

令和元年6月20日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00563

研究課題名(和文)カドミウム腎毒性発現における新規のカドミウム毒性決定因子BIRC3の役割の解明

研究課題名(英文)The roles of BIRC3 on cadmium induced renal toxicity

研究代表者

李 辰竜 (LEE, Jin-Yong)

愛知学院大学・薬学部・准教授

研究者番号：80581280

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)：カドミウムは、HK-2細胞(ヒト由来腎近位尿細管上皮細胞)において、BIRC3の遺伝子発現およびタンパク質発現を低下させ、その結果、細胞に障害を与えることが明らかとなった。また、BIRC3遺伝子発現低下によるカスパーゼ3の活性化およびアポトーシスが誘導された。しかも、カドミウムはBIRC3を介したネクロトーシスを有意に誘導した。以上の結果より、腎近位尿細管上皮細胞において、カドミウムによるBIRC3の発現抑制は、アポトーシスのみならずネクロトーシスの誘導も引き起こすことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、カドミウムの毒性発現および防御機構におけるBIRC3の役割を明らかにすることを目的とした。本研究は、本申請者がカドミウム毒性発現に関わる新たな細胞内因子として見いだしたBIRC3の役割解明しており、学術的独自性がある。しかも、カドミウムの毒性発現におけるBIRC3の役割解析は世界で初めての報告となり、学術的独自性の高いといえる。本研究によって、新たなカドミウム毒性発現機構が明らかになり、カドミウム毒性研究、さらに金属毒性学研究の発展にも大きく貢献することである。

研究成果の概要(英文)：Cadmium is one of the harmful heavy metals, which induce severe renal toxicity. This study was conducted to clarify the role of BIRC3 in the renal toxicity of cadmium. First, it is demonstrated that cadmium suppresses BIRC3 gene expression and reduces intracellular protein levels in HK-2 human renal proximal tubular epithelial cells. Knockdown of BIRC3 activated caspase 3 in HK-2 cells as well as cadmium. Furthermore, activation of caspase 3 by BIRC 3 gene expression reduction is a cadmium-specific action in renal proximal tubular cells. On the other hand, BIRC3 knockdown as well as cadmium treatment significantly induced extracellular release of HMGB-1, which is an index of necroptosis, in HK-2 cells. Moreover, phosphorylation of RIPK1 by cadmium was also observed. From the above results, it is suggested that suppression of BIRC3 expression by cadmium not only causes apoptosis but also induction of necroptosis in renal proximal tubular cells.

研究分野：分子毒性学

キーワード：カドミウム 腎毒性 BIRC3 アポトーシス ネクロトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究代表者は、有害重金属の一つであるカドミウムの腎毒性発現に関与している新規標的転写因子の同定を行った。その結果、カドミウムは ARNT (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) 転写因子の活性抑制を介して、細胞毒性を引き起こすことを見いだした。さらに、カドミウム毒性発現に関わる ARNT の下流因子を検索し、BIRC3 [Baculoviral IAP (inhibitor of apoptosis protein) repeat containing 3] の遺伝子発現が ARNT ノックダウンによって減少し、BIRC3 の細胞内低下も細胞毒性を示した。この結果から、カドミウムによる ARNT 活性抑制は、細胞内 BIRC3 レベルを低下させて細胞毒性を引き起こすことが示唆され、カドミウム毒性発現における BIRC3 の詳細な役割の解明が必要となった。

### 2. 研究の目的

本研究代表者はこれまでに、カドミウムが遺伝子発現をかく乱することによって、その毒性を発揮する可能性を示唆している。遺伝子発現は転写因子の制御下で調節されていることから、カドミウムは多数の転写因子の活性に影響を与えることによって遺伝子発現かく乱作用を示すと考えられる。そこで、ごく最近、ヒト腎臓由来 (HK-2) 細胞を用いて、345 種の転写因子を対象とした網羅的スクリーニングを実施した。その結果、カドミウムによって活性が変動する転写因子を複数同定することに成功した。しかも、同定された転写因子のうち、ARNT 転写因子のノックダウンによる細胞内レベルの低下が、細胞生存率の有意な減少を引き起こすことも見いだしている。ARNT 転写因子の活性低下による下流因子の細胞内レベルの低下はカドミウム毒性発現に深く関与していると考えられ、カドミウム毒性発現に関与する ARNT 転写因子の下流因子の同定を試みた。その結果、ARNT 転写因子の細胞内レベルの低下により、BIRC3 の遺伝子発現が減少するとともに、BIRC3 の遺伝子ノックダウンは著しく細胞生存率を低下させることを見いだした。これらの事実は、カドミウム毒性発現に ARNT 転写因子とその下流遺伝子である BIRC3 が深く関与していることを示唆している。BIRC3 は IAP ファミリーに属するタンパク質であり、カスパーゼ活性抑制によるアポトーシス阻害や、細胞内タンパク質の分解に関わる E3 リガーゼ機能も持っていることが知られている。しかしながら、BIRC3 とカドミウム毒性との関連性が検討されたことが全くないことから、カドミウム毒性と BIRC3 との関係性を明らかにすることによって、新たなカドミウム毒性発現機構が解明されるものと期待される。そこで本研究では、ARNT の転写活性低下を介した BIRC3 の発現抑制がカドミウムの新たな毒性発現機構であることを解明するとともに、カドミウム毒性決定因子としての BIRC3 の分子機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) カドミウムが細胞内 BIRC3 レベルに及ぼす影響の解明

HK-2 細胞を無血清培地に希釈したカドミウムで処理した後、total RNA および可溶性タンパク質を抽出した。リアルタイム RT-PCR により遺伝子発現レベルを、ウェスタンブロット法によりタンパク質レベルを測定した。

#### (2) BIRC3 の細胞内レベルの低下および活性抑制がカドミウム毒性発現に及ぼす影響の検討 ノックダウンによる BIRC3 の発現抑制がカドミウム毒性に及ぼす影響を検討する。

#### (3) BIRC 遺伝子ファミリーの発現に及ぼすカドミウムの影響

カドミウムによる BIRC3 遺伝子発現抑制作用の特異性を調べるため、BIRC3 以外の BIRC 遺伝子ファミリーの発現に及ぼすカドミウムの影響を検討した。カドミウムで処理した HK-2 細胞から total RNA を抽出し、BIRC1, BIRC2, BIRC4, BIRC5, BIRC6, BIRC7 および BIRC8 の mRNA レベルをリアルタイム RT-PCR 法で測定した。

#### (4) 細胞生存率に及ぼす BIRC3 ノックダウンの影響

細胞生存に及ぼす細胞内 BIRC3 レベル低下の影響を調べた。HK-2 細胞を control siRNA および 3 種類の BIRC3 siRNA で 48 時間処理し、MTT アッセイにより生存率を測定した。

#### (5) BIRC3 が関与するカドミウムによる細胞死経路の解明

アポトーシス作用：カドミウムによるアポトーシス作用における BIRC3 ノックダウンの影響を TUNEL 染色 (アポトーシス検出ツール) で検討した。

ネクロプトーシス作用：最近、BIRC3 はアポトーシス以外のプログラム細胞死、ネクロプトーシスに関与していることが報告された。ネクロプトーシスは近年注目を浴びている新たな細胞死経路であり、カドミウムのような有害重金属の毒性発現機構との関連性はほとんど報告されていない。ネクロプトーシスは HMGB-1 (high mobility group Box-1 protein) の細胞外放出を検討した。

#### (6) カスパーゼ 3 の活性化に及ぼすカドミウムまたは BIRC3 ノックダウンの影響

BIRC3 はカスパーゼ 3 活性を抑制することが知られている。そこで、HK-2 細胞においてカスパーゼ 3 の活性化に及ぼすカドミウムの影響を調べるため、カドミウム処理後の HK-2 細胞

を用いて細胞内断片化カスパーゼ 3 のタンパク質レベルをウェスタンブロット法で検討した。また、HK-2 細胞においてカスパーゼ 3 の活性化に及ぼす BIRC3 ノックダウンの影響をウェスタンブロット法で検討した。

(7) BIRC3 発現抑制を介したカドミウム毒性発現における RIP kinase の役割の検討: BIRC3 がネクロプトーシス経路に関与する際には、RIP (Receptor Interacting Protein) kinase のリン酸化が関わっていることが知られている。そこで、カドミウムによる RIP kinase のリン酸化に及ぼす BIRC3 の影響を検討した。

