

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390433

研究課題名（和文）**虚血再灌流時に神経系細胞において発生する活性酸素種の確定とその特異的消去剤の選定**

研究課題名（英文）Determination of the active reactive oxygen species that generated in cells during ischemia-reperfusion and selection of its specific scavenger.

研究代表者 荒井 俊之 (Arai Toshiyuki)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80175950

研究成果の概要（和文）：

一重項酸素と細胞傷害の関係について研究を行った。ヒト白血病細胞を用いた実験では、白血病細胞が産生する一重項酸素が血管傷害を惹起すること、ラット神経様細胞では細胞外で発生させた一重項酸素が急性の壊死型細胞死をもたらすこと、マウス神経様細胞では細胞内で発生させた一重項酸素が亜急性の自己食食型細胞死をもたらすこと、ヒト好中球では一重項酸素が DNA 放出を伴う NETosis という形態の細胞死を誘導すること、が分かった。

研究成果の概要（英文）：

The relation of reactive oxygen species (ROS) with cell injury was investigated. Among ROS, we noticed singlet oxygen (SO) that has not been much noticed yet. Human leukemia cell line NB4, rat neuronal cell line B50, mouse neuronal cell line MG6, human neutrophils and rat neuron were used. In NB4, produced SO induced vascular cell injury. In B50, extracellularly generated SO induced acute cell death by necrosis. In MG6, intracellularly generated SO induced subacute cell death by autophagy. In neutrophils, SO induced cell death with NETs formation. In neurons, SO was involved in cell death induced by glutamate. In above mentioned all experiments, SO was strongly involved in cell injury. Therefore, we speculated that SO is essential for cell injury induced by ROS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	13,100,000	3,930,000	17,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、麻酔・蘇生学

キーワード：活性酸素、一重項酸素、細胞死、壊死型、自己貪食型、アポトーシス、NETosis

1. 研究開始当初の背景

脳虚血再灌流傷害の成因として活性酸素(ROS)が大きく関与することは以前より知られている。そのROSの発生源として最も考えやすいのが、NADPH-oxidase (NOX)を有する細胞すなわち貪食細胞型NOXを有する好中球やマクロファージで、脳の場合は前述のようにミクログリアがこれに相当する。しかし、ROSの発生源として神経細胞そのものが注目されるようになったのは最近である。それは虚血により神経細胞に非貪食細胞型NOX発現が誘導され、このNOXが産生したROSが組織傷害を引き起こすというものである。しかしこの非貪食細胞型NOXが産生するROSの種類についてはよく分かっていない。好中球が有する貪食細胞型NOXの場合は、活性化して通常の三重項酸素(3O_2)からスーパーオキシド(O_2^-)が生成し、これが自発的に、またはSODの作用により不均化されて過酸化水素(H_2O_2)が生じる。次いで好中球細胞質内の顆粒から放出されたミエロペロキシダーゼの作用によりこの H_2O_2 と生体に普遍的に存在する塩素イオン(Cl^-)から次亜塩素酸イオン

(OCl^-)が生じる。そしてこの OCl^- と H_2O_2 が自発的に反応して一重項酸素(1O_2)が生じるとされている。ヒドロキシルラジカル($\bullet OH$)については H_2O_2 からFenton反応により生成するという説や O_2^- からHaber-Weiss反応により生成するという説などがあるが、未だ生成機序は確定していない。ともあれ、神経細胞が発現する非貪食細胞型NOXの場合は、貪食細胞型NOX同様、まず O_2^- を産生すると思われるが、それ以降の過程は全く不明である。電子を受け取って H_2O_2 を生成する可能性もあれば、逆に電子を失って 1O_2 を生成する可能性もある。ちなみに O_2^- が電子を失った場合は 3O_2 ではなく 1O_2 になることは化学的に証明されている。以上のように虚血再灌流状態においては非貪食細胞型NOXを発現した神経細胞がROSを産生するとしても、いかなる種類のROSが産生され傷害を引き起こすかは全く不明である。また貪食細胞型NOXを有すると考えられるミクログリアがROSを産生するとしても、好中球と同様のROS産生経路を持つとは考え難く、ROSの種類はやはり不明である。以上が研究開始当初の背景である。

2. 研究の目的

心停止や脳梗塞による脳虚血においては、虚血による組織傷害に加えて、血流再開時に発生する ROS がさらなる傷害、いわゆる虚血再灌流傷害をもたらすといわれている。発生する ROS としてはスーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)、過酸化水素(H_2O_2)、ヒドロキシラジカル($\cdot OH$)ならびに一重項酸素(1O_2)が考えられているが、どの種の ROS が直接的に組織傷害を引き起こすかは未だ明らかではない。さらに再灌流時の ROS の発生源も明らかではない。ROS を大量に産生する細胞としては好中球、単球ならびにマクロファージが知られているが、脳の場合は脳血管バリアが存在するので、それらの細胞が組織に流入するとは考えにくい。そこで ROS の発生源として考えられるのは神経膠細胞の一種で脳における組織マクロファージに相当するミクログリアである。さらに近年では、前述のように、神経細胞そのものが NOX を発現して ROS を産生するとも考えられている。しかしミクログリアにせよ神経細胞にせよ、虚血再灌流状態における ROS の産生は、未だ明確には証明されていない。ましてや産生する ROS の種類の同定は全くなされていない。そこで今回我々はまず虚血再灌流状態においてミクログリアや神経細胞が ROS を産生するか否かを検証する。そして、ROS を産生する場合はその種類を同定する。次いで、その同定された ROS を選択的に消去する薬剤を選定ないしは新たに合成し、傷害緩和効果を検討する。以上が本研究の目的である。

3. 研究の方法

研究開始当初は、好中球が産生する ROS のうち

スーパーオキシドは化学発光試薬 CLA を、一重項酸素は同じく化学発光試薬 MVP を用いてそれぞれ特異的に検出できることは、これまでの研究で分かっていた。そこで、この手法を用いて細胞内で発生するスーパーオキシドならびに一重項酸素を、それぞれ特異的に検出することを目論んだ。化学発光での検出はルミノメーターを用いて発光量を数値としてカウントしたものであって、二次元画像として検出したものではない。そこで好感度の顕微鏡を用いて発光そのものを検出し二次元画像化することを試みたが、如何に好感度の顕微鏡を用いても化学発光そのものを検出することは、現時点では技術的に不可能であるということが分かった。そこで発想を変え、「細胞傷害時には何らかの種類の ROS が発生している」という命題を証明することは一旦諦め、「ある種の ROS は細胞傷害を引き起こす」という命題を証明することにした。これは先の命題の言わば「逆」の命題であって、この命題を証明しても先の命題を証明したことにはならないが、ある種の ROS が必ず細胞傷害を惹起するのであれば、種々の細胞傷害にその ROS が関与している可能性は大いに考えられる。そこでそのある種の ROS として以前より疑わしく思っていた一重項酸素に目標を定め、以下の実験を行った。

(1) ROS が病態モデルにおいて組織傷害に関与しているか否かの実験

白血病の治療法の一つに白血病細胞をレチノイン酸で刺激して分化成熟を促し、成熟白血球化した細胞に特有の自死作用を利用して白血病細胞を消滅させるという治療法がある。しかしこの治療法は呼吸器障害などの重篤

な副作用を伴うことがある。それは白血球細胞が成熟分化に伴いROS産生能を獲得し、その細胞が産生するROSが肺毛細血管などの組織を傷害するのが原因ではないかと考えた。そこでこの病態モデルを用いて実験を行った。

(2) ROSのうちでも一重項酸素が組織傷害に大きく関与している可能性を調べる実験

ラット神経様細胞であるB50細胞を、光増感剤であるローズベンガルを溶解させた培養液に入れ、培養液を緑色光で照射することにより、細胞外で一重項酸素を人為的に発生させた。

(3) 一重項酸素を効果的に消去する薬剤の開発
プテリン化合物の有する一重項酸素消去能に注目し、その置換基を変化させることによりさらに消去能を高める工夫を行った。

(4) 細胞内で発生させた一重項酸素が細胞傷害を惹起する可能性を調べる実験

マウス神経様細胞であるMG6細胞に光増感剤であるフォトフリンを取り込ませ、これを赤色光で照射することで細胞内に人為的に一重項を発生させた。

(5) 神経細胞を用いた実験

これまでのような神経様細胞ではなく、神経細胞そのものを用いて、また一重項酸素を細胞内外から人為的に負荷するのではなく、細胞内外で一重項酸素が発生していると予想される無酸素・再酸素化法、グルコース枯渇法、グルタミン酸投与法、パラコート投与法のうち、にグルタミン酸投与法を試みた。方法としてラット神経細胞にグルタミン酸を負荷することにより、細胞内に一重項酸素が発生すること、ならびにそれにより細胞死が惹起されることを示そうとした。

(6) 好中球の細胞死において近年注目を集めている Neutrophil Extracellular Traps (NETs) と一重項酸素の関係

NETsというのは好中球が自らのDNAを網の目のように細胞外に放出し、これにより細菌を捉え死滅させるという一種の生体防御機構である。好中球自身も細胞死を来すため、その細胞死の形態は NETosis と呼ばれている。この NETs 形成には活性酸素が関与していることは広く知られていたが、好中球が産生する種々の活性酸素種のうち、どの種の活性酸素が重要かは不明であった。そこで我々は、NETs 形成に必須の ROS は何かを調べた。

4. 研究成果

(1) 結果は予想通り、ヒト白血病細胞であるNB4細胞をレチノイン酸で刺激した場合、この細胞はROS産生能を獲得し、ホルボルミリステアアセテート(PMA)刺激によりスーパーオキシド(O_2^-)、過酸化水素(H_2O_2)、ヒドロキシラジカル($\bullet OH$)ならびに一重項酸素(1O_2)といった成熟白血球が産生するのと同じ種類のROSを産生した。またこのROS産生能を獲得したNB4細胞を血管内皮細胞と共存させ、おなじくPMA刺激を行うと内皮細胞の透過性を高まった。これはレチノイン酸を用いた白血病治療において、副作用として呼吸器障害が生じるという現象に通じる知見である。以上より、ROSが病態モデルにおいて組織傷害に関与していることが実証できた。これは臨床医学において治療につながる意義ある成果である(論文1)。

(2) ラット神経様細胞では細胞外で発生させた一重項酸素が急性のネクローシス型細

胞死をもたらすことを示した。この細胞死が脳梗塞治療薬エダラボンで緩和されたことから、生体内でも一重項酸素が脳梗塞の組織傷害に関与している可能性が示唆された。これは基礎と臨床の知見を結びつけるという意味で意義ある成果である(論文3)。

(3) プテリン化合物を基本骨格として、一重項酸素消去能はエダラボンにやや劣るものの、エダラボンにはないスーパーオキシド消去能を有する試薬が合成できた。この試薬の構造決定や、一重項酸素による細胞傷害に対する効果については、今後の検討課題となるが、この試薬には細胞毒性がないので、これは「創薬」という意味で意義がある(論文2)。

(4) マウス神経様細胞では細胞内で発生させた一重項酸素が亜急性の自己貪食型細胞死をもたらすことを示した。さらに、この亜急性の細胞傷害に対しては、急性の細胞傷害で有効であった一重項酸素消去剤エダラボンも傷害緩和に有効でないことが分かった。これはエダラボンのように有効半減期の短い薬剤では、自己貪食型細胞死のように徐々に進行していく細胞死を抑制できないのではないかと類推された。

(5) ラット神経細胞にグルタミン酸を負荷した場合、細胞死が惹起された。しかしこの細胞死の形態が単純な壊死やアポトーシスではなく、変性細胞死であったため細胞死の評価が困難で、実験計画に大きく齟齬を来した。これに関しては、細胞死そのものではなく、細胞の活性低下を評価する方法に計画を変更し、実験を継続する予定である。

(6) 好中球における NETosis の研究において、我々はこれまで培ってきた活性酸素研究の

手法を用いて、一重項酸素が NETs 形成に必須であることを示した(論文4)。しかし、同じ貪食細胞の一種であるミクログリアにおいても、無酸素・再酸素化などで細胞内に一重項酸素が発生した場合、NETs 様現象が生じ、それにより周りの神経細胞を傷害する可能性があるか否かについては、今後の検討課題となった。

5. 主な発表論文 (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4件)

1. Nishinaka Y, Arai T, Adachi S, Takaori-Kondo A, Yamashita K: Singlet oxygen is essential for neutrophil extracellular trap formation. *Biochem Biophys Res Commun* 413, 75-79, 2011 (査読有り)
doi:10.1016/j.bbrc.2011.08.052
2. Nishinaka Y, Mori H, Endo N, Miyoshi T, Yamashita K, Adachi S, Arai T: Edaravone directly reacts with singlet oxygen and protects cells from attack. *Life Sci* 86, 808-813, 2010 (査読有り)
doi:10.1016/j.lfs.2010.03.017
3. Mori H, Nishinaka Y, Nonogawa M, Sommani P, Makino K, Yamashita K, Arai T: Substituent effects of pterin derivatives on singlet oxygen scavenging activity. *Biol Pharm Bull* 33, 905-908, 2010 (査読有り)
4. Miyoshi T, Arai T, Yamashita K, Sasada M, Uchiyama T: NB4 cells treated with all-*trans* retinoic acid generate toxic reactive oxygen species that cause endothelial hyperpermeability. *Leukemia Res* 34, 373-378, 2010 (査読有り)
doi:10.1016/j.leukres.2009.05.022

[学会発表] (計 11 件)

1. Yoko Nishinaka, Makiko Morita, Toshiyuki Arai, Souichi Adachi, Akifumi Takaori-Kondo, Kouhei Yamashita: Singlet oxygen is essential for neutrophil extracellular trap formation. 第 53 回米国血液学会。2011 年 12 月 12 日 San Diego (San Diego Convention Center, CA, USA)
2. Kouhei Yamashita, Yoko Nishinaka, Toshiyuki Arai, Souichi Adachi, Akifumi Takaori-Kondo: Singlet oxygen is essential for neutrophil extracellular trap formation. 第 73 回日本血液学会総会。2011 年 10 月 14-16 日 名古屋 (名古屋国際会議場)
3. 西中瑶子、森田真紀子、山下浩平、荒井俊之、足立壮一: NETosis における一重項酸素の役割。第 20 回日本 Cell Death 学会。2011 年 7 月 30 日 東京 (東京大学)
4. 森浩子、西中瑶子、荒井俊之: 細胞内で発生させた一重項酸素による細胞死に対する脳梗塞治療薬エダラボンの効果について。第 58 回日本麻酔科学会。2011 年 5 月 19 日 神戸 (神戸ポートピアホテル)
5. 西中瑶子、遠藤伸之、荒井俊之: 新規一重項酸素消去剤による細胞傷害の緩和。日本化学会第 91 春期大会 (中止するも成立と認定)。2011 年 3 月 28 日 横浜 (神奈川大学)
6. 荒井俊之: 酸素 (ラジカル) - 一重項酸素と細胞傷害について - 。第 14 回日本医療ガス学会招待講演。2010 年 11 月 20 日 金沢 (金沢市アートホール)
7. 西中瑶子、荒井俊之、山下浩平、足立壮一:

細胞内で発生させた一重項酸素による細胞死に対するエダラボンの効果。第 19 回日本 Cell Death 学会。2010 年 7 月 31 日 名古屋 (愛知県産業労働センター)

8. 森浩子、荒井俊之、福田和彦: 脳梗塞治療薬エダラボン一重項酸素消去能と細胞死抑制効果について。第 57 回日本麻酔科学会。2010 年 6 月 4 日 福岡 (福岡国際会議場)
9. 三好隆史、山下浩平、荒井俊之、笹田昌孝、内山卓: ATRA 症候群における血管透過性亢進病態形成への活性酸素関与の可能性の検討。第 71 回日本血液学会総会。2009 年 10 月 23-25 日 京都 (京都国際会議場)
10. 森浩子、荒井俊之、福田和彦: 一重項酸素による細胞傷害に対する PBN の効果。第 56 回日本麻酔科学会。2009 年 8 月 17 日 神戸 (神戸ポートピアホテル)
11. 西中瑶子、荒井俊之、三好隆史、山下浩平、足立壮一: N-アセチルシステインの一重項酸素消去能と細胞死について。第 18 回日本アポトーシス研究会学術集会。2009 年 8 月 2 日 長崎 (長崎大学)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者: 荒井 俊之 (Arai Toshiyuki)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 80175950
- (2) 研究分担者: 山下 浩平 (Yamashita Kouhei)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号: 80402858
- (3) 連携研究者: 遠藤 伸之 (Endo Nobuyuki)
若狭湾エネルギー研究センター・
研究開発部・主査研究員
研究者番号: 30359244