

## 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11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590733

研究課題名（和文） 硫化水素の細胞毒性の機構の解明

研究課題名（英文） Studies on the mechanisms of cell toxicity caused by hydrogen sulfide

研究代表者

上村 公一（UEMURA KOUICHI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30244586

研究成果の概要（和文）：

硫化水素（H<sub>2</sub>S）の細胞への毒性作用の機序を解明するため、ラット胎児心筋由来細胞（H9c2 cells）、ラット II 型肺胞上皮由来細胞（L2 cells）に H<sub>2</sub>S 供与体としての NaHS を暴露した。H9c2 cell で 3mM、十数時間後から細胞質の萎縮が観察された。5mM で顕著な形態的アポトーシス様細胞死が確認され、caspase3 の活性化が見られた。L2 cells では NaHS 2-3mM、数十分後から、核凝集、細胞膜の AnnexinV との反応、Cytochrome C の細胞質への漏出が確認された。L2 cells では H9c2 cells より濃度は低く、短時間で細胞毒性が確認された。H<sub>2</sub>S の細胞毒性は組織により感受性が異なっていた。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate the mechanism of toxic effects of H<sub>2</sub>S on cells by exposure to NaHS as a donor of H<sub>2</sub>S in cells derived from fetal rat cardiomyocytes (H9c2 cells) or rat type II alveolar epithelial cells (L2 cells) was performed. In H9c2 cells atrophy of the cytoplasm was observed under 3mM NaHS after a dozen hours. Remarkable morphological apoptotic cell death and the activation of caspase3 were observed in 5mM NaHS. In L2 cells after an hour under 2-3mM NaHS exposure, nuclear aggregation, AnnexinV positivity with cell membrane, leakage into the cytoplasm of Cytochrome C has been confirmed, which showed that the concentration of NaHS cytotoxicity in L2 cells is lower than in H9c2 cells. H<sub>2</sub>S cytotoxic sensitivity was different by organs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	4,000,000	1,200,000	5,200,000

研究分野：生物

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：硫化水素、心筋由来細胞、肺胞上皮由来細胞、アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

本研究は硫化水素の直接的な細胞への毒作用の機構の解明を目的とする。硫化水素はシアンや一酸化炭素と同様に、ミトコンドリア呼吸鎖のチトクローム c オキシダーゼの阻害による窒息を引き起こすと考えられてきた。しかし、高濃度の硫化水素を吸引すると、短時間で意識を消失し、死亡することや、剖検例で肺胞内出血が認められることから、細

胞に対して、窒息ではない直接的な傷害作用があることが考えられる。培養細胞や実験動物を用いて、硫化水素による細胞死の機序を解明し、作用点（標的分子）を明らかにし、それを保護する方法を見つけ出し、硫化水素中毒の治療・予防法の確立を目的とする。硫化水素による細胞死の機序が解明され、硫化水素はこれまで考えられてきた以上に危険な物質であることが認識されることになれ

ば、その発生源となる日用品の監視も強化され、硫化水素自殺の発生を未然に防止できるものと考えられる。

## 2. 研究の目的

硫化水素は呼吸器系に作用し、中毒症状を引き起こし、高濃度に吸引すると短時間で意識を消失し死に至る。硫化水素が細胞に与える影響の詳細は明らかでなく、有効な治療法も確立されていない。近年、硫化水素により臓腑と肺由来の細胞においてアポトーシスが誘導されることが報告されている。一方で、心筋細胞において毒性は報告されておらず、低濃度では心筋細胞を保護すると考えられている。本研究では心臓と肺胞上皮由来の細胞について、高濃度硫化水素暴露の実験を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 材料

<試薬>

NaHS : Sodium hydrogen sulfide anhydrous (STREM CHEMICALS)

<細胞培養>

ラット胎児心筋由来 H9c2 細胞、ラット II 型肺胞上皮細胞由来である L2 細胞。

方法

### (2) H<sub>2</sub>S の曝露方法

H<sub>2</sub>S 発生のドナーとして NaHS を用い、NaHS と HCl を 1:2 の割合で混合し、D-MEM を弱酸性に傾けることで硫化水素を発生させた。

NaHS と HCl を混合した D-MEM を細胞に曝露し、dish の周囲をシーリングして気密性を高めた。CO<sub>2</sub> 5%, 37°C で一定時間静置した。

### (3) 形態変化の観察

3 cm dish に培養した H9c2 細胞に NaHS 1, 3, 5mM を 15 時間曝露した後、Hoechst33342 で染色し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。アポトーシス率は Hoechst33342 により染色された細胞を総数とし、核の凝集した細胞の割合を算出した。

### (4) アポトーシス関連蛋白質の変化の検討

6 cm dish に培養した H9c2 細胞に NaHS を濃度 1, 3, 5mM を 15 時間、NaHS 5mM を 0, 4, 8, 12 時間曝露し、細胞を回収した。蛋白電気泳動後、PVDF 膜に転写し、Anti-cleaved caspase3、Anti-PARP 抗体による Western blotting を用いて細胞死関連蛋白質の変化を検証した。

### (5) ミトコンドリア膜電位の変化の観察

3 cm dish に培養した H9c2 細胞に JC-1 10μM を加え、10 分間静置した。その後 PBS で wash し、NaHS 5mM を曝露させた。曝露直後から蛍光顕微鏡を用いてミトコンドリア膜電位の変化を観察した。

### (6) 活性酸素種 (ROS) に関する実験

3 cm dish に培養した H9c2 細胞に Dihydroethidium 20μM を加え、10 分間静置した。その後 PBS で wash し、NaHS 5mM を曝露させた。曝露直後から蛍光顕微鏡を用いて O<sub>2</sub><sup>-</sup> の産生を確認した。活性酸素種の Scavenger による細胞死への影響の検討では、3 cm dish に培養した H9c2 細胞に Glutathion 50μM、N-Acetyl-L-Cysteine 50μM、Tiron® 2.5mM、Trolox® 100μM を加え、それぞれ 30 分間、1 時間、30 分間静置した。その後 PBS で wash し、NaHS 5mM を 15 時間曝露させた。

### (7) Cytochrome C に関する実験

10cm dish に培養した H9c2 細胞に NaHS 5mM を 15 時間曝露し、回収した細胞を Mitochondria Isolation Buffer を用いて細胞質画分とミトコンドリア画分に分画した。その後 Western blotting 法を用いて Cytochrome C を検出した。

### (8) Caspase 阻害剤に関する実験

3 cm dish に培養した H9c2 細胞に Z-VAD-FMK 50μM を加え、1 時間静置した。その後 PBS で wash し、NaHS 5mM を 15 時間曝露させた。

## 4. 研究成果

### (1) NaHS 曝露による H9c2 細胞への影響

NaHS 1mM 曝露では細胞の形態に変化はみられなかった。NaHS 3mM 曝露では周囲の形状がいびつになる細胞が複数観察された。NaHS 5mM 曝露では多くの細胞が委縮し、Hoechst33342 により核の凝集も観察された (Fig.1-A)。アポトーシス率は 60% を上回った。NaHS を曝露すると濃度依存的に細胞のアポトーシス率が上昇することが確認された (Fig.1-B)。

### (2) NaHS 曝露によるアポトーシス関連蛋白質の変化

NaHS 1, 3, 5mM を 15 時間曝露した。NaHS 5mM 曝露で Caspase-3 の活性型である Cleaved caspase-3 (17, 19kDa) のバンドが Control に比べて顕著に上昇した (Fig.2-A)。Caspase-3 の基質である PARP を観察したところ、濃度依存的に PARP が切断され、切断された 89kDa のバンドが確認された (Fig.2-B)。曝露 12 時間後で Cleaved caspase-3 (17, 19kDa) のバンドが曝露 0 時間に比べて顕著に上昇した (Fig.2-C)。曝露 12 時間後で PARP の切断された 89kDa のバンドが確認された (Fig.2-D)。NaHS 曝露により H9c2 細胞において濃度・時間依存的に Cleaved caspase-3 (17, 19kDa) が活性化し、PARP が切断された。H9c2 細胞では NaHS 曝露によりアポトーシスが引き起こされることが確認された。

### (3) ミトコンドリア膜電位の変化

H<sub>2</sub>S はミトコンドリアの Complex IV の阻害剤である。NaHS 5mM 曝露直後からミトコンドリア膜電位検出試薬 JC-1 の赤色蛍光が減少

し始めた。それに伴い、アポトーシスを起こした細胞では JC-1 がミトコンドリアに取り込まれず細胞質中で発する緑色蛍光が強まった。(Fig.3)。

(4) 活性酸素種 (ROS) の細胞死への影響  
NaHS 5mM では曝露後 1 時間までは Dihydroethidium の赤色蛍光に変化はなく、ROS の産生は確認されなかった。曝露 1 時間後から Dihydroethidium の赤色蛍光が強まり、ROS が産生されることが確認された (Fig.4-A)。Glutathione、N-Acetyl-L-Cysteine、Tiron® それぞれを投与した細胞は、NaHS 5mM のみ曝露させた細胞に比べてアポトーシス率が顕著に減少した (Fig.4-B~D)。しかし、Trolox® 100 $\mu$ M を添加した細胞では NaHS 5mM のみ曝露した細胞と同様の形態変化が観察された。Glutathione の投与により、細胞への障害を軽減することが確認された (Fig.4-B)。 $\cdot$ OH (ヒドロキシラジカル) の Scavenger である N-Acetyl-L-Cysteine の投与と、 $O_2^-$  (スーパーオキシドアニオン) の Scavenger である Tiron® の投与により、同程度アポトーシス率が減少することが確認された。フリーラジカルの Scavenger である Trolox® (ビタミン E) は細胞を保護しないことが確認された (Fig.4-E)。NaHS により  $\cdot$ OH や  $O_2^-$  が産生されることでアポトーシスが引き起こされることが示唆された。

(5) Cytochrome C の漏出  
ミトコンドリアを介したアポトーシスでは Cytochrome C の細胞質への漏出が確認されるため、Cytochrome C の遊離を検討した。NaHS 5mM を 15 時間曝露したところ、ミトコンドリアから細胞質への Cytochrome C の漏出が確認された (Fig.5)。

(6) Caspase 阻害剤による細胞死への影響  
Caspase 阻害剤である Z-VAD-FMK 50 $\mu$ M を曝露させた細胞は NaHS 5mM のみ曝露させた細胞に比べてアポトーシス率が有意に減少した (Fig.6)。

(7) LC2 cell の実験  
肺胞上皮細胞由来の L2 cell においては、NaHS 2mM 以下、1 時間曝露における細胞の形態変化および、Hoechst33342 による核の凝集、PI 染色によるアポトーシス細胞 (Fig.7)、Annexin V 陽性が見られた (Fig.8)。

(8) 考察  
アポトーシス関連蛋白質の変化と核の形態変化から、NaHS の曝露により心筋細胞においてアポトーシスが誘導されることが示された。本研究では  $H_2S$  発生のドナーとして NaHS を用い、過去の報告では NaHS の約 33% が  $H_2S$  として発生すると考えられている。本研究で用いた NaHS 5mM から約 1.6mM の  $H_2S$  が発生していると考えられる。 $H_2S$  は生体内に 46 $\mu$ M 以下の濃度で存在していると考えられており、約 33 $\mu$ M の  $H_2S$  はラットの心

筋において保護作用を示すことが報告されている。一方、15mM 以上の  $H_2S$  の曝露により即時に死に至ることが報告されている。本研究で用いた NaHS から臭覚麻痺を引き起こす約 150ppm の  $H_2S$  が発生すると考えられる。これは生体内に存在する  $H_2S$  より高濃度であるが、即時に死に至る濃度ではないため、心筋細胞においてアポトーシスが誘導されることは  $H_2S$  の生体への影響を解明する上で重要な結果であると考えられる。

NaHS により誘導されるアポトーシスは、NaHS 曝露直後からミトコンドリア膜電位の低下が起こり、曝露 1 時間後から ROS の産生が始まること、そして Cytochrome C の漏出が確認されたことから、ミトコンドリアを介したアポトーシスシグナルが関与していることが示された (Fig.9)。過去の報告から  $H_2S$  の毒性には ROS が関与することが報告されており、本研究でも ROS の Scavenger によりアポトーシス率が大幅に減少したことから、NaHS により心筋細胞のミトコンドリアが障害され、 $\cdot$ OH や  $O_2^-$  の産生によりアポトーシスが引き起こされることが示唆された。

(9) 研究の総括  
硫化水素による細胞毒性は各組織で反応性が大きく異なり、肺胞のように急性期において毒性を示す一方で、心筋のように数十時間後に毒性を示し、実際の硫化水素中毒症例においても組織における障害の違いを考慮することが重要であると考えられる。当初予定していた動物実験は実施できなかったため、本研究の結果がそのまま動物に当てはまるか否かは不明である。しかし、硫化水素の急性毒性、特に心臓・肺に対する毒性の一部は解明できたと考える。

## 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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 白鳥 典、船越 丈司、鶴沼 香奈、秋利彦、上村 公一、硫化水素による心筋細胞障害の検討. 第 79 回日本法医学会 学術関東地方集会 2010.10.30; 東京.
- ② 白鳥 典、船越 丈司、鶴沼 香奈、秋利彦、上村 公一、心筋細胞における硫化水素の毒性の検討. 第 83 回 日本生化学会大会.2010.12.7-10 神戸.

[その他]

ホームページ等

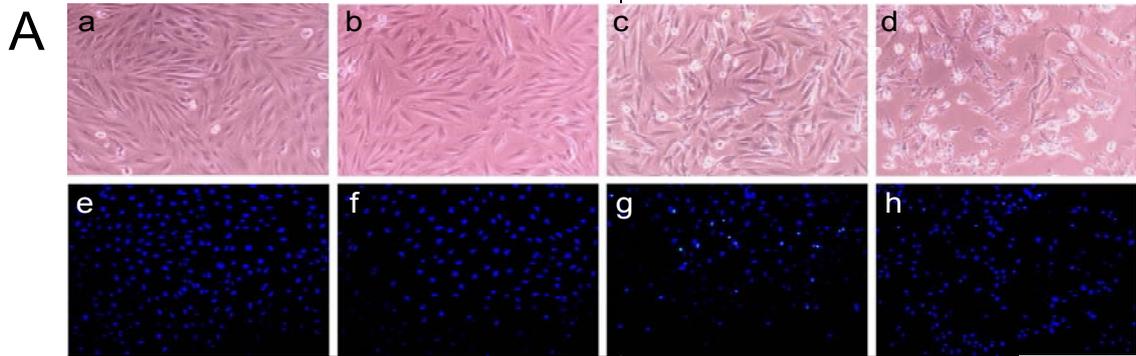
<http://www.tmd.ac.jp/med/legm/kenkyu.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上村 公一 (UEMURA KOICHI)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

(2)研究分担者



B

船越 丈司 (FUNAKOSHI TAKESHI)

Fig.1 NaHS 曝露による細胞の形態変化 (A): NaHS 1, 3, 5mM 15 時間曝露における細胞の形態変化および、Hoechst33342 による核の凝集の観察。a~d: 位相差 e~h: Hoechst33342 a, e: Control b, f: NaHS 1mM c, g: NaHS 3mM d, h: NaHS 5mM (B): NaHS 1,3,5mM 15 時間曝露における細胞のアポトーシス率。

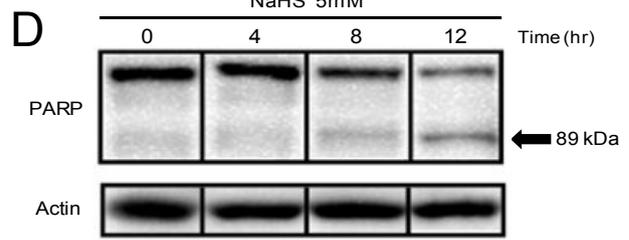
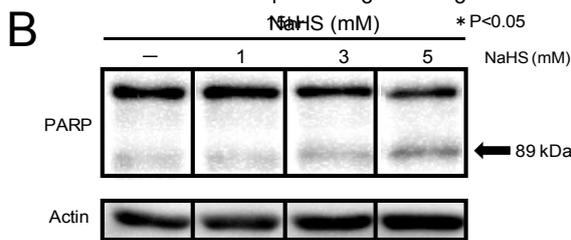
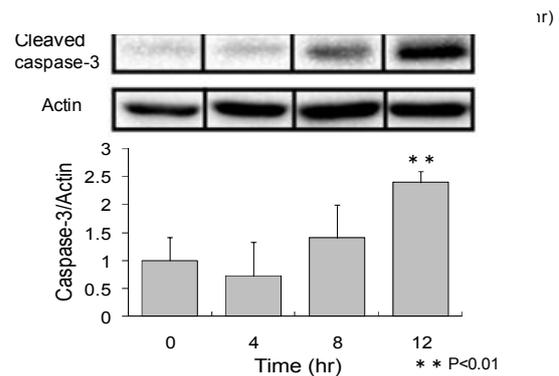
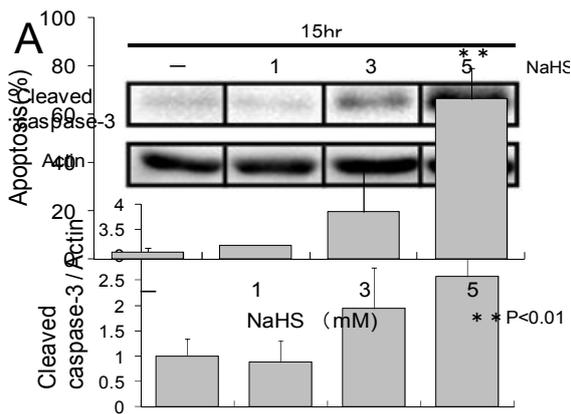
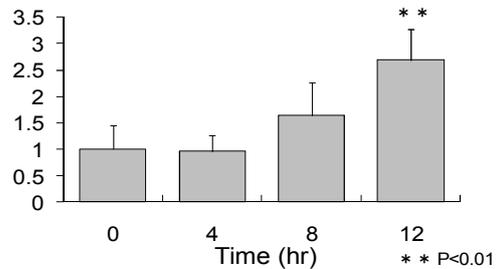
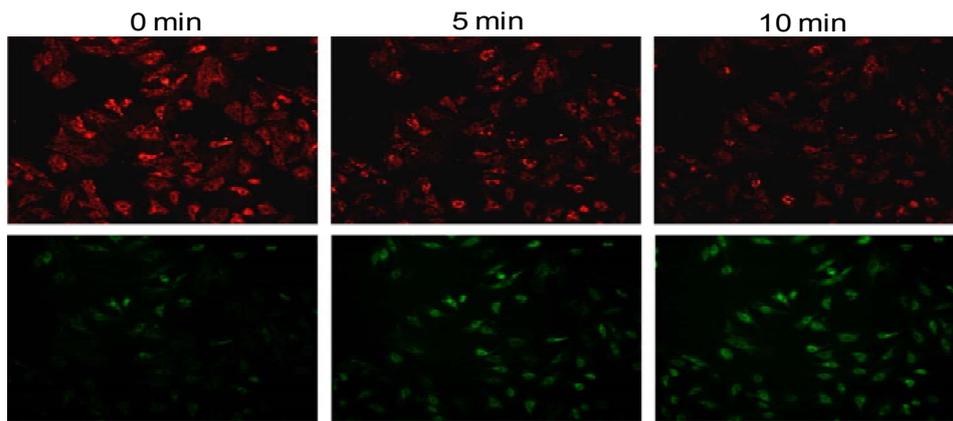


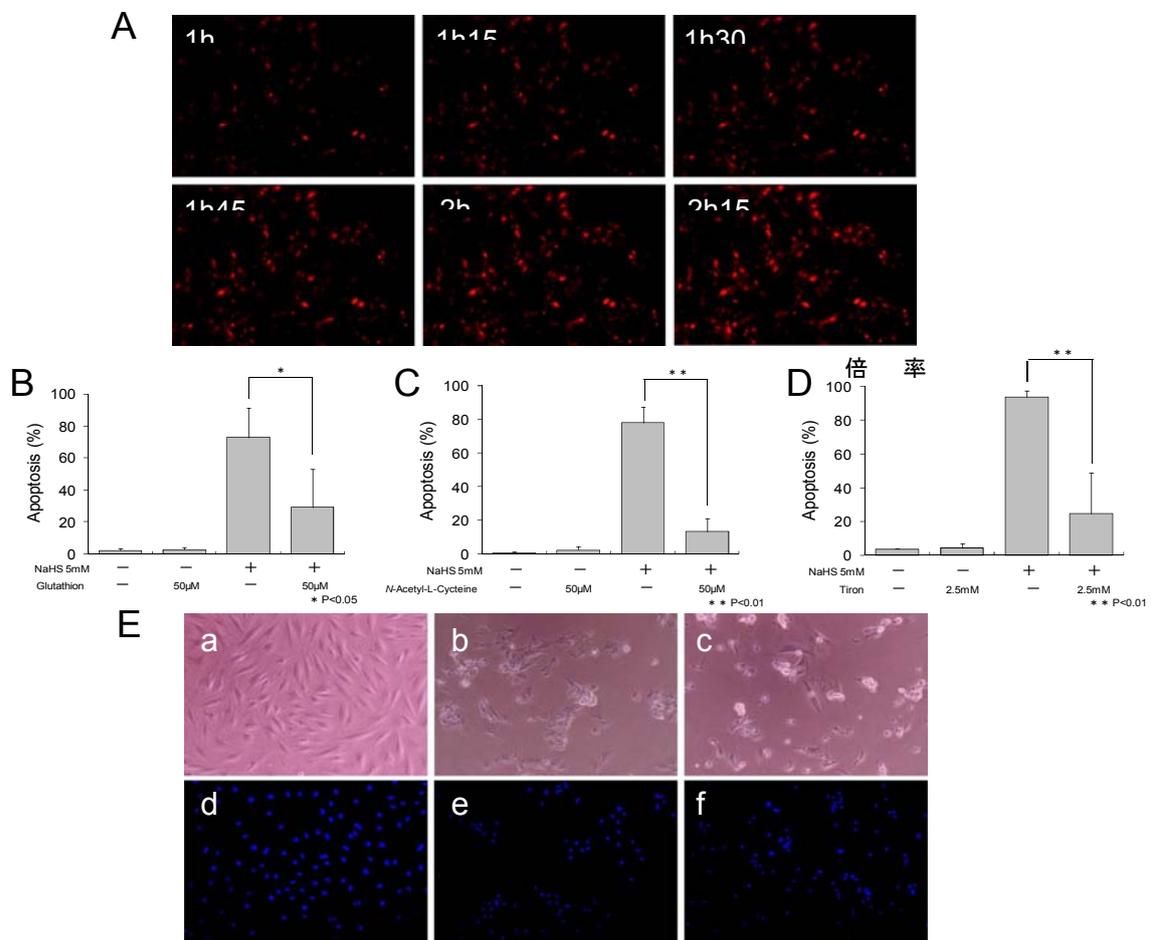
Fig.2 NaHS 曝露によるアポトーシス関連蛋白質の変化の観察

(A): NaHS 1, 3, 5mM 15 時間曝露による Cleaved caspase-3 (17, 19kDa) の活性化。(B): NaHS 1, 3, 5mM 15 時間曝露による PARP の切断バンド (89kDa) の確認。(C): NaHS 5mM 0, 4, 8, 12 時間曝露による Cleaved caspase-3 (17, 19kDa) の活性化。(D): NaHS 5mM 0, 4, 8, 12 時間曝露による PARP の切断バンド(89kDa)。

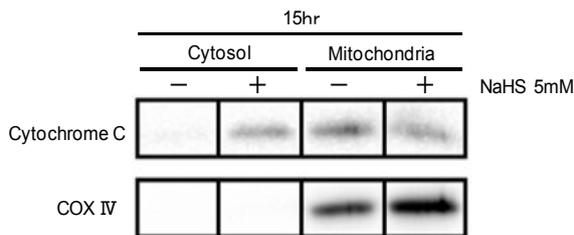




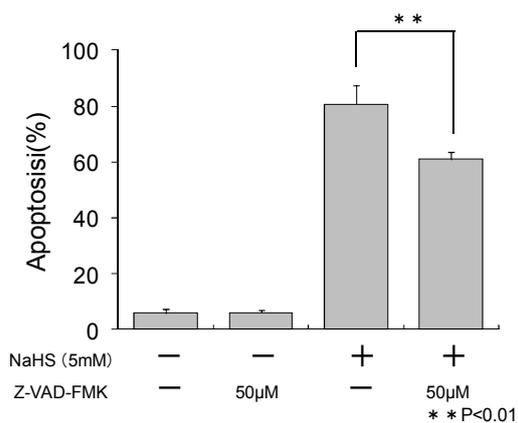
**Fig.3 JC-1によるミトコンドリア膜電位の変化** \*倍率 ×200  
 JC-1 10 $\mu$ Mを加え、10分間静置した。その後PBSでwashし、NaHS 5mMを曝露させた。曝露直後から蛍光顕微鏡を用いてミトコンドリア膜電位の変化を観察した。  
 a~c: 生細胞のミトコンドリアに取り込まれたJC-1の赤色蛍光  
 d~f: アポトーシスを起こした細胞の細胞質中で発する緑色蛍光



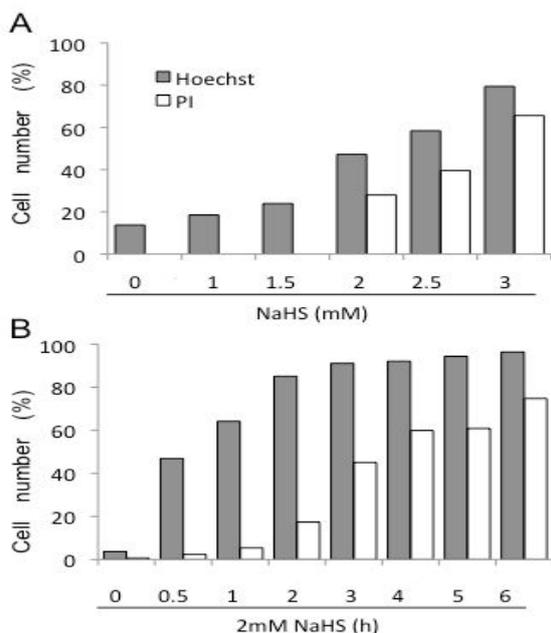
**Fig.4 活性酸素種の細胞死への影響の検討** \*倍率 ×200  
 (A): O<sub>2</sub>の産生の確認。Dihydroethidium 20 $\mu$ Mを加え、10分間静置した。その後PBSでwashし、NaHS 5mMを曝露させた。曝露直後から蛍光顕微鏡を用いてO<sub>2</sub>の産生を確認した。(B): Glutathione (C): N-Acetyl-L-Cysteine (D): Tiron<sup>®</sup>による細胞死への影響。  
 Glutathione 50 $\mu$ M、N-Acetyl-L-Cysteine 50 $\mu$ M、Tiron<sup>®</sup> 2.5mMを加え、30分間、1時間、30分間静置した。その後PBSでwashし、NaHS 5mMを15時間曝露させた。アポトーシス率はHoechst33342により染色された細胞を総数とし、核が凝集した細胞の割合を算出した。(E): Trolox<sup>®</sup>による細胞死への影響。Trolox<sup>®</sup> 100 $\mu$ Mを加え、30分間静置した。その後PBSでwashし、NaHS 5mMを15時間曝露させた。a~c: 位相差 d~f: Hoechst33342 a, d: control b, e: NaHS 5mM c, f: Trolox 100 $\mu$ M+NaHS 5mM



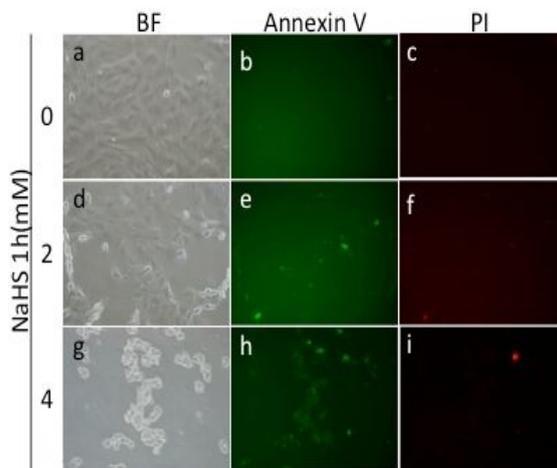
**Fig.5 Cytochrome C 遊離の検討**  
NaHS 5mM 15 時間による Cytochrome C 漏出。  
COX IVは Mitochondria 画分のマーカー。



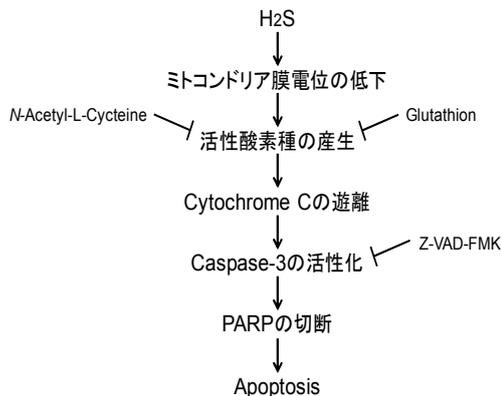
**Fig.6 Caspase 阻害剤による細胞死への影響**  
Z-VAD-FMK 50μM による細胞死への影響。



**Fig.7 H<sub>2</sub>S による肺胞上皮細胞における形態変化**  
(A): NaHS 1-3mM 1 時間曝露における細胞の形態変化  
および、Hoechst33342 による核の凝集、PI 染色による  
アポトーシス細胞の観察。(B): NaHS 2mM 0-6 時間曝  
露における細胞のアポトーシス率。



**Fig.8 H<sub>2</sub>S による肺胞上皮細胞における細胞膜構造の変化**  
NaHS 0-4mM 1 時間曝露における細胞の膜構造  
の変化を AnnexinV により観察。



**Fig.9 H<sub>2</sub>S による心筋細胞におけるアポトーシス誘導経路**

NaHS 曝露直後からミトコンドリア膜電位の低下が  
起こり、曝露 1 時間後から活性酸素種の産生が始ま  
る。その後 Cytochrome C 遊離が起こり、Caspase-3  
の活性化、PARP の切断が起こりアポトーシスを引き  
起こす。