

機関番号：33902

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390175

研究課題名（和文） カドミウム毒性における鉄代謝異常の関与とその分子機構解明

研究課題名（英文） Involvement of iron metabolism in cadmium toxicity and elucidation of its molecular mechanism

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

研究成果の概要（和文）：カドミウムが妊娠マウスの十二指腸で鉄輸送関連遺伝子である *DMT1*、*FPN1*、*DCYTB* の発現を抑制することで鉄の吸収を阻害し、その結果鉄欠乏状態となって胎仔の発育が阻害されること、非妊娠成熟マウスにおいてもカドミウムが十二指腸中の *DMT1*、*FPN1*、*DCYTB*、*HEPH*、*HCP1* の遺伝子発現を抑制し、腸管からの鉄吸収に影響を与えること、並びに培養小腸上皮細胞においてもカドミウムが鉄輸送関連遺伝子 (*DMT1*、*FPN1*、*DCYTB*、*HEPH*) の発現を抑制することを見いだした。

研究成果の概要（英文）：Cadmium inhibited iron absorption through suppression of the expression of genes (*DMT1*, *FPN1*, *DCYTB*) related to iron transport in the duodenum of pregnant mice. As a result, it was shown that fetal growth was inhibited. Furthermore, cadmium was found to suppress the expression of genes (*DMT1*, *FPN1*, *DCYTB*, *HEPH*, *HCP1*) related to iron transport in the duodenum of adult mice and to affect on the intestinal iron absorption. In addition, cadmium was also shown to inhibit the expression of genes (*DMT1*, *FPN1*, *DCYTB*, *HEPH*) related to iron transport in cultured intestinal epithelial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2010年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：環境保健、毒性学、カドミウム、鉄輸送、非ヘム鉄、ヘム、マウス、ヒト小腸上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

カドミウムによる環境汚染が引き起こした公害病としてイタイイタイ病が知られているが、この他にも、かつては、作業場でのカドミウム曝露や汚染食品を介したカドミウムの

過剰摂取などによって腎、骨、呼吸器、循環器および胎児などの障害が認められていた。これら職業曝露や汚染食品によるカドミウム中毒は今日ではほとんど発生していないが、最近、微量カドミウムの長期摂取が一般人の

健康に障害を与える可能性が指摘され、国際的な問題となっている（我が国でも内閣府食品安全委員会がこの問題を取りあげて議論している最中である）。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。したがって、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、微量カドミウム摂取による健康影響について十分な注意が必要となる。

微量カドミウムの慢性毒性として、腎機能障害、鉄欠乏性貧血および胎児障害（低体重、低身長）などが挙げられるが、それらの毒性発現メカニズムはほとんど明らかにされていない。特に、カドミウムによる鉄欠乏性貧血および胎児障害の発症機構に関する知見は乏しく、鉄欠乏性貧血についてはカドミウムが鉄の体内貯蔵量を低下させるために誘発されることが国内外の研究グループによって報告されているもののその機構はほとんど検討されておらず、また、胎児障害についてはその機構を検討した例は皆無といえる。我々が日常摂取しているレベルのカドミウムの健康影響を評価する上でも鉄欠乏性貧血や胎児障害の発症機構に関する研究を推進する必要があるが、これまでは解明の糸口となる知見すらなかったために、研究の進展が立ち後れていたというのが現状である。

カドミウムの腸管吸収には、鉄の輸送体として知られる divalent metal transporter 1 (DMT1) が関与することが報告されている。したがって、カドミウムが DMT1 を介した腸管からの鉄吸収を競合的に阻害する可能性が考えられるが、この競合阻害作用については否定的な報告や矛盾する報告が多く、結論を得るに至っていない。一方、我々はごく最近、カドミウムが小腸の *DMT1* の遺伝子発現を顕著に抑制することをマウスを用いた検討により見いだした。これまでに *DMT1* の遺伝子発現に対するカドミウムの影響を検討した例はなく、本知見は視点を変えた研究によって得られた独創的な発見といえる。カドミウムが鉄の腸管吸収に関わる輸送体の遺伝子発現を抑制するという事実は、カドミウムによる体内鉄貯蔵量の低下機構に直接繋がるものであり、カドミウムが引き起こす鉄欠乏性貧血並びに胎児障害の発症機構解明の突破口になると思われる。

2. 研究の目的

微量カドミウムの長期摂取が引き起こす鉄欠乏性貧血や胎児障害の発症機構はほとんど解明されていない。我々は鉄の腸管吸収に関わる輸送体の遺伝子発現をカドミウムが顕著に低下させることを見いだした。これ

は、これまで不明であったカドミウムによる鉄欠乏性貧血の発症機構解明に直接繋がる画期的な発見と考えられる。さらに、カドミウムが腸管からの鉄の吸収や胎盤から胎児への鉄の移行を抑制することで、胎児の発育に影響を与える可能性も考えられる。そこで本研究では、カドミウムによる鉄輸送関連遺伝子の発現抑制と鉄欠乏性貧血および胎児障害との関係を詳細に検討することによって、微量カドミウムの長期摂取が引き起こす鉄欠乏性貧血や胎児障害の発症機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 母体小腸および胎盤中鉄輸送関連遺伝子の発現に及ぼすカドミウム妊娠期曝露の影響

C57BL/6J 妊娠マウスに、10 mg/kg のカドミウムを妊娠 1 日目から 18 日目まで 1 日 1 回連続強制経口投与し、妊娠 19 日目にエーテル麻酔下で心採血した後、母体の肝臓、腎臓、十二指腸、胎盤および胎仔を摘出した。胎仔については、体重および身長を測定した後、さらに肝臓を摘出した。

組織中鉄濃度を ICP-MS およびフレーム型原子吸光光度計を用いて測定した。母体十二指腸および胎盤の鉄輸送に関連した二価金属輸送体 *DMT1*、鉄還元酵素 *duodenal cytochrome b (DCYTB)*、鉄移出輸送体 *ferroportin 1 (FPN1)* 並びに鉄酸化酵素 *hephaestin (HEPH)* の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。

本研究におけるマウスの飼育および処置は「愛知学院大学薬学部動物実験指針」に従って十分な動物擁護の配慮下で実施した。

(2) カドミウムによるマウス小腸での鉄輸送関連遺伝子の発現変動

8 週齢の C57BL/6J マウスにカドミウム 50 mg/kg を単回経口投与して、3 時間後にエーテル過麻酔死下で十二指腸を摘出した。また、カドミウム投与 24 時間後にエーテル麻酔下で血液を採取した。

非ヘム鉄の輸送に関わる *DMT1*、*DCYTB*、*FPN1* および *HEPH*、並びにヘムの輸送体である *heme carrier protein 1 (HCP1)* の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。さらに、*DMT1* および *FPN1* のタンパク質量をウエスタンブロット法により測定した。

また、カドミウム投与 24 時間後の血清中鉄濃度を Fe C-テストワコーを用いて測定した。

本研究におけるマウスの飼育および処置は「愛知学院大学薬学部動物実験指針」に従って十分な動物擁護の配慮下で実施した。

(3) カドミウムによる培養ヒト小腸上皮細胞での鉄輸送関連遺伝子の発現変動

培養ヒト小腸上皮細胞モデルであるヒト結腸癌由来の Caco-2 細胞を増殖培地中でコンフルエントまで培養した後、21 日間培養を続けて Caco-2 細胞を小腸上皮細胞様に分化させた。その後、新鮮な 10% FBS 含有増殖培地中カドミウム (10 μ M) の存在下で 72 時間処理した。

細胞中 *DMT1*、*FPN1*、*DCYTB* および *HEPH* の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。さらに、*DMT1* および *FPN1* のタンパク質量をウエスタンブロット法で測定した。

4. 研究成果

(1) 母体小腸および胎盤中鉄輸送関連遺伝子の発現に及ぼすカドミウム妊娠期曝露の影響

カドミウム妊娠期曝露による胎仔障害 (低体重、低身長) や胎仔肝臓中鉄濃度と母体小腸および胎盤中鉄輸送関連遺伝子の発現量との関係を妊娠マウスを用いて検討した。

カドミウム投与群において、胎仔の体重および身長が有意に減少し、カドミウム妊娠期曝露による胎仔の発育阻害が観察された。母体血清、母体十二指腸、胎盤および胎仔肝臓中の鉄濃度はカドミウムの曝露によって有意に減少したが、母体肝臓および母体腎臓ではカドミウム曝露による鉄濃度の有意な変化は認められなかった。したがって、カドミウムの妊娠期曝露による胎仔の発育阻害において、胎仔の鉄欠乏と母体十二指腸からの鉄の吸収阻害が関与している可能性が示唆された。

そこで次に、カドミウム曝露による母体十二指腸の鉄輸送関連遺伝子の変動について検討したところ、カドミウム曝露群では *FPN1* mRNA および *DCYTB* mRNA 量の顕著な減少が認められた。また、*DMT1* mRNA 量もカドミウム曝露によってコントロールの約 50%まで減少していた。しかしながら、*HEPH* の mRNA 量は、カドミウム曝露による影響を受けなかった。胎盤においても同様の検討を行ったところ、カドミウム曝露群では *HEPH* mRNA 量の有意な減少と *DMT1* mRNA 量の有意な増加が認められた。また、*DCYTB* の mRNA 量はカドミウム曝露によってコントロールの約 50%まで減少した。*FPN1* の mRNA 量に有意な変化は認められなかった。

以上の結果より、カドミウムは妊娠期のマウスの十二指腸と胎盤において、鉄輸送関連遺伝子の発現に影響を及ぼすこと、およびそれらの遺伝子発現様式は母体十二指腸と胎盤で異なることが示された。すなわち、カドミウムは腸管からの鉄の吸収に関わる十二指腸上皮細胞の *FPN1*、*DCYTB* および *DMT1*

mRNA の発現を抑制することを通じて鉄の吸収を阻害し、母体並びに胎仔の鉄欠乏を引き起こす結果、胎仔の発育阻害に影響を及ぼす可能性が示唆された。また、カドミウム曝露により認められた胎盤における鉄輸送関連遺伝子の発現変動も鉄の胎仔移行に影響を及ぼす可能性が考えられた。

(2) カドミウムによるマウス小腸での鉄輸送関連遺伝子の発現変動

成熟マウスの十二指腸における鉄輸送関連遺伝子の発現や血清鉄濃度に及ぼすカドミウム単回経口投与の影響について検討した。

カドミウムを投与して 3 時間後のマウスの十二指腸における *DMT1*、*DCYTB*、*FPN1* および *HEPH* の mRNA 量は、いずれもコントロール群に比べて有意に低下した。さらに、十二指腸におけるヘムの輸送体である *HCP1* mRNA 量も非ヘム鉄輸送関連遺伝子と同様にカドミウム投与 3 時間後にコントロール群と比較して顕著に減少した。また、カドミウムを投与したマウスの十二指腸における *DMT1* および *FPN1* のタンパク質量は、いずれもコントロール群に比べて有意に低下した。

一方、カドミウム投与 24 時間後の血清中鉄濃度はコントロール群と比較して有意な減少が認められた。

以上の結果より、成熟マウスにおいて十二指腸中の非ヘム鉄およびヘムの輸送関連遺伝子の発現がカドミウムの経口曝露によって速やかに抑制されることが明らかとなった。したがって、カドミウムの経口曝露は十二指腸で鉄輸送関連遺伝子の発現を抑制することを通じて、消化管からの鉄吸収を阻害する可能性が示唆された。

(3) カドミウムによるヒト小腸上皮細胞での鉄輸送関連遺伝子の発現変動

ヒト小腸上皮細胞モデルである Caco-2 細胞における鉄輸送関連遺伝子の発現に及ぼすカドミウム曝露の影響について検討した。

カドミウム (10 μ M) 処理後の細胞層を観察したところ形態学的な傷害は認められなかった。カドミウム処理した Caco-2 細胞内の *DMT1*、*DCYTB*、*FPN1* および *HEPH* mRNA 量はいずれもコントロールに比べて有意に減少した。また、カドミウムが *DMT1* および *FPN1* タンパク質の発現も抑制することが示された。

以上の結果より、小腸上皮細胞モデルである Caco-2 細胞においても、マウス十二指腸と同様にカドミウムは *DMT1*、*DCYTB*、*FPN1* および *HEPH* の遺伝子発現を抑制することが示された。したがって、細胞レベルにおいてもカドミウムが鉄輸送関連遺伝子の発現抑制を引き起こすことを通じて、鉄輸送に影響を

及ぼす可能性が示唆された。

(4) まとめ

本研究結果より、経口摂取されたカドミウムは、小腸上皮細胞に直接的に作用し、鉄輸送関連遺伝子である *DMT1*、*FPN1*、*DCYTB*、*HEPH* および *HCP1* の発現を抑制し、それらの分子のタンパク質レベルを減少させることを通じて、消化管からの鉄吸収阻害を引き起こすメカニズムが考えられた。このような鉄輸送関連遺伝子の発現抑制を介した小腸での鉄吸収阻害作用は、カドミウム曝露によって引き起こされる鉄欠乏性貧血や胎児障害の発症にも深く関与することが示唆された。

本研究は、鉄輸送関連遺伝子に着目して実験動物（マウス）や培養細胞（ヒト小腸上皮細胞）を用いる点を特色としており、カドミウム毒性における鉄代謝異常の関与とその分子機構を解明することによって、これまで明らかにされていなかったカドミウムによる鉄欠乏性貧血および胎児障害の発症メカニズムの一部を国内外に先駆けて明らかにすることができた。

また、本研究で得られたカドミウム毒性発現メカニズムは、鉄欠乏性貧血や胎児障害以外のカドミウム慢性毒性にも関与している可能性があり、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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計0件）

〔学会発表〕（計7件）

- ① Masahiko Satoh, Suppression of iron transporter system in duodenum by cadmium, The 50th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 7 March, 2011, Washington Convention Center (Washington, D.C. USA).
- ② 坂野博紀、カドミウムによる小腸鉄輸送システムの阻害作用、フォーラム2010 衛生薬学・環境トキシコロジー、2010年9月10日、星薬科大学（東京都）。
- ③ 坂野博紀、カドミウムによるマウス小腸の鉄輸送関連遺伝子の発現抑制、第37回日本トキシコロジー学会学術年会、2010年6月16日、沖縄コンベンションセンター（沖縄県）。
- ④ 坂野博紀、Caco-2細胞におけるカドミウムによる鉄輸送関連遺伝子の発現抑制、第80回日本衛生学会学術総会、2010年5月11日、仙台国際センター（仙台市）。
- ⑤ 藤原泰之、カドミウム経口曝露による小腸鉄輸送関連遺伝子の発現抑制、第80回日本衛生学会学術総会、2010年5月11日、

仙台国際センター（仙台市）

- ⑥ 藤原泰之、小腸鉄輸送関連遺伝子の発現に対するカドミウム経口曝露の影響、日本薬学会第130年会、2010年3月30日、岡山大学（岡山市）。
- ⑦ 藤原泰之、カドミウム妊娠期曝露による鉄輸送システムの攪乱、第79回日本衛生学会学術総会、2009年3月30日、北里大学（東京都）。

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

藤原 泰之 (FUJIWARA YASUYUKI)

愛知学院大学・薬学部・准教授

研究者番号：40247482

長谷川 達也 (HASEGAWA TATSUYA)

山梨県環境科学研究所・環境健康研究部・

主任研究員

研究者番号：90208489