

機関番号：33902

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790136

研究課題名（和文） 動脈硬化症におけるメタロチオネインの役割と医療への応用

研究課題名（英文） Role of metallothionein on the progression of atherosclerosis and its application to medical care.

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（和文）：

メタロチオネイン(MT)は、酸化ストレスや炎症反応に対して保護的役割を有することから、血管組織におけるMTは、動脈硬化病変の発症・進展に対して防御的に寄与できると考えられる。本研究では、モデル動物と細胞培養系を活用し、動脈硬化病変の発症と進展におけるMTの役割を解明することを目的とした。まず、本研究期間において、粥状動脈硬化モデルであるアポリipoprotein E 欠損マウス(ApoE ノックアウトマウス)とMT-I およびMT-II 欠損マウス(MT-I/II ノックアウトマウス)を掛け合わせたApoE/MT-I/II トリプルノックアウトマウスを作製することに成功した。また、ヒト血管内皮細胞を用いて、血管病変誘発の危険因子である亜ヒ酸やカドミウムの曝露によって発現変動する遺伝子を多数見いだした。さらに、抗血小板薬であるシロスタゾールが、血管内皮細胞においてMTを誘導することにより、亜ヒ酸やカドミウムによる血管毒性の発現を強く抑制することも見いだされ、血管組織におけるMTが動脈硬化病変の進展防御に深く関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Since metallothionein (MT) has a protective role against oxidative stress and inflammation, we considered that MT in the vascular tissue may contribute to the protection against the development of atherosclerosis. In this study, we have utilized cell culture systems and animal models to determine whether MT in the vascular tissue can protect the onset and the progression of atherosclerosis. First, in this study period, we produced the MT-I, MT-II and apolipoprotein E (ApoE) deficient mice (MT-I/II/Apo-E triple-knockout mice) from ApoE knockout mice and MT-I and MT-II knockout mice. We also demonstrated the gene expression profile of human vascular endothelial cells exposed to arsenic and cadmium, which are risk factors for vascular lesions. In addition, we found that anti-platelet drug cilostazol strongly inhibits the vascular toxicity of arsenic and cadmium in vascular endothelial cells as a result of induction of metallothionein synthesis. These observations suggest that MT in the vascular tissue may contribute to the protection against the progression of atherosclerosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究代表者の専門分野：環境毒性学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：メタロチオネイン、ノックアウトマウス、血管内皮細胞、カドミウム、ヒ素、
動脈硬化症、血管毒性学

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞や脳梗塞、脳出血などの動脈硬化性疾患は、悪性腫瘍とともにわが国の主要な死因であり、健康寿命に大きな影響を及ぼしている。動脈硬化病変の発症・進展メカニズムは極めて複雑ではあるが、血管内皮細胞の傷害を契機として、(1) T リンパ球や単球/マクロファージの血管内膜への浸潤、(2) 血管内皮細胞の機能障害による抗凝固能の低下、(3) 血管平滑筋細胞の内膜における増生、(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マトリックス成分の蓄積、(5) 内膜における脂質の沈着、などが観察される。このうち複合糖質であるプロテオグリカンは、様々な生体分子と相互作用して動脈硬化病変の進展と形成に関与することから、動脈硬化病変の鍵分子のひとつとされ注目されている。我々は、これまで血管毒性を示す環境汚染金属であるカドミウム、鉛およびヒ素が各々の金属に依存した様式でプロテオグリカンの代謝異常を引き起こし、しかも血管内皮細胞においては、鉛がプロテオグリカン分子の選択的な合成阻害を介して内皮機能異常(増殖阻害)を引き起こすことを見いだした(Review, *J. Health Sci.*, 50, 197-204, 2004; *J. Health Sci.*, 46, 1-4, 2000)。

MT は有害金属や酸化ストレスに対する生体内防御因子として重要な役割を果たしている。また近年、遺伝子工学的手法を用いて MT のトランスジェニックマウスやノックアウトマウスなどの遺伝子改変マウスが作製され、MT の生理機能の解明のための実験モデルとして広く利用されている。例えば、MT-I および-II の遺伝子が欠損した MT-I/II ノックアウトマウスは、有害金属、酸化ストレスおよび炎症反応などに対して高感受性

であることが報告されている。酸化ストレスは生体における多くの病的状態に関与しているが、動脈硬化病変においても酸化 LDL、活性酸素およびフリーラジカルなどの関与が示されている。また、これらの酸化ストレスと同様に炎症反応も動脈硬化病変の発症に重要であると考えられている。したがって、血管組織の MT は重金属類の血管毒性をはじめ酸化ストレスや炎症反応を介した動脈硬化病変の発症・進展に対しても防御的な役割を果たしていることが期待されるが、血管病変の発症と進展における MT の役割についてはほとんど不明であった。

2. 研究の目的

そこで本研究は、動脈硬化症における MT の防御的役割を明らかにし、血管の生理および病理学分野における MT 研究の先駆けとなることを目的とした。具体的には、①粥状動脈硬化モデルであるアポリポ蛋白 E 欠損マウス (ApoE ノックアウトマウス) と MT-I/II ノックアウトマウスを掛け合わせた ApoE/MT-I/II トリプルノックアウトマウスを作製して、動脈硬化病変の発症と進展における MT の役割を解明するとともに、②培養細胞を用いて、血管構成細胞における MT の防御的役割も明らかにする。これらの検討により、動脈硬化病変をはじめとする血管病変の予防と新たな治療法の開発に貢献することを目指した。

3. 研究の方法

1. ApoE/MT-I/II トリプルノックアウトマウスの作製

雌性 MT-I/II ノックアウトマウス (C57BL/6J) と雄性 ApoE ノックアウトマウス (C57BL/6J) を交配させ、ApoE/MT-I/II

ヘテロマウスを作製した。その後、雌雄のヘテロマウス同士を交配し、これより得られた次世代マウスの内、ApoE/MT-I/II トリプルノックアウトマウスを選別した。選別方法は、4 週齢の仔マウスの尾よりゲノム DNA を抽出し、PCR 法による遺伝子型解析 (genotyping) を実施した。

2. 亜ヒ酸およびカドミウム曝露した血管内皮細胞で発現変動する遺伝子の網羅的解析

血管病変の危険因子である亜ヒ酸あるいはカドミウムに曝露した血管内皮細胞から Total RNA を抽出し、有害金属類により変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ法で網羅的に解析した。

3. 血管組織で MT を合成誘導する化合物の探索

MT はカドミウムや亜鉛などの重金属をはじめ、様々な化学物質やストレスによって合成誘導されることが知られている。そこで、血管内皮細胞の培養系を用いて、血管組織に対して保護作用を示すような既存の薬剤や有機金属化合物などによる MT mRNA の発現変動をリアルタイム RT-PCR 法で確認した。非特異的な細胞傷害性を伴わずに MT mRNA レベルを効果的に増加させた化合物については、MT のタンパク質レベルをウェスタンブロット法や ELISA 法で確認した。

4. 研究成果

平成 21 年度は、粥状動脈硬化モデルである ApoE ノックアウトマウスと MT-I/II ノックアウトマウスを掛け合わせた ApoE/MT-I/II トリプルノックアウトマウスの作製を試みた。また、ヒト冠動脈血管内皮細胞および脳毛細血管内皮細胞を用いて、血管病変誘発の危険因子のひとつである亜ヒ酸の曝露によって発現変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ法により解析したところ、10 μ M の亜ヒ酸に 12 時間曝露したヒト冠動脈血管内皮細胞において、発現量が 2 倍以上に増加した遺伝子は 6 種類 (*MTIE*, *MTIH*, *HTRA3*, *MT1B*, *EDNRB*, *HMOX1*) 認められた。ヒト脳毛細血管内皮細胞では、亜ヒ

酸曝露によって 10 種類 (*MTIE*, *MTIH*, *HMOX1*, *EDNRB*, *MT1B*, *FTL*, *SPARC*, *BNIP3L*, *OPTN*, *C11orf74*) の遺伝子の発現が増加したが、このうち、MT 遺伝子を含む 5 種類の遺伝子が冠動脈血管内皮細胞で認められたものと共通していた。一方、両細胞において亜ヒ酸曝露により発現量が 1/2 以下に減少した共通遺伝子は 12 種類 (*TRIB3*, *PLUR*, *SULF2*, *LIPG*, *SC65*, *KLF2*, *ADAMTS1*, *SULT1B1*, *PPAN*, *MPZL2*, *ISG20*, *HOHD4*) であった。以上の結果より、MT 遺伝子をはじめ、亜ヒ酸に曝露した血管内皮細胞において発現変動した遺伝子の中に亜ヒ酸による血管病変誘発作用に影響を及ぼす遺伝子が含まれる可能性が示唆された。本研究成果は論文として発表した (Fujiwara et al., *J. Toxicol. Sci.*, 35, 275-278, 2010)。

平成 22 年度は、作製したトリプルノックアウトマウスの繁殖・維持を試みたが、その過程で、このトリプルノックアウトマウスの繁殖率が野生型マウスと比較して明らかに低いことが観察された。本研究で作製した遺伝子改変マウスは今後も解析を継続していく予定である。また、ヒト冠動脈血管内皮細胞を用いて、動脈硬化病変の危険因子の一つであるカドミウム曝露によって変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ法により網羅的に解析し、カドミウムにより発現量が 2 倍以上に変化した遺伝子を 3 種類、発現量が 1/2 以下に減少した遺伝子を 12 種類見だし、論文として発表した (Fujiwara et al., *J. Toxicol. Sci.*, 36, 141-143, 2011)。さらに、抗血小板薬であるシロスタゾールが、血管内皮細胞において MT を誘導する結果、動脈硬化病変の危険因子である亜ヒ酸やカドミウムの血管毒性の発現を抑制することも見だし、論文として発表した (Fujiwara et al., *J. Toxicol. Sci.*, 36, 155-161, 2011)。以上より、血管組織における MT が動脈硬化病変の発症と進展の防御に深く関与することが示唆された。

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3件)

- ① Fujiwara Y., Banno H., Shinkai Y., Yamamoto C., Kaji T., Satoh M. Protective effect of pretreatment with cilostazol on cytotoxicity of cadmium and arsenite in cultured vascular endothelial cells. J. Toxicol. Sci., 36, 155-161, 2011. 査読有
- ② Fujiwara Y., Honda A., Yamamoto C., Kaji T., Satoh M. DNA microarray analysis of human coronary artery endothelial cells exposed to cadmium. J. Toxicol. Sci., 36, 141-143, 2011. 査読有
- ③ Fujiwara Y., Honda, A., Satoh, M. DNA microarray gene expression analysis of human vascular endothelial cells exposed to arsenite. J. Toxicol. Sci., 35, 275-278, 2010. 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① 藤原泰之、佐藤雅彦、疾病の予防と治療に向けたメタロチオネイン研究の新たな試み、第17回東海メタロチオネイン研究会、2010年12月、岐阜
- ② 藤原泰之、佐藤雅彦、Induction of metallothionein synthesis by organometals and coordination compounds、第20回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2010年6月、徳島
- ③ 藤原泰之、坂野博紀、鍛冶利幸、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と血管保護作用、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 2009、2009年10月、東京
- ④ 藤原泰之、北川貴大、鍛冶利幸、佐藤雅彦、シロスタゾール前処理によるカドミウムおよび亜ヒ酸の細胞毒性の軽減、第36回日本トキシコロジー学会学術年会、2009年7月、盛岡

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：