

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 5 月 15 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年度 ～ 2011 年度

課題番号：21590651

研究課題名（和文）カドミウムと環境化学物質の複合影響に関する研究

研究課題名（英文）Studies on combined effects of low-dose cadmium and environmental chemicals

研究代表者 稲寺 秀邦（INADERA HIDEKUNI）

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・教授

研究者番号 10301144

研究成果の概要（和文）：カドミウム（Cd）と環境化学物質の複合影響を実験的に検討した。ヒトリンパ腫細胞株 U937 細胞は、アポトーシスに対する感受性が高く、50 マイクロモルの塩化 Cd を 12 時間添加するとアポトーシスが誘導される。アポトーシスを誘導しない 1 マイクロモルの塩化 Cd にて 72 時間前処理すると、50 マイクロモルの塩化 Cd により誘発されるアポトーシスに対する抵抗性を獲得した。そのメカニズムとして、ROS 産生と JNK 活性化が抑制され、アポトーシス感受性に影響を与える Bcl-2 ファミリー蛋白質の発現が影響を受けていた。低濃度カドミウム曝露は、細胞のアポトーシス感受性に影響を与えることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Cadmium (Cd) is a potential environmental hazard that induces disorders in various organs. In this study, we examined the molecular mechanisms involved in the adaptive response to Cd-induced apoptosis in human myelomonocytic lymphoma U937 cells. When U937 cells were treated with 50 μ M cadmium chloride (CdCl_2) for 12 hours, significant apoptosis occurred. This was associated with an increase in intracellular reactive oxygen species (ROS), sustained phosphorylation of JNK, activation of caspase-3, a decrease in Mcl-1 (anti-apoptotic Bcl-2 proteins), and increases in Bim, Noxa and tBid (a pro-apoptotic protein under the Bcl-2 family). No apoptosis occurred when the cells were treated with 1 μ M CdCl_2 for 72 hours. However, pretreatment with low-dose CdCl_2 dramatically altered the sensitivity of the cells to 50 μ M CdCl_2 with inhibition of apoptosis. Concomitantly, there were significant decreases in the generation of intracellular ROS and the activation of JNK. Pretreatment with 1 μ M CdCl_2 also attenuated the decrease in Mcl-1 and the increases in Bim, Noxa and tBid induced by 50 μ M CdCl_2 . The inhibition of apoptosis following exposure to low-dose Cd suggests a potential mechanism that may help explain why people exposed to low doses of Cd for a long time have an increased risk of developing certain cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：環境保健・カドミウム

1. 研究開始当初の背景

工業化時代の発展とともに、環境中には様々な化学物質が放出されてきた。化学物質は日常生活に不可欠な存在であり、その利便性、有用性から人類の生活レベルの向上に貢献している。その一方、野生生物やヒト、さらには環境に大きな被害を与えた事例は数多い。

重金属のカドミウムは、長期曝露により腎尿細管障害、骨軟化症を引きおこし、イタイイタイ病の原因物質である。現在、わが国では、環境汚染や産業現場におけるカドミウム中毒はほとんど認められていない。一方、カドミウムは米や食品や喫煙を介して生涯にわたり身体に取りこまれるため、長期微量曝露による健康影響が懸念されている。わが国はカドミウムによる土壌・水環境中の汚染が、諸外国に比べて高レベルにあり、米食等を介して体内に取りこむカドミウム量が多い。このため、環境化学物質の生体影響を考える際には、カドミウム汚染がベースにあることを考慮した複合影響を評価する必要がある。

生体が低濃度カドミウムに曝露された際、他の環境化学物質に対する感受性・応答性の変化を検討することは重要な課題である。

2. 研究の目的

申請者が所属する富山大学医学部公衆衛生学講座は、これまで疫学的手法を用いて「イタイイタイ病」の病態解明、カドミウムの生体への影響評価、リスクアセスメントの分野において、多くの業績をあげてきた。本申請研究は、これらの研究成果をふまえ、細胞生物学的・分子生物学的手法を用いて、生体がカドミウムと環境化学物質に複合的に曝露した際の影響について実験的に検討することを目的とする。

わが国では、カドミウムによる環境汚染が様々な地域で残存しており、カドミウムの生体影響に関する研究は、疫学的手法を用いて

多くのフィールドで行われてきた。本申請研究は、実験的手法を用いて、低濃度カドミウムと環境化学物質の複合影響評価を行う。

低濃度カドミウム曝露による生体への影響を評価する上での基盤となる知見を集積するとともに、環境化学物質の生体へのリスク評価を行う際の基礎的なデータを取得することを目的とする。

3. 研究の方法

カドミウムは発がん性を有することが報告されているが、その詳細な分子機構については十分に明らかではない。発がんの分子機構のひとつとして、細胞がアポトーシスに対する抵抗性を獲得することが知られている。すなわち、本来アポトーシスが生じるべき時期にアポトーシスが生じないことにより、細胞の異常増殖が引きおこされ、発がんに結びつく可能性が考えられる。そこで培養細胞を用いてこのような現象が認められるか、認められた場合、その分子機構を明らかにすることを目的として検討を行った。

ヒトリンパ腫細胞株U937細胞を用い、低濃度カドミウムで前処理した時の、高濃度カドミウム誘発アポトーシスに対する感受性の変化について検討した。細胞の生存能は、Cell Counting Kit-8を用いて測定した。細胞のアポトーシスは、annexin V、propidium iodideを用いて評価した。DNAの断片化は、SellinsとCohenの方法により評価した。細胞内のreactive oxygen species (ROS)の発生は、Gormanらの方法により判定した。細胞のミトコンドリア膜電位についてはフローサイトメーターを用いて評価した。またアポトーシスにかかわる蛋白質の発現をウェスタンブロット法により検討した。

4. 研究成果

ヒトリンパ腫細胞株 U937 細胞を、種々の濃度の塩化カドミウムにて処理し、その生存能を検討した。1 マイクロモルの塩化カドミウム 72 時間までの添加は、細胞の生存能に影響を与えなかった。またアポトーシスは、塩化カドミウム 10 マイクロモル、72 時間の添加により誘導されなかった。一方、50 マイクロモルの塩化カドミウムを 12 時間添加するとアポトーシスが誘導された。その分子機構を検討すると、ミトコンドリア膜電位の低下、細胞内 ROS の上昇、JNK の活性化、カスパーゼ 3 の活性化が関与していた。

一方、U937 細胞をあらかじめ、アポトーシスを誘導しない 1 マイクロモルの塩化カドミウムにて 72 時間前処理すると、50 マイクロモルの塩化カドミウムにより誘発されるアポトーシスに対する抵抗性を獲得した。その分子機構を検討すると、低濃度カドミウムの前処理により、ROS の産生と JNK 活性化が抑制されていた。さらに前処理により、50 マイクロモルの塩化カドミウム単独処理により生じる Mcl-1(anti-apoptotic Bcl-2 protein)の発現低下、Bim、Noxa、tBid(いずれも pro-apoptotic proteins under the Bcl-2 family)の発現上昇が抑制されることが明らかとなった。すなわち、細胞のアポトーシス感受性に影響を与える Bcl-2 ファミリー蛋白質の発現が影響を受けることが明らかとなった。

本研究により、低濃度カドミウム曝露は、細胞のアポトーシス感受性に影響を及ぼすことが明らかとなった。すなわち、低濃度のカドミウム曝露によりアポトーシスに対する抵抗性が獲得されることが見出され、低濃度カドミウム曝露の生体障害機構の一端を明らかにした。

この成果は、カドミウムによる発がんの分子機構の一端を説明しうるものと推測される。また、カドミウムの生体影響・リスク評価を行う際の重要な知見を提供するものである。低濃度カドミウムの生体影響評価については、今後も、培養細胞や動物を用いた実験的な検討が必要である。

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 6 件)

1. Cui Z-G, Ogawa R, Piao J-L, Hamazaki K, Feril L.B, Shimomura A, Kondo T, and Inadera H. Molecular mechanisms involved in the adaptive response to cadmium-induced apoptosis in human myelomonocytic lymphoma U937 cells. *Toxicol. in vitro* 25:1687-1693, 2011. (査読有)
2. Tachibana S, Shimomura A, and Inadera H. Toxicity monitoring with primary cultured

hepatocytes underestimates the acetaminophen-induced inflammatory responses of the mouse liver. *Tohoku J. Exp. Med.* 225:263-272, 2011. (査読有)

3. Hamazaki K, Terashima Y, Itomura M, Sawazaki S, Inagaki H, Kuroda M, Tomita S, Hirata H, Inadera H, and Hamazaki T. Docosahexaenoic acid is an independent predictor of all-cause mortality in hemodialysis patients. *Am. J. Nephrol.* 33:105-110, 2011. (査読有)
4. Inadera H, Tachibana S, Takasaki I, Tatematsu M, and Shimomura A. Hyperglycemia perturbs biochemical networks in human trophoblast BeWo cells. *Endocr. J.* 57:567-577, 2010. (査読有)
5. Inadera H, Tachibana S, Suzuki A, and Shimomura A. Carbon tetrachloride affects inflammation-related biochemical networks in the mouse liver as identified by a customized cDNA microarray system. *Environ. Health Prev. Med.* 15:105-114, 2010. (査読有)
6. Inadera H, Shimomura A, and Tachibana S. Effect of Wnt-1 inducible signaling pathway protein-2 (WISP-2/CCN5), a downstream protein of Wnt signaling, on adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379: 969-974, 2009. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. 崔正国, 近藤隆, 稲寺秀邦 : ドコサヘキサエン酸による温熱誘発アポトーシスの増強とその分子メカニズムの検討. 第 82 回日本衛生学会総会. 2012, 3, 25. 京都.
2. 稲寺秀邦, 崔正国, 橘信二郎 : トランスクリプトーム解析を用いた高血糖の胎盤絨毛細胞分化に及ぼす影響の検討. 第 82 回日本衛生学会総会. 2012, 3, 25. 京都.
3. 崔正国, 小川良平, 浜崎景, 寺西秀豊, 近藤隆, 稲寺秀邦 : 低濃度カドミウム (Cd) 前処理による高濃度 Cd 誘発アポトーシス抵抗性の獲得機構の検討. 第 81 回日本衛生学会学術集会. 2011, 3, 27. 東京.
4. 崔正国, 稲寺秀邦, 寺西秀豊, 浜崎景, 近藤隆 : 細胞内活性酸素生成の修飾による温熱誘発アポトーシスの増強. 第 80 回日本衛生学会学術集会. 2010, 5, 10. 仙台.
5. 稲寺秀邦, 橘信二郎, 崔正国, 下村明子 : 有害化学物質の生体影響評価のための DNA マイクロアレイの構築. 第 80 回日本衛生学会学術集会. 2010, 5, 10. 仙台.

[図書] (計 1 件)

- 1) 稲寺秀邦 : 環境エストロゲン 「分子予防環境医学」分子予防環境医学研究会編本の泉社 (東京) 623-627, 2010.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/pubhlth/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲寺 秀邦 (INADERA HIDEKUNI)

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・
教授

研究者番号：10301144

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

崔 正国 (CUI ZHENG-GUO)

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・
助教

研究者番号：90572115