

平成23年 5月31日現在

機関番号： 82401
 研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2009～2010
 課題番号： 21790560
 研究課題名(和文)
 カドミウム誘導性発癌における、マトリックスメタロプロテアーゼの役割の解明
 研究課題名(英文) The role of matrix metalloproteinase in cadmium-induced cancer

研究代表者
 西躰 元 (NISHITAI GEN)
 独立行政法人理化学研究所・自然免疫研究チーム・研究員
 研究者番号： 60509941

研究成果の概要(和文)： カドミウムによる発癌の分子メカニズムについては不明な点が多い。我々は、MAP キナーゼファミリーの一つである JNK シグナルを欠失させたマウス胚性幹細胞にカドミウム曝露をすることにより、JNK シグナル依存的に MMP9、MMP13 mRNA の発現上昇が起こることを見出した。MMP は癌の転移および血管新生において重要な役割を果たすと考えられており、カドミウムが発癌を促進する遺伝子発現に関与する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)： Cadmium has been classified as a human carcinogen by the International Agency for Research on Cancer. However, the molecular link between cadmium exposure and carcinogenesis is unclear. In this study, we found that matrix metalloproteinase (MMP) 9 and MMP13 were accumulated in mouse embryonic stem (ES) cells treated with CdCl₂. MMPs contribute to many steps in the carcinogenic process, including angiogenesis and metastasis. Cadmium-induced MMP9 and MMP13 expression was abolished in ES cells deficient in the activation of JNK, a member of the mitogen-activated protein kinases, suggesting that cadmium-induced MMP expression is mediated by JNK signaling pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：衛生、癌、細胞・組織、シグナル伝達、免疫学

1. 研究開始当初の背景

カドミウムは、その非腐食性のために電気メッキや塗料など様々な用途に用いられる

ため、職業性曝露が問題になっている。また生活環境においても、カドミウムに汚染された飲料水や食物の摂取などにより、カドミウムに曝露され

うる。体内に摂取されたカドミウムは、腎臓と肝臓に蓄積し、腎障害、骨軟化症などの様々な慢性毒性を示し深刻な健康障害をもたらす。また、カドミウムは長期の職業性曝露により肺癌および前立腺癌を引き起こすことが強く示唆されており、IARCにおいてGroup 1の発癌物質に指定されている。このように疫学的、病理学的知見があるにもかかわらず、カドミウムがこれらの機能障害を引き起こす細胞内分子メカニズムについては未解明な部分が多く残されている。我々は、カドミウムによる毒性および発癌の細胞内分子メカニズムを解明するため、カドミウムを含む様々な環境ストレスによって活性化され、且つ発癌に関与する細胞内シグナル伝達分子である mitogen-activated protein kinase (MAPK) ファミリーの遺伝子を欠失したマウス胚性幹 (ES) 細胞を初めて作製し、この細胞を用いて解析を行ってきた (*J Biol Chem* 279: 1621-1626, 2004, *J Cellular Biochem* 104: 1771-1780, 2008)。その結果、癌の転移および血管新生において、細胞の接着に重要な役割を果たすと考えられているマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 遺伝子ファミリーが、MAPK ファミリー遺伝子を欠失した ES 細胞において著しく低下していることを見出した。高濃度(10 μ M)のカドミウムを ES 細胞に曝露すると、野生型の細胞は曝露後4時間で急速に培養ディッシュへの接着能を失い剥離するのに対し、欠失 ES 細胞では6時間以上接着が維持されていることから、カドミウムがMMPを異常に活性化し、接着能に影響を与える可能性が強く示唆された。

2. 研究の目的

環境汚染金属であるカドミウムは体内に蓄積し、肺および前立腺に癌を引き起こすことが報告されているが、その発癌の分子メカニズムについてはほとんど明らかになっていない。我々は、カドミウムを曝露したマウス胚性幹 (ES) 細胞において、癌形成時の細胞接着に関与するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の活性化が原因と考えられる細胞接着の変化を見出した。本研究においては、カドミウムがMMPの活性化を引き起こす分子メカニズムを明らかにすると共に、このMMPの活性化が発癌において必須であるかどうかを、*in vivo* 腫瘍形成モデルを用いて解明することを目的とした。以上を踏まえ、具体的には次の2項目を目的として研究を行った。

(1) 遺伝子欠損 ES 細胞を用いて、カドミウム曝露からMMP異常活性化に至る細胞内分子メカニズムを解明する。

(2) マウスの *in vivo* 腫瘍形成モデルを用い、腫瘍におけるMMP産生細胞に対するカドミウムの影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ES細胞におけるカドミウム応答性MMP発現の検討

野生型およびJNKの活性化因子であるSEK1、MKK7両方を同時に欠失し、JNKシグナルを完全に遮断したES細胞に1 μ Mのカドミウムを曝露し、6時間後のRNAを回収した。このRNAより逆転写酵素を用いてcDNAを作製した。次にこのcDNAを鋳型として各種MMP、MMP阻害因子であるTIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase)、およびMMPと近縁のADAM (a disintegrin and metalloproteinase) 遺伝子の配列特異的なプライマーを用い、定量的PCR法により発現を調べた。プライマーの種類と配列は表1に示した。

表1 定量PCRに用いたプライマー配列

Gene Symbol	Primer Sequence
Mmp1a	AACTACATTTAGGGGAGAGGTGT
	GCAGCGTCAAGTTAACTGGAA
Mmp1b	GCTCATGCTTTTCTGCCAGG
	TAGAATGGGAGAGTCCAAGGG
Mmp2	CAAGTTCGCCGGCGATGTC
	TTCTGGTCAAGGTCACCTGTC
Mmp3	AGTGGATCTTCGCAGTTGGAA
	ATTAAACCAGCTATTGCTCTTCAATATG
Mmp7	CTGCCACTGTCCCAGGAAG
	GGGAGAGTTTTCCAGTCATGG
Mmp8	TGCCACGATGGTTGCAGAG
	GGCATTTCATAATCCCCATTGT
Mmp9	CTGGACAGCCAGACACTAAAG
	CTCGCGCAAGTCTTCAGAG
Mmp10	GAGCCACTAGCCATCCTGG
	CTGAGCAAGATCCATGCTTGG
Mmp11	CCGGAGAGTCACCGTCATC
	GCAGGACTAGGGACCCAATG
Mmp12	GAGTCCAGCCACCAACATTAC
	GCGAAGTGGGTCAAAGACAG
Mmp13	GGGCTCTGAATGGTTATGACATTC
	AGCGCTCAGTCTCTCACCTCTT
Mmp14	CAGTATGGCTACCTACCTCCAG
	GCCTTGCTGTCACTTGTAATA
Mmp15	CCGCTGCTACTGGTCTTC
	CATCCACGTTTTTCGTCTTTCAT
Mmp16	TTACTCGCATTAGCTCTGGA
	CCGCAGACTGTAGCACATAAAA

Mmp17	CCACCCCAACCAATGGAG
	TGAGGGCTAGTACATGAGTG
Mmp19	CTGTGGCTGGCATTCTACTT
	GGGCAGTCCAGATGCTTCC
Mmp20	GGCGAGATGGTGGCAAGAG
	CTGGGAAGAGGCGGTAGTT
Mmp21	CCTAGCCCAAAGGAGTCAGC
	AGGTGAGTCCAATCCCCACT
Mmp23	AGGGCAGCTCAGGAAATGTA
	GTATGTGAGGTGAAGTGGTCC
Mmp24	GCATCTGCGTTGCATTCTGG
	CACTCGATTGTGTCTGATCCA
MMP27	AGGATAATAAAGTCTCCAGGA
	AAGAAATAGAGGAATCCATTATGTTGG
Mmp28 isoform 1	TGCCATCACTGTAGGGAGTTA
	CCTGGAACCTCCAACAACGA
Mmp28 isoform 2	AACCAGAGGTCTAAATACTGCC
	GGACGAGGCTCTACAGTGATG
Timp1	CATGGAAGCCTCTGTGGATATG
	AAGCTGCAGGCACTGATGTG
Timp2	TCAGAGCCAAAGCAGTGAGC
	GCCGTGTAGATAAACTCGATGTC
Timp3	TCCTAGACCCAGTTCATATACACTTC
	TTGGACTTCTGCCAACTTCCTT
Timp4	TGTGGCTGCCAAATCACCA
	TCATGCAGACATAGTGCTGGG
Adam8	AGTTCCTGTTTATGCCCAAAG
	AAAGGTTGGCTTGACCTGCT
Adam9	GGAAGGCTCCCTACTCTCTGA
	TCCAAAAGTGGCATTCTCCAAA
Adam10	ATGGTGTGGCCGACAGTGTTA
	GTTTGGCAGCTGGTGTTTTT
Adam12	TGGGACCAGAGAGGAGCTTAC
	GTTGCACAGTCAGCACGTCT
Adam15	CCTCGTACTACTTGGTGCCAG
	GCCCCTGAGACTTAGTGCC
Adam17	AGGACGTAATTGAGCGATTTGG
	TGTTATCTGCCAGAACTTCCC
Adam19	TCAGTGGCGGACTTCAGAAAAG
	GCAAAAAGGTGCTCGTCTTC
Adam23	AGGCCAGACCAACAGAAAC
	CCATTGTTCAAGTGTGAGGTCAAG
Adam28	AGGATGCCAAGCTACACAATC
	GACTTTTGCATTTGGGTCCAAG
Adam33	TCAGAATGCTACCTCCCAGGA
	AAACCCACCGTTATGGCAG
18S rRNA	CGGACAGGATTGACAGATTG
	CAAATCGCTCCACCAACTAA

(2) マウスの *in vivo* 腫瘍形成モデルを用い

た、腫瘍におけるMMP産生細胞の単離とカドミウム応答性の検討

①腫瘍随伴マクロファージの単離

腫瘍におけるMMP産生細胞に対するカドミウムの影響を明らかにするため、既存のマウス腫瘍形成モデルを用いて腫瘍を形成させ、腫瘍よりMMP産生細胞を単離した。B16メラノーマ細胞をマウスの皮下に接種し、腫瘍を形成させた。接種後8日目の腫瘍を切除し、コラゲナーゼ処理にすることにより単細胞懸濁液を作製した。次に腫瘍における主なMMP産生細胞であるマクロファージの単離を行った。マクロファージの表面マーカーであるCD11bの抗体を固定化した磁気ビーズを用いて、単細胞懸濁液より腫瘍随伴マクロファージを単離した。

②腫瘍随伴マクロファージのカドミウム応答性MMP発現の検討

単離した腫瘍随伴マクロファージを培養皿に撒いた後、10 μ Mのカドミウムを曝露し、24時間後RNAを回収した。このRNAより逆転写酵素を用いてcDNAを作製した。次に腫瘍における発現が報告されているMMP2、3、7、8、9、10、13、14、19、21、28について定量PCR法により発現量を調べた

③チオグリコレート誘導腹腔マクロファージの単離

マクロファージのカドミウム応答性MMP発現に、組織特異性が見られるかを検討するため、チオグリコレート誘導型マクロファージの単離を行った。マウス腹腔に3% (w/v) チオグリコレート溶液を2 ml投与し、4日後腹腔内をメディウムを用いて還流し、腹腔内に誘導されたマクロファージを含む腹腔液を回収した。得られた細胞懸濁液を培養皿に撒き、2時間培養した後、培養上清を除き、一度メディウムで培養皿を洗うことにより、接着している腹腔マクロファージを単離した。

④チオグリコレート誘導腹腔マクロファージのカドミウム応答性MMP発現の検討

単離した腹腔マクロファージに対して、10 μ Mのカドミウムを曝露し、24時間後RNAを回収した。このRNAより逆転写酵素を用いてcDNAを作製した。次に腫瘍随伴マクロファージで調べたMMP2、3、7、8、9、10、13、14、19、21、28について定量PCR法により発現量を調べた

4. 研究成果

(1) ES細胞におけるカドミウム応答性MMP発現

ES細胞におけるカドミウム応答性のMMP、TIMP、ADAM発現を検討した結果、野生型においてMMP9、MMP13 mRNAの発現が各々30倍程度上昇することを

見出した。次にカドミウム曝露による MMP 発現における細胞内シグナル伝達メカニズムを解明するため、ERK、JNK、p38 の 3 つの主要なサブファミリーからなる MAPK の関与について、ノックアウト法を用いて検討した。JNK の活性化因子である SEK1、MKK7 両方を同時に欠失し、JNK シグナルを完全に遮断した ES 細胞にカドミウムを曝露したところ、MMP9、MMP13 両遺伝子の発現誘導が著しく抑えられることを見出した。よって両遺伝子の発現誘導において JNK シグナルが重要な役割を果たすことが考えられた。

(2) マウスの *in vivo* 腫瘍形成モデルを用いた、腫瘍随伴マクロファージの単離とカドミウム応答性の検討

腫瘍形成時、腫瘍と共に存在するマクロファージが MMP を産生し、血管新生や転移を促進することで腫瘍細胞の増殖を助ける可能性が近年報告されている。そこで B16 メラノーマ細胞の接種による腫瘍形成モデルを用いてマウスに腫瘍を形成させ、切除した腫瘍より CD11b マイクロビーズを用いて腫瘍マクロファージを単離した。単離した腫瘍マクロファージに対して 10 μ M のカドミウムを曝露し、24 時間後 RNA を回収し定量 PCR により MMP 発現を調べた。腫瘍における発現が報告されている MMP2、3、7、8、9、10、13、14、19、21、28 を調べた結果、MMP8、9、13、14、19 の定常状態における発現が見られたものの、カドミウムによる発現上昇は見られなかった。一方でチオグリコレート誘導腹腔マクロファージに対して 1 μ M、10 μ M のカドミウムを曝露し、上記 MMP の発現を調べたところ、MMP8、9、13、14 の定常状態における発現に加え、MMP19 のカドミウム濃度に応じた発現上昇が認められた。以上より、マクロファージのカドミウム応答性 MMP 発現には組織特異性があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Nabeyama A, Kurita A, Asano K, Miyake Y, Yasuda T, Miura I, Nishitai G, Arakawa S, Shimizu S, Wakana S, Yoshida H, Tanaka M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **107**(14):6436-6441 2010 査読有
- ② Ridley W, Nishitai G, Matsuoka M. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **29**(3):260-265 2010 査読有
- ③ Karube H, Nishitai G, Inageda K, Kurosu H, Matsuoka M. *J Dent. Res.* **88**(5):461-465 2009 査読有

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
西躰 元 (NISHITAI GEN)
独立行政法人理化学研究所・自然免疫研究チーム・研究員
60509941
- (2) 研究分担者
- (3) 連携研究者