

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18400

研究課題名(和文)ポリスルフィドを介したH<sub>2</sub>SとNOのクロストーク：その疼痛疾患への関与の検討

研究課題名(英文) Interaction of hydrogen sulfide and nitric oxide through generation of polysulfide

研究代表者

宮本 亮 (Miyamoto, Ryo)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・外来研究員

研究者番号：40770863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：硫化水素(H<sub>2</sub>S)と一酸化窒素(NO)はともに生体内で酵素により合成され、ガスメッセンジャーとして多様な生体反応に関わる。本研究ではH<sub>2</sub>SとNOの同時処置がラット知覚神経に発現する痛み受容体TRPA1を活性化すること、またその実効分子が、硫黄が連なったポリサルファイド(H<sub>2</sub>Sn)であることを見出した。この現象はマイクロモラーレベルの低濃度で、かつ秒単位で認められた。本研究は過剰に産生されたH<sub>2</sub>SとNOがポリサルファイドを介して発痛に寄与する可能性を提示する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

毒ガスとして知られている硫化水素(H<sub>2</sub>S)が血管拡張やホルモン分泌などの多様な生物学的反応を惹起することが明らかになっているが、実験に使用されるH<sub>2</sub>Sの濃度と生体内で生じる濃度との間には乖離があり、本来のH<sub>2</sub>Sの役割は確立されていない。本研究では複数の手法・薬剤を併用して重合型のH<sub>2</sub>Sが低濃度でも痛み受容体を活性化するという新たな現象を示した。一連の結果は本研究分野の発展に貢献するとともに、H<sub>2</sub>Sが痛みや炎症に関わる有害物質となりうることを指摘する。

研究成果の概要(英文)：Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) and nitric oxide (NO) are enzymatically synthesized in mammalian cells, and considered to be gaseous mediators for various biological functions. This study shows that H<sub>2</sub>S and NO synergistically activate a pain receptor TRPA1 expressed in rat sensory neurons, and that their reaction products polysulfides (H<sub>2</sub>Sn) are the responsible molecules for the synergy. The chemical interaction occurs with low micro molar of H<sub>2</sub>S and NO in a time scale of a few seconds. This study suggests that excessively produced H<sub>2</sub>S and NO potentially contribute to pain sensation via polysulfides.

研究分野：薬理学一般

キーワード：硫化水素 一酸化窒素 ポリサルファイド TRPA1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

硫化水素 ( $H_2S$ ) は有毒ガスとして知られているが、哺乳動物の体内でも腸内細菌により産生され、多種の細胞で合成酵素の発現が認められる。また近年では  $H_2S$  の処置が血管拡張、抗酸化作用など、多岐にわたる作用を示すことから、 $H_2S$  がガス状メッセンジャーとして機能していると見られている。しかし実験に用いられる  $H_2S$  が高濃度であることから、この概念の確立には至っておらず、 $H_2S$  の本来の役割は不明確なままである。

知覚ニューロンに発現するイオンチャネル TRPA1 は、ワサビ成分などの刺激性物質により活性化され痛みを惹起する。研究代表者は以前から  $H_2S$  の痛覚における役割を検討し、 $H_2S$  が知覚ニューロンの TRPA1 を活性化することや、知覚ニューロン自身も酵素を介して  $H_2S$  を合成することを示し、 $H_2S$  が内因性の TRPA1 アゴニストとして発痛に寄与する可能性を提示してきた。TRPA1 の活性化には mM レベルの  $H_2S$  が必要であったが、近年  $H_2S$  が重合した  $H_2S_2$  や  $H_2S_3$  などの「ポリサルファイド」はより低濃度で TRPA1 を活性化させることが示された。そのため  $H_2S$  から変換されたポリサルファイドが発痛の実効分子であると考えられ、その変換メカニズムの解明が  $H_2S$  の研究において重要な意義をもつと見られている。

一方、 $H_2S$  が、古典的なガス状メディエーターである NO と、平滑筋弛緩作用などで相乗効果を示すことが報告されており、何らかの反応性物質の生成が示唆されていた。硫黄元素 (S) は -2 から +6 までの酸化数を取り、 $H_2S$  では -2 であるのに対してポリサルファイドでは正味 0 である。この化学的背景は  $H_2S$  が NO のような強い酸化物質の存在下でポリサルファイドに変換されうることを示唆する。すでに  $H_2S$  と NO の相乗効果を担う実効分子として nitroxyl ( $HNO$ ) や nitroso persulfide (SSNO) といった新規物質が提案されていたが、ポリサルファイドがその分子実体であるか否かの検討はなされていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究ではポリサルファイドの生成経路として  $H_2S$  と NO との相互作用に着目し、ポリサルファイドが双方に相乗効果をもたらす原因であると仮説を立てた。そこでポリサルファイドおよび  $Ca^{2+}$  選択的蛍光指示薬を用いて物質生成と機能発現を照らし合わせながらこの仮説の実証を試みた。

またポリサルファイドはシアン化物イオンやグルタチオンなどの還元剤によって不活化するが、 $HNO$  や SSNO はポリサルファイドと比べてそれらに抵抗性を示す。この性質を利用して  $H_2S$  と NO の相乗効果における各物質の関与を検討した。

### 3. 研究の方法

$H_2S$ 、NO ドナーとしてそれぞれ  $Na_2S$ 、DEA/NO (DEA/NO) を使用した。 $Na_2S$  はミリ Q 水に溶解し、DEA/NO は 0.1 M NaOH 溶液に溶解し -80°C で保存した。 $Ca^{2+}$  蛍光指示薬として Fluo-4 を、ポリサルファイド蛍光指示薬として SSip-1 を用いた。ポリサルファイドの検出には LC-MS/MS および紫外可視吸光度法も用いた。

(1) 蛍光イメージング：新生 Sprague-Dawley ラットから脊髄背根神経節を摘出し、酵素処理により知覚ニューロンを分離した。知覚ニューロンをカバーガラスに播種し、当日または翌日に実験に用いた。Fluo-4 および SSip-1 を HEPES 緩衝栄養液に溶解し、細胞に導入した。蛍光顕微鏡下で細胞蛍光を測定した。常時、対象細胞の近傍に設置したノズルから HEPES 緩衝栄養液を還流した。(2) LC-MS/MS および紫外可視吸光度法：HEPES 緩衝中性液に  $H_2S$  単独または NO の両方を添加し、紫外可視吸光度計を用いて経時的に 250–700 nm 波長の吸光度を測定した。または添加 5 分後にチオール選択的反応分子であるモノプロモピマンを添加して安定派生体を生成させ、LC/MS/MS に供した。

### 4. 研究成果

#### (1) 蛍光イメージングによるポリサルファイドの検出

知覚ニューロンに 5–50  $\mu M$  の  $H_2S$  と NO を処置したところ、これは同時処置時のみ  $Ca^{2+}$  上昇を引き起こし、その反応は TRPA1 阻害剤の HC030031 により抑制された (図 1 左上)。また  $H_2S$  と NO の同時処置は細胞内ポリサルファイド増加を誘発した (図 1 右上)。

#### (2) LC-MS/MS によるポリサルファイドの検出

LC-MS/MS による硫黄種の測定を実施した。 $H_2S$  ピークは NO 存在下で消失し、代わりに  $H_2S_2$  と  $H_2S_3$  のピークが生成した (図 1 下)。その生成は  $H_2S$  と NO に対して濃度依存性を示した。

#### (3) ポリサルファイド生成時間の検討

NO 蛍光プローブの DAF-2 を用いて DEA/NO からの NO 放出を測定した。DEA/NO は中性溶液に希釈することで NO の放出を開始し、飽和状態に達するまでにおよそ 3–5 分を要した。DEA/NO と  $H_2S$  を同時に希釈した場合のポリサルファイド生成は 3 分以上の反応を必要としたが、まず DEA/NO を希釈し、その 5 分後に  $Na_2S$  を加えた場合は 10 秒以内にはポリサルファイド生成が検出された。このことから  $H_2S$  と NO の反応自体は秒単位で起こることが示された。

