

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590122

研究課題名(和文) 胃粘膜傷害時における内因性硫化水素の挙動と生理的役割に関する研究

研究課題名(英文) Study of roles of endogenous hydrogen sulfide in stomach with mucosal injury

研究代表者

関口 富美子 (SEKIGUCHI, Fumiko)

近畿大学・薬学部・准教授

研究者番号：90271410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト胃癌由来AGS細胞において、生体内で硫化水素(H₂S)産生に関わる酵素の1つであるcystathionine-gamma-lyase(CSE)により産生された内因性H₂Sは、AGS細胞の増殖を促進的に調節していることが示唆された。この効果の一部には、H₂SによるCav3.2 T型カルシウムチャネルの機能増強およびNF-kappaB系の活性化を介した抗アポトーシスタンパクBcl-2とBcl-xLの発現増加が関与している可能性が示唆された。これらの経路は胃癌治療の新たなターゲットとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In human gastric cancer-derived AGS cells, our findings suggest that endogenous hydrogen sulfide (H₂S) produced by cystathionine-gamma-lyase (CSE), one of H₂S-forming enzymes in the mammalian body, accelerates the proliferation of AGS cells. The effects of H₂S may be mediated, in part, by increase in function of Cav3.2 T-type calcium channels and upregulation of anti-apoptotic proteins, Bcl-2 and Bcl-xL, via activation of NF-kappaB caused by endogenous H₂S. These pathways can be expected to be effective targets for treatment of gastric cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：硫化水素合成酵素 胃癌細胞増殖 T型カルシウムチャネル 抗アポトーシス因子

1. 研究開始当初の背景

硫化水素 (H_2S) は、火山地帯や下水処理場で発生する腐敗卵に似た刺激臭を持つ毒性の強いガスである。しかし近年、 H_2S が哺乳類の生体内において、cystathionine- γ -lyase (CSE) や cystathionine- β -synthase (CBS) などにより L-cysteine から酵素的に合成され、多種多様な生理的・病態生理的反応に寄与していることが明らかにされ、NO や CO に続く第三のガス状メッセンジャーとして広く知られるようになった (図 1)。哺乳類の血漿 H_2S 濃度は 10-160 μM と報告されているが、敗血症モデル動物では血漿 H_2S 濃度が上昇すること、肝臓や肺における CSE 発現量が増加していることが示されている。また、このモデルにおける炎症反応スコアが CSE 選択的阻害薬の DL-propargylglycine (PPG) 処置により改善されることより、CSE/ H_2S 系は敗血症において炎症増悪因子であることが示唆されている。また、腎臓や初代培養神経細胞においても H_2S は細胞傷害的に働くことが示されている。一方、心臓や中枢神経系、アレルギー性の鼻炎や肺炎症では、 H_2S が細胞保護的、抗炎症的に働くことが示されており、細胞に対して H_2S が保護的か、傷害的かは傷害の種類や臓器によって異なるものと考えられる。

胃粘膜に対する H_2S の効果は、酢酸やエタノール、非ステロイド抗炎症薬 (NSAIDs)、胃の虚血/再灌流処置などで誘起される胃粘膜傷害モデル動物において、我々の研究室を含む複数のグループにより検討されており、 H_2S は胃粘膜保護的に働くことが多くの論文において示されている。初期の研究では、 H_2S ガスそのものや H_2S donor の NaHS を作用させることで外来性 H_2S の胃粘膜保護効果が示されていたが、最近では、 H_2S の合成酵素 CSE、CBS に対する阻害薬やこれら酵素の基質 L-cysteine の効果を検討することにより、内因性 H_2S が胃粘膜正常性維持に重要であることが示されている。Wallace らは、酢酸経口投与による胃粘膜傷害モデル動物において、CSE および CBS 発現量とともに増加すること、また内因性 H_2S が治癒促進的に働くことを示している (Wallace et al., FASEB J., 21, 4070-4076, 2007)。一方、非ステロイド抗炎症薬 (NSAIDs) による胃粘膜傷害モデル動物では反対に CSE 発現量、 H_2S 産生量ともに減少することが示されている (Fiorucci et al., Gastroenterology, 129, 1210-1224, 2005)。また最近、100%エタノール経口投与による胃粘膜傷害モデルラットにおいて、CSE 阻害薬 PPG が胃粘膜傷害を軽減することが示され、これまで報告されている H_2S の胃粘膜保護効果とは逆に、 H_2S が胃において細胞傷害的に働くことが示唆されている (Chavez-Pina et al., Eur. J. Pharmacol., 630, 131-136, 2010)。これらの報告から、胃粘膜傷害を誘起する刺激の種類や傷害の程度により、 H_2S 合成酵素の発現量や胃粘膜

の正常性維持に及ぼす内因性 H_2S の効果が異なっている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

H_2S は上記に示したように様々な生理的・病態生理的反応の調節に寄与するが、その反応に $Ca_v3.2$ T 型 Ca^{2+} チャンネル (T-channel) の機能増強や H_2S の sulfhydration 作用を介した GAPDH、NF- κ B、ATP 感受性 K^+ チャンネル (K_{ATP} -channel) などの活性化が関与することが報告されている。 H_2S が各種細胞において細胞増殖や細胞死・細胞保護に影響を及ぼす事は報告されているが、その効果の方向性やメカニズムについては必ずしも統一した見解は得られていない。また、我々は、胃粘膜において H_2S が酸化ストレスに対する細胞保護作用を示すことを報告している (Yonezawa and Kawabata et al. Toxicology 2007, 241, 11-18)、胃癌細胞における内因性 H_2S の役割についてはまだよくわかっていない。そこで本研究では、ヒト胃癌由来 AGS 細胞における内因性 H_2S の細胞増殖への関与とその下流シグナルを解析した。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト胃癌由来の AGS、KATO-III および MKN-45 細胞には、10%ウシ胎児血清 (FCS)、ペニシリン・ストレプトマイシンを含む RPMI-1640 培地を、ヒト肺癌由来 A549 細胞には、10% FCS、カナマイシンを含む DMEM 培地を用い 37°C、5% CO_2 条件下で培養した。

(2) 細胞増殖 MTT assay

96-well plate に 2×10^3 cells/well となるように各種細胞を播種し、10% FBS を含む培地で 24 時間培養した細胞に各種阻害薬を加えてさらに 48 時間培養した後、細胞増殖率を MTT 法により判定した。

(3) 乳酸脱水素酵素 (LDH) 遊離量測定

細胞を 96 well plate に 2.0×10^3 cells/well、全量 100 μl となるように播種し、10% FCS を含む上述の培地で 24 時間培養後、各種阻害薬を加え 48 時間培養した。上清を FCS 不含培地で 10 倍希釈したものを LDH cytotoxicity detection kit を用い培養液中の LDH 遊離量を測定し、細胞毒性を評価した。

(4) タンパク質の検出

CSE、CBS、 $Ca_v3.2$ 、Bcl-xL および Bcl-2 のタンパク発現を Western blot 法により検出した。

(5) GAPDH 活性測定

6-well plate に 1.5×10^5 cells/well となるように AGS 細胞を播種し、10% FCS を含む培地で 24 時間培養し、各種阻害薬を加えて 48 時間培養した後、細胞を回収し、GAPDH 活性測定キットを用いて比色法により細胞溶

溶液中の GAPDH 活性を測定した。

(6) アポトーシスの評価

顕微鏡下でヘキスト染色した細胞における核の凝集、断片化を指標に評価した。

4. 研究成果

(1) 胃癌由来 AGS 細胞の増殖における内因性 H₂S の関与

AGS 細胞の 48 時間における細胞増殖は、CSE 阻害薬の DL-propargylglycine (PPG) および -cyano-L-alanine (BCA)、CBS 阻害薬の aminoxyacetic acid (AOAA) により濃度依存性に抑制された (図 2A-C)。この効果はいずれも LDH 遊離増加を伴わなかったことから (図 1D-F)、細胞毒性によるものではないことが示唆された。

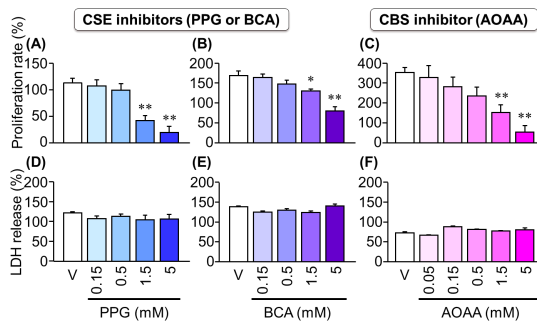


図 2 H₂S 合成酵素 CSE および CBS 阻害薬の AGS 細胞の増殖および LDH 遊離に対する効果。阻害薬作用 48 時間後に MTT 法および LDH 活性測定により細胞増殖と細胞毒性を検討した。データは 12 (A), 8 (B), 16-24 (C) 例の平均±標準誤差で示している。* P<0.05, ** P<0.01 vs. vehicle (V). PPG, DL-propargylglycine; BCA, β-cyano-L-alanine; AOAA, aminoxyacetic acid.

CSE 阻害薬の PPG、BCA による細胞増殖抑制効果は、H₂S donor の NaHS 1.5 mM をこれら阻害薬作用の 0, 12, 24, 36 時間後に 4 回繰り返し作用させることで消失したが、CBS 阻害薬の AOAA の増殖抑制効果に対して NaHS は無効であった (図 3)。

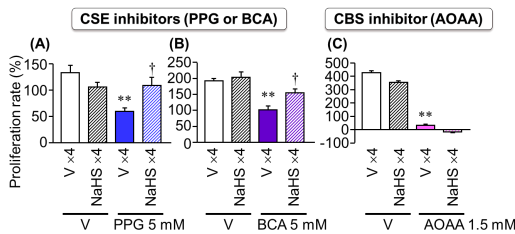


図 3 H₂S 合成酵素 CSE および CBS 阻害薬による細胞増殖抑制効果に対する H₂S donor, NaHS 繰り返し作用の影響。H₂S donor の NaHS 1.5 mM は CSE, CBS 阻害薬を作用させた 0, 12, 24, 36 時間後に計 4 回繰り返し作用させ、阻害薬作用 48 時間後に MTT 法により細胞増殖を検討した。データは 16-25 例の平均±標準誤差で示している。* P<0.01 vs. V+V; † P<0.05. V + PPG (A) or BCA (B), V, vehicle; PPG, DL-propargylglycine; BCA, β-cyano-L-alanine; AOAA, aminoxyacetic acid.

AGS 細胞以外の癌由来細胞についても細胞増殖における CSE を介した内因性 H₂S の関与を

検討したところ、他のヒト胃癌由来細胞株の KATO-III, MKN-45 細胞およびヒト大腸癌由来 HTC-15 細胞の増殖は、CSE 阻害薬 PPG により有意に抑制されたが、ヒト肺癌由来 A549 細胞の増殖は PPG の影響を受けなかった (図 4)。

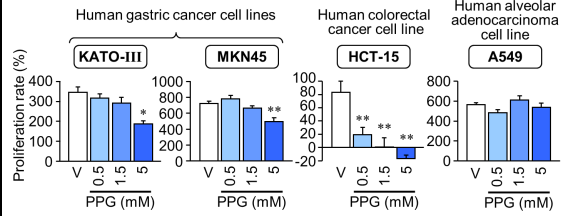


図 4 H₂S 合成酵素 CSE 阻害薬 DL-propargylglycine (PPG) の各種癌由来細胞増殖におよぼす影響。データは 4-8 例の平均±標準誤差で示している。V, vehicle; PPG, DL-propargylglycine.

