

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659058

研究課題名(和文) 求核性有機金属の毒性発現を担う分子標的と生体システム

研究課題名(英文) Molecular targets and biological systems involved in the toxicity of nucleophilic organometallic compounds

研究代表者

鍛冶 利幸 (Kaji, Toshiyuki)

東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：90204388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：有機-無機ハイブリッド分子は有機元素化学の領域で広く活用されてきたが、その毒性についてはほとんど知られていない。本研究では、求核性有機金属化合物の血管毒性を調べるために血管内皮細胞を培養し、ジフェニルジテルライドで処理し、細胞毒性と細胞内蓄積を調べ、併せてその細胞毒性に対する電子供与基および電子吸引基の効果を評価した。得られた結果は、求核性有機金属化合物の内皮細胞毒性は分子中の金属の種類と電子状態に依存することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The organic-inorganic hybrid molecules have been widely used in the field of organoelement chemistry. However, very little is known about the toxicity of the molecules. To investigate the vascular toxicity of nucleophilic organometallic compounds, vascular endothelial cell were cultured and treated with diphenylditelluride, diphenyldiselenide, a model compound, in the present study. Cytotoxicity and intracellular accumulation were determined and the effects of an electron-donating group (CH₃-) and an electron-withdrawing group (-Cl) on the cytotoxicity of DPDTe were evaluated. The data obtained suggest that the endothelial cytotoxicity of nucleophilic organometallic compounds depends on the intramolecular metal and electronic structure in the compounds.

研究分野：環境・衛生薬学，毒性学，バイオオルガノメタリクス

キーワード：ハイブリッド分子 有機金属化合物 細胞毒性

1. 研究開始当初の背景

有機化合物の分子構造に無機金属を組み込んだ化合物を有機-無機ハイブリッド分子（以下、ハイブリッド分子）と呼ぶ。ハイブリッド分子は、GrignardやWittigらの先駆的な研究者が化学反応に用いたのが契機となって注目を浴びるようになり、爾来、合成試薬として広く活用され、今日に至っている。このような経緯から、ハイブリッド分子の研究は有機元素化学の中で行われてきた。同時に、生命科学への貢献は皆無に等しい状態が続いている。

我々は、ハイブリッド分子のバイオロジーをバイオオルガノメタリクスと呼び、その展開を提唱している。ハイブリッド分子の生命科学への活用にあたり、その毒性が問題となる。なぜならハイブリッド分子は金属を含む分子であり、金属は一般に毒性があると認識されているからである。

しかしながら、我々は無機態では毒性が低いビスマスが有機ビスマス化合物となったときに強い細胞毒性を示すことがあること、それと同じ分子構造を持つ有機アンチモン化合物ではそのような細胞毒性は観察されないことを見いだした(Kohri *et al.*, *J. Toxicol. Sci.*, in press)。この結果は、少なくともビスマス/アンチモンを含む求電子性有機金属化合物の細胞毒性が組み込まれた金属によって大きく異なることを示している。

2. 研究の目的

現代の有機元素化学は周期表のあらゆる元素を活用できるまでに発展しているので、求電子性金属だけでなく、求核性金属も分子構造に組み込むことができる。そのようにして創製された求核性有機金属化合物については、その細胞毒性に関する知見はほとんどない。本研究の目的は、ジフェニルジテルライド (Ph-Te-Te-Ph, DPDTe)、ジフェニルジセレンライド (Ph-Se-Se-Ph, DPDSe) およびジフェニルジスルフィド (Ph-S-S-Ph, DPDS) を求核性有機金属化合物のモデルとして、その細胞毒性の特性を明らかにし、併せて毒性発現機構に迫ることである。

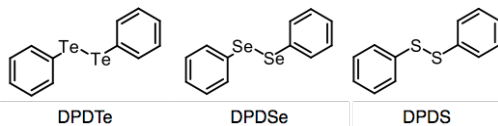


図1. DPDTe, DPDSe, および DPDS の構造

3. 研究の方法

ウシ大動脈内皮細胞、ウシ大動脈平滑筋細胞、ブタ腎上皮 LLC-PK1 細胞、ヒト胎児肺線維芽細胞 IMR-90 をコンフルエントまで培養し、DPDTe, DPDSe, または DPDS で処理し、細胞毒性を細胞の形態学的観察および乳酸脱水素酵素 (LDH) の逸脱またはは

AlamarBlue アッセイによって評価した。別に DPDTe または DPDSe で処理した細胞を調製し、これらの有機金属化合物の細胞内蓄積を ICP-MS によって測定した。ヒト冠動脈内皮細胞を DPDTe で処理し、total RNA を抽出し、遺伝子発現の変動について網羅解析を行った。ジーントラップ挿入変異細胞ライブラリーから感受性低下細胞を獲得し、感受性を決定する責任候補遺伝子を探索した。さらに、カルコゲン原子の *p*-位に電子供与基 (-OCH₃) または電子吸引基 (-Cl) を付加し、その効果を検討した。

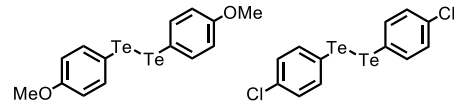


図2. 電子供与基 (左) および電子吸引基 (右) を付加した *p*-MeO-DPDTe および *p*-Cl-DPDTe の構造

4. 研究成果

(1) 求核性有機金属化合物の毒性発現の特性

ウシ大動脈内皮細胞を DPDTe, DPDSe, または DPDS で処理したところ、DPDS および DPDSe には細胞傷害性は認められなかったが、DPDTe の強い細胞傷害性が観察された。

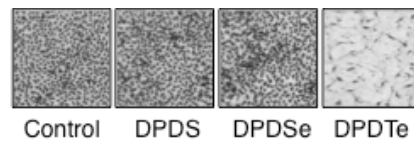


図3. DPDTe, DPDSe, または DPDS で処理したウシ大動脈内皮細胞の形態学的観察

このとき培地に逸脱した LDH の活性も DPDTe 処理群でのみ上昇しており、この形態学的観察が裏付けられた。また、DPDTe および DPDSe の細胞内への蓄積を調べたところ、DPDTe が細胞内に高く蓄積するのに対し、DPDSe は蓄積しないことが示された (もともと細胞内にはイオウが多く存在するので DPDS は検討できなかった)。

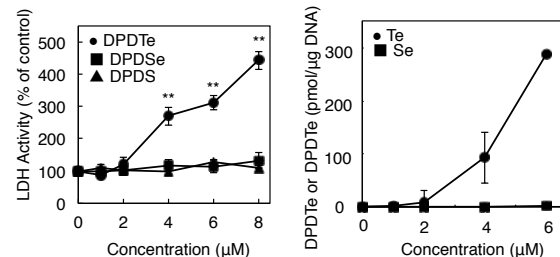


図4. DPDTe, DPDSe, または DPDS で処理したウシ大動脈内皮細胞からの LDH の逸脱 (左) および DPDTe および DPDSe の細胞内蓄積 (右)

これらの結果から、イオウおよびセレンを組み込んだ求核性有機金属化合物は細胞内に蓄積せず細胞毒性も低いものに対し、同じ分子構造をもっているテルルが組み込まれた DPDTe は細胞内に高く蓄積して細胞毒性を発現することが示された。このような現象はウシ大動脈内皮細胞およびヒト胎児肺線維芽細胞 IMR-90 において認められたが、ウシ大動脈平滑筋細胞およびブタ腎上皮 LLC-PK1 細胞は DPDTe に対して抵抗性を示すことも分かった。

本研究遂行の過程で、求電子性有機金属化合物である有機ビスマス化合物が細胞内に高く蓄積するのにに対し、同じ分子構造を持つ有機アンチモン化合物は細胞内に蓄積せず細胞毒性を示さないことを見いだした (Kohri *et al.*, *J. Toxicol. Sci.*, in press)。

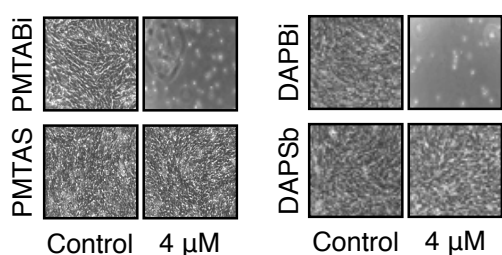


図 5. 有機ビスマス化合物 (PMTABi および DAPBi) または有機アンチモン化合物 (PMTAS および DAPSb) で処理したウシ大動脈内皮細胞の形態学的観察

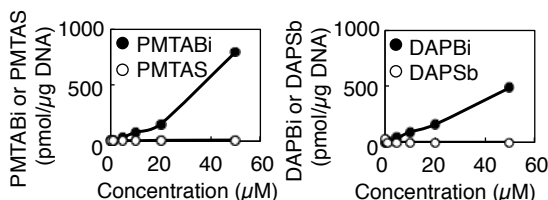


図 6. ウシ大動脈内皮細胞における有機ビスマス化合物 (PMTABi および DAPBi) または有機アンチモン化合物 (PMTAS および DAPSb) の細胞内蓄積

従って、求電子性有機金属化合物も求核性有機金属化合物も組み込まれた金属によって劇的に細胞内への蓄積とそれともなう細胞毒性が異なるという点では共通する特性を有するが、そのような特性が認められる細胞の種類は異なることが明らかになった。その違いのメカニズムは不明であるが、求核性有機金属化合物の細胞毒性発現に関する特性が求電子性有機金属化合物のそれとは異なることが明らかになったことは重要である。

(2) 求核性有機金属化合物の細胞毒性発現のメカニズム

DPDTe の毒性発現メカニズムに DPDTe による遺伝子発現の変動が関与する可能性がある。そこで、ヒト冠動脈内皮細胞を DPDTe

で処理し、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅解析を行った。その結果、DPDTe によって発現が上昇したのは 21 遺伝子、逆に発現が低下したのは 155 遺伝子、計 176 遺伝子の発現変動が認められた。発現が上昇した遺伝子の中には、小胞体ストレスに関与するとされる遺伝子である *FAM129* および *DNAJB1* が含まれていた。176 の候補遺伝子のうちどれが実際に DPDTe の毒性発現に関与しているかを同定することはできなかったが、小胞体ストレスを中心に今後明らかにしていきたいと考えている。

DPDTe と DPDSe/DPDS との重要な違いは細胞内への蓄積性である。一般に、化学物質の細胞内への蓄積性はその脂溶性に依存するとされる。しかしながら、同じ分子構造に同じく第 16 族元素を含む DPDTe と DPDSe/DPDS の脂溶性では、実験結果で示されるような蓄積性の違いを説明できない。そこで、細胞毒性を示す DPDTe について、電子供与基 (-OCH₃) および電子吸引基 (-Cl) を付加し、その効果を検討した。その結果、電子供与基は細胞内蓄積と細胞毒性を増加するのに対し、電子吸引基はその両方を減少させることが分かった。このことは求核性有機金属化合物の細胞内蓄積と細胞毒性の発現には、分子中の電子状態が重要であることを示唆している。現在、物理系研究者と共同研究を行い、DPDTe、DPDSe、および DPDS の電子状態を解析し比較する研究を進めている。

電子状態解析の予備的な検討から、DPDTe における -Te-Te- の電子状態密度が DPDSe における -Se-Se- および DPDS における -S-S- に比べ低いことが示された。そこで DPDTe のテルル原子を 1 個にした DPMTe を合成し、その細胞内への蓄積と細胞毒性を比較した。

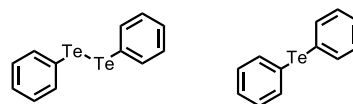


図 7. DPDTe (左) および DPMTe (右) の構造

その結果、DPDTe に比べ、DPMTe では細胞内への蓄積性はきわめて低く、細胞毒性もほとんど観察されなかった。このことは、細胞内への移行には -Te-Te- 構造が必要であること、またこの構造は DPDTe の毒性発現にも関与する可能性があることが示唆される。

さらに、DPDTe、*p*-MeO-DPDTe および *p*-Cl-DPDTe が細胞内に入った後の細胞内分布を調べたところ、DPDTe はミトコンドリア画分に高く蓄積したが、細胞毒性が DPDTe よりも高い *p*-MeO-DPDTe ではその蓄積はさらに増大し、細胞毒性が DPDTe よりも低い *p*-Cl-DPDTe では同程度であった。従って、DPDTe の毒性発現に関与する分子標的の一部はミトコンドリアに存在することが示唆される。

本研究の結果は、求核性有機金属化合物は求電子性有機金属化合物とは異なる様式で細胞毒性を発現すること、そのメカニズムには組み込まれた金属原子の種類が関与し、特に電子状態が重要な役割を果たすことを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 17 件)

- ① Kohri, K., Yoshida, E., Yasuike, S., Fujie, T., Yamamoto, C. and Kaji, T. (2015) The cytotoxicity of organobismuth compounds with certain molecular structures can be diminished by replacing the bismuth atom with an antimony atom in the molecules. *J. Toxicol. Sci.*, in press. (査読有)

(<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jts/-char/ja/>)

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

(http://www2.e-kenkyu.com/fts_journal/uploads/manuscript/file/41/2_61.pdf)

〔学会発表〕 (計 53 件)

- ①岡崎貴大, 中浴静香, 吉田映子, 藤原泰之, 山本千夏, 安池修之, 鍛冶利幸. 血管内皮細胞における有機テルル化合物の細胞毒性に対する置換基効果. 第 42 回日本毒性学会学術年会, 石川県立音楽堂 (金沢), 2015 年 7 月 1 日.

- ②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与する遺伝子の探索. フォーラム 2014 : 衛生薬学・環境トキシコロジー, つくば国際会議場 (つくば), 2014 年 9 月 19 日.

- ③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与する遺伝子. 第 41 回日本毒性学会学術年会, 神戸コンベンションセンター (神戸), 2014 年 7 月 3 日.

- ④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, 九州大学医学部百年講堂 (福岡), 2013 年 9 月 13 日.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rs.tus.ac.jp/kaji-lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鍛冶 利幸 (KAJI Toshiyuki)

東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号 : 9 0 2 0 4 3 8 8