

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293329

研究課題名(和文) 硫化水素吸入による生体内ガス分子活性化とその脊髄神経保護効果

研究課題名(英文) Activation of endogenous gas molecules and its spinal cord protection by hydrogen sulfide

研究代表者

垣花 学 (KAKINOHANA, MANABU)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20274897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウス脊髄虚血後遅発性対麻痺に対する硫化水素(Hydrogen sulfide : H₂S)の神経保護効果の機序について分子生物学的検討を行った。このモデルにおいて、H₂S吸入は脊髄での抗アポトーシス蛋白(Bcl-XL)の発現が増加することが明らかとなった。これらの現象は、一酸化窒素合成酵素阻害薬によってH₂Sの神経保護効果が消失すること、H₂S負荷後にBcl-XLが発現することが証明された。これらのことから、H₂Sによる神経保護効果の機序として、抗アポトーシス蛋白発現を増加させることに起因し、しかもこれは、H₂SのみならずiNOSの存在が必須であり、H₂SとNOの関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The investigating the mechanism for neuroprotective effect by hydrogen sulfide (H₂S) inhalation therapy after spinal cord ischemia in mice was done. H₂S inhalation therapy started at 24 hours of spinal cord ischemia could provide significant neuroprotective effect compared to air inhalation (control). Some inflammatory cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6) increased significantly during onset of delayed paraplegia, which was completely blocked by H₂S inhalation therapy. Of interesting, this effects could not be observed in inducible NOS (NOS2) deficient mice. H₂S therapy could produce Bcl-XL, antiapoptotic protein, in the spinal cord and the primary neuronal culture cells. Based on these results, neuroprotective effects induced by H₂S inhalation therapy may be associated with the synthesis of antiapoptotic protein as well as anti-inflammation, and NOS2 might be essential for its effects.

研究分野：医学

キーワード：遅発性脊髄障害 硫化水素 抗アポトーシス蛋白 Bcl-XL 抗炎症効果

1. 研究開始当初の背景

脊髄虚血あるいは脊髄外傷では、その受傷からある程度時間を経過した後に病態が悪化する、いわゆる遅発性脊髄神経障害を伴うことがあり、それにより症状がさらに悪化する。この遅発性脊髄神経障害の研究は、ラットやウサギを用いた研究がほとんどで、遺伝子改変技術を利用することが困難であることから、その病態あるいは治療に関わる重要な分子を見出すことが非常に困難であった。

当教室では米国ハーバード大学との共同研究により、遺伝子改変が容易であるマウスを用いた脊髄虚血モデルを開発し、この遅発性脊髄障害の病態生理について遺伝子改変マウス (Caspase-3 KO) を用いた研究を行い、Caspase 3 を必須とするアポトーシスがその主体たる病態であることを報告した (Kakinohana M, et al. Stroke 2011;42:2302-7)。さらに遅発性脊髄障害発症前から脊髄内での炎症性サイトカイン遺伝子発現が著増(虚血前の 100 ~ 400 倍)することを見出した。今後、このマウスモデルを用いることで、虚血性脊髄障害に伴う神経細胞死の病態生理ならびに治療に関する分子生物学的検討を進めていくことが可能となった。

最近、NO や CO と同様に、生体内で産生および作用するガス分子の一種である H₂S の生理学的役割やその細胞保護効果(心、肝、腎、肺など)に関する報告がみられる。中枢神経系に関しては、マウス心停止モデルにおいて蘇生直前に H₂S ドナー (Na₂S) を投与することにより海馬でのアポトーシスを抑制 (Circulation 2009;120:88) することが報告され、中枢神経保護効果に期待が持たれている。

我々もハーバード大学との共同研究で、上記マウス遅発性脊髄障害モデルを用い H₂S 吸入療法の効果について検討した結果、脊髄虚血 24 時間後に 5 時間の H₂S 吸入 (80ppm) させることにより、対照群(空気吸入)と比較し有意 ($p < 0.01$) に対麻痺発生率を低下させ (対麻痺発生率: 対照群 (100%)、治療群 (33.3%))、病理組織

学的にも著明な脊髄保護効果を発揮することを見出した(図 1)。また、免疫組織学的検討から、H₂S 吸入により脊髄前角細胞における活性型カスパーゼ 3 発現を抑えることを見出した(図 2)。

図 1 . H₂S による脊髄神経保護効果

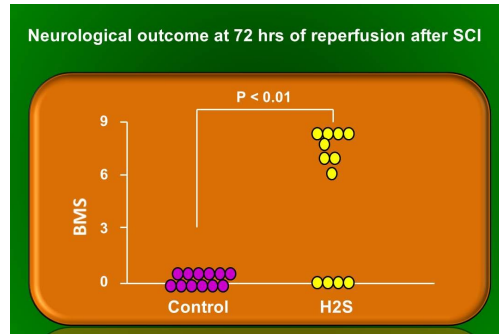
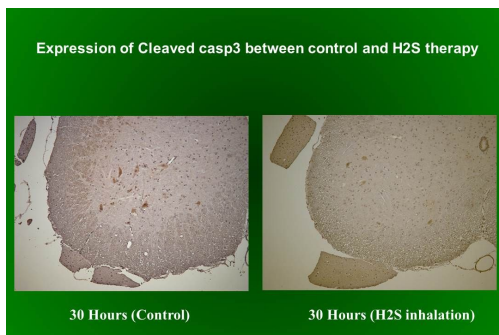


