

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08957

研究課題名(和文) 硫化水素の新規生理機能：金属イオン恒常性破綻による神経細胞傷害に対する保護作用

研究課題名(英文) A novel function of hydrogen sulfide: Protection against heavy metal-induced neurotoxicity

研究代表者

原 宏和 (Hara, Hirokazu)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30305495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：硫化水素(H₂S)は脳梗塞で認められる神経細胞傷害に対して保護作用を示すが、その機序には不明な点も多い。一方、脳梗塞で生じる脳内金属(Zn、Cuなど)の恒常性破綻は神経細胞傷害を引き起こすことから、これら金属は脳梗塞の増悪因子の一つに挙げられている。本研究では、ZnおよびCuの神経毒性に対するH₂Sの影響について検討した。H₂Sは細胞内へのZn流入を抑制し、Znの神経細胞傷害を軽減した。しかし、Znの場合とは異なり、H₂SはCuの細胞内蓄積を増大させ、Cuの神経細胞傷害を増強した。以上の結果から、H₂Sは神経細胞における金属の動態の制御因子としての作用を有している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の実施により、H₂Sが神経細胞内外のZnやCu動態の制御因子として機能している可能性が示された。金属イオンの細胞内外の恒常性の破綻は、脳梗塞などの虚血性脳血管障害による神経細胞傷害以外に、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患の発症とも密接に関連していることが報告されている。それゆえ、今回明らかとなったH₂Sが金属イオンの細胞内動態を制御するというH₂Sの新規機能は、神経変性疾患の病態解明のみならず、有効な治療薬が少ない神経変性疾患の新規治療薬の開発にも繋がる重要な知見となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Zinc (Zn) aggravates brain damage after cerebral ischemia, since disturbance of zinc homeostasis in the brain induces neurotoxicity. Therefore, improvement of zinc disturbance may be a therapeutic approach for cerebral ischemia. Hydrogen sulfide (H₂S) is involved in the detoxification of heavy metals. In this study, we found that H₂S protected against Zn cytotoxicity in neuronal cells by preventing Zn influx into cells. Copper (Cu) is an essential trace element, whereas excess Cu is toxic to cells. We examined the effects of H₂S on Cu cytotoxicity. Cu enhanced its cytotoxicity in the presence of H₂S. The combination of Cu and H₂S increased the amount of intracellular Cu compared with Cu alone. Thus, we concluded that the increased intracellular Cu accumulation elevates Cu cytotoxicity. These findings suggest that H₂S regulates the cellular dynamics of heavy metals.

研究分野：病態生化学

キーワード：硫化水素 亜鉛 銅 神経細胞 酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

亜鉛 (Zn) は生体内で鉄に次いで多い必須微量元素である。これまで、Zn は酵素の活性や転写因子などの構造維持に関与する分子と考えられてきたが、近年の研究から、Zn は神経系や免疫系においてカルシウムと同様なシグナル伝達物質としてその重要性が認識されている。一方、脳内に多く存在している Zn は、脳梗塞などの虚血性神経細胞傷害やアルツハイマー病などの神経変性疾患の病因とも密接に関与している。脳虚血時に大量に神経終末から放出される Zn は、後シナプスの神経細胞に流入し、エネルギー産生障害を介した神経細胞死を惹起する。それゆえ、Zn は虚血性神経細胞傷害の増悪因子の一つに挙げられており、実際、脳虚血再灌流モデルにおいて Zn キレーターが神経細胞傷害を抑制することが報告されている。申請者は、これまで、Zn による神経細胞傷害の分子機構について研究を行い、活性酸素種 (ROS) などにより惹起される細胞内遊離 Zn の増加が神経細胞死を惹起すること、Zn 自身が脳内の免疫担当細胞であるミクログリアを活性化することなどを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

