

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08136

研究課題名(和文) 高求核活性イオウ分子による血管レドックス制御と動脈硬化進展抑制への応用

研究課題名(英文) Role of reactive sulfur species in vascular redox regulation and inhibition of arteriosclerosis

研究代表者

芦野 隆 (Ashino, Takashi)

昭和大学・薬学部・准教授

研究者番号：00338534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：レドックスバランス破綻による酸化ストレスは、血管平滑筋細胞(VSMC)の機能障害を引き起こし、動脈硬化の発症と進展の原因となる。本研究では、強い抗酸化作用を有する活性イオウ分子に着目し、VSMCの機能調節における役割について検討した。その結果、活性イオウ分子が血小板由来増殖因子により生成した活性酸素の消去機能を介して、下流のシグナル伝達因子Aktの活性化と細胞接着斑の形成を抑制することで、VSMCの遊走を制御することを見出した。これらの成果は、活性イオウ分子が血管傷害後の内膜肥厚と動脈硬化に対する治療ターゲットとなる可能性を示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈硬化は、酸化ストレスが関与し、心筋梗塞や脳梗塞など、生命予後に直結する重大な病気の引き金となることから、その克服は世界中で重要な課題となっている。本研究では、強い抗酸化能を持つ活性イオウ分子が、活性酸素の消去を介して細胞内環境を維持することで、動脈硬化の発症に関与する血管平滑筋細胞の過剰な遊走を抑制することを明らかにした。これらの成果は、動脈硬化の治療法開発に貢献する可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Excess reactive oxygen species (ROS)-induced vascular smooth muscle cell (VSMC) hypermigration contributes to the development of arteriosclerosis. We demonstrated that intracellular sulfane sulfur donors inhibited the migration of VSMCs in response to PDGF. Specifically, PDGF increased the levels of cellular ROS, which were decreased by sulfane sulfur donors. Further, such molecules inhibited PDGF-induced activation of Akt and formation of focal adhesions. These findings suggest that sulfane sulfurs regulate ROS-dependent PDGF signaling, which may contribute to PDGF-induced migration of VSMCs.

研究分野：分子毒性学

キーワード：動脈硬化 血管平滑筋細胞 活性酸素 活性イオウ分子 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

活性酸素 (ROS) は生命活動において、シグナル伝達因子として細胞機能を制御している。ROS は血管組織においても、血管平滑筋細胞 (VSMC) のセカンドメッセンジャーとして機能し、遊走や増殖を調節することで、傷害血管の修復に寄与している。一方で、ROS の過剰かつ持続的な産生による酸化ストレスは、VSMC を形質転換させ、細胞機能を障害することで、過剰な遊走や増殖による内膜肥厚を引き起こし、動脈硬化へと進展させる。

硫化水素 (H_2S) は、一酸化窒素、一酸化炭素に次ぐ第3のガス状メディエーターとして注目され、細胞保護作用、血管機能調節作用などが報告されたが、その作用メカニズムは長い間不明であった。近年、 H_2S の作用本体は、細胞内で反応生成したシステインパースルフィド (Cys-S-Sn-SH) などの高い求核性を持つ『活性イオウ分子』であり、 H_2S による細胞保護作用は、この活性イオウ分子を経由した抗酸化作用であることが示唆されている。また活性イオウ分子は、生体内においても酵素的 (シスタチオニン γ-リアーゼ: CSE など) に合成されていることが明らかとなり、新たな生体防御システムとして注目が集まっている。

2. 研究の目的

血管組織におけるレドックスバランスの破綻は、VSMC の機能不全を引き起こし、動脈硬化の原因となる血管の内膜肥厚を進行させる。これまで研究代表者は、血管恒常性維持におけるレドックスバランスの重要性に注目し、主要な酸化ストレス防御システムである転写因子 Nrf2 が、VSMC の遊走・増殖を制御することで血管内膜肥厚を抑制することを明らかにしてきた。その血管組織における抗酸化システムの役割について解析を進める過程で、VSMC の遊走/増殖を惹起する血小板由来増殖因子 (PDGF) の刺激により、ROS の増加に伴い、活性イオウ分子が高発現する事実をつかんだ。高い求核性を持つ活性イオウ分子は、その強い抗酸化能およびレドックスシグナル制御能から、新たな生体防御システムとして期待されている。これは、血管においても活性イオウ分子がレドックス制御因子として機能していることを示唆している。しかし、活性イオウ分子による血管のレドックス制御と動脈硬化進展における役割は明らかにされていない。

そこで本研究は、活性イオウ分子による血管系の新たなレドックス制御システムとしての役割を解明し、動脈硬化の治療法開発への展開を目指すことを目的とした。そのために血管傷害後の内膜肥厚に関与する VSMC を用いて、活性イオウ分子による VSMC 機能制御と、血管傷害後の内膜肥厚抑制機能の解明を到達目標に、① VSMC における ROS の産生・消去における活性イオウ分子の役割、② PDGF 刺激による VSMC の遊走および増殖における活性イオウ分子の役割、③ 活性イオウ分子による PDGF シグナル伝達系の制御、④ PDGF 刺激による細胞接着斑形成における活性イオウ分子の役割について検討した。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ラット大動脈平滑筋細胞 (RASM 細胞) は、雄性 Sprague-Dawley ラット胸部大動脈からコラゲナーゼ/エラスターゼ溶液を用いた酵素消化法により単離した。RASM 細胞は、10%ウシ血清含有 DMEM 培地で培養し、使用 24 時間前に、血清非含有 DMEM 培地に交換した。

(2) 細胞内活性イオウ分子 (サルフェンイオウ) 検出法

サルフェンイオウ解析用プローブ SSP4 で細胞を処理し、一定時間後に共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡を用いて観察した。

(3) Modified Boyden chamber アッセイ法

細胞のケモタキシスは、8 μm ポアサイズのトランスウェルチャンバーを用いた。チャンバー上方に細胞を播種し、PDGF をチャンバー下側に処置し、8 時間後の遊走細胞数を計測した。

(4) 細胞内 ROS 検出法

ROS 用蛍光プローブおよび Hoechst 33342 で細胞を処理し、一定時間後に共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡を用いて観察した。

(5) Rac1 activity assay

細胞可溶化液に含まれる活性型 Rac1 を、活性型 Rac1 (Rac-GTP) のみが特異的に結合する GST 結合 PAK-1 タンパク質結合領域ペプチドを用いて、pull-down した。その後、Western blot 法に

より、Rac1 を検出した。

(6) ウェスタンブロット法

4%SDS 溶液に可溶化した細胞サンプルを SDS-PAGE 後、PVDF メンブランに転写した。各タンパク質は、酵素抗体化学発光法に基づき検出した。

(7) 培養細胞の蛍光免疫染色法

細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、0.05%トライトン X-100 で処理した。3%ウシ血清アルブミンでブロッキング後、1 次抗体で一晩処置した。PBS で洗浄後、蛍光標識された 2 次抗体で 1 時間処理し、対比染色として DAPI 溶液による核染色を行った。細胞の観察は、共焦点レーザー顕微鏡で行った。

4. 研究成果

(1) VSMC における PDGF 刺激による活性イオウ分子の増加

ラットから単離した RASM 細胞に VSMC 遊走を惹起する PDGF を処置すると、サルフェンイオウプローブ SSP4 の蛍光強度が有意に増加した。VSMC への PDGF 刺激により活性イオウ分子が増加することが示唆されたことから、PDGF の応答制御における活性イオウ分子の関与が示唆された。

(2) 活性イオウ分子による PDGF 誘発 VSMC 遊走の制御

RASM 細胞への VSMC 刺激により活性イオウ分子が増加したことから、PDGF による VSMC 遊走に対して活性イオウ分子が機能的役割を果たすか、トランスウェルを用いた遊走アッセイ (Modified Boyden chamber assays) による検討を行った。その結果、活性イオウドナーである donor 5a および Na₂S₄ の処置により、PDGF による VSMC 遊走を濃度依存的に抑制した。一方、PDGF による VSMC 増殖には、活性イオウドナーの影響は認められなかった。これらの結果から、活性イオウ分子は、PDGF による VSMC 遊走を制御していることが示唆された。

(3) 活性イオウ分子による PDGF 誘発 ROS 産生の制御

ROS はシグナル伝達分子として機能し、血管内膜肥厚の原因となる VSMC の遊走を促進させる。そこで次に、PDGF 刺激による VSMC 内の ROS レベル変動における活性イオウ分子の関与について検討を行った。RASM 細胞への PDGF 刺激により、細胞内の ROS レベルは 30 分後に有意に増加した。一方で、その ROS の増加は、活性イオウドナーである donor 5a および Na₂S₄ の処置により抑制された。

VSMC において、PDGF 刺激により増加する ROS の主な生成源は NAD(P)H oxidase であり、その活性化には酵素複合体サブユニットの会合が要求され、Rac1 GTPase の活性化によりコントロールされている。そこで、Rac1 活性化における活性イオウ分子の関与について検討したが、RASM 細胞へ PDGF 刺激による Rac1 活性上昇に活性イオウドナーの抑制作用は認められなかった。

これらの結果から、活性イオウ分子は ROS の生成には関与せずに、消去能を有することが示唆された。

(4) PDGF シグナル伝達経路における活性イオウ分子の役割

PDGF シグナルは、PDGF 受容体のリン酸化と、それに引き続く分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAP キナーゼ) や Akt のリン酸化を介して伝達される。そこで、PDGF シグナル伝達における活性イオウ分子の役割について検討した。その結果、活性イオウドナーである donor 5a および Na₂S₄ の処置により PDGF による Akt のリン酸化が有意に抑制された。一方、PDGF による PDGF 受容体の自己リン酸化および MAP キナーゼリン酸化の活性イオウドナーによる抑制は認められなかった。

(5) PDGF による細胞接着斑形成における活性イオウ分子の役割

VSMC の遊走には、細胞接着斑の形成が必要となる。そこで、遊走過程において重要な役割を担っている細胞接着斑の構成分子ビンキュリンおよびパキシリンを免疫染色し、細胞接着斑の形成に活性イオウ分子が関与するか検討した。その結果、活性イオウドナーにより PDGF によるビンキュリンとパキシリンのリーディングエッジへの移行が抑制された。以上の結果から、活性イオウ分子が、細胞遊走に必須である細胞接着斑の形成を阻害することが示唆された。

本研究は、VSMC の遊走に必要な接着斑の形成に関与する PDGF 依存性 ROS-Akt 経路の調節に関連する活性イオウ分子の新たな効果を明らかにした。これらの結果は、活性イオウ分子が VSMC における ROS レベルの調節因子として、血管の恒常性に重要な役割を果たしていることを示唆している。これらの本課題の成果は、活性イオウ分子をターゲットにした虚血性心疾患の予防や治療法の探索に貢献できると考える。さらに、活性イオウ分子は脳、肝臓、心臓などの臓器にも存在していることから、ROS レベルと細胞遊走の調節不全に関連する血管形成術後の再狭窄、糖尿病、がんなどの治療にも応用できる可能性を提供するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Natsumi Hattori-Usami, Asuka Kaizaki-Mitsumoto, Takashi Ashino, Masayuki Yamamoto, Satoshi Numazawa	4. 巻 48
2. 論文標題 Toxicity manifestations and sex differences due to MARTA olanzapine	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 191-202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.48.191	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 Takashi Ashino, Yuki Nakamura, Hirokazu Ohtaki, Yoichiro Iwakura, Satoshi Numazawa	4. 巻 374
2. 論文標題 Interleukin-6 regulates the expression of hepatic canalicular efflux drug transporters after cecal ligation and puncture-induced sepsis: A comparison with lipopolysaccharide treatment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Toxicology Letters	6. 最初と最後の頁 40-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.toxlet.2022.12.003	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 Shunichi Ishii, Takashi Ashino, Hiroki Fujimori, Satoshi Numazawa	4. 巻 55
2. 論文標題 Reactive sulfur species inhibit the migration of PDGF-treated vascular smooth muscle cells by blocking the reactive oxygen species-regulated Akt signaling pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 186-197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2021.1887485	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 Yoshitaka Yamazaki, Mikako Terashima-Hasegawa, Atsufumi Manabe, Toshikazu Shiba, Yumi Kawazoe, Takashi Ashino, Masahiro Hosonuma, Satoshi Numazawa	4. 巻 8
2. 論文標題 Inorganic polyphosphate modulates leukocyte accumulation and vascular endothelial cell permeability and ameliorates cecal ligation and puncture-induced lethality	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 89-96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/fts.8.89	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 芦野 隆	4. 巻 81
2. 論文標題 酸化ストレス関連疾患における薬物代謝酵素シトクロムP450発現制御	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 昭和学会雑誌	6. 最初と最後の頁 387-394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14930/jshowaunivsoc.81.387	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 Miyoshi Tatsuro, Keller Brian C., Ashino Takashi, Numazawa Satoshi	4. 巻 18
2. 論文標題 Noncanonical mechanism of Nrf2 activation by diacylglycerol polyethylene glycol adducts in normal human epidermal keratinocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0291905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0291905	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 Ashino Takashi, Nakamura Yuki, Ohtaki Hirokazu, Iwakura Yoichiro, Numazawa Satoshi	4. 巻 117
2. 論文標題 Downregulation of the gene expression of Cyp2c29 and Cyp3a11 by cecal ligation and puncture-induced sepsis is associated with interleukin-6	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	6. 最初と最後の頁 110039
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.intimp.2023.110039	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 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 芦野 隆, 赤池 哉太, 千葉 莉沙子, 山本 雅之, 沼澤 聡
2. 発表標題 5-フルオロウラシル誘発骨髄抑制におけるNrf2酸化ストレス応答系の役割
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 篠内 良介, 佐々木 晶子, 柴田 佳太, 古林 創史, 芦野 隆, 高木 孝士, 辻 まゆみ, 木内 祐二, 野部 浩司
2. 発表標題 メカニカルストレスによる化学療法誘発性末梢神経障害モデルマウスの皮膚構造改善効果の検討
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 芦野 隆, 石井 俊一, 沼澤 聡
2. 発表標題 血小板由来増殖因子による血管平滑筋細胞遊走におけるサルフェンイオウの役割
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 篠内 良介, 佐々木 晶子, 柴田 佳太, 古林 創史, 芦野 隆, 坂井 信裕, 山口 真帆, 佐藤 ゆり絵, 細沼 雅弘, 高木 孝士, 辻 まゆみ, 野部 浩司, 木内 祐二
2. 発表標題 化学療法誘発性末梢神経障害 (CIPN) モデルマウスを用いたハンドセラピー施術による神経障害改善効果の解明
3. 学会等名 第53回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村崎 帆乃香, 篠内 良介, 佐々木 晶子, 柴田 佳太, 古林 創史, 芦野 隆, 坂井 信裕, 山口 真帆, 佐藤 ゆり絵, 細沼 雅弘, 高木 孝士, 辻 まゆみ, 野部 浩司, 木内 祐二
2. 発表標題 化学療法誘発性末梢神経障害 (CIPN) モデルマウスを用いたハンドセラピー施術による神経障害改善機序の検討
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 芦野 隆, 中村 祐輝, 大滝 博和, 岩倉 洋一郎, 沼澤 聡
2. 発表標題 敗血症モデルマウスを用いた肝シトクロム450遺伝子発現低下におけるインターロイキン-6の役割
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ashino T, Ishii S, Numazawa S
2. 発表標題 Inhibitory role of reactive sulfur species in PDGF-induced vascular smooth muscle cell migration
3. 学会等名 10th International Congress of Asian Society of Toxicology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 芦野 隆, 中村 祐輝, 大滝 博和, 岩倉 洋一郎, 沼澤 聡
2. 発表標題 盲腸結紮穿刺誘発敗血症による肝薬物トランスポーター遺伝子発現低下におけるインターロイキン-6の関与
3. 学会等名 フォーラム2023: 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡辺 佳愛子, 篠内 良介, 佐々木 晶子, 柴田 佳太, 古林 創史, 芦野 隆, 辻 まゆみ, 木内 祐二, 野部 浩司
2. 発表標題 メカニカルストレス付与による化学療法誘発性末梢神経障害モデルマウスにおけるオキシトシン発現の解析
3. 学会等名 第149回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 芦野 隆, 千葉 莉沙子, 村田 百奈美, 柴田 佳太, 野部 浩司, 岩倉 洋一郎, 沼澤 聡
2. 発表標題 NAFLD/NASHによる炎症性サイトカイン非依存的シトクロムP450遺伝子発現低下
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

昭和大薬学部基礎医療薬学講座毒物学部門ホームページ https://www.showa-u.ac.jp/education/pharm/major/toxicol.html 昭和大薬理科学研究センターホームページ https://www.showa-u.ac.jp/research/prc/
--

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

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