

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 24 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510073

研究課題名（和文） 毒性金属曝露に対するストレスセンサーとしての小胞体の機能解明

研究課題名（英文） Functions of endoplasmic reticulum as a stress sensor to toxic metals exposure

研究代表者

松岡 雅人（MATSUOKA MASATO）

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：50209516

研究成果の概要（和文）：毒性金属であるカドミウムは、近位尿細管障害を引き起こす。そこで、小胞体ストレス抑制剤サルブリナルがカドミウムによるヒト HK-2 近位尿細管細胞アポトーシスを抑制するかどうかについて検討した。その結果、サルブリナルは、翻訳開始因子 eIF2 α のリン酸化を持続させ、細胞死シグナル伝達経路を抑制することにより、カドミウムによる HK-2 細胞のアポトーシスを抑制した。小胞体は、毒性金属曝露に対するストレスセンサーとして機能する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The toxic metal, cadmium, damages renal proximal tubular cells. We, therefore, examined the protective effects of salubrinal, a suppressor of endoplasmic reticulum stress, on apoptotic cell death in HK-2 human proximal tubular cells exposed to cadmium. Treatment with salubrinal protected cadmium-exposed HK-2 cells from apoptosis by increasing the phosphorylation of translation initiation factor, eIF2 α , and suppressing cell death signal transduction pathways. Endoplasmic reticulum may function as a stress sensor to toxic metals exposure.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、放射線・化学物質影響科学

キーワード：小胞体ストレス、毒性金属、分子シャペロン、熱ショック蛋白、シグナル伝達、トキシコロジー、環境

1. 研究開始当初の背景

細胞内小器官の一つである小胞体

(endoplasmic reticulum) は、細胞内カルシウムの貯蔵、新生蛋白質の折り畳み（フォ

ールディング) や脂質代謝など多様な生理機能を有している。細胞は、虚血、低酸素、栄養飢餓、熱ショックなどの小胞体ストレスを受けると、小胞体内に異常な折り畳み構造を持つ蛋白質が蓄積し、順次、蛋白質の翻訳抑制 → 異常蛋白質の蓄積を回避する小胞体シャペロン分子の発現誘導 → 異常蛋白質の分解促進 → 最終的手段としての細胞死 (アポトーシス) と、一連の「小胞体ストレス応答」が生じる。このように、小胞体は環境ストレスに応答するセンサーとしても機能しうるが、これまで環境毒性学の立場から「小胞体」および「小胞体ストレス応答」に着目した研究は少ない。

我々は、カドミウムを LLC-PK1 近位尿細管由来上皮細胞に曝露し、小胞体ストレスマーカーである 78-kDa glucose-regulated protein (Grp78) の発現誘導が生じることを初めて明らかにした (Environ Health Perspect 114:859-864, 2006)。また、この小胞体シャペロン分子 Grp78 の発現誘導には、翻訳開始因子 α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α) のリン酸化、その結果生じる転写因子 activating transcription factor 4 (ATF4) の翻訳亢進が関与していることを示した。その後、トリブチルスズが SH-SY5Y 神経芽細胞腫において、小胞体ストレス応答を引き起こすことも明らかにした (Environ Toxicol Pharmacol 27:158-160, 2009)。また、他研究者からも我々の結果と一致するカドミウム曝露 LLC-PK1 細胞における Grp78 発現誘導 (Cell Death Differ 14:1467-1474, 2007) のほか、腎毒性物質ゲンタマイシンやアセトアミノフェン代謝物の投与によるラット腎の Grp78 発現誘導も報告されている (Toxicol Sci 99:346-353, 2007)。しかしながら、カドミウムや他の環境汚染毒性金属曝露による小胞体ストレス応答の発生機序、シグナル伝達やその毒性学的意義については、十分な知見がない。

これまでに我々は、カドミウム、水銀、トリブチルスズなど毒性金属を曝露した細胞において、アポトーシス発生に関わるストレス応答性 MAP キナーゼ (mitogen-activated protein kinase) の c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) と p38 が活性化されることを報告してきた (Biochem Biophys Res Commun 251:527-532, 1998; Biochem Pharmacol 60:1875-1882, 2000; Toxicol Sci 53:361-368, 2000; Toxicol Appl Pharmacol 196:206-214, 2004; Toxicol Lett 152:175-181, 2004; Environ Toxicol Pharmacol 24:252-259, 2007, など)。一方、小胞体ストレスによる JNK 経路の活性化が明らかにされており (Science 287:664-666, 2000)、毒性金属曝露においても小胞体を発

信地とするシグナルにより、JNK 活性化を介したアポトーシスが生じる可能性がある。

2. 研究の目的

蛋白質の品質管理を担う小胞体に変性蛋白質が蓄積すると、その修復機構として小胞体ストレス応答が生じる。また、小胞体はアポトーシス誘導シグナルの発信地ともなる。我々は、カドミウムを曝露した近位尿細管由来上皮細胞において、小胞体ストレスマーカーであるシャペロン分子 Grp78 の発現誘導が生じることを見出した。本研究では、カドミウムなど毒性金属曝露による標的細胞・臓器における小胞体ストレス応答の発生機序、シグナル伝達系、細胞障害および防御に関わる遺伝子・蛋白質の解明を行い、毒性金属曝露に対する小胞体を介した細胞応答の毒性学的意義とその環境科学領域における可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 小胞体ストレス抑制化合物サルブリナルのカドミウム誘導アポトーシス抑制効果

① 塩化カドミウムを曝露した近位尿細管由来上皮細胞における Grp78 蛋白質、リン酸化型 eIF2 α 蛋白質、ATF4 蛋白質レベルをウェスタンブロットにより測定する。さらに、eIF2 α 蛋白質の脱リン酸化を抑制する化合物サルブリナル (salubrinal) を処理したヒト HK-2 近位尿細管由来上皮細胞における上記小胞体ストレス応答関連蛋白質レベルをウェスタンブロットにより測定する。

② サルブリナルおよびカドミウム (または他の毒性金属) 処理細胞において、アポトーシスおよびオートファジーを定量する。アポトーシスは DNA 断片化、ELISA を用いたヌクレオソーム、ウェスタンブロットによる切断型 PARP、TUNEL 法などにより定量する。オートファジーは LC-3II の発現により検出する。

③ サルブリナルを処理した HK-2 細胞に塩化カドミウムを曝露し、小胞体ストレス応答シグナル伝達経路である PERK-eIF2 α 経路により発現が調節される ATF4 ならびに他の分子の発現レベルを測定するほか、ATF4 ノックダウン HK-2 細胞におけるサルブリナルのアポトーシス抑制効果を検討することにより、ATF4 の小胞体ストレス応答における機能を明らかにする。また、PERK 以外の小胞体ストレスセンサーである ATF6、IRE1 の関与についても、各々、切断型 ATF6 の検出、XBP1 mRNA のスプライシングの測定により評価する。

④ サルブリナルおよびカドミウム (または他の毒性金属) 処理細胞において、アポトーシス誘導に関わるストレス応答性 MAP キナー

ぜである JNK と p38 の活性化ならびに Bcl-2 ファミリーや GADD153 (CHOP) の発現を評価することにより、サルブリナルによるアポトーシス抑制効果に関わるシグナル伝達機序を検討する。

⑤ 小胞体ストレス軽減効果が期待されるケミカルシャペロンの 4-フェニル酪酸 (4-PBA) を用いて、カドミウム (または他の毒性金属) 処理細胞における細胞死およびアポトーシスを定量する。

(2) 毒性金属による熱ショック蛋白 HSP110 発現誘導

培養 NIH3T3 細胞に塩化カドミウムおよび他の金属塩化物 (マンガン、亜鉛、水銀、鉛) を血清非存在下で曝露後、HSP110、HSP70、Actin 蛋白レベルをウェスタンブロットにより、同 mRNA レベルを RT-PCR にて測定する。マウス HSP110 遺伝子に対する siRNA を NIH3T3 細胞に導入した後、カドミウム曝露による細胞障害をトリパンブルー色素排除法および WST-8 アッセイにて評価する。

(3) カドミウム曝露による c-Fos 蛋白リン酸化とその毒性学的意義

HK-2 細胞に塩化カドミウムを曝露後、Fos ファミリー (c-Fos、Fra-1、Fra-2、FosB)、リン酸化型 c-Fos (Ser362、Ser374) 蛋白レベルをウェスタンブロットにより測定する。上記 Fos ファミリー mRNA レベルを real-time RT-PCR にて測定する。野生型、および Ser362、Ser374、Ser362/Ser374 アラニン変異型 c-Fos を発現させた HK-2 細胞について、カドミウム曝露後、核抽出液を調整し、c-Fos 蛋白レベルならびに AP-1/c-Fos DNA 結合活性を測定する。