#### 4. 研究成果

カドミウムは、HK-2 細胞において、BIRC3 の遺伝子発現を顕著に抑制するとともに、細胞内タンパク質レベルも著しく低下させた。なお、BIRC3 以外の 7 種の BIRC 遺伝子ファミリーにおけるカドミウムの発現抑制作用は認められなかった。BIRC3 のノックダウンによって細胞生存率の低下と、アポトーシスの誘導が示されるとともに、BIRC3 のノックダウンによってカドミウム毒性も増強された。以上の結果より、カドミウムは、BIRC3 の遺伝子発現を抑制するとともに、細胞内タンパク質レベルを低下させ、その結果、細胞に障害を与えることが示唆された。

BIRC3 のノックダウンは、カドミウムと同様に HK-2 細胞内のカスパーゼ 3 を活性化させた。また、メチル水銀は、IMR-32 細胞と HK-2 細胞において、カスパーゼ 3 を活性化させたものの、BIRC3 遺伝子発現には影響を与えなかった。無機水銀は、HK-2 細胞において、カスパーゼ 3 の活性化には関与しなかったが、BIRC3 の遺伝子発現を有意に減少させた。無機ヒ素は、AML-12 細胞において、カスパーゼ 3 の活性化に関与せず、Birc3 の遺伝子発現を上昇させた。AML-12 細胞において、カドミウムは、カスパーゼ 3 の活性化に関与しないものの、低濃度のみで Birc3 の遺伝子発現を低下させた。これらの結果より、BIRC3 遺伝子発現低下によるカスパーゼ 3 の活性化は、腎近位尿細管細胞におけるカドミウム特異的な作用であることが考えられる。

HK-2 細胞において、カドミウムと同様に BIRC3 ノックダウンは、ネクロプトーシスの指標である HMGB-1 の細胞外への放出を有意に誘導した。さらに、カドミウムによる RIPK1 のリン酸化も認められた。

カドミウム長期曝露マウスの腎臓および肝臓における Birc3 の遺伝子発現変動も調べたところ、カドミウムに 67 週間曝露させた 129/Sv 系統マウス腎臓において、Birc3 mRNA レベルの有意な低下が認められた。しかしながら、同マウスの肝臓では、Birc3 mRNA レベルは有意に上昇した。以上の結果より、腎近位尿細管上皮細胞において、カドミウムによる ARNT の転写活性阻害を介した BIRC3 の発現抑制は、アポトーシスのみならずネクロプトーシスの誘導も引き起こすことが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Lee, J.Y., Tokumoto, M., Hwang, G.W., Satoh, M. Comprehensive analysis of BIRC family gene expression changes by mercury compounds and arsenic exposure in neuroblastoma, kidney, and hepatic cells. *BPB Reports*, 1, 20-24, 2018.

Lee, J.Y., Tokumoto, M., Hwang, G.W., Satoh, M. Effect of chronic cadmium exposure on the gene expression of Birc family in the mouse kidney and liver. *Fundam. Toxicol. Sci.*, 4, 275-278, 2017.

[学会発表](計 6 件)

Lee J.Y. Apoptosis related factors involved in cadmium renal toxicity. 2nd World Congress on Pharmacology & Toxicology. Rome, Italy. August 2018.

Lee J.Y., Tokumoto M., Satoh M. Novel mechanism of renal toxicity induced by chronic cadmium exposure. The 3rd Malaysian Congress of Toxicology (MyCOT 2017). Bangi, Selangor, Malaysia. December 2017.

李 辰竜, 徳本真紀, 佐藤雅彦. カドミウム腎毒性におけるアポトーシス抑制因子 BIRC3 の役割. 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.

李 辰竜, 徳本真紀, 佐藤雅彦. BIRC3 発現抑制を介したカドミウムのアポトーシス誘導. 第 44 回日本毒性学会学術年会. 横浜. 2017 年 7 月.

Lee J.Y., Tokumoto M., Satoh M. The Involvement of BIRC3 in Cadmium Toxicity in Proximal Tubular Cells. The 56th Annual Meeting of the Society of Toxicology. Baltimore, Maryland, USA. March 2017.

李 辰竜, 徳本真紀, 佐藤雅彦. 遺伝子発現抑制を介したカドミウム毒性発現機構. 「シンポジウム: カドミウム研究の新たな展開 - 疫学から分子機構まで -」. 第 43 回日本毒性学会学術年会. 名古屋. 2016 年 7 月.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：徳本 真紀

ローマ字氏名：Maki TOKUMOTO

所属研究機関名：愛知学院大学

部局名：薬学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：90614339

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。