

## 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 13 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791718

研究課題名（和文）硫化水素による神経細胞保護の可能性-初代神経細胞での検討-

研究課題名（英文）Neuroprotection using hydrogen sulfide donors :  
in the mice primary cultured neurons

研究代表者

神里 興太 (KAMIZATO KOTA)

琉球大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10554454

研究成果の概要（和文）：

対麻痺は胸部大動脈手術の重要な術後合併症であるが、その病態は解明されていない。今回、初代海馬神経細胞を用いて虚血再灌流後の硫化水素による神経保護作用のメカニズムに関する研究を行った。

硫化ナトリウムおよび GYY4137 を硫化水素ドナーとして使用した。しかしながら、治療濃度においても培養神経細胞に対する保護作用は弱かった。硫化水素で誘導されるタンパク質同定を DNA マイクロアレイにより網羅的に行った。しかし、アレイの結果では系統だって遺伝子の変化がおこっている事が確認できなかった。

研究成果の概要（英文）：

Paraplegia is a severe complication after the surgery of thoracic aorta aneurysm. But the mechanism is unknown. We performed a study on mechanism of the neuroprotection with hydrogen sulfide after spinal cord ischemia, using the mice primary cultured neurons.

We used sodium sulphide and GYY4137 as a hydrogen sulfide donor. However, the effect of neuroprotection for cultured neurons was weak. We seek the protein signals in the neurons with hydrogen sulfide attaching (sodium sulphide and GYY4137) by DNA micro array. However, no significant change was confirmed by DNA micro array.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

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：神経保護、硫化水素、対麻痺

## 1. 研究開始当初の背景

胸部下行大動脈遮断による脊髄虚血は、胸腹部大動脈手術後の最も悲惨な合併症である対麻痺を来しそれは患者および家族の生活に多大な損害を与える。血管外科手術で最も困難な領域であるため、現在でもその予防ならびに治療に関して世界中で様々な研究が行われている。しかし、血管外科医および麻酔科医はこの合併症の予防および治療について様々な手段を講じているが、その発生

率はいまだ約 5-30%と報告されており、いまだ解決できない領域となっている。

## 2. 研究の目的

### <マウス脊髄虚血モデルと遅発性対麻痺>

我々は、Lang-Lazdunski らの報告(Stroke 2000) したマウス脊髄虚血モデルを改良し、マウスを用いた大動脈遮断脊髄虚血モデルを確立した。このマウス脊髄虚血モデルは、人工呼吸下に左内頸動脈起始部と左鎖骨下動脈起始部との間で大動脈弓部を遮断するモデルである。我々のモデルでは 4-6 分間の大動脈遮断で虚血後 24 時間に歩行可能であるにもかかわらず、48 時間目には対麻痺となる遅発性対麻痺を来すことが判明した。我々は、マウス脊髄虚血モデルをもちいて虚血を行った後、低濃度の硫化水素を吸入させること遅発性麻痺の発生を強力に抑制できることを見出した(Stroke 2011)。さらに最近、Caspase 3 ノックアウトマウスで脊髄虚血実験を行ったところ、この遅発性対麻痺は発症しなかった(Stroke 2011)。つまり、このマウス脊髄虚血モデルにおける遅発性対麻痺は、主として脊髄神経細胞のアポトーシスを介するものであることが判明し、さらに硫化水素によってアポトーシスが抑制される可能性が強く示唆された。

そのため、マウス神経細胞のアポトーシスにおける硫化水素の保護の効果についてより詳細な検討をおこなう必要があると考えた。

### <硫化水素と臓器保護>

最近、硫化水素による臓器保護に関する報告が多く認められる。腎保護作用や心筋保護作用についての報告もあり、その機序として、様々な機序が示されている。神経細胞に関する報告も散見され、glutathione(Kimura 2004)を介した機序などが指摘されているが明確な機序は明らかになっていない。そのため、網羅的な遺伝子解析が必要であると考えた。

## 3. 研究の方法

### (1)低酸素暴露後の神経細胞に対する硫化水素の効果

#### ①海馬初代神経細胞培養:

雌性 C57/BL6 系マウスから空気+イソフルランによる全身麻酔下に胎生 18 日の胎仔を外科的に取り出し、脳組織を摘出する。摘出した脳組織から海馬を同定し、海馬のみを摘出する。

トリプシン処理及び DNAase 処理を行ない Poly-L-Lysine および Laminine 処理を行ったディッシュ(グラスボトム、6well および 96well)内にて培養を行う (Neurobasal Medium に B27 supplement、L-Glutamine、Penicillin/Streptomycin を添加したもの)。

培養開始から 7 日間培養を行なう。その間 3 日毎に半量ずつ培地の交換を行う。

#### ②海馬初代培養細胞の低酸素暴露と硫化水素ドナー添加

それぞれのウェルに硫化水素のドナーである硫化ナトリウム(Sodium Sulfide;Na<sub>2</sub>S)を加え(0, 10, 100, 1000  $\mu$ mol/L)、低酸素(酸素濃度 1%:低酸素環境群)ならびに通常酸素濃度(酸素濃度 21%:大気圧群)に 2 時間暴露する。暴露後、12 時間通常酸素濃度で培養する。(J Neurosci 2003)

#### ③硫化水素による細胞保護効果の評価—細胞死およびアポトーシスの検出—

低酸素暴露後に生存細胞を CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay(Promega)を用い、細胞死アッセイを行い、両群で生存している細胞数を比較検討する。同時に同時に westren blotting によっても生存細胞の検出を行う。

#### (2)硫化水素により誘発される遺伝子の同定

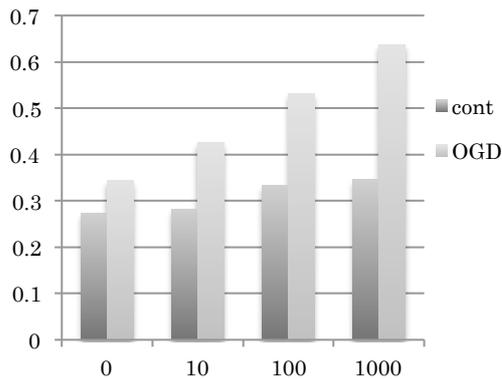
低酸素暴露後の初代海馬神経細胞より、mRNA を抽出する。DNA マイクロアレイにより網羅的に遺伝子発現を定量化し、硫化水素によって変化する遺伝子を同定する。

## 4. 研究成果

硫化ナトリウムは低濃度(10  $\mu$ mol/L)の場合、神経細胞死はほとんど生じないが、高濃度(100  $\mu$ mol/L および 1000  $\mu$ mol/L)の場合には薬剤の添加により神経細胞死を来すことが判明した。

実験結果から硫化ナトリウム添加濃度を 10  $\mu$ mol/L として硫化水素による低酸素環境下における細胞保護効果についての検討を行った結果、硫化ナトリウムを添加すると低酸素環境下による神経細胞死を減少させることが示唆された。

一方で、硫化ナトリウムが高濃度では、細胞死が誘発された。これは、従来の報告とは異なるものである。



図：硫化ナトリウム添加における低酸素暴露後の細胞数減少

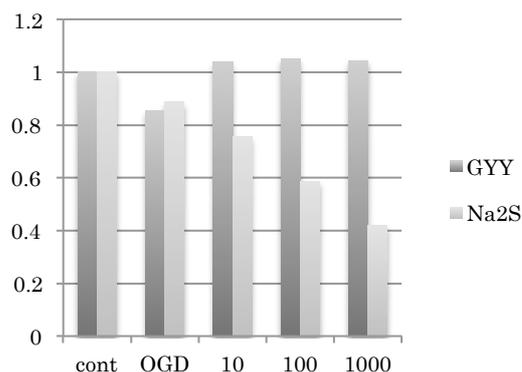
60 分間の低酸素暴露後に硫化水素ドナーとして硫化ナトリウムを添加し、その後細胞死の検出を LDH アッセイを用い検討した。硫化水素ドナーである硫化ナトリウムを添加すると低酸素暴露群では細胞死が増加する事が示唆された。

OGD：低酸素暴露群（1% 60min）

Cont：対照群（21% 培養群）

本検討では治療濃度においても in vivo における組織学的検討と比較すると神経保護作用が弱かった。これは低濃度長時間の硫化水素暴露という in vivo モデルと異なり、硫化水素ドナーを直接培養液に添加するため、培養液中の硫化水素濃度が急激に上昇し、低下するために生じた結果であると考えられた。しかしながら、国内において低濃度硫化水素を培養中に使用できる施設は存在しない。そのため硫化水素ドナーを変更する必要があると考えられ、より in vivo モデルに近づけるため、新たなドナーとして GYY4137 を使用する事とした。

GYY4137 ではより高い濃度の硫化水素を添加しても硫化水素による細胞死は誘発されず、低酸素環境下で細胞保護効果が示唆された。



#### 図：硫化水素ドナー添加による低酸素誘発性細胞死の抑制

GYY4137 添加群では低酸素暴露後も細胞数の減少がおきなかった。一方で硫化ナトリウム添加群では添加量により細胞数減少が確認できた。

GYY: GYY4137 群

Na2S: 硫化ナトリウム群

Control: 対照群(21%酸素による培養群)

OGD: 低酸素暴露群

そのため、さらに硫化水素により誘導されるタンパク質の同定をおこなうため DNA マイクロアレイにより網羅的に遺伝子発現を定量化した。しかし、アレイの結果では系統によって遺伝子の変化がおこっている事が確認できなかった。

遅発性対麻痺発症マウスモデルに対して低濃度硫化水素吸入がどのような効果を発揮しているのか、低酸素暴露初代培養神経細胞に対する GYY4137 添加では確認する事ができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計0件）

〔学会発表〕（計1件）

神里興太, 瀧上竜也、照屋孝二, 垣花学, 須加原一博:術後に挿入したスパイナルドレナージが効奏した胸部大動脈ステントグラフト内挿術の1症例, 日本心臓血管麻酔学会第17回学術大会, 2012年9月15日(仙台市)

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神里 興太 (KAMIZATO KOTA)

琉球大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 10554454

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし