

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700434

研究課題名（和文） 認知症患者死後脳を用いた硫化水素の動態解析研究

研究課題名（英文） Analysis of dynamics of hydrogen sulfide in the brain

研究代表者

渋谷 典広（SHIBUYA NORIHIRO）

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 神経薬理研究部・室長

研究者番号：40466214

研究成果の概要（和文）：近年、生理活性物質硫化水素（H<sub>2</sub>S）が注目されている。本研究では、認知症におけるH<sub>2</sub>Sの動態を解析し、その治療法開発の基盤構築を目指した。大脳皮質におけるH<sub>2</sub>Sの貯蔵量を測定した結果、アルツハイマー型変化群（ADC）に異常は認められなかったが、老人斑優位型変化群（PSC）については、貯蔵量が低下している傾向が認められた。H<sub>2</sub>Sの生産酵素及び代謝酵素を定量したところ、PSCでは代謝酵素の存在量が増加しており、ADCおよびPSCともにH<sub>2</sub>Sを用いた治療法の開発は原理的に可能であることが示唆された。なお、生産酵素を解析する過程で、新たな生産経路を見出した。

研究成果の概要（英文）：Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) has been recognized as a neuromodulator as well as a cytoprotectant. Recent evidences from in vitro studies has raised the possibility that H<sub>2</sub>S is used for treatment for alzheimer's disease. The levels of bound sulfane sulfur, a storage form of H<sub>2</sub>S, in Alzheimer disease type change (ADC) and pathological senile change (PSC) were comparable to those in minimal senile change. Although the expression of H<sub>2</sub>S-producing enzymes was unchanged in ADC and PSC, sulfur dioxygenase, a H<sub>2</sub>S-metabolizing enzyme, was increased in PSC. These observations suggest that H<sub>2</sub>S has a therapeutic potential for alzheimer's disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,400,000	420,000	1,820,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：認知症・硫化水素

## 1. 研究開始当初の背景

近年、生理活性物質としての硫化水素（H<sub>2</sub>S）が注目されている。H<sub>2</sub>Sには神経伝達調節作用や神経細胞保護作用があり、H<sub>2</sub>Sを疾患治療に応用する研究が進行中である。H<sub>2</sub>Sには

抗酸化ストレス作用・抗炎症作用・抗アポトーシス作用等も確認されている。それ故、H<sub>2</sub>Sは神経変性疾患の治療に有効と考えられており、なかでも難治例の多い認知症への応用が期待されている。

しかし、その一方で、脳内の  $H_2S$  濃度がクリアランス異常によって高まり、高濃度の  $H_2S$  に慢性的に曝露されることで脳障害が惹起されるとの報告がある。高濃度の  $H_2S$  は、呼吸鎖系酵素複合体の阻害や神経伝達抑制などの毒性を示すことから、 $H_2S$  を利用した治療方法を開発するためには、クリアランス評価が不可欠である。しかし、この点に関しては国内・国外を問わず報告されておらず、 $H_2S$  を利用することの妥当性は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、認知症の新規治療法開発を目指し、死後脳を用いた  $H_2S$  の動態に関する検討を行うとともに、 $H_2S$  の標的因子を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 内在性 $H_2S$ の定量

生体内で生産された  $H_2S$  は、タンパク質のシステイン残基と結合することで、「結合型硫黄」として貯蔵される。そこで、結合型硫黄を定量することで、脳内における  $H_2S$  の曝露状況を調査した。具体的には、結合型硫黄は、還元条件下で  $H_2S$  を放出するため、脳抽出液にジチオスレイトールを添加し、 $37^\circ C$  で50分間保温することで遊離する  $H_2S$  をガスクロマトグラフィーで定量した。

$H_2S$  は、電子伝達系酵素複合体内の鉄硫黄クラスターの生合成に関与すると考えられている。この鉄硫黄クラスターが、内在性  $H_2S$  の利用形態の一つである可能性を考慮し、クラスター内の硫黄含量を測定した。具体的には、鉄硫黄クラスターは酸性条件下で  $H_2S$  を放出するため、脳抽出液にトリクロロ酢酸を添加し、 $37^\circ C$  で30分間保温することで放出される  $H_2S$  を酸不安定型硫黄としてガスクロマトグラフィーで定量した。

### (2) 生産酵素及び代謝酵素の定量

脳内における  $H_2S$  の生産酵素及び代謝酵素はウエスタンブロット法で検出した。得られたシグナル強度は、デンシトメーターで定量し数値化した。

なお、 $H_2S$  生産酵素として、3-メルカプトピルビン酸サルファートランスフェラーゼ (3MST) およびシスタチオニン  $\beta$  シンターゼ (CBS)、3MST の基質生産酵素として、システインアミノトランスフェラーゼ (CAT)、 $H_2S$  代謝酵素として、サルファジオキシゲナーゼ (ETHE1) を定量対象とした。

### (3) 死後脳のグループ化

Braak らのステージ分類に基づき、神経原線維変化ステージ及び老人斑ステージを組み合わせた以下の3群にグループ化した。

#### ①微小変化群 (Minimal senile change, MSC)

=神経原繊維変化：ステージ 1-2、老人斑：ステージ 0-A

②アルツハイマー型変化群 (Alzheimer disease type change, ADC) =神経原繊維変化：ステージ 6、老人斑：ステージ C

③老人斑優位型変化群 (Pathological senile change, PSC) =神経原繊維変化：ステージ 1-2、老人斑：ステージ B-C

#### (4) 統計解析

2群間の比較には t 検定を行い、3群間の比較には一元配置分散分析法を用いた。

#### (5) 倫理面への配慮

本研究の対象は死後脳検体であることから、死の尊厳への配慮と篤志ご遺族への敬意を前提に取り扱った。また、研究結果が篤志ご遺族へ不利益と危険性を及ぼすことのないよう、十分な配慮を払い遂行した。

## 4. 研究成果

(1)  $H_2S$  の脳内における貯蔵量を調べるため、アルツハイマー型変化群 (ADC; n=14) 及び対象として微小変化群 (MSC; n=16) の結合型硫黄 (nmol/mg protein  $\pm$  S.D.) を定量した結果、それぞれ  $0.544 \pm 0.037$  及び  $0.545 \pm 0.036$  であり、両群間の差は有意ではなかった。また、酸不安定型硫黄 (nmol/mg protein  $\pm$  S.D.) を定量した結果、それぞれ  $0.322 \pm 0.018$  及び  $0.304 \pm 0.012$  であり、両群間の差は有意ではなかった。

次に、ADC とは背景病理の異なる老人斑優位型変化群 (PSC; n=4) について結合型硫黄含量 (nmol/mg protein  $\pm$  S.D.) を新たに測定したところ、 $0.542 \pm 0.031$  であった。一方、MSC (n=5) 及び ADC (n=5) における結合型硫黄含量 (nmol/mg protein  $\pm$  S.D.) は、それぞれ  $0.718 \pm 0.028$  及び  $0.678 \pm 0.074$  であった。3群間における差は有意ではなかったが、PSC において結合型硫黄含量が低下している傾向が認められた。

MSC, ADC, PSC の酸不安定型硫黄含量 (nmol/mg protein  $\pm$  S.D.) については、それぞれ  $0.399 \pm 0.021$ ,  $0.454 \pm 0.040$ ,  $0.313 \pm 0.019$  であり、CTL との差は有意ではなかったが、PSC において比較的 low 濃度の酸不安定型硫黄が検出された。

ADC 及び PSC の脳内において  $H_2S$  の生産系または代謝系に変化が生じているかを調べるため、生産酵素 3MST 及び CBS、3MST の基質生産酵素 CAT、代謝酵素 ETHE1 を定量した。ADC における 3MST, CBS, ミトコンドリア型 CAT, サイトゾル型 CAT, ETHE1 の含量は、MSC のそれぞれ 1.08 倍, 0.62 倍, 0.73 倍, 1.09 倍, 1.01 倍であった。一方、PSC における 3MST, CBS, ミトコンドリア型 CAT, サイトゾル型 CAT, ETHE1 の含量は、MSC のそれぞれ 1.17

倍, 0.96 倍, 0.99 倍, 1.16 倍, 1.25 倍であり、PSC においては 3MST の増加に加えて ETHE1 の増加が認められ、PSC における硫黄含量の低下は ETHE1 の増加に起因している可能性が示唆された。

以上までの H<sub>2</sub>S の生産・貯蔵・代謝に関する生化学的解析の結果、ADC 及び PSC においては健常脳と同等のクリアランス能が維持されていると判明した。H<sub>2</sub>S には認知症の治療及び予防の観点から効果を発揮し得る作用が *in vitro* で確認されていることから、生体への影響や投与形態の検討など臨床応用を指向した研究・開発が求められる。

本研究の開始当初は、H<sub>2</sub>S のクリアランス異常によって認知症内の貯蔵量が増加していた場合には、おもに毒性の観点から硫化水素の標的因子を同定する予定であった。その際、脳抽出液から標的因子を回収する方法を新規に考案したが、その後試みたところ、おもに収率の観点から同定を行うには不十分であると判明した。今後、硫化水素の動態をより詳細に解明するため、収率を向上させるための別法を確立することが新たな課題となった。

(2) 上述の通り、生体には H<sub>2</sub>S の生産酵素が存在する。現在までに、CBS、シスタチオンγ-リアーゼ (CSE)、3MST-CAT が知られていたが、これらはいずれも L-システインを基質とする。ところが、生産酵素に関する生化学的解析を進める過程において、L-システインのネガティブコントロールとして用いた D-システインからも H<sub>2</sub>S が生産されることを見出した (図 1)。

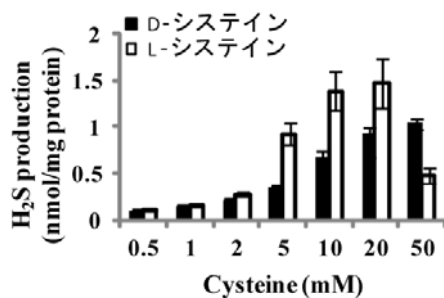


図 1 脳内における H<sub>2</sub>S 生産活性

その後の検討から、D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) が D-システインから 3MST の基質である 3-メルカプトピルビン酸 (3MP) を供給することが判明した (図 2)。L-システインから H<sub>2</sub>S を生産する経路は、脳・肝臓・腎臓・膵臓・血管等に広く分布するが、D-システイン経路は脳及び腎臓で認められた。脳では、おもに小脳で活性が認められ、L-システイン経路と比較すると、約 7 倍の活性を示した。腎臓においては、L-システインの約 80 倍の活性を示し、その特異な生産能力が示された。

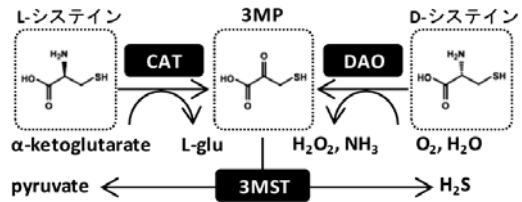


図 2 システインからの H<sub>2</sub>S 生産経路

3MST の基質である 3MP は DAO と CAT によって、それぞれ D-システインと L-システインから供給される。

H<sub>2</sub>S には神経細胞を保護する作用が確認されている。そこで、過酸化水素誘発性の小脳初代神経培養細胞に対する酸化ストレスに対する D-システインの効果を調べた結果、L-システインと同程度の細胞保護効果が示された。さらに、D-システインに関しては、L-システインよりも効果的に細胞を保護することも判明した (図 3)。

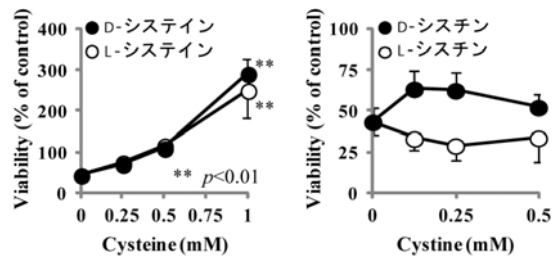


図 3 過酸化水素誘発性酸化ストレスにおけるシステイン及びシスチンの細胞保護効果

H<sub>2</sub>S には虚血再還流障害を減弱することも知られている。そこで、腎臓虚血再還流障害に対する D-システインの効果を調べたところ、L-システインよりも効率的に再還流障害を減弱できることが新たに判明した (図 4)。

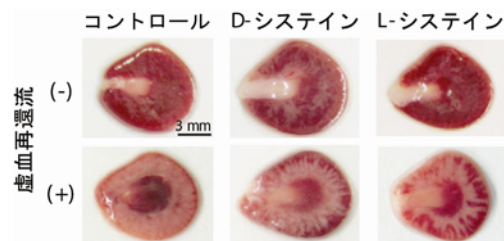


図 4 D-システインによる腎虚血再還流障害の減弱効果 D-システイン群では、皮質がホルマザン色素で染色され、細胞活性が維持されていた。

減弱効果はともに腎皮質において認められるが、D-及び L-システイン経路が同部位に局在することと矛盾しない。組織学的な解析では、D-システイン群では糸球体の構造が保護されているのに対して、L-システイン群で

は糸球体が萎縮しており、ボーマン嚢との間隙が認められた (図 5)。

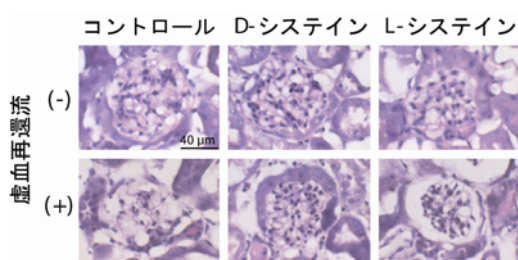


図 5 D-システインによる腎虚血再還流障害の減弱効果 D-システイン群では、糸球体の構造が維持されていたが、L-システイン群では、糸球体が萎縮しボーマン嚢との間隙が認められた。

D-システインを投与すると、小脳及び腎臓の結合型硫黄含量が増加し、その効果は L-システインよりも高いことを考慮すると、D-システインが  $H_2S$  の貯蔵型である結合型硫黄を供給することで細胞保護効果を発揮しているものと推察される。

#### 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)

[雑誌論文] (計 5 件)

- (1) 渋谷典広、木村英雄、生理活性物質としての硫化水素、DOJIN NEWS、査読無、Vol. 146、2013、1-6
- (2) Mikami Y, Shibuya N, Ogasawara Y, Kimura H, Hydrogen sulfide is produced by cystathionine  $\gamma$ -lyase at the steady-state low intracellular  $Ca^{2+}$  concentrations、Biochemical and Biophysical Research Communications、査読有、Vol. 431、2013、131-135  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.01.010
- (3) Shibuya N、Koike S、Tanaka M、Ishigami-Yuasa M、Kimura Y、Ogasawara Y、Fukui K、Nagahara N、Kimura H、A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells、Nature Communications、査読有、Vol. 4、2013、1366-1366  
DOI: 10.1038/ncomms2371
- (4) 渋谷典広、木村英雄、硫化水素 ( $H_2S$ ) の基礎、LiSA、査読無、Vol. 19、2012、1284-1289
- (5) Kimura H, Shibuya N、Kimura Y、Hydrogen sulfide is a signaling molecule and a cytoprotectant、査読有、Vol. 17、2012、45-57  
DOI: 10.1038/ncomms2371

[学会発表] (計 7 件)

- (1) 渋谷典広、マウスにおける生理活性物質  $H_2S$  の生産経路、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 23 日、福岡国際会議場 (福岡県)
- (2) Norihiro Shibuya、Another pathway to produce  $H_2S$  in the brain、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 16 日、福岡国際会議場 (福岡県)
- (3) 渋谷典広、マウス脳における  $H_2S$  の生産酵素、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 21 日、名古屋国際会議場 (愛知県)
- (4) 渋谷典広、マウス脳における硫化水素の生産経路、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 15 日、国立京都国際会館 (京都府)
- (5) 渋谷典広、マウス脳における新規の  $H_2S$  生産経路、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 24 日、国立京都国際会館 (京都府)
- (6) 渋谷典広、脳における硫化水素生産経路の探索、第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 16 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- (7) 渋谷典広、マウス脳における新規の  $H_2S$  生産経路、第 7 回 D-アミノ酸研究会学術講演会、2011 年 9 月 9 日、東京医科歯科大学 (東京都)

[その他]

新聞報道

- (1) 硫化水素が臓器を守る - 医療への応用研究進む. 読売新聞 (近畿・中国・四国版) 科学 MONDAY, 3. 4, 2013
- (2) 臓器を保護する硫化水素に第 4 の生合成経路 - 腎疾患治療への応用に期待. 医療・介護 CB ニュース, 2. 4, 2013
- (3) 様々な組織保護機能をもつ硫化水素. 科学新聞, 2. 1, 2013

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

渋谷 典広 (SHIBUYA NORIHIRO)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 神経薬理研究部・室長  
研究者番号: 40466214