

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12259

研究課題名(和文)新規カドミウム毒性修飾因子の同定とその調節機構

研究課題名(英文) Identification of the modifying factors of cadmium toxicity

研究代表者

李 辰竜 (LEE, JINYONG)

愛知学院大学・薬学部・准教授

研究者番号：80581280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腎臓内のどの遺伝子がカドミウム感受性を決定しているのかを検討した。まず、DPYS (dihydropyrimidinase)の発現抑制によるカドミウム毒性が増強されることを見いだした。DPYS mRNAレベルは、カドミウムの6時間処理により、減少傾向を示した。また、6時間のCd処理もDPYSタンパク質レベルを若干減少する傾向を示した。DPYSは、細胞内チミンおよびウラシルの分解酵素であり、細胞内核酸レベル調節に関与している。ウラシル処理は、Cd毒性を増強させた。以上の結果より、Cd毒性は、DPYSの細胞レベルまたはその基質のレベル変動によって調節される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、カドミウムの毒性発現および防御機構におけるDPYSの役割を明らかにすることを目的とした。本研究は、本申請者がカドミウム毒性発現に関わる新たな細胞内因子として見いだしたDPYSの役割解明しており、学術的独自性がある。しかも、カドミウムの毒性発現におけるDPYSの役割解析は世界で初めての報告となり、学術的独自性が高いといえる。本研究によって、新たなカドミウム毒性発現機構が明らかになり、カドミウム毒性研究、さらに金属毒性学研究的発展にも大きく貢献することである。

研究成果の概要(英文)：This study examined which genes in the kidney determine cadmium sensitivity. First, we found that cadmium toxicity was enhanced by suppression of expression of DPYS (dihydropyrimidinase). DPYS mRNA levels showed a downward trend with 6-h treatment with cadmium. In addition, Cd treatment for 6 h also showed a slight tendency to reduce DPYS protein levels. DPYS is a degrading enzyme of intracellular thymine and uracil and is involved in the regulation of intracellular nucleic acid levels. Uracil treatment enhanced Cd toxicity. These results suggest that Cd toxicity may be regulated by the cellular level of DPYS and its substrates.

研究分野：分子毒性学

キーワード：カドミウム DPYS Uracil

1. 研究開始当初の背景

カドミウム (Cd) は、イタイイタイ病の原因物質として知られており、その慢性中毒患者に共通して認められる症状は、腎臓の近位尿細管機能障害である。カドミウムの生物学的半減期は15~30年と長いこと、ヒト体内のCd濃度は加齢とともに増加する。Cdは日本人の主食であるコメの中に比較的多く含まれており、一般人が1日に摂取するCdの約50%はコメに由来する。コメを主食とする日本人は欧米人に比べてCdの体内蓄積量が多く、日本人の腎臓中のCd蓄積量は一部の高齢者で約100 ppmに達している。したがって、食品を介したCdの長期摂取による高齢者の健康影響については十分な注意が必要となる。さらに、Cdによる慢性中毒(腎毒性)の発症には個体差が認められており、高感受性の集団が存在することから、感受性因子の同定は、食品を介したCdの慢性曝露による高齢者の健康影響を評価する上で、極めて重要である。

2. 研究の目的

本報告者は、HK-2細胞において、Cdが様々な遺伝子の発現レベルを変動させて細胞毒性を引き起こすことを見いだしている。特に、CdはFOXF1、YY1およびARNT転写因子の転写活性を抑制し、それらの下流遺伝子の発現低下を介してアポトーシスを誘導することも明らかにしている。これらの知見は、腎臓細胞内遺伝子発現の変動が、Cd感受性決定に重要であることを示唆している。Cdに対する生体内防御因子として、金属結合タンパク質であるメタロチオネインが知られているが、Cdによる慢性腎毒性発症の個体差をメタロチオネインの発現量だけでは説明できず、不明な点も残っている。しかも、生体防御因子の量的変動は、Cdの感受性に大きく影響する。したがって、Cd慢性曝露による健康影響を評価するために、腎臓内のどの遺伝子がCd感受性を決定しているのかの問題が、本研究課題の目的である。

3. 研究の方法

他組織に比べて腎臓中に4倍以上発現している遺伝子をThe Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org>)サイトより検索し、36種の遺伝子を選定した。それぞれの遺伝子を標的とするsiRNAをHK-2細胞にトランスフェクションし、Cd感受性を調べた。siRNAトランスフェクションはlipofectamineを利用し、細胞生存率はalamarBlue法で測定した。mRNAレベルをリアルタイムRT-PCR法で測定し、タンパク質レベルをウエスタンブロット法で評価した。

4. 研究成果

(1) Cd感受性に影響を及ぼす遺伝子スクリーニング

網羅的なスクリーニングによって、*AQP6*、*OTOGL*および*SOST* siRNA処理はHK-2細胞のCdを軽減させた。また、*CRYAA*および*DPYS* siRNA処理は、HK-2細胞におけるCd毒性を増強した (Fig 1)。

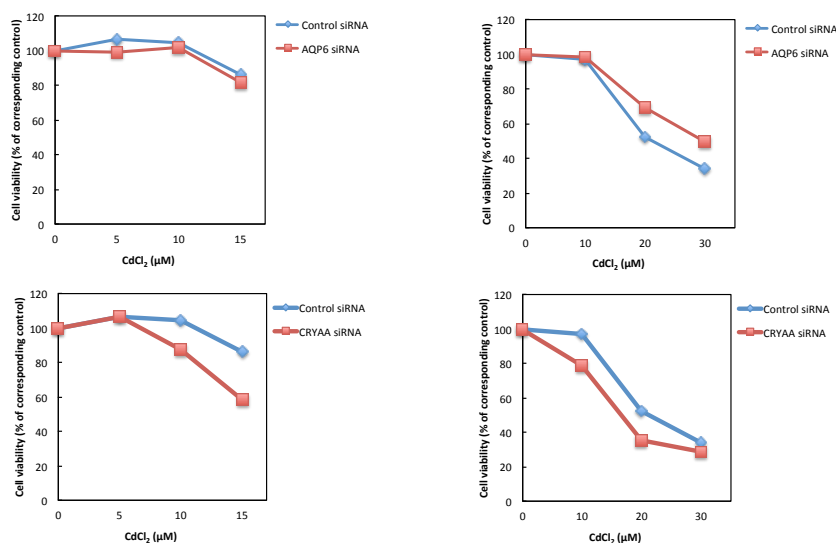


Fig. 1. The primary screening on the Cd sensitivity by siRNA treatment against the genes highly expressed in the kidney.

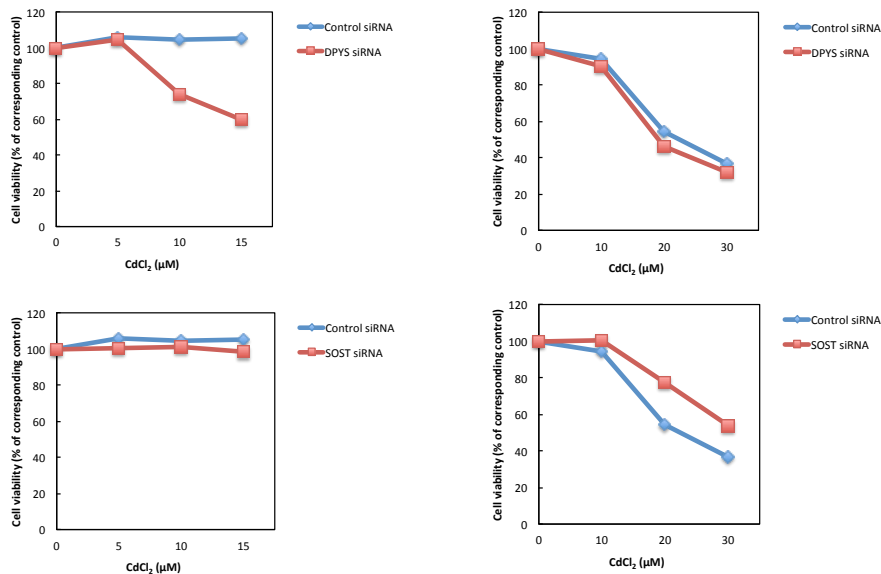


Fig. 1 (continued). The primary screening on the Cd sensitivity by siRNA treatment against the genes highly expressed in the kidney.

(2) Cd 感受性に影響を及ぼす遺伝子の特定

Cd 感受性に影響を与えられる候補遺伝子の役割を確かめるため、siRNA 処理によるノックダウン効率および更なる毒性評価を行った。その結果、*CRYAA* および *DPYS* siRNA 処理による十分なノックダウン効果が得られた (Fig 2)。また、両遺伝子のノックダウンにより、著しい Cd 感受性上昇作用が示された (Fig 2)。この結果より、*CRYAA* および *DPYS* の発現低下は、Cd 毒性を増強させることが示唆された。

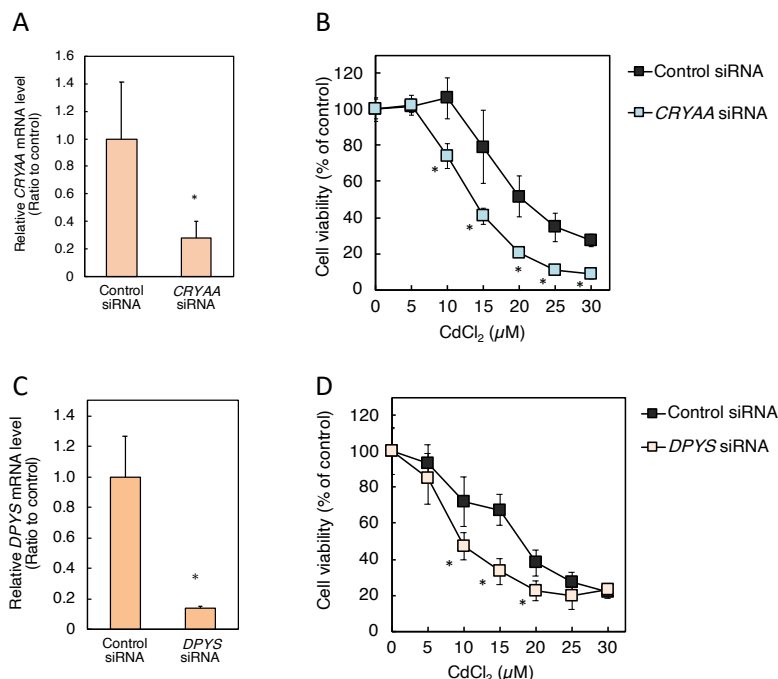


Fig. 2. Effects of *CRYAA* and *DPYS* knockdown on the viability of HK-2 cells treated with Cd.

(3) *CRYAA* および *DPYS* siRNA 処理が水銀化合物毒性に及ぼす影響

CRYAA および *DPYS* 発現低下による感受性変動作用の Cd 特異性を確認するため、両遺伝子の siRNA 処理が水銀化合物の毒性発現に及ぼす影響について検討した。両遺伝子に対する siRNA 処理は、水銀化合物の感受性に影響を及ぼさなかった (Fig 3)。この結果より、*CRYAA* および *DPYS* の毒性変動作用は、Cd 特異的である可能性が考えられる。

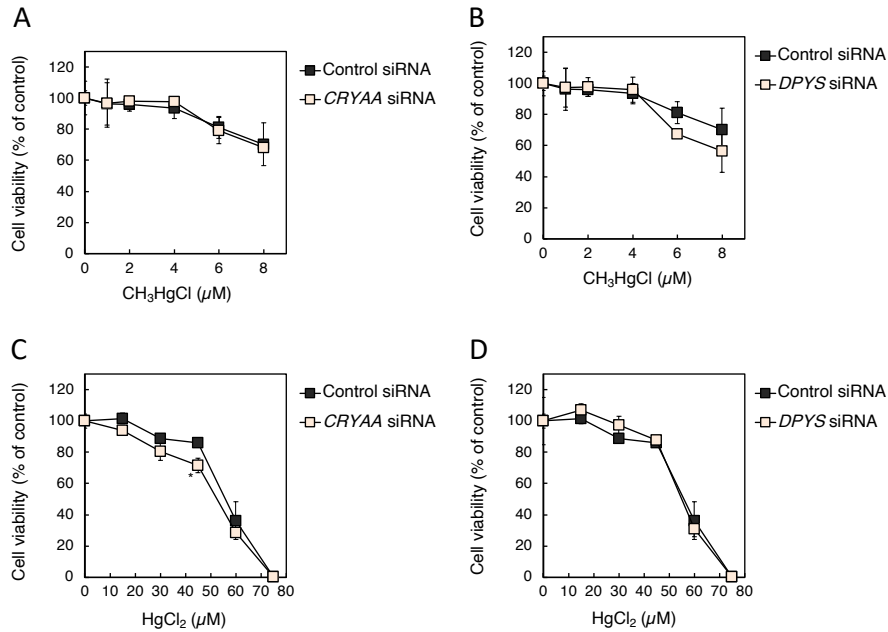


Fig. 3. Effects of CRYAA and DPYS knockdown on the viability of HK-2 cells treated with mercury compounds.

(4) 細胞内 DPYS の発現レベルに及ぼす Cd の影響

DPYS mRNA レベルは、Cd の 6 時間処理により、減少傾向を示した (Fig 4)。また、DPYS siRNA 処理は、DPYS がコードする dihydropyrimidinase タンパク質レベルを低下させ、また、6 時間の Cd 処理も dihydropyrimidinase タンパク質レベルを若干減少する傾向を示した (Fig 4)。以上の結果より、Cd は、細胞内 DPYS 発現を抑制することによって細胞毒性を引き起こす可能性が示唆される。

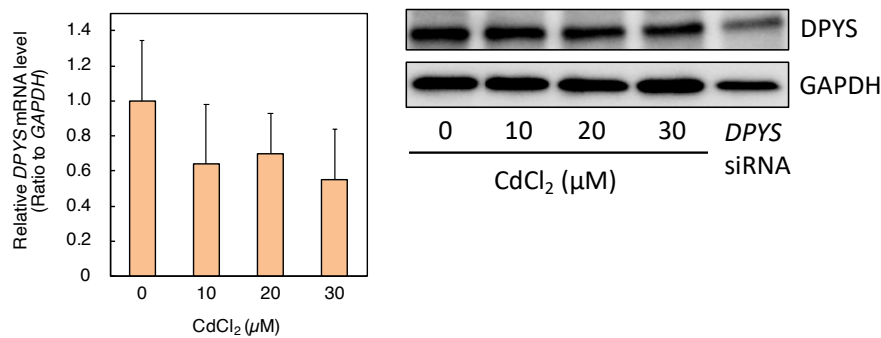


Fig. 4. Effects of Cd on mRNA and protein levels of DPYS in HK-2 cells.

(5) Dihydropyrimidinase の基質処理による Cd 毒性発現変動

Dihydropyrimidinase は、細胞内チミンおよびウラシルの分解酵素であり、細胞内核酸レベル調節に関与している。チミンの 48 時間前処理は、Cd 毒性に影響を与えなかったが、1 mM のウラシル処理は、Cd 毒性を増強させた。なお、チミンおよびウラシルを同時に前処理した結果、ウラシル単独の前処理と同様な Cd 毒性増強作用を示した (Fig. 5)。以上の結果より、近位尿管細胞における Cd 毒性は、DPYS の細胞レベルまたはその基質のレベル変動によって調節される可能性が示唆された。

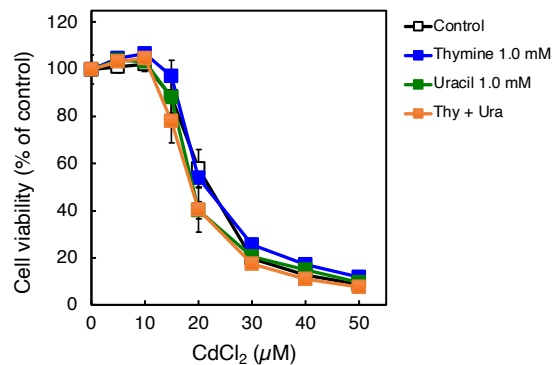


Fig. 5. Effects of pretreatment of thymine and uracil on the Cd toxicity in HK-2 cells.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Lee Jin-Yong, Tokumoto Maki, Satoh Masahiko	4. 巻 7
2. 論文標題 Identification of Genes Affecting Cd Toxicity in HK-2 Cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 66 ~ 70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpbreports.7.2_66	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高井玲菜、李辰竜、徳本真紀、佐藤雅彦
2. 発表標題 カドミウムによるdihydropyrimidinaseの発現変動
3. 学会等名 第68回日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 李辰竜、高井玲菜、徳本真紀、佐藤雅彦
2. 発表標題 Dihydropyrimidinaseの発現抑制によるカドミウム毒性増強作用
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 李辰竜、高井玲菜、徳本真紀、佐藤雅彦
2. 発表標題 カドミウム毒性に及ぼすdihydropyrimidinaseの発現抑制の影響
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2023
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	佐藤 雅彦 (Sato Masahiko) (20256390)	愛知学院大学・薬学部・教授 (33902)	
研究 分担者	徳本 真紀 (Tokumoto Maki) (90614339)	愛知学院大学・薬学部・講師 (33902)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	森 稚景 (Mori Chikage)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------