

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18910

研究課題名(和文)カドミウム曝露によるがん悪性化メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of the effects of prolonged cadmium exposure on the malignant progression

研究代表者

藤木 恒太 (Fujiki, Kota)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：80632504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：カドミウムは肺組織においてがん化を誘引する環境汚染物質として知られているが、カドミウムがどのような制御機構でがんの悪性化を亢進させるのか、未だに明らかになっていない。本研究は、肺胞基底上皮腺癌細胞(A549細胞)に対するカドミウム長期曝露の効果とNotch1、HIF-1 およびPI3K/Akt/ERKシグナル経路の機能について検討した。その結果、カドミウム長期曝露されたA549細胞において、Notch1、HIF-1 およびPI3K/Akt/ERKシグナル経路が協調的に機能することで、肺癌細胞の悪性化を亢進することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Cadmium exposure is known to increase lung cancer risk, but the underlying molecular mechanisms in cadmium-stimulated progression of malignancy are unclear. Here, we examined the effects of prolonged cadmium exposure on the malignant progression of A549 human lung adenocarcinoma cells and the roles of Notch1, HIF-1, and PI3K/Akt/ERK signaling pathways. As a result, we found that Notch1, along with HIF-1 and PI3K/Akt/ERK signaling pathways, promotes malignant progression stimulated by prolonged cadmium exposure in A549 cells.

研究分野：薬学・毒性学・生物学

キーワード：重金属ストレス応答 シグナル伝達 肺癌 上皮間葉転移

### 1. 研究開始当初の背景

カドミウムは環境汚染物質であり、主に喫煙や採鉱時に呼吸器を経由して曝露され、その結果、肺、腎臓などの組織において、機能障害やがんを誘引することが報告されている。培養細胞や個体レベルの実験系からも、高濃度カドミウムを急性曝露すると、細胞レベルで細胞死を誘導する一方、長期間カドミウムを曝露すると、細胞のがん化が誘導されることが報告されている。しかしながら、がんの悪性化、特にがんの転移能・浸潤能に対し、カドミウムがどのような影響を与えるのかは未だに明らかにされていない。

がん細胞の転移能・浸潤能は複数の要因に起因する事象であり、その要因の一つとして、上皮性のがん細胞が、上皮間葉転移(EMT)を惹起することが報告されている。EMTはE-cadherinを含む複数の細胞接着因子が減少し、タイトジャンクションといった細胞間の接着が脆弱になる一方、細胞接着因子N-cadherin、細胞骨格因子Vimentinなどの間葉系のマーカー分子の発現量が上昇することで、細胞の転移能・浸潤能を上昇させる。また、分子モーターであるアクチンの重合、ストレスファイバーの形成を介した細胞の移動能の上昇によっても転移能・浸潤能が上昇することが報告されている。

これまでに、EMTや細胞移動能の制御に関わる様々な因子が既に報告されているが、その中でもNotch1シグナル経路は、多くの局面で機能していることが報告されている。膜貫通型受容体かつ転写因子であるNotch1は細胞外領域にお

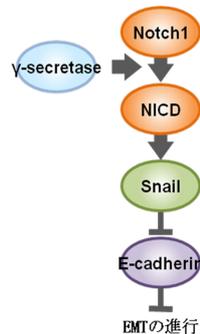


図1:Notch1によるEMT制御機構

いてリガンドと結合することで、タンパク切断酵素  $\gamma$ -secretase により Notch1 細胞内領域が切断され、活性化型 Notch1(Notch1-ICD)を形成する。Notch1-ICDは、転写因子 Snail の発現を誘導し、それによって E-cadherin などの転写が抑制され、EMT が誘導される(図1)。また、近年、研究代表者は、ヒト近位尿管上皮細胞(HK-2細胞)において、カドミウム曝露依存的に Notch1-ICD が形成され、その結果、Snail の発現が増加し、E-cadherin の発現量が抑制されることを見出した(Fujiki et al., *Cell Death Dis*, 2014)。

### 2. 研究の目的

カドミウムを曝露したHK-2細胞において、EMTと類似した現象が観察されたことから、研究代表者は、カドミウム長期曝露によって、がん細胞がNotch1シグナル経路の活性化を介してEMTを惹起し、がん細胞の悪性化を亢進するのではないかと仮説に至った。そ

こで、本研究は、この可能性について生化学的・細胞生物学的に解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

研究材料としてカドミウムの標的器官となる肺、特に肺がん患者の中でも80%以上が分類される非小細胞肺がんに属する肺胞基底上皮腺がん細胞(A549細胞)を用いることにし、以下の点について検討する。

(1)カドミウム長期曝露のA549細胞に対する影響の解析:カドミウム(塩化カドミウム)を長期(最長14週)曝露し、細胞形態、細胞成長速度、EMT、細胞移動能を経時的に観察し、解析する。また、がん細胞の悪性化が亢進すると抗がん剤に対する耐性も上昇することが報告されているため、肺がんの治療に用いられる抗がん剤、シスプラチン・ゲムシタピンに対する耐性への影響についても検討する。

(2)Notch1およびその周辺で機能する因子の役割の解析:(1)で観察されたカドミウム長期曝露のA549細胞に対する影響が、Notch1の機能を介しているのか調べるため、カドミウム長期曝露によってNotch1シグナル経路が活性化するのか検討する。また、Notch1の機能を阻害したときに、カドミウム長期曝露の影響が抑制されるのか検討する。さらに、Notch1がどのような分子基盤で機能するのか調べるため、その周辺で機能する因子を探索する。

### 4. 研究成果

(1)カドミウム長期曝露のA549細胞に対する影響の解析

A549細胞にカドミウム1-20 $\mu$ Mを1-14週間曝露したところ、カドミウム20 $\mu$ Mを10週間曝露した時点で、何も曝露していない細胞よりも細胞成長速度が上昇し、細胞の形態がspindle shape様の形態となった。さらに、カドミウム20 $\mu$ Mを10週間曝露した細胞では、何も曝露していない細胞と比べ、E-cadherinの発現量が減少する一方、N-cadherin、Vimentinの発現量が増加していた。さらに、phalloidin-FITCを用いた染色実験の結果、カドミウム20 $\mu$ Mを10週間曝露した細胞では、何も曝露していない細胞よりもストレスファイバーの形成が促進していた。また、wound-healing assayを用いて、細胞移動能を測定した結果、カドミウム20 $\mu$ Mを10週間曝露した細胞では、何も曝露していない細胞よりも細胞移動能が上昇していることがわかった。また、観察されたカドミウム長期曝露のA549細胞に対する効果は、カドミウム曝露期間を延ばしても同様に確認された。これらの結果から、カドミウム20 $\mu$ Mを10週間以上曝露(カドミウム長期曝露)したA549細胞では、EMTが惹起され、細胞移動能が上昇することが示唆された。さらに、

カドミウム長期曝露した細胞では、シスプラチンやゲムシタピンに対する耐性が上昇することも確認された。以上の結果から、カドミウム長期曝露によって A549 細胞の悪性化が亢進したことが示唆された。

次に、カドミウム長期曝露によって得られた A549 細胞の形質は、細胞内からカドミウムを除去しても維持・記憶されるのか調べるため、カドミウムを長期曝露した後、カドミウムを加えていない通常培地で 10 週間培養し、形質が維持されるか検討した。まず、ICP-MS を用いて、細胞内に存在するカドミウムの量を確認したところ、通常培地で 5 週間培養した時点で、既に細胞内のカドミウムは完全に除去されていることが確認された。さらに、カドミウム長期曝露した後、10 週間通常培地で培養した細胞では、細胞内からカドミウムが完全に除去されているにもかかわらず、何も曝露していない細胞と比べ、細胞成長速度が高く、また EMT が惹起され、抗がん剤耐性も上昇していることが確認された。以上の結果から、カドミウム長期曝露によって得られた形質は、細胞内からカドミウムを除去しても維持・記憶されることが示唆された。

## (2) Notch1 およびその周辺で機能する因子の役割の解析

カドミウム長期曝露によるがん細胞の悪性化の亢進における Notch1 の役割を調べるため、まず、Notch1 シグナル経路がカドミウム長期曝露によって活性化するか検討した。その結果、カドミウムを長期曝露した細胞では、Notch1 全長、Notch1-ICD、さらにはターゲット因子である Snail および Slug の発現量が上昇していることが確認された。さらに、-secretase 阻害剤 DAPT で処理した細胞および siRNA を用いて Notch1 をノックダウンした細胞では、カドミウム長期曝露依存的な Snail および Slug の発現量の上昇が抑制された。このことから、カドミウム長期曝露によって Notch1 シグナル経路が活性化していることが示唆された。また、カドミウム長期曝露した後、通常培地で 10 週間培養した細胞でも、Notch1 シグナル経路の活性化は維持されていることも確認された。さらに、Notch1 をノックダウンした細胞では、カドミウム長期曝露によって減少した E-cadherin の発現量が回復し、カドミウム長期曝露依存的なストレスファイバーの形成の促進、細胞移動能の上昇、抗がん剤耐性の上昇も抑制された。以上の結果から、カドミウム長期曝露によって、Notch1 シグナル経路が活性化し、それによって、A549 細胞の悪性化が亢進していることが示唆された。

また、Notch1 周辺で機能する因子を探索したところ、カドミウム長期曝露依存的に転写因子である HIF-1 の発現量が上昇し、さらにキナーゼである PI3K/Akt/ERK シグナル経路が活性化していることが確認された。

HIF-1 および PI3K/Akt/ERK シグナル経路は、どちらも EMT の誘導に関わることが既に報告されているシグナル経路であるため、次に、Notch1、HIF-1 および PI3K/Akt/ERK シグナル経路が協調的に機能することで、カドミウム長期曝露依存的に EMT を惹起しているのではないかと予想し、その可能性について検討した。その結果、Notch1 をノックダウンした細胞では、カドミウム長期曝露依存的な HIF-1 の発現量の上昇が抑制され、また、PI3K/Akt/ERK 経路の活性化が抑制されていた。さらに、HIF-1 をノックダウンした細胞では、カドミウム長期曝露依存的な Notch1-ICD の発現量の上昇が抑制され、また、E-cadherin の発現量の減少も抑制された。加えて、PI3K/Akt/ERK シグナル経路の活性を、Akt 阻害剤 MK2206 および ERK 阻害剤 U0126 を用いて阻害した細胞では、カドミウム長期曝露依存的な HIF-1 の発現量の上昇が抑制された。以上の結果から、Notch1、HIF-1 および PI3K/Akt/ERK シグナル経路が、相互に活性化し合い、協調的に機能することで、カドミウム長期曝露依存的に EMT を惹起していることが示唆された。

以上の結果をまとめると、カドミウムを長期曝露すると、Notch1、HIF-1 および PI3K/Akt/ERK シグナル経路が活性化し、協調的に機能することで、EMT が惹起され、がん細胞の悪性化が亢進することを見出した。また、カドミウム長期曝露によって獲得された悪性化したがん細胞の形質は、細胞内のカドミウムを取り除いても、ある程度記憶・維持されることが見出された。これらの成果は、国際誌 *J. Biol. Chem.* (2017, in press) に発表した。

## 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 3 件)

Fujiki K., Inamura H., Miyayama T., Matsuoka M.: Involvement of Notch1 signaling in malignant progression of A549 cells subjected to prolonged cadmium exposure. *J. Biol. Chem.* In press, (2017) 査読有り

松岡雅人, 蔣池勇太, 藤木恒太, 宮山貴光: 化学物質の毒性発現機構 最近のシグナル伝達研究から **産薬医ジャーナル** 40, 61-65(2017) 査読無し

Pastuhov SI., Fujiki K., Tsuga A., Asai K., Hirose K., Ishikawa S., Matsumoto K., Hisamoto N.: The core molecular machinery used for engulfment of apoptotic cells regulates the JNK pathway mediating axon regeneration in *Caenorhabditis elegans*. *J.*

*Neuroscience* 36, 9710-21 (2016) 査読有り

〔学会発表〕(計5件)

藤木恒太

カドミウムによる肺癌の悪性転化機構の解明

第355回東京女子医科大学学例会、東京女子医科大学(東京都新宿区)、2017年2月25日

藤木恒太、松岡雅人

慢性カドミウム曝露による肺癌細胞の悪性化

第39回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)、2016年12月1日

藤木恒太、松岡雅人

カドミウム慢性曝露による肺癌細胞の悪性化とNotch1の役割

第86回日本衛生学会学術総会、旭川市民文化会館(北海道旭川市)、2016年5月13日

藤木恒太、松岡雅人

肺癌細胞に対するカドミウム慢性曝露の影響とNotch1の役割

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、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)、2015年12月2日

藤木恒太、松岡雅人

Notch1 シグナルを介したカドミウムによる近位尿細管障害

メタルバイオサイエンス研究会2015、名古屋国際センター(愛知県名古屋市)、2015年8月27日

〔その他〕

所属機関ホームページ

<http://www.twmu.ac.jp/Basic/hygiene1/index.html>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

藤木 恒太 (FUJIKI, KOTA)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80632504