

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10582

研究課題名(和文)小胞体ストレスシグナリングカスケードに着目した重金属毒性抑制機構

研究課題名(英文)Reduction of heavy metal toxicity through the endoplasmic reticulum signaling cascade

研究代表者

松岡 雅人(Matsuoka, Masato)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：50209516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体ストレス軽減物質サルブリナル(Sal)は、重金属カドミウム(Cd)の毒性に対して細胞種依存性の効果を示した。Cdをばく露した肺胞上皮腺癌細胞では、小胞体ストレス応答とオートファジーが誘導され、Salは細胞生存率を減少させた。同細胞におけるCd長期ばく露による悪性転化において、Salは細胞増殖および移動能を低下させた。神経芽細胞腫では近位尿管細胞と同様に、SalはCdばく露による細胞死抑制効果を示し、細胞死を誘導するCHOP発現抑制とオートファジー促進の関与が示唆された。更に、重金属ばく露による小胞体ストレスおよび酸化ストレスのモデル生物として線虫とゼブラフィッシュの有用性も示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経変性疾患や代謝性疾患と小胞体ストレス応答との関わりが注目されているが、重金属ばく露が小胞体ストレスを介して毒性や健康影響を生じるかについては十分に検討されていない。本研究では、小胞体ストレス軽減物質サルブリナルが重金属毒性や細胞障害を軽減する効果について、ヒト由来の呼吸器系や神経系培養細胞を用いて検討したことに毒性学的意義がある。小胞体が重金属ばく露に対するセンサーとして機能することにも繋がる。培養細胞実験を進展させ、個体レベルでの小胞体ストレスや酸化ストレスの検討が必要であり、重金属をばく露したゼブラフィッシュと線虫などのモデル生物の有用性を示したことは、今後の環境医学研究に役立つ。

研究成果の概要(英文)：Treatment with salubrinal (Sal), an inhibitor of endoplasmic reticulum (ER) stress, showed the distinct effects against heavy metal cadmium (Cd)-induced toxicity depending on the cell types. Exposure of lung alveolar epithelial adenocarcinoma cells with Cd induced ER stress response and autophagy, and treatment with Sal reduced the viability of adenocarcinoma cells. In malignant progression of lung alveolar epithelial adenocarcinoma cells subjected to prolonged Cd exposure, treatment with Sal decreased cell proliferation and high cell motility. Treatment with Sal suppressed Cd exposure-induced cell death in neuroblastoma cells in similar to renal proximal tubular cells. The inhibitory expression of cell death promoting CHOP and activation of autophagy might play a role in the protective effects of Sal in neuroblastoma cells. Model animals such as *C. elegans* and zebrafish were found to be useful for studying heavy metal exposure-induced ER stress and oxidative stress.

研究分野：環境・産業医学

キーワード：小胞体ストレス シグナル伝達 サルブリナル 重金属 カドミウム 鉛 線虫 ゼブラフィッシュ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小胞体 (Endoplasmic Reticulum) はカルシウム貯蔵のほか、蛋白質のプロセッシングと品質管理や細胞内輸送などに関わる重要な細胞小器官である。小胞体ストレス応答 (unfolded protein response) では、小胞体内に異常な折り畳み構造を持つ蛋白質が蓄積すると (小胞体ストレス) 順次、蛋白質の翻訳抑制、異常蛋白質の蓄積を回避する小胞体シャペロン分子の発現誘導、異常蛋白質の分解促進、最終的手段としてのアポトーシスが生じる。近年、小胞体ストレス応答は、神経変性疾患 (パーキンソン病、アルツハイマー病など) や代謝性疾患 (糖尿病、脂肪肝など) のみならず、環境汚染重金属であるカドミウムによる中毒性細胞障害へ関与することを我々は報告してきた (引用文献 1-4)。従って、中毒性細胞障害を防御する上で、小胞体ストレス応答を軽減する物質またはシグナル分子に着目することが重要である。

小胞体ストレス応答には、小胞体膜貫通蛋白質である PERK (double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase)、ATF6 (activating transcription factor 6)、IRE1 (inositol-requiring enzyme 1) を介した 3 つの主要な小胞体ストレスシグナリングがあり、各々、翻訳停止、小胞体シャペロン分子転写誘導およびアポトーシスを制御している。PERK は翻訳開始因子 eIF2 (eukaryotic translation initiation factor 2) のセリン 51 部位をリン酸化し、eIF2 の翻訳開始活性を抑制し、新規蛋白質合成に伴う小胞体の過重な負荷状態を軽減させる。Boyce ら (2005) は、ラット褐色細胞腫 PC12 細胞を用いたスクリーニングにおいて、小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンによるアポトーシスを抑制する物質として小分子サルブリナル (salubrinal) を発見した (引用文献 5)。サルブリナルは、GADD34/protein phosphatase 1 (PP1) 複合体を抑制することにより、eIF2 脱リン酸化を防ぎ、小胞体ストレスを軽減させる可能性が考えられる。

我々は、カドミウムをばく露したヒト HK-2 近位尿細管由来上皮細胞において、サルブリナルが MAP キナーゼ (mitogen-activated protein kinase) 活性化とアポトーシスを共に抑制することを見出した (引用文献 3)。さらに、eIF2 のリン酸化による蛋白翻訳停止に反し、転写因子 ATF4 は選択的翻訳によりその発現が誘導されるが、カドミウム細胞毒性において ATF4 が防御的に機能することも見出した (引用文献 6)。従って、サルブリナルは中毒性細胞障害を防御しうる有用な候補物質となる可能性がある。しかし、我々がサルブリナルを用いた *in vitro* および *in vivo* の毒性学研究所を網羅的に検索したところ (引用文献 7)、サルブリナルが有害化学物質 (カドミウム、ヒ素、パラコート、ベンゾピレン、ダイオキシン、タバコ煙、シスプラチン、サイクロスポリンなど) による小胞体ストレスを軽減するか否かは不確定であり、また、その分子機構の詳細は必ずしも明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、重金属ばく露が小胞体ストレスを介して細胞毒性や健康影響を生じるかについて *in vitro* での検討を行うことにより、小胞体が重金属ばく露に対するセンサーとして機能することを明らかにする。また、今後の研究で必要となるモデル生物を用いた *in vivo* の重金属ばく露実験系を作成する。

(1) 培養細胞を用いた *in vitro* 実験: サルブリナルの小胞体ストレス軽減効果に着目し、重金属化合物、特にカドミウム、のばく露による細胞障害に対するサルブリナルの効果を明らかにする。これまでの腎近位尿細管細胞への影響に加えて、新たにヒト由来の呼吸器系 (A549 肺胞上皮腺がん細胞) や神経系 (SH-SY5Y 神経芽細胞腫) 培養細胞を用いた *in vitro* 実験を行う。カドミウムは、国際がん研究機関 (International Agency for Research on Cancer) による発がん分類グループ 1 であり、ヒトに肺がんを惹起することが知られている。そこで、A549 細胞のカドミウムばく露による悪性転化に対するサルブリナルの影響も検討する。

(2) モデル生物を用いた *in vivo* 実験: 今後、培養細胞実験を進展させ、重金属ばく露による個体レベルでの小胞体ストレスや酸化ストレスへの影響に対する分子生物学的検討が必要であり、重金属 (カドミウム、鉛) をばく露したモデル生物 (ゼブラフィッシュ、線虫) の有用性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた *in vitro* 実験

培養 A549 肺胞上皮腺癌細胞および SH-SY5Y 神経芽細胞腫に塩化カドミウム (CdCl_2) およびサルブリナルを培地溶液中に添加してばく露を行った。小胞体ストレスおよびオートファジー

応答因子 (eIF2、ATF4、GRP78、CHOP、LAMP1、TFEB、p62、LC3B) の mRNA と蛋白レベルは、それぞれリアルタイム PCR 法とウェスタンブロットング法で評価した。細胞死率は、トリパンブルー法または MTT アッセイにより定量した。リソソーム pH とオートファゴソーム形成は、蛍光プローブの LysoTracker と Cyto-ID でそれぞれを蛍光標識し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

培養 A549 細胞のカドミウム長期ばく露による悪性転化は、塩化カドミウム (CdCl_2) を 9 から 14 週間ばく露し、高い細胞移動能および抗がん剤耐性を獲得した R-A549 細胞を樹立した。サルプリナルは、カドミウム長期ばく露中に継続的に処理を行う場合 (サルプリナル継続処理) あるいは、R-A549 樹立後に 48 時間処理を行う場合 (サルプリナル単回処理) のそれぞれの影響を検討した。上皮間葉転換に関わる因子 (E-cadherin、N-cadherin、PAI-1) および小胞体ストレス応答因子 (eIF2、ATF4) の蛋白レベルはウェスタンブロットング法で評価した。細胞死率と細胞増殖率は、それぞれトリパンブルー法と MTT アッセイにより定量した。細胞移動能は、wound healing assay を用いて評価した。ストレスファイバー (アクチン繊維束) 形成は、細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、phalloidin-FITC で蛍光標識し、蛍光顕微鏡で観察した。PAI-1 発現ノックダウン実験では、siRNA を用いた。

(2) モデル生物を用いた in vivo 実験

線虫: NGM (nematode growth medium) に線虫の餌となる大腸菌株 OP50 を蒔き、20 で線虫を飼育した。塩化カドミウム (CdCl_2) は NGM に添加した。抗酸化剤の N-アセチルシステイン (NAC) は各濃度を培地上に均一になるように滴下した。野生型線虫をカドミウム含有培地で飼育し、Kaplan-Meier 法を用いた寿命測定、体長測定および忌避行動評価を行った。線虫へのカドミウム取り込み量に対する NAC の影響は、ICP-MS を用いてカドミウム量を定量した。

ゼブラフィッシュ: ゼブラフィッシュ受精卵を、哺乳類の着床から出生に相当する期間に含まれる、受精後 6 時間 (6 hpf) から 72 hpf まで低濃度 (100 ppb、10 $\mu\text{g}/\text{dl}$) の酢酸鉛にばく露し、胚発生に与える影響を評価した。小胞体ストレス関連遺伝子 (hspa5、hsp90b1、ddit3) および酸化ストレス関連遺伝子 (gclc、gsr、gstp1、hmox1、nqo1、prdx1、sqstm1) の mRNA レベルはリアルタイム PCR 法で評価した。活性酸素種レベルは、DCFH-DA を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) カドミウムばく露 A549 細胞におけるサルプリナルの影響

A549 細胞に小胞体ストレス誘導剤であるタブシガルジンとツニカマイシンを処理したところ、eIF2 リン酸化、ATF4、GRP78 レベルの増加が認められ、本 in vitro 実験系は小胞体ストレス応答モデルとして有用であることを確認した。次いで、A549 細胞にカドミウムをばく露したところ、eIF2 リン酸化、ATF4、GRP78 レベルは増加し、また、TFEB の減少と p62 と LC3B の増加を認めた。以上の結果から、カドミウムは A549 細胞において小胞体ストレス応答とオートファジーを共に誘導することが明らかとなった。一方、サルプリナル処理はカドミウムによる小胞体ストレス応答とオートファジーの各マーカーの発現に明らかな影響を及ぼさなかった。

カドミウム濃度依存的にばく露 24 時間後の MTT アッセイによる A549 細胞生存率の低下が認められた。サルプリナル単独では、20 μM までは明らかな細胞毒性はなかった。カドミウムとサルプリナルの併用により軽度な相加的な細胞毒性の増強が認められた。以上の結果から、肺胞上皮腺がん細胞ではカドミウム細胞毒性に対するサルプリナルの抑制効果は明らかではなく、むしろ、がん細胞生存率を低下することが判った。また、BEAS-2B ヒト気管支上皮細胞に銀ナノ粒子をばく露した別実験においても、サルプリナル処理による細胞生存率低下の増強が認められた。近位尿細管上皮細胞ではサルプリナルのカドミウム誘導細胞死に対する抑制効果が認められることから、サルプリナルの細胞生存・死への影響は細胞種に依存する可能性が考えられる。

(2) 悪性転化したカドミウムばく露 A549 細胞におけるサルプリナルの影響

R-A549 細胞では、上皮系因子 (E-cadherin) の減少と間葉系因子 (N-cadherin、PAI-1) の増加が認められた。また、細胞内にストレスファイバー形成が認められた。サルプリナル継続処理は、カドミウム長期ばく露による E-cadherin 発現量低下、N-cadherin 発現量増加およびストレスファイバー形成への影響はなかったが、PAI-1 発現量が有意に減少した。さらに、サルプリナル継続処理は R-A549 細胞の細胞増殖率および細胞移動能を低下させた。一方、サルプリナル継続処理は R-A549 細胞の抗がん剤耐性を増加させた。サルプリナル単回処理は、R-A549 細胞の細胞増殖率を低下させたが、PAI-1 発現量および細胞移動能に対する明らかな影響はなかった。以下の実験では、サルプリナル継続処理による PAI-1 の発現量低下と細胞増殖率、細胞移動能および抗がん剤耐性との関連性について検討した。

PAI-1 発現を siRNA によりノックダウンした R-A549 細胞では、E-cadherin 発現量低下と

N-cadherin 発現量増加は軽度抑制され、細胞増殖能および細胞移動能は明らかに抑制された。一方、抗がん剤シスプラチンに対する耐性は低下した。R-A549 細胞のストレスファイバー形成に対する PAI-1 ノックダウンの影響は観察されなかった。このことから、サルプリナル継続処理は、R-A549 細胞に対するシスプラチン耐性を除く、細胞増殖能および細胞移動能の低下への効果は、PAI-1 の発現量低下を介している可能性がある。なお、R-A549 細胞に対するサルプリナル継続処理と PAI-1 ノックダウン処理のシスプラチン耐性に対する効果の違いについては、サルプリナル継続処理による eIF2 のリン酸化を介した ATF4 の発現量増加を検討したが、本仮説を支持する結果は得られず、今後の検討が必要である。

(3) カドミウムばく露 SH-SY5Y 細胞におけるサルプリナルの影響

カドミウム濃度依存的に細胞生存率の低下が認められ、サルプリナル処理は細胞生存率の低下を抑制した。カドミウム濃度依存的にリン酸化型 eIF2、GRP78、p62、LC3B 蛋白レベルの上昇が認められ、サルプリナル処理はこの上昇を増強した。一方、ATF4 蛋白レベルの明らかな変動は認められなかった。細胞死を誘導する CHOP の mRNA レベルはカドミウム濃度依存的に上昇し、サルプリナル処理はこの上昇を抑制した。Cyto-ID で蛍光標識した細胞内のオートファゴソームは、カドミウムばく露で上昇し、サルプリナル処理はこの上昇を増強した。以上の結果から、近位尿細管細胞と同様に神経芽細胞腫において、カドミウムばく露による細胞死に対するサルプリナル処理の抑制効果が認められた。サルプリナルが持続的に eIF2 のリン酸化を持続させる結果、小胞体ストレスとオートファジーが同時に機能する一方、細胞死を誘導する CHOP 発現を抑制することにより、細胞生存にバランスがシフトする可能性が考えられた。

カドミウムばく露は、リソソーム pH の上昇をもたらした。カドミウムばく露により、リソソーム膜に多く存在する LAMP1 レベルには変化なかったが、リソソームおよびオートファジーを制御する TFEB レベルの減少が認められ、サルプリナル処理による更なる減少が認められた。パフィロマイシン A1 を用いたフラックスアッセイにより、カドミウムばく露はオートファジー活性を抑制し、サルプリナルは逆にオートファジーを促進した。以上の結果から、神経芽細胞腫において、カドミウムばく露による細胞死に対するサルプリナルの抑制効果は、CHOP 発現の抑制に加えて、オートファジー経路の活性化が関わる可能性がある。

(4) カドミウムばく露線虫モデルを用いた検討

N-アセチルシステイン (NAC) は線虫へのカドミウムの取り込みを阻害しなかったことから、本実験条件下では、NAC はカドミウムに対するキレート作用ではなく、抗酸化剤として機能することが確認できた。そこで、カドミウムばく露によって惹起される線虫体長の矮小化と忌避行動に対する NAC の効果を調べた。NAC はカドミウムばく露による線虫体長の矮小化を回復しなかったが、忌避行動を有意に回復させた。従って、カドミウムばく露による忌避行動は、酸化ストレスを介して生じていることが示唆された。本研究では、線虫をカドミウムばく露実験の有用なモデル生物として確立できた。今後、線虫における小胞体ストレス応答に焦点を当てるほか、本研究で見出したカドミウムばく露による線虫の忌避行動が有する生物学的意義とその分子基盤についても解析予定である。

(5) 鉛ばく露ゼブラフィッシュモデルを用いた検討

72 hpf までは外表的な形態異常は観察されず、生存率も非ばく露群と差はなかったが、孵化が非ばく露群よりも早まる傾向を示し、かつ、48 hpf と 72 hpf での体長が有意に短かった。また、72 hpf まで鉛にばく露した幼生を、鉛非存在下で受精後 7 日まで飼育したところ、鰾の消失、浮腫形成などの発生異常が観察された。次に、活性酸素種の量を比較したところ、ばく露群では 48 hpf で有意に増加し、72 hpf では半減した。酸化ストレス関連遺伝子 (gclc、gsr、gstp1、prd1、sqstm1) の発現は、24 hpf では変化なかったが、ばく露群では 48 hpf と 72 hpf で有意に上昇した。小胞体ストレス応答関連遺伝子 (hsa5、hsp90b1、ddit3) の発現は、ばく露群では 48 hpf で増加後、72 hpf で減少し、細胞保護的に働く小胞体シャペロン (hsa5、hsp90b1) の発現は 72 hpf でも非ばく露群よりも有意に高かった。以上の結果から、ゼブラフィッシュにおいて、微量鉛のばく露により一過的な酸化ストレスおよび小胞体ストレスが生じ、初期発達の低下や将来的な発生異常を引き起こされる可能性が示唆された。ゼブラフィッシュは、鉛ばく露実験の有用なモデル生物として利用できた。

<引用文献>

1. Liu F et al., Cadmium induces the expression of Grp78, an endoplasmic reticulum molecular chaperone, in LLC-PK1 renal epithelial cells. Environ Health Perspect 114, 859-864, 2006.
2. Inageda K, Matsuoka M, Induction of GADD153 expression by tributyltin in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Environ Toxicol Pharmacol 27, 158-160, 2009.
3. Komoike Y et al., Effects of salubrinal on cadmium-induced apoptosis in HK-2 human renal proximal tubular cells. Arch Toxicol 86, 37-44, 2012.

4. Komoike Y, Matsuoka M, Endoplasmic reticulum stress-mediated neuronal apoptosis by acrylamide exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 310, 68-77, 2016.
5. Boyce M et al., A selective inhibitor of eIF2 dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 307, 935-939, 2005.
6. Fujiki K et al., PI3K signaling mediates diverse regulation of ATF4 expression for the survival of HK-2 cells exposed to cadmium. *Arch Toxicol* 88, 403-414, 2014.
7. Matsuoka M, Komoike Y, Experimental evidence shows salubrinal, an eIF2 dephosphorylation inhibitor, reduces xenotoxicant-induced cellular damage. *Int J Mol Sci* 16, 16275-16287, 2015.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Keiko Hirota, Masato Matsuoka	4. 巻 34
2. 論文標題 N-acetylcysteine restores the cadmium toxicity of <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioMetals	6. 最初と最後の頁 1207-1216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10534-021-00322-z	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 Yuta Komoimke, Masato Matsuoka	4. 巻 13
2. 論文標題 Developmental adverse effects of trace amounts of lead: Evaluation using zebrafish model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1014912
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2022.1014912	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 廣田恵子、松岡雅人
2. 発表標題 線虫 <i>Caenorhabditis elegans</i> を用いたカドミウム毒性メカニズムの解析
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮山貴光、松岡雅人
2. 発表標題 神経芽腫SH-SY5Y細胞におけるカドミウム誘導性の小胞体ストレス/オートファジー応答とサルプリナルの細胞死への影響
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮山貴光、松岡雅人
2. 発表標題 カドミウム誘導性のERストレス/オートファジー応答に対するサルプリナルの細胞特異的影響
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮山貴光、松岡雅人
2. 発表標題 銀ナノ粒子誘導性のERストレス/オートファジー応答に対するサルプリナルの肺細胞への影響
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takamitsu Miyayama、Masato Matsuoka
2. 発表標題 Involvement of ER stress response/autophagy in silver nanoparticles exposure-induced cell death in SH-SY5Y cells
3. 学会等名 The 8th International Symposium on Metallomics (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 蔣池勇太、松岡雅人
2. 発表標題 微量鉛による発生影響：ゼブラフィッシュモデルを用いた評価
3. 学会等名 第93回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京女子医科大学研究業績データベース衛生学公衆衛生学（環境・産業医学分野）
<https://gyoseki.twmu.ac.jp/twmhp/KgApp?kozac=C11100000000&year=2022>

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
研究協力者	蔣池 勇太 (Komoike Yuta)		
研究協力者	廣田 恵子 (Hirota Keiko)		
研究協力者	藤木 恒太 (Fujiki Kota)		
研究協力者	宮山 貴光 (Miyayama Takamitsu)		
研究協力者	稲村 尚子 (Inamura Hisako)		

6. 研究組織（つづき）

	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	松村 賢一 (Matsumura Kenichi)		

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