

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02890

研究課題名(和文) 硫化水素ガス吸入療法による脊髄虚血後運動神経保護効果のプロテオーム解析

研究課題名(英文) Proteome analysis for neuronal protection by hydrogen sulfide

研究代表者

垣花 学 (KAKINOHANA, MANABU)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20274897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈瘤などの手術後の合併症のひとつである虚血性脊髄障害のマウスモデルを用いた研究において硫化水素ガス吸入療法が遅発性対麻痺の発症を抑えることを見出したが、低体温療法との併用によりその効果は消失することが我々の研究で明らかとなっている。その要因を検討する目的で、プロテオーム解析を用いた研究を行った。その結果、硫化水素ガス吸入療法と低体温を併用することにより複数の蛋白分子の発現が抑えられ、その中の誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)の発現抑制がその有力な要因であることが示唆された。さらにiNOSノックアウトマウスでは、硫化水素ガス吸入療法の効果がみられなくなることも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

硫化水素ガスの生理学的意義については多様な機序が関わっていると報告されているが、我々の研究結果である脊髄虚血後の遅発性対麻痺発症に対する抑制効果についての詳細な機序は明らかとなっていなかった。今回の研究では、通常は神経保護効果のある低体温療法との併用で硫化水素ガスの効果が消失するという特徴を利用し、プロテオーム解析によりiNOSが重要であることが明らかとなったことは、学術的意義が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We found that hydrogen sulfide gas inhalation therapy suppressed the onset of delayed paraplegia in a mouse model of ischemic spinal cord injury, which is one of the complications after surgery such as aortic aneurysm. Our study, however, showed that this effect disappeared when combined with hypothermia. We conducted a study using proteomic analysis with the aim of investigating the factors responsible for this phenomenon. Our results suggested that the combined use of hydrogen sulfide gas inhalation therapy and hypothermia suppressed the expression of several protein molecules, among which the suppression of induced nitric oxide synthase (iNOS) was the most important factor. Furthermore, the iNOS knockout mice showed no effect of hydrogen sulfide gas inhalation therapy.

研究分野：麻酔科学

キーワード：硫化水素ガス 脊髄虚血 遅発性対麻痺 低体温療法 誘導型一酸化窒素合成酵素

1. 研究開始当初の背景

脊髄虚血あるいは脊髄外傷では、その受傷からある程度時間を経過した後に病態が悪化する、いわゆる遅発性脊髄神経障害を伴うことがあり、それにより症状がさらに悪化する。また、近年の臨床で盛んに行われている大動脈瘤に対する血管内治療では、従来の外科的治療と比較して遅発性脊髄障害発症の割合が遥かに多く、その予防あるいは治療法について世界的に注目されている。しかしながら、我々を含めて世界中の研究において薬物をはじめとする可能性のある多くの治療法が試みてきたが、理論的に神経保護の可能性が報告されてきた治療方法（例えば、NMDA 受容体遮断薬を含む興奮性アミノ酸受容体遮断薬、プレコンディショニングなど）では虚血性脊髄障害を予防あるいはその発症を抑えることはできなかった。その要因のひとつとして、この遅発性脊髄神経障害の研究ではラットやウサギを用いた研究がほとんどで、遺伝子改変技術を利用することが困難であることから、その病態あるいは治療に関わる重要な分子を見出すことが非常に困難であったこともこれに起因していると考えられる。近年当教室では、遺伝子改変が容易であるマウスを用いた遅発性脊髄障害モデルの開発に取り組み、その作成に成功し、カスパーゼ 3 ノックアウトマウスを用いアポトーシスの関与を報告した（Kakinohana M, et al. Stroke 2011;42:2302-7）。このマウスモデルを用いることで、虚血性脊髄障害に伴う神経細胞死の病態生理ならびに治療に関する分子生物学的検討を進めていくことが可能となった。

