科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590866

研究課題名(和文)一酸化炭素中毒による脳損傷の発現閾値に関する研究

研究課題名(英文)Study on the threshold for brain damage due to carbon monoxide poisoning

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：一酸化炭素(CO)中毒のラット線条体において、酸化ストレスに関連する遺伝子のうち重度CO中毒でのみmRNA発現が著明に増加する遺伝子として、NADPH oxidase familyに属するdual oxidase 2を検出した。NADPH oxidaseを阻害すると、重度CO中毒による活性酸素生成だけでなく、細胞内cAMP増加による活性酸素生成も抑制された。このような知見から、CO中毒による脳損傷には、cAMP情報伝達経路下流に位置するNADPH oxidase familyが関与することが示唆された。しかし、その中でどのisozymeが主役かについてはさらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：We found that severe, but not non-severe, carbon monoxide (CO) poisoning enhanced mRNA expression of dual oxidase 2, which is a member of NADPH oxidase family involved in oxidative stress, in rat striatum. No such enhancement of mRNA expression was observed for other members of NADPH oxidase family. Inhibition of NADPH oxidase, but not xanthine oxidase, suppressed production of active oxygen species induced not only by severe CO poisoning, but also by enhancement of intracellular cAMP production due to forskolin. These findings suggest that NADPH oxidase may be under the control of cAMP signaling and contribute to brain damage due to severe CO poisoning. It is likely that dual oxidase 2 plays a role on brain damage. It is necessary to further examine the role of dual oxidase 2.

研究分野：中毒学

キーワード：一酸化炭素中毒 ヒドロキシルラジカル NADPH oxidase dual oxidase 2 mRNA ラット 線条体

1. 研究開始当初の背景

一酸化炭素(CO)中毒では、脳が損傷されることが知られている。実験動物のCO中毒モデルにおける脳損傷は、ヒドロキシルラジカルを選択的に消去・不活性化する水素(Ohsawa et al., Nat. Med. 13:688;2007)の投与で軽減できることから(Sun et al., Crit. Care Med. 39:765;2011)ヒドロキシルラジカルの生成が、この脳損傷に関連する重要な原因因子の一つであると推察される。実際、ラットCO中毒モデルでは、線条体のヒドロキシルラジカルの生成量が顕著に増加することが明らかにされている(Hara et al., Arch. Toxicol. 85:1091;2011)。興味深いことに、このヒドロキシルラジカル生成量の増加は、COヘモグロビン(CO_hb)レベルが50%程度のCO中毒では認められず、70%を超えるような重度CO中毒時においてのみ認められ(Hara et al., Arch. Toxicol. 85:1091;2011)、細胞内セカンドメッセンジャーであるcAMP生成量とパラレルであった(Hara et al., Toxicology 288:49;2011)。さらに、重度CO中毒により生成したcAMPは、ヒドロキシルラジカル生成に対して抑制的なprotein kinase A (PKA)系と促進的なEpac (exchange protein directly activated by cAMP)系の両方の経路を同時に活性化するが、後者の作用が前者を上回るため、結果的にヒドロキシルラジカル生成が促進されることが示唆された(Hara et al., Free Radic. Biol. Med. 52: 1086;2012)。

これまで、CO中毒による脳損傷は、CO濃度に依存して誘発されるものと漠然と信じられてきた。しかし、上述のような知見から、「重度に至らないCO中毒では、COによる細胞保護作用と毒性作用とが拮抗しているために両作用が相殺されて脳損傷誘発には至らず、さらに中毒の程度が増すと、そのバランスが毒性作用に優勢な方向に傾くために脳損傷が発現され、これが閾値として観察される」という仮説を立てた。

2. 研究の目的

COは、生体内情報伝達物質として種々の生体反応に関与し(Hoetel et al., Antioxid. Redox. Signl. 9:2013;2007)また、CO中毒によって活性化されるcAMP情報伝達系は種々の経路を介してDNAに作用し、多くのたんぱく質の発現の制御に関与することが知られている(Sands & Palmer, Cell Signl. 20:460;2008)。このようなタンパク質の中には、脳神経保護に働くものと(Tanaka, Prog. Neurobiol. 65:173;2001)ヒドロキシルラジカル生成のように毒性的に働くもの(Adadio et al., Neurochem. Int. 47:334;2005)の両方が存在するものと考えられる。上述の仮説に基づいて、中程度と重度のCO中毒で変動に差異のある脳内物質を特定すれば、脳損傷の機序にアプローチできるものと考えられた。

本研究の目的は、ラットCO中毒モデルを用い、重度CO中毒で特異的に変動するmRNAを探索し、重度CO中毒のマーカーとなりうるタンパク質、さらに、CO中毒による脳損傷の原因因子の1つと考えられるヒドロキシルラジカル生成に関与するタンパク質を特定することであった。

3. 研究の方法

(1)動物: Sprague-Dawley系雄性ラット(体重235~265g)を購入して使用した。

(2)CO曝露: 既報(Hara et al., Arch. Toxicol. 85:1091;2011)と同様に、マイクロダイアリシス実験(下述)で用いる円筒形プラスチックケージにラットを入れ、1000ppmあるいは3000ppmのCOを含む空気を導入して40分間曝露した。3000ppmCOと同等の非CO性低酸素の曝露では、5%酸素になるよう空気に窒素を混合して行った。

(3)線条体の採取: ペントバルビタール麻酔下、左心室に挿入したカニューレから冷生理食塩水を注入して脳を灌流、摘出後、氷上で線条体を採取し、-80℃で保存した。mRNA分析の場合は、専用保存液(RNA later)で処理後、-80℃で保存した。

(4)血液採取: 無麻酔下、尾の先端少し手前付近にメス刃で小さな切れ目を入れて静脈血を約70μl採取し、室温で遠心分離して血清を採取した。

(5)マイクロダイアリシス: 既報(Hara et al., Arch. Toxicol. 85:1091;2011)と同様に、ガイドカニューレを通してマイクロダイアリシス用プローブを線条体(左側)に刺入、固定し、フリームービングの状態で行った。(6)siRNAの線条体内投与: 上述のガイドカニューレを通してニードルを線条体に刺入し、全量2μlのsiRNAを、マイクロインジェクションポンプを用いて20分間で注入した。(7)DNAマイクロアレイは、マトリックス研究所に委託し、Agilent Gene Expression Arrayを用いて行った。

(8)リアルタイムPCR: 線条体のホモジナイズ、total RNAの抽出・精製およびcDNA作成は、市販のキットを用いて行った。得られたcDNAをリアルタイムPCRで測定し(TaqMan Fast Advanced Master Mixを使用してApplied Biosystems社製Step Oneあるいはタカラバイオ社製Thermal Cycler Dice(r) Real Time Systemで分析)、mRNA発現量をglyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)およびbeta-2 microglobulin (B2M)の2種類のhousekeeping geneに対して標準化して定量化した。

(9)ウエスタンブロット: 線条体を、タンパク分解酵素阻害薬カクテルを含む市販のタンパク抽出用試薬でホモジナイズし、遠心分離後の上清を市販のウエスタンブロットキットを用いて分析した。画像解析にて、該当するタンパクの分子量のバンドをGAPDHに対して標準化して定量化した。

(10)ヒドロキシルラジカル生成の測定：既報 (Hara et al., Arch. Toxicol. 85:1091; 2011)と同様に、マイクロダイアリスと高速液体クロマトグラフィーを用いて、線条体におけるサリチル酸とヒドロキシルラジカルとの反応生成物 (2,3-dihydroxybenzoic acid) を定量した。