(2) AGS 細胞における内因性 H₂S の細胞増殖効果に対する T-channel 阻害薬の効果

H₂S は T-channel 機能を増強すること、また、細胞内 Ca²⁺レベルの上昇は細胞増殖を促進することが知られていることから、内因性 H₂S による AGS 細胞の増殖促進効果に T-channel が関与する可能性を検討した。T-channel 阻害薬の NNC 55-0396 および mibefradil はいずれも 3 μM で細胞毒性を示さず、有意に細胞増殖を抑制した (図 5A, B, D, E)。また、T-channel の 3 つのサブタイプのうち Ca_v3.2 を選択的に抑制する濃度のアスコルビン酸 (AA、ビタミン C) あるいは塩化亜鉛 (ZnCl₂) も細胞毒性を示すことなく同程度の細胞増殖抑制効果を示した (図 5C, F)。

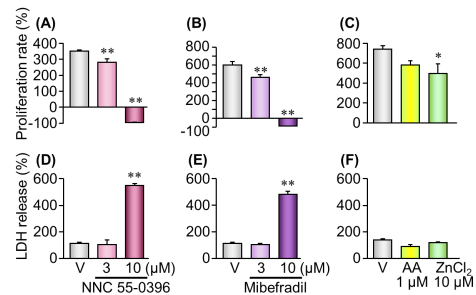


図 5 AGS 細胞の細胞増殖および LDH 遊離におよぼす T 型 Ca²⁺チャネル (T-channel) 阻害薬の効果。T-channel 阻害薬 NNC 55-0396 と mibefradil, 3 つの T-channel サブタイプのうち Ca_v3.2 を選択的に阻害することが知られているアスコルビン酸 (AA) および塩化亜鉛 (ZnCl₂) を作用させた 48 時間後に MTT 法および LDH 活性測定により細胞増殖と細胞毒性を検討した。データは 4-8 例の平均±標準誤差で示している。* P<0.05, ** P<0.01 vs. V.

これまでの結果より、CSE により産生される H₂S による Ca_v3.2 の機能増強が AGS 細胞の増殖を促進的に調節していることが示唆されたことから、実際に、AGS 細胞にこれらタンパクが発現しているかについて Western blot 法により検討した。その結果、AGS 細胞において内因性 H₂S 産生への関与が示唆された CSE の発現は認められたが、CBS はほとんど発現していないことがわかった (図 6A)。また、AGS 細胞に Ca_v3.2 T-channel のタンパク発現も認められた (図 6B)。

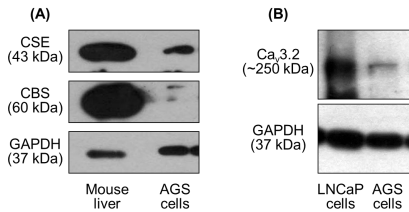


図 6 AGS 細胞における H₂S 合成酵素の CSE と CBS、および Ca_v3.2 T-channel タンパク発現の確認。マウス肝臓(A)は CSE と CBS の、前立腺癌由来 LNCaP 細胞(B)は Ca_v3.2 の陽性コントロールとして使用した。

(3) AGS 細胞の内因性 H₂S の細胞増殖効果における H₂S 誘起 sulfhydrylation 作用の関与。H₂S は GAPDH、NF- κ B、K_{ATP}-channel などを sulfhydrylation することで機能増強することが報告されている。そこで、AGS 細胞の内因性 H₂S の細胞増殖効果におけるこれら因子の関与を検討した。H₂S の sulfhydrylation を阻害する還元剤の dithiothreitol (DTT) は AGS 細胞の増殖を強く抑制したが (図 7A)、K_{ATP}-channel 阻害薬の glibenclamide は無効であった (図 7B)。

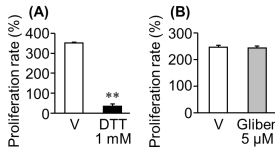


図 7 AGS 細胞の細胞増殖に対する還元剤 dithiothreitol (DTT) および K_{ATP}-channel 阻害薬 glibenclamide (Gliben) の効果。阻害薬作用 48 時間後に MTT 法により細胞増殖を検討した。データは 8 例の平均±標準誤差で示している。**, P<0.01 vs. V (vehicle)。

次に、GAPDH 阻害薬 koningic acid の効果を検討したところ、0.3 μM の濃度で細胞毒性を起こさずに細胞増殖を抑制したが (図 8A)、AGS 細胞の GAPDH 活性は、CSE 阻害薬 PPG により抑制されなかった (図 8B)。

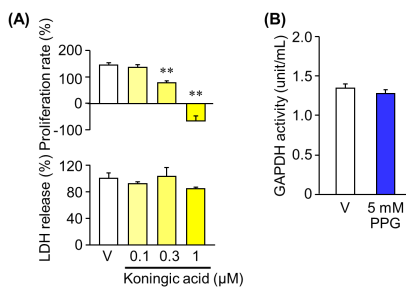


図 8 AGS 細胞の細胞増殖に対する GAPDH 阻害薬 koningic acid の効果 (A) および GAPDH 活性におよぼす CSE 阻害薬 DL-propargylglycine (PPG) の効果。 (A) Koningic acid 作用 48 時間後に MTT 法により細胞増殖を検討した。 (B) PPG を 48 時間作用させた AGS 細胞を回収し、その細胞回収液中の GAPDH 活性をキットを用いて測定した。データは 4-8 例の平均±標準誤差で示している。**, P<0.01 vs. V (vehicle)。

(4) AGS 細胞の内因性 H₂S による細胞増殖効果における NF- κ B の関与。NF- κ B を構成する p65 は H₂S により sulfhydrylation されることで、核移行した時に NF- κ B の転写活性を促進的に調節する RPS3 との結合が強固になり、NF- κ B 活性が増強されることが示されている。そこで次に、AGS

細胞の内因性 H₂S の細胞増殖効果における NF- κ B の関与を検討した。NF- κ B 阻害薬の Bay 11-7082 および pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) は、それぞれ 0.3、0.1 μM の濃度で、細胞毒性を示すことなく細胞増殖を有意に抑制したが (図 9A、B、D、E)、curcumin は、細胞増殖抑制よりも低濃度で細胞毒性を示した (図 9C、F)。

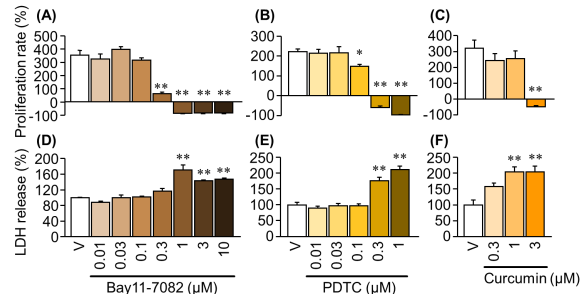


図 9 AGS 細胞の細胞増殖および LDH 遊離におよぼす NF- κ B 阻害薬 Bay 11-7082、pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) および curcumin の効果。各種 NF- κ B 阻害薬作用 48 時間後に MTT 法および LDH 活性測定により細胞増殖と細胞毒性を検討した。データは 8 例 (A-C) あるいは 4 例 (D-F) の平均±標準誤差で示している。* P<0.05, ** P<0.01 vs. V (vehicle)。

NF- κ B 系は抗アポトーシスの働き、細胞増殖促進的に作用していることが示されていることから、アポトーシスの指標である核の凝集をヘキスト染色により検討した。その結果、CSE 阻害薬の PPG および BCA と、NF- κ B 阻害薬 PDTC は 48 時間後に有意にアポトーシス細胞の割合を増加させた (図 10)。また、他の NF- κ B 阻害薬 Bay 11-7083 と curcumin もアポトーシス細胞を増加させる傾向を示した (図 10B)。

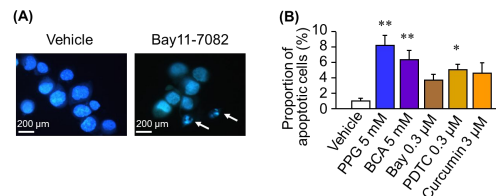


図 10 AGS 細胞のアポトーシスレベルにおよぼす CSE 阻害薬 DL-propargylglycine (PPG)、 β -cyano-L-alanine (BCA)、および NF- κ B 阻害薬 Bay 11-7082、pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)、curcumin の効果。各種阻害薬作用 48 時間後にヘキストにより核を染色し、核を蛍光顕微鏡下で観察した。データは 4 例の平均±標準誤差で示している。* P<0.05, ** P<0.01 vs. vehicle。

図 10 の結果から、内因性 H₂S/NF- κ B 系による抗アポトーシス作用が AGS 細胞の増殖促進に関与している可能性が示唆されたことから、最後に、抗アポトーシスタンパクである Bcl-xL および Bcl-2 の発現量について検討した。その結果、CSE 阻害薬 PPG および NF- κ B 阻害薬 Bay 11-7082 はいずれも Bcl-xL および Bcl-2 の発現量を顕著に減少させた (図 11)。

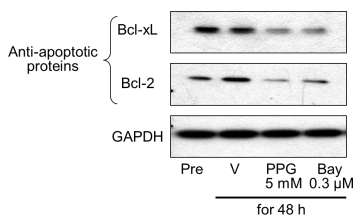


図 11 AGS 細胞の抗アポトーシスタンパク Bcl-xL および Bcl-2 発現レベルにおよぼす CSE 阻害薬 DL-propargylglycine (PPG) および NF-κB 阻害薬 Bay 11-7082 の効果。各種阻害薬作用 48 時間後に細胞を回収し、Western blot 法によりタンパク発現量を検討した。

以上の結果より、AGS 細胞の増殖は、CSE により産生される内因性 H₂S により促進的に調節されており、H₂S の下流シグナルとして Ca_v3.2 T-channel および抗アポトーシスの働く NF-κB 系の活性化が関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Fumiko Sekiguchi, Teruki Sekimoto, Atsufumi Kawabata. Endogenous hydrogen sulfide contributes to cell proliferation in gastric cancer cells. 査読無、J Pharmacol. Sci., 2012, vol. 118 (Suppl. 1), 122P.

〔学会発表〕(計 4 件)

小椋彩加、関本晃己、関口富美子、川畑篤史. ヒト胃癌由来 AGS 細胞における内因性硫化水素の細胞増殖への関与とその下流シグナルの解析. 第 125 回日本薬理学会近畿部会(岡山)2014 年 6 月 20 日(ポスター発表).

関本晃己、関口富美子、川畑篤史. 胃癌細胞における内因性硫化水素の細胞増殖促進作用について. 日本薬学会第 132 年会(札幌)2012 年 3 月 28-31 日(ポスター発表).

Fumiko Sekiguchi, Teruki Sekimoto, Ayaka Ogura, Atsufumi Kawabata. Roles of endogenous hydrogen sulfide in proliferation of gastric cancer cells. 7th International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection (Honolulu), 2012 年 9 月 9-11 日(口頭発表).

関口富美子、関本晃己、川畑篤史. 胃癌細胞において内因性に産生される硫化水素は癌細胞増殖に関与する. 第 85 回日本薬理学会年会(京都)2012 年 3 月 14-16 日(口頭発表).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phar.kindai.ac.jp/byoutai/index.files/byoutai.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関口 富美子 (SEKIGUCHI, Fumiko)

近畿大学・薬学部・准教授

研究者番号：90271410

(2) 研究分担者

川畑 篤史 (KAWABATA, Atsufumi)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：20177728