

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590168

研究課題名(和文)カドミウムおよびマンガンの標的臓器における金属輸送機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of transport mechanism of cadmium and manganese in their target organs

研究代表者

藤代 瞳 (Fujishiro, Hitomi)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：10389182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：カドミウム(Cd)の標的組織である腎臓近位尿細管の領域特異的由来細胞(S1, S2, S3)を用いた検討によりS1, S2, S3領域ごとに管腔側および血管側からのCdの取り込みおよび排泄を解析した結果、尿細管の部位によってCdイオンの取り込みおよび排泄が異なることを見出した。神経細胞におけるMn取り込みには、DMT1のみならずZIP14が関与し、脳疾患の病変での上昇が報告される炎症性サイトカインによってMnの取り込みおよび排泄が変化し、神経細胞へのMn蓄積が増加する可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the mechanism of Cd and Mn transport in the target organs of their toxicity. To examine Cd transport in the proximal tubule of kidney, we obtained immortalized cells derived from S1, S2, and S3 segments of mouse proximal tubule. We found that different patterns of Cd uptake and excretion among segment-specific proximal tubule epithelial cells. We demonstrated that not ZIP14 which is inducible by cytokines, might play an important role in the uptake of Mn in neuronal cells. The inflammatory cytokine enhanced the accumulation of Mn to neuronal cells via the increase in Mn uptake and the decrease in Mn excretion. These data suggest that metal transporters might play an important role in accumulation of Mn in the brain of neurodegenerative diseases where the levels of inflammatory cytokine are abnormally elevated.

研究分野：環境分子生物学

キーワード：カドミウム マンガン 輸送 腎臓 神経 消化管

### 1. 研究開始当初の背景

Cd は広く地殻に分布し、米や魚介類に蓄積する。そのため、米を主食にする日本人は欧米人に比べて Cd の体内蓄積量が多い。しかし、Cd がどのようにして細胞に取り込まれるのかという基本的なことからよくわかっていなかった。古くから Cd は Ca チャネルや Fe 輸送体を介して細胞内に取り込まれると考えられていた。本申請者は、これまでに、マウス胎仔由来繊維芽細胞およびラット好塩基性白血病細胞を用いた解析により、Cd 輸送に Zn 輸送体の ZIP8, ZIP14, 鉄輸送体の DMT1 が関与することを明らかにしてきた。また、その過程で、Cd と Mn は共通する輸送系を介して細胞内に取り込まれていることを明らかにしてきた。

しかし、実際の Cd 毒性の標的組織である腎臓や、食物からの Cd の吸収に関する小腸において、ZIP8, ZIP14, DMT1 が具体的にどの程度関与しているのかについてはまだ良く分かっていなかった。また Mn 中毒によってパーキンソン病様症状が起こることが古くから知られているが、実際に神経細胞にどのようにして Mn が取り込まれるのかについてもほとんど分かっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、Cd 毒性の標的組織である腎臓、小腸における Cd 輸送機構を動的に解析する。Mn の毒性の標的組織である脳における Mn 輸送について解析し、亜鉛(Zn)および鉄(Fe)の代謝との関係を明らかにする。

ZIP8, ZIP14, DMT1 による Cd および Mn 取り込みを調節する生体内因子を探索する。以上により、Cd と Mn の標的臓器における組織特異的な金属輸送体の役割と調節因子を明らかにする。

### 3. 研究の方法

Cd 毒性の標的組織である腎臓近位尿管の S1, S2, S3 領域由来の不死化細胞を入手し、管腔側と血管側からの金属取り込みを分けて測定できるカップ培養システムを用いて培養可能かどうか電気抵抗値およびタイトジャンクション形成能について検討する。その後、それぞれの部位での管腔側および血管側からの Cd 取り込みおよび排泄機構を動的に

