

平成 30 年 9 月 7 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08047

研究課題名(和文) バイオオルガノメタリクス戦略に基づく血管内皮細胞パールカン合成の分子機構解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms for vascular endothelial perlecan synthesis by the strategy of bio-organometallics

研究代表者

山本 千夏 (YAMAMOTO, Chika)

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号：70230571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：バイオオルガノメタリクスは有機-無機ハイブリッド分子を生体機能解析のツールに活用する研究戦略である。この戦略に基づき、ライブラリーから血管内皮細胞のプロテオグリカン合成を制御するハイブリッド分子(o-Phen, Zn-Phen, Rh-Phen)を見出した。これらを用いて、PHD2が阻害されたとき、HIF-1 / 経路が活性化され、それによってヘパラン硫酸プロテオグリカンの小型分子種シンデカン-4の発現が誘導されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Bio-organometallics is a research strategy in which organic-inorganic hybrid molecules are used as a tool to analyze biological systems. Based on this strategy, we got hybrid molecules (1,10-phenanthroline with or without zinc or rhodium) from a library of organic-inorganic hybrid molecules. It was found that the expression of syndecan-4, a small heparan sulfate proteoglycan, is induced via the hypoxia-inducible factor-1 / pathway when prolyl hydroxylase domain-containing protein 2 is inhibited.

研究分野：衛生薬学

キーワード：プロテオグリカン 血管内皮細胞 バイオオルガノメタリクス

1. 研究開始当初の背景

有機-無機ハイブリッド分子(以下、ハイブリッド分子)とは、有機化合物の分子中に金属原子を組み込んだ構造を有する化合物をいう。ハイブリッド分子の科学への応用は Grignard や Wittig が化学反応に用いたことに始まる。このような経緯から、有機元素化学におけるハイブリッド分子の焦点は「如何に不安定なものを設計・単離・構造決定し、分子変換(合成)反応に応用するか」にあり、生命科学への貢献は皆無に等しい。研究代表者らはハイブリッド分子のバイオロジーをバイオオルガノメタリクスと呼び、その展開を提唱している。ハイブリッド分子では、純粋な有機化合物では困難あるいは不可能な特異な三次元構造を形成することができるので、新しい生物活性が期待できる。研究代表者は、ハイブリッド分子を、生体機能解析を行うケミカルバイオロジーの分子プローブとして活用したいと考えている。

血管内皮細胞は血管内腔を一層で覆っている細胞であり、血液と直に接している唯一の cell type である。内皮細胞は血液凝固を促進する von Willebrand 因子や組織因子、血小板凝集を阻害するプロスタサイクリン、プラスミノゲンをプラスミンに変換してフィブリンを分解する組織型プラスミノゲンアクチベーターなどを合成・放出し、血液凝固線溶系を調節している。

プロテオグリカン(PGs)はコアタンパク質と呼ばれるタンパク質骨格にグリコサミノグリカン糖鎖を結合した構造を特徴とする複合糖質であり、あらゆる組織の細胞外マトリックスや細胞膜に普遍的に存在する。PGs は存在する組織や細胞種によってその分子種の発現様式および糖鎖の微細構造が異なり、それによって機能も異なる。動脈組織には内皮細胞と血管平滑筋細胞が存在するが、内皮細胞がヘパラン硫酸 PGs (HSPGs) の大型分子種パールカン、シンデカン-1、シンデカン-2、シンデカン-3、シンデカン-4、グリピカンおよびデルマタン硫酸 PGs (DSPGs) の小型分子種ビグリカンを中心として産生しているのに対し、血管平滑筋細胞ではパールカンの発現は低く、コンドロイチン硫酸 PGs (CSPGs) の大型分子種パーシカンならびに DSPGs の小型分子種ビグリカンおよびデコリンを中心として産生している。このうち HSPG 分子種のヘパラン硫酸糖鎖はヘパリン様活性を示し、血管内腔の抗血栓特性に寄与している。また、これらの分子種は様々な増殖因子・サイトカインと結合してそれらの活性を制御している。

しかしながら、内皮細胞の HSPGs の合成調節については不明な点が多い。研究代表者らは、VEGF (*Biochim. Biophys. Acta*, **1760**: 1465-1474, 2006) や TGF- β (*J. Biol. Chem.*, **275**: 1463-1470, 2000) などが内皮細胞パールカン合成を誘導することを明らかにしているが、パールカンを含め HSPGs の合成調節の分子

機構には不明な点が多い状態が続いていた。

2. 研究の目的

内皮細胞の HSPG 合成を選択的に誘導する低分子量化合物があれば、それらの合成調節機構の解析に大きく寄与することは間違いない。しかしながら、研究代表者らは天然物、糖鎖類、無機金属類、など 100 を超える低分子量化合物を試したが、HSPG 分子種の発現を選択的に誘導するものは見いだすことはできなかった。

そこで本研究では、バイオオルガノメタリクス研究戦略に基づき、有機-無機ハイブリッド分子ライブラリーから内皮細胞に対して細胞毒性を示さない分子を選択し、それらの分子を活用して内皮細胞におけるパールカンなどの HSPG 分子種の合成調節機構を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 配位子として 1,10-phenanthroline(Phen) または 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline(DMP) を有する亜鉛、銅、およびロジウム錯体の毒性評価

o-Phen, Zn-Phen, Cu-Phen, Rh-Phen, DMP, Zn-DMP, Cu-DMP, および Rh-DMP からなるライブラリーを構築し、培養ウシ大動脈血管内皮細胞に対する毒性を形態学的観察と細胞から培地への乳酸脱水素酵素の逸脱によって評価した。併せて、細胞内への蓄積を inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS; Nexion 300S, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) によって測定した。

(2) o-Phen, Zn-Phen, および Rh-Phen によるシンデカン-4 の発現誘導を介在する細胞内シグナル伝達経路

ウシ大動脈内皮細胞をコンフルエントまで培養後、Phen, Zn-Phen, および Rh-Phen で処理し、内皮細胞が発現している PG 分子種についてその mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR 法で解析した。シンデカン-4 のコアタンパク質の発現を Western blot 分析によって検出した。Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α , HIF-2 α , および HIF-1 β を干渉 RNA 法によってノックダウンし、o-Phen, Zn-Phen, および Rh-Phen で処理後、シンデカン-4 mRNA の発現を調べた。

4. 研究成果

(1) 解析ツールの抽出

o-Phen, Zn-Phen, Rh-Phen はいずれも内皮細胞毒性を示さなかったが、Cu-Phen は強い細胞毒性を示した。このとき、無機亜鉛、無機銅、および無機ロジウムには細胞毒性は認められなかった。したがって、銅が Phen と錯体を形成したときに細胞毒性が発現されることが示唆される。Cu-Phen は内皮細胞内に

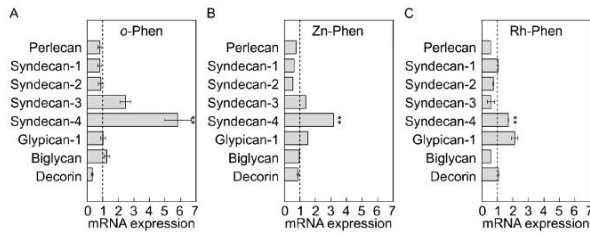


Figure 1. Effects of o-Phen, Zn-Phen, and Rh-Phen on proteoglycan expression in vascular endothelial cells. Bovine aortic endothelial cells were treated with o-Phen (A); Zn-Phen (B); or Rh-Phen (C) at 5 μ M each at 37 $^{\circ}$ C for 24 h and proteoglycan mRNA levels were analyzed by real-time RT-PCR. Values are means \pm S.E.M. of four samples. ** p < 0.01 vs. the corresponding control.

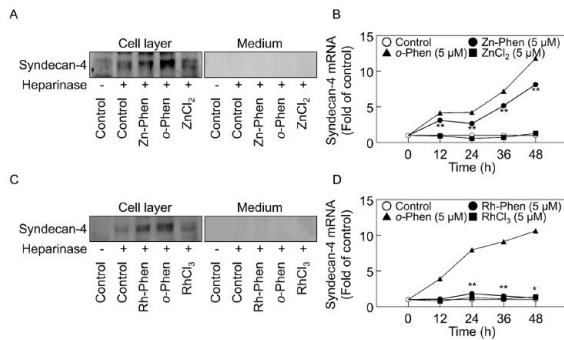


Figure 2. Effects of o-Phen, Zn-Phen, Rh-Phen, ZnCl₂, and RhCl₃ on syndecan-4 expression in vascular endothelial cells. Bovine aortic endothelial cells were treated with Zn-Phen, o-Phen, or ZnCl₂ (A,B) and Rh-Phen, o-Phen, or RhCl₃ (C,D) at 5 μ M each at 37 $^{\circ}$ C for 24 h (A,C) or for 12, 24, 36, and 48 h (B,D). Syndecan-4 core protein and mRNA were analyzed by Western blot and real time RT-PCR, respectively. Values are means \pm S.E.M. of four samples. * p < 0.05; ** p < 0.01 vs. control.

高く蓄積していたので、銅が Phen と錯体を形成することによって細胞内に輸送されることが示唆された。また、Cu-DMP および Rh-DMP も強い内皮細胞毒性を有することが示された。

以上の結果から、内皮細胞の機能解析ツールの候補として、内皮細胞毒性を示さない o-Phen, Zn-Phen, Rh-Phen を抽出した。この3つの化合物の特徴は、o-Phen は金属を含まず、Zn-Phen は亜鉛を緩く結合しており、Ph-Phen はロジウムを強く結合していることである。したがって、3 化合物を比較することによって作用メカニズムを想定し得ると考えられた。

(2) o-Phen, Zn-Phen, および Rh-Phen による内皮細胞 PG 分子種の発現調節機構の解析

内皮細胞において o-Phen, Zn-Phen, および Rh-Phen がシンデカン-4 の発現を誘導する

o-Phen, Zn-Phen, および Rh-Phen で処理し

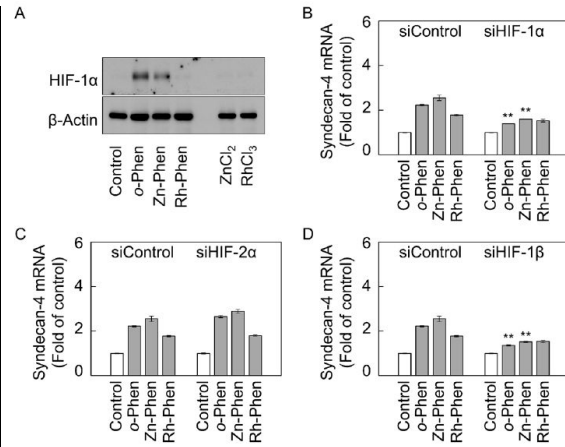


Figure 3. Involvement of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α , HIF-2 α , and HIF-1 β in the induction of syndecan-4 expression by o-Phen, Zn-Phen, and Rh-Phen in vascular endothelial cells. (A) Bovine aortic endothelial cells were treated with o-Phen, Zn-Phen, Rh-Phen, ZnCl₂, or RhCl₃ at 5 μ M each at 37 $^{\circ}$ C for 1 h, and HIF-1 α expression was detected by Western blot analysis; (B) Effects of siRNA-mediated knockdown of HIF-1 α on syndecan-4 mRNA levels. Bovine aortic endothelial cells were transfected with siHIF-1 α at 37 $^{\circ}$ C for 12 h and treated with o-Phen, Zn-Phen, or Rh-Phen at 5 μ M each at 37 $^{\circ}$ C for 8 h; (C) Effects of siRNA-mediated knockdown of HIF-2 α on syndecan-4 mRNA levels. Bovine aortic endothelial cells were transfected with siHIF-2 α at 37 $^{\circ}$ C for 12 h and treated with o-Phen, Zn-Phen, or Rh-Phen at 5 μ M each at 37 $^{\circ}$ C for 8 h; (D) Effects of siRNA-mediated knockdown of HIF-1 β on syndecan-4 mRNA levels. Bovine aortic endothelial cells were transfected with siHIF-1 β at 37 $^{\circ}$ C for 12 h and treated with o-Phen, Zn-Phen, or Rh-Phen at 5 μ M each at 37 $^{\circ}$ C for 8 h. Syndecan-4 mRNA was analyzed by real-time RT-PCR. Values are means \pm S.E.M. of four samples. ** p < 0.01 vs. the corresponding siControl.

た内皮細胞における PG 分子種(パールカン, シンデカン-1, シンデカン-2, シンデカン-3, シンデカン-4, グリピカン, ビグリカン, およびデコリン)の mRNA 発現を検討したところ、パールカン mRNA 発現の抑制とシンデカン-4 mRNA 発現の上昇が認められた。その強さは、パールカン mRNA 発現では o-Phen < Zn-Phen < Rh-Phen であり、シンデカン-4 mRNA 発現では o-Phen > Zn-Phen > Rh-Phen であった (Figure 1)。

o-Phen, Zn-Phen, および Rh-Phen によるシンデカン-4 の誘導がコアタンパク質レベルでも起こることも確認された。しかしながら、無機亜鉛(ZnCl₂) および無機ロジウム(RhCl₃) にはシンデカン-4 発現の上昇作用は認められなかった (Figure 2)。

② HIF-1 α / β 経路が o-Phen および Zn-Phen によるシンデカン-4 発現の誘導を介在する

o-Phen が HIF 関連タンパク質の発現を誘導することが報告されているので、o-Phen, Zn-Phen, および Rh-Phen が HIF-1 α の発現を誘導するかどうか調べたところ、o-Phen および Zn-Phen による著明な HIF-1 α 発現上昇が認められた。発現上昇の程度は o-Phen > Zn-Phen であった。HIF-1 α および HIF-1 β をノックダウンしたとき、o-Phen および Zn-Phen による内皮細胞シンデカン-4 mRNA 発現の上昇は有意に抑制された。しかしながら、HIF-2 α をノックダウンしても o-Phen および Zn-Phen によるシンデカン-4 mRNA 発現の上昇は影響を受けなかった (Figure 3)。

③ o-Phen および Zn-Phen は、Prolyl hydroxylase domain-containing protein 2 (PHD2) 活性を阻害する

HIF-1 α の発現レベルは PHD2 によって Pro564 が水酸化され、それがシグナルとなってユビキチン-プロテアソームで分解を受けることによって調節されている。そこで、PHD2 の活性を調べたところ、o-Phen および Zn-Phen によって有意に低下していることが示された。しかしながら、ユビキチン化されたタンパク質の量は o-Phen および Zn-Phen によって変化しなかった (Figure 4)。

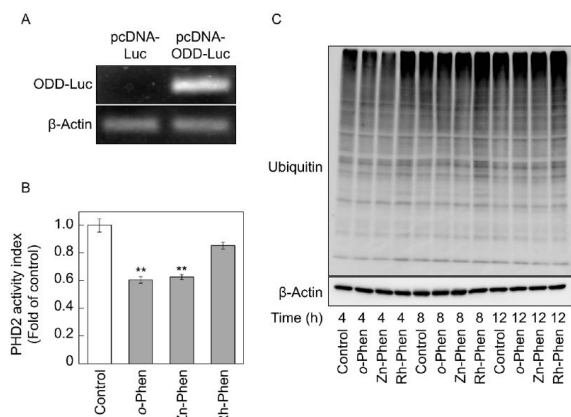
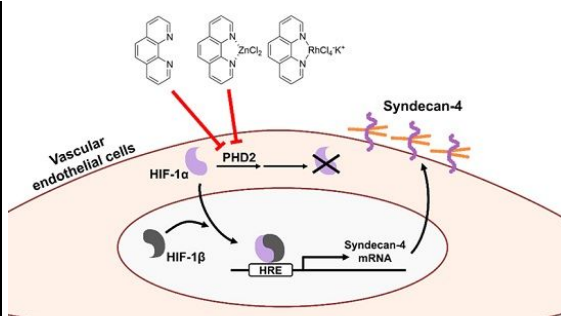


Figure 4. Effects of o-Phen, Zn-Phen, and Rh-Phen on prolyl hydroxylase domain-containing protein 2 (PHD2) activity in vascular endothelial cells. (A) Bovine aortic endothelial cells were transfected with pcDNA-Luc or pcDNA-ODD-Luc at 37 °C for 24 h. Amplified DNA products were separated by agarose gel electrophoresis and stained using ethidium bromide; (B) Bovine aortic endothelial cells were transfected with pcDNA-ODD-Luc at 37 °C for 12 h, treated with o-Phen, Zn-Phen, or Rh-Phen at 5 μ M each at 37 °C for 24 h, and PHD2 activity was subsequently analyzed by luciferase assay. Values are means \pm S.E.M. of five samples. ** $p < 0.01$ vs. control; (C) Bovine aortic endothelial cells were treated with o-Phen, Zn-Phen, or Rh-Phen at 5 μ M each at 37 °C for 4, 8, and 12 h, and levels of ubiquitinated proteins were detected by Western blot analysis.



④ 結論

本研究は、血管内皮細胞において PHD2 が阻害されたとき、HIF-1 α/β 経路が活性化され、それによってシンデカン-4 の発現が誘導されることを、有機-無機ハイブリッド分子を解析ツールとして活用することによって明らかにしたものである。

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 3 件)

1. Hara, T., Kojima, T., Matsuzaki, H., Nakamura, T., Yoshida, E., Fujiwara, Y., Yamamoto, C., Saito, S. and Kaji, T. Induction of syndecan-4 by organic-inorganic hybrid molecules with a 1,10-phenanthroline structure in cultured vascular endothelial cells. *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 352, 2017.

DOI: 10.3390/ijms18020352

査読あり

2. Nakamura T, Yoshida E, Fujie T, Ogata F, Yamamoto C, Kawasaki N, Kaji T. Synergistic cytotoxicity caused by forming a complex of copper and 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline in cultured vascular endothelial cells. *J. Toxicol. Sci.* **42**, 683-687, 2017.

DOI: 10.2131/jts.42.683

査読あり

3. Hara, T., Matsuzaki, H., Nakamura, T., Yoshida, E., Ohkubo, T., Maruyama, H., Yamamoto, C., Saito, S. and Kaji, T. Cytotoxicity of zinc, copper and rhodium complexes with 1,10-phenanthroline or 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline in cultured vascular endothelial cells. *Fundam. Toxicol. Sci.* **3**, 109-113, 2016.

DOI: 10.2131/fts.3.109

査読あり

[学会発表](計 7 件)

1. 原崇人, 酒巻沙弥香, 中村武浩, 鍛冶利幸, 山本千夏, 亜鉛錯体による血管内皮細胞特異的なグリコサミノグリカン合成の調節 日本薬学会第 138 年会 2018 年

2. 熊谷玲衣奈, 原崇人, 吉田映子, 藤原泰之,

山本千夏, 鍛冶利幸 鉛による血管内皮細胞増殖の阻害に関するヘパラン硫酸プロテオグリカンの大型分子種パールカンの発現抑制機構 フォーラム 2017: 衛生薬学・環境トキシコロジー 2017年

3. 立石紘子, 原崇人, 藤江智也, 吉田映子, 山本千夏, 中寛史, 鍛冶利幸 ジチオカルバメート銅錯体 Cu10 による血管内皮細胞のシンデカン-4 発現誘導 フォーラム 2017: 衛生薬学・環境トキシコロジー 2017年
4. 原崇人, 中村武浩, 松崎紘佳, 吉田映子, 山本千夏, 鍛冶利幸 亜鉛錯体を用いた内皮細胞シンデカン-4 の新規発現調節機構の解析 第 44 回日本毒性学会学術年会 2017年
5. 立石紘子, 原崇人, 吉田映子, 藤江智也, 山本千夏, 中寛史, 鍛冶利幸 銅錯体を用いた血管内皮細胞のプロテオグリカン発現調節機構の解析 第 44 回日本毒性学会学術年会 2017年
6. 松崎紘佳, 原崇人, 吉田映子, 藤原泰之, 山本千夏, 斎藤慎一, 鍛冶利幸 有機ロジウム化合物を活用した血管内皮細胞のパールカン発現抑制機構の解明への試み フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー 2016年
7. 立石紘子, 原崇人, 藤江智也, 吉田映子, 山本千夏, 中寛史, 鍛冶利幸 ジチオカルバメート銅錯体による血管内皮細胞のプロテオグリカン発現調節 フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー 2016年

(4)研究協力者
なし

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.toho-u.ac.jp/phar/labo/eika.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 千夏 (YAMAMOTO, Chika)

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号: 70230571

(2) 研究分担者

鍛冶 利幸 (KAJI, Toshiyuki)

東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号: 90204388

(3) 連携研究者

なし