



Title	RIN14B細胞の細胞内Ca ²⁺ 動態に対する硫化水素の作用に関する研究
Author(s)	氏家, 絢子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第12614号
Issue Date	2017-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12614
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/68635
Type	doctoral thesis
File Information	Ayako_Ujike.pdf



RIN14B 細胞の細胞内 Ca^{2+} 動態に対する
硫化水素の作用に関する研究

氏家絢子

目次

I	緒論	1
II	実験方法	4
A	RIN14B 細胞の継代培養法	4
B	細胞内 Ca^{2+} 濃度測定法	4
C	RT-PCR 法	5
D	リアルタイム PCR 法	7
E	5-HT 放出測定法	7
F	細胞内サルフェン硫黄量測定法	9
G	使用試薬	9
H	統計処理	10
III	実験成績	11
A	細胞内 Ca^{2+} シグナルに対する H_2S の作用	11
B	H_2S の Ca^{2+} シグナル抑制作用	11
1.	RIN14B 細胞に発現する K_{ATP} チャネルサブユニットの同定	13
2.	H_2S による Ca^{2+} シグナルに対する K_{ATP} チャネル阻害薬の効果	13
C	炎症条件下における H_2S の作用	16
1.	H_2S による Ca^{2+} シグナルに対する炎症性サイトカインの効果	20
2.	$\text{IL-1}\beta$ 処置細胞における H_2S の作用	20
a)	K_{ATP} チャネル開口薬の効果	20
b)	TRPA1 及び電位依存性 Ca^{2+} チャネル阻害薬の効果	22
c)	ポリサルファイドの関与	27
3.	H_2S による 5-HT 放出反応に対する炎症性サイトカインの効果	27

IV 考察	33
V 総括	39
謝辞	42
参考文献	43
英文抄録	53

略語表

5-HT	5-hydroxytryptamine
ADP	adenosine diphosphate
ATP	adenosine triphosphate
AUC	area under the curve (曲線下面積)
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	intracellular Ca^{2+} concentration (細胞内 Ca^{2+} 濃度)
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	fetal bovine serum (牛胎仔血清)
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H_2S	hydrogen sulfide (硫化水素)
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid
HIF-1 α	hypoxia-induced factor-1 α
IFN- γ	interferon- γ
IL	interleukin
K_{ATP}	ATP-sensitive potassium ion (ATP 感受性 K^+)
Kir	inward-rectifier potassium ion (内向き整流性 K^+)
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MO	mustard oil
Na_2S	sodium sulfide
Na_2S_3	sodium trisulfide
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NaHS	sodium hydrosulfide
NF- κ B	nuclear factor- κ B
NO	nitric oxide (一酸化窒素)
ODS	octa decyl silyl (オクタデシル基結合シリカゲル)
PCA	perchloric acid
PCR	polymerase chain reaction
RT	reverse transcription
SUR	sulfonyl urea receptor
TBE	tris-borate-EDTA
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TPH1	tryptophan hydroxylase 1
TRPA1	transient receptor potential ankyrin 1

I 緒論

硫化水素(H_2S)はガス状伝達物質の一つであり、生体内では腸管における腸内細菌からの産生に加え(Carbonero *et al.*, 2012)、哺乳類細胞においても中枢神経系や肝臓、膵臓など様々な組織で、システインを基質とした酵素反応によって産生されている(Kamoun, 2004)。産生された H_2S はタンパク質と結合して貯蔵され、細胞内の pH の低下や還元剤によって再び放出される(Ishigami *et al.*, 2009)。ミトコンドリアでは、sulfide:quinine oxidoreductase などの酵素によってチオ硫酸へと代謝される(Hilderbrandt and Grieshaber, 2008)。 H_2S の生理的作用は様々な組織で報告されており、脳では N-methyl-D-aspartate 受容体を介した神経活動を増強すること(Abe and Kimura, 1996)、血管や腸管では平滑筋収縮を調節すること(Hosoki *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2014)、膵 β 細胞や神経細胞では細胞保護作用を示すことなどが報告されている(Kaneko *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2012)。

本研究室では以前に、ラット知覚ニューロンにおいて H_2S が非選択的陽イオンチャネルの transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)を活性化して細胞内 Ca^{2+} 濃度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)を増加させることを報告した(Miyamoto *et al.*, 2011)。また、ラット膵 δ 細胞由来セルライン RIN14B 細胞では、 H_2S により TRPA1 を介した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加と 5-HT 放出の増加が起こることを報告した(氏家絢子卒業論文、平成 24 年度)。TRPA1 は主に知覚神経に発現し侵害受容に関与しているチャネルである(Story *et al.*, 2003; Jordt *et al.*, 2004; Obata *et al.*, 2005; Bautista *et al.*, 2006)。TRPA1 は膵 β 細胞や腸内分泌細胞などにも発現しており(Purhonen *et al.*, 2008; Nozawa *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 2014)、TRPA1 の活性化を介した Ca^{2+} 動員はホルモンやオータコイドの開口放出を引き起こすのに重要であると考えられる。一方で、ラット膵 β 細胞やそのセルラインでは、 H_2S は ATP 感受性 K^+ (K_{ATP})チャネルを活性化して Ca^{2+} 動員を減少させ、インスリン放出を抑制することが報告されている(Yang *et al.*, 2005; Ali *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009)。 K_{ATP} チャネルは様々な細胞に幅広く発現しているため、 H_2S の標的である

TRPA1 と K_{ATP} チャネルの両方が同じ細胞に発現するケースは珍しくないと考えられるが、そのような場合 Ca²⁺動員や伝達物質放出に対する H₂S の増強作用と抑制作用がどのように現れてくるかは不明である。RIN14B 細胞は TRPA1 を発現しており (Nozawa *et al.*, 2009)、K_{ATP} チャネルの存在も電気生理学的手法で示唆されている (Bränström *et al.*, 1997)。このような両チャネルを発現しているセルラインを用いて H₂S に対する細胞反応を解析することで、H₂S による伝達物質放出機構調節のより詳細なメカニズムを明らかにすることができるはずである。

H₂S は病態との関連も注目されている。炎症時には H₂S 産生量や H₂S 合成酵素の発現量が増加し、この H₂S 産生の増加が炎症病態を増悪させているという報告もあれば (Li *et al.*, 2005)、反対に炎症からの回復を促進しているという報告もある (Wallace *et al.*, 2009; Flannigan *et al.*, 2011)。また、炎症条件では、H₂S 産生に限らず H₂S の標的分子にも影響が生じる。モルモットの大腸炎モデルでは、K_{ATP} チャネルの発現が増加してリンパ管の拡張が起こることが報告されている (Mathias and Weid, 2013)。炎症性サイトカイン interleukin-1 (IL-1) や tumor necrosis factor- α (TNF- α) の処置では、滑膜細胞や象牙芽様細胞の TRPA1 チャネルの発現が誘導されること、またラット三叉神経節ニューロンでは、TRPA1 の形質膜への移行が増強されて [Ca²⁺]_i 反応が増大することが示されている (Hatano *et al.*, 2012; El Karim *et al.*, 2015; Meng *et al.*, 2016)。H₂S の作用メカニズムとして、標的分子のシステイン残基を修飾する S-sulfhydration が提唱されていたが (Mustafa *et al.*, 2009)、H₂S の硫黄原子は安定した還元状態にあり、システイン残基の硫黄原子と直接反応することは理論上起こらない (Mishanina *et al.*, 2015)。一方、近年になって、H₂S の酸化で生じる反応性の高いポリサルファイドが H₂S の作用を媒介している可能性が示唆されている (Toohey, 2011; Greiner *et al.*, 2013)。炎症条件で増加する活性酸素種や一酸化窒素は、H₂S からのポリサルファイド生成を促進する (Nagy and Winterbourn, 2010; Cortese-Krott *et al.*, 2015)。そのため、炎症時の H₂S の働きについて明らかにするには、標的分子や細胞内環境の変化の影響を調べる必要があ

る。

本研究では、RIN14B 細胞を用いて、 H_2S の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 反応に対する作用及び炎症性サイトカイン処置による H_2S 作用の変化について調べた。チャネル阻害薬や作動薬を用いた薬理的な解析から、 H_2S が TRPA1 を介した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加に加えて、 K_{ATP} チャネルを介して Ca^{2+} シグナルを抑制することを明らかにした。また、炎症条件下では H_2S からポリサルファイドが生成されることにより $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加反応を増強していることを示した。

なお、本論文の一部は誌上公表されている(Ujike *et al.*, 2015)。

II 実験方法

A RIN14B 細胞の継代培養法

RIN14B 細胞を DS ファーマバイオメディカル(大阪、日本)より購入し、10%牛胎子血清 (FBS、Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)、100 U/ml penicillin 及び 100 µg/ml streptomycin (Gibco/Thermo Fisher Scientific)を添加した RPMI1640 培地(Gibco/Thermo Fisher Scientific)で継代・培養した。継代は週に 1 回の頻度で行った。培地を除去し、Hanks' balanced salt solution (HBSS、Ca²⁺、Mg²⁺不含、Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Germany)で一度細胞を洗い、0.25% trypsin、0.1% EDTA (Sigma-Aldrich/Merck)を含む HBSS を 2 分間、37°C で処置し、接着している細胞を剥がした。10 倍量の培地(FBS 含)を加えて trypsin 活性を止め、細胞を分散して 10-20%コンフルエント程度の密度になるように培養フラスコに播き、37°C、5% CO₂ 下で培養した。継代数 2-20 の細胞を実験に用いた。

サイトカイン処置は、細胞を 24 時間培養した後に行った。培地に recombinant rat IL-1β または recombinant rat TNF-α を目的の終濃度となるように加え、一定時間、37°C、5% CO₂ 下で処置した。

B 細胞内 Ca²⁺濃度測定法

Trypsin 処置後、RPMI1640 培地に分散した RIN14B 細胞を poly-D-lysine (4-5 µg/cm²、Sigma-Aldrich/Merck)でコーティングしたカバーガラスに播き、37°C、5% CO₂ 下で 24-48 時間培養した。その細胞に、栄養液(140 mM NaCl、3.3 mM KH₂PO₄、0.8 mM K₂HPO₄、1.2 mM CaCl₂、1.2 mM MgCl₂、10 mM Glucose、20 mM HEPES、NaOH により pH を 7.4 に調整)で希釈し界面活性剤の 0.002% cremophor EL (Sigma-Aldrich/Merck)を添加した 10 µM fura-2

acetoxymethyl ester (同仁化学、熊本、日本)を1時間、室温(22-26°C)で処置し、細胞内へ fura-2 を負荷した。

Fura-2 の蛍光をレーザー光源・波長切り替え装置(C7773、浜松ホトニクス、静岡、日本)、CCD カメラ(C6790、浜松ホトニクス)及びコンピュータから構成される蛍光画像解析装置を取り付けた倒立顕微鏡(Eclipse Ti-U、ニコン、東京、日本)で検出した。実験は全て室温で行った。細胞を播いたカバーガラスを顕微鏡のステージ上の実験槽に固定し、細胞近傍に設置したチューブから栄養液を常に灌流し、同じチューブから薬物投与を行った。細胞に 340 nm と 380 nm の励起光を交互に 92 ミリ秒間ずつ照射し、それぞれの波長により励起された 510 nm の蛍光を 5 秒間隔で CCD カメラにより検出した。各励起光による蛍光強度の比 (F_{340}/F_{380})を画像解析ソフトウェア AquaCosmos (浜松ホトニクス)で解析した。細胞内 Ca^{2+} 濃度($[Ca^{2+}]_i$)を Grynkiewicz ら(1985)の式: $[Ca^{2+}]_i = Kd \cdot \beta \times (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$ を用いて計算した。この式において R は F_{340}/F_{380} であり、 R_{min} は Ca^{2+} 非存在下での蛍光比、 R_{max} は Ca^{2+} 飽和状態での蛍光比である。 $Kd \cdot \beta$ は fura-2 の見かけの解離定数を表す。本実験では、Calcium Calibration Buffer Kit (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific)を用いて、 R_{min} 、 R_{max} を測定、 $Kd \cdot \beta$ を算出した。それぞれの値として 0.28、7.2、2634 を用いた。

C RT-PCR 法

RNA 抽出を TRI reagent (Sigma-Aldrich/Merck)を用い、添付の使用説明書の手順に従って行った。細胞を TRI reagent で溶解し、4°C、12,000 ×g で 10 分間遠心した。上清を回収し室温で 5 分間静置した後、クロロホルムを加えて 15 秒間激しく振盪した。室温で 10 分間静置し、4°C、12,000 ×g で 15 分間遠心し、3 相に分かれたサンプルから水相を回収した。水相にイソプロパノールを加えて混合し、室温で 10 分間静置した。4°C、12,000 ×g で 10 分間遠心し、上清を除去した。沈澱した白色ペレットを 75%エタノールで洗浄し、4°C、7,500 ×g

で5分間遠心してエタノールを除去した後、10分間程度乾燥させ、ペレットが半透明になったところで RNase free の蒸留水で溶解した。RNA 濃度は分光光度計(NanoDrop 2000c、Thermo Fisher Scientific)により 260 nm における吸光度を測定して算出した。RNA サンプルは-80°C で保存した。

RNA サンプルにDNase I (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific)を室温、15分間処置した。EDTAの添加及び65°Cの加熱により酵素反応を止めた。サンプルについてcDNA合成キットのReverTra Ace (東洋紡、大阪、日本)を用いてOligo dT primerにより逆転写反応を行った。

得られたcDNA (75 ng/reaction)を200 μ M dNTP、0.5 μ M プライマーと混合して、Taqポリメラーゼ(Roche、Basel、Switzerland)により増幅した。用いたプライマーを次表に示す。

遺伝子	(product size)	Forward
		Reverse
<i>Kcnj8</i> (Kir6.1)	(212 bp)	5'-AAGCGCAACTCTATGAGAAG-3' 5'-ACCAGAACTCAGCAAACCTGT-3'
<i>Kcnj11</i> (Kir6.2)	(297 bp)	5'-CGCATGGTGACAGAGGCAATG-3' 5'-GTGGAGAGGCACAACCTTCGC-3'
<i>Abcc8</i> (SUR1)	(558 bp)	5'-TGCCAGCTCTTTGAGCATTG-3' 5'-AGGATGATACGGTTGAGCAGG-3'
<i>Abcc9</i> (SUR2A)	(155 bp)	5'-TTGTTCGAAAGAGCAGCATAC-3' 5'-GCCCCGATCCATAATAGAGG-3'
<i>Abcc9</i> (SUR2B)	(152 bp)	5'-TTGTTCGAAAGAGCAGCATAC-3' 5'-AGCAGTCAGAATGGTGTGAACC-3'
<i>Actb</i> (β -actin)	(280 bp)	5'-TGTCACCAACTGGGACGATA-3' 5'-ACCCTCATAGATGGGCACAG-3'

サーマルサイクラー(PC320、ASTECH、福岡、日本)を用いて、94°C、1分(initial denaturation)の後、94°C、30秒(denaturation)、55°C (Kir6.1、SUR2A)、58°C (Kir6.2、SUR2B)又は60°C (SUR1、 β -actin)、30秒(annealing)、72°C、30秒(elongation)を1サイクルとした30サイクル、続いて72°C、4分(final elongation)という反応条件でPCRを行った。

PCR産物を0.1 μ g/mlエチジウムブロマイド(同仁化学)を含んだTBE緩衝液で作製した1.5%

agarose gelにアプライして、100 Vで約30分間電気泳動を行った。泳動後のゲルを紫外線下で観察し、PCR産物のバンドを検出した。

D リアルタイム PCR 法

RT-PCR 法と同様の手順で RNA 抽出及び逆転写反応を行って cDNA を合成した。得られた cDNA (50 ng/reaction)に 0.5 μ M プライマーと Thunderbird SYBR qPCR Mix (東洋紡)を混合してリアルタイム PCR を行った。用いたプライマーを次表に示す。

遺伝子	(product size)	Forward
		Reverse
<i>Trpa1</i> (TRPA1)	(193 bp)	5'-TGCTGAGATCGACGGGAGTG-3'
		5'-GGGTATGCCAACTCATTCTGAAC-3'
<i>Gapdh</i> (GAPDH)	(218 bp)	5'-GTCGGTGTGAACGGATTTG-3'
		5'-TGGAAGATGGTGATGGGTTT-3'

Eco Real Time PCR System (Illumina、San Diego、CA、USA)を用いて、95°C、1 分(initial denaturation)の後、95°C、15 秒(denaturation)、60°C、30 秒(annealing)を 1 サイクルとした 40 サイクルという反応条件で PCR を行った。融解曲線分析により PCR 産物の確認を行った。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)をリファレンス遺伝子として、サイトカイン無処置細胞群の発現量を基準として $\Delta\Delta C_t$ 法で相対定量解析を行った。

E 5-HT 放出測定法

Trypsin 処理後 RPMI1640 培地に分散した RIN14B 細胞を 60 mm のシャーレに 2.5×10^5 cells/ml の密度で播き、37°C、5% CO₂ 下で 80-100%コンフルエントになるまで(約 48 時間)培養した。培地を除去し、5-HT 取込み阻害薬 fluoxetine (2 μ M)を含んだ栄養液に置換して

37°C で 30 分間前処置した。H₂S 放出剤を含む栄養液に交換して 37°C、15-30 分間処置し、氷上に置くことで反応を止めた後、上清と細胞をそれぞれ回収した。上清を 800 ×g で 2 分間遠心して細胞の混入を除いた後、終濃度 0.4 N になるように perchloric acid (PCA) を加えた。細胞の付着したシャーレにも 0.4 N PCA を含んだ栄養液を加え、スクレイパーで細胞を剥がしてエッペンチューブに回収した。それぞれ 12,000 ×g で 2 分間遠心し、その上清に K₂HPO₄ を終濃度 0.29 M になるように加え中和した。再び 12,000 ×g で 2 分間遠心して得られた上清をサンプルとした。

サンプル中の 5-HT を高速液体クロマトグラフィーによって分離し、電気化学検出器を用いて検出した。移動相としてクエン酸バッファー(0.1 M 酢酸ナトリウム、0.1 M クエン酸、pH 3.5)とメタノールを 81 : 19 で混和し、5 mg/L EDTA-2Na (同仁化学)と 190 mg/L 1-オクタスルホン酸ナトリウムを加えた。移動相をデガッサ(DG-350、エイコム、京都、日本)で脱気し、ポンプ(Dual Pump KP-12、フロム、東京、日本)により流速 0.5 ml/min で流した。オートサンプラー(Autosampler Model 33、システム・インスツルメンツ、東京、日本)を用いて、サンプルを 100 µl ずつ適用した。分離カラムにオクタデシル基結合シリカゲル(ODS)を充填剤としたカラム(EICOMPAK SC-5ODS、3.0×150 mm、エイコム)を用い、分離条件を一定にするためにカラムオーブン(ATC-10、エイコム)でカラムを 30°C に保温した。分離能を保持するため、分離カラムの前にプレカラム(AC-ODS、4×30 mm、エイコム)を取り付けた。電気化学検出器(ECD-300、エイコム)の電極電位は+450 mV に設定した。検出結果をクロマトデータ解析装置(Power Chrom EPC-500、エイコム)を用いて解析した。5-HT の保持時間は約 15-16 分であり、そのピーク下面積を測定した。5-HT 溶液を用いて検量線を作成し、サンプル中の 5-HT 量を算出した。上清サンプルの 5-HT 量と細胞サンプルの 5-HT 量の合計を細胞内 5-HT の全体量とし、全体量に対する上清サンプルの 5-HT 量の割合を 5-HT 放出率(% of content)とした。

F 細胞内サルフェン硫黄量測定法

細胞を poly-D-lysine でコーティングしたカバーガラスに播き、37°C、5% CO₂ 下で 24 時間培養した。無血清 RPMI1640 培地で 1 回洗浄し、無血清培地で希釈し界面活性剤 0.003% cremophor EL を添加した 50 µM SSP4 (同仁化学)を 20 分間、37°C で処置した。無血清培地で 2-3 回洗浄した後、SSP4 蛍光を測定した。

SSP4 の蛍光をレーザー光源(C6979、浜松ホトニクス)、波長切り替え装置(C8214、浜松ホトニクス)、CCD カメラ(ORCA-ER、浜松ホトニクス)を取り付けた倒立顕微鏡(Diaphot 300、ニコン)で検出した。細胞内 Ca²⁺濃度測定法と同様に、実験は全て室温で、栄養液を常に灌流しながら行った。細胞に 482 nm の励起光を 183 ミリ秒間照射し、励起された 515 nm の蛍光を CCD カメラで 5 秒間隔で検出し、画像解析ソフトウェア AquaCosmos で蛍光強度を測定した。蛍光強度からバックグラウンドを差し引き、薬物適用直前の値を 1.0 として標準化した値を示した。

G 使用試薬

使用した薬物は以下の通りである。Sodium hydrosulfide (NaHS、Strem Chemicals、Newburyport、MA、USA)、glibenclamide (Research Biochemicals Incorporated、Natick、MA、USA)、allyl isothiocyanate (mustard oil)、diazoxide、diltiazem hydrochloride (和光純薬、大阪、日本)、fluoxetine hydrochloride、HC-030031 (Tocris bioscience、Bristol、UK)、sodium sulfide (Na₂S) 及び tolbutamide (Sigma-Aldrich/Merck)、sodium trisulfide (Na₂S₃、同仁化学)、recombinant rat IL-1β (Pepro Tech、Rocky Hill、NJ、USA)、recombinant rat TNF-α (Merck Millipore、Darmstadt、Germany)。その他の試薬については和光純薬またはナカライテスクの特級を用いた。栄養液の NaCl 濃度を 120 mM とし、そこに KCl 20 mM を加えたものを高濃度 K⁺溶液とした。

H 統計処理

平均値±標準誤差(n=例数)でデータを示した。Dunnett's test または unpaired Student's *t*-test で有意差検定を行い、 $P < 0.05$ を有意水準とした。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加反応の曲線下面積(AUC)の算出及び濃度反応関係の Sigmoid 曲線の作成をデータ解析・図表作成ソフトウェア OriginLab (Northampton, MA, USA)を用いて行った。

III 実験成績

A 細胞内 Ca^{2+} シグナルに対する H_2S の作用

H_2S の放出剤である NaHS を用いて、RIN14B 細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) に対する H_2S の作用を調べた。RIN14B 細胞は非刺激時においてもほとんどの細胞が自発的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変動を示したが(図 1A)、一部の細胞では変動が小さい(図 1B)、あるいは全く見られなかった(図 1C)。細胞に NaHS (300 μM) を 10 分間適用すると、ベースラインの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化に加えて、この自発的な Ca^{2+} 変動が抑制されるなど複数の反応パターンが見られた。そこで、図 1A のように変化量 25 nM 以上の自発的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変動を 5 分間当たり 2 回以上示した細胞(全体の 80-90%)を対象に、NaHS に対する反応を以下の 3 つのパターンに分類した; 1) NaHS 適用中に自発反応の頻度と振幅の減少のみを示した(Inhibition、図 1D)、2) 自発反応の抑制に続いて $[\text{Ca}^{2+}]_i$ のベースラインの増加を示した(Inhibition + Increase、図 1E)、3) NaHS 適用後自発反応の抑制なく $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加のみを示した(Increase、図 1F)。各反応パターンを示す細胞の割合は Inhibition が 37% (19/51 細胞)、Inhibition + Increase が 24% (12/51 細胞)、Increase が 25% (13/51 細胞) だった(図 1G)。NaHS (1 μM -3 mM) の適用によって $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加を示した細胞の割合は NaHS 濃度依存性に増加した。一方、自発反応の抑制を示した細胞の割合も 300 μM をピークとして NaHS 濃度依存性に増加したが、高濃度の NaHS (≥ 1 mM) では減少し、NaHS (3 mM) ではほとんどの細胞が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加反応のみを示した(図 1H)。

B H_2S の Ca^{2+} シグナル抑制作用

H_2S が RIN14B 細胞に発現する transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) チャネルを活性化し、細胞外からの Ca^{2+} 流入を引き起こすことによって $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加反応を生じることを以前

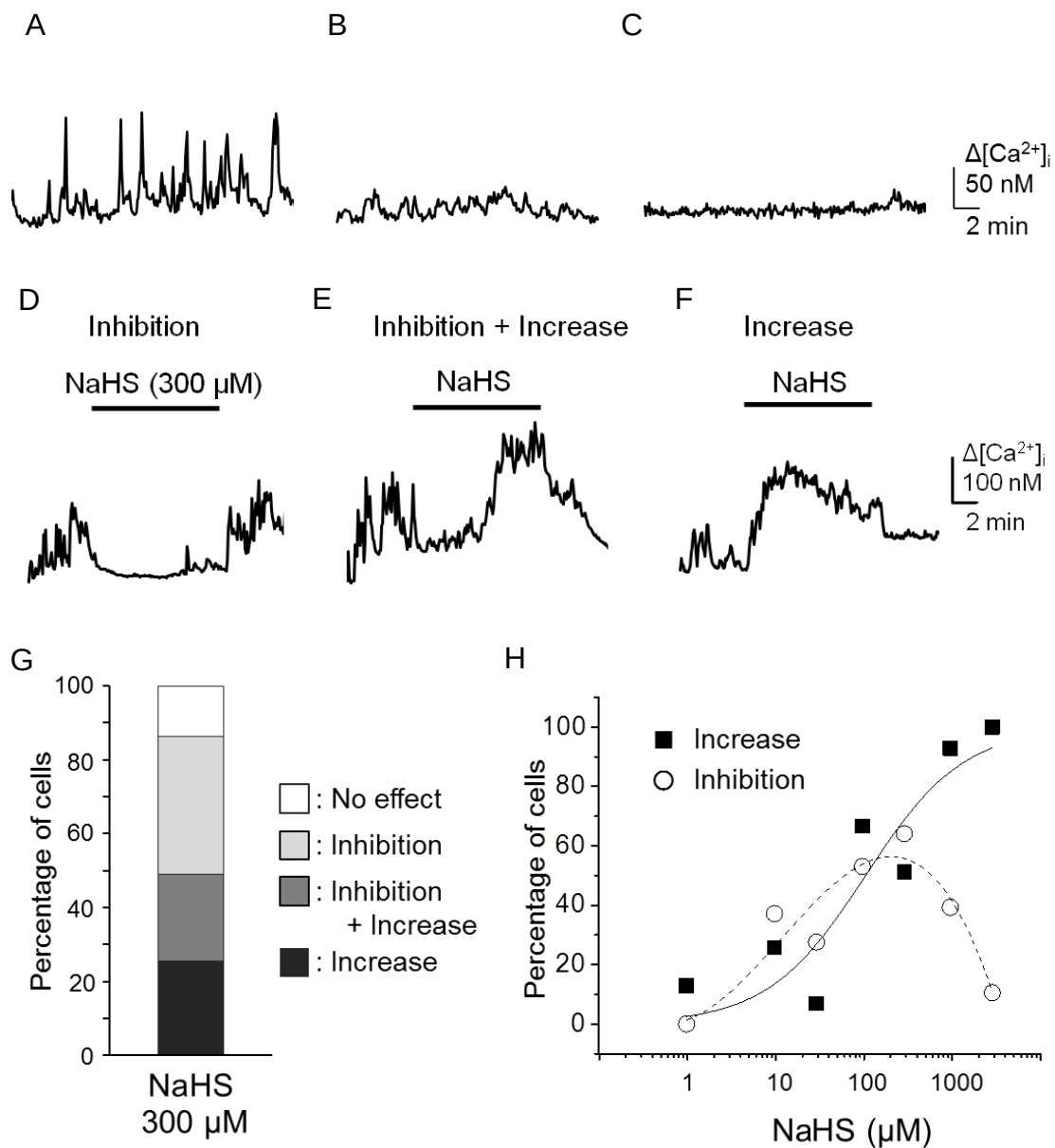


図1 H_2S による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 反応

(A-C) RIN14B 細胞で見られる自発的 Ca^{2+} シグナルの典型例(A 及び B: 自発反応を示した例、C: 自発反応を示さなかった例)。(D-F) NaHS (300 μM)を10分間適用した時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 反応の典型例。(D)自発的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変動が抑制される場合(Inhibition)。(E)抑制の後 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が増加する場合(Inhibition + Increase)。(F) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が適用後すぐ増加する場合(Increase)。(G) 各反応パターンを示した細胞数の割合($n=51$)。(H)反応パターン($\circ$: Inhibition、 $\blacksquare$: Increase)の割合の NaHS 濃度依存性($n=28-66$)。(E)のような抑制・増加の両方を示した細胞は両カテゴリーにカウントした。

卒業論文(氏家絢子、平成 24 年度)で報告した。これに加えて、本研究では H_2S によって自発的な Ca^{2+} シグナルの抑制反応が観察された。 H_2S は ATP 感受性 K^+ (K_{ATP}) チャンネルの開口を介した細胞膜の過分極によって、膵臓 β 細胞のインスリン分泌の抑制や血管平滑筋の弛緩を引き起こすことが報告されている(Zhao *et al.*, 2001, Yang *et al.*, 2005)。そこで、RIN14B 細胞で観察された H_2S の自発的 Ca^{2+} シグナルの抑制作用に対する K_{ATP} チャンネルの関与について検討した。

1. RIN14B 細胞に発現する K_{ATP} チャンネルサブユニットの同定

K_{ATP} チャンネルは、ポアを構成する内向き整流性 K^+ チャンネルサブユニットの Kir と補助タンパク質の sulfonyl urea receptor (SUR) がそれぞれ 4 つずつ集まって構成されている(Hibino *et al.*, 2010)。Kir は Kir6.1 及び Kir6.2 の 2 種類、SUR は SUR1 及び SUR2A、SUR2B の 3 種類のサブタイプがあり、細胞によってその構成が異なる。RIN14B 細胞に発現しているサブタイプを RT-PCR 法によって検討したところ、Kir6.2 及び SUR1 の mRNA の発現が認められたが、Kir6.1、SUR2A 及び SUR2B mRNA は検出されなかった(図 2)。以上の結果から、RIN14B 細胞に K_{ATP} チャンネルが発現していることが示され、このチャンネルは Kir6.2 と SUR1 で構成されていると考えられた。

2. H_2S による Ca^{2+} シグナルに対する K_{ATP} チャンネル阻害薬の効果

次に、 H_2S の Ca^{2+} シグナル抑制作用に対する Kir6.2/SUR1 に特異的な K_{ATP} チャンネル阻害薬 glibenclamide 及び tolbutamide の効果を調べた。Glibenclamide の 10 μM 以上の適用により、自発的 Ca^{2+} シグナルの増強とベースラインの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加が生じた(図 3)。そのため、glibenclamide 存在下での H_2S の作用を評価するために、単独では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に影響を与えなかつ