解析する。競合実験による阻害金属の影響について検討する。また、各部位における Cd 動態に対する MT の影響も明らかにする。

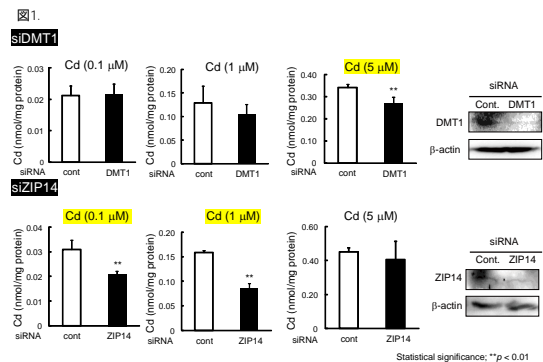
消化管のモデル細胞として Caco-2 細胞を使用し、消化管からの Cd の取り込みに関与する可能性のある DMT1, ZIP8, ZIP14, CaT1 の輸送体の siRNA をそれぞれ細胞に導入して発現抑制し、カップ培養システムへと移し、抵抗値の上昇を確認後、管腔側からの Cd の取り込みに対する影響を解析する。

Mn 毒性の標的組織であるヒト神経芽細胞腫の SH-SY5Y 細胞を使用し、3 つの輸送体 (ZIP8, ZIP14, DMT1) に注目し、それぞれの金属輸送体の siRNA を導入して発現抑制し、Mn 取り込みへの影響を解析する。また、SH-SY5Y 細胞に IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  を添加し、mRNA レベルおよびタンパクレベルで各金属輸送体発現量の影響と金属取り込みおよび排泄、蓄積量の変化を解析する。

### 4. 研究成果

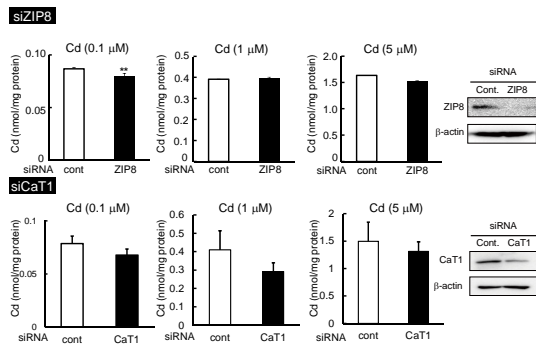
#### (1) 消化管上皮細胞における Cd 輸送機構

消化管については、モデル細胞として Caco-2 細胞を使用し、カップ培養システムを用いて管腔側からの Cd の取り込みに、すでに報告のある DMT1 に加えて ZIP14 が関与す



る可能性を検討した。それぞれの金属輸送体の siRNA を細胞に導入後、カップ培養系へと細胞を移し、管腔側からの Cd の取り込みに対する影響を検討した。DMT1 を発現抑制すると 5 μM の Cd 取り込みが低下したが、ZIP14 の発現を抑制すると、0.1, 1 μM の Cd 取り込みが著しく低下したことから、ZIP14 は食事に含まれるような低濃度の Cd の吸収に重要な役割を果たす可能性を見出した (図 1)。

図2.

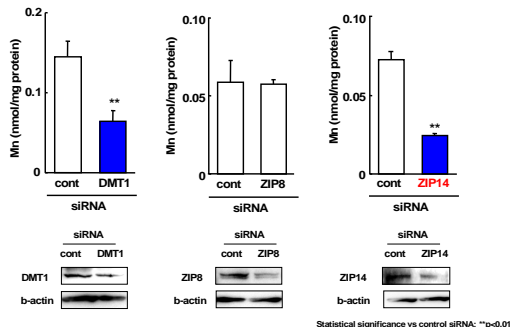


消化管からの Cd の吸収に関して、カルシウムトランスポーターの CaT1 が関与する可能性がある。そこで、CaT1 を Caco-2 細胞において発現抑制した結果、0.1, 1.0, 5.0 μM のいずれの濃度の Cd の取り込みも有意な差は見られなかった (図 2)。よって、消化管モデル細胞である Caco-2 細胞において、5 μM 以上の Cd に対しては DMT1 が、1 μM 以下の Cd に対しては ZIP14 が Cd の取り込みに関与する可能性が示唆された。

## (2) 神経細胞における Mn 輸送機構の解析

Mn の脳神経細胞における取り込みには、Fe 輸送体の DMT1 およびトランスフェリン受容体の関与しか検討されていない。そこで、神経細胞における Mn 輸送に ZIP8, ZIP14 および DMT1 が関与するか検討した。また、肝臓において ZIP14 は IL-6 に応答して発現上昇することが知られており、近年、脳変性疾患の病変における炎症性サイトカインの上昇が報告されているため、神経細胞における炎症性サイトカインの金属輸送に対する影響を解析した。

図3.

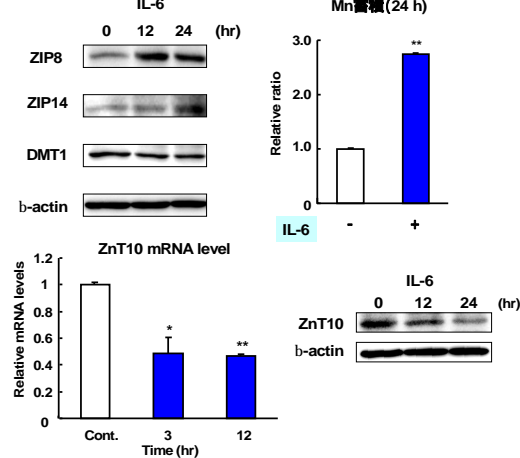


SH-SY5Y 細胞に、DMT1 siRNA および ZIP14 siRNA を導入して輸送体の発現を抑制すると、Mn<sup>2+</sup>取り込み効率は control siRNA 導入細胞に比べて顕著に低下した。しかし、ZIP8 の発現を抑制した際には、Mn<sup>2+</sup>取り込み効率は変化しなかった。(図 3)

次に、SH-SY5Y 細胞を IL-6 に曝露し、金属輸送体の発現への影響を調べた結果、Mn の輸送に関与する ZIP8 および ZIP14 の発現

が IL-6 によって上昇することが分かった。しかし、DMT1 の発現は変化しなかった。また、IL-6 曝露後の Mn の取り込みおよび蓄積を調べた結果、Mn 蓄積が約 2.5 倍に上昇した。一方、近年 Mn の輸送に関与する可能性が知られている ZnT10 に対する IL-6 の影響を調べた結果、ZnT10 の発現が IL-6 によって低下することを見出した。そこで、SH-SY5Y 細胞を IL-6 に曝露した時の Mn の排泄効率について調べた結果、Mn の排泄効率が IL-6 によって低下することが分かった。以上の結果より、SH-SY5Y 細胞を IL-6 に曝露することによって起こる Mn 蓄積の上昇は、ZIP8 および ZIP14 の発現上昇による Mn 取り込みの上昇と ZnT10 の発現低下による Mn 排泄効率の低下の両方が関与している可能性が示唆された (図 4)。(発表論文)

図4.



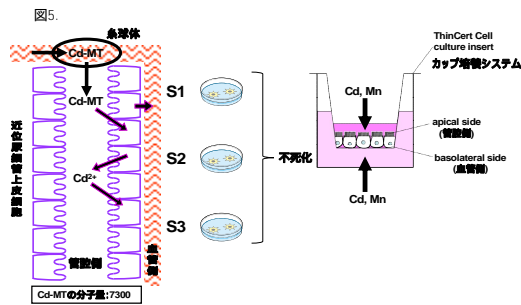
次に、IL-6 以外の TNF-α, IL-1β に SH-SY5Y 細胞を曝露した時の影響を解析した結果、TNF-α により ZIP8, ZIP14 が、IL-1β により ZIP8 が発現誘導された。一方、Mn の排泄に関与する可能性が報告されている ZnT10 の発現が TNF-α, IL-1β によって低下することが分かった。以上の結果より、IL-6 と同様に、TNF-α と IL-1β も Mn 輸送体の発現を変化させ、Mn 蓄積を増加させることが明らかになった。

近年、様々な脳変性疾患脳での炎症性サイトカインの役割が報告されているため、これらのサイトカインが Mn 蓄積の増加を引き起こし、脳疾患の悪化を引き起こす可能性が示唆された。

## (3) 腎臓近位尿細管における Cd 輸送機構

カドミウム (Cd) の毒性標的である腎臓近位尿細管において、Cd はメタロチオネン (MT) と結合した Cd-MT の形で糸球体を通過し、近位尿細管の S1 領域からエンドサイ

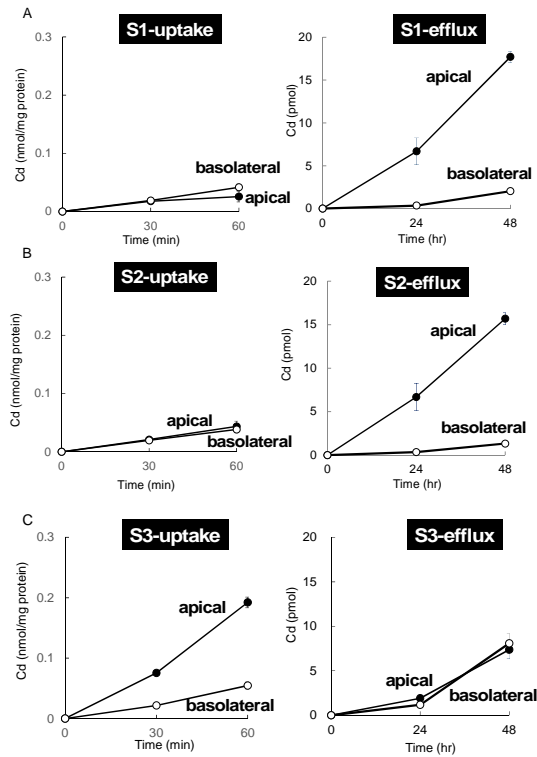
トースで再吸収されることが明らかにされている。これまでの本研究者らの検討により、尿細管の部位によっては Cd-MT のエンドサイトーシスのみならず、亜鉛輸送体のうちの ZIP8 あるいは ZIP14 を介した Cd イオンの取り込み系が関与している可能性を見出している。本研究者は、近位尿細管の S1 領域から Cd-MT の形で一度細胞内に取り込まれた Cd は再び尿細管腔へと排泄され、さらに下流の S2 あるいは S3 領域からイオン型の Cd として再取り込みされるというモデルが存在するのではないかという仮説を立てた (図 5)。( 発表論文 )



そこでさらに詳細な輸送機構の解明を目指し、マウスの近位尿細管の S1, S2, S3 それぞれの領域由来の細胞を入手し、カップ培養システムを使用し、性状解析と金属輸送の解析を行った。入手した S1, S2, S3 細胞が、マウス腎臓近位尿細管の S1, S2, S3 領域特異的な細胞であることを確認した。そこでまず、S1, S2, S3 細胞はマウス近位尿細管由来細胞は極性細胞であるため、カップ培養システムを用いた培養が可能かどうかを検討した。その結果、S1, S2 細胞は播種後 2 日目で抵抗値が上昇し、カップ培養可能であった。一方、S3 細胞は tight junction は形成されるものの、S1, S2 細胞に比べてその能力は弱いと考えられたが、ぎりぎりカップ培養可能で培地等の漏れはなかった。

次に、Cd<sup>2+</sup> を管腔 ( apical ) および血管 ( basolateral ) 側からそれぞれ添加し、30, 60 min 後の Cd<sup>2+</sup> の取り込み及び排泄効率を S1, S2, S3 細胞で比較した。その結果、S3 細胞への管腔側からの Cd<sup>2+</sup> の取り込み効率は S1, S2 細胞に比較して高かった ( 図 6 )。また、S1, S2 細胞での Cd<sup>2+</sup> の取り込み効率は、管腔 ( apical ) および血管 ( basolateral ) 側で差がなかった。しかし、S3 細胞での管腔側からの Cd<sup>2+</sup> の取り込み効率は血管側よりも高かった。昨年度までの研究結果 ( マウス腎臓の *in situ* hybridization ) により、S3 領域において Cd<sup>2+</sup> の輸送体である ZIP8 は他の領域と比べて高

図6.



い発現がみられた。このことにより、S3 細胞への Cd<sup>2+</sup> の取り込み効率が高いことが説明できる可能性が示唆された。次に S1, S2, S3 細胞に 2 時間 Cd を取り込ませた後、24, 48 hr 後の Cd 排泄効率を測定した。S1, S2 細胞では、排泄された Cd のほとんどが管腔側から排泄されていた。一方、S3 細胞では管腔側と血管側にほぼ同じくらい排泄されており、S1, S2 細胞に比べると血管側への排泄効率が高かった ( 図 6 )。以上のように S1, S2, S3 細胞への Cd<sup>2+</sup> の取り込み及び排泄効率は、尿細管の部位によって異なっていた。

したがって、本研究者が昨年度までに提唱した仮説のように、Cd は尿細管上皮細胞に一度取り込まれた後、その一部が S1, S2 領域で管腔側に排泄され、再び S3 領域の上皮細胞に再吸収される、というダイナミックな動態が存在している可能性が示唆された。しかし、今回 apical 側から添加したのは Cd<sup>2+</sup> であり、Cd-MT の取り込みおよび排泄効率についても検討する必要がある。Cd-MT の輸送実験のためには、MT タンパク質の精製が必要である。そこでグルタチオン S-トランスフェラーゼ ( GST ) 融合マウス MT-I タンパク質を大腸菌系で大量に生産し、高純度にマウス MT タンパク質を精製する系を確立した。本研究では、Cd-MT の取り込みおよびその他の実験を実施するには至らなかったが、今後の尿細管部位特異的な Cd 輸送に重要な知見が多く蓄積できた。大量精製した MT を



用いて、今後、Cd-MT の尿細管における輸送実験を展開していく予定である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Hojyo, S., Miyai, T., **Fujishiro, H.**, et al. (2014) Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 controls humoral immunity by modulating B-cell receptor signal strength. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 111(32), 11786-11791. doi: 10.1073/pnas.1323557111. 査読あり

**Fujishiro, H.**, Yoshida, M., Nakano, Y., Himeno, S. (2014) Interleukin-6 enhances manganese accumulation in SH-SY5Y cells: Implications of the up-regulation of ZIP14 and the down-regulation of

ZnT10. **Metallomics** 6, 944-949. doi: 10.1039/c3mt00362k. 査読あり

Migita, S., Moquin, A., **Fujishiro, H.**, et al. (2014) Quantum dots induce heat shock-related cytotoxicity at intracellular environment. **In Vitro Cell Dev Biol Anim.** 50(4):367-72. doi:

10.1007/s11626-013-9693-2. 査読あり

**Fujishiro, H.**, Ohashi, T., Takuma, M., Himeno, S. (2013) Suppression of ZIP8 expression is a common feature of cadmium-resistant and manganese-resistant RBL-2H3 cells. **Metallomics** 2013 5(5), 437-444. doi: 10.1039/c3mt00003f. 査読あり

**Fujishiro, H.**, Ohashi, T., Takuma, M., Himeno, S. (2013) Down-regulation of S100A9 and S100A10 in manganese-resistant RBL-2H3 cells. **J. Toxicol. Sci.** 38(5), 753-757.

<http://doi.org/10.2131/jts.38.753>. 査読あり

**Fujishiro, H.**, Yano, Y., Takada, Y., Tanihara, M., Himeno, S. (2012) Roles of ZIP8, ZIP14, and DMT1 in transport of cadmium and manganese in mouse kidney proximal tubule cells. **Metallomics** 4(7), 700-708. doi; 10.1039/c2mt20024d. 査読あり

〔学会発表〕(計 17 件うち 4 件招待講演)

腎臓近位尿細管 S1, S2, S3 領域由来細胞を用いたシスプラチン毒性の検討. **○藤代 隆**、杉本光、姫野誠一郎. 日本薬学会 135 年会、神戸学院大学 (神戸). 2015

年 3 月 28 日

腎臓近位尿細管におけるカドミウム輸送に関する仮説. **○藤代 隆**、東京理科大学総合研究機構バイオオルガノメタリクス研究部門研究交流会、東京理科大学 (東京). 2015 年 3 月 16 日

腎臓近位尿細管由来細胞を用いたカドミウム輸送系評価システムの検討. **○藤代 隆**、高田侑那、矢野悠、姫野誠一郎. 第 4 回メタロミクス研究フォーラム、武蔵野大学 (東京). 2014 年 11 月 7 日

カップ培養システムを用いた消化管および近位尿細管におけるカドミウム輸送機構の解析. **○藤代 隆**、濱尾聡子、高田侑那、田中里奈、矢野悠、姫野誠一郎. 第 4 回メタロミクス研究、フォーラムシンポジウム : 異分野融合シンポジウム、武蔵野大学 (東京). 2014 年 11 月 8 日

マンガン耐性細胞における乳酸関連遺伝子の発現変化. **○藤代 隆**、城公子、姫野誠一郎. フォーラム 2014 : 衛生薬学・環境トキシコロジー、つくば国際会議場 (筑波). 2014 年 9 月 20 日

腎臓近位尿細管および消化管におけるカドミウム輸送機構. **○藤代 隆**、姫野誠一郎. フォーラム 2014 : 衛生薬学・環境トキシコロジー、シンポジウム「金属毒性発現機構解明への新たな戦略」、つくば国際会議場 (筑波). 2014 年 9 月 19 日  
腎臓近位尿細管由来細胞を用いた新たな毒性・輸送系評価システムの検討. **○藤代 隆**、姫野誠一郎. 第 41 回日本毒理学学会学術年会、ミニシンポジウム「次世代研究者セミナー～分子毒性学的アプローチと安全性評価～」、神戸コンベンションセンター (神戸). 2014 年 7 月 4 日

Analysis of manganese accumulation mechanism by TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in SH-SY5Y cells. **○Tomoki Kitayama, Hitomi Fujishiro, Seiichiro Himeno.** 第 24 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM2014), 京都薬科大学 (京都). 2014 年 6 月 14 日

神経細胞におけるマンガン輸送に対する炎症性サイトカインの影響. **○藤代 隆**、吉田真梨、姫野誠一郎. メタルバイオサイエンス研究会 2013, 静岡県立大学 (静岡). 2013 年 9 月 26 日

マウス腎臓近位尿細管 S1, S2, S3 領域由来細胞の性状解析. **○藤代 隆**、高田侑那、

姫野誠一郎. メタルバイオサイエンス研究会 2013, 静岡県立大学(静岡). 2013年9月26日

消化管からのカドミウム輸送における金属輸送体の役割. ○藤代瞳、詫間美紀、姫野誠一郎. メタルバイオサイエンス研究会 2013, 静岡県立大学(静岡). 2013年9月26日

RBL-2H3 細胞由来マンガン耐性細胞を用いた新たなマンガン耐性因子の探索. 藤代瞳、詫間美紀、大橋俊直、姫野誠一郎. フォーラム 2013: 衛生薬学・環境トキシコロジー、九州大学医学部(福岡). 2013年9月13日

消化管のカドミウム輸送における金属輸送体の役割. ○詫間美紀、濱尾聡子、藤代瞳、姫野誠一郎. 第24回日本微量元素学会、関西大学(大阪). 2013年6月29日

金属輸送システムとハイブリット分子. ○藤代瞳、姫野誠一郎. ワークショップ「毒性学からバイオオルガノメタリクスへのアプローチ」; 第40回日本毒性学会学術年会、幕張メッセ(幕張). 2013年6月17日

消化管由来 Caco-2 細胞におけるカドミウム輸送機構—消化管におけるカドミウム吸収における亜鉛輸送体の役割. ○藤代瞳、田中里奈、姫野誠一郎. メチル水銀・カドミウム研究ミーティング若手研究発表. LMJ 東京研修センター(東京). 2012年12月19日

消化管由来 Caco-2 細胞でのカドミウム輸送における DMT1 と ZIP14 の役割. ○藤代瞳、田中里奈、姫野誠一郎. フォーラム 2012: 衛生薬学・環境トキシコロジー. 2012年10月26日、名古屋観光ホテル(名古屋). 2012年10月26日

重金属の毒性とその防御の分子メカニズム. ○藤代瞳、姫野誠一郎. 第39回日本毒性学会学術年会、仙台国際センター(仙台). 2012年7月17日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕0 ホームページ等

(1)研究代表者

藤代瞳 (FUJISHIRO, Hitomi)

徳島文理大学・薬学部衛生化学講座・助教

研究者番号: 10389182

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし