

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12185

研究課題名(和文)ヒ素による血液凝固線溶系の攪乱とその作用機構解明

研究課題名(英文) Disruption of blood coagulation and fibrinolysis system by arsenic and elucidation of its possible mechanisms.

研究代表者

藤原 泰之 (Fujiwara, Yasuyuki)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40247482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、亜ヒ酸がヒト血管内皮細胞に対してNrf-2/ARE経路の活性化を介して組織型プラスミノゲンアクチベーター(t-PA)の産生を選択的に抑制し、その結果として液相のt-PA線溶活性を低下させる機序を明らかにした。また、亜ヒ酸は血管平滑筋細胞やマクロファージ様細胞に対してt-PAの阻害因子であるPAI-1や組織因子(TF)の発現を増加させることを見出した。さらに、亜ヒ酸はマウスの血管組織に対してt-PAの発現低下を引き起こすと同時に血清中のt-PA量を減少させることを確認した。すなわち、動物個体レベルにおいても亜ヒ酸は線溶因子の発現抑制を介して線溶活性を阻害することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界各地でヒ素の地下水汚染による健康被害が発生しているものの、その毒性発現に関わる分子メカニズムは十分に解明されていない。ヒ素は血液凝固・線溶系の破綻を介して動脈硬化症や循環器障害を引き起こすことも示唆されているが、その毒性発現メカニズムの詳細も不明であった。本研究で得られた成果は、ヒ素をはじめとする有害環境汚染物質の血管毒性発現メカニズムに関する解明研究に新たな知見を提供すると共に、ヒ素曝露患者の予防と治療に貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we have elucidated the mechanism by which arsenite selectively suppresses the production of tissue-type plasminogen activator (t-PA), a pro-fibrinolytic factor, via activation of the Nrf-2/ARE pathway in human vascular endothelial cells, resulting in a decrease in t-PA fibrinolytic activity in the liquid phase. We also found that arsenite increased the expression of PAI-1, an inhibitor of t-PA, and tissue factor (TF), a procoagulant factor, on vascular smooth muscle cells and macrophage-like cells. Furthermore, arsenite caused a decrease in the expression of t-PA in vascular tissues of mice, and also decreased the amount of t-PA in the serum. This suggests that arsenite inhibits fibrinolytic activity through suppressing the expression of fibrinolytic factors at the individual animal level.

研究分野：環境健康学, 分子毒性学

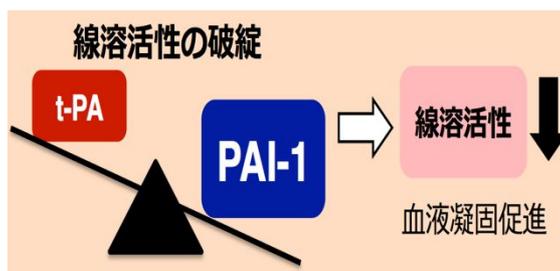
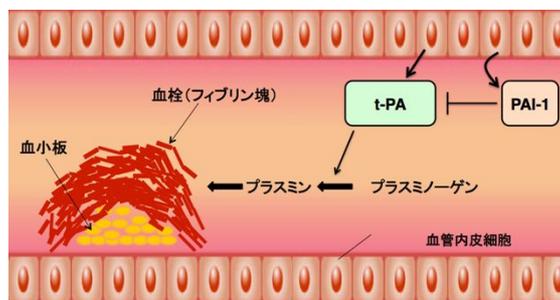
キーワード：ヒ素 血液凝固線溶系 血管内皮細胞 血管平滑筋細胞 血管周囲脂肪組織 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

ヒ素(As)は世界中(特に南アジア)に広く存在する環境汚染物質の一つであり、地下水の高濃度ヒ素汚染による地域住民の健康被害が問題となっている。ヒ素曝露によって、皮膚の色素沈着や多臓器における発がん、循環器疾患など様々な健康被害が引き起こされることが知られている。ところで、血管内腔を一層で覆っている血管内皮細胞は、血液凝固・線溶系をはじめとする様々な血管機能の調節に関与しているが、一方で血管内皮細胞の機能障害に伴う血液凝固・線溶系の破綻は動脈硬化症や循環器障害などの重大な疾患の要因となり得る。実際、ヒ素汚染地域住民において、主に血管内皮細胞から産生される線溶関連タンパク質である組織型プラスミノゲンアクチベーター(t-PA)の血中濃度が低下すると共に、その阻害因子であるプラスミノゲンアクチベーターインヒビター1(PAI-1)の血中濃度が上昇しているとの報告(Wu et al., Thromb. Res. (1993) 72, 211-218)があり、このことから線溶系の破綻が動脈硬化症や循環器障害などの疾患リスクを高めている可能性が示唆されていた。また、亜ヒ酸に曝露した培養血管内皮細胞において、t-PAの発現が抑制されることが確認されていた(Jiang et al., Thromb. Res. (2002) 105, 55-62)が、この報告以外に亜ヒ酸が血管内皮細胞の線溶活性に与える影響については明らかになっていなかった。また、線溶活性低下のメカニズムについても詳細な検討や解明は未だなされていなかった。したがって、本研究課題での学術的「問い」は、「ヒ素はどのような毒性発現様式によって、そしてどのようなメカニズムで血液線溶系の破綻を引き起こすのか？」であり、この「問い」に答えることができれば、ヒ素曝露により引き起こされる血管病変の予防や治療に役立つ有用な知見を提供できると考えた。

2. 研究の目的

線溶は、フィブリン塊をプラスミンが溶解する現象のことであるが、そのプラスミンは血中にあるプラスミノゲン(肝臓で合成・分泌)からt-PAによる活性化によって生じたものである。t-PAは、主に血管内腔を一層で覆っている血管内皮細胞から合成・分泌されるが、血管内皮細胞はt-PAの阻害因子であるPAI-1も合成・分泌しており、両者のバランスが線溶活性を決定する。したがって、t-PAに対してPAI-1が優位となった場合、線溶活性が低下し、血液が凝固傾向に傾くことに繋がり、血液循環障害や動脈硬化症が引き起こされやすくなる。そこで本研究では、ヒ素曝露によって引き起こされる血管内皮細胞機能障害機構の解明を目的とし、ヒト血管内皮細胞株であるEA.hy926細胞を用いて亜ヒ酸の曝露が線溶活性因子に及ぼす影響とその詳細なメカニズム解明を目指すことを第一の目的とした。さらに、血管内皮細胞以外の細胞(血管平滑筋細胞や血球系細胞など)にも焦点をあてるとともにマウスを用いた動物実験もあわせて行うことで、亜ヒ酸による血管毒性発現機構の解明研究並びに血管内皮細胞研究に新しい展開をもたらすことを目的とした。



3. 研究の方法

(1) 血管内皮細胞における亜ヒ酸による線溶活性低下作用のメカニズム解明

t-PAおよびPAI-1の合成と産生への影響：ヒト血管内皮細胞株EA.hy926細胞を亜ヒ酸で処理し、t-PAおよびその阻害因子であるPAI-1のmRNA発現レベルおよび培養上清中へ放出されたタンパク質レベルをリアルタイムRT-PCR法およびELISA法でそれぞれ測定し、亜ヒ酸による線溶活性の低下が、線溶促進作用を有するt-PAの産生抑制または線溶阻害作用を示すPAI-1の産生促進あるいはその両方によるものなのかを確認した。

線溶関連タンパク質の発現抑制/発現促進メカニズムの解明：で明らかになった線溶タンパク質の発現抑制/発現促進メカニズム(シグナル経路)を明らかにするために、各種シグナル経路の阻害剤を用いた検討やシグナル分子をRNA干渉法によってノックダウンすることにより亜ヒ酸で処理したEA.hy926細胞について線溶タンパク質の遺伝子発現レベル、タンパク質発現レベルおよび線溶活性を調査し、その関与を確認した。シグナル経路としては、血管内皮細胞の

線溶タンパク質の発現調節に関与するとされる cAMP 経路や PKC 経路、また様々な細胞種において亜ヒ酸の毒性発現に関与することが報告されている活性酸素種 (ROS) の関与や転写因子である NF- B や Nrf-2 経路などを検討し、亜ヒ酸による毒性発現メカニズム (シグナル経路) を明らかにした。

(2) 他の細胞種の線溶活性に対する亜ヒ酸の作用の解明

EA.hy926 細胞において明らかになった亜ヒ酸の毒性発現様式とその作用発現メカニズムの結果を基に、他の細胞種の線溶活性に対する亜ヒ酸の影響を検討し、血管を構成する細胞種に対するヒ素の線溶活性に対する毒性を評価した。

正常ヒト血管内皮細胞および正常ヒト血管平滑筋細胞について、上記(1)と同様の検討を行った。

ヒト血球系細胞 (単球由来細胞株 THP-1 細胞やマクロファージに分化させた細胞) についても、上記(1)と同様の検討を行った。

(3) マウスの線溶系および血管組織に対する亜ヒ酸の作用の解明

次に、マウスを用いた個体レベルでの検討も遂行した。

マウスに亜ヒ酸を腹腔内投与した後、胸腹部大動脈を摘出し、線溶関連因子の発現変化等を検討し、個体レベルでの血管組織への亜ヒ酸の影響を培養細胞の結果と比較した。

亜ヒ酸を投与したマウスの胸腹部大動脈から血管周囲脂肪組織 (PVAT) を単離し、PVAT における線溶関連遺伝子の発現における亜ヒ酸曝露の影響を検討した。これら検討により血管組織全体への影響を把握することを目指した。

4. 研究成果

(2020 年度)

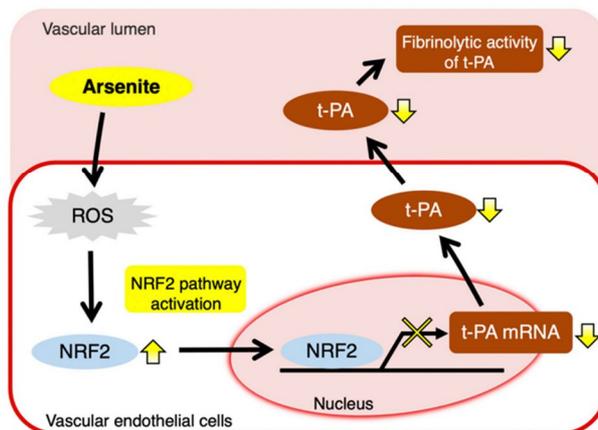
2020 年度は、ヒト血管内皮 EA.hy926 細胞を用いて、亜ヒ酸による血管内皮細胞の線溶活性低下の毒性発現メカニズムを検討し、以下の知見を得た。(1) 亜ヒ酸は、ヒト血管内皮 EA.hy926 細胞に対して、細胞傷害を生じない濃度において、液相の線溶活性を低下させる。(2) その亜ヒ酸による線溶活性の低下は、亜ヒ酸による t-PA の選択的な産生抑制に起因する。(3) その t-PA の産生抑制には、亜ヒ酸による血管内皮 EA.hy926 細胞の Nrf-2/ARE 経路の活性化が重要である。すなわち、亜ヒ酸は血管内皮細胞に対して Nrf-2/ARE 経路の活性化を介して t-PA の産生を選択的に抑制し、その結果として液相の t-PA 線溶活性を低下させるメカニズムを明らかにした。

Summary of *in vitro* study

- As^{III} inhibited the fibrinolytic activity in HVECs .
- As^{III} inhibited the production of t-PA, but not PAI-1, in HVECs .



- Our results suggest that As^{III} reduces fibrinolytic activity in vascular endothelial cells through selective suppression of t-PA expression depending on the activation of Nrf2.



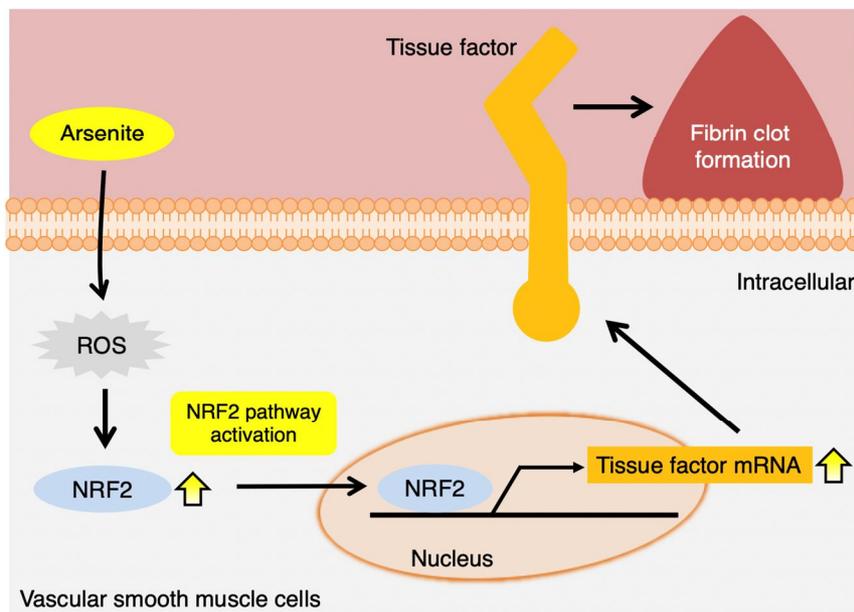
Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 739

また、亜ヒ酸は、血管平滑筋細胞やマクロファージ様細胞に対しては、t-PA の阻害因子である PAI-1 の発現を増加させることを確認した。したがって、亜ヒ酸は血管構成細胞に対してそれぞれ異なった様式で線溶活性の低下を引き起こすことが示唆された。

(2021 年度)

次に、亜ヒ酸は血管平滑筋細胞の組織因子(TF)の発現増加を誘導することを明らかにした。この結果は、亜ヒ酸がTFの発現増加を介して血管内の凝固活性を促進させることを示唆している。また、亜ヒ酸によるTFの発現増加には、Nrf-2/ARE 経路の活性化が関与することが確認された。さらに、マクロファージ様細胞においても、亜ヒ酸は、TFの合成を促進させ、TFの発現にはやはりNrf-2/ARE 経路の活性化が関与していることも確認された。したがって、亜ヒ酸は血管構成細胞(血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、マクロファージなど)に対してそれぞれ異なった様式で線溶活性の低下や凝固活性の促進を引き起こすことが示唆された。

Arsenite induces tissue factor (TF) synthesis through Nrf2 activation in cultured human aortic smooth muscle cells



J. Toxicol. Sci., 46, 187-192, 2021

(2022 年度)

2022 年度では、2020 年度および 2021 年度に細胞レベルで確認された亜ヒ酸による線溶活性の阻害作用が個体レベルでも同様に引き起こされる可能性についてマウスを用いて検討を行った。対照群と比較した場合、亜ヒ酸単回腹腔内投与 24 時間後のマウス血清において、t-PA タンパク質量の有意な減少が認められたが、胸部大動脈および血管周囲脂肪組織 (PVAT) 中の t-PA タンパク質量に有意な変化は認められなかった。血清中の PAI-1 量も有意な変化は認められなかった。亜ヒ酸単回腹腔内投与 3 時間後の t-PA および PAI-1 の mRNA 量を確認したところ、胸部大動脈では有意な変化は認められなかったが、PVAT において t-PA の mRNA 量の有意な減少が観察され、亜ヒ酸曝露による早期の PVAT の t-PA 発現抑制が、血清中の t-PA タンパク質量の減少に一部関与している可能性が示唆された。また、亜ヒ酸を 2 週間連続投与した場合には、血管内皮細胞を含む胸部大動脈における t-PA の発現抑制が血清中の t-PA タンパク質量の減少に関与していることが示唆された。以上の結果より、亜ヒ酸はマウスの胸部大動脈および PVAT に対して線溶促進因子である t-PA の発現低下を引き起こすと同時に血清中の t-PA 量を減少させることが明らかとなった。したがって、個体レベルにおいても、亜ヒ酸は線溶因子の発現抑制を介して線溶活性を阻害する可能性が示唆された。

以上より、亜ヒ酸がヒト血管内皮細胞に対して Nrf-2/ARE 経路の活性化を介して組織型プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) の産生を選択的に抑制し、その結果として液相の t-PA 線溶活性を低下させる機序を明らかにした。また、亜ヒ酸は血管平滑筋細胞やマクロファージ様細胞に対して t-PA の阻害因子である PAI-1 の発現や凝固関連因子である TF の発現を増加させることを見出した。さらに、亜ヒ酸はマウスの血管組織に対して t-PA の発現低下を引き起こすと同時に血清中の t-PA 量を減少させることを確認した。すなわち、動物個体レベルにおいても亜ヒ酸は線溶因子の発現抑制を介して線溶活性を阻害することが確認された。

ヒ素は血液凝固・線溶系の破綻を介して動脈硬化症や循環器障害を引き起こすことも示唆されていたが、その詳細な毒性発現メカニズムは不明であった。本研究で得られた成果は、亜ヒ酸をはじめとする有害環境汚染物質の血管毒性発現メカニズムに関する解明研究に新たな知見を提供すると共に、ヒ素曝露患者の予防と治療に貢献できる可能性があるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakano, T., Takahashi, T., Yamamoto, C., Kaji, T., Fujiwara, Y.	4. 巻 46
2. 論文標題 Arsenite induces tissue factor synthesis through Nrf2 activation in cultured human aortic smooth muscle cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 187-192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2131/jts.46.187	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Tsuyoshi, Takahashi Tsutomu, Yamamoto Chika, Yoshida Eiko, Kaji Toshiyuki, Fujiwara Yasuyuki	4. 巻 22
2. 論文標題 Arsenite Inhibits Tissue-Type Plasminogen Activator Synthesis through NRF2 Activation in Cultured Human Vascular Endothelial EA.hy926 Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 739 ~ 739
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22020739	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計25件（うち招待講演 3件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 中野毅, 荒木祐美, 高橋勉, 山本千夏, 鍛冶利幸, 藤原泰之
2. 発表標題 血管平滑筋細胞及びマクロファージ様細胞における亜ヒ酸による組織因子の発現誘導機構
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会, 神戸 (Hybrid開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsuyoshi Nakano, Tsutomu Takahashi, Chika Yamamoto, Yasuyuki Fujiwara, Toshiyuki Kaji
2. 発表標題 Arsenite influences blood coagulation-fibrinolytic systems via Nrf2 pathway activation in cultured vascular component cells
3. 学会等名 日韓次世代ポスターセッション. フォーラム2021: 衛生薬学・環境トキシコロジー. 船橋 (Hybrid開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野毅, 高橋勉, 山本千夏, 藤原泰之, 鍛冶利幸
2. 発表標題 血管構成細胞における血液凝固制御因子の発現に及ぼす亜ヒ酸の影響
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2021. 横浜 (Hybrid開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 恒岡弥生, 横山岬, 石山仁太, 高橋勉, 篠田陽, 藤原泰之
2. 発表標題 亜ヒ酸曝露マウスの血管周囲脂肪組織における炎症性サイトカインの発現誘導
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2021. 横浜 (Hybrid開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮川直也, 藤純礼, 高橋勉, 恒岡弥生, 篠田陽, 藤江智也, 山本千夏, 鍛冶利幸, 藤原泰之
2. 発表標題 亜ヒ酸が血管内皮細胞の活性イオウ分子産生酵素の発現に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第142年会. 名古屋 (オンライン開催).
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋勉, 黄基旭, 永沼章, 藤原泰之
2. 発表標題 亜ヒ酸毒性発現に関わる細胞内糖代謝シグナル (ワークショップ: 重金属のシグナルトキシコロジー)
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野毅, 荒木祐美, 高橋勉, 山本千夏, 鍛冶利幸, 藤原泰之
2. 発表標題 血管内皮細胞及びマクロファージ様細胞の血液凝固線溶系に対する亜ヒ酸の作用
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野毅, 荒木祐美, 高橋勉, 山本千夏, 鍛冶利幸, 藤原泰之
2. 発表標題 亜ヒ酸による免疫系細胞の血液凝固促進因子と線溶抑制因子の発現誘導
3. 学会等名 フォーラム2020: 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野毅, 荒木祐美, 高橋勉, 山本千夏, 鍛冶利幸, 藤原泰之
2. 発表標題 亜ヒ酸が血管平滑筋細胞およびマクロファージ様細胞の 血液凝固・線溶系に与える影響
3. 学会等名 生命金属に関する合同年会 (ConMetal 2020)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野毅, 荒木祐美, 高橋勉, 山本千夏, 鍛冶利幸, 藤原泰之
2. 発表標題 亜ヒ酸はマクロファージ様細胞および血管平滑筋細胞による組織因子の発現を誘導する
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原泰之
2. 発表標題 血液凝固・線溶系に対する亜ヒ酸の毒性発現機構
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会(招待講演)(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋勉, 中野毅, 藤原泰之
2. 発表標題 亜ヒ酸毒性発現に關与する血液凝固・線溶系の破綻
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2022(招待講演)(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takahashi T., Miyakawa N., Fuji S., Tsuneoka Y., Shinoda Y., Fujie T., Yamamoto C., Kaji T., Fujiwara Y.
2. 発表標題 Induction of a reactive sulfur-producing enzyme cystathionine gamma-lyase in cultured vascular endothelial cells exposed to arsenite
3. 学会等名 The 8th International Symposium on Metallomics (ISM-8)(国際学会)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fujiwara Y., Tsuneoka Y., Takahashi T., Shinoda Y.
2. 発表標題 Cadmium induces metallothionein expression in mouse thoracic aorta and perivascular adipose tissue
3. 学会等名 The 8th International Symposium on Metallomics (ISM-8)(国際学会)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中野毅, 高橋勉, 山本千夏, 藤原泰之, 鍛冶利幸
2. 発表標題 亜ヒ酸による血管内皮細胞および血管平滑筋細胞の凝固系亢進とその分子機構
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井関歩夢, 山田帆乃香, 恒岡弥生, 高橋勉, 篠田陽, 藤原泰之
2. 発表標題 亜ヒ酸単回投与マウスの血管および血管周囲脂肪組織のメタロチオネイン発現誘導
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋勉, 宮川直也, 藤純礼, 恒岡弥生, 篠田陽, 藤江智也, 山本千夏, 鍛冶利幸, 藤原泰之
2. 発表標題 亜ヒ酸による血管内皮細胞の活性硫黄分子産生酵素cystathionine -lyaseの発現誘導
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 恒岡弥生, 山田帆乃香, 高橋勉, 篠田陽, 藤原泰之
2. 発表標題 マウス血管組織における線溶系因子の発現に対する亜ヒ酸曝露の影響
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋勉, 宮川直也, 恒岡弥生, 篠田陽, 藤江智也, 山本千夏, 鍛冶利幸, 藤原泰之
2. 発表標題 血管内皮細胞においてcystathionine gamma-lyaseが亜ヒ酸毒性に対して防御的な作用を有する
3. 学会等名 フォーラム2022: 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原泰之, 恒岡弥生, 山田帆乃香, 高橋勉, 篠田陽
2. 発表標題 マウスの血液線溶系に対する亜ヒ酸の毒性発現
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中野毅, 高橋勉, 鍛冶利幸, 藤原泰之, 山本千夏
2. 発表標題 亜ヒ酸による血管構成細胞における血液凝固・線溶系の破綻
3. 学会等名 第27回ヒ素シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木なつ華, 恒岡弥生, 高橋勉, 篠田陽, 藤原泰之
2. 発表標題 亜ヒ酸曝露マウスの血管組織におけるプロテオグリカン分子種の発現解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菅谷颯斗, 佐藤萌, 恒岡弥生, 高橋勉, 篠田陽, 藤原泰之
2. 発表標題 マウス脂肪組織のアディポネクチン発現に対する亜ヒ酸曝露の影響
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 後藤探花, 山田帆乃香, 恒岡弥生, 高橋勉, 篠田陽, 藤原泰之
2. 発表標題 マウスの血液線溶系因子の発現に対する亜ヒ酸曝露の影響
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 恒岡弥生, 横山岬, 高橋勉, 篠田陽, 藤原泰之
2. 発表標題 亜ヒ酸曝露によるマウス血管および血管周囲脂肪組織における炎症性サイトカインの発現誘導
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------