

令和元年6月7日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15495

研究課題名(和文)カドミウム曝露による細胞死誘導・選択メカニズムの解析

研究課題名(英文)Analysis of the regulatory mechanisms of cadmium-induced cell death

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：環境汚染物質カドミウムは尿細管細胞死を惹起することが知られている。しかしながら、カドミウムがどのような制御機構で尿細管細胞死を惹起するかは、未だに解明しきれていない。本研究は、カドミウム曝露依存的に惹起されるヒト近位尿細管細胞(HK-2)細胞死におけるALK4/5シグナル経路の機能について検討した。その結果、カドミウム曝露依存的にALK4/5が活性化し、Smad3およびAktの活性化を介してHK-2細胞死を促進することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞死は、発生、障害、疾病など様々な生命現象の基盤となる機構であり、その制御機構の理解は重要な課題である。尿細管細胞も様々な刺激や薬物に応じて多様な細胞死が惹起され、その結果、腎機能障害につながる事がわかっているが、その詳細は未だ解明しきれていない。本研究において、カドミウム曝露依存的尿細管細胞死の制御機構の一端が解明されたことは、尿細管細胞死制御機構の解明に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cadmium is a pollutant which can induce renal tubular cells death, but the underlying molecular mechanisms in cadmium exposure-induced renal tubular cells death are unclear. Here, we examined the roles of ALK4/5 pathways in cadmium exposure-induced HK-2 human proximal renal tubular epithelial cells death. As a result, we found that ALK4/5 promote cadmium exposure-induced HK-2 cells death via Smad3 and Akt pathways.

研究分野：薬学、毒性学、生物学

キーワード：ストレス応答 シグナル伝達 尿細管細胞死

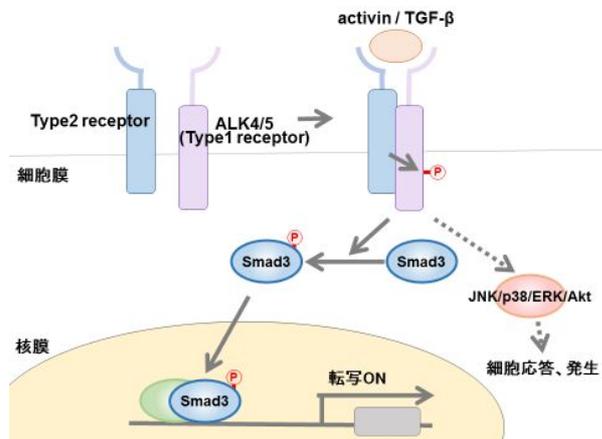
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞死を惹起する刺激や刺激を受容した細胞の種類によって、アポトーシス、ネクローシス(シグナルによって制御されていないネクローシス)、ネクロプトーシス(シグナルによって制御されているネクローシス)などその状況に応じた様々な細胞死が使い分けられている。生体内では、この使い分けられた細胞死によって発生が制御されており、また障害、疾病が生じることが報告されている。そのため、発生の理解、さらには障害や疾病の治療戦略を考える上でも、刺激や細胞の種類によってどのような細胞死が選択されるのか、またそれはどのように制御されているのかを解明することは重要な課題である。

カドミウムは、今なお喫煙や採鉱時に呼吸器を経由して曝露され、その結果、腎臓や肺などの組織において、機能障害、癌を誘引することが報告されている日常の環境汚染物質である。培養細胞や個体レベルの実験系から、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が誘導される一方、長期間カドミウムを曝露すると、細胞の癌化が誘導されることが報告されているが、その毒性発現メカニズムの詳細は未だ解明しきれていない。そこで、研究代表者はそれを解明すべく、これまでに転写因子 Notch1 やリン酸化酵素 Akt を中心に解析してきたが(Fujiki et al., *Cell Death Dis*, 2014)、解析を更に加速すべく、ヒト近位尿管上皮細胞を用いて、リン酸化酵素阻害剤を中心とした様々な阻害剤のカドミウムによって惹起される細胞死に対する影響を検討し、重要な機能を担う因子を探索した。その結果、カドミウム曝露依存的に誘導される細胞死において、ALK4/5 阻害剤 SB431542 及び SB505124 が顕著な細胞死抑制効果を示すことを見出した。

ALK(activin receptor like kinase)4 及び ALK5 は、それぞれリガンドである activin 及び TGF(transforming growth factor)- の受容体型リン酸化酵素として知られており、腎組織の繊維化などに関与することが報告されている。ALK4/5 は通常細胞膜上に不活性化状態で局在するが、リガンドが接着するとヘテロ複合体を形成し、リン酸化される。リン酸化された ALK4/5 は活性化し、転写因子 Smad2/3 をリン酸化できるようになり、リン酸化された Smad2/3 は核内へと移行し、標的因子の転写を調節する(右図)。一方、活性化した ALK4/5 は Smad2/3 非依存的にリン酸化酵素である JNK、p38、ERK 及び Akt の活性化を介して下流へとシグナルを伝達することも報告されている。



### 2. 研究の目的

予備実験においてカドミウムの毒性に対して SB431542 及び SB505124 が抑制効果を示したことから、カドミウム曝露依存的に ALK4/5 が活性化し、下流にシグナルを伝達することで細胞死が促進するのではないかと仮説に至った。そこで、この可能性について、生化学的、細胞生物学的に検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

これまでに個体レベルの実験で、カドミウム曝露によって近位尿管上皮細胞が細胞死を起こすことが報告されている。そのため、カドミウムの毒性メカニズムの解析をするにあたり、研究材料としてカドミウムの標的器官となるヒト近位尿管上皮細胞(HK-2細胞)を主に用いることにし、以下の点について検討する。

#### (1) activin 経路及び TGF- 経路のカドミウム曝露依存的尿管細胞死における重要性の検討

カドミウム曝露依存的に ALK4/5 が活性化し、下流にシグナルを伝達することで細胞死を促進するという作業仮説を検討するため、ALK4/5 のカドミウム曝露依存的な活性化を経時的に観察し、解析する。また、ALK4 及び ALK5 はそれぞれ activin 及び TGF- の受容体であるため、activin 経路及び TGF- 経路のどちらがカドミウム曝露依存的 HK-2 細胞死において重要であるか生化学的、細胞生物学的に解析する。

#### (2) カドミウム曝露依存的尿管細胞死における ALK4/5 の下流因子の探索

カドミウム曝露依存的に ALK4/5 が活性化し、下流にシグナルを伝達することで細胞死を促進するという作業仮説を基に、カドミウム曝露依存的 HK-2 細胞死において ALK4/5 の下流で機能する因子を探索する。主に Smad2/3 依存的経路及び Smad2/3 非依存的経路(1.研究開始当初の背景の項参照)を中心に生化学的、細胞生物学的に解析する。

#### (3) 他の外的ストレスや薬剤曝露依存的尿管細胞死における ALK4/5 の機能阻害効果の検討

カドミウム曝露依存的 HK-2 細胞死における ALK4/5 の機能が、カドミウムストレス特異的な

ものであるのか調べるため、尿細管細胞が曝露される他の外的ストレス及び薬剤[ソルビトール(高浸透圧ストレス)、シスプラチン(抗がん剤)、エラスチン(フェロトシス誘導剤)]曝露依存的に誘導されるHK-2細胞死に対するALK4/5の機能を検討する。猶、これまでに虚血性再灌流により尿細管障害が生じる際、フェロトシス(鉄イオン依存性ネクロシス様細胞死)が尿細管細胞で観察されることが報告されており、エラスチンはその尿細管細胞死を模倣するためのストレス源として使用した。

#### 4. 研究成果

(1) activin 経路及び TGF- $\beta$  経路のカドミウム曝露依存的尿細管細胞死における重要性の検討  
カドミウム曝露依存的尿細管細胞死における activin 経路及び TGF- $\beta$  経路の役割を調べるため、まず、ALK4/5 シグナル経路がカドミウム曝露依存的に活性化するか検討した。その結果、カドミウム曝露依存的に ALK4/5 の基質である Smad3 のリン酸化の顕著な増加が観察された。また、siRNA を用いて ALK4 をノックダウンした細胞及び ALK5 阻害剤 SIS3 で処理した細胞では、どちらもコントロール細胞と比べてカドミウム曝露依存的細胞死が抑制された。これらの結果から、カドミウム曝露依存的に ALK4 及び ALK5 が活性化し、HK-2 細胞死が促進されることが示唆された。次に ALK4/5 のリガンドである activin 及び TGF- $\beta$  がカドミウム曝露依存的尿細管細胞死に重要であるか調べるため、まず、activin 及び TGF- $\beta$  の発現量のカドミウム曝露依存的な変化を調べた。その結果、activin を構成する Inhibin-BA の mRNA 及びタンパク量はカドミウム曝露依存的に増加する一方、TGF- $\beta$  の mRNA の増加は確認されなかった。一方、カドミウム曝露依存的な発現量の増加が認められた activin の機能を siRNA を用いて阻害した細胞では、カドミウム曝露依存的な Smad3 のリン酸化及び HK-2 細胞死に影響は見られず、また activin や TGF- $\beta$  を培地中に添加してもカドミウム毒性に有為な影響が認められなかった。これらのことから、カドミウム曝露依存的な ALK4/5 の活性化にはリガンドは関与しないことが示唆された。

#### (2)カドミウム曝露依存的尿細管細胞死における ALK4/5 の下流因子の探索

ALK4/5 は Smad2/3 依存的経路と Smad2/3 非依存的経路を介してシグナルを下流へと伝達することが知られているため、カドミウム曝露依存的 HK-2 細胞死においてどちらの経路が重要であるか検討した。まず、Smad3 の機能を調べるため、siRNA も用いてノックダウンしたところ、コントロール細胞と比べてカドミウム曝露依存的細胞死が抑制された。一方、Smad2 ノックダウン処理では、カドミウム曝露依存的細胞死に影響が認められなかった。このことから、Smad3 を介して ALK4/5 はカドミウム曝露依存的 HK-2 細胞死を制御していることが示唆された。次に、Smad3 下流因子について探索した。腎組織の一つである糸球体上皮細胞において、分泌された TGF- $\beta$  が ALK5 を活性化し、活性化した ALK5 が Smad2/3 のリン酸化を促進し、その結果、Smad2/3 の標的因子であり酸化酵素である Nox4 の転写が誘導され、活性酸素を産生することで、細胞死が惹起されることが報告されている (Das et al., *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014)。また、Smad3 は酸化ストレス防御遺伝子群の発現を制御する転写因子 Nrf2 の機能を負に制御することも報告されている (Bakin et al., *Free Radic Biol Med*, 2005)。そこで、Nox4 及び Nrf2 が、カドミウム曝露依存的 HK-2 細胞死における ALK4/5/Smad3 の機能に関与するか検討した。その結果、Nox4 の mRNA 量、タンパク量にカドミウム曝露依存的な変化は確認されず、また Nox4 ノックダウン処理によるカドミウム曝露依存的細胞死に対する影響も認められなかった。さらに、SB431542 及び SB505124 のもつカドミウム曝露依存的細胞死抑制機能に対する Nrf2 ノックダウン処理の影響も認められなかった。これらの結果から、ALK4/5/Smad3 経路は Nox4 及び Nrf2 を介さずにカドミウム曝露依存的 HK-2 細胞死を促進することが示唆された。

次に、Smad2/3 非依存的経路が ALK4/5 の機能に重要であるか検討した。これまでに、カドミウム曝露依存的に JNK 経路、ERK 経路、p38 経路及び Akt 経路が活性化することが報告されているため、その活性化に対する ALK4/5 の機能阻害効果を調べたところ、SB431542 処理及び ALK4 ノックダウン処理した細胞では、コントロール細胞と比べて特にカドミウム曝露依存的な Akt の活性化が抑制された。さらに、Akt の特異的阻害剤 MK2206 処理によって、カドミウム曝露依存的 HK-2 細胞死が抑制された。以上の結果から、カドミウム曝露依存的に活性化した ALK4/5 は Akt の活性化を介して HK-2 細胞死を促進することが示唆された。

次に、結果 2 で示した ALK4/5 のカドミウム曝露依存的 HK-2 細胞死における機能が、HK-2 細胞以外の尿細管細胞でも保存されているか調べるため、ヒト由来初代近位尿細管細胞および不活化したマウス由来近位尿細管(mProx)細胞を用いて検討した。その結果、SB431542、SIS3 及び MK2206 のもつカドミウム曝露依存的細胞死に対する抑制効果は、ヒト由来初代近位尿細管細胞及び mProx 細胞でも観察された。以上の結果から、カドミウム曝露依存的 HK-2 細胞死における ALK4/5 を中心とした制御機構は、少なくともヒト及びマウスでは保存されている可能性が示された。

#### (3) 他の外的ストレスや薬剤曝露依存的尿細管細胞死における ALK4/5 の機能阻害効果の検討

他のストレス及び薬剤曝露依存的尿細管細胞死に対する ALK4/5 の機能を検討するため、ソルビトール、シスプラチン及びエラスチン曝露依存的 HK-2 細胞死に対する ALK4/5 の阻害効果を検討した。その結果、ソルビトール及びシスプラチン曝露依存的 HK-2 細胞死に対して SB431542 及び SB505124 処理による影響は観察されなかった。一方、エラスチン曝露依存的 HK-2 細胞死

は、SB431542、SB505125 及び SIS3 処理により抑制され、その抑制効果は、Nrf2 ノックダウン処理により阻害された。加えて、activin 及び TGF- $\beta$  を培地に添加すると、エラスチン曝露依存的 HK-2 細胞死は促進された。しかしながら、MK2206 処理してもエラスチン曝露依存的 HK-2 細胞死に影響は認められなかった。以上の結果から、ALK4/5 はエラスチン曝露依存的 HK-2 細胞死促進機能を持つが、その制御は Nrf2 の機能抑制を介しており、ALK4/5 のカドミウム曝露依存的 HK-2 細胞死促進機構とは異なることが示唆された。

以上の結果をまとめると、ヒト尿細管細胞がカドミウムに曝露されると、リガンド非依存的に ALK4/5 が活性化し、活性化した ALK4/5 は Smad3 及び Akt を介して細胞死を促進すると考えられる。また、ヒト尿細管細胞が虚血性再灌流などによりフェロトーシスを惹起する場合には、ALK4/5 は Nrf2 の機能抑制を介して細胞死を促進すると考えられる。これらの成果は、国際誌 *Cell Death Differ* (2019, In press) に発表した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

### 【原著論文】

Fujiki K, Inamura H, Sugaya T, Matsuoka M. Blockade of ALK4/5 signaling suppresses cadmium- and erastin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells via distinct signaling mechanisms. *Cell Death & Differentiation* in press, DOI, 10.1038/s41418-019-0307-8, 2019. 査読有り

Miyayama T, Fujiki K, Matsuoka M. Silver nanoparticles induce lysosomal-autophagic defects and decreased expression of transcription factor EB in A549 human lung adenocarcinoma cells. *Toxicology in Vitro* 46, 148-154, 2018. 査読有り

### 【総説】

Matsuoka M, Fujiki K. Mechanisms underlying the development of pulmonary fibrosis induced by paraquat exposure: Signaling pathways regulating the epithelial-mesenchymal transition. *Current Topics in Toxicology* 14, 21-27, 2018. 査読有り

[学会発表](計6件)

藤木恒太、松岡雅人

外的ストレス依存的に惹起される HK-2 ヒト近位尿細管細胞死制御メカニズムの解析  
第 89 回日本衛生学会学術総会、名古屋大学豊田講堂(愛知県名古屋市)、2019 年 2 月 3 日

藤木恒太

カドミウム曝露に対するストレスシグナル伝達系活性化の意義  
第 89 回日本衛生学会学術総会、名古屋大学豊田講堂(愛知県名古屋市)、2019 年 2 月 2 日

宮山貴光、藤木恒太、松岡雅人

ヒト肺細胞における銀ナノ粒子のオートファジー・リソソーム系阻害と TFEB の減少  
第 45 回日本毒性学会、大阪国際会議場(大阪府大阪市)、2018 年 7 月 20 日

宮山貴光、藤木恒太、松岡雅人

The role of lysosomal dysfunction and autophagic defects in silver nanoparticle-induced cellular damage in A549 human lung adenocarcinoma cells  
The 8th International Congress of Asian Society of Toxicology, Pattaya, Thailand, 2018 年 6 月 18 日

藤木恒太、松岡雅人

フッ素曝露により惹起される炎症反応における転写因子 FOXO family の機能解析  
第 88 回日本衛生学会学術総会、東京工科大学蒲田キャンパス(東京都大田区)、2018 年 3 月 24 日

宮山貴光、藤木恒太、松岡雅人

ヒト肺胞上皮腺がん細胞を用いた銀ナノ粒子によるオートファジー阻害と TFEB の減少  
第 88 回日本衛生学会学術総会、東京工科大学蒲田キャンパス(東京都大田区)、2018 年 3 月 24 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