

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590156

研究課題名(和文) 金属原子導入による有機化学物質の毒性修飾とその分子機構

研究課題名(英文) Modification of organometallic compound cytotoxicity by incorporated metal atoms and molecular mechanisms underlying the toxicity

研究代表者

山本 千夏 (YAMAMOTO, Chika)

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号：70230571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、有機ビスマス化合物の血管内皮細胞に対して高い毒性を発現することを明らかにしている。そこで本研究の目的はその毒性発現機構を明らかにするために、有機ビスマス化合物に対する耐性細胞を獲得し、変動のあった遺伝子を探索し、遺伝子を同定し、有機ビスマス化合物の毒性発現を担う分子標的を明らかにすることである。

ジーントラップ挿入変異細胞ライブラリーからCHO-GT細胞を有機ビスマス化合物(PMTABi, TDPBi, DAPBi)で処理し、感受性の低下した細胞を97クローン獲得した。5'RACE法にて感受性低下細胞においてトラップ(破壊)された遺伝子を増幅し、感受性低下を担う候補遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文)：We have already found that organobismuth compounds often exhibit cytotoxicity in vascular endothelial cells. The purpose of the present study was to obtain cell clones that are tolerant to the toxic organobismuth compounds (PMTABi, DAPBi, and TDPBi) from a random gene trap insertional mutants library of CHO cells, to investigate candidate genes involved in the tolerance of the cells, and to clarify the molecular targets of the cytotoxicity of the organobismuth compounds. We succeeded to obtain 97 clones of the tolerant cells and identified candidate genes involved in the tolerance of the cells.

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：細胞毒性 ビスマス アンチモン ハイブリッド分子 有機金属化合物 ジーントラップ法 血管内皮細胞 CHO細胞

### 1. 研究開始当初の背景

有機金属は、工業的に多く利用され、環境汚染物質としての評価と規制の必要が求められている。化学物質審査規正法では、監視化学物質(有害性の懸念がある化学物質)は製造輸入量の報告が求められている。また、製造輸入量がある程度多くなると、化学物質の製造輸入量は経済産業省が把握することになっている。しかしながら、有機金属については、近年の有機金属化学の発展にともない、多種多様な化合物が合成可能になっているにもかかわらず、系統的な「有機金属の毒性学」が存在せず、そのため無機金属に比べ十分な対応とはなっていない。例えば PRTR 法においても、環境中への金属の排出量は金属ごとに把握され、個々の有機金属化合物のデータは得られていない。

本研究者は、これまでに生命科学研究への応用を展望した有機金属化合物・錯体分子のバイオロジーを立ち上げ、これをバイオオルガノメタリクス(Bio-organometallics)と呼んでいる。その研究の過程で、PMTAS のビスマス置換体が強い細胞傷害性を示すことを知った。しかも分子構造の異なる有機ビスマス/アンチモン化合物においても同様の結果が観察された(図1)。このことは分子構造が同じであっても、導入される金属が違えば細胞毒性がまったく異なることを示している。また、無機ビスマスが低毒性であることから、有機ビスマスもまた「ビスマス化合物なので毒性は低い」とする従来の認識が間違いであることも示している。このとき、有機ビスマス化合物が細胞内に高く蓄積するのに対し、有機アンチモン化合物は細胞内にほとんど蓄積しなかった。有機アンチモン化合物と有機ビスマス化合物では、三次元構造の変化が観察された。これらのデータは、有機金属化合物においては、導入された金属が分子の立体構造に影響を及ぼすことによって細胞内への蓄積が劇的に増加し、強い毒性を発現することを示唆して

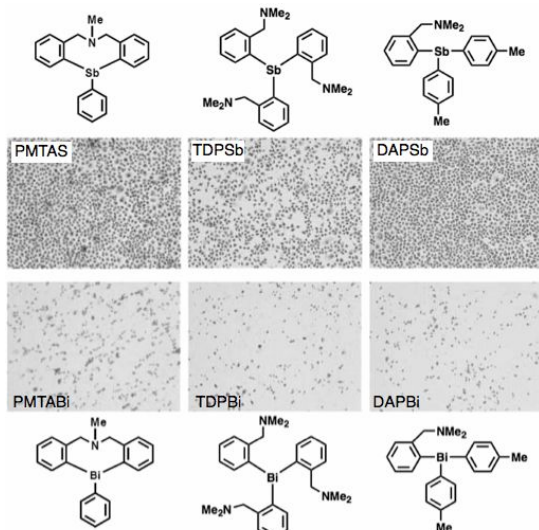


図 1

いる。すなわち、有機金属化合物の毒性は導入された金属の毒性学的特性に依存せず、有機金属化合物分子の三次元構造に依存することを示唆している。従って、有機金属化合物の毒性は有機化学物質に金属が導入された結果として修飾された有機化学物質の毒性として理解すべきである。しかしながら、有機金属化学の発展にともなって新たな有機金属化合物が次々と合成されている時代にあつて、それを系統的に取り扱う新しい毒性学は存在せず、その確立が求められている。

我が国では、カドミウムや鉛などの無機金属について多くの研究がなされ、知見の蓄積も十分である。メチル水銀や有機ヒ素などの有害有機金属の毒性は無機金属の類縁体の毒性として取り扱われてきた。しかしながら、前述のように、無機金属の毒性学で得られた特定の金属に関する知見をその金属を含む有機金属に単純に適用することはできない。一方で、有機金属化合物の数は、理論的には無限である。したがって、有機金属の毒性をある程度予測可能にする評価系の構築が重要である。強い細胞傷害性を示す有機ビスマス化合物のアンチモン置換体が低毒性である理由は、その細胞内への蓄積量にある。このことは、有機ビスマスは通過できるが有機アンチモンは通過できない輸送体の存在を示唆するものであるが、その詳細は不明である。現在、有機金属の毒性についての知見は十分でなく、有用な毒性評価系もなく、前述のようにそもそもその基盤となる「有機金属の毒性学」そのものが未確立なのである。

### 2. 研究の目的

本研究は、我々が見出した上記の有機ビスマス/アンチモン化合物(PMTABi, TDPBi, DAPBi, PMTAS, TDPsB, DAPsB)をモデルとして、(1)有機ビスマスの毒性発現を担う分子標的を解析し、併せてそのアンチモン置換体が低毒性である分子機構を解明すること、および(2)有機ビスマスの分子標的の発現を活用した毒性評価系の構築とそれを活用した毒性評価スキームの確立を試みることを目的としている。

### 3. 研究の方法

#### (1) 有機ビスマス化合物の毒性発現の特異性についての検討

PMTABi, TDPBi および DAPBi がウシ血管内皮細胞に対して顕著な細胞毒性を示すことが明らかになっているが、それ以外のウシ大動脈平滑筋細胞、ヒト胎児肺由来 IMR-90 線維芽細胞、およびブタ腎由来 LLC-PK1 上皮細胞についても検討を行った。

#### (2) 細胞毒性の有機ビスマス化合物ならびに有機アンチモン化合物の細胞内への蓄積毒性が細胞内への化合物の蓄積量に依存

することが考えられるので、ウシ血管内皮細胞、ウシ大動脈平滑筋細胞、ヒト胎児肺由来 IMR-90 線維芽細胞、およびブタ腎由来 LLC-PK1 上皮細胞について細胞内の金属量を ICP/MS を用いて測定した。

(3) 有機ビスマス化合物と有機アンチモン化合物の X 線結晶構造解析に

分子構造が同じである化合物に Bi あるいは Sb を導入するので細胞毒性に顕著な違いが出るのが明らかとなった、PTABi と PMTA および、DAPBi と DAPsb について解析した。

(4) ジーントラップ挿入変異細胞ライブラリー (CHO-K1 細胞) による解析：有機ビスマス処理変異株でトラップ (破壊) された遺伝子のクローニングと同定

有機ビスマス処理によって発現が変化する遺伝子をクローニング：ジーントラップ法では、クローニングで遺伝子を取り出すことが容易で、網羅的に遺伝子を解析することが可能である。細胞内への化合物の取り込みを修飾する遺伝子だけでなく、毒性発現あるいは防御に関与する遺伝子も関与している可能性が強く示唆される。陰性対照として対応する有機アンチモンを用いた。実験は信國と共同しながら進行させた。

有機ビスマス処理によって発現が変化する遺伝子の同定：単離したクローンについて、トラップ (同時に破壊) された遺伝子の同定を行った。具体的には、ジーントラップ法でトラップされた内在性遺伝子とレポーター遺伝子とのキメラ mRNA を PCR 法 (5'-RACE 法) で増幅した後、シークエンスを行い、遺伝子を同定した。この方法は、信國が他の課題で成功している (Nobukuni, *J. Biol. Chem.*, **280**, 10572-10577, 2005)。

(5) DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析

有機ビスマスと有機アンチモンでは、細胞内への取り込みあるいは排泄の速度が違うことが予測されるが、遺伝子発現が変化した下流の影響も排除できない。そこで、無毒性あるいは低毒性レベルの上記の有機ビスマス/アンチモン化合物でウシ大動脈内皮細胞を 24 時間処理し、その遺伝子発現について DNA マイクロアレイによる網羅的解析を行った。その中から、毒性発現を担い得る分子標的を探索し、内皮細胞についてその遺伝子を高発現させ、あるいは RNA 干渉法でノックダウンさせ、有機ビスマス/アンチモン化合物に対する感受性を調べた。

(6) 同定された遺伝子の解析

細胞内への有機金属化合物蓄積の解析：単離した変異株について有機ビスマス処理

時の細胞内ビスマスの蓄積を ICP-MS で測定した。陰性対照の有機アンチモンについては、細胞内アンチモンを測定する。細胞内への取り込みと、細胞内の金属を細胞外へ排泄する機構、その他、が考えられるので、同定した各遺伝子の機能・特性から解析を行った。

機能解析：変異株および野生株を用いて、有機ビスマスの毒性を選択的に担うと予想されるタンパク質の機能を、高発現および RNA 干渉法によるノックダウン後の感受性の変化によって解析した。

#### 4. 研究成果

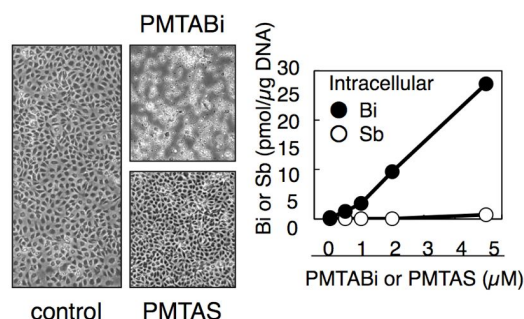
(1) ビスマスおよびアンチモン導入による有機化合物の毒性修飾

有機ビスマス/アンチモン化合物ライブラリーを構築し、ウシ大動脈内皮細胞に対する毒性を調べ、ビスマスを導入した場合は毒性を示すがアンチモンを導入した場合は毒性を示さない化合物 (PMTABi および PMTAS ならびに DAPBi および DAPsb) の抽出に成功した。アンチモンを導入した場合は毒性を示すがビスマスを導入した場合は毒性を示さない化合物は存在しなかった。この 2 組の化合物対の細胞毒性をウシ大動脈平滑筋細胞、ヒト胎児肺由来 IMR-90 線維芽細胞、およびブタ腎由来 LLC-PK1 上皮細胞についても調べたところ、内皮細胞と同様の結果を得た。

(2) 細胞内への蓄積性

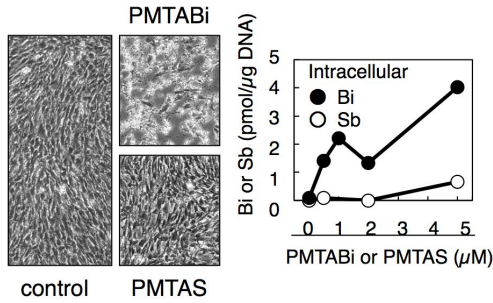
有機ビスマス/アンチモン化合物のウシ大動脈内皮細胞内蓄積量を ICP/MS を用いてビスマスおよびアンチモン量として測定した。有機ビスマス化合物である PMTABi および DAPBi は細胞内に高く蓄積したが、有機アンチモン化合物である PMTAS および DAPsb の蓄積はわずかであった。この結果はウシ大動脈平滑筋細胞、ヒト胎児肺由来 IMR-90 線維芽細胞、およびブタ腎由来 LLC-PK1 上皮細胞についても調べたところ、内皮細胞と同様の結果を得た (図 2-5)。すなわち、細胞内への蓄積が毒性の強さを決定する有力な要因の 1 つであることが示唆された。

ウシ大動脈内皮細胞



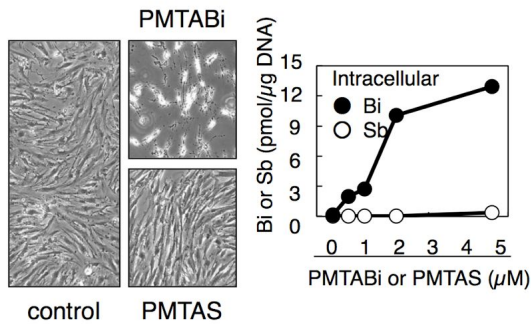
(図 2)

ウシ大動脈平滑筋細胞



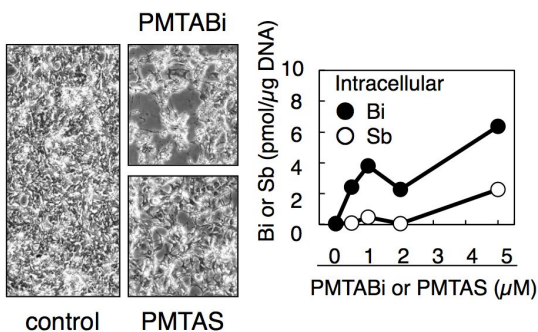
(図 3)

ヒト胎児肺由来IMR-90細胞



(図 4)

ブタ腎上皮LLC-PK<sub>1</sub>細胞



(図 5)

(3) X線結晶構造解析

X線結晶構造解析の結果、上記有機ビスマス化合物とそれに対応するアンチモン置換体の三次元構造の違いはわずかであることが分かった。したがって、ビスマスおよびアンチモン化合物の血管内皮細胞に対する毒性の差が、三次元構造の違いによるものではないことが示唆された。

(4) ジーントラップ挿入変異細胞ライブラリーを用いた解析

ジーントラップ挿入変異細胞ライブラリーから CHO-GT 細胞を有機ビスマス化合物 (PMTABi, TDPBi, DAPBi) で処理し、感受性の低下した細胞を 97 クローン獲得した。5'RACE 法にて感受性低下細胞においてトラップ (破壊) された遺伝子を増幅し、感受性低下を担う候補遺伝子を同定した。これまで

に LMNA の他に、TNS1, PPAR $\gamma$ , Adapt15, CD34, Zfp280c, LOC100762940, KIF4, Eno2 などの候補遺伝子を見出すことに成功した。現在これらの遺伝子の発現をノックダウンすることで責任遺伝子を検証中である。

(5) DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析

網羅的遺伝子解析の結果、DAPBi と PMTABi は共通して、p57<sup>Kip2</sup> など約 1,000 遺伝子が発現上昇し、CDK1 など約 700 遺伝子が発現低下していた。

樹立した感受性低下細胞について、その感受性の低下と細胞内蓄積量の関係について検討した。親株である CHO-GT 細胞に比べ、検討した感受性低下細胞と同様にビスマスの細胞内蓄積量は増加していた。従って、有機ビスマス化合物の細胞内への取り込みを低下させるのではなく、細胞内での毒性発現機構のいずれかの段階で変化が起こり、細胞毒性が現れにくい状態になっていることが推測された。

しかしながら、有機ビスマス化合物は、有機アンチモン化合物に比べ顕著に細胞内に蓄積しやすく、同じ分子構造であるのに導入金属がビスマスからアンチモンに置換されるだけで細胞毒性をほとんど示さなくなる理由の理由は現在のところ構造上の差 (三次元構造を含む) から理解することは困難である。そこで、電子状態解析によって毒性を理解する研究を開始した。

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)

[学会発表](計 9件)

中浴静香, 郡 久美子, 山本千夏, 安池修之, 鍛冶利幸, 有機ビスマス化合物の毒性発現に関する遺伝子. 第 41 回日本毒理学学会学術年会, 2014 年 7 月 4 日, 神戸. 橋谷珠世, 岡崎貴大, 郡 久美子, 山本千夏, 藤原泰之, 信國好俊, 栗田城治, 鍛冶利幸, 有機カルコゲン化合物の細胞毒性. フォーラム 2013: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2013 年 9 月 13 日, 福岡.

郡 久美子, 中浴静香, 山本千夏, 安池修之, 角澤直紀, 栗田城治, 鍛冶利幸, ビスマスまたはアンチモンを導入した有機金属化合物の毒性発現とそのメカニズム. 第 12 回分子予防環境医学研究会大会, 2013 年 2 月 1 日, つくば.

郡 久美子, 中浴静香, 山本千夏, 安池修之, 角澤直紀, 栗田城治, 鍛冶利幸, 有機ビスマス化合物の細胞毒性はそのアンチモン置換体では消失する. フォーラム 2012: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2012 年 10 月 25 日, 名古屋.

Kumiko Kohri, Chika Yamamoto, Shuji

Yasuike , Naoki Kakusawa , Jyoji Kurita , Toshiyuki Kaji , Cytotoxicity of organobismuth and organoantimony compounds . The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology , July 20, 2012 , Sendai .

郡 久美子 , 山本千夏 , 安池修之 , 角澤直紀 , 栗田城治 , 鍛冶利幸 , 有機ビスマス化合物とそのアンチモン置換体の細胞毒性の特徴 . 第 39 回日本毒性学会学術年会 , 2012 年 7 月 18 日 , 仙台 .

Kumiko Kohri , Chika Yamamoto , Shuji Yasuike , Naoki Kakusawa , Jyoji Kurita , Toshiyuki Kaji , Cytotoxicity of organobismuth and organoantimony compounds in vitro . The 22nd Symposium on Role of Metals in Biological Reactions, Biology and Medicine , May 31, 2012 , Kanazawa .

郡 久美子 , 山本千夏 , 安池修之 , 角澤直紀 , 廣岡孝志 , 栗田城治 , 鍛冶利幸 , 有機金属化合物の細胞毒性に及ぼす導入金属の影響 . 日本薬学会第 132 年会 , 2012 年 3 月 31 日 , 札幌 .

山本千夏 , ハイブリッド分子を活用する新しいバイオロジー . フォーラム 2011 : 衛生薬学・環境トキシコロジー(招待講演) , 2011 年 10 月 27 日 , 金沢 .

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 千夏 ( YAMAMOTO , Chika )

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号 : 7 0 2 3 0 5 7 1

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

信國 好俊 ( NOBUKUNI , Yoshitaka )

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授

研究者番号 : 8 0 2 9 5 6 4 1

安池 修之 ( YASUIKE , Shuji )

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号 : 1 0 2 3 0 2 1 0