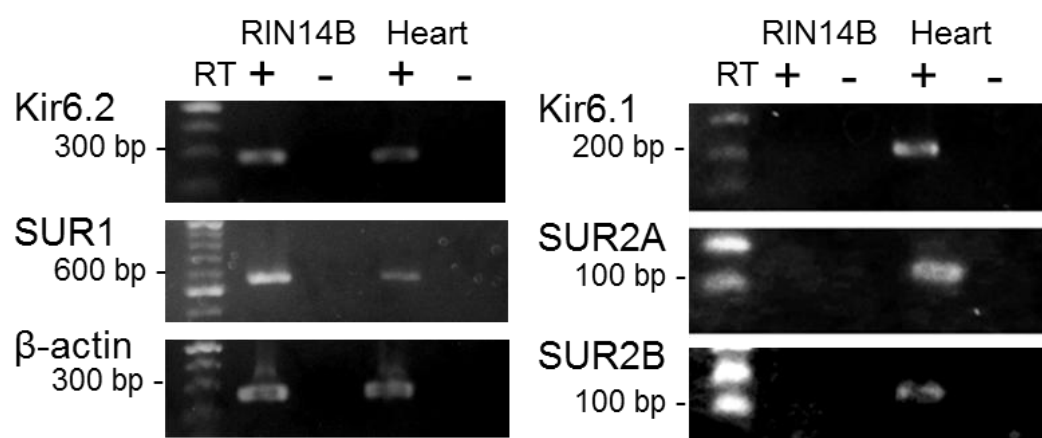


図2 RIN14B細胞における K_{ATP} チャネルサブユニットの発現

RIN14B細胞及びラット心臓(陽性対照)における K_{ATP} チャネルサブユニットの mRNA 発現。RT +/-は逆転写反応の有無を示す。

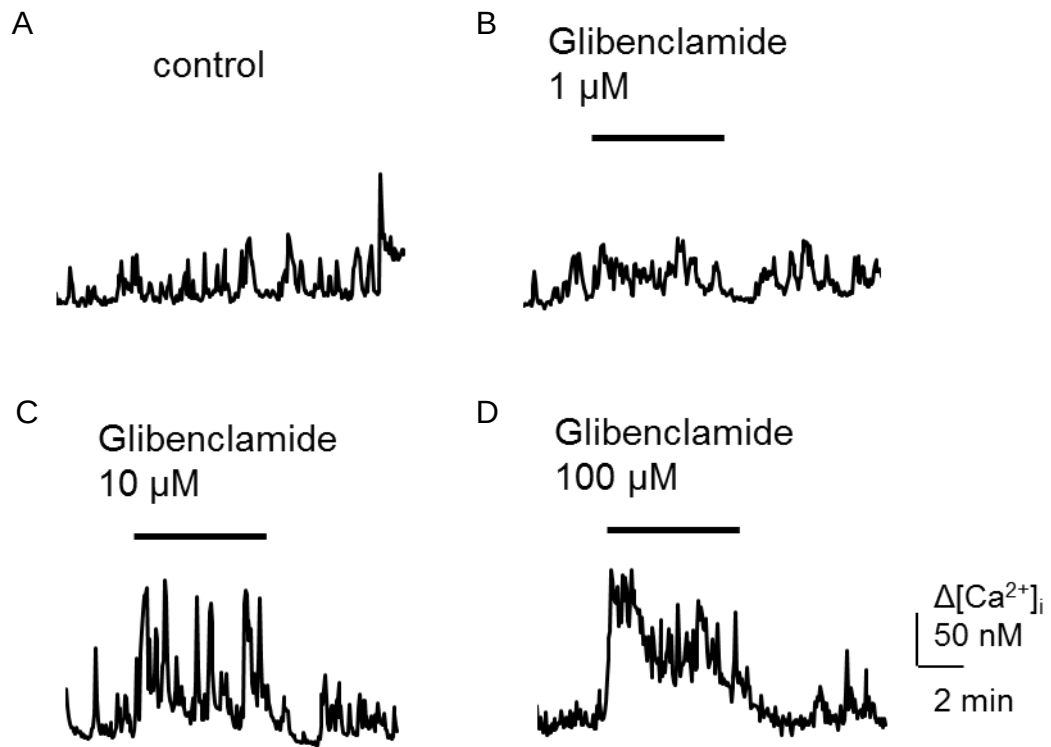


図 3 Glibenclamide の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に対する作用

(A-D) Glibenclamide (1-100 μM 、10 分間)を適用した時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 反応の典型例。

た 1 μM の glibenclamide を用いて、 H_2S 作用への効果を検討した。Glibenclamide (1 μM) 存在下で NaHS (300 μM) を適用すると、適用後すぐに $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加が見られた(図 4A)。Glibenclamide 存在下での反応パターンとしては、NaHS による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加(Increase)は 87%の細胞で起き、抑制作用(Inhibition)は見られなくなった(図 4B)。Glibenclamide は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加を示す細胞の割合だけでなく $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加反応の大きさも増強した(図 4C、D)。Glibenclamide 非存在下では、NaHS (1 μM -1 mM)適用 2 分間では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加が見られず、より長く(10 分間)適用すると NaHS 濃度依存性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加が見られた。一方 glibenclamide 存在下では、適用 2 分間でも NaHS 濃度依存性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加が起きたことから、NaHS による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加反応の立ち上がりが早くなっていることが示された。また、NaHS 適用 10 分間の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加反応の大きさも glibenclamide によって顕著に増強された。

TRPA1 発現 HEK293T 細胞やマウス背根神経節細胞では、glibenclamide (1-200 μM)は TRPA1 を活性化すると報告されており (Babes *et al.*, 2013)、RIN14B 細胞での glibenclamide ($\geq 10 \mu\text{M}$)による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加は TRPA1 活性化が原因で生じた可能性がある。そこで、TRPA1 には作用しないより選択的な K_{ATP} チャネル阻害薬として (Babes *et al.*, 2013)、tolbutamide の効果を検討した。Tolbutamide (400 μM)は単独では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に影響を与えなかった(図 5A)。Glibenclamide (1 μM)存在下と同様に、tolbutamide (400 μM)存在下では NaHS (300 μM)適用による自発的 Ca^{2+} シグナルの抑制はなく、ほとんどの細胞で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加反応が見られ、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加反応の大きさも増強された(図 5B-D)。

H_2S は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加により RIN14B 細胞から 5-HT 放出を引き起こすことを以前に報告した。そこで、glibenclamide 存在下で NaHS を 15 分間適用し 5-HT 放出を測定したが、NaHS (10-100 μM)による濃度依存性の 5-HT 放出反応に glibenclamide (1 μM)は影響しなかった(図 6)。

C 炎症条件下における H_2S の作用

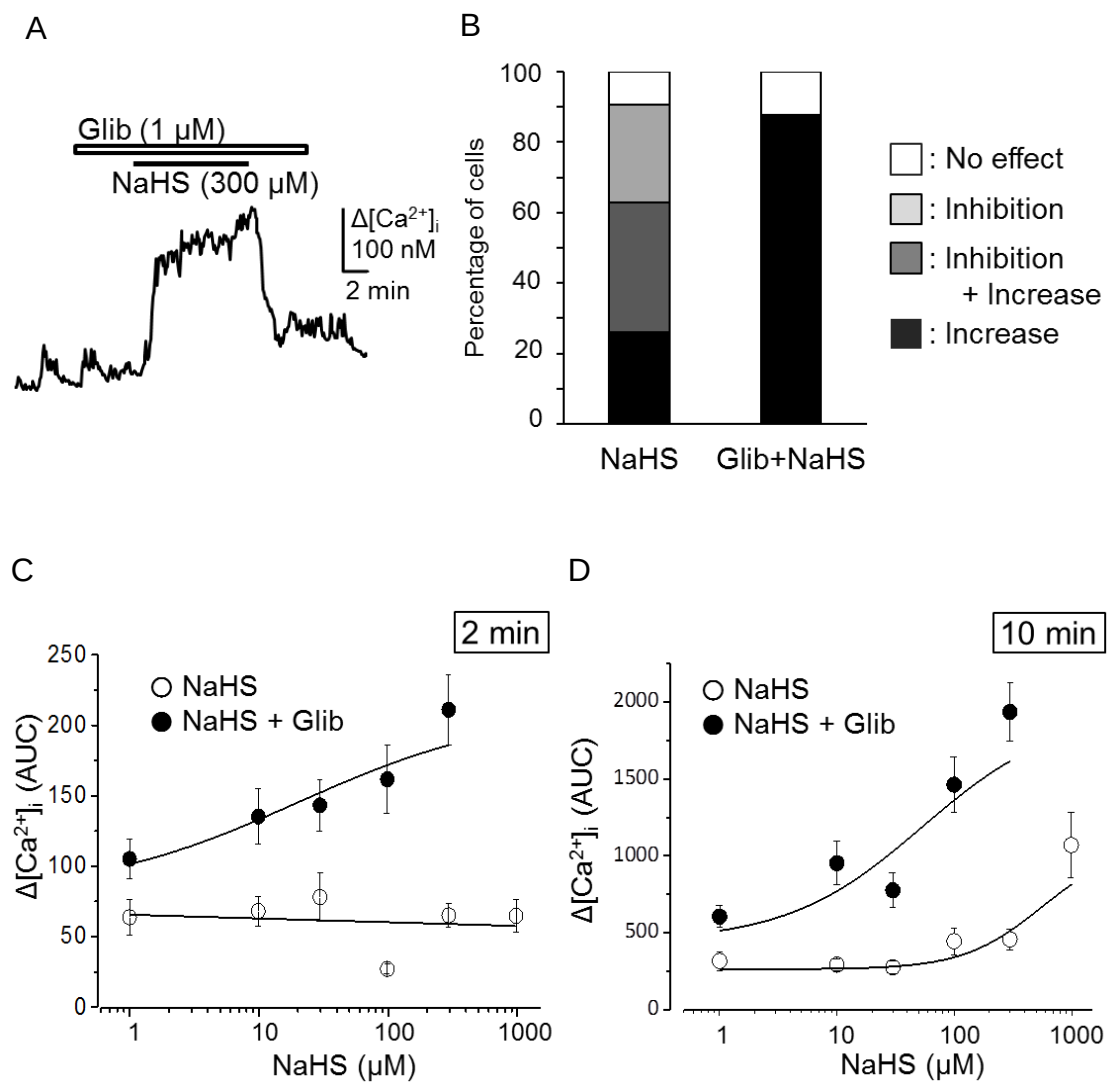


図4 H₂S 惹起[Ca²⁺]_i 反応に対する glibenclamide の効果

(A) Glibenclamide (1 μ M、Glib)存在下での NaHS に対する[Ca²⁺]_i 反応の典型例。阻害薬は NaHS 適用 5 分前から処置した。(B) Glibenclamide 存在下での反応パターンの割合 (n=49-56)。(C、D) Glibenclamide 存在下での[Ca²⁺]_i 反応の曲線下面積(AUC)の NaHS 濃度依存性(NaHS 適用後 2 分間(C)及び 10 分間(D))。○: Glib 非存在下(n=11-37)、●: Glib 存在下(n=41-49)。

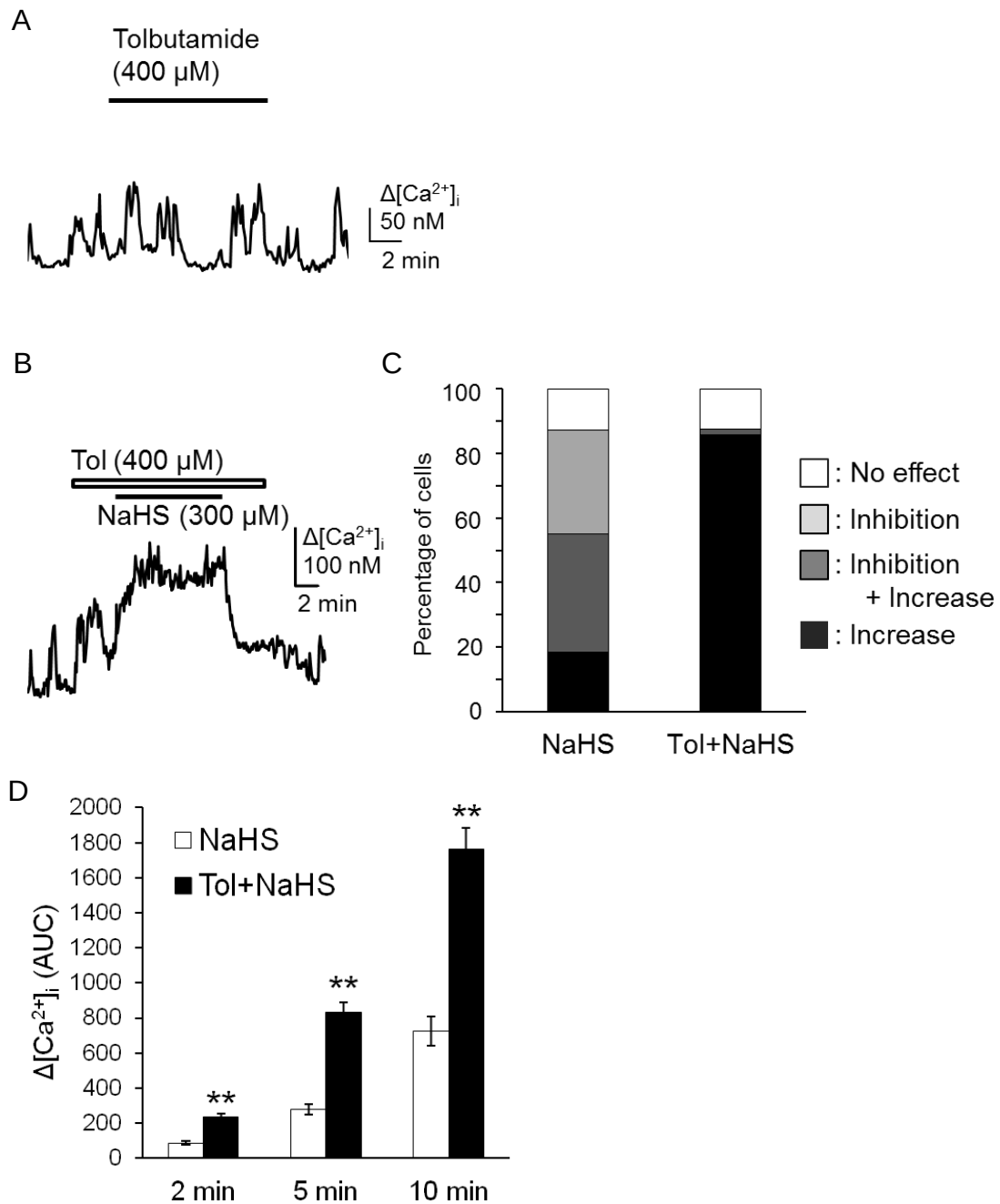


図5 H_2S 惹起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 反応に対する tolbutamide の効果

(A) Tolbutamide (400 μ M、10 分間)を適用した時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 反応の典型例。(B) Tolbutamide (400 μ M、Tol)存在下での NaHS に対する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 反応の典型例。阻害薬は NaHS 適用 5 分前から処置した。(C) Tolbutamide 存在下での反応パターンの割合(n=43-60)。(D) Tolbutamide 存在下での $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 反応の曲線下面積(AUC)を NaHS (300 μ M)適用後 2、5 及び 10 分間で測定した。 ** $P < 0.01$ vs. NaHS (unpaired Student's *t*-test)