硫化水素 (H_2S) は一般に有毒ガスとして知られているが、 H_2S は生体内で生成されること、多彩な薬理作用を有していることが明らかとなり、現在では、一酸化窒素や一酸化炭素に続く第三のガス状分子として注目されている。 H_2S は脳梗塞などの脳血管障害やアルツハイマー病などの神経変性疾患で認められる神経細胞傷害に対して保護作用を示すことが報告されているが、その機序には不明な点も多い。一方、脳内金属 (Zn、Cu など) は、虚血性脳障害や神経変性疾患の発症や病態の進展に関与していることが明らかとなり、これら疾患時の脳内金属イオンのインバランスの改善は、新しい治療法として期待されている。実際、Zn や Cu キレート剤がこれら疾患の病巣で認められる神経細胞傷害を抑制することが示されている。

H_2S は Zn や Cu などの金属イオンと強い反応性を示すことが知られている。それゆえ、 H_2S は上述の疾患の病巣で認められる過剰な Zn や Cu イオンと反応し、これら遊離金属イオンの量を減少させることで、神経細胞に対する金属毒性を抑制できるのではないかと考えられた。そこで本研究では、 H_2S が金属イオン動態の制御因子として機能し、脳内の金属イオンバランスをコントロールしている可能性について検証する。

3. 研究の方法

細胞傷害性：ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞の培養は、10%FCS を含む DMEM を用いて行った。96 穴プレート (1.8×10^4 細胞/well) に細胞を播種した後、一晚培養し、実験に使用した。培地を 1% FCS を含む DMEM に置換した後、 H_2S 供与体である NaHS 存在下で $ZnSO_4$ または $CuSO_4$ を曝露し、20 時間後に細胞傷害を MTT 法により測定した。

ウエスタンブロッティング：SH-SY5Y 細胞を処理した後、PBS で洗浄し、lysis buffer により細胞を可溶化した。SDS-PAGE で分離した後、PVDF 膜に転写した。ブロッキング後、抗 ATP7A 抗体で一晚反応させた。その後、HRP 標識 2 次抗体と反応させ、化学発光でタンパク質を検出した。

ATP の測定：24 穴プレートに培養した SH-SY5Y 細胞 (細胞密度 1.5×10^5 個/well) を NaHS 存在下 $ZnSO_4$ または $CuSO_4$ で 5 時間処理した。細胞を冷 PBS で洗浄後、過塩素酸を用いて ATP を抽出し、ENLITEN ATP Assay System (プロメガ) を用いて ATP 量を測定した。

ROS イメージング：3.5 cm ディッシュに培養した SH-SY5Y 細胞 (細胞密度 6×10^5 個/dish) を NaHS 存在下 $CuSO_4$ で 4 時間処理した。その後、MitoSOX で染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光を測定した。

ミトコンドリア膜電位の測定：3.5 cm ディッシュに培養した SH-SY5Y 細胞 (細胞密度 6×10^5 個/dish) を NaHS 存在下 $CuSO_4$ で 4 時間処理した。その後、mitotraker で細胞を染色した後、flowcytometry により解析した。

レポーターアッセイ：SH-SY5Y に金属応答配列 MRE を含んだレポータープラスミド (MRE-pGL4) と pRL-CMV をトランスフェクションした。次の日、NaHS 存在下 $ZnSO_4$ または $CuSO_4$ で 4 時間処理した後、細胞を可溶化し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

(1) Zn による神経細胞傷害に対する H_2S の保護効果

初めに、Zn が SH-SY5Y 細胞の細胞死を誘導するかどうかを確かめるために、種々の濃度の $ZnSO_4$ を細胞に曝露した後、細胞傷害を MTT 法により測定した。その結果、Zn は濃度依存的に細胞死を惹起した。以降の実験では、ほとんどの細胞 (70%以上) が死滅した $250 \mu M$ の $ZnSO_4$ 濃度で細胞を処理した。

次に、Zn 誘導性の細胞死が H_2S により抑制されるかどうか検討した。ガス状物質である H_2S を直接投与することは困難であることから、本実験では、 H_2S 供与体として NaHS を使用した。

種々の濃度の NaHS を培養細胞に添加した後、ZnSO₄ を細胞に曝露したところ、NaHS は濃度依存的に Zn 誘導性の細胞死を抑制した。また、NaHS の処理時間がこの保護作用に及ぼす影響を検討したところ、NaHS の前処理の時間が長くなるにつれて、NaHS の保護効果は著しく減弱した。

NaHS による保護作用が認められたことから、Zn 誘導性の細胞死を NaHS が抑制する機序について検討した。Zn による細胞死では、細胞内への Zn 流入が重要なステップである。そこで、SH-SY5Y 細胞において、Zn の曝露により細胞内で Zn が増加するかどうかを Zn の蛍光プローブ FluoZin-3 を用いて検討した。Zn 曝露により SH-SY5Y 細胞内の蛍光強度が増加したことから、十分量の Zn が細胞内に流入していることが確認できた。また、この細胞内 Zn の増加は NaHS 存在下で抑制された。細胞内の Zn の増加は、MT などの Zn 応答遺伝子の発現を亢進することから、メタロチオネイン (MT) 遺伝子の発現についても検討した。Zn 曝露は MT 遺伝子の発現を亢進したが、NaHS 存在下では Zn 誘導性の MT 発現は抑制された。

これらの結果から、H₂S は Zn の細胞への流入を抑制することで、Zn 傷害に対する保護効果を発揮していると考えられた。

(2) Cu による神経細胞傷害に対する H₂S の効果

NaHS が Cu 誘導性細胞傷害に及ぼす影響を検討した。NaHS が Cu 誘導性神経細胞傷害に及ぼす影響を検討するため、NaHS 存在下で、種々の濃度の CuSO₄ で SH-SY5Y 細胞を処理した後、細胞傷害を MTT 法により測定した。その結果、Cu による細胞傷害は、NaHS により増強された。

次に、Cu 誘導性細胞傷害が NaHS により増強される機序について検討した。Cu による細胞傷害は、Cu が細胞内に流入した後、ミトコンドリア障害が生じることで引き起こされる。そこで、Cu 曝露がミトコンドリアの膜電位や ATP 産生に及ぼす効果を検討した。Cu 曝露によるミトコンドリア膜電位の低下や ATP 減少が認められたが、NaHS 存在下で、これらの現象は著しく増大した。ミトコンドリア機能低下は、ROS の産生にもつながることから、細胞内 ROS のレベルを測定したところ、Cu と NaHS の共存下では ROS の産生も著しく亢進した。

Cu 誘導性細胞傷害では、Cu が細胞内に取り込まれることが重要である。それゆえ、NaHS による Cu 傷害の増強作用には、細胞内への Cu 取り込み亢進が関与していると考えられた。そこで、Cu に応答して発現が亢進することが知られている MT の発現に及ぼす影響を検討した。Cu 単独処理に比べ、Cu と NaHS の同時処理により MT の著しい発現亢進が認められた。さらに、MT の発現亢進には MT 遺伝子のプロモーター領域に存在する MRE の活性化が重要である。そこで、MER レポータープラスミドを用いたレポーターアッセイにより Cu や NaHS が MRE の活性化に及ぼす影響を検討した。MT 発現誘導と同様に、Cu と NaHS の同時処理により、MRE 活性は著しく亢進した。これらの現象は、Cu キレーター bathocuproinedisulfonic acid (BCS) により抑制された。

Cu の細胞への取り込みは、Cu²⁺ から Cu⁺ に還元された後、Cu 流入トランスポーター CTR1 を介して行われる。そこで、NaHS が Cu²⁺ の還元に及ぼす影響を BCS を用いて検討した。BCS は Cu⁺ の検出試薬でもあり、Cu⁺ と反応し橙黄色のキレート錯体を形成する。Cu²⁺ のみでは色の変化は認められなかったが、NaHS と Cu²⁺ を共存させたとき、橙黄色を呈したことから、NaHS は Cu²⁺ の Cu⁺ への還元を促進している可能性が示された。さらに、Cu 排出トランスポーター ATP7A の発現に対する Cu や NaHS の影響について検討した。Cu や NaHS 単独で細胞を処理したときには、そのタンパク発現に影響は認められなかったが、Cu と NaHS を同時に処理した細胞では、ATP7A タンパクの発現低下が認められた。

以上の結果から、Cu は H₂S が存在する場合、H₂S は Cu 流入の亢進や Cu 排出の抑制により細胞内 Cu 含量を増加させることで、Cu の細胞毒性を増大させるのではないかと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimoji M, Hara H, Kamiya T, Okuda K, Adachi T	4. 巻 51
2. 論文標題 Hydrogen sulfide ameliorates zinc-induced cell death in neuroblastoma SH-SY5Y cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Free Rad Res	6. 最初と最後の頁 978-985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2017.1400666.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hara Hirokazu, Kobayashi Mari, Shiiba Moe, Kamiya Tetsuro, Adachi Tetsuo	4. 巻 65
2. 論文標題 Sublethal treatment with plasma-activated medium induces senescence-like growth arrest of A549 cells: involvement of intracellular mobile zinc	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 16 ~ 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbn.19-17	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 -
1. 著者名 Nagaya Misaki, Hara Hirokazu, Kamiya Tetsuro, Adachi Tetsuo	4. 巻 676
2. 論文標題 Inhibition of NAMPT markedly enhances plasma-activated medium-induced cell death in human breast cancer MDA-MB-231 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 108155 ~ 108155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2019.108155	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Goto Norika, Hara Hirokazu, Kondo Mao, Yasuda Naomi, Kamiya Tetsuro, Okuda Kensuke, Adachi Tetsuo	4. 巻 -
2. 論文標題 Hydrogen sulfide increases copper-dependent neurotoxicity via intracellular copper accumulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Metallomics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0mt00015a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 後藤紀香、原 宏和、神谷哲朗、足立哲夫
2. 発表標題 硫化水素による銅誘導性神経細胞傷害の増強の分子機構
3. 学会等名 第29回日本微量元素学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原 宏和、後藤紀香、神谷哲朗、足立哲夫
2. 発表標題 硫化水素は銅による神経毒性を増強する
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大上綾音、原 宏和、神谷哲朗、足立哲夫
2. 発表標題 亜鉛誘導性神経細胞死に対するポリサルファイドの抑制効果
3. 学会等名 日本酸化ストレス学会東海支部第7回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下地 萌, 原 宏和, 神谷哲朗, 足立哲夫
2. 発表標題 硫化水素ドナーは亜鉛により惹起される神経細胞死を抑制する
3. 学会等名 第81回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 原宏和, 下地萌, 神谷哲朗, 奥田健介, 足立哲夫
2. 発表標題 硫化水素は神経細胞に対する亜鉛毒性を軽減する
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hara H, Adachi T
2. 発表標題 Contribution of Intracellular Mobile Zinc to Anti-Cancer Effects of Plasma-Activated Medium
3. 学会等名 5th International Workshop on Plasma for Cancer Treatment (IWPCT 2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤真央, 後藤紀香, 原 宏和, 神谷哲朗, 足立哲夫
2. 発表標題 硫化水素による銅毒性増強作用における銅トランスポーターの関与
3. 学会等名 第83回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原 宏和
2. 発表標題 脳内亜鉛恒常性破綻と神経細胞傷害
3. 学会等名 第46回 日本毒性学会学術年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原 宏和, 大上綾音, 神谷哲朗, 足立哲夫
2. 発表標題 ポリスルフィドによる亜鉛毒性軽減作用
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤真央, 原 宏和, 神谷哲朗, 足立哲夫
2. 発表標題 神経毒6-ヒドロキシドパミンが銅動態制御因子発現に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岐阜薬科大学 臨床薬剤学研究室 http://sv1.gifu-pu.ac.jp/lab/rinyaku/
--

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	足立 哲夫 (Adachi Tetsuo) (40137063)	岐阜薬科大学・薬学部・教授 (23701)	

6. 研究組織（つづき）

	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	神谷 哲朗 (Kamiya Tetsuro) (60453057)	岐阜薬科大学・薬学部・講師 (23701)	
連携 研究者	奥田 健介 (Okuda Kensuke) (00311796)	神戸薬科大学・薬学部・教授 (34512)	