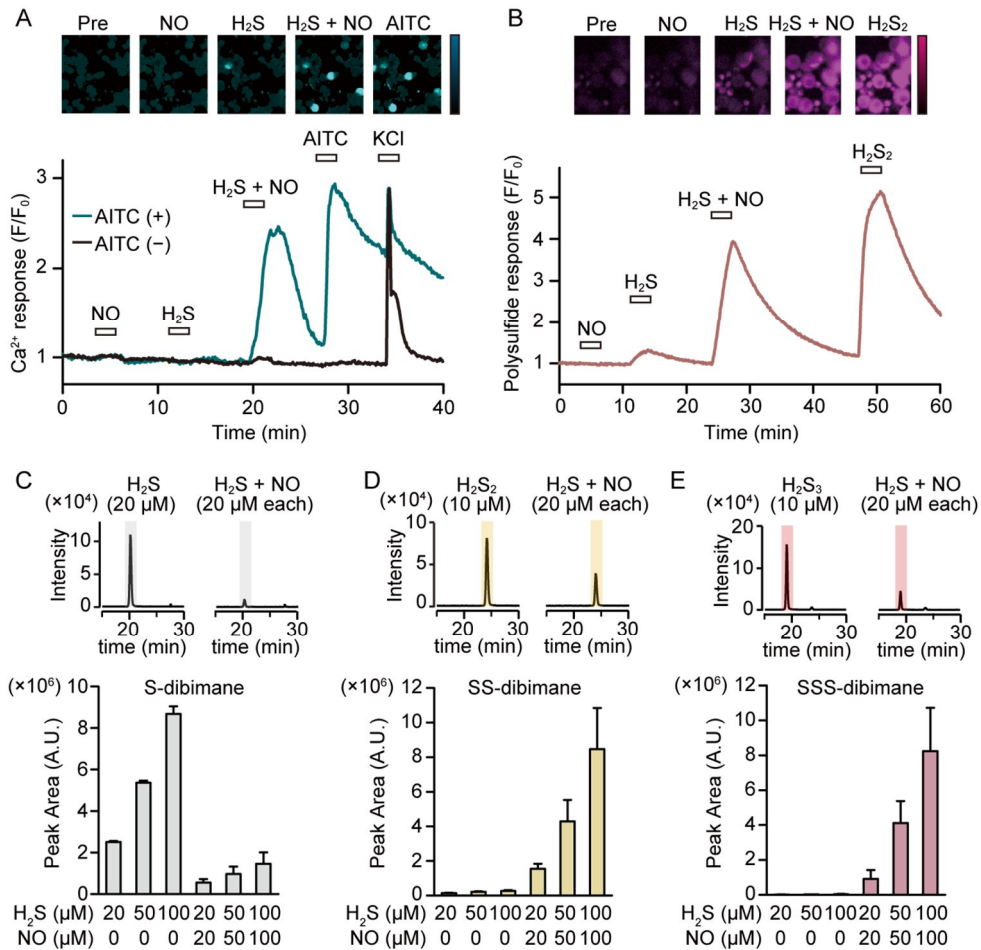


図 1 . 蛍光イメージングと LC-MS/MS を用いたポリサルファイドの検出

( 4 ) シアン化ナトリウムを用いた HNO の関与の検討

H<sub>2</sub>S と NO の混合液にシアン化ナトリウムを添加し、一定時間 ( 5–30 分 ) 後に蛍光イメージングを実施した。未添加群と比較し、添加 5 分後の混合液ではポリサルファイド反応と Ca<sup>2+</sup>反応は共に大きく減少した。HNO ドナーの Angeli's salt は TRPA1 依存性に Ca<sup>2+</sup>反応を誘発したが、この反応はシアン化ナトリウム前処置の影響を受けなかった。これらの結果は H<sub>2</sub>S と NO 混合液の実効分子が HNO ではなくポリサルファイドであることを支持する。

( 5 ) 紫外可視吸光度法による SSNO の検討

高濃度の H<sub>2</sub>S ( 5 mM ) と NO ( 2 mM ) を混合すると 410 nm にピークをもつ波長が生じ、時間依存的に増大した ( 図 2 A )。この時 300 nm に肩のような形状を思わせる吸光増加を伴った。この 300 nm と 410 nm の吸光増加はそれぞれポリサルファイドと SSNO によるものと思われた。いくつかの還元剤 ( シスチン ( Cys )、グルタチオン、ジチオスレイトール ) は 300 nm の吸光度を減少させたが、410 nm の吸光はこれらに対して抵抗性を示した ( 図 2 B )。これらの還元剤は H<sub>2</sub>S と NO の混合溶液によるポリサルファイド反応と Ca<sup>2+</sup>反応をほぼ完全に消失させ、実効分子が SSNO ではなく、ポリサルファイドであることが示唆された ( 図 2 C と D )。

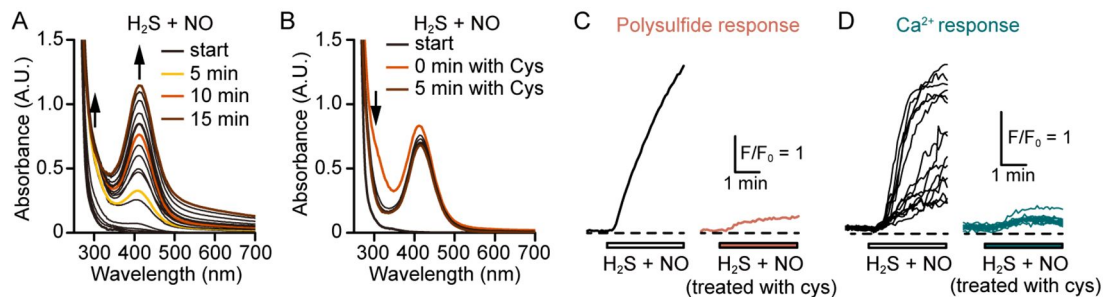


図 2 . 紫外可視吸光度法と蛍光イメージングを用いた還元剤に対する感受性の検討

本研究は  $\text{H}_2\text{S}$  が古典的なガス状伝達物質である  $\text{NO}$  によりポリサルファイドへと変換されることを明らかにした。同時に  $\text{H}_2\text{S}$  と  $\text{NO}$  の間の相乗効果は、少なくとも TRPA1 の活性化においてはポリサルファイドがほぼ唯一の原因であることを示した。 $\text{H}_2\text{S}$  や  $\text{NO}$  は容易に酸化・還元を受けるため定常的に豊富に存在するとは考えにくい。しかし今回、 $\text{H}_2\text{S}$  と  $\text{NO}$  によるポリサルファイド生成が秒単位で起こった。この結果は一過性・かつ局所的に  $\text{H}_2\text{S}$  と  $\text{NO}$  が生成する条件下であれば生体内でもポリサルファイドが生成するという可能性を示唆する。今後、酵素性に生成した  $\text{H}_2\text{S}$  や  $\text{NO}$  でも同様の現象をとらえられるか、また炎症モデルなど *in vivo* レベルでもこの現象が発痛に関与するかなど、より生理的条件下での検討が必要である。

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 Ryo Miyamoto, Shin Koike, Yoko Takano, Norihiro Shibuya, Yuka Kimura, Kenjiro Hanaoka, Yasuteru Urano, Yuki Ogasawara, Hideo Kimura	4. 巻 7
2. 論文標題 Polysulfides (H <sub>2</sub> S <sub>n</sub> ) produced from the interaction of hydrogen sulfide (H <sub>2</sub> S) and nitric oxide (NO) activate TRPA1 channels	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 45995
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/srep45995	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ryo Miyamoto, Shin Koike, Yoko Takano, Norihiro Shibuya, Yuka Kimura, Kenjiro Hanaoka, Yasuteru Urano, Yuki Ogasawara, Hideo Kimura
2. 発表標題 Contribution of polysulfides to the synergistic action of hydrogen sulfide (H <sub>2</sub> S) and nitric Oxide (NO) on TRPA1
3. 学会等名 WCP2018 (18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮本亮、小池伸、高野陽子、花岡健次郎、浦野泰照、小笠原裕樹、木村英雄
2. 発表標題 新規ポリスルフィド（H <sub>2</sub> S <sub>n</sub> ）生成機序の解明：硫化水素（H <sub>2</sub> S）と一酸化窒素（NO）による相乗効果
3. 学会等名 第160回日本獣医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮本亮、小池伸、高野陽子、渋谷典広、木村由佳、花岡健次郎、浦野泰照、小笠原裕樹、木村英雄
2. 発表標題 ポリサルファイド（H <sub>2</sub> S <sub>n</sub> ）を介した硫化水素（H <sub>2</sub> S）と一酸化窒素（NO）のクロストーク
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立精神・神経医療研究センター プレスリリース  
<https://www.ncnp.go.jp/press/release.html?no=342>

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
--	---------------------------	-----------------------	----