺激 24 時間前に、血清非含有 DMEM 培地に交換した。

(2) 実験動物

実験動物は、C57BL/6 系または BALB/c 系雄性 8 週齢の野生型 (Wild-type, WT) または BALB/c 系雄性 8 週齢の Nrf2 遺伝子欠損 (KO) マウスを用いた。遺伝子型は、PCR により決定した。

(3) Modified Boyden chamber アッセイ法

細胞のケモタキシスは、8 μm ポアサイズのトランスウェルチャンバーを用いた。チャンバー上方に細胞を播種し、薬物をチャンバー下側に処置し、8 時間後の遊走細胞数を計測した。

(4) ウェスタンブロット法

4%SDS 溶液に可溶化した細胞サンプルを SDS-PAGE 後、PVDF メンブランに転写した。各タンパク質は、酵素抗体化学発光法に基づき検出した。

(5) Rac1 activity assay

細胞可溶化液に含まれる活性型 Rac1 を、活性型 Rac1 (Rac-GTP) のみが特異的に結合する GST 結合 PAK-1 タンパク質結合領域ペプチドを用いて、pull-down した。その後、Western blot 法により、Rac1 を検出した。

(6) 細胞内 ROS 検出法

活性酸素用蛍光プローブおよび Hoechst 33342 で細胞を処理し、一定時間後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。

(7) 蛍光免疫染色法

細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、0.05%トライトン X-100 で処理した。3%ウシ血清アルブミンでブロッキング後、1 次抗体で一晩処置した。PBS で洗浄後、蛍光標識された 2 次抗体で 1 時間処理し、その後対比染色として DAPI 溶液による核染色を行った。細胞の観察は、共焦点レーザー顕微鏡で行った。

(8) リアルタイム PCR 法

細胞から全 RNA を抽出し、RNA を逆転写後、TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR を行った。なお、検出した各 mRNA は恒常的に発現している β-アクチン mRNA で補正した。

(9) 血管傷害モデルの作製

マウス大腿動脈の血管を切開し、0.38mmのストレートワイヤーを5mm以上血管に挿入し、内膜を傷害した。ワイヤーを取り除いた後、傷口を糸でしばり、1, 2, 4週間後に傷害された血管を摘出した。

(10) 免疫組織化学染色

5 μ mの厚さにスライスした切片を脱パラフィン後、10%正常ヤギ血清でブロッキングし、一次抗体、ビオチン標識二次抗体、ペルオキシダーゼ基質溶液で反応させた。対比染色として核染色を行った。

(11) 免疫蛍光染色

5 μ mの厚さにスライスした切片を脱パラフィン後、10%正常ヤギ血清でブロッキングし、一次抗体、蛍光標識二次抗体を反応させた。

(12) 血清トランスアミナーゼ活性測定法

マウス血清中のALTとAST活性は、POP・TOOS法に基づいたトランスアミナーゼCII-テストワコー（和光純薬工業株式会社製）を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 薬毒物処置による一酸化炭素および硫化水素産生酵素の発現変動

血管組織を構成するVSMCを用いてガス状物質の発現変動を検討したところ、生体内で酸化ストレスを引き起こす50 μ Mブチルヒドロキシアニソール処理により、2時から16時間後までHO-1 mRNAが有意に増加し、並行してCSE、CBSも時間依存的な増加が見られた。しかしながら、CBS遺伝子発現は、CSEと比較すると非常に低レベルであった。また、抗炎症作用を示す生体内物質15d-プロスタグランジンJ2を処理したところ、2.5 μ Mから10 μ Mまで濃度依存的なHO-1 mRNAとCSE mRNAの増加が見られた。以上のことから、VSMCにおいてHO-1およびCSEが誘導されることが明らかになった。

(2) 血管平滑筋細胞遊走における硫化水素の役割

心血管系に焦点をあて、動脈硬化発症と進展に参与する血管傷害後の新生内膜肥厚とその重要なステップである血管平滑筋細胞

(VSMC) 遊走におけるガス状物質の機能について検討を行った。血管傷害後のVSMC遊走は、血小板由来増殖因子(PDGF)により惹起される。VSMCへのPDGF刺激により、硫化水素産生酵素CSEと一酸化炭素産生酵素HO-1が有意に発現誘導された。そこで、硫化水素ドナーで

あるNaHSを処置したところPDGF刺激によるVSMC遊走が有意に抑制された。また、HO-1の転写因子Nrf2をsiRNAでノックダウンしたところ、同様にPDGF刺激によるVSMC遊走が抑制された。以上の結果から、硫化水素と一酸化炭素がVSMCの機能調節に関与していることが示唆された。

(3) オーラノフィンによるヘムオキシゲナーゼ-1誘導を介したコカイン誘発肝傷害防御作用

関節リウマチ治療薬オーラノフィンは、免疫系細胞からのサイトカイン遊離抑制作用や酸化ストレス応答タンパク質HO-1誘導作用を有することが報告されている。しかしながら、その作用機序およびその他の病態に対する効果については報告されていない。乱用薬物コカインは、肝障害を誘発すること知られており、代謝過程で生成する活性酸素種や炎症性サイトカインが原因であると考えられている。本研究では、コカイン誘発肝障害に対するオーラノフィンの効果とHO-1の役割について検討を行った。マウスへのコカイン(75 mg/kg)処置16時間後に、血清ALT活性(4,100 IU/L)、AST活性(1,700 IU/L)の上昇および肝中心静脈周囲の壊死と、同時に肝壊死領域周囲においてHO-1の誘導が認められた。次にオーラノフィン処置によるHO-1の誘導を検討したところ、マウス肝、マウスおよびヒト初代培養肝細胞においてHO-1の誘導が認められた。そこで、オーラノフィンをコカイン投与12時間前に前処置し、コカイン誘発肝傷害に及ぼす影響を検討した結果、コカイン処置によるALTとAST活性上昇が用量依存的に有意に抑制され、10 mg/kgの用量でそれぞれ190 IU/L、230 IU/Lであった。以上より、オーラノフィンはコカインによる肝傷害に対してHO-1誘導を介して防御的に作用することが示唆された。

(4) 血管内膜肥厚および血管平滑筋細胞遊走におけるNrf2の役割

血管傷害後の組織修復は、VSMCの遊走が重要な役割を担っている。しかし、酸化ストレスによりVSMCの機能が障害されると修復段階で過剰な血管内膜の肥厚が生じ、動脈硬化につながることを示唆されている。生体内において酸化ストレス防御の中心的な役割を果たしているのが、細胞内レドックス変化に鋭敏に反応し、各種抗酸化酵素の遺伝子発現を統合的に制御する転写因子Nrf2である。本研究では、まだ明らかにされていないNrf2のVSMC遊走および血管傷害後の内膜肥厚における役割について検討を行った。VSMC遊走を

惹起する PDGF により NADPH オキシダーゼ活性化を介して産生される活性酸素種 (ROS) は、セカンドメッセンジャーとして PDGF のシグナル伝達的一端を担うが、同時に酸化ストレスを引き起こすと考えられる。本研究においても、VSMC への PDGF (25 ng/mL) 刺激により、NADPH オキシダーゼの構成分子 Rac1 の活性 (227%) と、細胞内の ROS レベル (133%) が上昇した。また並行して、Nrf2 の核移行とその標的遺伝子である NAD(P)H:キノンオキシドレダクターゼ-1 (287%)、HO-1 (678%)、チオレドキシン-1 (213%) の誘導が観察された。そこで、siRNA を用いて Nrf2 阻害実験を行った結果、対照群と比較して PDGF 刺激による Rac1 活性化 (174%) と ROS レベル上昇 (150%) が増強し、その下流シグナル伝達因子 ERK のリン酸化が持続した。さらに、VSMC における Nrf2 の機能的意義について細胞遊走アッセイにより確認したところ、Nrf2 siRNA 処置により PDGF による細胞の遊走能が増強 (182%) した。また、マウス大腿動脈ワイヤー傷害モデルを用いた解析により、Nrf2 遺伝子欠損マウスにおいて新生内膜の肥厚が亢進した。以上の結果から、Nrf2 は PDGF 刺激による ROS の産生と除去を制御することで、VSMC 遊走と血管リモデリングを調節していることが示唆された。

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 12 件)

[1] Shizu R, Shindo S, Yoshida T, Numazawa S
Cross-talk between constitutive androstane receptor and hypoxia-inducible factor in the regulation of gene expression
Toxicol Lett, 219(2): 143-150, 2013 (査読有)
DOI: 10.1016/j.toxlet.2013.03.014.

[2] Ashino T, Yamamoto M, Yoshida T, Numazawa S
Redox-sensitive transcription factor Nrf2 regulates vascular smooth muscle cell migration and neointimal hyperplasia
Arterioscler Thromb Vasc Biol, 33(4): 760-768, 2013 (査読有)
DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.300614.

[3] Taki K, Fukushima T, Ise R, Horii I, Yoshida T
Microarray analysis of 6-mercaptapurine-induced-toxicity-related genes and microRNAs in the rat placenta

J Toxicol Sci, 38(1): 159-167, 2013 (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23358152>

[4] Shizu R, Shindo S, Yoshida T, Numazawa S
MicroRNA-122 down-regulation is involved in phenobarbital-mediated activation of the constitutive androstane receptor
PLoS One, 7(7): e41291, 2012 (査読有)
DOI:
10.1371/annotation/75898a72-dfcb-4002-b749-8c04d78ba6e1.

[5] Taki K, Fukushima T, Ise R, Horii I, Yoshida T
6-Mercaptopurine-induced histopathological changes and xanthine oxidase expression in rat placenta
J Toxicol Sci, 37(3): 607-615, 2012 (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22688000>

[6] Shizu R, Numazawa S, Yoshida T
Involvement of microRNA in the induction of drug-metabolizing enzymes
Yakugaku Zasshi, 132(3): 311-318, 2012
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22382835>

[7] Numazawa S, Takase M, Ahiko T, Ishii M, Shimizu S, Yoshida T
Possible involvement of transient receptor potential channels in electrophile-induced insulin secretion from RINm5F cells
Biol Pharm Bull, 35(3): 346-354, 2012 (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22382320>

[8] Kojima M, Ashino T, Yoshida T, Iwakura Y, Degawa M
Involvement of interleukin-1 in lead nitrate-induced hypercholesterolemia in mice
Biol Pharm Bull, 35(2): 246-250, 2012 (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22382320>

[9] Ashino T, Sugiuchi J, Uehara J, Naito-Yamamoto Y, Kenmotsu S, Iwakura Y, Shioda S, Numazawa S, Yoshida T
Auranofin protects against

cocaine-induced hepatic injury through induction of heme oxygenase-1
J Toxicol Sci, 36(5): 635-643, 2011 (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22008538>

[10] Kojima M, Ashino T, Yoshida T, Iwakura Y, Degawa M
Interleukin-1 controls the constitutive expression of the Cyp7a1 gene by regulating the expression of Cyp7a1 transcriptional regulators in the mouse liver
Biol Pharm Bull, 34(10): 1644-1647, 2011 (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21963511>

[11] Fukushima T, Taki K, Ise R, Horii I, Yoshida T
MicroRNAs expression in the ethylene glycol monomethyl ether-induced testicular lesion
J Toxicol Sci, 36(5): 601-611, 2011 (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22008535>

[12] Shindoh H, Nakano K, Yoshida T, Ishigai M
Comparison of in vitro metabolic conversion of capecitabine to 5-FU in rats, mice, monkeys and humans--toxicological implications
J Toxicol Sci, 36(4): 411-422, 2011 (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21804305>

[学会発表] (計 15 件)

