

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590163

研究課題名(和文) 機能性有機金属化合物・錯体分子によるメタロチオネインの機能調節とその分子機構

研究課題名(英文) The functional regulation of metallothionein by functional organic-inorganic hybrid molecules and its molecular mechanism

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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血管内皮細胞に対してメタロチオネイン(MT)合成を効率良く誘導するハイブリッド分子として、ジエチルジチオカルバミン酸銅(Cu10)を見いだした。次に、Cu10は内皮細胞内に取り込まれやすいことや、Cu10によるMT合成誘導には、重金属応答性転写因子であるMTF-1が関与するが、酸化ストレス応答性転写因子であるNrf2は関与していないことを明らかにした。また、Cu10は内皮細胞以外の細胞に対してもMTの合成誘導を引き起こすが、血管内皮細胞に対してより強いMT誘導活性を有することが示された。以上より、Cu10が動脈硬化症などの予防に向けた有用なリード化合物になり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, out of 120 compounds, we found that Cu(II)(Edtc)2 (Cu10), a organic-inorganic hybrid molecule, strongly induces metallothionein (MT) synthesis without non specific cell damage in human vascular endothelial cells. We also showed that Cu10 is easily taken up by vascular endothelial cells, and that Cu10 induce MT synthesis via metal response element-binding transcription factor-1 (MTF-1) pathway but not Nrf-2 pathway. Cu10 also induces MT synthesis in other cell types such as human brain microvascular pericytes and human coronary artery smooth muscle cells. However, the stimulatory effect of Cu10 was weaker than Cu10-stimulated vascular endothelial cells, suggesting that Cu10 has more strong activity on MT synthesis in vascular endothelial cells. These observations suggest that Cu10, a organic-inorganic hybrid molecule, may have a potential to contribute for prevention of vascular diseases including atherosclerosis.

研究分野：環境毒性学

キーワード：薬学 有機金属化合物 錯体分子 メタロチオネイン 血管内皮細胞 生体防御因子 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

癌や心疾患、脳血管疾患などの生活習慣病やアルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの神経変性疾患は国民衛生上の大きな社会的問題であるとともに、その予防と治療対策は必須の課題であり、かつ急務である。これらの疾患の発症機序はきわめて複雑であり、未解明な点が多く残されているが、その発症には各疾患部位での酸化ストレスや炎症反応が深く関与することが知られている。

生体防御因子の一つであるメタロチオネイン (金属結合タンパク質) は、必須金属の恒常性維持、重金属の毒性軽減、抗酸化作用、抗炎症作用、制癌剤の副作用軽減など多様な作用を示す多機能性タンパク質であることが示されている。また近年、遺伝子工学的手法を用いてメタロチオネインを過剰発現するトランスジェニックマウスやメタロチオネイン遺伝子を欠損した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、メタロチオネイン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、メタロチオネイン-I およびメタロチオネイン-II の遺伝子が欠損したメタロチオネイン-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 (Sato, *Yakugaku Zasshi*, 127, 709-717, 2007)。また、神経変性疾患をはじめとする様々な疾患防御にメタロチオネインが深く関与することも報告されている。したがって、各種疾患の病変部位でメタロチオネインを効率よく発現させることができれば、酸化ストレスや炎症反応が原因となって誘発される動脈硬化病変や神経変性疾患などの発症・進展に対して防御的な役割を果たすことが期待され、新たな治療法の開発に繋がる可能性が考えられる。

申請者はこれまでに化学系研究者と共同研究を行い、その過程でハイブリッド分子 (無機化合物と有機化合物の両方の特性を有する有機金属化合物・錯体分子) が生命科学研究においてきわめて興味深い特性を有していることを知った。例えば、ハイブリッド分子は導入する金属によって分子の立体構造や電子構造が大きく変化することが見いだされている (Muranaka et al., *J. Phys. Chem. A*, 113, 464-473, 2009)。また、血管内皮細胞に対して強い傷害性を示す有機ビスマス化合物のビスマス元素をアンチモン元素に置換することにより、その毒性は劇的に消失することを見いだした (Fujiwara et al., *J. Health Sci.*, 51, 333-340, 2005)。すなわち、ハイブリッド分子では、導入する金属によって分子の立体構造を制御でき、それによって生物活性も制御できることを示唆している。メタロチオネインは亜鉛などの重金属によって誘導合成されることが知られているが、申請者は無機亜鉛に比べてきわめて

高いメタロチオネイン誘導能を示す亜鉛含有化合物もすでに見いだしている。ハイブリッド分子はその分子中に金属を導入することによって特異な三次元構造を分子構造に与えるので、生体システムの選択的・特異的制御に優れていると考えられ、今後、ハイブリッド分子が生命科学を切り開く新しいツールになることが強く期待されている。

2. 研究の目的

そこで本研究では、無機化合物と有機化合物の両方の特性を有する有機金属化合物・錯体分子 (ハイブリッド分子) に着目し、メタロチオネインの発現や機能を調節することによって、疾病の治療や予防に大きく貢献できる有用な機能性有機金属化合物・錯体分子を見いだすことを目的とする。これまでの多くの研究により、重金属をはじめとする様々な物質やストレスなどがメタロチオネインの合成を誘導することが知られているが、組織特異的に効率よくメタロチオネインを誘導合成する低毒性な化合物はほとんど知られていない。また、メタロチオネインの誘導合成機序についても不明な点が残されている。近年、申請者らは亜鉛を含有したハイブリッド分子ライブラリーを用いて、前述の通り、血管内皮細胞に対してメタロチオネインを無機亜鉛よりも非常に効率よく誘導する化合物を複数見いだすことに成功している。本研究では、(1) 各種培養細胞において生体防御因子の一つであるメタロチオネイン (MT) を効率良く誘導合成するハイブリッド分子を見いだす、(2) 次いで、MT 誘導合成能を有するハイブリッド分子をツールとして活用し、新たな MT 誘導機構の解明を目指す、(3) また、実験動物を用い、個体レベルでのハイブリッド分子の有用性を確認し、動脈硬化症などの各種疾患の予防と治療に貢献できる有用なハイブリッド分子を提案することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 血管内皮細胞のメタロチオネイン合成を誘導するハイブリッド分子の探索

はじめに、血管内皮細胞に対して効率よくメタロチオネインを誘導合成する低毒性な化合物をハイブリッド分子ライブラリーから探索した。「ハイブリッド分子ライブラリー」は、連携研究者 (内山、安池、中) より提供されたものを用いた。また、構造活性相関を確認するために必要な新たな化合物、情報並びにアドバイスを連携研究者より随時提供していただいた。ヒト冠動脈血管内皮細胞およびヒト脳毛細血管内皮細胞をコンフルエントまで培養後、亜鉛、ビスマス、アンチモン、銅、マンガン、ニッケル、鉄あるいはコバルトなどの様々な金属を含むハイブリッド分子で、3、6、12 または 24 時間処理し、以下の分析を行った。分析 細胞中メタロチオネイン mRNA 量、分析 細胞中メタロチ

オネインタパク質量、 有機金属化合物・錯体 分子の構造活性相関の評価、 細胞毒性の評価。

(2) 各種培養細胞を用いたメタロチオネン合成誘導化合物の探索:

実験には、ヒト冠動脈血管平滑筋細胞、ヒト脳毛細血管周皮細胞などを用いた。血管内皮細胞以外の各種培養細胞を用いて、メタロチオネン合成に対するハイブリッド分子の作用を検討し、細胞選択的に効率よくメタロチオネンを誘導合成する化合物を探索した。各細胞をコンフルエントあるいは一定時間培養後、ハイブリッド分子で、3、6、12 または 24 時間処理した。その後、上記(1)に示した分析 ~ を行った。

(3) ハイブリッド分子によるメタロチオネン誘導合成のメカニズム解明

最も高いメタロチオネン誘導能が認められたハイブリッド分子 Cu10 によるメタロチオネン誘導合成のメカニズムを以下の分析により検討した。分析 メタロチオネン誘導における Cu10 の構造活性相関、Cu10 の細胞内蓄積量、Cu10 の重金属依存性転写因子 MTF-1 の関与の確認、メタロチオネン遺伝子の発現に關与する転写因子の同定。

(4) 個体レベルでのハイブリッド分子の有用性に関する検討

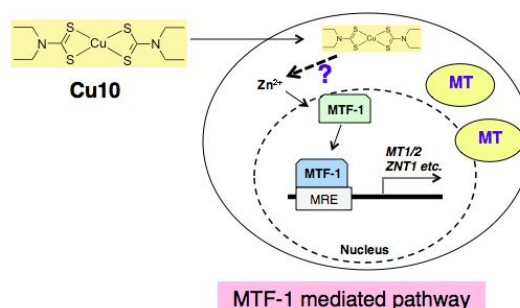
個体レベルでの検討を行うために、野生型マウス、ApoE 欠損マウス(動脈硬化症モデルマウス)、メタロチオネン欠損マウス及び ApoE/メタロチオネン欠損マウスを作製し、繁殖維持した。4 週齢の各種マウスに高脂肪食を負荷し、経時的に胸腹部動脈を摘出し、動脈壁の脂質沈着(動脈硬化の形成過程)をスダン IV 染色により観察し、Cu10 の投与時期並びに投与期間の検討を行った。また、Cu10 は、難水溶性であったため、実験動物に投与するにあたって、Cu10 の投与に適する溶媒の検討や可溶化剤(新規添加剤ソルプラス等)の添加等の検討を行ったが、良好な結果を得ることができず、Cu10 のマウスへの投与には至らなかった。

4. 研究成果

平成 24 年度は、血管内皮細胞に対して効率よくメタロチオネンを誘導合成する低毒性なハイブリッド分子を見いだすことを目的に、ハイブリッド分子ライブラリーを用いて化合物の探索研究を行い、120 化合物の中から高メタロチオネン誘導能を有する化合物として、ジエチルジチオカルバミン酸銅 [Cu(II)(Edtc)₂] (Cu10) を見いだした。Cu10 が高メタロチオネン誘導能を示す処理条件下において、Cu10 の配位子あるいは硫酸銅の単独処理ではメタロチオネンの発現誘導は起こらず、銅を他の金属に置換した化合物では、誘導効果の消失あるいは低下が認められ、血管内皮細胞における Cu10 によるメタロチオネン誘導合成には、Cu10

の構造そのものが重要であることが示唆された。また、Cu10 で前処理した血管内皮細胞では、カドミウムや亜ヒ酸による細胞毒性が軽減されることが確認されたことから、Cu10 によって誘導された血管内皮細胞のメタロチオネンが、金属毒性防御に寄与していることが示唆された。

平成 25 年度は、血管内皮細胞に対して高メタロチオネン誘導能を示した Cu10 の関連化合物群についてメタロチオネン誘導作用を検討したが、Cu10 よりも強い活性を示す化合物を見いだすことができなかった。また、Cu10 は血管内皮細胞だけでなく、脳微小血管周皮細胞や冠動脈血管平滑筋細胞に対してもメタロチオネン誘導能を示したが、その程度は血管内皮細胞に対しての作用に比べて弱かったことから、Cu10 は血管内皮細胞に対してより強いメタロチオネン誘導を引き起こすハイブリッド分子であることが示唆された。一方、Cu10 の作用発現機構を解析したところ、メタロチオネン誘導能を示した他のハイブリッド分子と比較して、Cu10 が血管内皮細胞に効率良く取り込まれることが示された。また、Cu10 によるメタロチオネン合成誘導には、重金属応答性転写因子である MTF-1 が関与するが、酸化ストレス応答性転写因子である Nrf2 は関与しないことを siRNA を用いたノックダウン実験により明らかにした。



平成 26 年度では、これまでに行ってきた高メタロチオネン誘導能を有する低毒性なハイブリッド分子の探索研究を継続したが、Cu10 よりも強い活性を示すハイブリッド分子は見いだされなかった。また、個体レベルでの検討を行うために、4 週齢の野生型マウス、ApoE 欠損マウス(動脈硬化症モデルマウス)、メタロチオネン欠損マウスおよび ApoE/メタロチオネン欠損マウスに高脂肪食を負荷した際の、動脈壁の脂質沈着度合いを観察し、高脂肪食に 4 週間負荷した時点で動脈硬化巣の形成評価が可能であることを確認した。一方、Cu10 は難水溶性であったため、マウスに Cu10 を投与するにあたって、Cu10 の投与に適する溶媒の検討や可溶化剤(新規添加剤ソルプラス等)の検討を行ったが、投与のための良好な結果を得ることができなかった。この点については、Cu10 の構造を修飾し、水溶性を高めるなどの今後の更なる検討が必要であると考えられるが、本研

究によって、Cu10 などのハイブリッド分子が、動脈硬化症などの各種疾患の予防に向けた有用なリード化合物になり得る可能性が示唆された。

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1件)

1. Murakami M., Fujie T., Matsumura M., Yoshida E., Yamamoto C., Fujiwara Y., Yasuike S., Kaji T. Comparative cytotoxicity of triphenylstibane and fluorine-substituted triarylphictogens in cultured vascular endothelial cells. *Fund. Toxicol. Sci.*, 2, 61-66, 2015.

[学会発表](計12件)

1. 藤原泰之, 李 辰竜, 佐藤雅彦. 血管内皮細胞における有機金属化合物・錯体分子によるメタロチオネイン発現誘導. 第58回日本薬学会東海支部総会・大会. 静岡. 2012年7月.
2. 藤原泰之, 李 辰竜, 佐藤雅彦. メタロチオネイン高発現誘導機能を有する有機金属化合物・錯体分子の探索. 第3回メタロミクス研究フォーラム. 東京. 2012年8月.
3. 藤原泰之, 黒田亮顕, 李 辰竜, 佐藤雅彦. ジエチルジチオカルバミン酸銅によるメタロチオネインの高発現誘導. 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2012. 岐阜. 2012年11月.
4. 藤原泰之, 李 辰竜, 佐藤雅彦. 血管内皮細胞のメタロチオネインを高発現誘導する有機金属化合物・錯体分子の探索. メタロバイオサイエンス研究会 2013. 静岡. 2013年9月.
5. 藤原泰之, 李 辰竜, 佐藤雅彦. 血管内皮細胞におけるジエチルジチオカルバミン酸銅によるメタロチオネインの高発現誘導. メタロバイオサイエンス研究会 2013. 静岡. 2013年9月.
6. 藤原泰之. ハイブリッド分子を活用したメタロチオネインの発現誘導. 第40回日本毒性学会学術年会(ワークショップ: 毒性学からバイオオルガノメタリクスへのアプローチ). 千葉. 2013年6月.(招待講演)
7. 藤原泰之, 李 辰竜, 佐藤雅彦. ジエチルジチオカルバミン酸銅によるメタロチオネインの発現誘導の解析. 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2013. 鈴鹿. 2013年11月.
8. 藤原泰之. 血管病変に対するメタロチオネインの防御的役割. 第58回日本薬学会関東支部大会(シンポジウム: 金属毒性

学 Today -環境健康影響における元素・分子の反応と動態-. 昭和薬科大学. 2014年10月.(招待講演)

9. 村上正樹, 藤江智也, 松村実生, 藤原泰之, 木村朋紀, 安池修之, 山本千夏, 佐藤雅彦, 鍛冶利幸. 血管内皮細胞においてメタロチオネイン遺伝子の発現を誘導する有機アンチモン化合物. 第41回日本毒性学会学術年会. 神戸. 2014年7月.
10. 村上正樹, 藤江智也, 木村朋紀, 藤原泰之, 安池修之, 山本千夏, 鍛冶利幸. 有機アンチモン化合物を用いた血管内皮細胞のメタロチオネイン遺伝子発現機構解析. フォーラム 2014 衛生薬学・環境トキシコロジー. 筑波. 2014年9月.
11. 藤江智也, 中寛史, 藤原泰之, 鍛冶利幸. 銅錯体を活用した血管内皮細胞のメタロチオネイン誘導機構の解析. フォーラム 2014 衛生薬学・環境トキシコロジー. 筑波. 2014年9月.
12. 藤江智也, 中 寛史, 吉田映子, 藤原泰之, 山本千夏, 鍛冶利幸. 銅錯体による血管内皮細胞のメタロチオネイン発現誘導機構解析. 日本薬学会第135年会. 神戸. 2015年3月.

[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:
出願年月日:
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)
東京薬科大学・薬学部・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

内山 真伸 (UCHIYAMA MASANOBU)
東京大学・薬学部・教授
研究者番号：00271916

安池 修之 (YASUIKE SHUJI)
愛知学院大学・薬学部・教授
研究者番号：10230210

中 寛史 (NAKA HIROSHI)
名古屋大学・物質科学国際研究センター・
助教
研究者番号：70431517

李 辰竜 (LEE JIN-YONG)
愛知学院大学・薬学部・講師
研究者番号：80581280