

平成30年6月13日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08054

研究課題名(和文)腎臓近位尿細管の領域特異的カドミウム輸送機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of segment-specific cadmium transport mechanism in renal proximal tubules

研究代表者

藤代 瞳 (Fujishiro, Hitomi)

徳島文理大学・薬学部・講師

研究者番号：10389182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Cdによる近位尿細管障害発現機構を解析するため、マウス近位尿細管のS1、S2、S3領域から単離した領域別の不死化培養細胞を用い、S1、S2、S3各領域のCd輸送および毒性発現機構を解析した。S1、S2、S3細胞のCd²⁺に対する感受性は差が見られなかったが、Cdを細胞内に輸送するZIP8の発現が高いS3細胞へのapical側からの取り込みが高いことを見いだした。また腎障害マーカーのKim-1の誘導が非常に低濃度のCd曝露によりS1、S2、S3のどの細胞でも見られた。mMTタンパク質の精製ができたため、今後、Cd-MTの輸送と毒性発現機構も解析する予定である。

研究成果の概要(英文)：To analyze the proximal tubular dysfunction mechanism by cadmium (Cd), we utilized the mouse immortalized proximal tubule cells derived from S1, S2, S3 segments to examine the Cd transport and toxicity. There is no difference in the sensitivity to Cd in S1, S2, S3 cells, we found that the high uptake from the apical side of S3 cells where the expression of ZIP8, the transporter having a high affinity for Cd, is high. Moreover, the induction of Kim-1 which is a sensitive renal failure marker was observed in S1, S2, and S3 cells exposed to low concentrations of Cd. Since the purification of mouse MT protein has been made, it is expected to analyze the transport and toxicity mechanisms of Cd-MT in the future.

研究分野：分子環境毒性学

キーワード：腎臓 カドミウム 輸送 近位尿細管 金属 毒性

1. 研究開始当初の背景

Cadmium (Cd) は広く地殻に分布し、米や魚介類に蓄積する。そのため、米を主食にする日本人は欧米人に比べてCdの体内蓄積量が多い。しかし、Cdの輸送経路はいまだ未解明な部分が多く残されている。古くからCdの取り込みに関わることが検討されてきたカルシウムチャネルや鉄(Fe)輸送体に加えて、近年、亜鉛(Zn)輸送体のZIP8およびZIP14がCdの輸送に重要な役割を果たしていることを本申請者および米国Cincinnati大学のグループが明らかにした。本申請者らは、これまでに、様々な哺乳動物細胞を用いた解析により、Cd輸送にZn輸送体のZIP8, ZIP14, Fe輸送体のDMT1が関与することを明らかにしてきた。一方、Cdの排泄に関与する輸送体については全く報告がない。申請者らは、これまでにいくつかの輸送体についてCdの排泄に関与するかどうか検討を行ってきたが、今のところその同定には至っていない。

申請者らは、Cdの毒性標的組織である尿細管上皮細胞が極性細胞であることを利用し、カップ培養システムを用いて、カップの中で原尿側と血管側に細胞を整列させ、実際の組織に似た環境で実験できる系をS1, S2, S3細胞を用いて構築した。この系を用いた実験でCdの原尿側(管腔側)からの取り込みにZIP8, ZIP14, DMT1が関与することを見出した。腎臓近位尿細管におけるCdの輸送はこれまでCd-メタロチオネン(Cd-MT)がエンドサイトーシスされることによる再吸収によって説明されていた。しかし、腎臓近位尿細管由来の不死化細胞(尿細管の領域の由来は不明)を用いて、ZIP8あるいはZIP14を介したCd²⁺の取り込み系も一部機能している可能性と、一度尿細管上皮細胞に取り込まれたCdが原尿側に排泄され得ることをカップ培養システムにより明らかにした。そこで申請者らは腎臓近位尿細管におけるCd吸収機構のモデルを提唱した。すなわち、Cdの吸収は近位尿細管の領域によって異なっており、これまでの研究で明らかにされたように、糸球体に最も近いS1もしくはS2領域で、CdはCd-MTの形でエンドサイトーシスにより尿細管上皮細胞に

取り込まれ、一度取り込まれたCdの一部はCd²⁺として再び管腔(原尿)側へと排出され、さらに下流のS3領域においてCd²⁺として再び吸収されるというダイナミックな挙動を示すというモデルである。このモデルに似た吸収が尿酸では報告されており、尿酸も一度尿細管上皮細胞に取り込まれ、原尿へと分泌され、また取り込まれることが明らかにされている。しかし、Cdがこのような挙動を示すかどうかは全く検討されていなかった。

2. 研究の目的

Cdは腎臓に蓄積し、近位尿細管障害を引き起こすことが知られている。しかし、尿細管におけるCd蓄積および毒性発現機構は不明のままである。そこで、マウス近位尿細管のS1, S2, S3領域から単離した領域別の不死化培養細胞を用い、各領域のCd蓄積および毒性発現機構を明らかにすることを目的とする。また、近位尿細管上皮細胞は極性細胞で管腔膜と基底膜があり、それぞれの膜で輸送システムが異なる。そこで、カップ培養システムを活用し、S1, S2, S3領域ごとに管腔側と血管側からのCdの取り込みおよび排泄の機構を解明し、領域特異的なCd毒性発現機構との関係を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

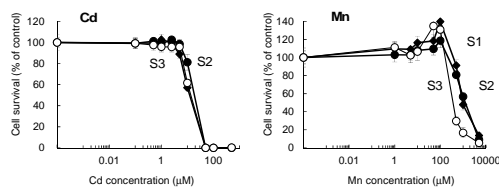
S1, S2, S3細胞を用いて、各部位ごとのCd取り込み、排泄の機構を管腔側と血管側に分けて測定し、その取り込みおよび排泄機構を明らかにし、Cdの近位尿細管における毒性発現機構を明らかにする。S1, S2, S3細胞において、Cdに対する感受性および尿細管原尿側、血管側での取り込み・排泄に各領域間で違いがあるか、Cdの形態(Cd-MTおよびCd²⁺)によって各領域間で取り込み・排泄に差があるか、Cd²⁺の取り込みおよび排泄に関わる輸送体の同定と寄与度、尿細管障害の新規マーカーであるKim-1, clusterinの発現誘導、合成、分泌に違いがあるかどうか、について明らかにする。

4. 研究成果

Cdに対する感受性および尿細管原尿側、血管側での取り込み・排泄に各領域間で違いがあるか

複数の金属に対する S1, S2, S3 細胞の感受性を比較した。その結果、腎障害を誘発し、特に近位尿細管の S3 領域を障害することが知られているシスプラチンに対しては、S1, S2 細胞に比べて S3 細胞が最も高い感受性を示した。同様に Mn に対しては、S1, S2 細胞に比べて S3 細胞が最も高い感受性を示した。無機水銀も腎障害を誘発することが知られているが、水銀については S1-S3 細胞に対する毒性に差は見られなかった。また、Cd, Pb, Cu, Zn についても検討したが、差は見られなかった (図 1)。

図1. S1, S2, S3細胞におけるCdおよびMn感受性(24 h)



-1: Cd の形態によって各領域間で取り込み・排泄に差があるか

Cd の毒性標的である腎臓近位尿細管において、Cd はメタロチオネイン (MT) と結合した Cd-MT の形で糸球体を通り、近位尿細管の S1 領域からエンドサイトーシスで再吸収されることが明らかにされている。私たちのこれまでの研究から、尿細管の部位によっては Cd-MT のエンドサイトーシスのみならず、亜鉛輸送体のうちの ZIP8 あるいは ZIP14 を介した Cd²⁺ の取り込み系が関与していることを見出している。

まず Cd²⁺ を管腔および血管側からそれぞれ添加し、30, 60 min 後の Cd²⁺ の取り込み及び排泄効率を S1, S2, S3 細胞で比較した。その結果、S3 細胞への管腔側からの Cd²⁺ の取り込み効率は S1, S2 細胞に比較して高かった (図 2)。また、S1, S2 細胞での Cd²⁺ の取り込み効率は、管腔および血管側で差がなかった。しかし、S3 細胞での管腔側からの Cd²⁺ の取り込み効率は血管側よりも高かった。これまでの本研究者による研究結果 (マウス腎臓の *in situ* hybridization) により、S3 領域において Cd²⁺ の輸送体である ZIP8 は他の領域と比べて高い発現がみられた。このことにより、S3 細胞への Cd²⁺

の取り込み効率が高いことが説明できる可能性が示唆された。次に S1, S2, S3 細胞に 2 時間 Cd を取り込ませた後、24, 48 hr 後の Cd 排泄効率を測定した。S1, S2 細胞では、排泄された Cd のほとんどが管腔側から排泄されていた。一方、S3 細胞では管腔側と血管側にほぼ同じくらい排泄されており、S1, S2 細胞に比べると血管側への排泄効率が高かった (図 3)。以上のように S1, S2, S3 細胞への Cd²⁺ の取り込み及び排泄効率は、尿細管の部位によって異なっていた。

図2. 管腔側、血管側からのCd²⁺取り込み効率(カップ培養)

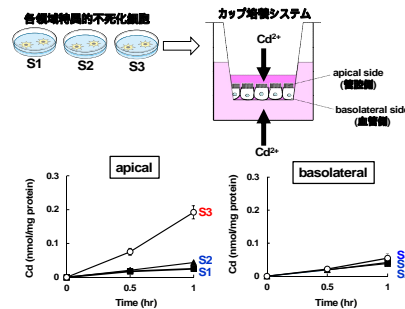
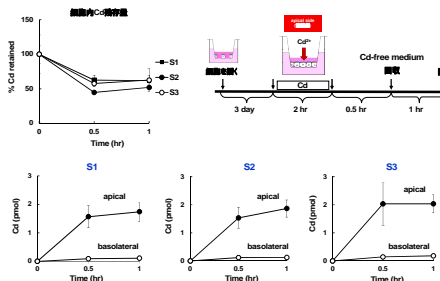


図3. 管腔側、血管側へのCd排泄効率(カップ培養)



-2: メタロチオネインタンパク質の精製

GST 融合タンパク質を作製するための vector である pGEX-6P-1 に mouse MT (mMT) 遺伝子を挿入した。作製した plasmid を大腸菌 BL21 株に形質転換した後、GST-mMT の精製を行った。しかし、GST を切断する酵素である PreScission proteinase での切断効率が悪く、様々な検討を行ったがうまくいかなかった。そこで、別の vector である pGEX-4T-1 に mMT 遺伝子を挿入した。GST-mMT の融合タンパク質の精製後、thrombin で今回は GST 切断することができ、mMT を精製できたが、時間がかかりかかってしまった。

同様に S1, S2, S3 細胞における Cd-MT の取り込み効率および排泄効率を測定する

予定だったが、リコンビナント mMT-1 の精製に手間取り検討できなかった。本研究者が提唱した仮説のように、Cd は尿細管上皮細胞に一度取り込まれた後、その一部が S1, S2 領域で管腔側に排泄され、再び S3 領域の上皮細胞に再吸収される、というダイナミックな動態が存在している可能性が示唆された。今後、Cd-MT を用いた実験を展開していく予定である。

Cd²⁺の取り込みおよび排泄に関わる輸送体の同定と寄与度

これまでの検討により、近位尿細管の S3 領域における Cd²⁺の取り込みには ZIP8 および ZIP14 が重要な役割を果たす可能性が示唆された。siRNA および CRISPR-Cas9 システムを用いて恒常的に金属輸送体の発現を抑制した細胞の樹立を試みたが、ZIP8 の発現抑制は成功しなかった。今後、系を変更するあるいは一過性の発現抑制により ZIP8 および ZIP14 の S3 細胞における Cd の取り込みへの寄与度を明らかにする。

尿細管障害の新規マーカーである Kim-1, clusterin の発現誘導、合成、分泌に違いがあるかどうか

腎障害のバイオマーカーとして尿中腎障害因子 (Kim-1)、尿中 clusterin などが尿細管障害の指標として優れていることが報告されている。これらの新規マーカーは腎障害に際して腎臓での発現が誘導され、尿中で検出される。そこで、まず S1, S2, S3 細胞に Cd を添加した場合の Kim-1, clusterin の発現変化について調べた。S1, S2, S3 細胞のいずれにおいても、Cd 添加 1 日後には Cd 濃度依

存的な Kim-1 の発現上昇が認められた (図 4)。濃度を低めに設定して 3, 6 日間 Cd に曝露した場合にも Kim-1 の上昇がどの細胞においても見られた。一方、clusterin については、Kim-1 のような明確な変化が認められなかった。

現在、trans-well を用いて培地中に放出されたタンパク質レベルについても測定できないか検討中である。

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)

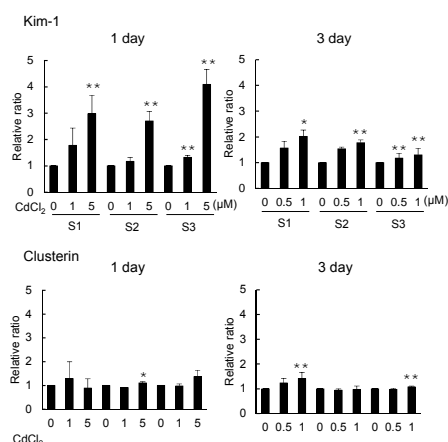
[雑誌論文](計 4 件)

1. Fujishiro, H., Hamao, S., Tanaka, R., Kambe, T., Himeno S. (2017) Concentration-dependent roles of DMT1 and ZIP14 in cadmium absorption in Caco-2 cells. J. Toxicol. Sci. Vol.42(5), 559-567. doi:10.2131/jts.42.559.
2. Fujishiro H., Liu Y., Ahmadi, B., Templton, D.M. (2017) Protective effect of cadmium-induced autophagy in rat renal mesangial cells. Archives of Toxicology 92(2), 619-631. doi: 10.1007/s00204-017-2103-x.
3. Templeton, D. M. and Fujishiro, H. (2017) Terminology of speciation- An IUPAC perspective. Coord. Chem. Rev. 352, 424-431. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.02.002>
4. Nishito, Y., Tsuji, N., Fujishiro, H. et al. (2016) Direct Comparison of Manganese Detoxification/Efflux Proteins and Molecular Characterization of ZnT10 as a Manganese Transporter. J. Biol. Chem. 291(28), 14773-14787. doi: 10.1074/jbc.M116.728014.

[学会発表](計 16 件うち招待講演 6 件)

1. 培養細胞を用いたカドミウムによる近位尿細管再吸収障害の評価。岡奈々恵、藤代瞳、姫野誠一郎。日本薬学会138年会、金沢。2018年3月28日
2. DT40細胞における亜鉛輸送体ZIP8の変異によるマンガン輸送の変化。宮崎寿和、藤代瞳、神戸大朋、姫野誠一郎。日本薬学会138年会、金沢。2018年3月26日
3. Lead accumulation and cytotoxicity in

図4. Kim-1およびclusterinのmRNAレベルの変化



- segment-specific kidney proximal tubule cells. M. Martinez- Alfaro, H. Fujishiro, S. Himeno. 日本薬学会138年会、金沢. 2018年3月26日
4. 腎臓近位尿細管における生体金属の動的な輸送機構と生体影響の解析. ○藤代瞳、姫野誠一郎. 生命化学系学会合同年次大会 (ConBio2017) ワークショップ: 生体金属動態の分子科学「生命金属科学」への展開、神戸. 2017年12月6日
 5. カドミウムによる近位尿細管再吸収障害機構の *in vitro* 解析. 大寺信輝, 山本葉月, 藤代瞳, 姫野誠一郎. フォーラム2017: 衛生薬学・環境トキシコロジー、仙台. 2017年9月2日
 6. 近位尿細管S1, S2, S3領域の活性酸素種感受性の差異. 藤代瞳, 山上りえ, 姫野誠一郎. フォーラム2017: 衛生薬学・環境トキシコロジー、仙台. 2017年9月1日
 7. 腎臓近位尿細管における有害金属および薬物の毒性と動態の解析. ○藤代瞳. 分子研研究会、愛知. 腎臓近位尿細管における有害金属および薬物の毒性と動態の解析. ○藤代瞳. 分子研研究会、愛知. 2017年8月27日
 8. 腎臓の様々な部位由来細胞を用いたカドミウム毒性発現機構の解析. 藤代瞳、姫野誠一郎. 第44回日本毒性学会学術総会. シンポジウム: 重金属の細胞毒性に対する新しい防御分子と防御系、横浜. 2017年7月12日
 9. Cadmium-induced autophagy through JNK and Ca²⁺ in rat mesangial cells. ○ H. Fujishiro and D.M. Templeton. 日本薬学会137年会、仙台. 2017年3月27日
 10. The role of Zinc transporters in cadmium transport in its target organs. ○H. Fujishiro and S. Himeno. BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会) Workshop Zn Signaling、神戸. 2015年12月1日
 11. 腎臓近位尿細管S1, S2, S3領域由来細胞を用いた白金製剤の毒性と輸送の検討. 藤代瞳, 濱尾聡子, 杉本光, 姫野誠一郎. フォーラム2015: 衛生薬学・環境トキシコロジー、神戸. 2015年9月18日
 12. Investigation of cadmium transport in mouse kidney proximal tubule cells. H. Fujishiro and S. Himeno. 第13回微量元素の生物地球化学に関する国際会議 (ICOBTE)、シンポジウム: Recent progress in cadmium studies in Japan: In commemoration of 50 years after the identification of cadmium as the cause of Itai-itai disease、福岡. 2015年7月13日
 13. 腎臓近位尿細管部位特異的な細胞の毒性・輸送機構解析への応用. 藤代瞳、伊澤美咲、杉本光、山本葉月、姫野誠一郎. 第42回日本毒性学会、金沢. 2015年6月30日
 14. 重金属の毒性発現における金属輸送体の役割に関する研究. 藤代瞳. 第42回日本毒性学会奨励賞受賞講演、金沢. 2015年6月30日
 15. Cadmium transport and cytotoxicity in segment-specific kidney proximal tubule cells. H. Fujishiro, S. Hamao, and S. Himeno. AsiaTox, 韓国. 2015年6月26日
 16. 腎臓近位尿細管部位特異的由来細胞を用いたカドミウム輸送機構の探索. ○藤代瞳. 第10回トランスポーター研究会年会、若手・中堅シンポジウム2015年6月21日 [図書](計1件)
- Himeno, S. and Fujishiro H. (2017) Roles of Zinc Transporters in Cellular Transport of Cadmium and Manganese. "Metalloomics - Recent Analytical Techniques and Applications", eds. 2017. Ogra Y, and Hirata T, Springer, 265-283.
- [産業財産権]
なし
6. 研究組織
(1)研究代表者
藤代瞳 (FUJISHIRO, Hitomi)
徳島文理大学・薬学部・講師
研究者番号: 10389182