[1] Ashino T, Yamamoto M, Yoshida T, Numazawa S
The redox-sensitive transcription factor Nrf2 regulates reactive oxygen species-dependent vascular smooth muscle cell migration and neointimal hyperplasia
The 10th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology, 2012年12月5日, 徳島

[2] 小柴 郁, 芦野 隆, 山本 雅之, 吉田 武美, 沼澤 聡
血管内膜肥厚における酸化ストレス応答性転写因子 Nrf2 の役割
第 56 回日本薬学会関東支部大会, 2012年10月13日, 東京

[3] Ashino T, Yamamoto M, Yoshida T, Numazawa S
Role of the redox-sensitive transcription factor Nrf2 in vascular smooth muscle cell migration and vascular remodeling
The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology, 2012年7月20日, 仙台

[4] 芦野 隆, 山本 雅之, 吉田 武美, 沼澤 聡
血管平滑筋細胞遊走および血管リモデリングにおけるレドックス感受性転写因子 Nrf2 の役割
第 39 回日本毒性学会, 2012年7月17日, 仙台

[5] Suwa M, Numazawa S, Yoshida T
Preparation of ssDNA aptamers, selectively bind 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), by SELEX method
The 50th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists, 2012年6月3日, 浜松

[6] 芦野 隆, 上原 淳奈, 杉内 仁子, 岩倉 洋一郎, 塩田 清二, 沼澤 聡, 吉田 武美
オーラノフィンによるヘムオキシゲナーゼ-1 誘導を介したコカイン誘発肝障害防御作用
日本薬学会第 132 年会, 2012年3月30日, 札幌

[7] 田中 佐知子, 石井 敦子, 大滝 博和, 塩田 清二, 吉田 武美, 沼澤 聡
炎症誘発によるパーキンソン病モデルマウスの作製と IL-1 の重要性
日本薬学会第 132 年会, 2012年3月30日, 札幌

[8] 諏訪 雅子, 沼澤 聡, 吉田 武美
SELEX 法による乱用薬物 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) 結合 DNA アプタマーの作製
日本薬学会第 132 年会, 2012年3月31日, 札幌

[9] Ashino T, Sugiuchi J, Uehara J, Naito-Yamamoto Y, Kenmotsu S, Iwakura Y, Shioda S, Numazawa S, Yoshida T
Auranofin protects against cocaine-induced hepatic injury through induction of heme oxygenase-1
Society of Toxicology 2012 Annual Meeting, 2012年3月12日, サンフランシスコ (アメリカ合衆国)

[10] 田中 佐知子, 石井 敦子, 大滝 博和,

塩田 清二, 沼澤 聡, 吉田 武美
大腸菌内毒素リポポリサッカライドを用いた
パーキンソン病モデル動物の作成と神経変性
機序におけるIL-1 β の役割
第38回日本トキシコロジー学会, 2011年7
月12日, 横浜

[11] 瀧 憲二, 丸茂 瑠佳, 芦野 隆, 田中 佐
知子, 沼澤 聡, 吉田 武美
ニコチン脳室内投与によるマウス海馬にお
ける神経毒性発現に関連するmiRNAの変動
第38回日本トキシコロジー学会, 2011年7
月11日, 横浜

[12] 瀧 憲二, 福島 民雄, 伊勢 良太, 堀井 郁
夫, 吉田 武美
miRNA, mRNA変動に関連した6-Mercaptopurine
のラット胎盤毒性
第38回日本トキシコロジー学会, 2011年7
月11日, 横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www10.showa-u.ac.jp/~toxicol/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 武美 (TAKEMI YOSHIDA)
昭和大学・薬学部・名誉教授
研究者番号：90006354

(2) 研究分担者

田中 佐知子 (TANAKA SACHIKO)
昭和大学・薬学部・講師
研究者番号：00197419

芦野 隆 (ASHINO TAKASHI)
昭和大学・薬学部・助教
研究者番号：00338534