最近、一酸化窒素（NO）や一酸化炭素（CO）と同様に、生体内で産生および作用するガス分子の一種である H₂S の生理学的役割やその細胞保護効果（心、肝、腎、肺など）に関する報告がみられる。また、H₂S のドナー投与や H₂S ガス吸入療法によって様々な病態への治療効果を示すことも証明されてきており、H₂S 関連の創薬も進められている。我々の研究室では本邦唯一の H₂S ガス吸入装置を有しており、これまで H₂S ガス吸入の生物学的意義について様々な疾患モデルで検討をしてきた。特に、マウス遅発性神経細胞死モデルや一過性全脳虚血モデルを用いた H₂S ガス吸入療法の効果について検討した結果、神経細胞死を強力に抑えることを見出し、神経学的、組織学的そして分子生物学的にその機序解明に挑戦している。H₂S ガスによる脊髄保護効果の最大の特徴は、一過性脊髄虚血後 24 時間に治療開始してもその神経保護効果を強力に発揮することであり、これは臨床的にも意義ある結果である。

2. 研究の目的

先述したが、これまで理論的に神経保護の可能性のある治療法を試みてきたが、虚血性脊髄障害を予防あるいはその発症を抑えることはできなかった。このようなことから、**“これまで考えられなかった治療法の模索”**が今後の研究には必要であるということを示している。このような状況の中、我々は H₂S ガス吸入療法によってマウス遅発性脊髄神経細胞障害を抑制することを見出した。さらにこの現象における特筆すべきことは、**“この神経細胞保護効果は低体温療法と併用することで消失するという”**、これまでの常識に反する結果を示したことである。つまり、低体温により H₂S の神経保護効果が消失するということは、H₂S により刺激される代謝経路とその合成蛋白質が神経保護効果に強く関わっていることを示唆するものである。これらの研究結果から、我々は H₂S ガス吸入療法による神経細胞保護効果は、「H₂S 分子により合成を促された蛋白質」に

よるものであると仮説をたてた。つまり“本研究課題の核心をなす学術的「問い」”は、「H₂S ガス吸入により合成される神経保護効果に関わる蛋白質の正体は？」ということである。当教室では、約 20 年にわたり虚血性神経障害モデル、特に大動脈遮断による脊髄虚血モデル(ラット、マウス)を用い、脊髄神経保護に関する基礎研究を積極的に行ってきた。上述したように生体内ガス分子である H₂S 吸入が脊髄神経保護効果を示したことで、この研究分野に新たな可能性が生まれた。本研究の目的は、「H₂S 吸入による脊髄神経保護効果の機序解明」の一環として“脊髄神経保護に関わる蛋白質の検索(プロテオーム解析)”である。

3. 研究の方法

<脊髄虚血モデル作成>

C57/BL6 マウスを用い、イソフルラン全身麻酔下に気管挿管し人工呼吸とした。頸部ならびに胸骨頭側部を切開し、左総頸動脈と左鎖骨下動脈の起始部で弓部大動脈一過性(5分間)に遮断し、一過性脊髄虚血モデルを作成した。その後、閉創し麻酔から覚醒させた。(Stroke 2011;42:2302-7)

<H₂S 吸入療法>

脊髄虚血 24 時間後にアクリル製吸入装置で、H₂S 吸入療法(80ppm×5 時間)を行った。尚、H₂S 吸入療法中の体温調節は、アクリル製吸入装置の外気温を変化させることで行った。H₂S 吸入終了後 1 時間目にペントバルビタール腹腔内投与による深麻酔下に犠殺し脊髄サンプル採取を行った。

<脊髄サンプル採取>

組織学的検討サンプル:犠殺後、4%パラフォルムアルデヒドで経心的に灌流固定し脊髄を採取し、脊髄膨大部の凍結切片あるいはパラフィン切片を作成。同定蛋白質について免疫組織染色し、その局在を検討した。

分子生物学的検討サンプル:犠殺後、仙骨部脊柱管から冷生理食塩水(4℃)を注入し脊髄を圧出さ、直ちに液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。

<二次元電気泳動による H₂S 特異的蛋白質の抽出・同定>

凍結脊髄サンプルをホモジナイズし上清を SDS ゲルで二次元電気泳動した後に、銀染色により分離された蛋白をマーキングした。対照群と比較し H₂S 群で発現している複数の蛋白質を SDS から個別にくり抜き、質量分析でそれぞれの蛋白質を同定した。

