

平成21年 5月29日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18790104

研究課題名（和文） 無機ヒ素による血管細胞機能障害の分子メカニズム

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of vascular cell dysfunction by inorganic arsenic

研究代表者

藤原 泰之（FUJIWARA YASUYUKI）

愛知学院大学・薬学部・准教授

研究者番号：40247482

研究成果の概要：

環境汚染金属の一つであるヒ素は、動脈硬化病変などの血管病変の危険因子とされる。今回、血管構成細胞である血管内皮細胞および血管平滑筋細胞を用いて、それらの細胞のプロテオグリカンと呼ばれる糖タンパク質の産生に対するヒ素の作用を検討した。その結果、3価の無機ヒ素が血管内皮細胞並びに血管平滑筋細胞のプロテオグリカン合成を非特異的に阻害することが見いだされ、ヒ素による動脈硬化病変の進展に血管構成細胞のプロテオグリカン代謝異常が関与する可能性が示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	360,000	3,760,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：ヒ素，亜ヒ酸，血管内皮細胞，血管平滑筋細胞，動脈硬化症

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化病変は虚血性心疾患，脳血管障害などの主要死因の上位を占める疾患に関与している。この病変の発症・進展の分子機構は極めて複雑ではあるが，共通して（1）傷害内皮細胞層の修復の遅延，（2）

血管内皮細胞の機能障害による抗凝固特性の低下，（3）血管平滑筋細胞の内膜における増生，および（4）主として血管平滑筋細胞に由来するプロテオグリカンなどの細胞外マトリックス成分の蓄積，が観察される。このうち，プロテオグリカンは，

動脈硬化病変進展の鍵分子であることが共通の認識になりつつあり、特に重要である。

プロテオグリカンは、コア蛋白とよばれる蛋白骨格にヘパラン硫酸やコンドロイチン/デルマタン硫酸などのグリコサミノグリカン糖鎖が結合した構造を持つ複合高分子であり、血管組織の恒常性維持に寄与しているが、動脈硬化巣に蓄積したプロテオグリカンは様々な分子と相互作用して動脈硬化病変の進展と形成に寄与する。血管壁のプロテオグリカンは血管平滑筋細胞および血管内皮細胞に由来することから、動脈硬化病変は血管平滑筋細胞および血管内皮細胞のプロテオグリカン代謝異常を一側面とする疾患であると捉えることができる。

血管内皮細胞の細胞外マトリックスは、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPGs) の大型分子種パールカンとコンドロイチン/デルマタン硫酸プロテオグリカン (CS/DSPGs) の小型分子種ビグリカンを保持し、細胞膜上にも HSPGs の小型分子種シンデカン-1 やグリピカンなどを保持している。これらのプロテオグリカン分子種は細胞増殖因子、酵素、プロテアーゼインヒビターなど様々な生理活性物質の活性制御を通じて内皮機能調節に関わっている。このプロテオグリカンの活性の多くは、グリコサミノグリカン糖鎖中の特異的な部分糖鎖構造 (機能ドメイン) を介した生理活性物質との結合 (相互作用) によって発現される。すなわち、同じ HSPG 分子であっても、グリコサミノグリカン糖鎖の微細構造が変化すれば、プロテオグリカンの活性も変化する。一方、血管平滑筋細胞が産生するコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの大型分子種バーシカンは、ヒア

ルロン酸とともにバーシカン/ヒアルロン酸リッチ細胞外マトリックスを形成するが、これは血管平滑筋細胞の遊走と増殖に不可欠であり、しかも LDL の保持に重要に関与している。

我々は、血管毒性を示す環境汚染重金属であるカドミウムおよび鉛が血管内皮細胞および血管平滑筋細胞に対して機能異常を引き起こし、しかもこの機能異常には細胞機能を調節するプロテオグリカンの合成異常が関与しているのではないかという独自の観点から細胞培養系を用いて検討してきた。その結果、カドミウムおよび鉛が細胞種ならびに各々の金属に依存した様式でプロテオグリカン合成異常を引き起こし、しかも血管内皮細胞においては鉛がパールカン分子の選択的な合成異常に基づく内皮機能異常 (内皮増殖阻害) を引き起こすことを見いだした (Review, *J. Health Sci.*, 46, 1—4, 2000; *J. Health Sci.*, 50, 197-204, 2004)。

ところで、環境汚染金属の一つであるヒ素が動脈硬化病変の危険因子であることが、疫学的研究により示されている (Review, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 198, 444—449, 2004)。また、動脈硬化病変のモデル動物であるアポE欠損マウスにおいても、ヒ素が動脈硬化病変の進展を促進させることが報告されている (*Environ. Health Perspect.*, 111, 1744—1748, 2003)。しかしながら、ヒ素曝露による動脈硬化病変の発症メカニズムには不明な点が多く残されていた。これまで細胞培養系を用いた研究において、ヒ素曝露が動脈硬化病変の進展に関わる内皮機能の障害を引き起こすことが報告されてはいるが、プロテオグリカン代謝に関する報告は国内外を問わず皆無であった。我々は、カドミウムや鉛

と同様に血管病変の危険因子とされる無機ヒ素の場合もプロテオグリカンの代謝異常を介した細胞機能異常を引き起こすのではないかと考え、非特異的な細胞毒性を示さない低濃度の亜ヒ酸が血管内皮細胞のプロテオグリカン合成を濃度依存的に阻害することを最近見いだした (*J. Health Sci.*, 51, 461—468, 2005). しかしながら、ヒ素曝露により影響を受けるプロテオグリカン分子種の特異性やその構造解析など詳細な検討には至っていなかった。また、血管平滑筋細胞のプロテオグリカン合成に対するヒ素の作用についても不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、プロテオグリカン合成に対するヒ素の作用を検討し、ヒ素の血管毒性発現におけるプロテオグリカン代謝異常の関与の可能性を確認することを目的とした。また、プロテオグリカン合成に対するヒ素の阻害作用を修飾し得る因子（金属元素や生理活性物質など）を検索することを目的とした。これらの検討により、ヒ素による血管病変発症のメカニズム解明に新たな知見を提供できることを目指した。

3. 研究の方法

ヒ素による血管内皮細胞および血管平滑筋細胞プロテオグリカンの特性の変化

コンフルエントおよびスパースな血管内皮細胞および血管平滑筋細胞を調製し、 $[^{35}\text{S}]$ 硫酸を含む無血清培地中で無機ヒ素存在下 24 時間代謝標識した。標識後、細胞層と培地から放射活性なプロテオグリカンを dissociative な条件で抽出し、DEAE-Sepharose 陰イオン交換クロマトグラフィーによって荷電密度の違いに基づ

き、ヘパラン硫酸プロテオグリカンとコンドロイチン/デルマトン硫酸プロテオグリカンを分離した。以上の検討から、血管内皮細胞および血管平滑筋細胞のプロテオグリカン代謝に対する無機ヒ素の作用を検討した。また、プロテオグリカン代謝において、無機ヒ素による細胞の応答性が細胞密度によって異なるかどうかを検討した。

細胞内メタロチオネイン mRNA 量およびメタロチオネインタンパク質量の測定

ビスマス、ヒ素およびシロスタゾール処理後の細胞層より total RNA を抽出し、メタロチオネイン mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR で調べた。別に、処理後の細胞層から total タンパク質を回収し、ウェスタンブロット分析によりメタロチオネインタンパク質量の変化を評価した。以上の検討により、各種血管構成細胞のメタロチオネイン合成誘導に対する各種化合物の作用を明らかにした。

4. 研究成果

平成 18 年度は、血管内皮細胞および血管平滑筋細胞の培養系を用い、以下の知見を得た。高細胞密度の血管平滑筋細胞において、 $10\ \mu\text{M}$ の亜ヒ酸は細胞層に蓄積したプロテオグリカンへの $[^{35}\text{S}]$ 硫酸の取り込みを有意に減少させた。低細胞密度な血管平滑筋細胞の細胞層においても $10\ \mu\text{M}$ の亜ヒ酸による $[^{35}\text{S}]$ 硫酸の取り込みの減少が認められたが、培地に蓄積したプロテオグリカンへの $[^{35}\text{S}]$ 硫酸の取り込みは $2\ \mu\text{M}$ 以上の亜ヒ酸により顕著に減少していた。このとき、非特異的な細胞傷害性の指標である細胞層から培地中に逸脱した乳酸脱水素酵素の活性に有意な変化は認められなかった。一方、5 価の無機ヒ素であるヒ酸

は、血管平滑筋細胞が産生するプロテオグリカンへの $[^{35}\text{S}]$ 硫酸の取り込みに影響を及ぼさなかった。これらの結果から、3 価の無機ヒ素である亜ヒ酸が血管平滑筋細胞のプロテオグリカン合成を非特異的な細胞傷害性を伴うことなく阻害すること、およびその阻害作用は細胞密度が低い時により強く現れることが示唆された。また、ヒ素の血管毒性を修飾し得る金属イオンの検索を試みたところ、血管内皮細胞において、亜ヒ酸による非特異的な細胞毒性がビスマスにより軽減されることを見出した。さらに、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、これが傷害された場合には速やかな傷害部位の修復が血管病変の防御に重要であるが、非特異的な細胞傷害性を示さない濃度の亜ヒ酸が傷害された内皮細胞層の修復過程を阻害することが明らかとなった。

平成 19 年度は、プロテオグリカン合成に対する亜ヒ酸の阻害作用を修飾する因子の検索を行い、以下の知見を得た。血管内皮細胞において、亜ヒ酸とビスマスが共存した場合、亜ヒ酸による細胞層画分と培地画分に蓄積したプロテオグリカンへの $[^{35}\text{S}]$ 硫酸の取り込み阻害がビスマスによって濃度依存的に有意に軽減されることを見いだした。このような軽減作用は、亜鉛、マンガン、ニッケルおよびコバルトなどの重金属においては認められなかった。血管内皮細胞が産生した $[^{35}\text{S}]$ 硫酸標識プロテオグリカンを DEAE-Sephacel 陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて分離したとき、亜ヒ酸はヘパラン硫酸プロテオグリカン画分およびコンドロイチン/デルマトン硫酸プロテオグリカン画分への $[^{35}\text{S}]$ 硫酸の取り込みを共に阻害した。また、これらの阻害作用はビスマスにより有意に軽減さ

れた。ビスマス単独処理によるプロテオグリカンへの $[^{35}\text{S}]$ 硫酸の取り込みの有意な増加は認められなかった。以上の結果より、ビスマスが血管内皮細胞に対する亜ヒ酸のプロテオグリカン合成阻害作用を軽減する特異な重金属であることが示唆された。

平成 20 年度は、ビスマスによる毒性軽減機構の解明並びにヒ素の血管毒性とメタロチオネインの関与について検討を行った。血管内皮細胞に亜ヒ酸とビスマスを曝露させたところ、ヒ素の細胞内蓄積量がビスマスの共存によって有意に減少することが認められた。ビスマスの細胞内蓄積量も亜ヒ酸が共存することで減少した。生体防御因子であるメタロチオネインはヒ素の毒性軽減に関与することが示されている。そこで、リアルタイム RT-PCR によってメタロチオネインの mRNA 量を測定したところ、亜ヒ酸によるメタロチオネイン mRNA 量の増加が認められたが、ビスマス処理によるメタロチオネイン mRNA 量の有意な変化は認められなかった。したがって、亜ヒ酸毒性に対するビスマスの軽減効果に亜ヒ酸の細胞内蓄積量の減少が一部関与することが示唆された。また血管内皮細胞を用い、亜ヒ酸の細胞毒性に対する抗血小板治療薬シロスタゾールの作用を検討したところ、シロスタゾール前処理によって亜ヒ酸の細胞毒性が軽減することが示された。さらに、カドミウムの細胞毒性もシロスタゾール前処理により軽減されることが認められた。また、シロスタゾールはメタロチオネイン mRNA 量とタンパク質量をともに増加させることが認められた。以上の結果より、シロスタゾールが亜ヒ酸やカドミウムの血管毒性を軽減すること並びにその毒性軽減効果に血

管内皮細胞のメタロチオネイン合成誘導が関与することが示唆された。

以上より、3価の無機ヒ素による血管平滑筋細胞並びに血管内皮細胞のプロテオグリカン代謝異常が動脈硬化病変の進展に寄与する可能性が示された。また、血管組織においてヒ素の細胞毒性がビスマスやシロスタゾールにより軽減されることも明らかとなった。

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)

- ① Fujiwara, Y., Yamamoto, C., Hirooka, T., Terada, N., Satoh, M., Kaji, T. Arsenite but not arsenate inhibits general proteoglycan synthesis in cultured arterial smooth muscle cells. *J. Toxicol. Sci.*, 33, 487-492, 2008. 査読有
- ② Fujiwara, Y., Mikami, C., Nagai, M., Yamamoto, C., Hirooka, T., Satoh, M., Kaji, T. Homocysteine inhibits proteoglycan synthesis in cultured bovine aortic smooth muscle cells. *J. Health Sci.*, 54, 56-65, 2008. 査読有

[学会発表] (計6件)

- ① 藤原泰之, 北川貴大, 鍛冶利幸, 佐藤雅彦, カドミウムおよび亜ヒ酸による血管内皮細胞傷害に対するシロスタゾールの効果, 日本薬学会第129年会, 2009年3月, 京都
- ② 藤原泰之, 北川貴大, 佐藤雅彦, 血管構成細胞におけるシロスタゾールによるメタロチオネイン誘導, 平成20年度日本薬学会東海支部例会, 2008年12月, 静岡
- ③ 藤原泰之, 山本千夏, 廣岡孝志, 寺田奈緒子, 佐藤雅彦, 鍛冶利幸, 亜ヒ酸ナトリウムによる血管平滑筋細胞プロテオグリカン合成の阻害, フォーラム2007: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2007年11月, 大阪
- ④ 藤原泰之, 稲垣孝行, 山本千夏, 廣岡孝志, 佐藤雅彦, 鍛冶利幸, 亜ヒ酸による血管内皮細胞プロテオグリカンの合成阻害に対するビスマスの軽減効果, メタ

ロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会2007, 2007年9月, 徳島

- ⑤ 藤原泰之, 稲垣孝行, 佐藤雅彦, 鍛冶利幸, 血管内皮細胞のプロテオグリカン合成に対する亜ヒ酸とビスマスの相互作用, 第34回日本トキシコロジー学会学術年会, 2007年6月, 東京
- ⑥ 藤原泰之, 稲垣孝行, 山本千夏, 鍛冶利幸, ビスマスは亜ヒ酸による血管内皮細胞プロテオグリカンの合成阻害を軽減する, 日本薬学会第127年会, 2007年3月, 富山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 泰之 (FUJJIWARA YASUYUKI)
愛知学院大学・薬学部・准教授
研究者番号: 40247482

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: