

平成22年 5月 7日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19590131

研究課題名（和文） カドミウムのDNAメチル化阻害による抗がん機構

研究課題名（英文） The role of DNA methylation in cadmium-induced anti-carcinogenesis

研究代表者

瀧口 益史（MASUFUMI TAKIGUCHI）

広島国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：90330753

研究成果の概要（和文）：カドミウムは発がん作用と抗がん作用を持つ金属である。そのカドミウムによる抗がん機構について研究を行った。カドミウムは発がん誘導に関係のあるDNAメチル化酵素を阻害した。また、カドミウムはがんの浸潤や転移に関係するメタロプロテイナーゼ2活性阻害を介して細胞浸潤能を阻害することを明らかにした。この結果は、カドミウムの新たな抗がん作用機構の1つを提案するものである。

研究成果の概要（英文）：Cadmium (Cd) is a carcinogenic metal in humans and rodents. Cd in certain instances can also be anti-carcinogenic. In this study, Cd is an effective inhibitor of DNA methyltransferase, controlled DNA methylation status, and kinetic studies indicated the mechanism is via interference with enzyme-DNA interaction. The enzyme-DNA binding site may be Pro-Cys in catalytic site of enzyme. In addition, Cd inhibited cell invasion activity via inhibition of MMP2 activity. This result proposed one of the new mechanisms of cadmium-induced anti-carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,460,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,460,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,480,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：環境系薬学

キーワード：カドミウム、エピジェネティクス、がん、DNA、メチル化

## 1. 研究開始当初の背景

近年、地球環境変化、酸性雨、海洋汚染、環境ホルモン汚染など地球をとりまく環境破壊が著しく大きな社会問題となっている。その一つとして土壌の重金属汚染がある。北極

氷山中の重金属濃度を年代毎に測定した報告からも、世界環境規模での著しい重金属汚染が進んでいることが明らかである。汚染された土壌に育った作物中に高濃度の重金属が蓄積されることが報告されている。カドミ

ウムは穀物中に蓄積されることが知られており、特に米への蓄積が多い。日本では米が主食であるため、低用量、長期間のカドミウム摂取の危険性が考えられる。カドミウムのヒト生体半減期は15～20年と非常に長期間であること、また急速な高齢化社会の発展による高齢者の増加及び加齢に伴う生体抵抗性の低下が予想されることを考え合わせると、今後、日本ではカドミウムによる危険性が増加することが考えられる。カドミウムは、1993年にヒト発がん物質として認められた非常に強い環境と職業汚染毒物である。

これまでに我々は、カドミウム発ガンの重要な機構の1つとして、異常DNAメチル化状態が関与することを明らかにした(Takiguchi Mら, *Exp. Cell Res.*, 2003)。さらに、カドミウムにより誘導されるメタロチオネン(MT)に関して、マイクロアレーを用いて、MT欠損細胞と野生型細胞の両細胞間で発現量の異なる遺伝子を865種類中より検索したところ、野生型細胞に比べ、MT欠損細胞で低発現している遺伝子3種類(MMP2等)、高発現している遺伝子3種類(Cryac crystallin  $\alpha$ C、等)を同定した。その中でMMP2遺伝子産物である68 kDa type IV collagenaseの分泌活性はMT欠損細胞の方が有意に低い活性を示した。Type IV collagenaseはがんの進展及び転移活性に関与することが知られている蛋白質であり、MTはMMP2発現を増加させ、ガン化機構に影響を与える可能性が考えられた(Takiguchi Mら, *Toxicol Sci*, 2005)。このように、カドミウムの発がん物質としての側面から、その発がん機構を詳細に検討し、明らかにしてきた。しかしながら一方で、カドミウムによる抗ガン作用についても多く報告されている(Waalkes, MP, *Metal ions in Biology and Medicine*, 1994, Review)。

Waalkesらは、代表的な発がん物質であるN-ニトロソジエチルアミン(NDEA)による発がんをCdが抑制することを報告している。また、腫瘍を移植した場合には、カドミウムは肉腫(MSB sarcoma)や骨肉種(Dunn osteosarcoma)の成長を抑制し、形質細胞腫細胞(MOPC-1040E plasmacytoma cell)を移植したマウスの生存期間を延長する等、抗がん活性を示している。このように、一方で発がん作用を持つ物質が、他方で抗がん作用を持つという、とても興味深い現象を示している。

## 2. 研究の目的

我々はラット肝臓由来細胞 lysis を用いた研究から、カドミウムは非常に強くDNAメチル基転位酵素活性を阻害することを明らかにしている。(Takiguchi Mら, *Toxicol Sci*, 2000)。また、ラット培養細胞へ短期間(1週間)カドミウムを投与すると、細胞内DNAメチル基転位酵素活性が低下し、それに伴い核内DNAのメチル化レベルが対照細胞より有意に低下することを見出している(Takiguchi Mら, *Exp. Cell Res.*, 2003)。これらの結果は、カドミウムの抗がん機構にDNAのメチル化異常が関係している可能性を示唆するものと考えられる。従って本研究ではカドミウムによる抗がん機構を解明することを目的とし、培養細胞と実験動物を用いてDNAのメチル化との関係を中心に、カドミウムによるDNAメチル化異常の機構解析およびカドミウムによる抗がん作用とDNAメチル化異常の関係解析を行なうことを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) DNAメチル化酵素活性  
酵素源としてはラット肝臓由来細胞 lysis と

精製されたバクテリア DNA メチル基転位酵素 (*M. SssI*) を用い、亜鉛及びカドミウムを添加し、それら DNA MTase 活性に対する影響を調べた。DNA MTase 活性は基質としてデオキシイノシン-デオキシシトシン (poly[dI · dC] · poly[dI · dC]) 2 本鎖 DNA テンプレート、メチルドナーとして s-adenosylmethionine (SAM) を使用した。

(2) 細胞 : 野生型及び MT 欠損マウス由来線維芽細胞を使用した。両細胞に種々の重金属 ( $\text{Cr}^{6+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  及び  $\text{Cd}^{2+}$ ) を曝露し 24 時間培養後、その培養液をゼラチンゼイモグラフィー用サンプルとした。

(3) 細胞浸潤能 (マトリゲルインベーションアッセイ)

Chemoinvasion assay を用いて細胞浸潤能を測定した。インサート内に無血清 DMEM と細胞を播種し、インサート外には 0.5%FBS を含んだ DMEM を入れて 24 時間細胞を浸潤させた。DMEM とマトリゲルを除去後、細胞を固定染色しメンブレンを切り取り、細胞数を計測した。

(4) ゼラチンゼイモグラフィー

各細胞を 70-80% コンフルエンスまで培養し、PBS で洗浄後、血清無し DMEM 培地に交換し、2 4 時間培養した。培地を回収後、濃縮し、等量を 10% zymography gel (0.1%ゼラチン含む、Novex 社) にて泳導後、zymogram developing buffer で 2 4 時間反応させ、検出した。

(5) MT-II 遺伝子再発現細胞の作成 : MT-II 遺伝子発現プラスミド (pcMT-II : ゼオシン耐性遺伝子を含む pcDNA3.1 プラスミド (Invitrogen 社) にマウス MT-II 遺伝子を組み込んだもの) を作成し、MT 欠損マウス線維芽細胞に導入し、安定形質転換体 MT(-) / MT-II 細胞を作成した。

#### 4. 研究成果

##### (1) DNA メチル基転移酵素 (DNA MTase) の亜鉛結合部位へのカドミウムの影響

我々は、カドミウムが非常に強く DNA メチル基転位酵素活性を阻害することを明らかにしている。また、ラット培養細胞へ短期間 (1 週間) カドミウムを投与すると、細胞内 DNA メチル基転位酵素 (DNA MTase) 活性が低下し、それに伴い核内 DNA のメチル化レベルが対照細胞より有意に低下することを見出している。これらの結果は、カドミウムの抗ガン機構に DNA のメチル化異常が関係している可能性を示唆するものと考えられる。そこでカドミウムによる DNA メチル化異常の機構解析の一環として、まず DNA MTase の亜鉛結合部位へのカドミウムの影響を調査した。その結果、亜鉛及びカドミウムは両酵素ともに強く阻害した。つまり、亜鉛結合部位を持つラット DNA MTase も持たない *M. SssI* ともにカドミウムが阻害したこと、また亜鉛自身も両酵素の活性を阻害したことから、カドミウムによる DNA MTase 阻害作用は酵素中の亜鉛と置き換わることにより機能変化したためではないことが示唆された。一方、我々は以前の研究でカドミウムは酵素と DNA との結合を非拮抗的に阻害することを明らかにしている。また今回、カドミウムや亜鉛による DNA MTase 活性阻害はジチオスレイトールの添加により消失することを明らかにした。さらに、ほとんどの DNA MTase の活性中心には Pro-Cys のアミノ酸基が存在し、その Cys の-SH 基が DNA と結合するためには重要であることが知られている。これらのことを考え併せると、カドミウムは酵素活性中心の Pro-Cys の-SH 基に結合することで DNA と酵素の結合を阻害していると考えられた。

##### (2) カドミウムがメタロプロテイナーゼ活性及び細胞浸潤能に与える影響

今回検討した金属のうち、0.1 $\mu$ M, 0.5 $\mu$ M カドミウムを 24 時間曝露すると野生型細胞において濃度依存的に MMP2 活性を減少させた。亜鉛とクロムはカドミウムと比べると弱いながら、カドミウムは細胞内 MMP2 遺伝子発現に影響を示さなかった。このことから、カドミウムは MMP2 タンパク質の合成阻害せず、MMP2 活性を減少させたことが明らかとなった。次に Matrigel を使用し細胞浸潤能を調査したところ、細胞浸潤能は 0.5 $\mu$ M カドミウム曝露により顕著に減少した。これらの実験結果より、カドミウムは MMP2 活性阻害を介して細胞浸潤能を阻害した可能性が考えられる。今回の結果は、カドミウムの新たな抗がん作用機構の 1 つを提案するものである。

### (3) MT 欠損細胞への MT 再発現による MMP2 発現に対する影響

マウス腎臓 cDNA ライブラリーより MT-II 遺伝子をクローニングし、MT-II 遺伝子発現プラスミドを作成し、MT 細胞に導入した。その結果、6 個の MT-II 発現クローン細胞を樹立することができた。その細胞を解析したところ、MT 欠損細胞で発現が変化していた proclagen, Cryac Crystalin, CD24, CD34-like gene 発現は MT の再発現によっても変化しなかった。このことは、これら遺伝子発現に MT は関係していないことを示している。一方、MMP2 発現は MT の再発現によって野生型細胞と同等にまで増加した (3 クローン)。このことより、MMP2 発現は MT により調節されていることが考えられる。しかしながら、MT の再発現によっても変化しないクローンも存在した (3 クローン) ことより、MMP2 発現と MT の関係については、さらに詳しい調査が必要である。

## 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 2 件)

- ① Minoru Higashimoto, Naoki Isoyama, Satoshi Ishibashi, Masahisa Inoue, Masufumi Takiguchi, Shinya Suzuki, Yoshinari Ohnishi, Masao Sato  
Tissue-dependent preventive effect of metallothionein against DNA damage in dyslipidemic mice under repeated stresses of fasting or restraint.  
Life Science  
査読：有  
2009, **84**; 569-575
- ② 瀧口益史、吉原新一  
カドミウムの胎盤毒性-環境ホルモンを中心に  
臨床検査  
査読：なし  
2008, **51**; 1719~1723

〔学会発表〕 (計 4 件)

- ① Masufumi Takiguchi  
Effects of various metals on secretion of matrix metalloproteinase2 from mouse fibroblast cells  
49th Annual Meeting of Society of Toxicology  
平成 22 年 3 月 10 日  
ソルトレイクシティーコンベンションセンター、米国
  - ② 島田秀明  
ラットにおけるカドミウムの精巣毒性の系統差：金属トランスポーターの関与  
フォーラム 2009 衛生薬学・環境トキシコロジー  
平成 21 年 11 月 5 日  
沖縄コンベンションセンター
  - ③ 森石麻祐子  
種々の金属がメタロプロテイナーゼ活性及び細胞浸潤能に与える影響  
日本薬学会 128 年会  
平成 20 年 3 月 27 日  
横浜コンベンションセンター
  - ④ 瀧口 益史  
メタロチオネインによるメタロプロテイナーゼ 2 (MMP2) 発現への影響  
メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会 2007  
平成 19 年 9 月 29 日  
徳島文理大学
- 〔図書〕 (計 0 件)  
〔産業財産権〕  
○出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧口 益史 (MASUFUMI TAKIGUCHI)

広島国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：90330753

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし