

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14992

研究課題名(和文) バイオオルガノメタリクス研究戦略に基づく内皮細胞メタロチオネイン誘導機構の解析

研究課題名(英文) Mechanisms underlying endothelial metallothionein induction based on the strategy of bioorganometallics

研究代表者

鍛冶 利幸 (Kaji, Toshiyuki)

東京理科大学・薬学部薬学科・教授

研究者番号：90204388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞におけるメタロチオネイン(MT)誘導を介在する細胞内シグナル経路を有機-無機ハイブリッド分子を活用して解析し、MTアイソフォームのうち、MT-1の誘導にはMTF-1-MRE経路とNrf2-ARE経路の両方が必要なのに対し、MT-2の誘導にはMTF-1-MRE経路のみが関与することを明らかにした。さらに、MT-1AおよびMT-2の誘導は、ALK5-Smad2/Smad4-Sp1経路およびALK5-Smad2-Sp1経路によって介在されることも明らかにした。MTアイソフォームには機能上の違いはないと考えられてきたが、実際には機能分化が存在することが示唆された。

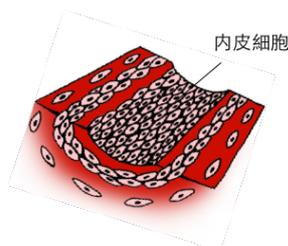
研究成果の概要(英文)：The present study revealed that induction of metallothionein (MT) isoforms MT-1 and MT-2 of vascular endothelial cells mediated by the MTF-1-MRE pathway and Nrf2-ARE pathway, respectively, using organic-inorganic hybrid molecules. Additionally, it was also revealed that induction of MT-1A and MT-2A is mediated by the ALK5-Smad2/Smad4-Sp1 pathway and ALK5-Smad2-Sp1 pathway, respectively. It has been postulated that there is no functional difference between MT-1 and MT-2, however, the present results suggest the functional differentiation between the MT isoforms.

研究分野：環境健康学，毒性学，バイオオルガノメタリクス

キーワード：バイオオルガノメタリクス メタロチオネイン 有機-無機ハイブリッド分子 誘導 血管内皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

有機化合物に金属原子が組み込まれた構造を有する化合物を有機-無機ハイブリッド分子 (ハイブリッド分子) と呼ぶ。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。それ以来、ハイブリッド分子は分子変換 (合成) 反応に応用する試薬として高く評価され、それを生きた科学-有機元素化学-は飛躍的に発展してきた。一方、ハイブリッド分子の生命科学への応用は皆無に等しい状態が続いている。申請者らは、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名付け研究を展開している。



血管内皮細胞は血液と直接接している唯一の cell type であり、血管病変の防御に重要な役割を果たしている。メタロチオネ

ン (MT) は亜鉛などの必須微量元素の代謝制御を行い、加えて重金属の毒性軽減作用や抗酸化作用など多様な機能を有する生体防御タンパク質である。これらの機能を有する MT アイソフォームは MT-1 と MT-2 である。これまで MT-1 と MT-2 は機能的にも発現制御的にも違いがないと考えられてきたが、MT-1 と MT-2 の遺伝子発現比率が異なる事例が報告され、MT アイソフォームの機能分化の可能性が示唆されている。

一般に、MT は亜鉛やカドミウムなどの重金属によって誘導されることが知られている。中でも無機亜鉛は毒性が低く扱いやすいので、MT 誘導機構の解明のツール (誘導剤) として広く用いられている。しかしながら、内皮細胞において、カドミウムは MT を誘導するが無機亜鉛は誘導することができないことが示唆されている。

## 2. 研究の目的

上記の研究背景は、第一に血管内皮細胞において MT を誘導するメカニズムを解析するツールを獲得すること、第二にそのツールを活用して MT アイソフォームの誘導を担う細胞内シグナル経路などの誘導機構を解析すること、第三に内皮細胞の機能を調節する生理活性因子、特にサイトカイン/細胞増殖因子による MT 誘導が起こるかどうかが、起こるとすればその誘導を担う細胞内シグナル経路を解析すること、が重要課題であることを示唆している。本研究の目的は有機-無機ハイブリッド分子ライブラリーから内皮細胞の MT 誘導を解析するツールを獲得し、それを活用して内皮細胞 MT の誘導機構を解析し、さらにサイトカイン/細胞増殖因子による MT 誘導とそれを担う細胞内シグナル経路についても検討を加えることである。

## 3. 研究の方法

従来、MT アイソフォームの機能分化を解析するために、ヒト由来の細胞を用い、構造的に発現している MT アイソフォーム mRNA のレベルの高さや重金属に対するそれらの応答性の違いを調べるなどの戦略が採用されてきた。しかしながら、そのような戦略では 8 つのサブアイソフォームについて相同性が高いタンパク質と塩基配列が類似している mRNA を定量的に評価しなければならず、実験が困難である。そこで、MT サブアイソフォームとして MT-1A, MT-1E および MT-2A の 3 つだけを発現しているウシ大動脈内皮細胞を材料として用いた。

MT 遺伝子のプロモーター領域には metal response element (MRE) と呼ばれる転写因子 MTF-1 に応答する配列および antioxidant response element (ARE) と呼ばれる転写因子 nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) に応答する配列があることが確認されたので、MTF-1-MRE 経路および Nrf2-ARE 経路に注目し解析した。

この内皮細胞をコンフルエントまで培養し、被験物質で処理し、MT の発現および細胞内シグナルを担う分子の発現を解析した。MT タンパク質は Western blot 分析で、MT mRNA は Real time RT-PCR 法にてそれぞれ検出した。

## 4. 研究成果

(1) 血管内皮細胞において MT を誘導する有機-無機ハイブリッド分子の探索

まず、亜鉛錯体ライブラリーを構築し、個々の分子について内皮細胞における MT 誘導能を検討した。次いで、銅錯体ライブラリーおよび有機アンチモン化合物ライブラリーについても検討を加えた。その結果、以下のことが明らかになった。

- ① 無機亜鉛が内皮細胞の MT を誘導できないことが確認された。
- ② bis(L-cysteinato)zincate(II) [Zn(cys)<sub>2</sub>] は MTF-1-MRE 経路を活性化したが、MT を誘導することはできなかった。したがって、少なくとも内皮細胞においては MTF-1-MRE 経路を活性化するだけでは MT は誘導されないことが示唆された。
- ③ zinc(II) bis(diethyldithiocarbamate) [Zn(edtc)<sub>2</sub>] も Nrf2-ARE 経路を活性化せず MTF-1-MRE 経路だけを活性化したが、すべての MT サブアイソフォームの発現を上昇させた。
- ④ copper(II) bis(diethyldithiocarbamate) (Cu10) は、MTF-1-MRE 経路と Nrf2-ARE 経路の両方を活性化し、内皮細胞においてすべての MT サブアイソフォームを誘導した。
- ⑤ 28 化合物から成る有機アンチモン化合物ライブラリーから獲得した Tris(pentafluorophenyl)stibane

(Sb35) は MTF-1-MRE 経路と Nrf2-ARE 経路の両方を活性化し、内皮細胞においてすべての MT サブアイソフォームを転写段階でのみ誘導した。

以上の知見から、Cu10 および Sb35 を活用して内皮細胞 MT 誘導への MTF-1-MRE 経路および Nrf2-ARE 経路の関与を検討することとした。

(2) MTF-1-MRE 経路および Nrf2-ARE 経路の活性化機構

MT 誘導への MTF-1-MRE 経路および Nrf2-ARE 経路の関与を検討する前提として、それぞれの経路の活性化機構について検討した。

①MTF-1-MRE 経路の活性化：MTF-1 が亜鉛イオンによって活性化されるという知見に基づき、亜鉛イオンを輸送し細胞内における亜鉛イオンの分布を変える亜鉛輸送体 (ZIPs) に着目した。siRNA により内皮細胞の ZIP 分子種をそれぞれ発現抑制したとき、ZIP3 および ZIP7 を発現抑制したときのみ、Cu10 による MT-2A mRNA 発現の上昇が抑制された。このとき、ZIP3 発現を抑制した内皮細胞では Cu10 による細胞障害が認められた。そこで、ZIP7 について詳細に検討した結果、Cu10 による内皮細胞の MT 誘導が亜鉛輸送体 ZIP7 の発現上昇により制御されることが分かった。ZIP7 は小器官に局在する亜鉛輸送体であり、ZIP7 の発現上昇による小胞体などの小器官から細胞質への亜鉛イオンの流出促進が、MTF-1 の活性化を介した MT 誘導に寄与すると示唆された。

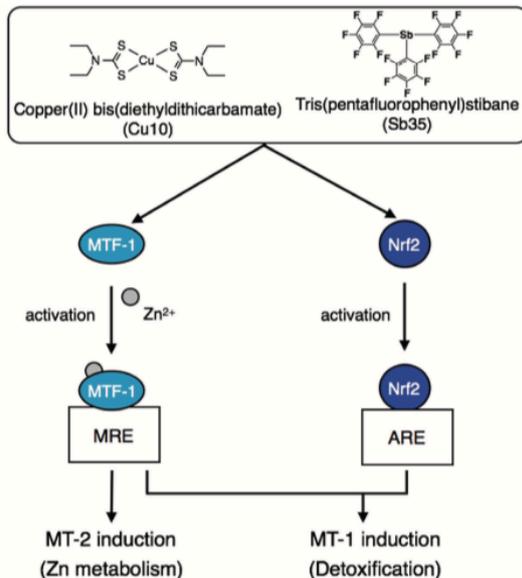
②Nrf2-ARE 経路の活性化：Cu10 は Nrf2 を強く活性化することが分かった。Nrf2 の下流にある HO-1, NQO1, GCLM の発現の上昇も確認された。Nrf2 の活性化は、Cu10 の配位子、銅イオン、亜鉛置換体および銅置換体では起こらず、Cu10 の分子全体が重要であることが示唆された。細胞内への亜鉛の蓄積は Cu10 によって変化しなかったが、銅の蓄積は硫酸銅よりも Cu10 処理で顕著に増加した。この高い蓄積には銅イオンを輸送する輸送体 CTR1 は関与していなかった。Cu10 は Nrf2 を結合して不活性化している Keap1 に結合した。また、Cu10 はプロテアソームの活性を有意に阻害した。以上から、Cu10 は Keap1 に結合して Nrf2 を遊離・安定化させるだけでなく、プロテアソームを阻害して Nrf2 の分解を遅らせ、結果として Nrf2 を活性化し、Nrf2-ARE 経路を活性化することが示唆された。

(3) 血管内皮細胞において MT 誘導を担う細胞内シグナル経路の解析

上記の研究成果に基づき、Cu10 による血管内皮細胞の MT 誘導を介在する細胞内シグナル経路の解析を行った。Cu10 による MT 誘導は配位子や硫酸銅では起こらず、この誘導には Cu10 分子としての構造が必要であることが示された。Cu10 による内皮細胞 MT

の誘導は MTF-1 に依存的であった。一方、siRNA によって Nrf2 をノックダウンしたとき、MT-1A および MT-1E の転写誘導は有意に低下したが、MT-2A の転写誘導は影響を受けなかった。同様の結果は、Sb35 による MT サブアイソフォームの転写誘導についても認められた。

以上の結果は、MT アイソフォームのうち、MT-1 の誘導には MTF-1-MRE 経路および Nrf2-ARE 経路の両方が関与するが、MT-2A の誘導には MTF-1-MRE 経路のみが関与することを示唆している。MT の生理的機能として重金属の解毒と亜鉛代謝が特に重要だとされるが、MTF-1 が亜鉛によって活性化されることおよび Nrf2 が細胞防御を司る転写因子であることを考えると、MT-1 は重金属や活性酸素などの毒性防御に機能し、一方、MT-2 の主な機能は亜鉛代謝の調節にあるのかもしれない。



(4) TGF- $\beta_1$  による血管内皮細胞 MT の誘導とそれを担う細胞内シグナル経路

有機-無機ハイブリッド分子を活用した解析によって血管内皮細胞 MT アイソフォームの誘導を介在する細胞内シグナル経路が明らかになったので、次に内皮細胞の機能を広く調節するサイトカインである TGF- $\beta_1$  による MT 誘導を検討した。

内皮細胞において、TGF- $\beta_1$  は MT タンパク質の発現を上昇させた。MT-1E mRNA の TGF- $\beta_1$  による発現上昇は認められなかったが、TGF- $\beta_1$  の濃度および時間依存的に MT-1A および MT-2A mRNAs の発現上昇が認められた。TGF- $\beta_1$  と TGF- $\beta_1$  中和抗体を同時処理したところ、TGF- $\beta_1$  による MT-1A および MT-2A mRNAs の発現上昇は消失した。MT mRNA の発現上昇は、他の内皮細胞機能調節因子—FGF-2, VEGF, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  および Thrombin—によっても起こらず、IL-6 は MT-1A mRNA の発現を上昇させたが TGF- $\beta_1$  の作用の方が強かった。

内皮細胞の MT 誘導は MTF-1-MRE 経路および Nrf2-ARE 経路によって介在されることが明らかになっている。しかしながら、TGF- $\beta_1$  による内皮細胞の MRE および ARE の活性化は認められず、MTF-1 および Nrf2 をそれぞれ発現抑制しても TGF- $\beta_1$  による MT-1A および MT-2A mRNAs の発現上昇は抑制されなかった。

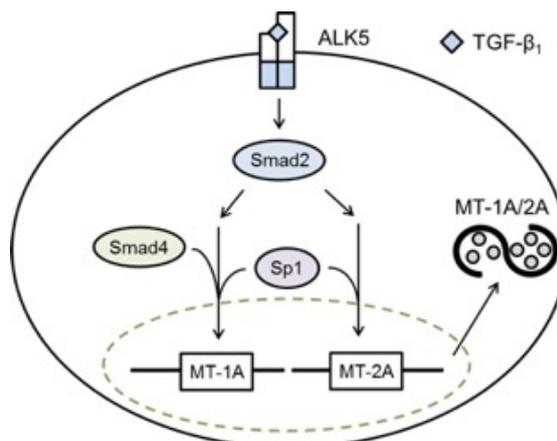
内皮細胞において TGF- $\beta_1$  の下流シグナルは細胞膜上に存在する TGF- $\beta$  受容体 ALK1 および ALK5 によって介在される。そこで、MT-1A および MT-2A mRNAs の発現誘導に関わる受容体を検討したところ、ALK5 を発現抑制した内皮細胞において TGF- $\beta_1$  による MT-1A および MT-2A mRNAs の発現上昇が抑制された。ALK1 を発現抑制しても MT-1A および MT-2A mRNAs の発現上昇は抑制されなかった。

ALK5 下流のシグナル伝達経路には、Smad 経路 (Smad2/3) および non-Smad 経路である MAPK (ERK, p38 MAPK および JNK) 経路が存在する。TGF- $\beta_1$  による内皮細胞の Smad2/3 の活性化が認められた。Smad2 の発現抑制により TGF- $\beta_1$  による MT-1A および MT-2A mRNAs の発現上昇が抑制された。しかしながら、Smad3 を発現抑制しても MT-1A および MT-2A mRNAs の発現上昇は抑制されなかった。Smad2 と複合体を形成し、その核移行を促進する Smad4 を発現抑制した内皮細胞では、TGF- $\beta_1$  による MT-1A mRNA の発現上昇が抑制された。これに対し、MT-2A mRNA の発現上昇には Smad4 の発現抑制の影響は認められなかった。Smad2 下流の転写因子 Sp1、転写調節因子 CBP および p300 の関与を検討したところ、Sp1 の発現抑制によって TGF- $\beta_1$  による MT-1A および MT-2A mRNAs の発現上昇が抑制された。

一方、TGF- $\beta_1$  による MT-1A および MT-2A mRNAs の発現上昇における MAPK 経路の関与を検討したが、TGF- $\beta_1$  による ERK, p38 MAPK および JNK の活性化が認められたものの、それらの阻害剤を処理しても TGF- $\beta_1$  による MT-1A および MT-2A mRNAs の発現上昇は抑制されなかった。

以上の結果より、内皮細胞において、TGF- $\beta_1$  は MTF-1-MRE 経路、Nrf2-ARE 経路および MAPK 経路ではなく ALK5-Smad2 経路の活性化を介して MT を誘導することが明らかになった。その中で MT-1A の転写誘導には Smad2 と協調して Smad4 および Sp1 が関与し、このうち Sp1 は MT-2A の転写誘導にも関与することが示された。本研究は、内皮細胞層が傷害を受けたとき、粘着・凝集した血小板由来する TGF- $\beta_1$  が傷害部位近傍の内皮細胞において MT を誘導し、酸化ストレスなどに対する防御応答を活性化することを示唆するものである。同時に、本研究は TGF- $\beta_1$  の新しい機能と MT 誘導を介在する新しいシグナル経路を明らかにしたもので

ある。



#### (5) まとめ

有機-無機ハイブリッド分子を生命科学に応用するバイオオルガノメタリクス戦略に基づき、血管内皮細胞の MT 誘導機構を解析し、誘導を介在する細胞内シグナル経路が MT アイソフォームによって異なることを明らかにした。また、TGF- $\beta_1$  が内皮細胞 MT を誘導することを見つけ、その誘導を介在する細胞内シグナル経路は MTF-1 に依存しない TGF シグナルの一部であることを示した。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 20 件)

- ① Takehiro Nakamura, Eiko Yoshida, Tomoya Fujie, Fumihiko Ogata, Chika Yamamoto, Naohito Kawasaki and Toshiyuki Kaji (2017) *Journal of Toxicological Sciences*, **42**, 683-687. (査読有り)  
DOI: <https://doi.org/10.2131/jts.42.683>
- ② Tomoya Fujie, Shiori Okino, Eiko Yoshida, Chika Yamamoto, Hiroshi Naka and Toshiyuki Kaji (2017) Copper diethyldithiocarbamate as an inhibitor of tissue plasminogen activator synthesis in cultured human coronary endothelial cells. *Journal of Toxicological Sciences*, **42**, 553-558. (査読有り)  
DOI: <https://doi.org/10.2131/jts.42.553>
- ③ Takato Hara, Takayuki Kojima, Hiroka Matsuzaki, Takehiro Nakamura, Eiko Yoshida, Yasuyuki Fujiwara, Chika Yamamoto, Shinichi Saito and Toshiyuki Kaji (2017) Induction of syndecan-4 by organic-inorganic hybrid molecules with a 1,10-phenanthroline structure in cultured vascular endothelial cells. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**, 352. (査読有り)  
DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18020352>
- ④ Tomoya Fujie, Takato Hara and Toshiyuki Kaji (2016) Toxicology of organic-inorganic hybrid molecules: bio-organometallics and

- its toxicology. *Journal of Toxicological Sciences*, **42** (Special issue), S81-S88. (査読有り)  
DOI: <https://doi.org/10.2131/jts.41.SP81>
- ⑤ Tomoya Fujie, Masaki Murakami, Eiko Yoshida, Shuji Yasuike, Tomoki Kimura, Yasuyuki Fujiwara, Chika Yamamoto and Toshiyuki Kaji (2016) Transcriptional induction of metallothionein by tris(pentafluorophenyl)stibane in cultured bovine aortic endothelial cells. *International Journal of Molecular Sciences*, **17**, 1381. (査読有り)  
DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms17091381>
- ⑥ Tomoya Fujie, Masaki Murakami, Eiko Yoshida, Tadashi Tachinami, Yasuhiro Shinkai, Yasuyuki Fujiwara, Chika Yamamoto, Yoshito Kumagai, Hiroshi Naka and Toshiyuki Kaji (2016) Copper diethyldithiocarbamate as an activator of Nrf2 in cultured vascular endothelial cells. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **21**, 263-273. (査読有り)  
DOI: [10.1007/s00775-016-1337-z](https://doi.org/10.1007/s00775-016-1337-z)
- ⑦ Tomoya Fujie, Yukino Segawa, Eiko Yoshida, Tomoki Kimura, Yasuyuki Fujiwara, Chika Yamamoto, Masahiko Satoh, Hiroshi Naka and Toshiyuki Kaji (2016) Induction of metallothionein isoforms by copper diethyldithiocarbamate in cultured vascular endothelial cells. *Journal of Toxicological Sciences*, **41**, 225-232, 2016. (査読有り)  
DOI: <https://doi.org/10.2131/jts.41.225>
- ⑧ Tomoya Fujie, Yukino Segawa, Akane Uehara, Takehiro Nakamura, Tomoki Kimura, Eiko Yoshida, Chika Yamamoto, Mananobu Uchiyama, Hiroshi Naka and Toshiyuki Kaji (2016) Zinc diethyldithiocarbamate as an inducer of metallothionein in cultured vascular endothelial cells. *Journal of Toxicological Sciences*, **41**, 217-224. (査読有り)  
DOI: <https://doi.org/10.2131/jts.41.217>
- ⑨ Yasuhiro Shinkai, Tomoki Kimura, Ayaka Itagaki, Chika Yamamoto, Keiko Taguchi, Masayuki Yamamoto, Yoshito Kumagai and Toshiyuki Kaji (2016) Partial contribution of the Keap1-Nrf2 system to cadmium-mediated metallothionein expression in vascular endothelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **295**, 37-46. (査読有り)  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.01.020>
- ⑩ Takato Hara, Hiroka Matsuzaki, Takehiro Nakamura, Eiko Yoshida, Takanori Ohkubo, Hiroki Maruyama, Chika Yamamoto, Shinichi Saito and Toshiyuki Kaji (2016) Cytotoxicity of zinc, copper and

rhodium complexes with 1,10-phenanthroline or 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline in cultured vascular endothelial cells. *Fundamental Toxicological Sciences*, **3**, 109-113. (査読有り)

DOI: <https://doi.org/10.2131/fts.3.109>

- ⑪ Kumiko Kohri, Eiko Yoshida, Shuji Yasuike, Tomoya Fujie, Chika Yamamoto and Toshiyuki Kaji (2015) The cytotoxicity of organobismuth compounds with certain molecular structures can be diminished by replacing the bismuth atom with an antimony atom in the molecules. *Journal of Toxicological Sciences*, **40**, 321-327. (査読有り)

DOI: <https://doi.org/10.2131/jts.40.321>

その他 9 件

〔学会発表〕(計 96 件)

- ① 鍛冶 利幸. アンチモンおよびテルル含有ハイブリッド分子の細胞毒性とバイオオルガノメタリクス研究への活用 (招待講演). 第 23 回ヒ素シンポジウム, つくば, 2017 年.
- ② 鍛冶 利幸. バイオオルガノメタリクス: 重金属毒性学から生まれた新しい研究戦略 (招待講演). 科学技術振興機構国際科学技術共同研究推進事業 戦略的国際共同研究プログラム: 日本-中国共同研究 都市における環境問題または都市におけるエネルギー問題に関する研究分野, 岐阜, 2017 年.
- ③ 鍛冶 利幸. 有機-無機ハイブリッド分子の血管毒性学 (招待講演). プラズマ分光分析研究会第 99 回講演会, 東京, 2017 年.
- ④ 鍛冶 利幸. バイオオルガノメタリクスの到達点と課題 (招待公演). 東京理科大学総合研究院バイオオルガノメタリクス研究部門研究交流会, 東京, 2017 年.
- ⑤ 鍛冶 利幸. 重金属の毒性学からバイオ元素戦略の毒性学への展開 (日本毒性学会学会賞受賞講演). 第 43 回日本毒性学会学術年会, 名古屋, 2016 年.

その他 91 件

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rs.tus.ac.jp/kaji-lab/>

<https://www.tus.ac.jp/ridai/doc/ji/RIJIA01Detail.php?act=nam&kin=ken&diu=6347>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鍛冶 利幸 (KAJI Toshiyuki)

東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号: 90204388