4. 研究成果

(1)マイクロアレイ：1000 ppm CO (50% COHb)、3000 ppm CO (>70% COHb；重度 CO 中毒)あるいは5%酸素 (3000 ppm COと同程度の低酸素)を40分間曝露後、0、2、6および12h (5%酸素は6hまで)の脳線条体 mRNA 発現を0 ppm CO 群と比較したところ、0hで発現が確実に検出できた mRNA のうち、3000 ppm CO 群のみで Normalized 値(N)が3以上と顕著な mRNA 発現の誘導が認められたのは、alkaline phosphatase 1 (intestinal, defined by SSR)、oncostatin M、dual oxidase 2 (DUOX2)、transformation related protein 63、Ac2-248、tissue factor pathway inhibitor 2であった。これらの発現量は、0 ppm CO 群では検出確定閾値に達しないほど非常に低く、また、3000 ppm CO 群においても0h以外の時間では、0 ppm CO の場合と同様に低かった。一方、3000 ppm CO 群のみで N<-2 と mRNA 発現が顕著に抑制されたのは、cytochrome P450 family 1 (subfamily a, polypeptide 2)、neurogenic differentiation 2、sulfatase 1、synuclein gamma であった。なお、CO 曝露あるいは5%酸素曝露によって mRNA 発現が誘導されるものは、抑制されるものよりも少なかった。

(2)血清中タンパク：上述のマイクロアレイにおいて、alkaline phosphatase 1 の mRNA 発現が、3000 ppm CO のみで強く誘導されたことから、血清中アルカリフォスファターゼ活性を経時的に (曝露後、0h、2h、6h および 24h)測定したが、1000 ppm および 3000 ppm CO 曝露群の活性は、いずれの測定時間においても 0 ppm CO 群と同程度であった。一方、1000 ppm CO、3000 ppm CO および 5%酸素のすべての曝露群において、adiponectin C1Q and collagen domain containing mRNA の発現が、長時間に渡って強く抑制された (N<-3)。そこで、これら3群の血清中アディポネクチン量を経時的に測定したが、アルカリフォスファターゼ活性と同様に顕著な変動は認められなかった。このようなことから、これらは、重度 CO 中毒のマーカーにはなり得ないことが明らかとなった。

(3)リアルタイム PCR：マイクロアレイ分析において、DUOX2 mRNA 発現が3000 ppm CO 群のみで強く誘導されることが示唆された。DUOX2は、NADPH oxidase family に属し、活性酸素を生成することから (Leto et al., Antioxi. Red. Sigl. 11:2607;2009) CO 中毒によるヒドロキシルラジカル生成に関与する可能性が考えられた。そのため、リアルタイム PCR を用いて、DUOX2 mRNA 発現を

GAPDH mRNA および B2M mRNA に対して標準化したところ、いずれの標準化の場合にも、マイクロアレイの結果と同様に、0 ppm CO 群の DUOX2 mRNA 発現量は非常に低く、1000 ppm CO 群は 0 ppm CO 群と同程度であったが、3000 ppm CO 群では著明に増加した。このような結果から、重度 CO 中毒による DUOX2 mRNA 発現の誘導が裏付けられた。一方、DUOX1 mRNA 発現は、マイクロアレイおよびリアルタイム PCR のいずれにおいても DUOX2 mRNA 発現よりもはるかに顕著であったが、CO 曝露による変動はまったく認められなかった。

(4)ウエスタンブロット：上述のリアルタイム PCR の結果に基づき、DUOX2 に対する抗体 (DUOX1 との交差性を完全には否定できない)を用いて、1000 ppm および 3000 ppm CO 曝露後の DUOX2 タンパク発現について検討したが、3000 ppm CO による顕著な DUOX2 タンパクの発現誘導は認められなかった。上述のように、マイクロアレイ分析およびリアルタイム PCR において、0 ppm CO 群の DUOX2 mRNA 発現が非常に弱いにもかかわらず、DUOX2 タンパクの発現は、確実に認められた。一方、DUOX1 mRNA 発現は、マイクロアレイ分析およびリアルタイム PCR のいずれにおいても顕著に認められること、抗 DUOX2 抗体の DUOX1 に対する交差性を完全には否定できないこと、さらに、DUOX2 と DUOX1 の推定分子量がそれぞれ 175KDa および 177KDa であることから、ウエスタンブロットにおいて DUOX2 として検出されたタンパクには、DUOX1 も含まれる可能性がある。

(5)重度 CO 中毒によるヒドロキシルラジカル生成に対する NADPH oxidase 阻害薬の効果：NADPH oxidase 阻害薬として、特異性の異なる diphenylene iodium (DPI；選択性は低い)が、強力に広く使用されている)と 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF；DPI よりも選択性は高いが、作用は弱い)の2種類の化合物を用いた。これらの NADPH oxidase 阻害薬はいずれも 3000 ppm CO によるヒドロキシルラジカル生成を強く抑制した。一方、xanthine oxidase 阻害薬であるアロプリノールは、まったく影響を及ぼさなかった。このような知見から、重度 CO 中毒によるヒドロキシルラジカル生成には、NADPH oxidase が関与することが強く示唆された。

(6)cAMP を介するヒドロキシルラジカル生成に対する NADPH oxidase 阻害薬の効果：forskolinにより細胞内 cAMP 生成を促進した場合のヒドロキシルラジカル生成は、DPI 投与により著明に抑制されたことから、cAMP 情報伝達系を介するヒドロキシルラジカル生成にも NADPH oxidase の関与が示唆された。

(7)重度 CO 中毒によるヒドロキシルラジカル生成に対する DUOX2 siRNA 投与の効果：3種類の RNA 配列の DUOX2 siRNA カクテルを transduction 試薬と混合して1日1回、3日間線条体内 (左側) に投与したところ、3000

ppm CO によるヒドロキシルラジカル生成は経日的に抑制された。そこで、DUOX2 siRNA カクテルの各配列を単独で、カクテルと同用量で1回投与して約24時間後、3000 ppm CO によるヒドロキシルラジカル生成に対する効果を検討した。negative control RNA を投与した対象群と比較したところ、1種のDUOX2 siRNA に強い抑制効果が認められた。この結果は、重度 CO 中毒によるヒドロキシルラジカル生成には、NADPH oxidase family 中のDUOX2 が関与することを強く示唆した。一方、ヒドロキシルラジカル生成を抑制したDUOX2 siRNA とnegative control RNA の各投与群についてリアルタイムPCRを行ない、3000 ppm CO 曝露後のDUOX2 mRNA 発現をB2M に対して標準化し、何も投与しない反対側(右側)の線条体と比較したところ、negative control 群では、投与側と非投与側で差はなく、siRNA 投与群では、投与側で減少傾向が認められた。しかし、GAPDH に対して標準化した場合、negative control 群およびsiRNA 投与群の投与側のDUOX2 mRNA 発現量はいずれも、各々の非投与側よりも高く、siRNA 投与群のそれは、negative control 群よりも若干低い程度であった。DUOX2 siRNA 投与によるDUOX2 タンパク発現については、まだ結論を得ておらず、継続検討中である。

本研究において、重度 CO 中毒のマーカーとなるような生体内物質を見出すことはできなかったが、重度 CO 中毒のみにおいて、cAMP 情報伝達系を介して線条体で生成されるヒドロキシルラジカルは、NADPH oxidase の活性化が関与する可能性が強く示唆された。そのヒドロキシルラジカル生成には、DUOX2 の関与が推察されるが、まだ結論を得るに至っておらず、他のNADPH oxidase の関与を排除できないため、さらなる検討が必要である。

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1件)

1. Hara S, Kobayashi M, Kuriiwa F, Mukai T, Mizukami H. Different mechanisms of hydroxyl radical production susceptible to purine P2 receptor antagonists between carbon monoxide poisoning and exogenous ATP in rat striatum. Free Radical Research (査読有) Vol.48, No.11, 2014, pp.1322-1333 DOI: 10.3109/10715762.2014.951842

[学会発表](計1件)

1. 原修二、小林正宗、栗岩ふみ、池松和哉、向井敏二、水上創、「急性一酸化炭素中毒時のヒドロキシルラジカル生成におけるNADPH oxidase の関与」、第99次日本法医学会学術全国集会(高知市文化プラ

ザ かるぼーと)、平成27年6月11日

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

小林正宗 (KOBAYASHI, Masamune)
東京医科大学・医学部・助教

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

池松和哉 (IKEMATSU, Kazuya)
長崎大学・医学部・教授