

## AL2-2 環境化学物質による女性ホルモン機能修飾の分子機構

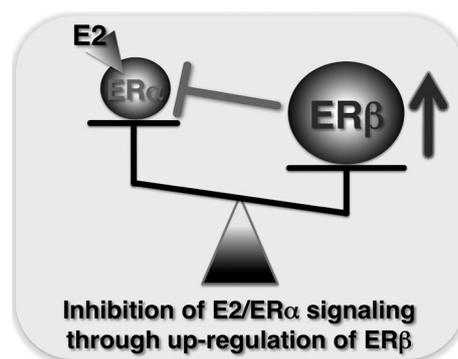
○竹田 修三  
(広島国際大・薬)

古くから、大麻主成分 $\Delta^9$ -テトラヒドロカンナビノール( $\Delta^9$ -THC)による女性ホルモン(E2)作用のかく乱(=拮抗)が知られていた。例えば、雌動物に対する影響では、ラットの排卵を抑制することやマスの子宮の成長を負に調節することが知られている。さらに、 $\Delta^9$ -THCによる排卵抑制はヒトにおいても確認されている。これまでに、多くの研究者がこの問題解明にチャレンジしてきた。 $\Delta^9$ -THCの構造を眺めると、E2と共通してフェノール部分を有していることから、 $\Delta^9$ -THCはエストロゲン受容体 $\alpha$  (ER $\alpha$ )への結合に際しE2と競合するものと考えられていた。しかし、その後の研究で $\Delta^9$ -THCはER $\alpha$ への結合活性を全く示さないことが判明した。エストロゲン受容体として、ER $\alpha$ に加えて、「ER $\beta$ 」が知られている。ERタンパク質は、ホモ( $\alpha\alpha$  or  $\beta\beta$ )あるいは「ヘテロ( $\alpha\beta$ )二量体」を形成することで標的遺伝子上のE2応答配列(ERE)に作用し転写を調節する。これら受容体の発現分布を比較すると、ER $\alpha$ は乳腺や子宮などの女性生殖器に分布するのに対し、ER $\beta$ は全身の臓器に分布している。従って、ER $\alpha$ と比較して、ER $\beta$ は広範な生理的役割を有しているものと考えられている。前述のようにER $\beta$ の生理的役割については未だ不明な点が多いが、同一細胞内にこれらER $\alpha/\beta$ 受容体が共存すると、ホモではなくヘテロ二量体が形成され、ER $\alpha$ の作用を抑制することが明らかとなっている。

我々はこれまでに、前述の課題である $\Delta^9$ -THCによる女性ホルモン機能のかく乱影響について機構の解明を進めてきた。DNAマイクロアレイ解析や種々の生化学的解析を行った結果、 $\Delta^9$ -THCは「第2のエストロゲン受容体ER $\beta$ の発現誘導ならびにその活性化を介して、E2/ER $\alpha$ シグナルを抑制する」という現象を見出した(Takeda *et al.*, Chem. Res. Toxicol., 26: 1073-1079, 2013; 西日本新聞2013年7月19日2013朝刊)。この成果は、これまで長らく不明であった $\Delta^9$ -THCによる女性ホルモン機能のかく乱の一端を細胞レベルで解明した研究として注目されている。さらに、 $\Delta^9$ -THCはカンナビノイド受容体に依存しない機構でER $\beta$ の発現誘導を来すことが明らかとなった。我々は、先に示した大麻研究で得られた「現象」をヒントとして、環境化学物質の毒性発現におけるER $\beta$ の関与を想定した。111種類の化学物質がER $\beta$ の発現に与える影響をリアルタイムRT-PCR法にて解析した。その結果、全体の26.1%(=29化合物)が2倍以上の誘導を示した。さらに、結果の一部は仮説を支持して、ER $\beta$ 誘導能を呈した化合物は同時にE2/ER $\alpha$ による転写活性を抑制する傾向にあった。

近年、環境化学物質による毒性影響は、「シグナル毒性」の結果であると説明されており、化学物質が受容体に結合し、異常シグナルを発することにより障害が引き起こされるという考え方である。従って、受容体の発現がない場合は毒性が現れない。この考え方に、我々はER $\beta$ の発現を誘導・活性化する化学物質が、ER $\alpha$ の機能に「何らかの影響」を与え得るのではないかと考えている。今後も研究を継続・発展させて行きたい。

【上記に関連した業績】 1) Takeda *et al.*, *Toxicology*, 2008. 2) Takeda *et al.*, *Toxicology*, 2009. 3) Takeda *et al.*, *Chem. Res. Toxicol.*, 2013. 4) Takeda *et al.*, *J. Toxicol. Sci.*, 2013. 5) Takeda, *Biol. Pharm. Bull.*, 2014. 6) Takeda *et al.*, *Toxicology*, 2014. 7) Takeda *et al.*, *Fundam. Toxicol. Sci.*, 2016. 8) Takeda *et al.*, *Fundam. Toxicol. Sci.*, 2016. 9) Takeda *et al.*, *In Handbook of Cannabis and Related Pathologies Chapter 85*, Elsevier, *in press* (2016).



**EDCs' disruption of estrogen-signaling: possible implication for the induced levels of ER $\beta$ .**

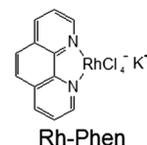
○ Shuso Takeda (Fac. Pharm. Sci., Hiroshima Int'l. Univ.)

## O6-2 有機ロジウム化合物を活用した血管内皮細胞のパールカン発現抑制機構の解明への試み

○松崎 紘佳<sup>1</sup>, 原 崇人<sup>1</sup>, 吉田 映子<sup>1</sup>, 藤原 泰之<sup>2</sup>, 山本 千夏<sup>3</sup>, 斎藤 慎一<sup>4</sup>, 鍛冶 利幸<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東京理大・薬, <sup>2</sup>東京薬大・薬, <sup>3</sup>東邦大・薬, <sup>4</sup>東京理大・理一)

【目的】パールカンは内皮細胞が産生するヘパラン硫酸プロテオグリカンの主要分子種であり、内皮細胞の増殖を促進することが示唆されている。それゆえ、内皮細胞の傷害に起因する血管病変を理解する上で、パールカンの発現調節機構を明らかにすることは重要である。しかし、適当な解析ツールが存在しなかったこともあり、詳細な研究が行われずにいる。有機-無機ハイブリッド分子(以下、ハイブリッド分子)は分子変換反応を通じて化学領域に革新をもたらしたが、生物学領域での活用例は少ない。我々はこれまでに、potassium tetrachloro (1,10-phenanthroline)-rhodate (以下、Rh-Phen)が内皮細胞のパールカン発現を顕著に抑制することを見出している。本研究の目的はRh-Phenによるパールカン発現抑制機構の特性を明らかにすることである。



【方法】ウシ大動脈由来血管内皮細胞にRh-Phenおよびその誘導体を処理した。パールカン遺伝子の発現は定量的RT-PCR, タンパク質の発現はウェスタンブロット法を用いて解析した。

【結果および考察】先行研究はRh-Phenによるパールカンの発現抑制は、配位子である1,10-phenanthrolineまたは無機金属の塩化ロジウム単体によっては引き起こされず、Rh-Phenが有するハイブリッド分子特有の構造により引き起こされる現象であることを明らかにしている。そこで、Rh-Phenの誘導体を用いてパールカンの発現抑制に重要な構成要素を検討した。Rh-Phenの2,9位メチル基置換体ではパールカンの発現抑制の消失が認められた。一方、5位ニトロ基置換体ではパールカンの発現抑制が増強したことから、Rh-Phenによるパールカンの発現抑制には分子内におけるロジウムが求電子性を有することが重要であることが示唆された。しかしながら、求電子性化合物による活性化が知られるNrf2は、Rh-Phenでは活性化されなかった。また、Rh-Phenによる小胞体ストレス誘導性因子GRP78およびGRP94の発現誘導も認められなかった。内皮細胞においてパールカンはcyclic AMPにより発現抑制されることが報告されている。そこで、cyclic AMP合成酵素であるadenylyl cyclaseとcyclic AMPにより活性化されるprotein kinase Aの関与をそれぞれの阻害剤SQ22536とH89を用いて検討したが、Rh-Phenによるパールカン発現抑制への影響は認められなかった。内皮細胞はパールカンによって増殖が促進されることから、細胞増殖を制御するMAPKs (ERK, JNK, およびp38 MAPK)の活性化にRh-Phenが及ぼす影響を検討した。その結果、Rh-Phen処理による時間依存的なp38 MAPKの活性化が認められたが、p38 MAPK阻害剤SB203580の前処理によってRh-Phenによるパールカン発現抑制の回復は認められなかった。MAPKsと同様に内皮細胞の増殖を促進させること知られているAktの活性化にRh-Phenが及ぼす影響を検討したところ、Rh-Phenの濃度および時間依存的なAkt活性化の抑制が認められた。Aktを介したパールカンの発現調節機構はこれまでに報告がなく、現在その分子機構の詳細を検討中であるが、本研究結果は新たなパールカン発現調節機構の存在を示すことを通じて、ハイブリッド分子を生物学領域へ応用することの有用性を提示するものである。

### Mechanism of perlecan suppression by an organorhodium compound in vascular endothelial cells

○Hiroka Matsuzaki<sup>1</sup>, Takato Hara<sup>1</sup>, Eiko Yoshida<sup>2</sup>, Yasuyuki Fujiwara<sup>2</sup>, Chika Yamamoto<sup>3</sup>, Shinichi Saito<sup>4</sup>, Kaji Toshiyuki<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Fac. of Pharm. Sci., Tokyo Univ. of Sci., <sup>2</sup>Sch. of Pharm., Tokyo Univ. Pharm. & Life Sci., <sup>3</sup>Fac. of Pharm. Sci., <sup>4</sup>Fac. of Sci. Dev. I, Tokyo Univ. of Sci.)

In this study, we show that an organorhodium compound suppresses the expression of perlecan via previously unreported pathway.

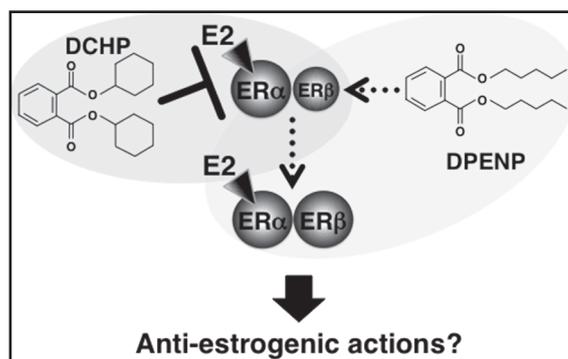
## P-027 フタル酸エステル類によるエストロゲンシグナル阻害活性とその機構

○岡崎 裕之<sup>1</sup>, 池田(高露) 恵理子<sup>1</sup>, 松本 昌也<sup>1</sup>, 竹田 修三<sup>2</sup>, 原口 浩一<sup>1</sup>,  
荒牧 弘範<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 第一薬大, <sup>2</sup> 広島国際大・薬)

【目的】フタル酸エステル類は、玩具や食品容器などのプラスチック製品に可塑剤として利用されてきた。その一方で、げっ歯類の精巣機能への影響(*Toxicol. Sci.*, 123: 206, 2011)や、ラットの子宮重量抑制(*Toxicol. Lett.* 146: 111, 2004)などの内分泌かく乱作用や発がん性に関する危険性が一部疑われていることもあり、各国で主に育児用品(特に子供の口に含まれる危険性があるもの)を中心として使用が規制されている。しかしながら、これらの化合物が内分泌系へ与える影響の詳細な機構については未だ不明な点を多く残している。エストロゲン受容体(ER)を介した女性ホルモン作用は、ER $\alpha$ あるいはER $\beta$ に対する結合活性(=アゴニスト作用)を基に評価される。近年、我々はER $\alpha$ に結合せずにER $\beta$ 発現の増加と活性化を介して17 $\beta$ -estradiol(E2)/ER $\alpha$ 活性を抑制する化合物を見出しており、女性ホルモン作用のかく乱を示す化合物の新たな作用機構について提唱している(*Chem. Res. Toxicol.*, 26: 1073-1079, 2013ほか)。本研究では、9種類のフタル酸エステル類がエストロゲン受容体の発現、ならびにE2/ER $\alpha$ シグナルへ与える影響について検討した。その結果、ER $\beta$ の発現誘導を示したdipentyl phthalate(DPENP)とdicyclohexyl phthalate(DCHP)を対象として、ER $\beta$ の発現誘導と受容体の転写活性化についてそのメカニズムの詳細を明らかにすることを目的に検討を行った。

【方法】フタル酸エステル類(9種類: DEP, DPrP, DBP, DPENP, DCHP, DHP, DEHP, DOP, BPPG): 東京化成及び和光純薬から購入した(純度>98%)。細胞培養: 常法に従って、ER $\alpha$ 陽性ヒト乳がんMCF-7細胞、およびER $\alpha$ 陰性ヒト乳がんMDA-MB-231細胞を培養した。ER $\alpha$ 及びER $\beta$ の転写活性測定: MCF-7, MDA-MB-231を用いてERE(E2応答配列)の活性化を指標としたレポーター遺伝子アッセイにて行った。リアルタイムRT-PCR: 各化合物を曝露して48時間後に細胞を回収し、各mRNAの発現量を測定した。

【結果および考察】9種類のフタル酸エステル類について、各25  $\mu$ MをMCF-7に曝露し、ER $\beta$  mRNAの発現量を測定したところ、DPENPとDCHPにおいて高い発現誘導が認められた(>2.0 fold vs Ctl.: それぞれ8倍, 4倍)。また、これらの化合物によるEREの活性化を指標とするレポーター遺伝子アッセイを行った結果、DPENPとDCHPを曝露した細胞では顕著な活性の低下が認められた。細胞の生存率やER $\alpha$  mRNAには有意な差が認められなかったことから、DPENP/DCHPはE2/ER $\alpha$ の活性に抑制的に働くことが示唆された。そこで、ER $\alpha$ /ER $\beta$ の転写活性化に対する影響を精査するべく、それぞれの発現ベクターを用いたレポーター遺伝子アッセイを行った(MDA-MB-231細胞)。その結果、DCHPはER $\alpha$ /ER $\beta$ の「活性化」は行わず、E2との共存下でE2誘導性の転写活性化を阻害した(IC<sub>50</sub>= $\sim$ 5  $\mu$ M)。一方、DPENPではER $\alpha$ に対して弱い活性化作用を生じ(EC<sub>50</sub>=4.39  $\mu$ M)、E2誘導性の転写活性化(ER $\alpha$ /ER $\beta$ )に対して影響を与えなかった。DPENPとDCHPのいずれもER $\beta$ の発現誘導を来すが、そのエストロゲン活性への影響には“それぞれ異なる作用”が認められたことから、これらの機構について更なる解析を進めている(図参照)。



### Phthalates inhibit estrogen signaling: analysis of inhibitory mechanisms based on ER $\beta$ expression.

○Hiroyuki Okazaki<sup>1</sup>, Eriko Ikeda-Kohro<sup>1</sup>, Masaya Matsumoto<sup>1</sup>, Shuso Takeda<sup>2</sup>, Koichi Haraguchi<sup>1</sup>, Hironori Aramaki<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Daiichi Univ. Pharm., <sup>2</sup>Fac. Pharm. Sci., Hiroshima Int'l Univ.)

## P-029 有機塩素系農薬DDTの代謝物3-methylsulfonyl-DDEは活性代謝物である：*in vitro*におけるエストロゲン作用修飾

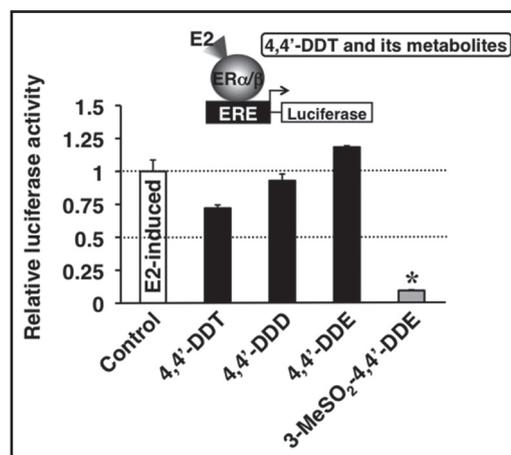
○古田 恵梨果<sup>1</sup>, 岡崎 裕之<sup>1</sup>, 池田(高露) 恵理子<sup>1</sup>, 竹田 修三<sup>2</sup>, 原口 浩一<sup>1</sup>, 荒牧 弘範<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 第一薬大, <sup>2</sup> 広島国際大・薬)

【目的】有機塩素系殺虫剤のDDTは安価かつその優れた殺虫作用のため、第二次世界大戦前後、大量に製造・使用され続けた。わが国でも、戦時中シラミを駆除するため、人体に直接散布されていた。しかし、DDTは難分解性・高蓄積性という性質のため環境中に長期間残留し、ヒトや動物に悪影響を及ぼすことが指摘されている。実際、ヒトの母乳からDDTや代謝物DDEが検出されている。わが国では、DDTは1971年以降から使用が禁止されているが、同時にある国では、DDTがマラリアの特効薬として、現在でも使用され続けている。最近の研究で、胎児期のDDT曝露の程度と呼応して、成人後のホルモン感受性の乳がんの罹患リスクが高まることが示唆されている。しかし、この疫学データをサポートする実験的証拠は乏しい。これまでにDDTや代謝物DDEに関する論文は多いが、3-methylsulfonyl-DDEの検討例は少ない。本研究では、17β-エストラジオール(E2)感受性のヒト乳がんMCF-7細胞をモデルとして、DDTと3-methylsulfonyl-DDEを含めた代謝物の影響を調査し、DDTが乳がん増殖を正に調節する機構の解明に向けたヒントを得ることを目的とした。

【方法】DDTとその代謝物(DDD, DDE, 及び3-methylsulfonyl-DDE)：市販品あるいは化学合成したものを使用した(純度>98%)。細胞培養：常法に従って、ERα陽性ヒト乳がんMCF-7細胞を培養した。リアルタイムRT-PCR：常法に従って行った。レポーター遺伝子アッセイ：ERα/ERβによるERE(E2応答配列)の転写活性化の評価は既報に従った(CRT, 2013)。細胞生存率の解析：Cell Titer Glo試薬(Promega)を用いて行った。

【結果および考察】DDTとその代謝物がMCF-7細胞生存率(処理後24時間)に与える影響を解析した結果(IC<sub>50</sub>)、3-methylsulfonyl-DDE(> 50 μM)>>DDE(～50 μM)>>DDT(21.9 μM)>DDD(11.6 μM)の順であった。この傾向は、処理後48時間でも確認され、特に3-methylsulfonyl-DDEは低濃度領域において細胞増殖を増加させた。次に、DDTとその代謝物がE2によるEREの活性化を指標とする転写活性に与える影響を調査した。興味深いことに、3-methylsulfonyl-DDEのみが転写活性を抑制した(挿入図: 3-MeSO<sub>2</sub>-4,4'-DDE)。すなわち、3-methylsulfonyl-DDEは“抗エストロゲン”として作用したことになる。この抑制は、ほかのスルホン化PCBでは確認されなかった。しかし、抗エストロゲンとして機能する3-methylsulfonyl-DDEが、どのようにして乳がん増殖を正に調節できるのか、という疑問が浮上する。エストロゲン受容体(ER)によるシグナルは、ERE以外にもAP-1 response elementを介して伝達される。抗エストロゲン薬であるタモキシフェンは、ER-AP1シグナルを介して“アゴニスト様”の活性を示すことが報告されている(Science, 277: 1508, 1997)。従って、我々は、上述の“パラドックス”に関して、3-methylsulfonyl-DDEがそれ特異的にER-AP1を活性化することで(=ER-EREは阻害)、乳がん細胞増殖を促進させるという機構を推定している。現在、この仮説を検証中であり、フォーラム会場にて発表する予定である。



### 3-Methylsulfonyl-DDE, a metabolite of DDT, behaves as a modulator of estrogen signaling *in vitro*.

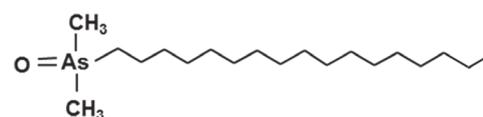
○Erika Furuta<sup>1</sup>, Hiroyuki Okazaki<sup>1</sup>, Eriko Ikeda-Kohro<sup>1</sup>, Shuso Takeda<sup>2</sup>, Koichi Haraguchi<sup>1</sup>, Hironori Aramaki<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Daiichi Univ. Pharm., <sup>2</sup>Fac. Pharm. Sci., Hiroshima Int'l Univ.)

## P-035 質量分析法に基づくヒ素脂質の代謝および毒性機構の解明 第1報 ～分析および抽出手法の検討～

○小林 弥生<sup>1</sup>, 鈴木 紀行<sup>2</sup>, 小椋 康光<sup>2</sup>, 平野 靖史郎<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>国環研・環境リスク・健康, <sup>2</sup>千葉大院・薬)

【目的】これまで、魚介類中のヒ素の主要な化学形態は、毒性の低いアルセノベタイン(AB)であると認識されていたが、近年、高分解能質量分析器による分析技術の向上により、海産物中のヒ素脂質が次々に報告されている。しかしながら、それらヒ素脂質の生体内における代謝および毒性に関する報告は非常に少ない。本研究では、海産物に含まれるヒ素脂質の生体内代謝機構および毒性発現機構の解明を目指し、分析およびヒ素脂質の抽出手法を検討した。

【方法】1)合成ヒ素含有炭化水素AsHC360の測定条件の検討: AsHC360は逆相カラムを用いてA液0.1%ギ酸、B液0.1%ギ酸を含むメタノール(MeOH)を溶離液とし、グラジエント法を用いたHPLC-ICPMSで測定した。2) AsHC360の添加回収実験: 含有ヒ素濃度が保証されているメカジキ魚肉粉末(NMIJ CRM 7403-a)とAsHC360を用いて効率的に抽出



AsHC360 の構造

し得る有機溶媒の組み合わせ(MeOHに対して、容積比として2倍のジクロロメタン、クロロホルム、トルエン、アセトン、ジエチルエーテル、酢酸エチル、アセトニトリル)を検討し、抽出液中のヒ素の化学形態別分析を行った。3)生体を模倣した擬似消化液によるAsHC360の溶出法の検討: CRM 7403-aまたはMeOHに溶解したAsHC360、あるいはCRMとAsHC360の混合試料に対して、擬似唾液、擬似胃液、擬似腸液および擬似胆汁を添加し、それぞれ37°Cで5分、2時間、5分および2時間振とうした。反応後遠心し得られた上清中の総ヒ素濃度と、試料から溶出されたヒ素の化学形態別分析を行い可給態(bioaccessible)ヒ素の評価を行った。

【結果および考察】1)逆相カラムの性質上、AsHC360よりも早い時間に脂肪酸が、遅い時間にリン脂質が溶出すると推定される。今回の測定条件ではAsHC360が約38分に溶出され、1回の測定に約60分要するため、分析時間を短縮させかつ各ヒ素化合物を分離する条件をさらに検討する必要がある。2) AsHC360の添加回収実験では、ジエチルエーテル以外はすべて100%に近い回収率となった。AsHC360がMeOHに可溶であることから回収率が高かったと推定されるが、実試料中でさらなる詳細な検討が必要であると示唆される。また、抽出溶液のHPLC-ICPMSの結果から、添加したAsHC360は安定に回収された事が分かった。3) CRM中のヒ素化合物はほぼABであることが分かっている。CRMと擬似消化液との反応後の上清中におけるヒ素の回収率から、ABは唾液で60%、さらに胃までで約90%がbioaccessibleになっており、HPLC-ICPMSの結果からABのまま溶出されることが分かった。AsHC360は唾液や胃液からは回収されず、腸液でbioaccessibleになっていることが分かった。HPLC-ICPMSの結果からほとんどがAsHC360として検出されたが、一部分解している可能性が示唆された。分解物の同定にはさらなる検討が必要である。

### Elucidation of the metabolism and toxicity mechanism of arsenolipids based on mass spectrometry - First report

○Yayoi Kobayashi<sup>1</sup>, Noriyuki Suzuki<sup>2</sup>, Yasumitsu Ogra<sup>2</sup>, Seishiro Hirano<sup>1</sup> (<sup>1</sup>NIES, <sup>2</sup>Grad. Sch. Pharm. Sci., Chiba Univ.)

