

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008 ～ 2009  
 課題番号：20790116  
 研究課題名 (和文) カドミウムの血管毒性防御の分子機構を担う転写因子 Nrf2  
 研究課題名 (英文) Transcription factor Nrf2 as a defense mechanism against cadmium toxicity in vascular system  
 研究代表者  
 新開 泰弘 (SHINKAI YASUHIRO)  
 筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教  
 研究者番号：10454240

## 研究成果の概要 (和文)：

カドミウムの血管毒性に対する生体の防御システムの解明を目的として、培養血管内皮細胞を用いて、カドミウムの毒性に対する Nrf2/Keap1 系の防御的役割とその分子機構を解析した。その結果、内皮細胞は Nrf2/Keap1 系にてカドミウムを感知し、活性化された Nrf2 が抗酸化応答配列を介してメタロチオネイン-I/II を含む抗酸化酵素群の発現誘導を正に制御することにより、カドミウムの毒性に対して防御に働く細胞応答システムであることが明らかとなった。

## 研究成果の概要 (英文)：

Cadmium, a ubiquitous heavy metal, is an important industrial and environmental pollutant that can target the vascular endothelium. In this study, we investigated the participation of Nrf2 in cellular response to cadmium and protection against this metal in bovine aortic endothelial cells. Exposure of the cells to cadmium resulted in Nrf2 activation followed by up-regulated expression of antioxidant proteins. We found that the Nrf2/Keap1 system serves as a defense mechanism against cadmium toxicity through a positive regulation of metallothionein gene in vascular endothelial cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：環境毒性学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：カドミウム、Nrf2、血管内皮細胞、メタロチオネイン

## 1. 研究開始当初の背景

環境汚染重金属カドミウムは、イタイイタイ病の原因物質として知られるが、現在でも低レベルで環境中および食品中にユビキタ

スに存在し人の健康を害すると考えられることから、国際的にも FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議による安全性評価の積極的な見直しが行われている。カドミウムの生体影響を理解するには、その毒性発現機構の

解明が不可欠であり、国内外の研究者によりこれまで積極的に研究が進められてきた。しかしながら、依然として次の二点が立ち後れている。第一に、カドミウムの血管毒性、特に血管内皮細胞毒性の解明である。これまでカドミウムの標的臓器として、腎、骨、肝、肺などが主な研究対象であったが、近年それらの器官の実質細胞の機能障害が血管内皮傷害の二次的影響を含むことが明らかになってきた。すなわち、カドミウムは血流に乗って標的器官に到達した後、その一部は当該器官の実質細胞に到達してこれを傷害するが、別の一部は血管内皮細胞を傷害し、その二次的影響として実質細胞の機能異常を誘発し得るというものである。第二に、カドミウムに対する細胞応答を担う分子標的と生体システムの解明である。これまでカドミウムの解毒タンパク質としてのメタロチオネインや細胞内へのカドミウムの輸送機構については精力的に研究が展開されてきた。しかしながら、カドミウムに対する防御システムの理解は必ずしも十分であるとはいえず、むしろ立ち遅れていたといえる。カドミウムに対する細胞応答は毒性と防御の総和であり、その意味で特に防御システムの解明はカドミウムの毒性を理解する上で重要である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、「生体防御システムである Nrf2/Keap1 系がカドミウムの毒性防御において重要な役割を担っている」という作業仮説を基に、カドミウムの血管内皮傷害における Nrf2/Keap1 系の役割ならびにその防御応答の分子機構を明らかにすることである。血管内皮細胞のモデルとしてウシ大動脈血管内皮細胞 (BAEC) を使用し、Nrf2 および Keap1 をノックダウンした後、カドミウムの毒性発現ならびにストレス応答のタンパク質の発現について検討する。また Nrf2 および Keap1 欠損細胞のモデルとして Nrf2 ノックアウトマウスおよび Keap1 コンディショナルノックアウトマウスの初代肝細胞を用いて上記と同様の検討を行い、カドミウムの毒性防御を担う細胞応答システムとしての Nrf2/Keap1 系の役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) BAEC を用いた検討

常法に従って BAEC を培養し、カドミウムに対する Nrf2 の応答性やストレス応答のタンパク質の発現誘導をウエスタンブロット法にて検討する。また siRNA 法にて Nrf2 および Keap1 をノックダウンし、カドミウムに対する感受性の変化を MTT 法や LDH 法で比較・検討する。また、カドミウムに対する抗酸化応答配列 (ARE) の転写活性化や、メタロチオネインのプロモーター活性をルシフェ

ラーゼ法で検討する。更に、メタロチオネイン I とメタロチオネイン II の mRNA 量の変化をリアルタイム PCR 法にて調べる。

### (2) 初代肝細胞を用いた検討

野生型マウスと Nrf2 ノックアウトマウスおよび Keap1 コンディショナルノックアウトマウスよりそれぞれ初代肝細胞を採取し、常法に従って培養する。カドミウムに対する感受性を MTT 法にて比較・検討する。同条件下における細胞内カドミウム蓄積量について ICP-MS にて検討する。カドミウムに対する Nrf2 の応答性やメタロチオネイン-I/II のタンパク質の発現誘導をウエスタンブロット法にて検討する。

## 4. 研究成果

BAEC において、無毒性レベルのカドミウムの曝露により、濃度依存的に転写因子 Nrf2 の活性化が生じ核への蓄積が観察された。またそれに伴い、濃度依存的な抗酸化剤応答配列の転写活性化が見られた。またカドミウムの曝露により、Nrf2 の下流のタンパク質としてヘムオキシゲナーゼ-1 や NAD(P)H:キノン酸化還元酵素 1、 $\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素などの抗酸化酵素群の発現誘導が観察された。そこで、RNA 干渉により Nrf2 をノックダウンしたところ、カドミウムの細胞毒性は有意に増強された。このとき、カドミウムによる Nrf2 の下流のタンパク質の発現誘導が減弱していたが、興味深いことにメタロチオネイン-I/II の発現誘導レベルも減少していた。また、Nrf2 欠損細胞のモデルとして Nrf2 遺伝子欠損マウスの初代肝細胞を用いて検討した結果、野生型に比べ Nrf2 欠損細胞でカドミウムの細胞毒性は顕著に増強された。また同条件下において、細胞内カドミウム蓄積量に変化は見られず、カドミウムによるメタロチオネイン-I/II の発現誘導が Nrf2 の欠損細胞において減弱していた。以上の結果より、転写因子 Nrf2 はカドミウムに対して、抗酸化酵素群だけでなくメタロチオネイン-I/II の発現誘導を正に制御することにより毒性防御に働く細胞応答システムであることが示唆された。

次に、Nrf2 を負に制御している感知・応答センサーである Keap1 の役割と、メタロチオネインの発現誘導機構における Nrf2 の作用機序を検討した。その結果、無細胞系において Keap1 のチオール基とカドミウムは強い親和性を示した。また、BAEC において Keap1 をノックダウンしたところ、恒常的な Nrf2 の活性化および ARE の転写活性化が観察され、カドミウムの細胞毒性を軽減できた。同条件下において、カドミウム曝露によるメタロチオネイン-I/II の発現誘導レベルは増強していた。また、メタロチオネイン-I のプロモ-

ターアッセイを行ったところ、Nrf2のノックダウンによりそのレポーター活性は有意に低下し、この効果は当該プロモーター領域に存在するARE配列に変異を加えることでほぼ消失した。したがって、Nrf2はメタロチオネインのプロモーター領域のARE配列に依存した機構でメタロチオネインの発現誘導を正に制御していることが示唆された。加えて、Keap1欠損細胞のモデルとしてマウス初代肝細胞を用いて検討した結果、Keap1欠損細胞は野生型に比べてカドミウムの毒性に耐性を示し、メタロチオネイン-I/IIの発現誘導レベルもやはり増強していた。以上の結果より、内皮細胞はNrf2-Keap1系にてカドミウムを感知し、活性化されたNrf2がAREを介してメタロチオネイン-I/IIの発現誘導を正に制御することにより、カドミウムの毒性に対して防御に働く細胞応答システムであることが明らかとなった。

#### 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5件)

- ① Shinkai Y, Yamamoto C, Kaji T. Lead induces the expression of ER chaperones GRP78 and GRP94 in vascular endothelial cells via the JNK - AP-1 pathway. *Toxicological Sciences*, 2010, 114, 378-386. 査読有り.
- ② Hirooka T, Fujiwara Y, Minami Y, Ishii A, Ishigooka M, Shinkai Y, Yamamoto C, Satoh M, Yasutake A, Eto K, Kaji T. Cell-density-dependent methylmercury susceptibility of cultured human brain microvascular pericytes. *Toxicology In Vitro*, 2010, 24, 835-841. 査読有り.
- ③ Hirooka T, Fujiwara Y, Inoue S, Shinkai Y, Yamamoto C, Satoh M, Yasutake A, Eto K, Kaji T. Suppression of fibroblast growth factor-2 expression: possible mechanism underlying methylmercury-induced inhibition of the repair of wounded monolayers of cultured human brain microvascular endothelial cells. *Journal of Toxicological Sciences* 2009, 34, 433-439. 査読有り.
- ④ Fujiwara Y, Kitagawa T, Shinkai Y, Kaji T, Satoh M. Cilostazol induces metallothionein expression in vascular cells. *Yakugaku Zasshi* 2009, 129, 1415-1422. 査読有り.

- ⑤ Shinkai Y, Sumi D, Toyama T, Kaji T, Kumagai Y. Role of aquaporin 9 in cellular accumulation of arsenic and its cytotoxicity in primary mouse hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2009, 237, 232-236. 査読有り.

[学会発表] (計12件)

- ① 新開泰弘、山本千夏、熊谷嘉人、鍛冶利幸: 血管内皮細胞においてカドミウムの毒性防御機構を担う転写因子 Nrf1、衛生薬学・環境トキシコロジー、2009年11月5日、沖縄
- ② Daigo Sumi, Yasuhiro Shinkai, Takashi Toyama, Toshiyuki Kaji, Yoshito Kumagai: Role of aquaporin 9 in cellular accumulation of arsenic and its cytotoxicity in primary mouse hepatocytes. 第19回 金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2009年6月11日、大阪
- ③ 新開泰弘、熊谷嘉人、鍛冶利幸: 血管内皮細胞における鉛に対する小胞体ストレス応答機構の解析、日本薬学会第130年会、2009年3月28日、岡山
- ④ 新開泰弘、岩崎奈津美、山本千夏、鍛冶利幸: 鉛に曝露した血管内皮細胞におけるPERK経路を介したNrf2の活性化と毒性防御、日本薬学会第129年会、2009年3月27日、京都
- ⑤ 山本千夏、宮内靖世、新開泰弘、廣岡孝志、鍛冶利幸: FGF-2システムは血管内皮細胞に対するカドミウムの細胞毒性を担うメカニズムである、日本薬学会第129年会、2009年3月27日、京都
- ⑥ Yasuhiro Shinkai, Ayaka Itagaki, Tomoki Kimura, Chika Yamamoto, Yoshito Kumagai, Masayuki Yamamoto, Toshiyuki Kaji: The Nrf2/Keap1 system as a defense mechanism against cadmium toxicity in vascular endothelial cells. *Molecular Mechanism of Environmental Response to Food and Oxygen III*, 2009年2月10日、仙台
- ⑦ 外山喬士、角大悟、新開泰弘、鍛冶利幸、熊谷嘉人: メチル水銀によるソルビトール脱水素酵素の阻害機構、第1回メタロミクス研究会、2008年11月28日、埼玉

- ⑧ 新開泰弘、板垣礼香、木村朋紀、山本千夏、熊谷嘉人、山本雅之、鍛冶利幸：血管内皮細胞においてカドミウムの毒性に対する防御機構を担う Nrf2/Keap1 系、フォーラム 2008：衛生薬学・環境トキシコロジー、2008 年 10 月 18 日、熊本
- ⑨ 廣岡孝志、山本千夏、石井明彦、石郷岡美緒、新開泰弘、安武章、鍛冶利幸：VEGF の自己分泌／傍分泌型調節システムは脳微小血管組織におけるメチル水銀毒性の標的である、フォーラム 2008：衛生薬学・環境トキシコロジー、2008 年 10 月 18 日、熊本
- ⑩ 宮内靖世、山本千夏、新開泰弘、廣岡孝志、鍛冶利幸：血管内皮細胞に対するカドミウムの細胞毒性を担うメカニズムとしての FGF-2 システム、フォーラム 2008：衛生薬学・環境トキシコロジー、2008 年 10 月 18 日、熊本
- ⑪ 新開泰弘：カドミウムに対する血管内皮細胞の防御応答を担う Nrf2/Keap1 システム、第 27 回チョークトーク 生体と金属・化学物質に関する研究会、2008 年 8 月 23 日、水俣
- ⑫ 新開泰弘、山本千夏、熊谷嘉人、山本雅之、鍛冶利幸：カドミウムの毒性防御の細胞応答システムを担う転写因子 Nrf2、第 34 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月 26 日、東京

[その他]

ホームページ等

[http://www.md.tsukuba.ac.jp/community-med/environmental\\_medicine/main/toppage.html](http://www.md.tsukuba.ac.jp/community-med/environmental_medicine/main/toppage.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

新開 泰弘 (SHINKAI YASUHIRO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・

助教

研究者番号：10454240