

アスピリン銅(II)錯体の活性酸素消去能

藤 森 貴 子, 山 田 涼 子, 安 井 裕 之, 桜 井 弘
(京都薬科大学・代謝分析学教室*)

Anti-oxidative activity of copper (II)-aspirin complex

Takako FUJIMORI, Suzuko YAMADA, Hiroyuki YASUI and Hiromu SAKURAI

Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University

Since it was proposed that reactive oxygen species (ROS) is involved in the pathogenesis of various diseases, superoxide dismutase (SOD) mimetic complexes have been intensively studied. We prepared a $\text{Cu}_2(\text{aspirin})_4$ ($\text{Cu}_2(\text{asp})_4$) consisting of Cu(II) and aspirin that has been in use for many years as an antipyretic, an analgesic, and as an anti-inflammatory agent. Also, $\text{Cu}(\text{salicylic acid})_2$ ($\text{Cu}(\text{sal})_2$) was used for comparison. The SOD mimetic activity was examined by using cytochrome c, electron spin resonance (ESR) spectroscopic and ESR spin trap methods; the activity of $\text{Cu}_2(\text{asp})_4$ was almost equal to or less than those of $\text{Cu}(\text{sal})_2$ and CuSO_4 . The *in vitro* antioxidant activity was evaluated on the basis of the cell survival after ultraviolet B light (UVB) irradiation on an immortalized human epithelial/keratinocyte cell line (HaCaT) and normal human dermal fibroblast (NHDF). The cell survival ratio was found to significantly increase in the presence of $\text{Cu}_2(\text{asp})_4$. Thus, the suppressive effect of ROS generation following UVA irradiation in the skin of hairless mice, who received oral administration of the compounds for three consecutive days, was found to be effective. The effect of $\text{Cu}_2(\text{asp})_4$ was significantly higher than that of Cu(II) ion. Based on the results, $\text{Cu}_2(\text{asp})_4$ complex was concluded to be a potent antioxidative compound in biological systems, and useful to treat diseases due to the involvement of ROS.

活性酸素種(ROS)が多くの疾病の発症に関与していると言われる中、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)様活性を有する物質が探索されている。我々は、銅(II)と古くから解熱鎮痛薬および抗炎症薬として用いられているアスピリンを含むアスピリン銅錯体 ($\text{Cu}_2(\text{aspirin})_4$: $\text{Cu}_2(\text{asp})_4$) およびサリチル酸銅錯体 ($\text{Cu}(\text{salicylic acid})_2$: $\text{Cu}(\text{sal})_2$) を合成し、SOD様活性をシトクロムc法, ESR直接法およびESRスピントラップ法を用いて評価した。 $\text{Cu}_2(\text{asp})_4$ の活性は $\text{Cu}(\text{sal})_2$ や CuSO_4 と同等かもしくはわずかに低い値を示した。*In vitro*における抗酸化活性は、ヒト表皮株化細胞 HaCaT cellとヒト真皮の繊維芽細胞fibroblastにおけるUVB照射後の細胞生存率を評価したところ、 $\text{Cu}_2(\text{asp})_4$ が生存率を有意に上昇することが分かった。さらに、 $\text{Cu}_2(\text{asp})_4$ を三日間ヘアレスマウスに経口投与したところ、UVA照射にもとづき発生する皮膚中のROS生成が抑制されることが明らかとなった。以上の結果にもとづいて、 $\text{Cu}_2(\text{asp})_4$ は有用な抗酸化性錯体であることが見出され、 $\text{Cu}_2(\text{asp})_4$ は将来的にROSの関与により生じる疾病の治療に有用な化合物となり得ると提案する。

*所在地：京都市山科区御陵中内町5 (〒607-8414)

実験方法

1. 錯体の合成

文献記載の方法^{1, 2)}を用いて水中でCuSO₄：配位子：KHCO₃を1：2：2の割合で混合して合成した。錯体の構造はESR, IR, および可視吸収スペクトル, 元素分析, 磁化率測定により推定した。

2. SOD様活性の評価

1) シトクロムc法³⁾：キサンチン-キサンチンオキシダーゼ系により発生するスーパーオキシドアニオン ($\cdot\text{O}_2^-$)により還元されたシトクロムcを550 nmにおける吸光度の変化として3分間測定し, その傾きより吸光度増加率を求めた。 $\cdot\text{O}_2^-$ 生成を50%抑制する錯体およびCuSO₄の濃度をIC₅₀値として評価した。

2) ESR直接法⁴⁾：KO₂, クラウンエーテル(DB18C6)およびトルエン-DMSO(3：2)を加え3分間ソニケーションして $\cdot\text{O}_2^-$ を生成した。これをアルゴンガス下で, 液体窒素温度においてESRスペクトルを測定した。シグナルピークの高さを求めて, $\cdot\text{O}_2^-$ を50%抑制する錯体およびCuSO₄濃度をIC₅₀値として評価した。

測定条件；Power：5 mW, Field：330 ± 25 mT, Sweep time：4 min, Modulation：0.1 mT, Time constant：0.1 sec, Gain：40

3) ESRスピントラップ法⁵⁾：ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系により発生させた $\cdot\text{O}_2^-$ をDMPOにトラップさせて, DMPO-OO(H)にもとづくESRスペクトルを室温(22℃)で測定した。DMPO-OO(H)の三番目のシグナル(S)のMn(II)の低磁場側のシグナル(M)に対する比をS/M比とした。 $\cdot\text{O}_2^-$ を50%抑制する錯体およびCuSO₄の濃度をIC₅₀値として評価した。

3. *In vitro*での抗酸化活性の評価⁶⁻⁸⁾

ヒト表皮株化細胞HaCaT cell (3×10^4 cells/well)およびヒト真皮繊維芽細胞fibroblast (2×10^4 cells/well)を播種し, 37℃で24時間培養した。錯体, CuSO₄またはリガンドを希釈してそれぞれ培地に加え, 24時間培養した。次に, UVB (60 mJ/cm²または300 mJ/cm²)を照射し, 24時間培養した。生細胞数はNeutral Red assayにより評価した。

4. *In vivo*での抗酸化活性の評価^{9, 10)}

5%アカシア溶液に懸濁した化合物を, それぞれ次の割合で6週齢の雄性ヘアレスマウス(Hos：HR-1)に3日間連続経口投与した。Cu₂(asp)₄ 240 μmol·kg⁻¹, Cu(sal)₂ 480 μmol·kg⁻¹, Cu(CH₃COO)₂ 480 μmol·kg⁻¹, aspirin 960 μmol·kg⁻¹, およびsalicylic acid 960 μmol·kg⁻¹最終投与の約30分後に, ペントバルビツール(50 mg·kg⁻¹)で麻酔し, 保温パットにマウスを固定した。腹部を50%エタノールで洗浄し, 2つの穴の開いた黒い布で覆い, 右側の穴からUVA (18 J·cm⁻²)を照射した。両方の穴から $\cdot\text{O}_2^-$ や一重項酸素(¹O₂)と特異的に反応して発光する化学発光プローブCLAを測定部位に塗布した。塗布後直ちに微弱光測定装置(NightOWL)を用いてマウスの皮膚中で発生するROSを30分間リアルタイムで観測した。

結果と考察

Cu₂(asp)₄とCu(sal)₂錯体の物性は既報の物性データとほぼ一致した。^{1, 2)}さらに, ESRスペクトルの解析結果より, これら錯体では, 4酸素原子が1原子銅に配位してCuO₄構造をとっていると推定した。錯体の推定構造をFig. 1に示した。また, 磁化率より錯体中の銅は2価であることがわかった。Cu₂(asp)₄については, 単結晶のX線構造解析によりこの構造を確認した。

化学的手法により $\cdot\text{O}_2^-$ 消去活性を評価した結果, Fig. 2に示すように両錯体およびCuSO₄の活性はほぼ同等であり, シトクロムc法により評価した結果から $\cdot\text{O}_2^-$ 消去活性はSODの約600分の1であることが分かった。また, ESR直接法で評価した結果より, 両錯体およびCuSO₄は直接 $\cdot\text{O}_2^-$ と反応し, $\cdot\text{O}_2^-$ を消去することが明らかとなった。

*In vitro*での抗酸化活性の評価の結果をFig. 3およびFig. 4に示した。化学的手法により評価したCu(II)錯体のSOD様活性は低いながらも, 両錯体およびCuSO₄はUVB照射後の細胞生存率を有意に上昇させた。Cu(II)化合物が細胞内に取り込まれ, ROSを消去したか, あるいは, 生体内抗酸化物質やタンパク質などを誘導合成してROSの産生を抑制

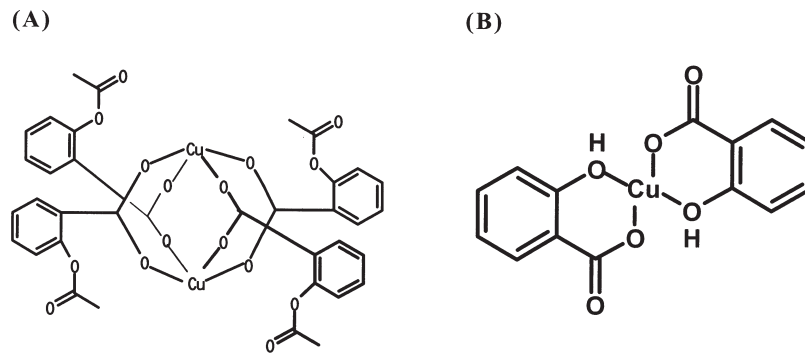


Fig. 1 The structures of $\text{Cu}_2(\text{aspirin})_4$ (A) and $\text{Cu}(\text{salicylic acid})_2$ (B) complexes.

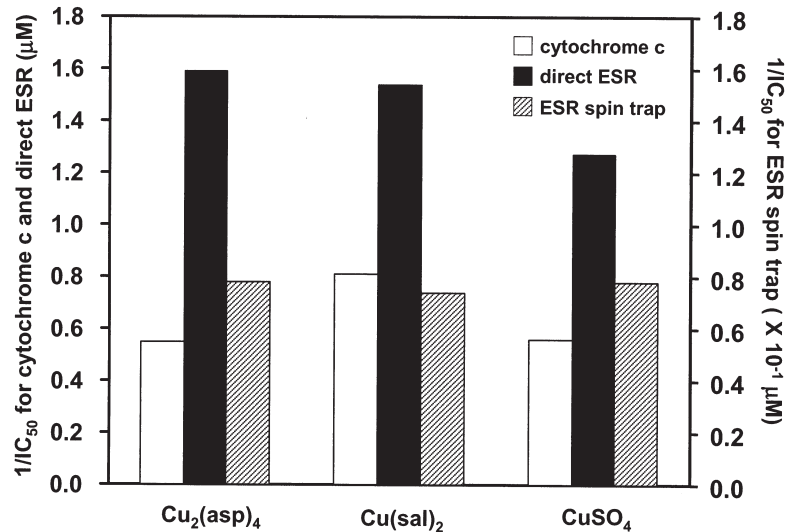


Fig. 2 Superoxide anion scavenging activity (SSA) of compounds. Data are represented as means ($n=3$) on the basis of Cu concentration.

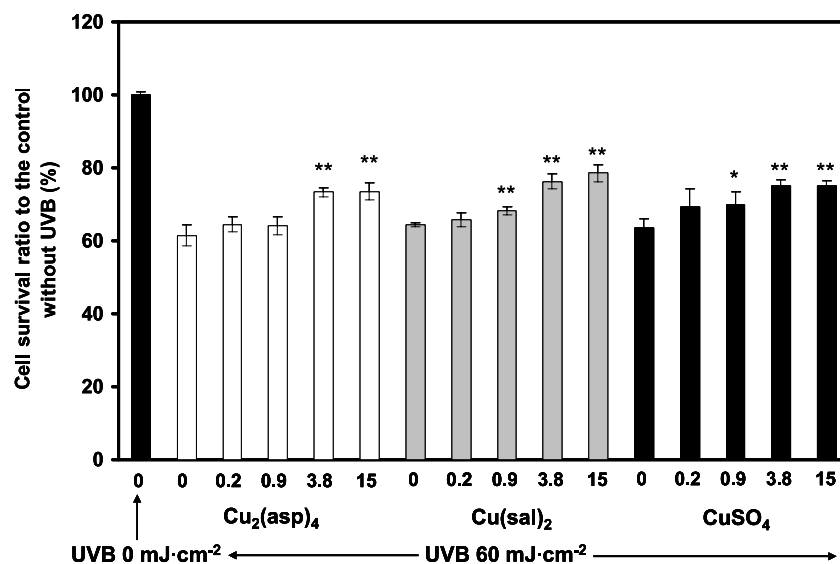


Fig. 3 Effects of $\text{Cu}_2(\text{asp})_4$ complex and its related compounds on the survival of the HaCaT cell. The left side block column shows the control without UVB irradiation. The other columns list the results for the groups treated with complexes and UVB irradiation. The indicated concentrations are based on Cu concentration. Data are expressed as the means \pm S.D.s for 3 repeated runs. Significance: ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs. control.

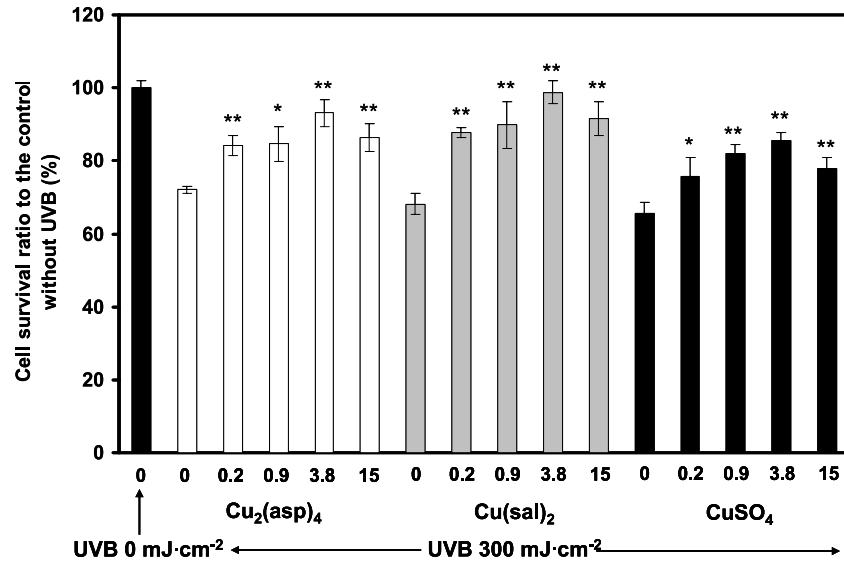


Fig. 4 Effects of Cu₂(asp)₄ complex and its related compounds on the survival of the fibroblast. The left side of the black column shows the control without UVB irradiation. The other columns are the results for groups treated with complexes and UVB irradiation. The indicated concentrations are on the basis of Cu concentration. Data are expressed as the means ± S.D.s for 3 repeated runs. Significance: **p < 0.01, *p < 0.05 vs. control.

したかまたはROSを消去したためUVB照射後の細胞生存率が上昇したのではないかと推定されるが、さらに詳しい研究が必要である。

Cu(II)化合物により細胞生存率が上昇したため、我々はUVA照射下のヘアレスマウスの皮膚中で発生するROSに対するCu(II)化合物の消去活性を評価した。その結果、三日間連続経口投与したCu₂(asp)₄はコントロールやイオン型のCu(CH₃COO)₂投与群より有意にROSを消去または抑制した (Fig. 5)。我々はすでに、動物の皮膚にUVAを照射すると $\cdot\text{O}_2^-$ と $^1\text{O}_2$ の両者が発生することを報告した。⁹⁾これまでの研究で、Cu₂(asp)₄は $\cdot\text{O}_2^-$ を消去するが $^1\text{O}_2$ は消去しないことが明らかとなっている。UVA照射により皮膚中で発生するROSに対してCu₂(asp)₄が消去活性を示したことは、 $\cdot\text{O}_2^-$ の消去に関係していると考えられた。また、Cu₂(asp)₄投与により内因性抗酸化化合物の誘導合成が促進され、

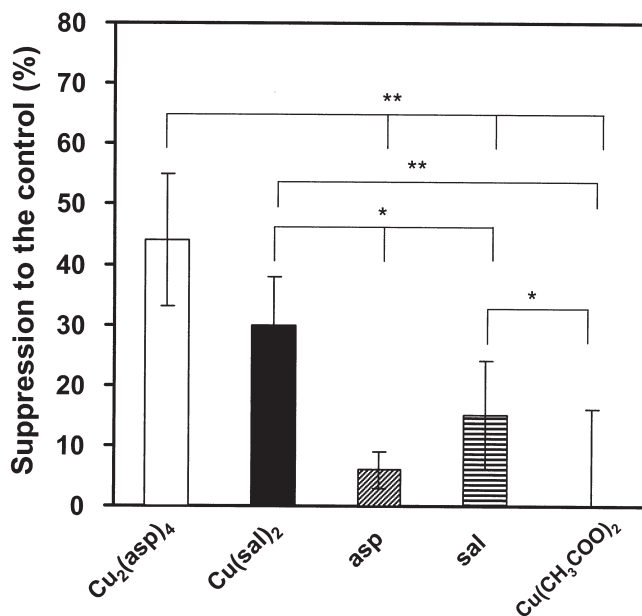


Fig. 5 Suppressive effect of compounds on UVA-induced ROS generation in the skin of HR-1 hairless mice, who were administered the compounds orally for 3 consecutive days. Data are expressed as the means ± S.D.s for 3 repeated experiments. Significance: **p < 0.01 and *p < 0.05 between the indicated groups.

ROSを消去または抑制していることも深く寄与していると考えられる。

以上の結果から、 $\text{Cu}_2(\text{asp})_4$ は有用な抗酸化性化合物であり、 $\text{Cu}_2(\text{asp})_4$ 錯体はROSが関与する疾病の治療や美容目的に対して有効な化合物になり得ると考えられる。

謝 辞

$\text{Cu}_2(\text{asp})_4$ のX線構造解析は大阪薬科大学・薬品物理化学 石田寿昌先生、尹 康子先生に測定して頂きました、深く感謝致します。

参考文献

1. Williams AD, Walz TD, Foye OW (1976) Synthesis and biological evaluation of tetrakis(acetylsalicylate)- μ -dicopper(II). J. Pharm. Sci. 65: 126 - 128.
2. Walker RW, Beveridge JS, Whitehouse WM (1980) Anti-inflammatory activity of a dermally applied copper salicylate preparation. Agents Actions 10: 38 - 47.
3. Babior MB, Kipnes SR, Curnutte TJ (1973) Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. J. Clin. Invest. 52: 741 - 744.
4. Jinno J, Mori H, Oshiro Y, Kikuchi T, Sakurai H (1991) Evaluation of superoxide scavenging activity of OPC-14117 by electron spin resonance technique. Free Rad. Res. Commun. 15: 223 - 230.
5. Gao D, Kakuma M, Oka S, Sugiuo K, Sakurai H (2000) Reaction of beta-alkannin (shikonin) with reactive oxygen species: detection of beta-alkannin free radicals. Bioorg. Med. Chem. 8: 2561 - 2569.
6. Masaki H, Okano Y, Ochiai Y, Obayashi K, Akamatsu H, Sakurai H (2002) α -Tocopherol increases the intracellular glutathione level in HaCaT keratinocytes. Free Rad. Res. 36: 705 - 709.
7. Masaki H, Sakurai H (1997) Increased generation of hydrogen peroxide possibly from mitochondrial respiratory chain after UVB irradiation of murine fibroblasts. J. Dermatol. Sci. 14: 207 - 216.
8. Masaki H, Sakurai H (1995) Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UV irradiation. Photomed. Photobiol. 17: 121 - 124.
9. Yasui H, Sakurai H (2000) Chemiluminescent Detection and Imaging of Reactive Oxygen Species in Live Mouse Skin Exposed to UVA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 269: 131 - 136.
10. Yasui H, Sakurai H (2003) Age-dependent generation of reactive oxygen species in the skin of live hairless rats exposed to UVA. Exp. Dermatol. 12: 655 - 661.