

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590123

 研究課題名（和文） ヒ素発がんの新規代謝的活性化機構の解明
 －硫黄転移酵素の関わる代謝的活性化－

研究課題名（英文） Possible metabolic activation of arsenic carcinogenesis –New mode of activation of dimethylarsenic involved with sulfur atom-

研究代表者

山中 健三（YAMANAKA KENZO）

日本大学・薬学部・教授

研究者番号：50182572

研究成果の概要（和文）：

ヒ素発がん機構を解明する上で、近年、無機ヒ素以外にも、無機ヒ素のメチル化代謝過程で生ずるジメチルアルシン酸(DMA)ならびに3価ジメチルヒ素の役割が注目されてきた。本研究では、これら代謝物の更なる代謝活性化機構を明らかにし、ヒ素発がん機序の解明を目指した。その結果、強毒性3価ジメチルヒ素は硫黄転移酵素によりジメチルチオアルシン酸(DMTA)へ変換されるが、生体微量元素との相互作用により容易にDMAや3価ジメチルヒ素に再変換されることから、この硫黄原子付加代謝反応は一時的防御機構と考えられた。一方で、ジメチルチオアルシン酸(DMTA)は細胞毒性が強いことが知られ、その毒性は低分子チオール化合物の存在下でジメチルアルシン酸(DMA)よりも強いことが確認された。以上のことから、ジメチルチオアルシン酸(DMTA)以降の代謝は毒性発現における新たな代謝活性化機構が存在することも推定した。

研究成果の概要（英文）：One theory concerning the modes of action is that the biotransformation of dimethylmonothioarsinic acid (DMTA) from dimethylarsinic acid (DMA) plays an important role in the carcinogenesis. However, the mechanisms of in vivo formation and disappearance of DMTA, and its toxicity are not fully understood. Thus, the purpose of the present study was to clarify the mechanism of metabolic formation of DMTA from DMA. DMTA is produced from trivalent dimethylated arsenic but not DMA by rhodanese. DMTA is easily re-converted into DMA by trace elements with a powerful affinity for sulfur. The metabolic process of DMA to DMMTA consists of a complicated mode of interaction between trace metals and/or sulfur transferase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

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：ジメチルアルシン酸、ジメチルモノチオアルシン酸、3価ジメチルヒ素、ヒ素発がんリスク

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒ素化合物の発がん機構は当該研究分野の進展により、ヒ素の解毒的代謝と考えられてきたメチル化代謝、特にジメチルヒ素の代謝生成は発がんの観点からはむしろ毒性増強機構であるとの結論に至った。一方で、いまだ不明な部分も多く残されているヒ素発がん機構の解明において、現在、ヒ素化合物の硫黄付加反応に関わる代謝機構解明が注目されている。特に、ジメチルチオアルシン酸 (DMTA) の代謝生成と毒性発現やがん発症におけるその役割との関連解明が強く望まれている。

2. 研究の目的

本研究は毒性が強く、ヒ素発がんの活性代謝物と疑われているジメチルチオアルシン酸 (DMTA) に着目し、その代謝生成機構および発がんへの関与を明らかにすることで、ヒ素化合物の発がんリスク評価の基礎となる知見を提供することを目的とするとともに、ヒ素代謝ならびに毒性発現における硫黄原子の関連という生体内元素による毒性機構における複合作用の解明により、ヒ素の生体影響に関する新たな研究分野の発展を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 供試ヒ素化合物であるジメチルモノチオアルシン酸 (DMTA) ならびにジメチル亜ヒ酸、ジメチル亜ヒ酸グルタチオン複合体の合成が必須であり、毒性試験への適用量の合成へのスケールアップが当面の課題であったが、研究期間内に達成された。具体的には、市販のジメチルアルシン酸 (DMA) を2度の再結晶により高純度に精製したものを出発原料とした。硫化ソーダより発生させた硫化水素を導入し反応させることで無水ジメチルチオアルシン酸を生成させた。数種類の有機溶媒を用いて再結晶させたのち、NMR、MS、ICP-MS分析等により生成確認ならびに純度確認を行った。純度は数十グラムオーダーで50%以上は確保された。

一方、ジメチル亜ヒ酸はジメチルアルシン酸 (DMA) をヨウ素イオン存在下で亜硫酸ガスで還元することで得られるヨウ化ジメチルアルシンを代用として用いた。すなわち、実験時に加水分解させることでジメチル亜ヒ酸を発生させた。なお、ヨウ化ジメチルアルシンは減圧蒸留による精製を行った。ジメチル亜ヒ酸グルタチオン複合体に関しては、報告 (Cullen, W.R., McBride, B.C., Reglinski, J., 1984. The reaction of methylarsenicals with thiols: Some biological implications. *Journal of Inorganic Biochemistry* 21, 179-193.) に従って合成した。

(2) ジメチルチオアルシン酸 (DMTA) の代謝生成に関して、腸内細菌による生成の可能性は示唆されているが、肝臓などの組織中での生成に関する報告がない。そこで、硫黄転移酵素に着目してジメチル亜ヒ酸グルタチオン複合体を基質として *in vitro* 試験での検討を行い、ジメチルチオアルシン酸 (DMTA) の生成に寄与する酵素の特定を行った。具体的にはマウス肝臓組織ホモジネートを作製し、遠心分離による細胞分画法により、ミトコンドリア画分、ミクロソーム画分を得て、代謝酵素反応を試験管内で行った。特に、多くのオルガネラに存在し、青酸イオンをチオシアン酸イオンに変換する酵素として知られる rhodanese を1つの硫黄転移酵素として着目して検討した。

(3) 上記 (2) で生成した代謝物の同定が必須となることから、HPLC-誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) および HPLC-タンデム質量分析計 (tandem MS/MS) などによる高感度精密分析法を用いて代謝物の同定を行った。

(4) ジメチルチオアルシン酸 (DMTA) がジメチルアルシン酸 (DMA) に比べ毒性が高い理由を明らかにするため、*in vitro* での硫黄原子親和性元素、例えば、銅、鉛、亜鉛、鉄などとの相互作用について検討した。

以上から反応論的考察を加え、膀胱発がんにおける新たな代謝的活性化機構を提案する。

4. 研究成果

毒性の強いジメチルヒ素中間代謝物であるジメチル亜ヒ酸からジメチルチオアルシン酸 (DMTA) の代謝生成に関して、硫黄転移酵素を用いた検討を行った。その結果、強毒性3価ジメチルヒ素を基質として、青酸イオンをチオシアン酸イオンに変換する rhodanese に着目した詳細な *in vitro* 実験を行った結果、次のような結論を得た。

(1) ジメチルチオアルシン酸 (DMTA) の代謝生成はジメチル亜ヒ酸の毒性軽減機構と考えられたが、このチオアルシン酸は銅イオンや鉄イオンなど生体微量元素の中でも硫黄原子に親和性の高い金属の存在下では容易にジメチル亜ヒ酸を経由してジメチルアルシン酸 (DMA) に再変換されることから、この代謝機構は一時的な毒性回避としてのみ存在する機構と推定された。

(2) 一方では、ジメチルチオアルシン酸 (DMTA) の代謝過程でジメチル亜ヒ酸や未同定ながらも揮発性の高い、かつ強い毒性を有す

ることが予想されるヒ素化合物の存在を示す結果が得られた。詳細については、今後の最重要検討課題となる。

(3) 以上のことから、IARCにおいてgroup2Bに分類されている無機ヒ素の主要代謝物のジメチルアルシン酸 (DMA) 以降の代謝過程は単なる酸化還元反応だけではなく、硫黄転移を伴い、かつ必須微量元素との相互作用により毒性発現が修飾されることを見だし、ヒ素発がんにおける解毒機序ならびに代謝活性化機構の研究に新たな一石を投じる結果が得られた。

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0件)

平成25年5月1日現在、投稿中

〔学会発表〕(計3件)

1. 黒澤英俊、下田康代、畑 明寿、山野優子、加藤孝一、立川真理子、圓藤陽子、圓藤吟史、山中健三

グルタチオンに依存したジメチルモノチオアルシン酸の代謝活性化

第18回ヒ素シンポジウム(宮崎県宮崎市、宮日ホール)2012年11月24日

2. 山中健三、下田康代、星井政志、加藤孝一、立川真理子、畑明寿、圓藤陽子、圓藤吟史

ジメチルチオアルシン酸の毒性発現に係る代謝機構について

日本薬学会132年会、札幌市、北海道大学2012年3月31日

3. 下田康代、加藤孝一、立川真理子、圓藤陽子、圓藤吟史、山中健三

ジメチルチオヒ素化合物の毒性発現に係る未知ヒ素代謝物について

日本薬学会第131年会(静岡)2011年3月30日

〔その他〕

ホームページ等

URL

<http://www.pha.nihon-u.ac.jp/page.jsp?id=1392>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山中 健三 (YAMANAKA KENZO)

日本大学・薬学部・教授

研究者番号：50182572

(2) 研究分担者

加藤 孝一 (KATO KOUICHI)

日本大学・薬学部・准教授

研究者番号：60246931

(3) 連携研究者

()

研究者番号：