<qRT-PCR による同定蛋白質 m-RNA 検出>

凍結脊髄サンプルから RNA を抽出し、プライマー-DNA 作成、逆転写酵素による c-DNA 合成を行い、cDNA をテンプレートとして標的蛋白質の蛍光プローベを用いて PCR を行った。

<蛋白阻害薬あるいは遺伝子改変マウスを用いた標的蛋白の確認>

プロテオーム解析ならびに m-RNA 検出実験により絞り込んだ標的蛋白質の阻害薬あるいは遺伝子欠損マウスを用い、脊髄虚血ならびに H₂S 吸入療法実験を行った。

脊髄虚血(5分間)侵襲を与えた 24 時間後に Prdx 阻害薬である Conoidin A(細胞膜通過可能)を腹腔内投与し、対照群では生理食塩水を腹腔内投与した。その 1 時間後に H₂S 吸入療法(80ppm×4 時間、目標体温 35℃)を行い、神経学的所見を検討した。また、iNOS ノックアウトマウスを用い脊髄虚血(5分間)の侵襲を与えた。

その 24 時間後に H₂S 吸入療法 (80ppm × 4 時間、目標体温 35) を行い、神経学的所見を検討した。

4. 研究成果

(1) 遅発性脊髄障害マウスモデルに対する H₂S 吸入療法と温度依存性

マウスに対する H₂S 吸入療法 (80ppm) によって、急激に代謝が低下し低体温を誘導できることが知られているが、H₂S 吸入療法中の外気温を変化させることによる体温変化と遅発性脊髄障害抑制効果について確認実験をおこなった。その結果 (図 1) H₂S 吸入療法中に体温を 34 - 35 度に維持した場合には、遅発性脊髄障害の発症を約 70% の確率で抑えることができるが、それより以下の体温では低体温になるほどその効果は減弱した。

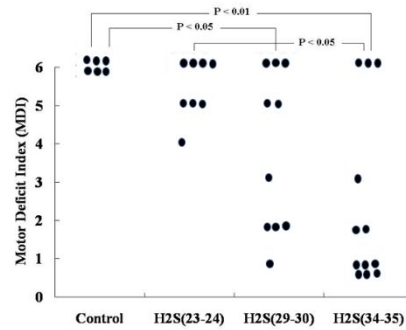


図 1. 硫化水素吸入療法と体温との関係

(2) 脊髄虚血後の H₂S 吸入療法による脊髄プロテオーム解析 (23-24 (C 群) と 34-35 (H 群) の比較)

脊髄虚血後 H₂S 吸入療法における低体温の影響を検討する目的で二次元電気泳動を行った。その結果、C 群と比較して H 群で 11 個の蛋白質の発現増強が認められ、質量分析解析により表のように同定された。この中で、硫化水素関連蛋白ならびに生体内ガス関連蛋白として Peroxiredoxin6 (Prdx6)、Mercaptopyruvate sulfurtransferase (MPS)、Inducible nitric oxide synthase (iNOS) を候補蛋白として選択した。

表. 硫化水素ガス吸入後の脊髄プロテオーム解析結果

Peroxyredoxin6 ⁺
Estelase D ⁺
Adenylate kinase 1 ⁺
Annexin A1 ⁺
Apolipoprotein ⁺
Carbonic anhydrase 3 ⁺
Crystallin ab ⁺
Inducible nitric oxide synthase ⁺
Phosphoglucomutase 2 ⁺
Pyruvate kinase isoform M1 ⁺
Mercaptopyruvate sulfurtransferase ⁺

(3) 候補蛋白質の脊髄内発現

上記のプロテオーム解析により選択された蛋白質について PCR あるいはウエスタンブロットティング法 (WB) さらに免疫組織学的検討によりその生体内での発現を検討した。Prdx6 については WB を行った結果、C 群と比較して H 群で有意に増強していた。Prdx6 の下方のバンドはリン酸化 Prdx6 (p-Prdx6) の可能性があるがその確認はできていない。免疫組織学的検討において、Prdx6 蛋白が脊髄神経細胞で発現していることも確認できた (図 3)

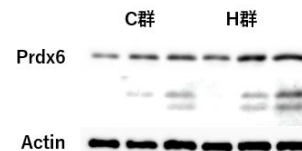


図 2. Prdx6 の WB 解析

MPS については PCR にて m-RNA の検討を行ったが、H 群と C 群で発現の有意な差は認められなかった。iNOS に関しては、C 群と比較して H 群で iNOS m-RNA 発現が約 2.5 倍に増加していた (図 4)

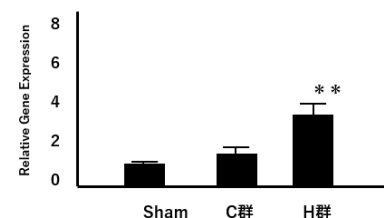
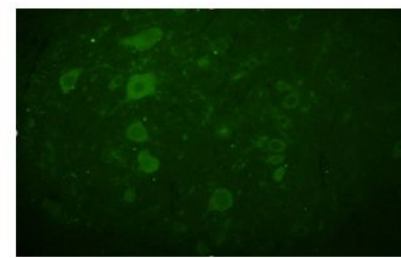


図 4. 脊髄における iNOS 発現

(4) Prdx6 阻害ならびに iNOS ノックアウトマウスにおける H₂S 吸入療法の効果検討

Prdx の阻害薬 Conoidin A を前処置後に H₂S 吸入療法 (ConA 群 : n=4) では、吸入療法 24 時間後 (脊髄虚血後 48 時間) に 2 匹で遅発性対麻痺となったが残りの 2 匹は遅発性対麻痺に至らなかった。対照群 (Control 群 : n=5) でも H₂S 吸入療法の 24 時間後に 2 匹が遅発性対麻痺を発症したが、残りの 3 匹では認められなかった。

一方、野生型マウス (Wild 群 : n=5) では 1 匹が遅発性対麻痺を発症し、4 匹はそれを発症しなかったが、iNOS ノックアウトマウス (NOSKO 群 n=6) では H₂S 吸入療法後に全てのマウスで遅発性対麻痺を発症した。

総括

本事業の目的は、「H₂S 吸入による脊髄神経保護効果の機序解明」として低体温療法との併用によりその効果が消失するという特徴を利用し、プロテオーム解析において H₂S 吸入療法による遅発性脊髄障害を抑える重要蛋白質を明らかとするものであった。今回のプロテオーム解析では、11 個の蛋白質が抽出され、その中から硫化水素関連蛋白ならびに生体内ガス関連蛋白として Prdx6、MPS、そして iNOS が候補蛋白質として挙げられた。WB、PCR ならびに免疫組織学的検討により、Prdx6 と iNOS が脊髄組織内で発現増加していたことから、前者に対しては阻害薬である Conoidin A そして後者では遺伝子改変マウス (iNOS ノックアウトマウス) を用いた実験を行った。その結果、H₂S 吸入療法の重要蛋白質としては、これまで我々が指摘してきた iNOS がやはり重要因子であることが明らかとなった。これまで、NO と H₂S による遅発性対麻痺抑制効果には、抗アポトーシス蛋白である Bcl-XL の発現の関与が指摘されていたが、Bcl-XL は今回のプロテオーム解析では抽出できなかった。今後、NO と H₂S に相互作用の新たなターゲット蛋白の解明に望みたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kakinohana M, Marutani E, Tokuda K, Kida K, Kosugi S, Kasamatsu S, Magliocca A, Ikeda K, Kai S, Sakaguchi M, Hirai S, Xian M, Kaneki M, Ichinose F.	4. 巻 131
2. 論文標題 Breathing hydrogen sulfide prevents delayed paraplegia in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Free Radic Biol Med	6. 最初と最後の頁 243-250
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	神里 興太 (KAMIZATO Kota) (10554454)	琉球大学・医学（系）研究科（研究院）・助教 (18001)	
研究分担者	野口 信弘 (NOGUCHI Nobuhiro) (80457671)	琉球大学・病院・助教 (18001)	
研究分担者	西 啓亨 (NISHI Hiroyuki) (00610809)	琉球大学・医学部附属病院・助教 (18001)	削除：2018年8月1日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関