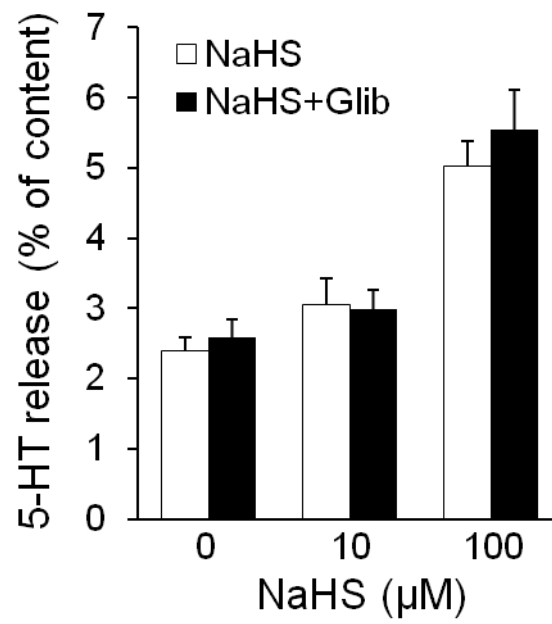


図6 H₂S 惹起 5-HT 放出反応に対する K_{ATP} チャンネル阻害薬の効果

Glibenclamide (1 μM)存在下における NaHS (10-100 μM、15 分間)による 5-HT 放出率(n=8)。

ここまでの結果から、 H_2S が TRPA1 チャンネルを介して $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加を引き起こすことに加えて、 K_{ATP} チャンネルを介して $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 反応を抑制するという双方向性の作用を示すことが明らかになった。TRPA1 を介した反応は炎症性サイトカインの処置によって増強されることが報告されている(Hatano *et al.*, 2012; El Karim *et al.*, 2015; Meng *et al.*, 2016)。そこで、炎症性サイトカインの処置により H_2S の双方向性作用がどのような影響を受けるか検討した。

1. H_2S による Ca^{2+} シグナルに対する炎症性サイトカインの効果

以下の実験からは、 H_2S の放出剤としてより純度の高い Na_2S を用いた(Greiner *et al.*, 2013)。 Na_2S (100 μM)を細胞に 10 分間適用すると、 NaHS と同様に Ca^{2+} シグナルに対する抑制と増加による複数の反応パターンが見られた(図 7A-C)。細胞に炎症性サイトカイン IL-1 β (1-10 ng/ml、24 h)を処置すると、IL-1 β 濃度依存性に増加反応を示す細胞の割合が増えた。IL-1 β (3 ng/ml)処置によって、Inhibition 又は Inhibition + Increase を示す細胞の割合はそれぞれ 50%から 12%、22%から 9%に減少し、Increase を示す細胞は 17%から 60%に増加した(図 7D)。また、増加反応の大きさも 3 ng/ml をピークとして IL-1 β 濃度依存性に大きくなった(図 7F)。

別のサイトカインとして TNF- α (0.05-0.5 ng/ml、48 h)の効果についても検討した(図 7E、G)。TNF- α は、 Na_2S (100 μM)による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 反応パターンの割合及び反応の大きさに有意な影響を与えなかった。

2. IL-1 β 処置細胞における H_2S の作用

a) K_{ATP} チャンネル開口薬の効果

Na_2S で生じる Ca^{2+} 増加反応に対する IL-1 β の増強効果に、 H_2S の抑制作用の標的分子である K_{ATP} チャンネルが関与しているか調べるため、IL-1 β 処置細胞に対する K_{ATP} チャンネル開

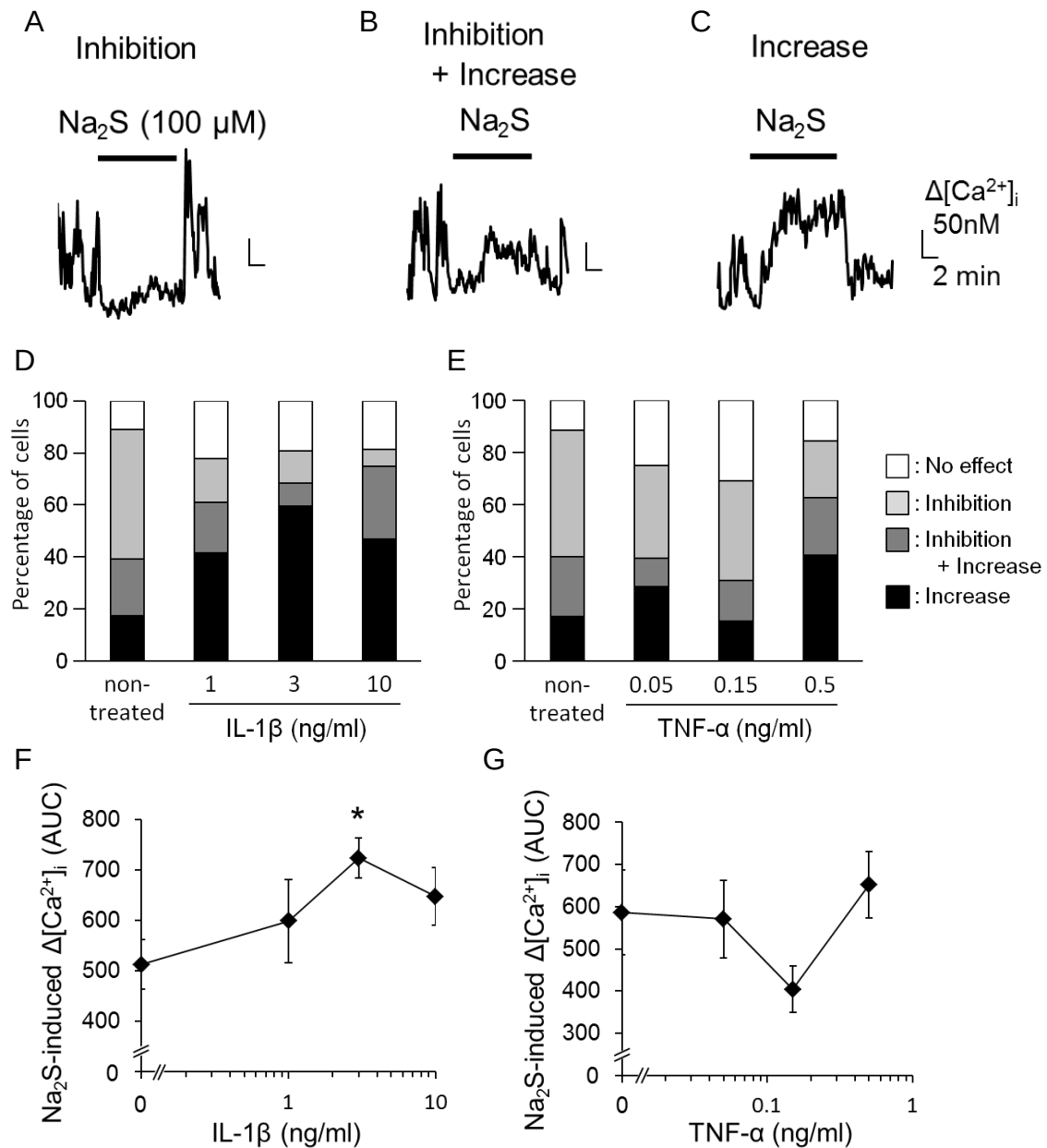


図7 H₂S 惹起[Ca²⁺]_i反応への炎症性サイトカインの効果

(A-C) Na₂S (100 μM)を10分間適用した時の[Ca²⁺]_i反応の典型例。(A)自発的な[Ca²⁺]_i変動が抑制される場合(Inhibition)。(B)抑制の後[Ca²⁺]_iが増加する場合(Inhibition + Increase)。(C) [Ca²⁺]_iが適用後すぐ増加する場合(Increase)。(D、E) IL-1β (1-10 ng/ml、24 h、n=32-57、D) または TNF-α (0.05-0.5 ng/ml、48 h、n=16-43、E)処置細胞における各反応パターンを示した細胞数の割合。(F、G) IL-1β (1-10 ng/ml、24 h、n=8-34、F)または TNF-α (0.05-0.5 ng/ml、48 h、n=5-25、G)処置での Na₂S による[Ca²⁺]_i増加反応の曲線下面積(AUC)。

**P* < 0.05 vs. non-treated (Dunnett's test)

口薬の効果を検討した(図 8)。K_{ATP} チャンネル開口薬 diazoxide (100 μ M)を 10 分間細胞に適用すると、自発反応の抑制が見られた。この抑制作用に IL-1 β (3 ng/ml)処置と無処置群間で有意な差は見られなかった。

b) TRPA1 及び電位依存性 Ca²⁺チャンネル阻害薬の効果

次に、IL-1 β 処置細胞での H₂S による[Ca²⁺]_i増加反応に対する TRPA1 の関与について検討した。また、以前の研究(氏家絢子卒業論文、平成 24 年度)で RIN14B 細胞が電位依存性 L-type Ca²⁺チャンネルを発現している可能性が示されたため、L-type Ca²⁺チャンネルの関与についても、その阻害薬を用いて検討した。

選択的 TRPA1 阻害薬 HC030031 (30 μ M)は、IL-1 β 無処置群・処置群どちらにおいても Na₂S (100 μ M)による[Ca²⁺]_i増加を完全に抑制した(図 9)。一方、電位依存性 L-type Ca²⁺チャンネル阻害薬 diltiazem (50 μ M)は、IL-1 β 無処置細胞では Na₂S による[Ca²⁺]_i増加に影響しなかったが、IL-1 β (3-10 ng/ml)処置群では[Ca²⁺]_i増加を部分的に抑制した。この結果から、IL-1 β 処置・無処置どちらにおいても[Ca²⁺]_i増加に TRPA1 が必要であること、また IL-1 β 処置下では H₂S による[Ca²⁺]_i増加に L-type Ca²⁺チャンネルが関与していることが示された。

次に、TRPA1 作動薬 mustard oil の作用に対する IL-1 β の効果を検討した。Mustard oil (10 μ M)の適用により[Ca²⁺]_i増加が起こったが、この反応の大きさに IL-1 β 無処置・処置群の間で有意な差は見られなかった(図 10A-C)。さらに、TRPA1 mRNA 発現量は IL-1 β 処置によって変化はしなかった(図 10D)。また、細胞膜を脱分極させ電位依存性 Ca²⁺チャンネルを活性化させる高濃度 KCl (20 mM)による[Ca²⁺]_i増加反応も、IL-1 β 無処置・処置群の間でその大きさに有意な差は見られなかった(図 11)。これらの結果から、IL-1 β による H₂S 作用の増強効果は、[Ca²⁺]_i反応に関与しているチャンネルの活性や発現の調整とは異なるメカニズムを介している可能性が示唆された。

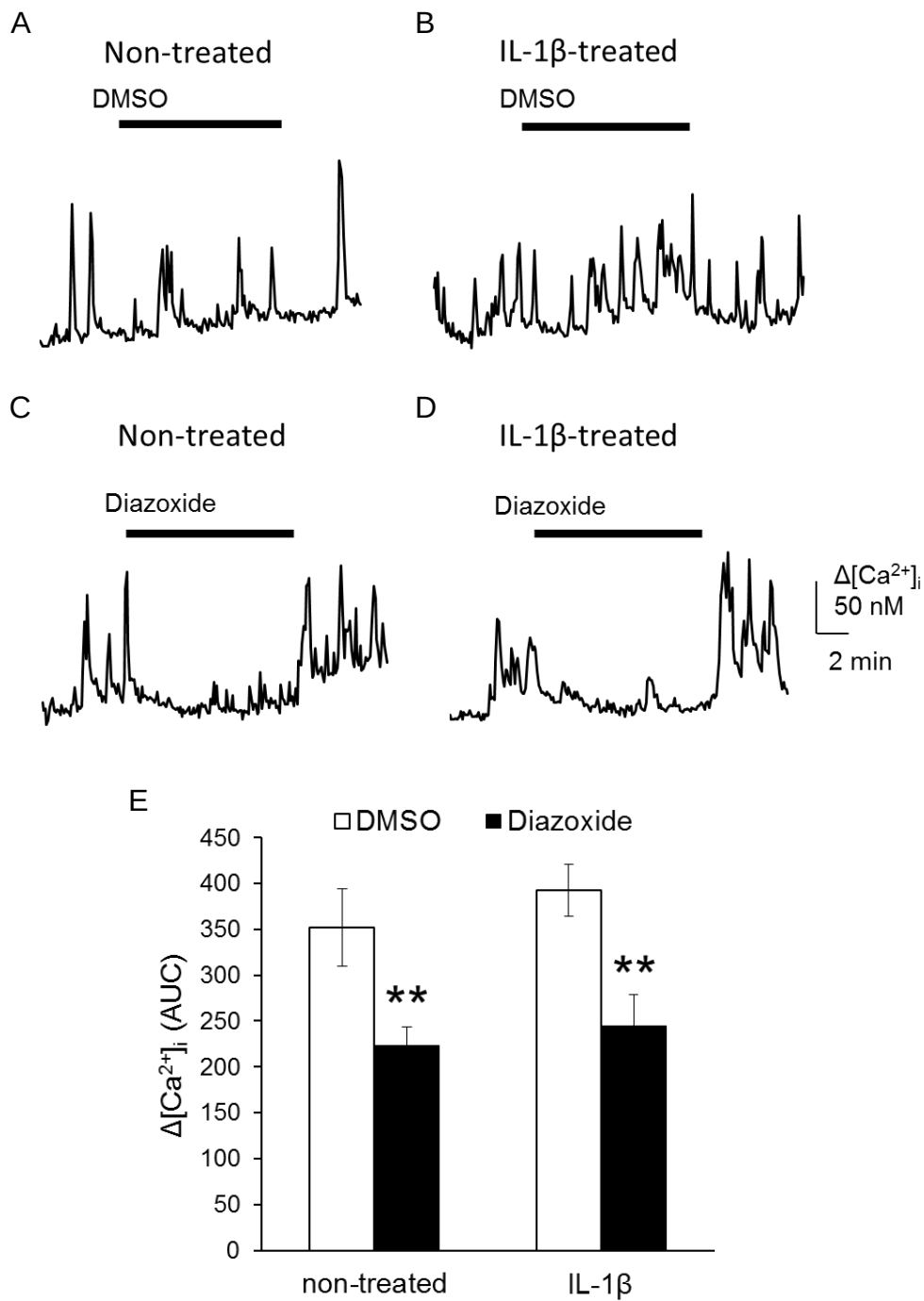


図 8 IL-1 β 処置細胞での K_{ATP} チャンネル開口薬の作用

(A-D)溶媒(0.1% DMSO、A、B)または K_{ATP} チャンネル開口薬 diazoxide (100 μ M、C、D)を 10 分間適用した時の[Ca²⁺]_i反応の典型例(A、C: IL-1 β 無処置、B、D: IL-1 β (3 ng/ml、24 h) 処置)。(E) DMSO または diazoxide 適用時の[Ca²⁺]_i反応の曲線下面積(AUC) (n=12-19)。**P < 0.01 vs. DMSO (unpaired Student's t-test)

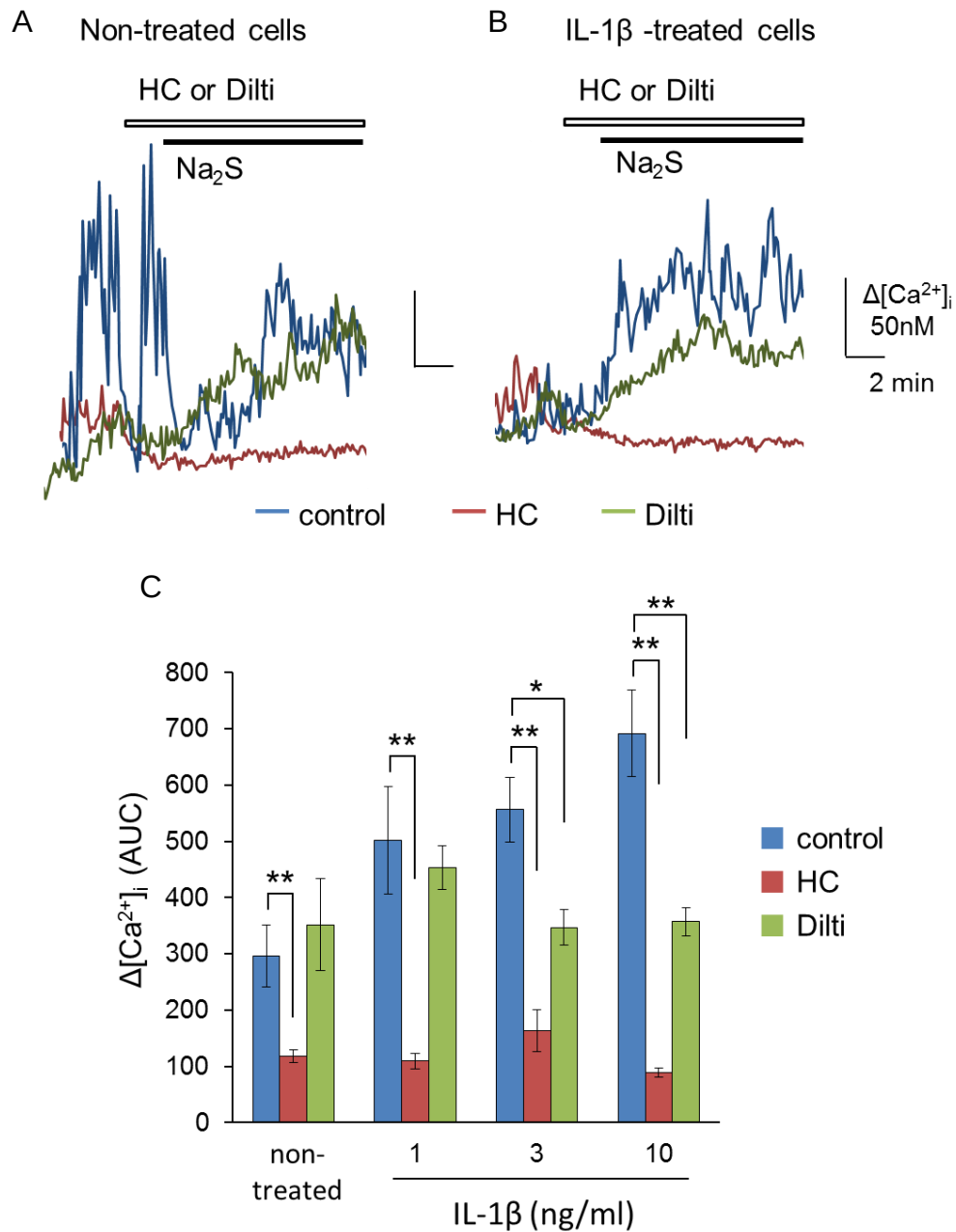


図9 IL-1 β 処置細胞での H₂S 惹起[Ca²⁺]_i 反応に対する TRPA1 及び電位依存性 L-type Ca²⁺ チャンネル阻害薬の効果

(A、B) HC030031 (30 μ M、HC、赤)または diltiazem (50 μ M、Dilti、緑)存在下での Na₂S (100 μ M、10 分間)に対する[Ca²⁺]_i 反応の典型例。青線は阻害薬非存在下での反応例(control)。阻害薬は Na₂S 適用の 2 分前から処置した(A: IL-1 β 無処置、B: IL-1 β (3 ng/ml、24 h)処置)。(C) 阻害薬存在下での Na₂S (100 μ M、10 分間)に対する[Ca²⁺]_i 反応の曲線下面積(AUC) (n=7-21)。* P < 0.05、** P < 0.01 vs. control (Dunnett's test)

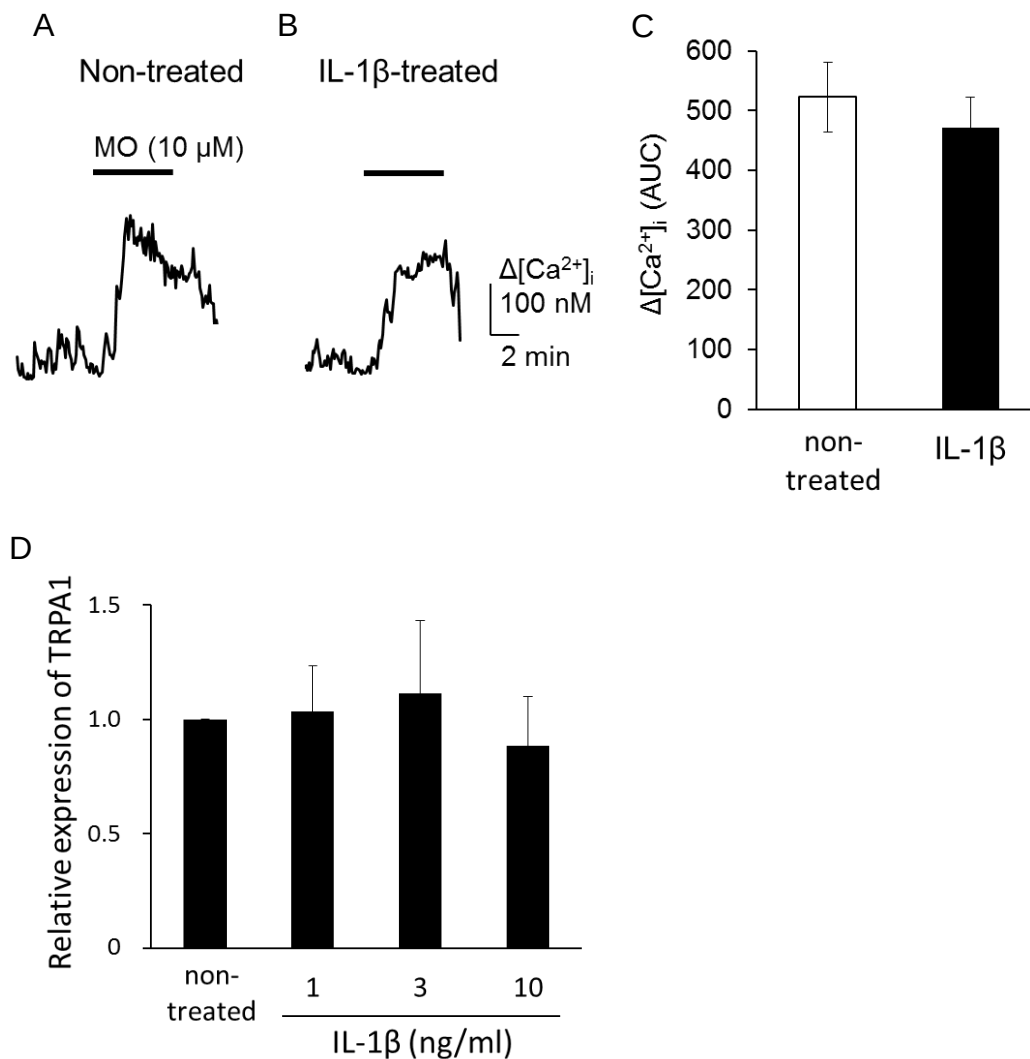


図 10 IL-1 β 処置細胞での TRPA1 作動薬の作用及び TRPA1 発現量

(A、B) TRPA1 作動薬 mustard oil (MO、10 μ M)を 5 分間適用した時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 反応の典型例 (A: IL-1 β 無処置、B: IL-1 β (3 ng/ml、24 h)処置)。 (C) MO による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加反応の曲線下面積(AUC)(n=27-31)。 (D) IL-1 β (1-10 ng/ml、24 h)処置細胞における TRPA1 の相対発現量 (n=3)。

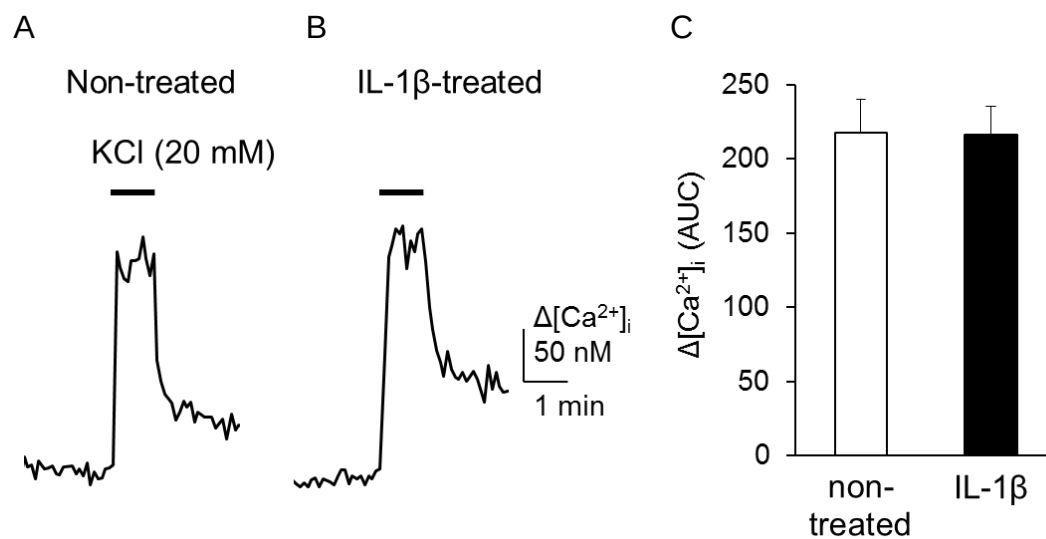


図 11 IL-1 β 処置細胞での高濃度 KCl の作用

(A、B)高濃度 KCl (20 mM)を 1 分間適用した時の $[Ca^{2+}]_i$ 反応の典型例(A: IL-1 β 無処置、B: IL-1 β (3 ng/ml、24 h)処置)。(C)高濃度 KCl による $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応の曲線下面積(AUC) (n=26-31)。

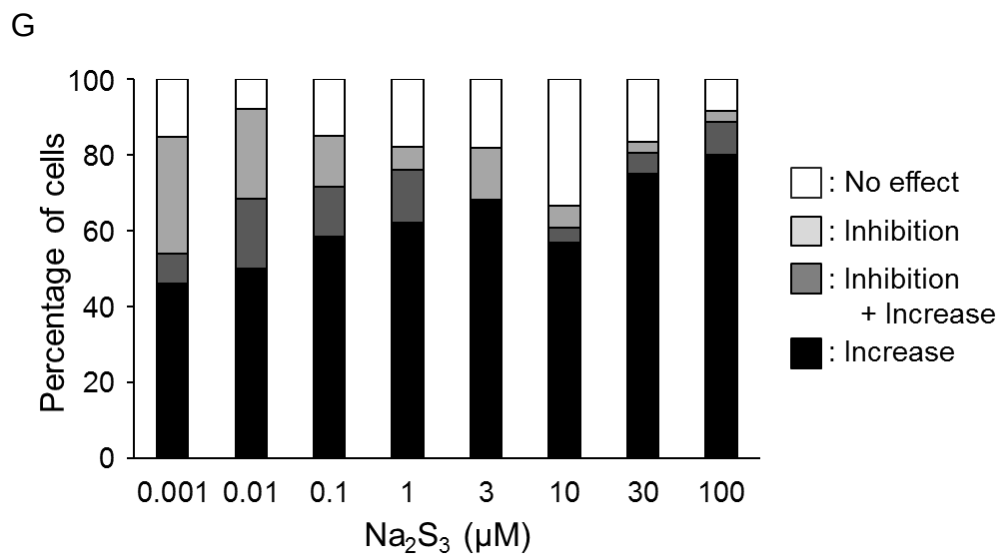
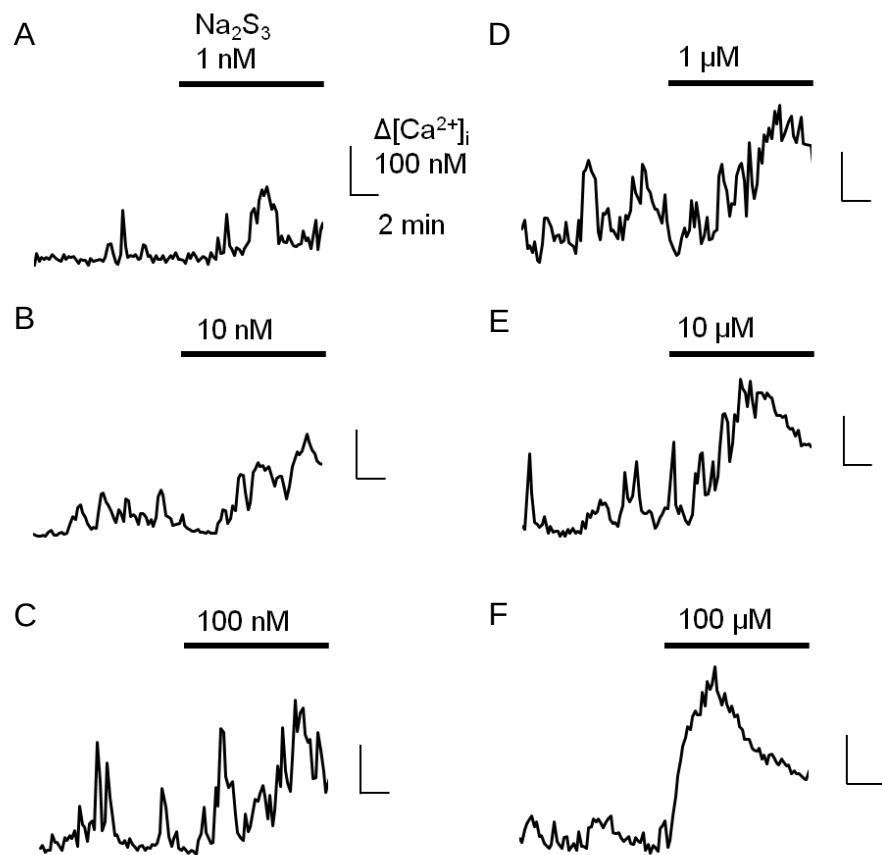
c) ポリサルファイドの関与

H₂S の作用メカニズムとして、反応性の高い酸化数 0 価の硫黄原子 S⁰ (サルフェン硫黄) を多数持つポリサルファイドに変換されることでターゲット分子に作用することが提唱されている(Toohey, 2011; Greiner *et al.*, 2013)。ポリサルファイドは H₂S よりも高い力価で TRPA1 に作用することも報告されている(Kimura *et al.*, 2013, Hatakeyama *et al.*, 2015)。そこで、IL-1 β による H₂S 作用の増強に対するポリサルファイドの関与について検討した。

まず、RIN14B 細胞の[Ca²⁺]_i に対するポリサルファイド Na₂S₃ の効果を検討した。Na₂S₃ (1 nM-100 μ M)を細胞に 5 分間適用すると[Ca²⁺]_i の増加が起こった。この[Ca²⁺]_i 増加反応の立ち上がりまでの時間は濃度依存性に短くなる傾向が見られた(図 12A-F)。Na₂S 適用時と同様に、Na₂S₃ により[Ca²⁺]_i 増加反応だけでなく自発反応の抑制も見られ、Na₂S₃ (1 nM)では Inhibition 又は Inhibition + Increase、Increase を示す細胞の割合はそれぞれが 31%、8%、46%だった。Na₂S₃ 濃度依存性に抑制を示す割合は減少、[Ca²⁺]_i 増加を示す割合は増加し、Na₂S₃ (100 μ M) 適用では Inhibition 又は Inhibition + Increase、Increase を示す細胞の割合はそれぞれ 3%、9%、80%となった(図 12G)。[Ca²⁺]_i 増加反応の大きさも Na₂S₃ 濃度依存性に増加した(図 12H)。これらのポリサルファイドによる[Ca²⁺]_i 反応の大きさ及び反応パターンの割合に対して、IL-1 β (3 ng/ml、24 h)処置は有意な影響を与えなかった(図 12H、I)。

次に、サルフェン硫黄に特異的な蛍光プローブ SSP4 を用いて、細胞内ポリサルファイドの変動を調べた(図 13)。細胞に Na₂S (100 μ M)を適用すると SSP4 の蛍光強度が増加し、適用後 2-10 分間その蛍光強度は維持された。IL-1 β (3 ng/ml、24 h)処置細胞では、SSP4 蛍光強度の増加が有意に大きくなった。以上の結果から、IL-1 β 処置によって H₂S からポリサルファイドへの変換が促進されることにより H₂S 作用が増強されていることが示唆された。

3. H₂S による 5-HT 放出反応に対する炎症性サイトカインの効果



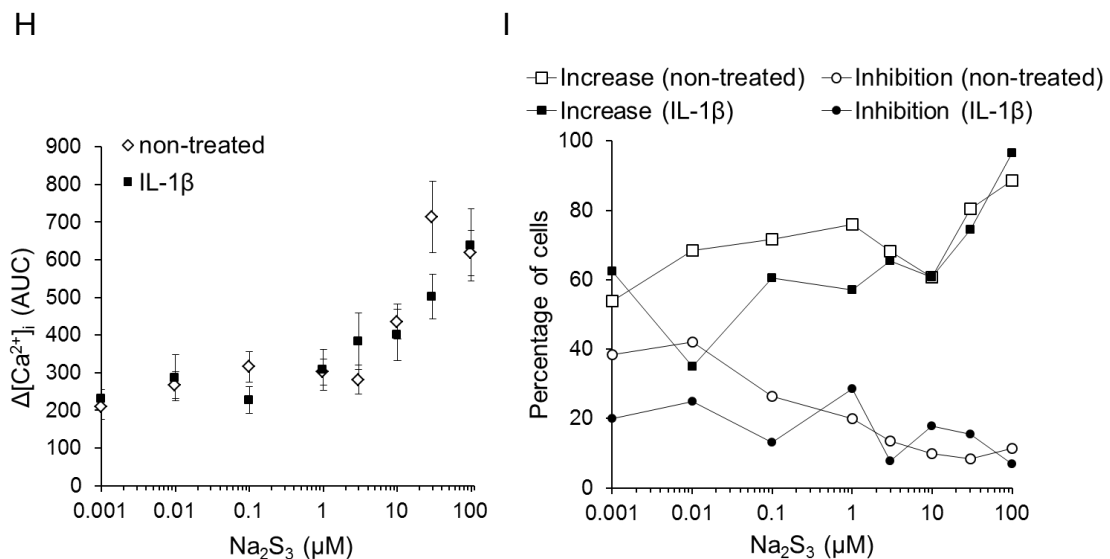


図 12 RIN14B 細胞におけるポリサルファイドの作用と IL-1 β 処置の効果

(A-F) Na_2S_3 (1 nM-100 μM)を 5 分間適用した時の $[Ca^{2+}]_i$ 反応の典型例。(G) Na_2S_3 (1 nM-100 μM)による反応パターンの割合(n=22-53)。(H) Na_2S_3 (1 nM-100 μM)を 5 分間適用した時の $[Ca^{2+}]_i$ 反応の曲線下面積(AUC) ($\diamond$: IL-1 β 無処置、n=22-53、 $\blacksquare$: IL-1 β (3 ng/ml、24 h)処置、n=20-40)。(I) 反応パターン($\circ\bullet$: Inhibition、 $\square\blacksquare$: Increase)の割合の Na_2S_3 濃度依存性 ($\circ\square$: IL-1 β 無処置、n=22-53、 $\bullet\blacksquare$: IL-1 β (3 ng/ml、24 h)処置、n=28-66)。抑制・増加の両方を示した細胞は両カテゴリーにカウントした。

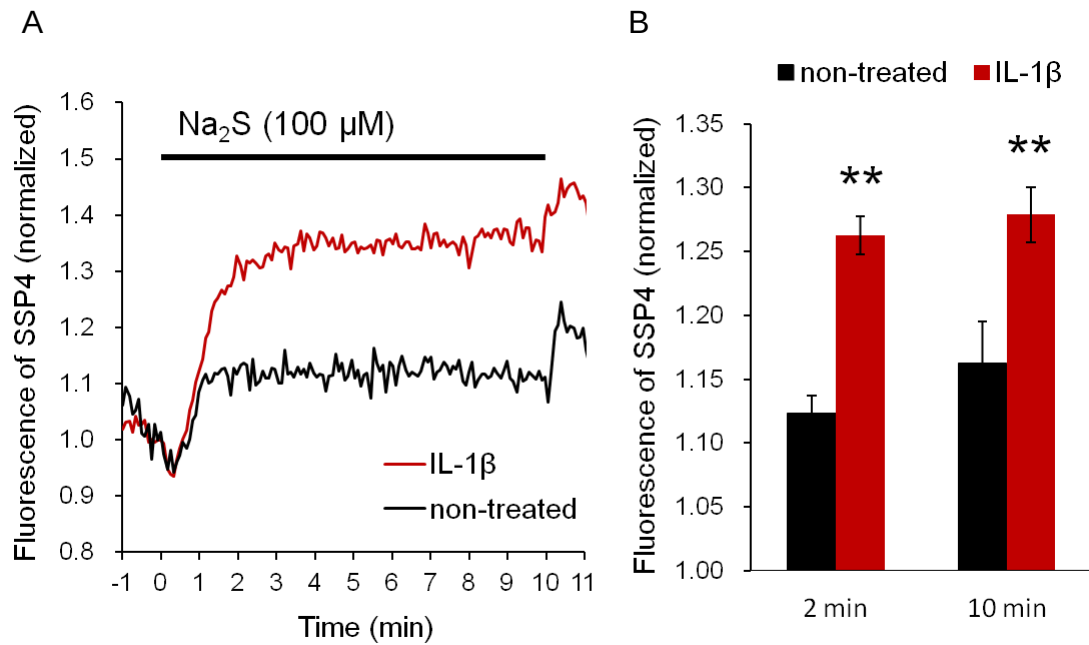


図 13 IL-1β 処置細胞での細胞内ポリサルファイドの変動

(A) Na₂S (100 μM)を 10 分間適用した時の SSP4 蛍光変化の典型例(黒: IL-1β 無処置、赤: IL-1β (3 ng/ml、24 h)処置)。SSP4 蛍光は Na₂S 適用前の値を 1.0 として標準化した。(B) Na₂S (100 μM)適用 2 分後及び 10 分後の SSP4 蛍光強度(黒: IL-1β 無処置、n=278、赤: IL-1β (3 ng/ml、24 h)処置、n=240)。** $P < 0.01$ vs. non-treated (unpaired Student's t -test)

最後に、5-HT 放出反応に対する IL-1 β の効果を検討した。IL-1 β (1-10 ng/ml、24 h)処置は Na₂S (100 μ M)を 30 分間適用した時の 5-HT 放出率には影響しなかった(図 14A)。一方で、5-HT 放出量は増加の傾向を示し、細胞全体の 5-HT 量は IL-1 β 濃度依存性に有意に増加した(図 14B)。また、5-HT 合成酵素の tryptophan hydroxylase 1 (TPH1)発現量も増加の傾向が見られた(図 14C)。

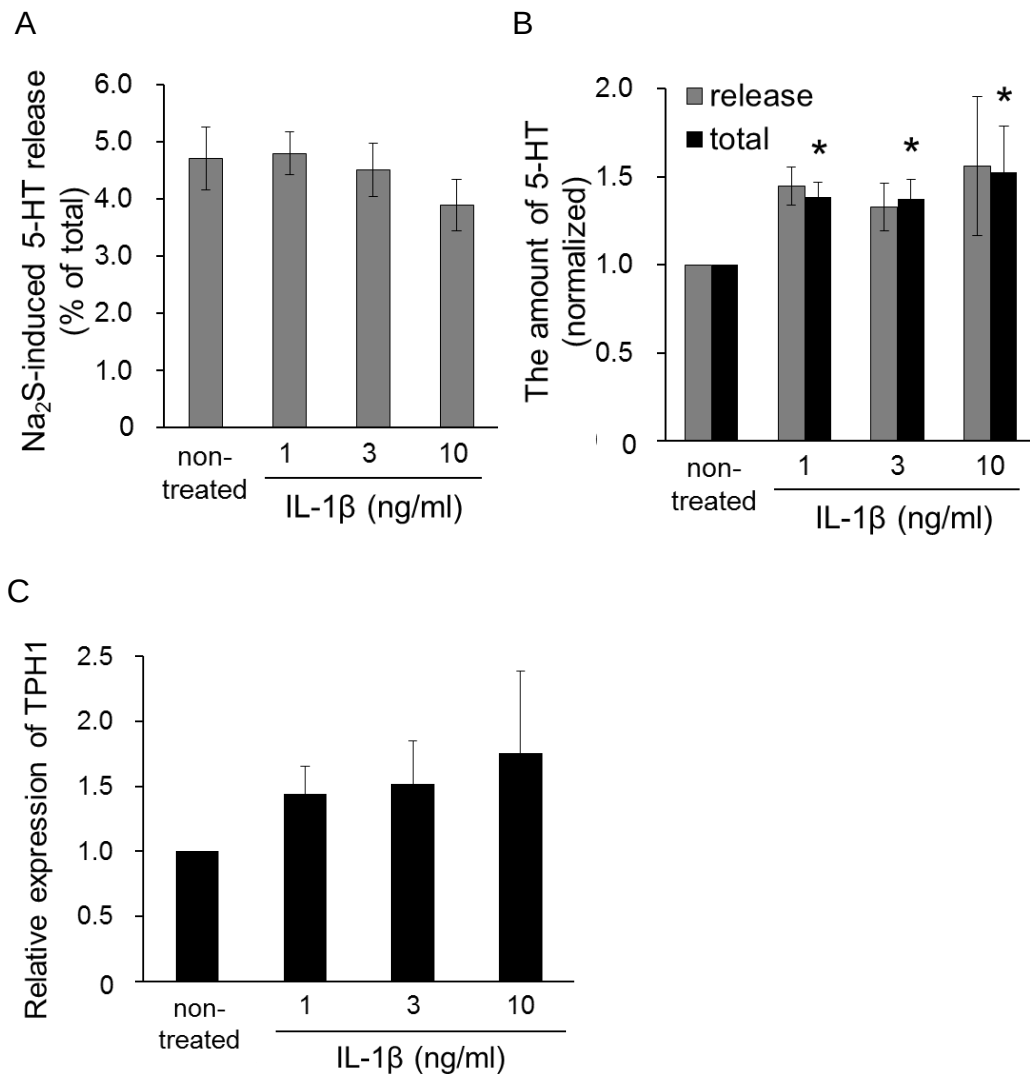


図 14 H₂S 惹起 5-HT 放出反応に対する IL-1β の効果及び TPH1 発現量

(A) IL-1β (1-10 ng/ml、24 h)処置細胞における Na₂S (100 μM、30 分間)適用時の 5-HT 放出率(n=6)。 (B) 5-HT 放出量(release、n=6)または細胞内全体の 5-HT 含量(total、n=6)。 IL-1β 無処置群を 1.0 として標準化した。**P* < 0.05 vs. non-treated (Dunnett's test) (C) TPH1 相対発

IV 考察

本研究では、ラット膵 δ 細胞由来 RIN14B 細胞において、 H_2S が細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) を TRPA1 活性化によって増加することに加えて、ATP 感受性 K^+ (K_{ATP}) チャンネルを介して Ca^{2+} シグナルを抑制する双方向性の作用を有することが明らかになった。また、炎症性サイトカインの IL-1 β 処置で H_2S による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加反応が増強され、その $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加反応には TRPA1 と電位依存性 L-type Ca^{2+} チャンネルが関わっていることが示された。IL-1 β 処置により H_2S からのポリサルファイド生成が促進されており、IL-1 β による H_2S 作用の増強に関与している可能性がある。

H_2S の自発的 Ca^{2+} シグナルに対する抑制作用

以前の研究(氏家絢子卒業論文、平成 24 年度)で、RIN14B 細胞において H_2S が TRPA1 を介して $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加及び 5-HT 放出を引き起こすことを報告した。本実験では、 H_2S が RIN14B 細胞の自発的な Ca^{2+} シグナルを抑制することが示された。膵 β 細胞では Ca^{2+} オシレーションが K_{ATP} チャンネルと電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介して発生することが報告されており、グルコース代謝によって細胞内 ATP/ADP 比が大きくなると、 K_{ATP} チャンネルが閉じて細胞膜が脱分極し、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介した Ca^{2+} 流入が起こる(Kanno *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004)。本研究では、RIN14B 細胞に K_{ATP} チャンネル(サブタイプ Kir6.2/SUR1)が発現していること、さらに非刺激時の自発的な Ca^{2+} シグナルは K_{ATP} 開口薬によって抑制されることが示された。また以前の研究で、RIN14B 細胞の高濃度 KCl に対する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 反応に電位依存性 L-type Ca^{2+} チャンネルが関与していることを示唆している。そのため、RIN14B 細胞においても、 K_{ATP} チャンネルと電位依存性 L-type Ca^{2+} チャンネルを介した膵 β 細胞と同様のメカニズムによる自発的な Ca^{2+} シグナルが起きている可能性が考えられる。 H_2S は K_{ATP} チャンネルを開口することがこれまでに報告されている(Zhao *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2005)。 H_2S は K_{ATP} チャ

ネルサブユニット SUR1 の細胞外ドメインのシステイン残基を修飾して K_{ATP} チャンネルを活性化することが示唆されている(Jiang *et al.*, 2010)。本研究において、 H_2S の Ca^{2+} シグナル抑制作用は K_{ATP} チャンネル阻害薬存在下では消失した。以上のことから、 H_2S の抑制作用は、 H_2S によって K_{ATP} チャンネルが開口して細胞膜の過分極が起こり、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの活性化が抑えられることで Ca^{2+} シグナルが抑制されたためと考えられる。

K_{ATP} チャンネル阻害薬によって、 H_2S による $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応の立ち上がりまでの時間は短くなり、反応の大きさも増加した。 K_{ATP} チャンネル阻害薬存在下では、 H_2S の K_{ATP} チャンネルの開口による過分極が起こらず、TRPA1 の開口による脱分極がより生じやすい条件になっていると考えられる。TRPA1 の電位依存性では膜電位が過分極した方が電流反応が大きくなるので(Story *et al.*, 2003; Jordt *et al.*, 2004)、 K_{ATP} チャンネル阻害によって TRPA1 を介した Ca^{2+} 流入が直接増強されているとは考えづらく、脱分極によって開口する電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの関与が示唆される。よって、 K_{ATP} チャンネル阻害薬存在下での H_2S による $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応には、TRPA1 に加えて電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介した Ca^{2+} 流入が関与している可能性が考えられる。

H_2S による 5-HT 放出反応は、 K_{ATP} チャンネル阻害薬による影響を受けなかった。本実験で行った 15 分間の NaHS の適用による細胞集団からの 5-HT 放出反応では、数分レベルで生じる単一細胞での $[Ca^{2+}]_i$ の増減を反映しづらいのかもしれない。 $[Ca^{2+}]_i$ シグナルの増強は 5-HT の開口放出頻度を増加させると考えられるため、本実験で観察されたような短時間で生じる $[Ca^{2+}]_i$ 動態変化に対応した放出反応の変化は、アンペロメトリー法のようなリアルタイムで単一細胞の放出反応を解析できる測定手法で検討する必要がある。

炎症性サイトカインの効果

自発反応の抑制や $[Ca^{2+}]_i$ 増加などの H_2S に対する反応性は、個々の細胞ごとに異なった。 H_2S の標的分子である K_{ATP} や TRPA1 チャンネルの発現バランスが細胞ごとに異なっていたの

かもしれない。病態などの条件下ではこの発現バランスが変化し、 H_2S の双方向性作用が変化する可能性がある。

炎症性サイトカインの $\text{IL-1}\beta$ を処置すると、 H_2S の抑制作用を示す細胞の割合が減少し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加反応を示す細胞の割合と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加反応の大きさが $\text{IL-1}\beta$ 濃度依存性に増加した。 $\text{IL-1}\beta$ 処置での $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加は TRPA1 及び電位依存性 L-type Ca^{2+} チャネル阻害薬で抑制されたことから、両チャネルが関与していることが示された。 $\text{IL-1}\beta$ は細胞膜表面に発現している IL-1 受容体を介して、nuclear factor- κB (NF- κB) や p38/mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路など様々なセカンドシグナル経路を活性化し、 IL-6 や IL-8 などの炎症関連因子の遺伝子発現を調節する(Weber *et al.*, 2010)。サイトカインによって活性化される NF- κB は、hypoxia-induced factor-1 α (HIF-1 α) の発現増加を介して TRPA1 の発現を誘導することが報告されている(Hatano *et al.*, 2012)。TRPA1 は p38/MAPK 経路でも発現が増加することが報告されている(Obata *et al.*, 2005)。また、 $\text{IL-1}\beta$ によって protein kinase C が活性化し L-type Ca^{2+} チャネル活性が抑制されるという報告もある(El Khoury *et al.*, 2014)。本研究では、TRPA1 及び L-type Ca^{2+} チャネル作動薬の作用は $\text{IL-1}\beta$ によって増強されず、TRPA1 については mRNA 発現の増加も見られなかった。 $\text{IL-1}\beta$ は、チャネルの発現や活性には直接影響を与えずに、別のメカニズムを介して H_2S の作用を増強したと考えられる。

H_2S の標的分子との反応は、ポリサルファイドを介していることが提唱されている(Toohey, 2011; Greiner *et al.*, 2013)。ポリサルファイドは酸化数 0 の不安定な硫黄原子サルフェン硫黄 (S^0) を多数持つ分子であり、タンパク質のシステイン残基を修飾することができる。TRPA1 に対する力価も H_2S より高いことが報告されている(Kimura *et al.*, 2013, Hatakeyama *et al.*, 2015)。そこで、 $\text{IL-1}\beta$ 処置下における H_2S 作用へのポリサルファイドの関与を検討したところ、 $\text{IL-1}\beta$ 処置では H_2S からのポリサルファイド生成が増加した。また、ポリサルファイドによる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加反応は増強されなかったことから、 $\text{IL-1}\beta$ は H_2S からのポリサルファイド生成を促進することで TRPA1 を介した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 反応を増強していると考えられる。ポリサル

ファイドは酸化剤や一酸化窒素(NO)と H₂S の化学的な反応で生じる(Nagy and Winterbourn, 2010; Cortese-Krott *et al.*, 2015)。IL-1 β は IL-1 受容体を介して、NADPH oxidase の活性化によって活性酸素種を生成したり (Brigelius-Flohé *et al.*, 2004)、NO 合成酵素の発現を誘導する (Corbett *et al.*, 1992; Larsen *et al.*, 1998; Cardozo *et al.*, 2001)。IL-1 β 処置によって増加した活性酸素種や NO が H₂S と反応してより力価の高いポリサルファイドが生じ、TRPA1 を介した増加反応が増強されたと考えられる。

一方、TNF- α は今回使用した濃度範囲では H₂S の作用に影響しなかった。TNF- α は TNF 受容体を介して、IL-1 β 同様に NF- κ B などのシグナル経路を活性化する (Cabal-Hierro and Lazo, 2012)。TNF- α による活性酸素種の生成や NO 合成酵素の誘導も報告されている (Sundaresan *et al.*, 1996; Heneka *et al.*, 1998; Tolando *et al.*, 2000)。TNF- α による増強効果が見られなかったのは今回の濃度が効果を示すのに不十分であった可能性が考えられるが、高濃度の TNF- α では細胞傷害作用が見られたため検討ができなかった。IL-1 β による NO 合成酵素の活性化が IFN- γ で増強されるというようなサイトカイン間の相互作用も報告されているため (Burke *et al.*, 2013)、TNF- α の効果については、低濃度 TNF- α と他サイトカインの同時適用などで検討する必要がある。

H₂S による 5-HT 放出率は IL-1 β 処置群・無処置群間で有意な差が見られなかったが、5-HT 合成は増加する傾向が見られた。クローン病の腸管粘膜では IL-1 β が増加し、腸内分泌細胞の TPH1 発現及び 5-HT 放出量も増加するという報告があり (Kidd *et al.*, 2009)、IL-1 β による 5-HT 合成の促進、それに伴う放出量の増加を支持するものである。[Ca²⁺]_i 反応で見られた増強効果が放出率に反映されなかったことについては、K_{ATP} チャネル阻害薬存在下と同様、より精密に放出反応を解析する必要があるだろう。

RIN14B 細胞における H₂S の Ca²⁺シグナル調節作用について

RIN14B 細胞において、H₂S は TRPA1 を介した [Ca²⁺]_i 増加と K_{ATP} チャネルを介した自発

反応の抑制という双方向性の Ca^{2+} 調節作用を示した。RIN14B 細胞は膵 δ 細胞由来のセルラインであるが、5-HT 合成及び放出能を持つことから腸上皮に存在する腸管クロマフィン細胞のモデルとしても考えられている(Nozawa *et al.*, 2009)。 H_2S 合成酵素の発現や H_2S 産生は膵臓及び腸上皮で報告されている(Kaneko *et al.*, 2009; Hennig and Diener, 2009; Gil *et al.*, 2011)。膵 δ 細胞では K_{ATP} チャネルの活性化によってソマトスタチン放出が抑制されることが、腸管クロマフィン細胞では TRPA1 の活性化が 5-HT 放出を引き起こすことが報告されているが(Braun *et al.*, 2009; Nozawa *et al.*, 2009)、 H_2S によるこれらの細胞に対する作用はまだ明らかにされていない。これら生体内の分泌細胞における K_{ATP} チャネルや TRPA1 などの H_2S 標的分子の発現パターンは RIN14B 細胞とは全く同じではないかもしれないが、 H_2S がこれらのチャネルに作用することで分泌機能の調節の一端を担っている可能性がある。今回の RIN14B 細胞における H_2S の作用に関する成果は、内因性 H_2S の膵 δ 細胞や腸管クロマフィン細胞に対する作用を検討する際に重要な知見になると思われる。

炎症時の H_2S とポリサルファイドの作用

本研究により炎症条件で H_2S からポリサルファイドの生成が促進され、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ 増加反応が増強されることが明らかになった。ポリサルファイドは近年シグナル分子として注目されており、ラットアストロサイトやマウス知覚神経において TRPA1 を活性化して Ca^{2+} 流入を起こしたり(Kimura *et al.*, 2013; Hatakeyama *et al.*, 2015)、ラット腹腔肥満細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ を NO 産生を介して調節したり(Moustafa and Habara, 2016)、神経芽細胞において細胞内のグルタチオンを増加させて細胞保護作用を示すことが報告されている(Koike *et al.*, 2013; 2016)。ラット脳では内因性のポリサルファイドが検出されており、3-mercaptopyruvate を基質として 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase により合成されることも報告されている(Kimura *et al.*, 2013; 2015)。 H_2S は酸化剤や NO と反応して無機のポリサルファイド(H_2S_n)に変換されるだけでなく、タンパク質のジスルフィド結合(RSSR)やスルフェン酸(RSOH)と反応して、

persulfide (RSSH)を形成する(Mishanina *et al.*, 2015)。Persulfide は貯蔵型の硫黄と考えられているが、より強力な抗酸化作用を示すことも報告されている(Ida *et al.*, 2014; Cuevasanta *et al.*, 2015)。H₂S は酸化されてポリサルファイドや persulfide になるが、細胞内が還元状態になれば再び H₂S として放出される。このような H₂S とポリサルファイド間のバランスは、炎症時には活性酸素種や NO の増加によってポリサルファイドが増加するため、細胞保護作用や今回見られたような[Ca²⁺]_i シグナルの変動に影響することで炎症病態の形成に関与しているかもしれない。

V 総括

硫化水素(H_2S)はガス状伝達物質として、平滑筋弛緩や細胞保護などの様々な生理的作用を示す。本研究では、ラット膵 δ 細胞由来セルライン RIN14B 細胞の細胞内 Ca^{2+} 動態に対する H_2S の作用を検討した。 H_2S は炎症病態での働きも注目されている。炎症時に生じる H_2S の標的分子や細胞内環境の変化が H_2S の作用に影響する可能性を検討するために、炎症性サイトカイン処置下での H_2S の作用を解析した。

1. RIN14B 細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)に対する H_2S の作用を Ca^{2+} 蛍光指示薬 fura-2 を用いた $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定法で検討した。NaHS (H_2S 放出剤)を細胞に適用すると、自発的な Ca^{2+} シグナルが抑制される場合、自発反応の抑制に続いて $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が増加する場合、抑制なく $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が増加する場合の 3 つの反応パターンを示した。
2. RT-PCR 法により、RIN14B 細胞には ATP 感受性 K^+ (K_{ATP})チャネル(サブユニット Kir6.2/SUR1)が発現していることが示された。 K_{ATP} チャネル阻害薬 glibenclamide 及び tolbutamide 存在下では、NaHS による自発的 Ca^{2+} シグナル反応の抑制が見られなくなり、NaHS による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加反応が増強された。
3. NaHS による 5-HT 放出は、glibenclamide 存在下で有意な変化を示さなかった。
4. 炎症性サイトカイン interleukin- 1β (IL- 1β)を細胞に処置すると、 Na_2S (H_2S 放出剤)によって $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加反応を示す細胞の割合と反応の大きさが IL- 1β 濃度依存性に増加した。
5. 炎症性サイトカイン tumor necrosis factor- α (TNF- α)の処置は Na_2S の作用に影響を与えな

かった。

6. K_{ATP} チャンネル開口薬 diazoxide による自発反応の抑制は IL-1 β 処置群と無処置群で有意な変化を示さなかった。
7. IL-1 β 処置細胞での Na_2S による $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応は、非選択的陽イオンチャンネル transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) 及び電位依存性 L-type Ca^{2+} チャンネル阻害薬によって抑制された。
8. TRPA1 チャンネル作動薬 mustard oil 及び高濃度 KCl による $[Ca^{2+}]_i$ 増加は IL-1 β 処置群と無処置群で有意な変化を示さなかった。TRPA1 の mRNA 発現量も IL-1 β 処置による変化は見られなかった。
9. 細胞にポリサルファイド Na_2S_3 を適用すると $[Ca^{2+}]_i$ 増加が起こったが、増加反応を示す細胞の割合や反応の大きさに IL-1 β 処置群と無処置群で有意な差は見られなかった。
10. サルフェン硫黄に特異的な蛍光指示薬 SSP4 を用いて細胞内ポリサルファイド量の変化を測定した。 Na_2S を細胞に適用すると細胞内ポリサルファイド量の増加が起こった。IL-1 β 処置細胞では、 Na_2S による細胞内ポリサルファイドの増加が大きくなった。
11. Na_2S による 5-HT 放出反応の放出率に対して、IL-1 β 処置は有意な影響を示さなかった。細胞全体の 5-HT 量は IL-1 β 濃度依存性に有意に増加し、5-HT 放出量及び 5-HT 合成酵素 tryptophan hydroxylase 1 発現量は増加する傾向を示した。

以上の結果から、RIN14B 細胞において、 H_2S が TRPA1 を介した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加に加えて、 K_{ATP} チャンネルを介した Ca^{2+} シグナルの抑制という Ca^{2+} 動態に対する双方向性作用を示すことが明らかになった。また、炎症性サイトカイン IL-1 β 処置下では、 H_2S からのポリサルファイド生成が促進されて $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加反応を増強することが示唆された。炎症時には活性酸素種や一酸化窒素が増加する。これらの炎症性因子は H_2S を酸化してポリサルファイドに変換することが報告されている。 H_2S とポリサルファイド間のバランスの変化が炎症病態における H_2S の作用に影響している可能性がある。

謝辞

稿の終わりに臨み、本研究の推進にあたり終始御指導と御高配を賜り、本論文を御校閲頂きました北海道大学大学院獣医学研究科比較形態機能学講座薬理学教室、乙黒兼一准教授並びに伊藤茂男名誉教授に深く感謝申し上げます。

本論文を御校閲頂き、有用なご助言を頂きました北海道大学大学院獣医学研究科比較形態機能学講座生理学教室、葉原芳昭特任教授、同生化学教室、木村和弘教授に厚く御礼申し上げます。

最後に、本論文の作成、そして日々の研究において終始御協力を頂きました山口聡一郎助教をはじめとする薬理学教室の皆様に心から感謝致します。

参考文献

Abe K, Kimura H (1996). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci* **16**: 1066-1071.

Ali MY, Whiteman M, Low CM, Moore PK (2007). Hydrogen sulphide reduces insulin secretion from HIT-T15 cells by a K_{ATP} channel-dependent pathway. *J Endocrinol* **195**: 105-112.

Babes A, Fischer MJ, Filipovic M, Engel MA, Flonta ML, Reeh PW (2013). The anti-diabetic drug glibenclamide is an agonist of the transient receptor potential Ankyrin 1 (TRPA1) ion channel. *Eur J Pharmacol* **704**: 15-22.

Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D (2006). TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* **124**: 1269-1282.

Bränström R, Höög A, Wahl MA, Berggren PO, Larsson O (1997). RIN14B: a pancreatic δ -cell line that maintains functional ATP-dependent K^+ channels and capability to secrete insulin under conditions where it no longer secretes somatostatin. *FEBS Lett* **411**: 301-307.

Braun M, Ramracheya R, Amisten S, Bengtsson M, Moritoh Y, Zhang Q, Johnson PR, Rorsman P (2009). Somatostatin release, electrical activity, membrane currents and exocytosis in human pancreatic delta cells. *Diabetologia* **52**: 1566-1578.

Brigelius-Flohé R, Banning A, Kny M, Böhl GF (2004). Redox events in interleukin-1 signaling. *Arch*

Biochem Biophys **423**: 66-73.

Burke SJ, Updegraff BL, Bellich RM, Goff MR, Lu D, Minkin SC Jr, Karlstad MD, Collier JJ (2013). Regulation of iNOS gene transcription by IL-1 β and IFN- γ requires a coactivator exchange mechanism. *Mol Endocrinol* **27**: 1724-1742.

Cabal-Hierro L, Lazo PS (2012). Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal* **24**: 1297-1305.

Cao DS, Zhong L, Hsieh TH, Abooj M, Bishnoi M, Hughes L, Premkumar LS (2012). Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) and its role in insulin release from rat pancreatic beta cells. *PLoS One* **7**: e38005.

Carbonero F, Benefiel AC, Gaskins HR (2012). Contributions of the microbial hydrogen economy to colonic homeostasis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **9**: 504-518.

Cardozo AK, Heimberg H, Heremans Y, Leeman R, Kutlu B, Kruhøffer M, Ørntoft T, Eizirik DL (2001). A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor- κ B-dependent genes in primary rat pancreatic β -cells. *J Biol Chem* **276**: 48879-48886.

Cho HJ, Callaghan B, Bron R, Bravo DM, Furness JB (2014). Identification of enteroendocrine cells that express TRPA1 channels in the mouse intestine. *Cell Tissue Res* **356**: 77-82.

Corbett JA, Wang JL, Sweetland MA, Lancaster JR Jr, McDaniel ML (1992). Interleukin 1 β induces

the formation of nitric oxide by β -cells purified from rodent islets of Langerhans. Evidence for the β -cell as a source and site of action of nitric oxide. *J Clin Invest* **90**: 2384-2391.

Cortese-Krott MM, Kuhnle GG, Dyson A, Fernandez BO, Grman M, DuMond JF, Barrow MP, McLeod G, Nakagawa H, Ondrias K, Nagy P, King SB, Saavedra JE, Keefer LK, Singer M, Kelm M, Butler AR, Feelisch M (2015). Key bioactive reaction products of the NO/H₂S interaction are S/N-hybrid species, polysulfides, and nitroxyl. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**: E4651-E4660.

Cuevasanta E, Lange M, Bonanata J, Coitiño EL, Ferrer-Sueta G, Filipovic MR, Alvarez B (2015). Reaction of Hydrogen Sulfide with Disulfide and Sulfenic Acid to Form the Strongly Nucleophilic Persulfide. *J Biol Chem* **290**: 26866-26880.

El Karim I, McCrudden MT, Linden GJ, Abdullah H, Curtis TM, McGahon M, About I, Irwin C, Lundy FT (2015). TNF- α -induced p38MAPK activation regulates TRPA1 and TRPV4 activity in odontoblast-like cells. *Am J Pathol* **185**: 2994-3002.

El Khoury N, Mathieu S, Fiset C (2014). Interleukin-1 β reduces L-type Ca²⁺ current through protein kinase C ϵ activation in mouse heart. *J Biol Chem* **289**: 21896-21908.

Flannigan KL, McCoy KD, Wallace JL (2011). Eukaryotic and prokaryotic contributions to colonic hydrogen sulfide synthesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **301**: G188-G193.

Gil V, Gallego D, Jiménez M (2011). Effects of inhibitors of hydrogen sulphide synthesis on rat colonic motility. *Br J Pharmacol* **164**: 485-498.

Greiner R, Pálincás Z, Bäsell K, Becher D, Antelmann H, Nagy P, Dick TP (2013). Polysulfides link H₂S to protein thiol oxidation. *Antioxid Redox Signal* **19**: 1749-1765.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**: 3440-3450.

Hatakeyama Y, Takahashi K, Tominaga M, Kimura H, Ohta T (2015). Polysulfide evokes acute pain through the activation of nociceptive TRPA1 in mouse sensory neurons. *Mol Pain* **11**: 24.

Hatano N, Itoh Y, Suzuki H, Muraki Y, Hayashi H, Onozaki K, Wood IC, Beech DJ, Muraki K (2012). Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF1 α) switches on transient receptor potential ankyrin repeat 1 (TRPA1) gene expression via a hypoxia response element-like motif to modulate cytokine release. *J Biol Chem* **287**: 31962-31972.

Heneka MT, Löschmann PA, Gleichmann M, Weller M, Schulz JB, Wüllner U, Klockgether T (1998). Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor- α /lipopolysaccharide. *J Neurochem* **71**: 88-94.

Hennig B, Diener M (2009). Actions of hydrogen sulphide on ion transport across rat distal colon. *Br J Pharmacol* **158**: 1263-1275.

Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* **90**: 291-366.

Hildebrandt TM, Grieshaber MK (2008). Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria. *FEBS J* **275**: 3352-3361.

Hosoki R, Matsuki N, Kimura H (1997). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* **237**: 527-531.

Ida T, Sawa T, Ihara H, Tsuchiya Y, Watanabe Y, Kumagai Y, Suematsu M, Motohashi H, Fujii S, Matsunaga T, Yamamoto M, Ono K, Devarie-Baez NO, Xian M, Fukuto JM, Akaike T (2014). Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 7606-7611.

Ishigami M, Hiraki K, Umemura K, Ogasawara Y, Ishii K, Kimura H (2009). A source of hydrogen sulfide and a mechanism of its release in the brain. *Antioxid Redox Signal* **11**: 205-214.

Jiang B, Tang G, Cao K, Wu L, Wang R (2010). Molecular mechanism for H₂S-induced activation of K_{ATP} channels. *Antioxid Redox Signal* **12**: 1167-1178.

Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Högestätt ED, Meng ID, Julius D (2004). Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* **427**: 260-265.

Kamoun P (2004). Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. *Amino Acids* **26**: 243-254.

Kaneko Y, Kimura T, Taniguchi S, Souma M, Kojima Y, Kimura Y, Kimura H, Niki I (2009). Glucose-induced production of hydrogen sulfide may protect the pancreatic beta-cells from apoptotic cell death by high glucose. *FEBS Lett* **583**: 377-382.

Kanno T, Rorsman P, Göpel SO (2002). Glucose-dependent regulation of rhythmic action potential firing in pancreatic β -cells by K_{ATP} -channel modulation. *J Physiol* **545**: 501-507.

Kidd M, Gustafsson BI, Drozdov I, Modlin IM (2009). IL1 β - and LPS-induced serotonin secretion is increased in EC cells derived from Crohn's disease. *Neurogastroenterol Motil* **21**: 439-450.

Kimura Y, Mikami Y, Osumi K, Tsugane M, Oka J, Kimura H (2013). Polysulfides are possible H_2S -derived signaling molecules in rat brain. *FASEB J* **27**: 2451-2457.

Kimura Y, Toyofuku Y, Koike S, Shibuya N, Nagahara N, Lefer D, Ogasawara Y, Kimura H (2015). Identification of H_2S_3 and H_2S produced by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in the brain. *Sci Rep* **5**: 14774.

Koike S, Ogasawara Y, Shibuya N, Kimura H, Ishii K (2013). Polysulfide exerts a protective effect against cytotoxicity caused by t-buthylhydroperoxide through Nrf2 signaling in neuroblastoma cells. *FEBS Lett* **587**: 3548-3555.

Koike S, Kayama T, Yamamoto S, Komine D, Tanaka R, Nishimoto S, Suzuki T, Kishida A, Ogasawara Y (2016). Polysulfides protect SH-SY5Y cells from methylglyoxal-induced toxicity by suppressing protein carbonylation: A possible physiological scavenger for carbonyl stress in the brain. *Neurotoxicology* **55**: 13-19.

Larsen CM, Wadt KA, Juhl LF, Andersen HU, Karlsen AE, Su MS, Seedorf K, Shapiro L, Dinarello CA, Mandrup-Poulsen T (1998). Interleukin-1 β -induced rat pancreatic islet nitric oxide synthesis requires both the p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **273**: 15294-15300.

Li L, Bhatia M, Zhu YZ, Zhu YC, Ramnath RD, Wang ZJ, Anuar FB, Whiteman M, Salto-Tellez M, Moore PK (2005). Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *FASEB J* **19**: 1196-1198.

Liu G, Hilliard N, Hockerman GH (2004). Ca_v1.3 is preferentially coupled to glucose-induced [Ca²⁺]_i oscillations in the pancreatic β cell line INS-1. *Mol Pharmacol* **65**: 1269-1277.

Lu M, Zhao FF, Tang JJ, Su CJ, Fan Y, Ding JH, Bian JS, Hu G (2012). The neuroprotection of hydrogen sulfide against MPTP-induced dopaminergic neuron degeneration involves uncoupling protein 2 rather than ATP-sensitive potassium channels. *Antioxid Redox Signal* **17**: 849-859.

Lu W, Li J, Gong L, Xu X, Han T, Ye Y, Che T, Luo Y, Li J, Zhan R, Yao W, Liu K, Cui S, Liu C (2014). H₂S modulates duodenal motility in male rats via activating TRPV1 and K_{ATP} channels. *Br J Pharmacol* **171**: 1534-1550.

Mathias R, von der Weid PY (2013). Involvement of the NO-cGMP-K_{ATP} channel pathway in the mesenteric lymphatic pump dysfunction observed in the guinea pig model of TNBS-induced ileitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **304**: G623-G634.

Meng J, Wang J, Steinhoff M, Dolly JO (2016). TNF α induces co-trafficking of TRPV1/TRPA1 in VAMP1-containing vesicles to the plasmalemma via Munc18-1/syntaxin1/SNAP-25 mediated fusion. *Sci Rep* **6**: 21226.

Mishanina TV, Libiad M, Banerjee R (2015). Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways. *Nat Chem Biol* **11**: 457-464.

Miyamoto R, Otsuguro K, Ito S (2011). Time- and concentration-dependent activation of TRPA1 by hydrogen sulfide in rat DRG neurons. *Neurosci Lett* **499**: 137-142.

Moustafa A, Habara Y (2016). Cross talk between polysulfide and nitric oxide in rat peritoneal mast cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **310**: C894-C902.

Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, Kim S, Mu W, Gazi SK, Barrow RK, Yang G, Wang R, Snyder SH (2009). H₂S signals through protein S-sulfhydration. *Sci Signal* **2**: ra72.

Nagy P, Winterbourn CC (2010). Rapid reaction of hydrogen sulfide with the neutrophil oxidant hypochlorous acid to generate polysulfides. *Chem Res Toxicol* **23**: 1541-1543.

Nozawa K, Kawabata-Shoda E, Doihara H, Kojima R, Okada H, Mochizuki S, Sano Y, Inamura K, Matsushime H, Koizumi T, Yokoyama T, Ito H (2009). TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 3408-3413.

Obata K, Katsura H, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Fukuoka T, Tokunaga A,

Tominaga M, Noguchi K (2005). TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest* **115**: 2393-2401.

Purhonen AK, Louhivuori LM, Kiehne K, Kerman KE, Herzig KH (2008). TRPA1 channel activation induces cholecystokinin release via extracellular calcium. *FEBS Lett* **582**: 229-232.

Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**: 819-829.

Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Sulciner DJ, Gutkind JS, Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ, Finkel T (1996). Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. *Biochem J* **318**: 379-382.

Tolando R, Jovanovic A, Brigelius-Flohé R, Ursini F, Maiorino M (2000). Reactive oxygen species and proinflammatory cytokine signaling in endothelial cells: effect of selenium supplementation. *Free Radic Biol Med* **28**: 979-986.

Toohey JI (2011). Sulfur signaling: is the agent sulfide or sulfane? *Anal Biochem* **413**: 1-7.

Ujike A, Otsuguro K, Miyamoto R, Yamaguchi S, Ito S (2015). Bidirectional effects of hydrogen sulfide via ATP-sensitive K⁺ channels and transient receptor potential A1 channels in RIN14B cells. *Eur J Pharmacol* **764**: 463-470.

Wallace JL, Vong L, McKnight W, Dickey M, Martin GR (2009). Endogenous and exogenous hydrogen sulfide promotes resolution of colitis in rats. *Gastroenterology* **137**: 569-578.

Weber A, Wasiliew P, Kracht M (2010). Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal* **3**: cm1.

Wu L, Yang W, Jia X, Yang G, Duridanova D, Cao K, Wang R (2009). Pancreatic islet overproduction of H₂S and suppressed insulin release in Zucker diabetic rats. *Lab Invest* **89**: 59-67.

Yang W, Yang G, Jia X, Wu L, Wang R (2005). Activation of K_{ATP} channels by H₂S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. *J Physiol* **569**: 519-531.

Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R (2001). The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener. *EMBO J* **20**: 6008-6016.

The effects of hydrogen sulfide on Ca^{2+} signals in RIN14B cells

Ayako Ujike

Laboratory of Pharmacology, Department of Biomedical Sciences,

Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, 060-0818, Japan

Hydrogen sulfide (H_2S) is enzymatically synthesized from cysteine in the mammalian cells and acts as a gasotransmitter. I have previously reported that H_2S activates transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channels and causes the increase of intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in RIN14B cells, the cell line derived from rat pancreatic δ cells. On the other hand, H_2S is reported to inhibit Ca^{2+} influx through the activation of ATP-sensitive K^+ (K_{ATP}) channels in rat pancreatic β cells. There are no reports how the effects of H_2S on Ca^{2+} signal appear in the cells expressing both TRPA1 and K_{ATP} channels. Furthermore, H_2S is reported to be involved in pathogenesis of inflammation. Under inflammatory conditions, the changes in the expressions and activities of target channels for H_2S and/or intracellular environment may affect the effects of H_2S . In this study, the effects of H_2S donors, NaHS or Na_2S , on Ca^{2+} signals in RIN14B cells which express both TRPA1 and K_{ATP} channels were examined under normal and inflammatory conditions.

The $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was measured using fura-2, a fluorescent Ca^{2+} indicator. NaHS caused three types of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses; 1) spontaneous Ca^{2+} signals were inhibited, 2) after inhibition, the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increased, 3) the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rapidly increased without inhibition. The percentage of cells showing each patterns were 37% (19/51 cells), 24% (12/51 cells) and 25% (13/51 cells), respectively. The expressions of Kir6.2/SUR1 subunits of K_{ATP} channels were detected in RIN14B cells. In the

presence of glibenclamide and tolbutamide, K_{ATP} channel blockers, the inhibitory effect by NaHS was abolished, and NaHS induced $[Ca^{2+}]_i$ increases in almost cells (87%). Areas under the curves of $[Ca^{2+}]$ responses to NaHS were increased by K_{ATP} channel blockers. These results suggest that H_2S shows bidirectional effects on Ca^{2+} signals: excitatory and inhibitory effects through TRPA1 and K_{ATP} channels, respectively.

Next, the effects of proinflammatory cytokines on Na_2S -evoked $[Ca^{2+}]_i$ responses were examined. The excitatory effects of Na_2S on Ca^{2+} signals were enhanced by the treatment of IL-1 β , not by that of TNF- α . IL-1 β failed to affect the inhibitory effect of diazoxide, a K_{ATP} channel opener, on Ca^{2+} signals, suggesting that K_{ATP} channels were not involved in the effect of IL-1 β . $[Ca^{2+}]_i$ increases by Na_2S were inhibited by TRPA1 and voltage-dependent L-type Ca^{2+} channel blocker in IL-1 β -treated cells. However, $[Ca^{2+}]_i$ increases by a TRPA1 agonist and a high concentration of KCl were not affected by IL-1 β treatment. The effect of polysulfides, the molecules with varying number of sulfane sulfur and more potency against TRPA1, was next examined. Polysulfide Na_2S_3 increased the $[Ca^{2+}]_i$. Unlike Na_2S , the Na_2S_3 -induced $[Ca^{2+}]_i$ increases were not enhanced by IL-1 β . Intracellular polysulfide was measured using SSP4, a fluorescence indicator of sulfane sulfur. Intracellular polysulfide was increased by Na_2S , which was enhanced by IL-1 β treatment. These results suggest that IL-1 β enhanced the oxidative reaction from H_2S to polysulfide, which result in the enhancement of excitatory effect of H_2S . The change of balance between H_2S and polysulfide by inflammatory factors may affect the role of H_2S in inflammation.