Marine organisms contain organoarsenicals, such as arsenolipids, and they become a source of arsenic exposure for human. Less information is available on the metabolism and toxicity of arsenolipids in mammals. In this study, we investigated measurement condition, recovery test, and bioaccessible extraction method of arsenic-containing hydrocarbon AsHC360 using HPLC-ICPMS.

## P-041 血管内皮細胞の増殖制御機構を解析するツールとしての有機-無機ハイブリッド分子

○中村 武浩<sup>1</sup>, 吉田 映子<sup>1</sup>, 滝田 良<sup>2</sup>, 内山 真伸<sup>2</sup>, 鍛冶 利幸<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東京理大・薬, <sup>2</sup>東大院・薬)

【目的】血管内皮細胞は、血管のトーンスや血液凝固線溶系を調節するだけでなく、血液と血管内皮下組織を隔てる障壁として機能している細胞である。この障壁機能には、内皮細胞単層を維持するための内皮細胞増殖が重要である。内皮細胞層修復の遅れは、動脈硬化病変進展の要因となる。内皮細胞の増殖を促進する細胞増殖因子はいくつか知られているが、同様の活性を有する低分子量化合物は知られていない。当研究室では、無機亜鉛が内皮細胞の増殖活性を上昇させることを見出しているが、無機亜鉛の非特異的作用のため解析が難しくそのメカニズムの解明に至っていない。有機化合物と無機化合物の特性を併せ持つ有機-無機ハイブリッド分子は、従来の純粋な無機・有機化合物ではなし得ない、特異な生物活性をもたらすことが可能である。本研究の目的は、亜鉛金属錯体ライブラリーを構築し、その中から血管内皮細胞の増殖を制御する化合物を探索することである。

【方法】32種の亜鉛錯体から成る亜鉛錯体ライブラリーを構築した。ウシ大動脈血管内皮細胞を $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>に播種し、24時間培養後、新鮮な培地中で24時間亜鉛錯体処理した。処理終了前4時間に<sup>3</sup>H]Thymidineでパルスラベルし、酸不溶性画分への放射活性を測定した。有望化合物について、形態学的観察およびLDH逸脱量により細胞傷害性を評価し、細胞内金属蓄積量をICP-MSを用いて定量した。

【結果および考察】亜鉛錯体ライブラリーを用いたスクリーニングの結果、Zn-12 [Zn(2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline)Cl<sub>2</sub>] (図1)が細胞傷害性を示すことなく、従来の無機亜鉛による増殖能の活性化よりも、顕著にその活性を高めることを見いだした。しかしながら、配位子には増殖促進活性は認められなかった。また、その構造類縁体Zn-11, Zn-13, Zn-14, Zn-19, Zn-21にも、内皮細胞の増殖活性は認められなかった。次に、Zn-12と同じ配位子を持つ重金属(Cd, Co, Cu, Fe, Hg, Mn, NiおよびPb)錯体を合成し、内皮細胞の増殖に対する影響を検討した。その結果、いずれの化合物においてもZn-12のような強い増殖活性は認められなかった。これらの結果は、Zn-12の強力な内皮細胞増殖促進活性が、2,9位の置換基としてメチル基を有するZn-12の配位子の構造と導入された亜鉛の相互作用に基づくことを示唆している。Zn-12およびそれを構成する配位子、無機亜鉛(ZnSO<sub>4</sub>またはZnCl<sub>2</sub>)、Zn-11について、細胞内への亜鉛蓄積量を検討した結果、増殖活性を有するZn-12および無機亜鉛について亜鉛の蓄積量が増加したが、その蓄積量に大きな差は認められず、細胞内の標的分子への親和性あるいは無機亜鉛の供給能が亜鉛イオンよりもZn-12の方が高いことが示唆された。強力な内皮細胞増殖促進活性を有する低分子量化合物が得られた意義は大きく、Zn-12をツールとして内皮細胞増殖を担う生体システムの解明されることが期待される。

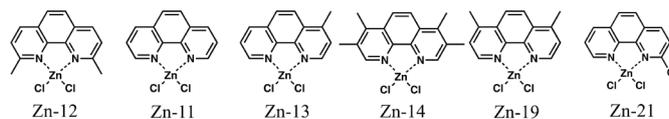


図1. 亜鉛錯体ライブラリー

### Organic-inorganic hybrid molecule as a tool to analyze the mechanisms of vascular endothelial cell proliferation.

○Takehiro Nakamura<sup>1</sup>, Eiko Yoshida<sup>1</sup>, Ryo Takita<sup>2</sup>, Masanobu Uchiyama<sup>2</sup>, Toshiyuki Kaji<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Fac. of Pharm. Sci., Tokyo Univ. of Sci., <sup>2</sup>Grad. Sch. of Pharm. Sci., Univ. Tokyo.)

Since organic-inorganic hybrid molecules can have unique biological activities, zinc complexes may be useful tools to analyze vascular endothelial cell proliferation. In the present study, we found a zinc complex Zn-12—Zn(2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline)Cl<sub>2</sub>—that strongly stimulates vascular endothelial cell proliferation in vitro. Characterization of the stimulatory activity of Zn-12 was investigated and discussed.

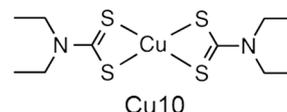
## P-042 ジチオカルバメート銅錯体による血管内皮細胞のプロテオグリカン発現調節

○立石 紘子<sup>1</sup>, 原 崇人<sup>1</sup>, 藤江 智也<sup>1,2</sup>, 吉田 映子<sup>1</sup>, 山本 千夏<sup>2</sup>, 中 寛史<sup>3</sup>, 鍛冶 利幸<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東京理大・薬, <sup>2</sup>東邦大・薬, <sup>3</sup>名大・物国セ)

【目的】ジエチルジチオカルバメート銅錯体(以下Cu10, 下図)は, ジエチルジチオカルバメートに銅を導入した有機-無機ハイブリッド分子であり, 純粋な無機・有機化合物ではなし得ない生物活性を有することが期待されている。当研究室では, Cu10が血管内皮細胞に細胞傷害性を示すことなく, 生体防御応答を担うNrf2の活性化やメタロチオネインを誘導することを見出し, これを活用することで様々な内皮細胞の機能解析を行ってきた。プロテオグリカンはコアタンパク質にグリコサミノグリカン糖鎖が共有結合した複合糖質であり, 血管内腔において抗血栓性を発現するだけでなく, 動脈硬化をはじめとする心血管疾患の進展に深く関与することが知られている。それゆえ, プロテオグリカン分子種の発現調節機構を解明し, その解析のためのツールを創出することは重要である。本研究の目的は, 内皮細胞におけるプロテオグリカン分子種の発現に対するCu10の作用を明らかにすることである。

【方法】培養ウシ大動脈内皮細胞をCu10で処理し, 内皮細胞のプロテオグリカン主要分子種(パルカン, シンデカン-1~4, ビグリカン, デコリン)の遺伝子発現を定量的RT-PCRにより評価した。



【結果および考察】 Cu10を内皮細胞に8時間処理すると, 濃度依存的なシンデカン-1の転写抑制とシンデカン-4およびビグリカンの転写誘導が認められた。これら3分子種の発現は24時間までシンデカン-1が持続的に発現抑制され, シンデカン-4についても持続的な発現上昇を示したが, ビグリカンについては一過的な発現上昇であった。Cu10によるこれら3分子種の発現変動がCu10を構成する銅イオンおよび配位子ジエチルジチオカルバメートでは認められなかったことから, Cu10による3分子種の発現変動には有機-無機ハイブリッド分子としてのCu10の構造全体が必要であることが示唆された。そこで, Cu10の亜鉛, ニッケル, および鉄置換体による3分子種の発現変動を検討したところ, いずれの錯体においても発現変動は認められず, 内皮細胞のプロテオグリカン合成への作用がこの銅錯体特異的な活性であることが示唆された。配位子としてジメチルジチオカルバメート, ジブチルジチオカルバメート, およびピロリジンジチオカルバメートを有する銅錯体では, ジメチルジチオカルバメート銅錯体はシンデカン-4とビグリカンの転写誘導活性が認められたが, その程度はCu10よりも微弱であり, シンデカン-1の転写抑制は認められなかった。一方, ジブチルジチオカルバメートおよびピロリジンジチオカルバメート銅錯体はCu10によって転写誘導された3分子種の発現に影響を及ぼさなかった。以上の結果より, Cu10が内皮細胞のシンデカン-1を転写抑制し, シンデカン-4およびビグリカンを転写誘導する特異な銅錯体であることが分かった。

### Regulation by copper(II) bis(diethyldithiocarbamate) of proteoglycan expression in cultured vascular endothelial cells

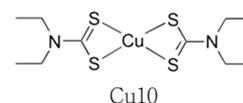
○Hiroko Tatsuishi<sup>1</sup>, Takato Hara<sup>1</sup>, Tomoya Fujie<sup>1,2</sup>, Eiko Yoshida<sup>1</sup>, Chika Yamamoto<sup>2</sup>, Hiroshi Naka<sup>3</sup>, Toshiyuki Kaji<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Fac. of Pharm. Sci., Tokyo Univ. of Sci., <sup>2</sup>Fac. of Pharm. Sci., Toho Univ., <sup>3</sup>Res. Center Mater. Sci., Nagoya Univ.)

The present study shows specific suppression of syndecan-1 expression and transcriptional induction of syndecan-4 and biglycan by copper(II) bis(diethyldithiocarbamate) in vascular endothelial cells.

## P-043 銅錯体による血管内皮細胞における線溶活性の抑制

○沖野 志織<sup>1</sup>, 藤江 智也<sup>1,2</sup>, 吉田 映子<sup>1</sup>, 山本 千夏<sup>2</sup>, 中 寛史<sup>3</sup>, 鍛冶 利幸<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東京理大・薬, <sup>2</sup>東邦大・薬, <sup>3</sup>名大・物国セ)

【目的】血管内皮細胞は、血管の内腔を一層で覆っているcell typeであり、血管のトーン調節に寄与し、血液凝固・線溶系を調節する。線溶活性の調節は、内皮細胞が産生する組織型プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) およびその阻害因子PAI-1のバランスに依存する。しかしながら、内皮細胞における線溶活性の調節機構は未だ不明な点が多い。ジチオカルバメート銅錯体Cu10は有機-無機ハイブリッド分子であり、純粋な有機化合物や無機化合物とは異なる生物活性を有するため、当研究室では内皮細胞の様々な生体機能解析のツールとして活用してきた。本研究では、Cu10が内皮細胞の線溶活性に与える影響を解析した。



【方法】培養ヒト冠動脈内皮細胞をCu10で処理し、線溶活性をFibrin zymographyで、培地中のt-PAおよびPAI-1タンパク質発現量をELISA法で、t-PAおよびPAI-1 mRNAの発現を定量的 RT-PCR法によりそれぞれ解析した。

【結果および考察】内皮細胞にCu10を処理すると、Cu10の処理濃度依存的な線溶活性の低下が認められた。このとき、Cu10の処理濃度および時間に依存して培地へのt-PA分泌量が顕著に低下していたが、PAI-1の分泌量の減少は認められなかった。t-PAおよびPAI-1 mRNAの発現はCu10の濃度依存的に低下していたが、t-PA mRNAの低下がより顕著であった。Cu10による細胞の傷害は認められなかった。次に、このCu10によるt-PAおよびPAI-1の発現抑制作用がこのハイブリッド分子に特有の作用である可能性を、Cu10の構成要素である硫酸銅および配位子のジチオカルバメート、ならびにCu10の鉄置換体を用いて検討した。このうち、t-PAの分泌量を顕著に減少させたのはCu10だけであった。このことは、Cu10が銅錯体として内皮細胞のt-PA合成を阻害することを示唆している。線溶タンパク質の発現は、cAMP/PKA経路の活性化によって抑制されることが報告されている。そこでCu10による線溶活性の低下にcAMP/PKA経路が関与するかどうかを検討した。しかしながら、Adenylate cyclaseおよびPKAの阻害剤を処理しても、Cu10による培地へのt-PA分泌量の抑制は影響を受けなかった。以上の結果から、Cu10は内皮細胞の線溶系因子t-PAの発現を抑制することによって線溶活性を低下させる銅錯体であることが明らかになった。このCu10によるt-PA合成の抑制は、従来のcAMP/PKA経路とは異なる経路に介在されることが示唆された。このことは、Cu10が内皮細胞の新しい線溶系制御機構を解明するためのツールとして有用であることを示唆している。

### Suppression of the fibrinolytic activity by a copper complex in cultured vascular endothelial cells

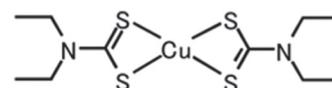
○Shiori Okino<sup>1</sup>, Tomoya Fujie<sup>1,2</sup>, Eiko Yoshida<sup>1</sup>, Chika Yamamoto<sup>2</sup>, Hiroshi Naka<sup>3</sup>, Toshiyuki Kaji<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. of Pharm. Sci., Tokyo Univ. of Sci., <sup>2</sup>Fac. of Pharm. Sci., Toho Univ., <sup>3</sup>Res. Center Mater. Sci., Nagoya Univ.)

In the present study, we found that a copper complex Cu10 reduces the fibrinolytic activity in the liquid phase of cultured vascular endothelial cells through suppression of the tissue plasminogen activator secretion. Since the suppression was independent of the cAMP pathway, a typical suppression pathway, it is suggested that Cu10 is a useful tool to analyze novel mechanisms underlying the regulation of fibrinolysis in vascular endothelial cells.

## P-044 培養血管平滑筋細胞においてVersican合成を抑制する銅錯体

○山本 千夏<sup>1</sup>, 奥山 聡美<sup>1</sup>, 入 亮秀<sup>1</sup>, 大野木 聡美<sup>1</sup>, 小林 祐太<sup>1</sup>, 藤江 智也<sup>1</sup>,  
吉田 映子<sup>2</sup>, 中 寛史<sup>3</sup>, 鍛冶 利幸<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>東邦大・薬, <sup>2</sup>東京理大・薬, <sup>3</sup>名古屋大・物国セ)

【目的】プロテオグリカン(PGs)はコアタンパク質と呼ばれるタンパク質骨格にグリコサミノグリカン糖鎖を共有結合した構造を有する複合糖質である。血管壁のPGsのほとんどは血管平滑筋細胞に由来し、その分子種は、コンドロイチン硫酸PGsの大型分子種バーシカン、デルマトン硫酸PGsの小型分子種デコリンおよびビグリカン、ならびにヘパラン硫酸PGsの大型分子種パールカンである。このうち、バーシカンにはV0, V1, V2, およびV3の4つのalternative splicing productsが存在する。血管壁PG分子種の比率は動脈硬化病変の進展によって変化する。PGsは多様な機能を有するが、動脈硬化病変の進展に関しては、バーシカンV0/V1が促進的に働き、デコリンが抑制的に働くことが知られている。しかしながら、これらのPG分子種の合成調節機構については不明な点が多い。我々は有機-無機ハイブリッド分子を活用するバイオロジー(バイオオルガノメタリクス)を展開している。その中で、銅錯体Cu10(右図)が血管内皮細胞において多様な活性を示すことがわかった。本研究では、血管平滑筋細胞のPG合成に対するCu10の活性について検討した。



【方法】ウシ血管平滑筋細胞をコンフルエントまで培養後、Cu10存在下、<sup>35</sup>S]硫酸でプロテオグリカン糖鎖を代謝標識し、細胞層と培地に蓄積したPGsの特性について、糖鎖への<sup>35</sup>S]硫酸の取り込みをCPC沈殿法で、hydrodynamic sizeに基づく分離をSephacel CL-4Bで、荷電密度に基づく分離をDEAE-Sephacel陰イオン交換クロマトグラフィーで、糖鎖の伸張をSephacel CL-6Bで解析した。別に、PGコアタンパク質をwestern blotで、遺伝子発現をReal time RT-PCRで分析した。

【結果および考察】細胞層および培地への<sup>35</sup>S]硫酸標識PGsの蓄積は、Cu10によって濃度依存的に減少した。<sup>35</sup>S]硫酸標識PGsをSephacel CL-4Bでゲルろ過したところ、細胞層では低分子量型PGサブクラスが減少しており、培地では高分子量型PGサブクラスが減少していた。それぞれのサブクラスをDEAE-Sephacelで生成したところ、高分子量型PGサブクラスは0.5 M NaClで、低分子量型PGサブクラスは0.45 M NaClで溶出される単一のピークとして検出された。Sephacel CL-6Bによる分析の結果、両サブクラスはコンドロイチン/デルマトン硫酸糖鎖を結合していることが示されたが、Cu10は糖鎖の長さに影響を及ぼさなかった。Western blot分析の結果、Cu10は、(1)バーシカンV0/V1バリエーションの培地への蓄積を減少させ、(2)デコリンの特に細胞層への蓄積を減少させ、(3)ビグリカンの培地への蓄積を減少させた。Real time RT-PCRの結果、Cu10はV0/V1バリエーションおよびデコリンのmRNAの発現を低下させたが、特にV0/V1バリエーションに対して顕著な抑制活性を示した。以上の結果から、Cu10が血管平滑筋細胞において、バーシカンV0/V1バリエーションの合成を顕著に抑制して培地への蓄積量を減少させ、デコリンについては合成を抑制して細胞層への蓄積を減少させるが、コンドロイチン/デルマトン硫酸糖鎖の慎重には影響を及ぼさないことが明らかになった。Cu10は特にバーシカンV0/V1バリエーションおよびデコリンのコアタンパク質の合成調節機構やこの2つの分子種の細胞層への付着機構を解析するツールとして有用であると考えられる。

### A copper complex that suppresses versican synthesis in vascular smooth muscle cells in culture

○ Chika Yamamoto<sup>1</sup>, Satomi Okuyama<sup>1</sup>, Akihide Hairu<sup>1</sup>, Satomi Onogi<sup>1</sup>, Yuta Kobayashi<sup>1</sup>, Tomoya Fujie<sup>1</sup>, Eiko Yoshida<sup>2</sup>, Hiroshi Naka<sup>3</sup>, Toshiyuki Kaji<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Fac. of Pharm. Sci., Toho Univ., <sup>2</sup>Fac. of Pharm. Sci., Tokyo Univ. of Sci., <sup>3</sup>Res. Center Mater. Sci., Nagoya Univ.)

We found out a copper complex that strongly suppresses the synthesis of a large chondroitin sulfate proteoglycan—versican—and a small leucine-rich dermatan sulfate proteoglycan—decorin—in cultured vascular smooth muscle cells.

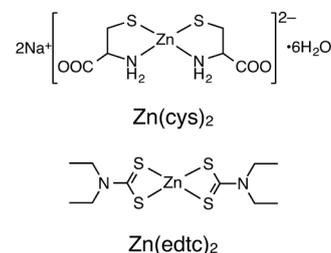
## P-056 無機亜鉛および亜鉛錯体を活用した血管内皮細胞メタロチオネイン誘導の特性解析

○藤江 智也<sup>1,2</sup>, 中 寛史<sup>3</sup>, 瀬川 雪乃<sup>1</sup>, 上原 茜<sup>1</sup>, 中村 武浩<sup>1</sup>, 木村 朋紀<sup>4</sup>,  
吉田 映子<sup>1</sup>, 内山 真伸<sup>5</sup>, 山本 千夏<sup>2</sup>, 鍛冶 利幸<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東京理大・薬, <sup>2</sup>東邦大・薬, <sup>3</sup>名大物産七, <sup>4</sup>摂南大・理工, <sup>5</sup>東大院・薬)

【目的】メタロチオネイン(MT)は構成アミノ酸残基の約1/3がシステインであり, その全てがチオール基として存在する金属結合タンパク質である。MTはその特徴的な構造から, 活性酸素や有害重金属の毒性を軽減するだけでなく, 亜鉛の恒常性の維持にも寄与する多機能な防御タンパク質である。MTの誘導には, 亜鉛が結合して活性化される転写因子MTF-1がMT遺伝子の重金属応答配列MREにリクルートされることが不可欠である。血管の内腔を一層に覆う内皮細胞は, 血液凝固線溶系の調節を通じて血管病変の防御に寄与している。最近, 有機-無機ハイブリッド分子を活用することによって, 内皮細胞MTの誘導にMTF-1だけでなく, AREにリクルートされるNrf2も関与し, 誘導機構がアイソフォーム単位で異なることを示した<sup>1)</sup>。したがって, 内皮細胞のMT誘導機構を解明することは血管病変の理解に重要である。亜鉛は代表的なMT誘導因子であるが, 内皮細胞を無機亜鉛で処理してもMTは誘導されないことが示唆されている<sup>2)</sup>。本研究では, 無機亜鉛による内皮細胞のMT関連応答を確認するとともに, MTF-1-MRE経路を活性化する亜鉛錯体を活用し, 内皮細胞MT誘導の特性を解析した。

【方法】培養ウシ大動脈内皮細胞を硫酸亜鉛, 亜鉛錯体Zn(cys)<sub>2</sub>, Zn(edtc)<sub>2</sub>で処理し, MT-1/2タンパク質発現をウエスタンブロット法で, MTアイソフォーム(MT-1A, MT-1E, およびMT-2A) mRNA発現をreal-time RT-PCR法でそれぞれ解析した。プロモーター活性はDual luciferase assayにて測定した。

【結果および考察】内皮細胞を硫酸亜鉛で処理したとき, MT-1/2タンパク質およびMT mRNA発現の上昇は認められなかった。このとき, MREの活性化もAREの活性化も認められなかった。このことから, 内皮細胞においては, 無機亜鉛がMTF-1-MRE経路およびNrf2-ARE経路を活性化することができず, そのためMTを誘導しないことが分かった。マウス胚線維芽細胞においてMTF-1選択的に亜鉛を供給する亜鉛錯体Zn(cys)<sub>2</sub>で処理したところ, MREが活性化されたにも関わらず, MT-1/2タンパク質および3つのMTアイソフォームmRNAの発現上昇は認められなかった。これに対し, Zn(edtc)<sub>2</sub>は, AREは活性化されなかったがMREは活性化され, MT-1/2タンパク質とすべてのMTアイソフォームmRNAの発現上昇が認められた。以上の結果は, 内皮細胞のMT誘導は, MTF-1-MRE経路の活性化が必要であるが, それだけでは不十分であることを示している。Zn(edtc)<sub>2</sub>は内皮細胞MT誘導機構の解析に有用な分子プローブであることが示された。



### Characterization of metallothionein induction in vascular endothelial cells using inorganic zinc and zinc complexes

○Tomoya Fujie<sup>1,2</sup>, Hiroshi Naka<sup>3</sup>, Yukino Segawa<sup>1</sup>, Akane Uehara<sup>1</sup>, Takehiro Nakamura<sup>1</sup>, Tomoki Kimura<sup>4</sup>, Eiko Yoshida<sup>1</sup>, Masanobu Uchiyama<sup>5</sup>, Chika Yamamoto<sup>2</sup>, Toshiyuki Kaji<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Fac. Pharm. Sci., Tokyo Univ. Sci., <sup>2</sup>Fac. Pharm. Sci., Toho Univ., <sup>3</sup>Res. Center Mater. Sci., Nagoya Univ., <sup>4</sup>Fac. Sci. Eng. Setsunan Univ., <sup>5</sup>Grad. Sch. Pharm. Sci., Univ. Tokyo)

In the present study, the following results were obtained: (1) inorganic zinc does not activate the MTF-1-MRE and Nrf2-ARE pathways involved in the induction of MT-1/2; (2) Zn(cys)<sub>2</sub> activates the MTF-1-MRE pathway without activating the Nrf2-ARE pathway activity but does not induce MT-1/2; and (3) Zn(edtc)<sub>2</sub> activates the MTF-1-MRE pathway without activating the Nrf2-ARE pathway activity and induced MT-1/2 in vascular endothelial cells.