4. 研究成果

以下の主要な研究成果を得た。

(1) 小胞体ストレス抑制化合物サルブリナルのカドミウム誘導アポトーシス抑制効果

① 塩化カドミウムを曝露した近位尿細管由来上皮細胞 (ヒト HK-2 細胞、ブタ LLC-PK1 細胞、マウス MCT 細胞) において、Grp78 蛋白、リン酸化型 eIF2 α 蛋白、ATF4 蛋白レベルは増加しており、カドミウム曝露による小胞体ストレス応答を認めた。eIF2 α 蛋白の脱リン酸化を抑制する化合物サルブリナルを処理した HK-2 細胞において、リン酸化型 eIF2 α 蛋白レベルの持続的な増加効果を認めた。一方、サルブリナル処理による Grp78 蛋白および ATF4 蛋白レベルへの影響はなかった。

② サルブリナル処理は、塩化カドミウムを曝露した HK-2 細胞および LLC-PK1 細胞において、トリパンブルー色素排除法、WST-8 ア

ッセイなどによる評価により、細胞死を有意に抑制することを認めた。また、TUNEL 法、切断型 PARP および非切断型カスパーゼ-3 蛋白レベルの評価により、カドミウム曝露によるアポトーシス発生が抑制されることを認めた。一方、カドミウム曝露によるオートファジーは抑制されなかった。従って、PERK-eIF2 α 経路は、カドミウム曝露による近位尿細管細胞のアポトーシスを抑制するシグナル伝達経路である可能性が考えられた。

③ siRNA を用いた ATF4 ノックダウン HK-2 細胞において、サルブリナルのカドミウム誘導アポトーシスに対する抑制効果は減弱した。従って、小胞体ストレス応答シグナル伝達経路である PERK-eIF2 α 経路により発現が調節される ATF4 蛋白の発現は、サルブリナルによるカドミウム誘導アポトーシスに対する抑制効果出現のためには必要であることが明らかとなった。

④ 塩化カドミウムを曝露した HK-2 細胞において、MAP キナーゼファミリーに属する JNK、p38 および ERK1/2 のリン酸化が認められた。このうち、サルブリナル処理は、アポトーシス誘導に関わる MAP キナーゼである JNK と p38 のリン酸化レベルを減少させた。一方、生存シグナルとされる ERK1/2 のリン酸化レベルには変動をおよぼさなかった。さらに、サルブリナル処理は、アポトーシス発生に関わる GADD153 (CHOP) 蛋白レベルも抑制した。従って、サルブリナルは、細胞死に関わるシグナル伝達系を抑制することが明らかとなった。引き続き、JNK と p38 の活性化を調節し、かつ、小胞体ストレス応答により活性化される MAP キナーゼキナーゼキナーゼ (MAP kinase kinase kinase) である apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) への作用についての検討を要する。

本研究では、サルブリナルによるカドミウム誘導アポトーシス抑制効果の機序についての詳細な分子生物学的検討を行った。サルブリナルを用いた研究は、毒性金属曝露による小胞体ストレスの毒性学的意義を検討するうえで有用である。本研究成果は、毒性学国際誌に論文発表した (Effects of salubrinal on cadmium-induced apoptosis in HK-2 human renal proximal tubular cells, Arch Toxicol, 86:37-44, 2012)。

(2) 毒性金属による熱ショック蛋白 HSP110 発現誘導

マウス NIH3T3 細胞において、10 μ M 塩化カドミウムの曝露 3 時間後より、HSP110、HSP70 蛋白レベルの上昇が認められ、24 時間後も上

昇は持続した。同様に、両 HSP mRNA レベル上昇も曝露 3 時間後から認められた。また、6 時間曝露時、濃度 (1-20 μM) 依存性の HSP110、HSP70 蛋白・mRNA レベルの上昇が認められた。10 μM 塩化第二水銀の曝露 (6、24 時間) でも、HSP110、HSP70 蛋白レベルの上昇が認められたが、同濃度の塩化カドミウム曝露に比し、軽度であった。一方、塩化マンガン、塩化亜鉛および塩化鉛曝露による HSPs 発現変動は認められなかった。siRNA を用いたノックダウンにより、カドミウム曝露による HSP110 蛋白発現誘導は、ほぼ完全に抑制された (HSP70 蛋白への影響はなし)。HSP110 ノックダウン細胞では、コントロール細胞に比し、10 μM 塩化カドミウム曝露 (6、12、24 時間) による細胞障害の有意な増強は認められなかった。

本研究では、塩化カドミウムおよび塩化第二水銀曝露により、小胞体シャペロン Grp78 蛋白のみならず、分子シャペロン HSP70 蛋白、HSP110 (HSP105) 蛋白の発現を誘導することを初めて明らかにした。siRNA による HSP110 の発現抑制は、塩化カドミウムを曝露した NIH3T3 細胞の細胞死を明らかに増強する結果は得られなかったことから、引き続き、小胞体シャペロン Grp78 蛋白および分子シャペロン HSP110 蛋白の発現誘導の毒性学的意義を検討する必要がある。本研究成果は、毒性学国際誌に論文発表した (HSP110 expression is induced by cadmium exposure but is dispensable for cell survival of mouse NIH3T3 fibroblasts, *Environ Toxicol Pharmacol*, 29:260-265, 2010)。

(3) カドミウム曝露による c-Fos 蛋白リン酸化とその毒性学的意義

カドミウム曝露後、*c-fos*、*fra-1*、*fra-2*、*fosB* mRNA レベル増加を認め、*c-fos* 遺伝子発現は曝露 2 時間後に最大 (40 倍) に達した。カドミウムの曝露濃度 (5-100 μM) および曝露時間 (1-8 時間) に依存したバンドシフトを伴う c-Fos 蛋白レベルの増加が認められた。さらに、この c-Fos 蛋白の変動に一致したリン酸化型 c-Fos (Ser362、Ser374) 蛋白レベル増加が認められた。ERK キナーゼ (MEK1/2) 阻害剤 U0126 および p38 阻害剤 SB203580 処理により、カドミウム曝露による c-Fos およびリン酸化型 c-Fos (Ser362、Ser374) 蛋白レベル増加が抑制された。一方、JNK 阻害剤 SP600125 処理による影響は認められなかった。Ser374 および Ser362/Ser374 アラニン変異型 c-Fos 導入細胞では野生型導入細胞に比し、有意な c-Fos 蛋白レベルの低下が認められた。c-Jun をコトランスフェクションした Ser362/Ser374 アラニン変異型 c-Fos 導入細胞では野生型導入細胞に比し、カドミウム曝

露による AP-1/c-Fos DNA 結合活性上昇は約 50%低下した。

本研究では、カドミウムを曝露した近位尿細管由来上皮細胞における Ser362、Ser374 部位のリン酸化を伴う c-Fos 蛋白の蓄積を初めて明らかにした。c-Fos 発現誘導とそのリン酸化は、ERK と p38 経路が主要なシグナル伝達系であり、c-Fos 蛋白蓄積には、Ser374 部位リン酸化による安定化が重要であると考えられた。また、Ser362、Ser374 両部位リン酸化は、カドミウム曝露により生じる AP-1/c-Fos DNA 結合活性上昇に関与すると考えられた。c-Fos 蛋白リン酸化と小胞体ストレス応答との関連については、今後の更なる検討を要する。本研究成果は、毒性学国際誌に論文発表した (Cadmium induces phosphorylation and stabilization of c-Fos in HK-2 renal proximal tubular cells, *Toxicol Appl Pharmacol*, 251:209-216, 2011)。

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)

① Komoike Y, Inamura N, Matsuoka M, Effects of salubrinal on cadmium-induced apoptosis in HK-2 human renal proximal tubular cells, *Archives of Toxicology*, 86:37-44, 2012 (査読有)

② Iwatsuki M, Inageda K, Matsuoka M, Cadmium induces phosphorylation and stabilization of c-Fos in HK-2 renal proximal tubular cells, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 251:209-216, 2011 (査読有)

③ Ridley W, Nishitai G, Matsuoka M, HSP110 expression is induced by cadmium exposure but is dispensable for cell survival of mouse NIH3T3 fibroblasts, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 29:260-265, 2010 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

① 松岡雅人、カドミウム刺激からみた細胞応答反応、第 455 回難研セミナー/第 28 回難治疾患共同研究拠点セミナー、2011 年 4 月 21 日、東京

② 蔣池勇太、松岡雅人、カドミウムが誘導する近位尿細管上皮細胞アポトーシスのサルブリナルによる抑制、第 81 回日本衛生学会総会、2011 年 3 月 26 日、東京 (震災のため Web 開催)

③ 蔣池勇太、松岡雅人、サルブリナルによるカドミウム誘導ヒト近位尿細管上皮細胞アポトーシスの抑制、臨床ストレス応答学会、

2010年11月20日、徳島

④ 岩月麻美子、松岡雅人、カドミウム曝露HK-2 近位尿細管細胞における c-Fos 発現と AP-1 活性化、第 80 回日本衛生学会総会, 2010年5月11日、仙台

⑤ 松岡雅人、環境ストレス応答シグナル伝達系の役割、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 2009、2009年10月16日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 雅人 (MATSUOKA MASATO)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：50209516

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし