

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03382

研究課題名(和文)カドミウム毒性に対する感受性決定因子の同定

研究課題名(英文)Identification of susceptibility determinants against cadmium toxicity

研究代表者

佐藤 雅彦 (Sato, Masahiko)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：20256390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：カドミウム長期曝露マウスの腎臓を用いた網羅的転写活性スクリーニング法およびヒト由来の腎近位尿管細胞を用いたRNA干渉法により、新たなカドミウム感受性決定因子として、転写因子PPAR γ を見いだした。さらに、転写因子Surf-2も僅かにカドミウム感受性を示すことを明らかにした。また、PPAR γ のリガンドであるレチノイン酸がカドミウム毒性軽減効果を示すことも新たに見いだすことができた。これら感受性決定因子の生体内での変動は、カドミウム慢性腎毒性の発症に多大な影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カドミウムによる慢性腎毒性の発症には個体差が認められていることから、人間集団におけるカドミウムの健康リスク評価の際には、個々人の感受性要因を解明する必要がある。本研究によって、カドミウムに対する新たな感受性決定因子を見いだすことができれば、カドミウムの健康リスク評価に大きく貢献できるものと考えられる。また、本研究によって得られる新たなカドミウム感受性決定因子の変動は、カドミウムによる慢性腎毒性発症を左右する極めて重要な要因であり、感受性集団として考慮する必要がある。また、カドミウム腎毒性に特異的な感受性決定因子を同定することは、新たなバイオマーカーとしての活用も期待される。

研究成果の概要(英文)：The transcription factor PPAR γ was found as a new cadmium susceptibility determinant by a comprehensive transcription activity screening method using the kidney of long-term cadmium-exposed mice and an RNA interference method using human renal proximal tubular cells. Furthermore, the transcription factor Surf-2 was also revealed to slightly sensitive to cadmium. It was also newly found that retinoic acid, which is a ligand of PPAR γ , has a protective effect on cadmium toxicity. Therefore, it was suggested that changes in these susceptibility determinants may have a significant effect on the development of chronic cadmium nephrotoxicity.

研究分野：薬学・環境毒性学

キーワード：カドミウム 腎毒性 感受性因子

1. 研究開始当初の背景

カドミウムは、コメなどの食品を介して生涯にわたって身体に取り込まれ、しかも体内残留性(生物学的半減期:15~30年)が非常に高いため、体内カドミウム蓄積量は加齢とともに上昇する。体内に取り込まれたカドミウムは腎臓に最も多く蓄積されることから、主なカドミウム慢性中毒は、腎毒性、特に腎近位尿細管機能障害である。カドミウムはコメの中に比較的多く含まれており、日本人が1日に摂取するカドミウムの約50%はコメに由来する。コメを主食とする日本人は欧米人に比べてカドミウムの体内蓄積量が多く、日本人の腎臓中のカドミウム蓄積量の一部の高齢者で約100 ppmに達している。したがって、食品を介したカドミウムの長期摂取による高齢者の健康影響については十分な注意が必要となる。さらに、カドミウムによる慢性中毒(腎毒性)の発症には個体差が認められており、高感受性の集団が存在することから、感受性決定因子の同定は、食品を介したカドミウムの慢性曝露による高齢者の健康影響を評価する上で、極めて重要である。

一方、カドミウムに対する生体内防御因子として、金属結合タンパク質であるメタロチオネインが知られている。4種類のメタロチオネイン分子種のうち、メタロチオネイン-Iとメタロチオネイン-II(メタロチオネイン-I/II)はカドミウムと結合することにより、その毒性を軽減する。また、メタロチオネイン-I/II欠損マウスは、カドミウム毒性に対して高感受性を示す。したがって、メタロチオネイン-I/IIは、カドミウム毒性に対する防御因子であるとともに、感受性因子でもある。しかしながら、カドミウムによる慢性腎毒性発症の個体差をメタロチオネイン-I/IIの発現量だけでは説明できず、不明な点も残っている。しかも、メタロチオネイン-I/II以外には、カドミウムに対する感受性因子は報告されていないのが現状である。

2. 研究の目的

カドミウムは、コメなどの食品を介して生涯にわたって身体に取り込まれ、しかも体内残留性が高いため、加齢とともに腎臓中に多く蓄積する。さらに、カドミウムによる慢性腎毒性の発症には個体差が認められており、高感受性集団が存在する。したがって、カドミウムに対する感受性決定因子の同定は、食品を介したカドミウムの慢性曝露による高齢者の健康影響を評価する上で、極めて重要である。本研究では、カドミウム長期曝露マウスやヒト由来腎近位尿細管細胞を用いて、カドミウムの腎近位尿細管障害に対する新たな感受性決定因子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) カドミウム曝露マウスの腎臓における活性変動転写因子の検索

300 ppmのカドミウムを含む餌を3ヶ月間与えたC57BL/6J雌性マウスの腎臓を用いて、網羅的転写活性スクリーニング法であるProtein/DNA-bindingアッセイ(Protein/DNA Array Kit)を行い、DNA結合活性が変動する転写因子(カドミウム感受性候補転写因子)を検索した。なお、Protein/DNA Array Kitには、345種類の転写因子の結合オリゴが搭載されており、これら転写因子についてDNA結合活性を解析できる。対照群(コントロール群)と比べて2倍以上、あるいは1/2以下に変動した転写因子を変動因子とした。

(2) 活性変動転写因子(カドミウム感受性候補転写因子)のカドミウムに対する感受性

MEF-1のカドミウムに対する感受性

MEF-1は、ATP binding cassette(ABC)多剤排出トランスポーターの1つであるABCB1(ABC transporter subfamily B member 1)[MDR1やP-糖タンパク質とも呼ばれる]の発現を制御することが知られている¹⁾。そこで、ABCB1をsiRNA法によりノックダウンしたヒト由来腎近位尿細管細胞(HK-2細胞)を5~50 μMのカドミウムで処理した後、細胞生存率をAlamar blueアッセイで調べた。また、カドミウム処理したHK-2細胞中のABCB1のmRNAレベルをリアルタイムRT-PCR法により、タンパク質レベルをウエスタンブロット法により各々解析した。

RAR/DR-5のカドミウムに対する感受性

RAR/DR-5には、3種類のアイソフォーム(RAR α 、RAR β 、RAR γ)が存在することから、RARA(RAR α の遺伝子名)、RARB(RAR β の遺伝子名)、RARG(RAR γ の遺伝子名)を各々siRNA法によりノックダウンしたHK-2細胞を用いて、カドミウム処理後の細胞生存率をAlamar blueアッセイで調べた。また、カドミウム処理したHK-2細胞中のRARA、RARB、RARG mRNAレベルをリアルタイムRT-PCR法により解析した。

Thy-1BP、Surf-2、USF-1のカドミウムに対する感受性

THY-1(Thy-1BPの下流遺伝子)、Surf-2、USF-1を各々siRNA法によりノックダウンしたHK-2細胞を用いて、カドミウム処理後の細胞生存率をAlamar blueアッセイで調べた。また、カドミウム処理したHK-2細胞中のTHY-1、Surf-2、USF-1 mRNAレベルをリアルタイムRT-PCR法によ

り解析した。

(3) カドミウムによる下流遺伝子の発現変動

カドミウム曝露マウスの腎臓を用いた網羅的転写活性スクリーニング法で得られた 5 種類のカドミウム感受性候補転写因子のうち、カドミウム感受性が認められた転写因子について、300 ppm のカドミウムを含む餌を 1 年間で与えた C57BL/6J 雌性マウスの腎臓を用いて、その下流遺伝子の mRNA レベルをリアルタイム RT-PCR 法により解析した。

(4) PPAR α のカドミウムに対する感受性

我々は、これまでにラット由来腎近位尿細管細胞を用いて、転写因子 PPAR α (ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体) の転写活性がカドミウムによって阻害されることを見いだしている²⁾。そこで、PPAR α (PPAR の遺伝子名)を siRNA 法によりノックダウンした HK-2 細胞を用いて、カドミウム処理後の細胞生存率を Alamar blue アッセイで調べた。また、カドミウム処理した HK-2 細胞中の PPAR α mRNA レベルをリアルタイム RT-PCR 法により解析した。

(5) カドミウム毒性に対するレチノイン酸の効果

レチノイン酸 (RA) は RAR のリガンドであるとともに PPAR α のリガンドでもあることから、カドミウム毒性に対する RA 前処理の効果を HK-2 細胞を用いて検討した。HK-2 細胞を RA で 24 時間処理した後、カドミウムで 24 時間処理して細胞生存率を Alamar blue アッセイで調べた。さらに、PPAR α をノックダウンした HK-2 細胞を用いて RA 前処理におけるカドミウム感受性を調べた。

4. 研究成果

(1) カドミウム曝露マウスの腎臓における活性変動転写因子の検索

カドミウムによって DNA 結合活性が上昇した転写因子は 8 種であった³⁾。一方、カドミウムによって DNA 結合活性が低下した転写因子は 16 種であった³⁾。これら変動転写因子のうち、特に変動割合の高かった Thy-1BP、Surf-2、MEF-1、RAR/DR-5、USF-1 の 5 種の転写因子をカドミウム感受性候補転写因子とした。なお、Thy-1BP と Surf-2 はカドミウムによって転写活性が促進され、MEF-1、RAR/DR-5 および USF-1 はカドミウムによって転写活性が阻害された。

(2) 活性変動転写因子 (カドミウム感受性候補転写因子) のカドミウムに対する感受性

MEF-1 のカドミウムに対する感受性

MEF-1 が ATP binding cassette (ABC) 多剤排出トランスポーターの 1 つである ABCB1 (ABC transporter subfamily B member 1) [MDR1 (Multiple drug resistance 1) と呼ばれる] の発現を制御していることから¹⁾、ABCB1 をノックダウンした HK-2 細胞を用いて、カドミウムに対する感受性を調べたところ、ABCB1 のノックダウンはカドミウム毒性に影響を与えないことが判明した⁴⁾。

次に、カドミウムによる HK-2 細胞での ABCB1 の発現変動を検討したところ、カドミウムによって ABCB1 mRNA レベルが増加するとともに P-糖タンパク質 (ABCB1 遺伝子産物) レベルも上昇することが明らかとなった⁴⁾。

以上の結果より、ABCB1 はカドミウムに対する感受性決定因子ではないことが確認された。しかしながら、カドミウムによって ABCB1 の発現が増加することが見いだされたことから、カドミウムが近位尿細管細胞における物質輸送に何らかの異常を引き起こす可能性が示された。

RAR/DR-5 (RAR α 、RAR β 、RAR γ) のカドミウムに対する感受性

RARA と RARG をノックダウンした HK-2 細胞は、いずれもカドミウム毒性に影響を与えなかった。一方、RAR β については、siRNA 処理してもノックダウンされなかったため、RAR β の阻害剤である LE135 を用いてカドミウム感受性に及ぼす影響を調べた。その結果、20 μ M のカドミウムで 24 時間処理した HK-2 細胞では、およそ 60% が細胞死を引き起こしたが、LE135 の前処理によってほぼ 100% の細胞が生存した。

次に、カドミウムによる HK-2 細胞での RARA および RARG の遺伝子発現変動を検討したところ、カドミウム処理によって RARA mRNA レベルの変動は認められなかったが、RARG mRNA レベルはカドミウム濃度に依存して減少した。なお、RAR β については、リアルタイム RT-PCR 法によって mRNA を検出することができなかった。

以上の結果より、RAR α および RAR γ はカドミウム毒性に関与しなかったが、RAR β はカドミウムの感受性に関与する転写因子であることが示された。また、カドミウムは RARG 遺伝子発現抑制作用を有することが示された。

Thy-1BP、Surf-2、USF-1 のカドミウムに対する感受性

THY1 と USF-1 を各々ノックダウンした HK-2 細胞は、いずれもカドミウム毒性に影響を与えなかった。しかしながら、Surf-2 をノックダウンした HK-2 細胞はカドミウム毒性に対して僅かに抵抗性を示した。

次に、THY1、Surf-2 および USF-1 の遺伝子発現に及ぼすカドミウムの影響を調べたところ、

THY1 および *Surf-2* mRNA レベルはカドミウムによって変動しなかったが、*USF-1* mRNA レベルはカドミウムによって減少した。

以上の結果より、THY1 および *USF-1* はカドミウム毒性に関与しなかったが、*Surf-2* は僅かにカドミウム感受性を示した。また、カドミウムは *USF-1* 遺伝子発現抑制作用を有することが示された。

(3) カドミウムによる下流遺伝子の発現変動

5 種類のカドミウム感受性候補転写因子の中からカドミウム感受性が認められた *Surf-2* について、カドミウム長期曝露マウスの腎臓を用いて、その下流遺伝子である *Pdgfb*⁵⁾ の遺伝子発現を調べた。その結果、マウスの腎臓中 *Pdgfb* の遺伝子発現はカドミウム長期曝露によって変動しなかった⁶⁾。

(4) PPAR α のカドミウムに対する感受性

我々は、これまでにラット由来腎近位尿細管細胞を用いて、転写因子 PPAR α の転写活性がカドミウムによって阻害されることを見いだしていることから²⁾、*PPAR α* (PPAR α の遺伝子名) をノックダウンした HK-2 細胞を用いて、カドミウムに対する感受性を調べた。その結果、*PPAR α* のノックダウンはカドミウム毒性に対して強い抵抗性を示した。なお、*PPAR α* の遺伝子発現はカドミウムによって変動しなかった。

以上の結果より、PPAR α はカドミウム感受性因子であることが明らかとなった。

(5) カドミウム毒性に対するレチノイン酸 (RA) の効果

RA は RAR のリガンドであるとともに PPAR α のリガンドでもあることから、カドミウム毒性に対する RA 前処理の効果を検討したところ、カドミウム毒性が RA の前処理によって軽減されることが判明した。さらに、RA によるカドミウム毒性軽減効果への PPAR α の関与を検討するために、*PPAR α* をノックダウンした HK-2 細胞を用いて RA 前処理におけるカドミウム感受性を調べた。その結果、*PPAR α* をノックダウンしても RA 前処理によるカドミウム毒性軽減効果が認められた。したがって、RA 前処理によるカドミウム毒性軽減効果には PPAR α が関与していない可能性が示された。

(6) まとめ

本研究結果より、カドミウム感受性決定因子として PPAR α を新たに見いだすことができた。また、カドミウム感受性候補転写因子の中で、*Surf-2* が僅かにカドミウム感受性を示すことも明らかとなった。PPAR α や *Surf-2* の転写活性はカドミウムによって変動することから、PPAR α や *Surf-2* の転写活性変動はカドミウムによる腎毒性の発症に深く関与する可能性が示唆された。一方、RA がカドミウム腎毒性軽減効果を有することも明らかとなり、RA の過不足がカドミウム腎毒性の発症に大きな影響を及ぼす可能性が示唆された。したがって、PPAR α や *Surf-2* の転写活性変動および RA の過不足は、カドミウム腎毒性に対する感受性を左右する要因(個体差要因) になっている可能性が考えられる。このように本研究で得られた成果は、カドミウムの健康影響を評価する上でも貴重な知見を提供できたものと考えられる。

< 引用文献 >

Ogretmen B, Safa A.R., Identification and characterization of the MDR1 promoter-enhancing factor 1 (MEF1) in the multidrug resistant HL60/ VCR human acute myeloid leukemia cell line. *Biochemistry*, 39, 194- 204 (2000).

Tokumoto M., Lee J.Y., Fujiwara Y., Satoh M. Alteration of DNA binding activity of transcription factors in NRK-52E rat proximal tubular cells treated with cadmium. *J. Toxicol. Sci.*, 39, 735-738, 2014.

Lee J.Y., Mori C., Tokumoto M., Satoh M. Changes in DNA-binding activity of transcription factors in the kidney of mice exposed to cadmium. *J. Toxicol. Sci.*, 46, 125-129, 2021.

Mori C., Lee J.Y., Tokumoto M., Satoh M. Effect of cadmium on the expression of ABCB1 transporter in human proximal tubular cells. *BPB Reports*, 4, 74-77, 2021.

Bondjers C, He L, Takemoto M, Norlin J, Asker N, Hellström M, Lindahl P, Betsholtz C. Microarray analysis of blood microvessels from PDGF-B and PDGF-Rbeta mutant mice identifies novel markers for brain pericytes. *FASEB J.*, 20, 1703-1705, 2006.

Lee J.Y., Mori C., Tokumoto M., Satoh M. Time-dependent changes in the gene expression levels in the mouse kidney by long-term exposure to cadmium. *BPB Reports*, 4, 69-73, 2021.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Jin-Yong Lee, Chikage Mori, Maki Tokumoto, Masahiko Satoh	4. 巻 46
2. 論文標題 Changes in DNA-binding activity of transcription factors in the kidney of mice exposed to cadmium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 125-129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Jin-Yong Lee, Chikage Mori, Maki Tokumoto, Masahiko Satoh	4. 巻 4
2. 論文標題 Time-dependent changes in the gene expression levels in the mouse kidney by long-term exposure to cadmium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 69-73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Chikage Mori, Jin-Yong Lee, Maki Tokumoto, Masahiko Satoh	4. 巻 4
2. 論文標題 Effect of cadmium on the expression of ABCB1 transporter in human proximal tubular cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 74-77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森 稚景、李 辰竜、徳本真紀、佐藤雅彦
2. 発表標題 カドミウムによる腎近位尿細管でのABCB1トランスポーターの発現誘導
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森 稚景、李 辰竜、徳本真紀、佐藤雅彦
2. 発表標題 ヒト腎近位尿管におけるABC11トランスポーター発現に及ぼすカドミウムの影響
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森 稚景、李 辰竜、徳本真紀、佐藤雅彦
2. 発表標題 カドミウム長期曝露マウス腎臓における転写因子の活性変動
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	李 辰竜 (LEE Jin-Yong) (80581280)	愛知学院大学・薬学部・准教授 (33902)	
研究分担者	徳本 真紀 (TOKUMOTO Maki) (90614339)	愛知学院大学・薬学部・講師 (33902)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	森 稚景 (MORI Chikage)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------