図 2 . 脊髄における活性型カスパーゼ 3 免疫組織染色



2. 研究の目的

H₂S の臓器保護効果は、直接的な抗炎症作用、抗アポトーシス作用、ラジカルスカベンジング効果、蛋白の翻訳後修飾などが示されている (Antioxid Redox Signal 2012;17:119-40)。実際、in vitro の実験で、“硫化水素ガス分子と抗アポトーシス蛋白発現との関与”が報告されている。そこで今回我々は、“H₂S による抗アポトーシス蛋白発現と脊髄保護効果との関係”に着目し、マウス遅発性脊髄障害モデルにおける H₂S の効果について、“H₂S は、抗アポトーシス蛋白発現を増加させ、それが脊髄神経細胞保護効果を発揮している”という仮説をたて、それを証明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス脊髄虚血モデル作成

マウス：C57/BL6、(8~10 週齢 雄)に全身麻酔(酸素・イソフルラン(1.5~2.0%))し、体温を 37.5 に維持した。気管挿管後に人工呼吸下に下記手術を行った。まず、左大腿動脈より動脈ライン(PE-10)を確保、動脈圧モニタリングならびにヘパリン投与ラインとした。頸部および前胸部正中切開し左内頸動脈を指標に胸骨切開(第2肋骨まで)し、胸腺を大動脈弓部から丁寧に剥離した。ヘパリン投与後、左鎖骨下動脈と左内頸動脈との間で弓部大動脈を遮断(脳動脈瘤クリップを用いる)した。大動脈遮断5分後に遮断を解除し再灌流した。ただし、Sham手術は、大動脈遮断は行わなかった。その後、止血を確認し、閉創そして麻酔から覚醒させた。覚醒後、抜管し30の環境温下で2時間観察した。虚血後下肢運動機能は、虚血後2、4、6、24、48、72時間目にMotor Deficit Index(Stroke 1996;27:1850)とBMS scale(Cell Mol Neurobiol 2006;26:1167)を用い評価した。

(2) 硫化水素ガス吸入療法

脊髄虚血24時間後にアクリル製吸入ボックス(自作)にマウスを入れ、空気1L/分・H₂S 80ppmをアクリル製吸入ボックスに流入した。マウスの入ったアクリル製吸入ボックスを環境温33.5~34で維持し、体温維持に努めた。吸入開始から5時間後、アクリル製吸入ボックスからマウスを取り出し室温で飼育とした。

(3) 脊髄サンプル採取

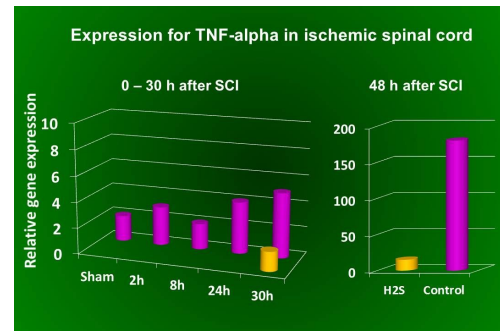
脊髄虚血前ならびに虚血後(H₂S吸入後も含む)に高用量ペントバルビタールで犠殺した。脊柱(中部胸椎~仙椎にかけて)を取り出し、仙骨部脊柱管から冷生理食塩水(4)を注入し脊髄を圧出させ、直ちに液体窒素で凍結し、-80で保存した。

4. 研究成果

(1) 脊髄虚血後の経時的サイトカイン mRNA 発現

脊髄虚血後の遅発性対麻痺発現過程における炎症性サイトカイン発現を検討した結果、脊髄虚血後30時間目から全ての炎症性サイトカインが増加した。(図3)H₂S吸入療法によって、その炎症性サイトカイン発現は著明に低下していた。

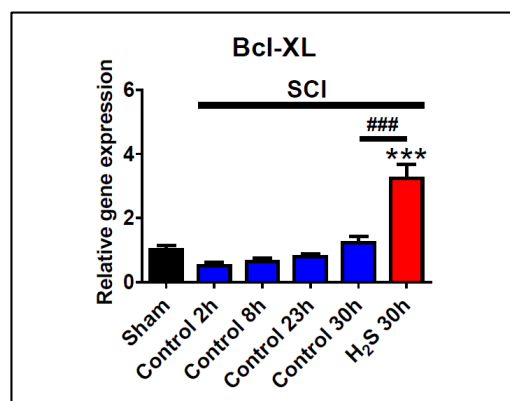
図3. 脊髄虚血後炎症性サイトカイン mRNA 発現の経時的变化



(2) 脊髄虚血後 H₂S 吸入療法による抗アポトーシス蛋白発現への影響

脊髄虚血後に H₂S 吸入療法を行い、その後犠殺し採取した脊髄における抗アポトーシス蛋白 mRNA の発現について検討した結果、H₂S 吸入後に Bcl-XL 蛋白の mRNA が虚血前の約 3.5 倍に増加していた。

図4. H₂S 吸入による Bcl-XL 蛋白の mRNA 発現

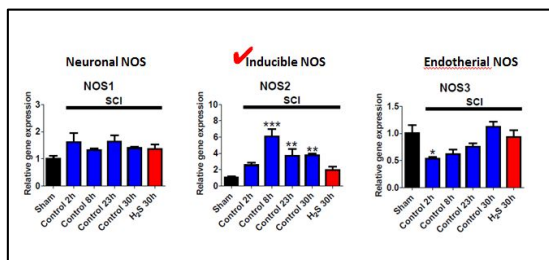


(3) 脊髄虚血後の誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)の影響

過去の結果から、iNOS ノックアウトマウスでは、H₂S 吸入による脊髄神経保護効果は発揮されないことが判明している。脊髄虚血後に脊髄における iNOS 発現が変化する

るか検討した結果、神経型一酸化窒素合成酵素（nNOS）と内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）は脊髄虚血後増加しなかったが、iNOS は増加した。（図5）

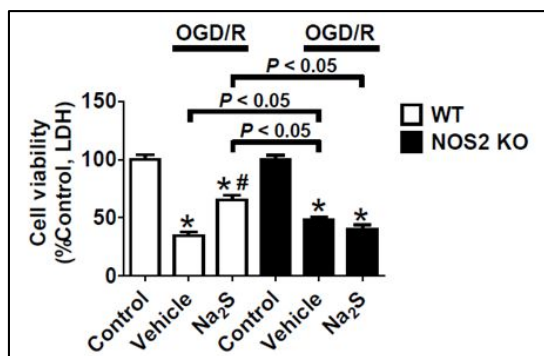
図5．脊髄虚血後の各種一酸化窒素合成酵素 mRNA の発現



(4) H₂S の神経保護効果に対する誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）の影響

H₂S の脊髄神経保護効果を確認するために、海馬一次培養神経細胞を用い、酸素・グルコース除去負荷(OGD)モデルを用い検討した結果、野生型マウス由来の海馬一次培養神経細胞と比較し iNOS 欠損マウス由来のものではH₂S ドナーのNa₂Sによる神経細胞保護効果が認められなかった。（図6）

図6．iNOS（NOS2）ノックアウトマウスにおけるNa₂Sによる神経細胞保護効果



このことから、H₂S による神経細胞保護効果には iNOS が必要であることが証明された。

(5) H₂S による抗アポトーシス蛋白発現効果

H₂S の脊髄神経保護効果には抗アポトーシス蛋白発現が関与している可能性をさしたるが、H₂S による抗アポトーシス蛋白 Bcl-XLの発現についてSH-SY5Yを用いた in

vitro でも検討した。その結果、H₂S ドナーのNa₂SによりBcl-XLのmRNA発現は増加し、さらにそれはiNOS阻害薬である1400Wで抑制された。このことは、マウスを用いた in vitro の結果と同じであり、H₂S による抗アポトーシス蛋白の合成が促されることが証明できた。

総括

H₂S によるマウス脊髄虚血後遅発性脊髄神経障害モデルにおける神経保護効果の機序として、脊髄虚血後の高サイトカイン血症を伴う脊髄内の炎症性変化を強力に抑制することのみならず、抗アポトーシス蛋白発現を増加させることにより神経細胞保護効果を発揮することが示された。しかもこの抗アポトーシス蛋白発現に関しては、H₂S のみならず iNOS の存在が必須であり、H₂S と NO の関連が示唆された。

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2件)

Kakinohana M. Protective effects of anesthetics on the spinal cord. *Curr. Pharmaceu Desig* 2014 ; 20 : 5744 - 50 (査読あり)

Fukuda T, Kakinohana M, Matsushita M, Sugahara K. Dietary supplementation with sodium nitrite can exert neuroprotective effects on global cerebral ischemia/reperfusion in mice. *J Anesth* 2015 ; 29 : 25 - 30 (査読あり)〔学会発表〕(計1件)

Kakinohana M, Kida K, Ichinose F, Sugahara K. Inhalation of Hydrogen sulfide can attenuate the delayed neuronal degeneration after spinal cord ischemia in mice. The 3rd. international meeting of hydrogen sulfide 2014, June, Kyoto, JAPAN

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

垣花 学 (KAKINOHANA、Manabu)

琉球大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20274897

(2)研究分担者

大城匡勝 (OSHIRO、 Masakatsu)

琉球大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00315483

中村清哉 (NAKAMURA、 Seiya)

琉球大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00363680

野口信弘 (NOGUCHI、 Nobuhiro)

琉球大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80457671

(3)連携研究者

()

研究者番号：