

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 21 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390034

研究課題名(和文) 亜鉛輸送体の発現調節による内皮細胞機能制御とその異常に基づく重金属の毒性発現

研究課題名(英文) Regulation of vascular endothelial cell functions and exhibition of heavy metal toxicity through zinc transporter expression

研究代表者

鍛冶 利幸 (Kaji, Toshiyuki)

東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：90204388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞は血液と直に接している唯一のcell typeである。カドミウムの器官毒性が血管内皮細胞に対する毒性に依存する場合は報告されているが、その詳細は不明である。本研究は、カドミウムの細胞毒性を修飾する炎症性サイトカインTGF- $\beta$ がALK5/Smad2/3/p38 MAPKシグナル経路を介して内皮細胞の亜鉛輸送体ZIP8の発現を誘導すること、およびカドミウムと亜鉛の相互作用にメタロチオネイン誘導だけでなくZIP8の発現レベルが重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Vascular endothelial cells are the only cell type that directly contact with blood. It was reported that organ toxicity of cadmium possibly depends on the toxicity of the metal to vascular endothelial cells; however, the mechanisms have been unclear. In the present study, we found that TGF- $\beta$ , an inflammatory cytokine that can influence the cytotoxicity of cadmium to vascular endothelial cells, induces the expression of a zinc transporter ZIP8 in vascular endothelial cells. In addition, it was revealed that the expression level of ZIP8 as well as metallothionein induction is important for interaction of zinc with cadmium in the cells.

研究分野：環境健康学，毒性学，バイオオルガノメタリクス

キーワード：金属輸送体 血管内皮細胞 亜鉛 カドミウム 細胞毒性

## 1. 研究開始当初の背景

血管内皮細胞は、血管内腔を一層に覆い血液と直接接している唯一の cell type である。血管は複数の cell type によって構成されているが、血管に共通して存在しているのは内皮細胞だけである。また、血管はあらゆる組織に存在しており、内皮細胞は血液と直に接している cell type として血液凝固・線溶系の調節、血管のトーンスの調節、物質の透過性の調節などに重要に関与している。

申請者は重金属の毒性について研究を行ってきた。その過程で、申請者は、それまで肝毒性、腎毒性、神経毒性など、器官別に理解されてきた重金属の毒性に「血管毒性」という新しい視点を提起した。なぜなら、重金属は内皮細胞を経ることなく器官実質細胞に到達することはできず、そのため血管内皮細胞の傷害や機能異常が器官毒性の発現に重要な影響を与え、さらにその毒性発現のメカニズムを担っている可能性があるからである。その後、重金属の血管毒性は一般的な概念となり、申請者らの研究はその中で重要に貢献している。

重金属の毒性研究の発展において、亜鉛輸送体の発見はきわめて重要なものの1つである。亜鉛輸送体は、ATP を利用しない二次性能動輸送型の Solute carrier transporter 群 (SLC ファミリー) に分類され、細胞外・細胞内小器官から細胞質の向きに亜鉛を輸送する ZIP (Zrt-, Irt-like protein) と細胞外・細胞内小器官内の向きに亜鉛を輸送する ZnT (Zn transporter) に大別される。哺乳動物では、ZIP が 14 種類、ZnT が 9 種類存在することが知られているが、内皮細胞のような極性を持つ細胞では、ZIP4、ZIP8、ZIP14 が頂端側 apical に、ZIP5 は基底側 basolateral に発現しているとされる。

亜鉛輸送体は、細胞内亜鉛のホメオスタシスに関わるだけでなく、重金属の毒性発現にも関与する。例えば、カドミウムの精巣毒性に感受性の高いマウスの系統の精巣では、ZIP8 が高く発現している。これは、カドミウムが ZIP8 を通じて内皮細胞に取り込まれ、内皮細胞がまず傷害され、次いで実質細胞が傷害されるというメカニズムを示唆している。このように、内皮細胞における亜鉛輸送体の生理的機能の解明と、その発現調節の異常に基づく重金属の毒性発現の解明が今、強く求められている。

## 2. 研究の目的

上記の研究背景をもとに、本研究は血管内皮細胞に対する重金属毒性の発現およびその毒性に対する感受性に関わる亜鉛輸送体の発現について、以下の観点から解明を行うことを目的とした。

(1) 細胞増殖因子/サイトカインによる亜鉛輸送体の発現調節を分子種レベルで解明する。

(2) 重金属による亜鉛輸送体の発現異常を

分子種レベルで明らかにすることによって、重金属、特にカドミウムの毒性発現に關与する亜鉛輸送体分子種を明らかにする。

(3) 重金属相互作用における亜鉛輸送体の関与を明らかにする。

## 3. 研究の方法

ウシ大動脈由来血管内皮細胞または血管平滑筋細胞をコンフルエントまで培養したものを dense culture,  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種し 24 時間培養したものを sparse culture とした。TGF- $\beta_1$ 、抗 TGF- $\beta_1$  中和抗体、その両方を処理した細胞の total RNA を抽出し、亜鉛輸送体 (ZIP1~14, ZnT1 および DMT1) の mRNA 発現を real-time RT-PCR 法によって検討した。リポフェクション法によって ALK1, ALK5, Smad2, Smad3 の siRNA を導入、もしくは LY364947 (ALK5 阻害剤), PD98059 (ERK 阻害剤), SB203580 (p38 MAPK 阻害剤), SP600125 (JNK 阻害剤) を前処理し、その後 TGF- $\beta_1$  を処理した細胞の ZIP8 mRNA 発現を real-time RT-PCR 法にて検討した。ZIP8 タンパク質の発現, Smad2/3 および MAPK シグナルの活性化は、ウエスタンブロット法により検出した。

別に、ウシ大動脈由来内皮細胞をカドミウム (5 or 10  $\mu$ M) と亜鉛 (5, 10, 30, 50 or 100  $\mu$ M) で同時処理し、形態学的観察およびアラマールブルーアッセイにより細胞傷害性を評価した。カドミウムおよび亜鉛の細胞内蓄積量は、細胞を EDTA 含有酢酸緩衝溶液で抽出し、ICP-MS によって定量した。MT および ZIP8 のタンパク質発現をウエスタンブロット法で、ZIP ファミリータンパク質の mRNA 発現を real-time RT-PCR 法にて検討した。干渉 RNA 法により ZIP8, MTF-1 および Nrf2 の発現を抑制した。転写因子 MTF-1 結合領域 MRE および転写因子 Nrf2 結合領域 ARE の転写活性化は、Dual-Luciferase Reporter Assay により評価した。

## 4. 研究成果

### (1) TGF- $\beta_1$ による ZIP8 発現の調節

#### 血管内皮細胞

サイトカイン/細胞増殖因子による亜鉛輸送体発現の調節をスクリーニングした結果、カドミウムの内皮細胞毒性を修飾することが知られている TGF- $\beta_1$  が内皮細胞の ZIP8 の発現を誘導することが示された。そこで以下の詳細な検討を行った。

Dense culture および sparse culture において、TGF- $\beta_1$  処理により ZIP8 mRNA の誘導が顕著に上昇した。TGF- $\beta_1$  による ZIP8 mRNA の誘導は濃度依存的であり、そのような変化は抗 TGF- $\beta$  中和抗体によって減弱した。TGF- $\beta_1$  による亜鉛輸送体の誘導は、検討した他の ZIP および ZnT1 では観察されず、ZIP8 mRNA の誘導が最も顕著であった。

内皮細胞において TGF- $\beta_1$  シグナルは、細胞膜上に存在する ALK1 および ALK5 を介して、

下流のシグナルを活性化させる。そこで、各受容体の siRNA を用いた発現抑制により、ZIP8 mRNA の誘導に関わる受容体を検討したところ、ALK5 の発現抑制により TGF- $\beta_1$  による ZIP8 mRNA の誘導が抑制されたのに対し、ALK1 の発現抑制では、ほとんど変化が見られなかった。また、ALK5 に特異的な阻害剤である LY364947 を処理した場合も同様に ZIP8 mRNA の誘導が抑制されたことから、内皮細胞における TGF- $\beta_1$  シグナルは ALK5 を介して下流シグナルを活性化させることが示唆された。ALK5 の下流シグナル分子である Smad2/3 のリン酸化を検討したところ、TGF- $\beta_1$  の濃度依存的な Smad2/3 の活性化が見られ、Smad2 siRNA および Smad3 siRNA により ZIP8 mRNA の誘導が抑制された。

さらに、ZIP8 の発現誘導に対する MAPK 経路の関与を検討した。TGF- $\beta_1$  により、ERK1/2、p38 MAPK、JNK のリン酸化が認められた。そこで、これらのシグナル経路が ZIP8 の誘導に関与する可能性を検討した。その結果、p38 MAPK 阻害剤 SB203580 を処理したとき、TGF- $\beta_1$  による ZIP8 mRNA の発現上昇が抑制されたのに対し、ERK 阻害剤 PD98059 と JNK 阻害剤 SP600125 を処理ではほとんど変化が見られなかった。

これらの結果より、ALK5/Smad2/3 経路と p38 MAPK が関与していることが示唆されたことから、ALK5/Smad2/3 が p38 MAPK に与える影響について検討した。ALK5 阻害剤 LY364947 の処理、および Smad3 のノックダウンにより p38 のリン酸化は顕著に抑制されたが、Smad2 のノックダウンは p38 MAPK のリン酸化への影響は小さかった。また、p38 MAPK 阻害剤 SB203580 は、Smad2/3 のリン酸化に影響を及ぼさなかった。

以上の結果から、内皮細胞において、TGF- $\beta_1$  は ALK5/Smad2/3/p38 MAPK シグナル経路の活性化を介して特異的に ZIP8 の発現を上昇させることが明らかとなった (図 1)。ZIP8 は細胞膜に存在し細胞外から細胞質内に亜鉛を輸送するので、本研究の結果は、TGF- $\beta_1$  が血管内皮細胞内の亜鉛濃度を高める方向に ZIP8 の発現を上昇させていることを示唆しており、TGF- $\beta_1$  による内皮細胞の機能調節に ZIP8 とその発現上昇による細胞内亜鉛の増加が関与していることが示唆される。

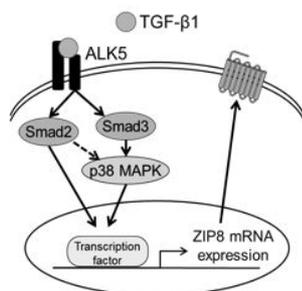


図 1. TGF- $\beta_1$  による血管内皮細胞 ZIP8 発現の誘導機構

#### 血管平滑筋細胞

次に血管平滑筋細胞について、同様の検討を行った。

Dense culture の血管平滑筋細胞において、TGF- $\beta_1$  により、ZIP8 タンパク質の発現が顕著に抑制された。さらに、TGF- $\beta_1$  濃度および時間依存的に ZIP8 mRNA の発現は抑制され、その ZIP8 mRNA の発現抑制は、TGF- $\beta$  中和抗体により消失した。TGF- $\beta_1$  と他のサイトカインおよび細胞増殖因子を比較し、TGF- $\beta_1$  が顕著に ZIP8 mRNA の発現を抑制した。また、Sparse culture の細胞においては、以上のような TGF- $\beta_1$  による ZIP8 mRNA の発現抑制は認められず、ZIP8 mRNA の顕著な変動は認められなかった。TGF- $\beta_1$  によるその他の亜鉛輸送体の発現変動は、平滑筋細胞で発現している ZIP ファミリー (ZIP4、8 および 10) の中で、TGF- $\beta_1$  による ZIP8 mRNA の発現抑制が最も顕著に検出された。

TGF- $\beta_1$  による ZIP8 発現抑制に関する細胞内シグナル伝達経路を検討するため、まず、ALK5/Smad2/3 経路を検討した。TGF- $\beta_1$  による ZIP8 発現抑制に対する ALK5 の関与を検討した。ALK5 siRNA を導入した細胞では、TGF- $\beta_1$  による ZIP8 mRNA の発現抑制が顕著に消失した。さらに、TGF- $\beta_1$  により ALK5 の下流に存在する Smad2/3 が活性化したが、細胞に Smad2 siRNA および Smad3 siRNA を導入したところ、Smad2 の発現を抑制した細胞でのみ、TGF- $\beta_1$  による ZIP8 mRNA 発現抑制の顕著な消失が認められた。次に、TGF- $\beta_1$  による ZIP8 mRNA の発現抑制に対する MAPK 経路の関与を検討した。TGF- $\beta_1$  により ERK1/2、p38 MAPK および JNK の活性化が認められたが、各 MAPK 阻害剤を処理しても TGF- $\beta_1$  による ZIP8 mRNA の発現が抑制され、各 MAPK 阻害剤の影響は認められなかった。

これらの結果から、血管平滑筋細胞において、TGF- $\beta_1$  による ZIP8 発現抑制は、ALK5/Smad2 シグナル伝達経路を介することが示唆された。Smad2 は活性化されたのち、Smad4 と複合体を形成することで、核内に移行し転写因子として機能する。このことから、TGF- $\beta_1$  による ZIP8 発現抑制に、Smad4 が関与するかを検討した。Smad2 のみを発現抑制、Smad4 のみを発現抑制、Smad2 と Smad4 を同時に発現抑制した細胞の全てで、TGF- $\beta_1$  による ZIP8 の発現抑制が顕著に消失した。

以上の結果より、血管平滑筋細胞において、TGF- $\beta_1$  による ZIP8 の発現抑制は、ALK5/Smad2 経路により制御されていることが明らかとなった。加えて、Smad4 と協調することで ZIP8 の発現が調節されることが示された (図 2)。また、TGF- $\beta_1$  による Smad2/4 経路に介在される ZIP8 の発現抑制メカニズムの仮説として、Smad2 および Smad4 が TGF- $\beta_1$  の機能を負に制御する配列 (TGF- $\beta$  inhibitory element) に結合すること、Smad2 および Smad4 が co-repressor と協調して転写

を負に制御すること、および Smad2 と co-activator との複合体形成を Smad4 が抑制することが示唆される。

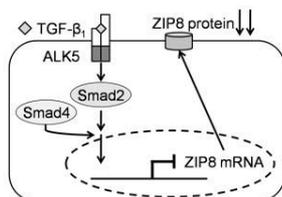


図 2 . TGF- $\beta_1$  による血管内皮細胞 ZIP8 発現の抑制機構

(2) 血管内皮細胞に対するカドミウムと亜鉛の相互作用における ZIP8 の役割

カドミウムの細胞毒性に対して必須微量元素である亜鉛が防御作用を示すことが広く知られているが、その防御機構は亜鉛によって誘導されたメタロチオネン (MT) にカドミウムが捕捉され無毒化された結果であることが定説となってきた。しかしながら、内皮細胞においては亜鉛の MT の誘導能は極めて低い。我々は亜鉛がカドミウムの細胞内蓄積量を減少させる“希釈効果”を示した (Kaji, *Yakugaku Zasshi*, 124: 113-120, 2004) が、そのメカニズムは不明であった。

カドミウムによる内皮細胞毒性は、亜鉛の処理濃度依存的に減弱した。また、カドミウムと亜鉛を同時処理した細胞は、亜鉛処理濃度依存的に細胞内の亜鉛蓄積量が増加するのに伴い、カドミウムの蓄積量は有意に抑制された。このとき、カドミウム曝露により発現が上昇した金属輸送体 ZIP8 は、亜鉛によって抑制された。また、ZIP8 の発現を抑制した細胞において、カドミウムの細胞内蓄積量が減少したことから、ZIP8 がカドミウムの細胞内輸送に関与していることが示された。これらの結果から、カドミウムの内皮細胞毒性に対する亜鉛の防御機構は、カドミウムによる ZIP8 の発現誘導が抑制され、細胞内のカドミウム蓄積量が減少したことによると考えられる。

次に、亜鉛の防御作用における MT の関与を検討した。MT はカドミウムにより誘導されるが、低濃度 (10  $\mu$ M 以下) の亜鉛はカドミウムによる MT の発現を抑制した。一方、高濃度の亜鉛 (30  $\mu$ M 以上) は、カドミウムによる MT の誘導を増強した。MTF-1 siRNA を導入した細胞における亜鉛の作用を検討したところ、MT の発現が抑制されたにも関わらず、亜鉛による防御作用が認められた。従って、カドミウムによる内皮細胞毒性に対する高濃度亜鉛の防御作用には MT の誘導が関与するが、低濃度亜鉛の防御作用は MT に依存しないことが推察される。

MTF-1 siRNA を導入した細胞において、カドミウムと亜鉛の同時処理による MT の誘導は顕著に抑制された。MRE の転写活性化はカドミウムの曝露により増強し、低濃度・高濃度に限らず亜鉛処理による変化は認められ

なかった。一方、Nrf2 siRNA を導入した細胞では、カドミウム単独処理による MT の誘導は顕著に抑制されたが、亜鉛との同時処理では亜鉛の濃度が低い場合には抑制され、高い場合には抑制されなかった。ARE の転写活性化は、カドミウムの曝露により増強したが、高濃度の亜鉛により低下した。

MT には 4 つのアイソフォームが存在するが、その中で重金属の毒性軽減には MT-1 と MT-2 が重要であるとされる。MT-1 にはサブアイソフォームが存在するが、本研究で用いた内皮細胞は MT-1A と MT-1E を発現している。我々は内皮細胞における MT アイソフォームの誘導機構として、MT-1A/1E の誘導には、MTF-1/MRE 経路と Nrf2/ARE 経路の両経路の活性化が関与するのに対し、MT2 は Nrf2/ARE 経路に依存せず、MTF-1/MRE 経路を介して誘導されることを見出している。このことから、カドミウムと高濃度亜鉛の相互作用の結果として誘導される MT アイソフォームは主として MT2 である可能性が示唆された。

本研究は、血管内皮細胞に対するカドミウムと亜鉛の相互作用は、1) 亜鉛による ZIP8 の発現抑制が、細胞内におけるカドミウムの希釈効果に関与していること、2) 亜鉛によるカドミウムの内皮細胞毒性の防御作用は亜鉛の濃度に依存し、低濃度亜鉛では ZIP8 の発現抑制によるカドミウムの取り込み抑制が重要であり、一方、高濃度亜鉛では ZIP8 の発現抑制に起因する細胞内カドミウムの蓄積量減少だけでなく、MT の誘導が関与していること、3) カドミウムと高濃度亜鉛との相互作用では主として MTF-1/MRE 経路を介した MT-2 の誘導が関与していることを示唆していた。本研究により、血管内皮細胞に対するカドミウムと亜鉛の相互作用において、従来の定説であった MT による防御機構の詳細が明らかとなっただけでなく、希釈効果に ZIP8 の発現に対するカドミウムと亜鉛の相互作用が関与することが明らかとなった。

本研究は、血管内皮細胞の亜鉛輸送体のうち、特に ZIP8 が TGF- $\beta_1$  による発現制御を受けること、およびカドミウムと亜鉛の相互作用に重要に関与すること、を明らかにした。

## 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 20 件)

Fujiwara Y, Yamamoto C, Yoshida E, Kumagai Y, Kaji T. (2016) Heparan sulfate chains potentiate cadmium cytotoxicity in cultured vascular endothelial cells. *Arch. Toxicol.*, **90**: 259-267. DOI: 10.1007/s00204-014-1420-6.

Hara T, Matsuzaki H, Nakamura T, Yoshida E, Ohkubo T, Maruyama H, Yamamoto C, Saito S,

- Kaji T. (2016) Cytotoxicity of zinc, copper and rhodium complexes with 1,10-phenanthroline or 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline in cultured vascular endothelial cells. *Fundam. Toxicol. Sci.*, **3**: 109-113. DOI: <http://doi.org/10.2131/fts.3.109>.
- Fujie T, Murakami M, Yoshida E, Tachinami T, Shinkai Y, Fujiwara Y, Yamamoto C, Kumagai Y, Naka H, Kaji T. (2016) Copper diethyldithiocarbamate as an activator of Nrf2 in cultured vascular endothelial cells. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **21**: 263-273. DOI: 10.1007/s00775-016-1337-z.
- Fujie T, Segawa Y, Yoshida E, Kimura T, Fujiwara Y, Yamamoto C, Satoh M, Naka H, Kaji T. (2016) Induction of metallothionein isoforms by copper diethyldithiocarbamate in cultured vascular endothelial cells. *J. Toxicol. Sci.*, **41**: 225-232. DOI: 10.2131/jts.41.225.
- Fujie T, Segawa Y, Uehara A, Nakamura T, Kimura T, Yoshida E, Yamamoto C, Uchiyama M, Naka H, Kaji T. (2016) Zinc diethyldithiocarbamate as an inducer of metallothionein in cultured vascular endothelial cells. *J. Toxicol. Sci.*, **41**, 217-224. DOI: 10.2131/jts.41.217.
- Shinkai Y, Kimura T, Itagaki A, Yamamoto C, Taguchi K, Yamamoto M, Kumagai Y, Kaji T. (2016) Partial contribution of the Keap1-Nrf2 system to cadmium-mediated metallothionein expression in vascular endothelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **295**: 37-46. DOI: 10.1016/j.taap.2016.01.020.
- Katsura M, Cyou-Nakamine H, Zen Q, Zen Y, Nansai H, Amagasa S, Kanki Y, Inoue T, Kaneki K, Taguchi A, Kobayashi M, Kaji T., Kodama T, Miyagawa K, Wada Y, Akimitsu N, Sone H. (2016) Effects of chronic low-dose radiation on human neural progenitor cells. *Sci. Rep.*, **6**: 20027. DOI: 10.1038/srep20027.
- Toyama T, Abiko Y, Katayama Y, Kaji T., Kumagai Y. (2015) S-Mercuration of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 through Cys152 by methylmercury causes inhibition of its catalytic activity and reduction of monoubiquitin levels in SH-SY5Y cells. *J. Toxicol. Sci.*, **40**: 887-893. DOI: 10.2131/jts.40.887.
- Kohri K, Yoshida E, Yasuike S, Fujie T, Yamamoto C, Kaji T. (2015) The cytotoxicity of organobismuth compounds with certain molecular structures can be diminished by replacing the bismuth atom with an antimony atom in the molecules. *J. Toxicol. Sci.*, **40**: 321-327. DOI: 10.2131/jts.40.321.
- Murakami M, Fujie T, Matsumura M, Yoshida E, Yamamoto C, Fujiwara Y, Yasuike S, Kaji T. (2015) Comparative cytotoxicity of triphenylstibane and fluorine-substituted triarylpnictogens in cultured vascular endothelial cells, *Fundam. Toxicol. Sci.*, **2**: 61-66. DOI: <http://doi.org/10.2131/fts.2.61>.
- Fujie T, Naka H, Yamamoto C, Shinkai Y, Kumagai Y, Kaji T. (2014) Activation of cellular defense mechanism by organic-inorganic hybrid molecules (in Japanese). *Yakugaku Zasshi*, **134**: 813-815. DOI: <http://doi.org/10.1248/yakushi.14-00017-8>.
- Takahashi S, Yamamoto C, Kaji T. (2014) Expression of ZIP8 in vascular endothelial cells after exposure to cadmium(in Japanese). *Yakugaku Zasshi*, **134**: 805-807. DOI: <http://doi.org/10.1248/yakushi.14-00017-6>.
- Toyama T, Shinkai Y, Yazawa A, Kakehashi H, Kaji T., Kumagai Y. (2014) Glutathione-mediated reversibility of covalent modification of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 by 1,2-naphthoquinone through Cys152, but not Lys4. (2014) *Chem. Biol. Interact.*, **214**: 41-48. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.02.008.
- Hirooka T, Yamamoto C, Yasutake A, Eto K, Kaji T. (2013) Expression of VEGF-related proteins in cultured human brain microvascular endothelial cells and pericytes after exposure to methylmercury. *J. Toxicol. Sci.*, **38**: 837-845. DOI: <http://doi.org/10.2131/jts.38.837>.
- Toyama T, Shinkai Y, Kaji T., Kumagai Y. (2013) Convenient method to assess chemical modification of protein thiols by electrophilic metals. *J. Toxicol. Sci.*, **38**: 477-484. DOI: <http://doi.org/10.2131/jts.38.477>
- Fujiwara Y, Yamamoto C, Inagaki T, Satoh M, Kaji T. (2012) Bismuth protects against arsenite-induced inhibition of proteoglycan synthesis in cultured vascular endothelial cells. *J. Toxicol. Sci.*, **37**: 837-843. DOI: <http://doi.org/10.2131/jts.37.837>.
- Kanda H, Toyama T, Shinohara-Kanda A, Iwamatsu A, Shinkai Y, Kaji T., Kikushima M, Kumagai Y. (2012) S-Mercuration of rat sorbitol dehydrogenase by methylmercury causes its aggregation and the release of the zinc ion from the active site. *Arch. Toxicol.*, **86**: 1693-1702. DOI: 10.1007/s00204-012-0893-4.
- Kimura T, Yoshida K, Yamamoto C, Suzuki M, Uno T, Isobe M, Naka H, Yasuike S, Satoh M, Kaji T., Uchiyama M. (2012) Bis(L-cysteinato)zincate(II) as a coordination compound that induces metallothionein gene transcription without inducing cell-stress-related gene transcription. *J. Inorg. Biochem.*, **117**: 140-146. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2012.07.021.
- Shinkai Y, Kaji T. (2012) Cellular defense mechanisms against lead toxicity in the vascular system. *Biol. Pharm. Bull.*, **35**: 1885-1891. DOI: <http://doi.org/10.1248/bpb.b212018>.

Hirooka T, Kaji T. (2012) The cytotoxicity of methylmercury in human microvascular endothelial cells and pericytes in culture. *Biol. Pharm. Bull.*, **35**: 1201-1205. DOI: <http://doi.org/10.1248/bpb.b12-00394>.

〔学会発表〕(計 18 件)

武正文子, 吉田映子, 山本千夏, 藤原泰之, 鍛冶利幸. 血管平滑筋細胞における TGF- $\beta$ 1 による亜鉛輸送体 ZIP8 遺伝子の発現調節機構. 第 42 回日本毒性学会学術年会, 金沢市アートホール(石川県金沢市), 2015 年 6 月 29 日~7 月 1 日.

森田遥香, 藤江智也, 中寛史, 吉田映子, 鍛冶利幸. 銅錯体による血管内皮細胞メタロチオネイン誘導を制御する亜鉛輸送体 ZIP7, フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー, 神戸学院大学(兵庫県神戸市), 2015 年 9 月 17-18 日.

森田遥香, 藤江智也, 吉田映子, 鍛冶利幸. 亜鉛輸送体 ZIP7 を介した銅錯体による血管内皮細胞メタロチオネイン誘導. 第 2 回東京環境健康薬学研究会, 東京理科大学(東京新宿区), 2015 年 8 月 21 日.

鍛冶利幸. 重金属の血管毒性研究からバイオ元素戦略バイオオルガノメタリクスへ(招待講演). 第 604 回新潟薬科大学薬学総合セミナー, 新潟薬科大学(新潟県新潟市), 2015 年 11 月 27 日.

鍛冶利幸. 有機-無機ハイブリッド分子を活用した血管内皮細胞のメタロチオネイン誘導機構の解明(招待公演), 第 42 回日本毒性学会学術年会 ワークショップ, ホテル日航金沢(石川県金沢市), 2015 年 6 月 29 日~7 月 1 日.

鍛冶利幸. 有機金属化合物の細胞毒性. 第 42 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム, 金沢市アートホール(石川県金沢市), 2015 年 6 月 29 日~7 月 1 日.

上原茜, 吉田映子, 山本千夏, 鍛冶利幸. カドミウムの内皮細胞毒性に対する亜鉛の防御機構への金属輸送体発現の関与. フォーラム 2014: 衛生薬学・環境トキシコロジー, つくば国際会議場(茨城県つくば市), 2014 年 9 月 19-20 日.

下村正裕, 吉田映子, 山本千夏, 鍛冶利幸. TGF- $\beta$ 1 による血管内皮細胞の亜鉛輸送体 ZIP8 の発現上昇. フォーラム 2014: 衛生薬学・環境トキシコロジー, つくば国際会議場(茨城県つくば市), 2014 年 9 月 19-20 日.

上原茜, 山本千夏, 鍛冶利幸. 血管内皮細胞において亜鉛は金属輸送体 ZIP8 の発現抑制を介してカドミウムの細胞毒性を防御する. 第 41 回日本毒性学会学術年会, 神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市), 2014 年 7 月 2-4 日.

上原茜, 吉田映子, 鍛冶利幸. カドミウム内皮細胞毒性に対する亜鉛の防御機構 -金属輸送体とメタロチオネインの関与-, 第 1 回東京環境健康薬学研究会, 東京薬科大学(東

京都八王子市), 2014 年 8 月 22 日.

鍛冶利幸. バイオオルガノメタリクス(有機-無機ハイブリッド分子のバイオロジー)(招待公演), 第 1 回東京環境健康薬学研究会, 東京薬科大学(東京都八王子市), 2014 年 8 月 22 日.

上原茜, 山本千夏, 鍛冶利幸. 血管内皮細胞に対する亜鉛とカドミウム相互作用は金属輸送体 ZIP8 の発現に介在される. 日本薬学会第 134 年会, 熊本大学(熊本県熊本市), 2014 年 3 月 28-30 日.

高橋涼香, 藤江智也, 山本千夏, 鍛冶利幸. カドミウムに曝露した血管内皮細胞における ZIP8 の発現誘導. 日本薬学会第 133 年会, 横浜, 2013 年 3 月 28-30 日.

安藤麗香, 山本千夏, 青木康展, 鍛冶利幸. カドミウムの内皮細胞毒性に対するマンガンの防衛作用. フォーラム 2012: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 名古屋観光ホテル(愛知県名古屋市), 2012 年 10 月 25-26 日.

高橋涼香, 藤江智也, 山本千夏, 鍛冶利幸. カドミウムによる血管内皮細胞 ZIP8 の誘導. 第 39 回日本毒性学会学術年会, 仙台国際センター(宮城県仙台市), 2012 年 7 月 17-19 日.

安藤麗香, 高橋涼香, 山本千夏, 青木康展, 鍛冶利幸. マンガンによるカドミウムの内皮細胞毒性の防御. 第 39 回日本毒性学会学術年会, 仙台国際センター(宮城県仙台市), 2012 年 7 月 17-19 日.

Takahashi S, Fujie T, Yamamoto C, Kaji T. Cadmium selectively and strongly induces the expression of ZIP8 in vascular endothelial cells. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology, Sendai International Center (Sendai city, Japan), July 17-20, 2012.

Ando R, Takahashi S, Yamamoto C, Aoki Y, Kaji T. Manganese protects against cadmium cytotoxicity via a lower expression of ZIP8 and ZIP14 in vascular endothelial cells. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology, Sendai, Japan, July 17-20, 2012.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rs.tus.ac.jp/kaji-lab/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鍛冶 利幸 (Kaji Toshiyuki)

東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号: 90204388

### (2) 研究分担者

山本 千夏 (YAMAMOTO Chika)

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号: 70230571