

＝総 説＝

カドミウム毒性発現分子機構とその防御

Molecular mechanism of cadmium toxicity and its protection

佐藤雅彦^{a*}、李 辰竜^a、徳本真紀^a、本田晶子^b、藤原泰之^c

Masahiko Satoh^{a*}, Jin-Yong Lee^a, Maki Tokumoto^a, Akiko Honda^b, Yasuyuki Fujiwara^c

^a愛知学院大学薬学部衛生薬学講座、^b京都大学大学院工学研究科環境衛生学講座、
^c東京薬科大学薬学部公衆衛生学教室

^aLaboratory of Pharmaceutical Health Sciences, School of Pharmacy, Aichi Gakuin University, ^bEnvironmental Health Division, Department of Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University, ^cDepartment of Environmental Health, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

Summary

Cadmium (Cd), a harmful metal, causes severe toxicity such as renal toxicity, hepatotoxicity, pulmonary toxicity, osteotoxicity and anemia. However, the molecular mechanism of these toxicity remains to be unknown. We have been studying the identification of target molecules involved in Cd toxicity, their molecular mechanisms, and metallothionein, which is a protective factor against Cd toxicity. In this paper, we present the molecular mechanism of Cd toxicity and its protection, focusing on our research results. It has been comprehensively investigated which molecules are altered by Cd using DNA microarray analysis, Protein/DNA binding assay analysis and siRNA method in order to identify the target molecules involved in Cd toxicity. As a result, we have newly identified YY1, FOXF1, ARNT and MEF2A transcription factors as new Cd-targeted transcription factors, and found the suppression of gene expression of *UBE2D2*, *UBE2D4*, *BIRC3* and *GLUT4*, which are their downstream factors, causes cytotoxicity. Moreover, it has been newly revealed that Cd causes inhibition of iron absorption from duodenal epithelial cells through suppression of the expression of iron transport-related genes *DMT1*, *FPN1*, *DCYTB*, *HEPH* and *HCP1*. These results suggested that Cd-induced iron deficiency anemia may result from lack of iron in the body. In addition, although metallothionein-I and metallothionein-II have been strongly involved in protecting Cd toxicity, the relationship between metallothionein-III and Cd toxicity has not been studied *in vivo*. We investigated the susceptibility of metallothionein-III null mice and metallothionein-I/II null mice to Cd-induced hepatotoxicity and testicular toxicity. As a result, it was found that Cd-induced hepatotoxicity and testicular toxicity were enhanced in metallothionein-I/II null mice and attenuated in metallothionein-III null mice as compared with wild-type mice. These results suggested that metallothionein-III has opposite effects to metallothionein-I and metallothionein-II on the acute toxicity of Cd, and provided new findings on the biological role of metallothionein-III.

Keywords: cadmium, renal toxicity, iron deficiency anemia, metallothionein

*Corresponding author:

Masahiko Satoh, Ph.D.

Tel: +81-53-757-6790, Fax: +81-53-757-6799

e-mail address: masahiko@dpc.agu.ac.jp

1. はじめに

カドミウム (cadmium, Cd) は、原子量が 112.41、比重が 8.642、融点が 321°C、沸点が 767°Cを示す重金属であり、1817年にドイツの鉱物学者 F. Strohmeyer によ

り発見された。カドミウムは、周期律表において、第 12 族元素 [亜鉛、カドミウム、水銀、コペルニシウム] の 2 番目に位置している。主な用途は、顔料、電池、合金、メッキなどであり、そのほか自動車部品、電子

機器、カメラ部品、合成樹脂の安定剤、原子炉の制御棒など、幅広く利用されている。自然界において、カドミウムは亜鉛、銅、鉛などと共存しており、これらの金属の採鉱、製錬の際に副産物として得られる。

カドミウムによる健康影響については、精錬工場や電池工場などの職場でのカドミウム曝露と、一般環境汚染による飲食物を介したカドミウムの過剰摂取によって腎臓、骨、呼吸器、生殖器および循環器などに障害が認められている^{1,4)}。特に、慢性腎毒性は尿管機能障害を主症状とし、カドミウムの安全性を評価する上で主要な毒性となっている。わが国では、職業曝露によるカドミウム中毒のみならず、カドミウムの汚染地域（富山県婦中町、兵庫県生野町、石川県梯川流域、秋田県小坂町、長崎県対馬など）において慢性腎毒性が多発した。1955年には、富山県神通川下流域で、カドミウムに汚染されたコメや飲料水を長期間経口摂取した結果、高齢経産婦を中心に腎毒性と骨軟化症を主症状とするイタイイタイ病が発生している²⁾。イタイイタイ病は、三井金属鉱業神岡鉱山亜鉛精錬所がカドミウムを含む鉱排水を神通川上流に排出した結果、神通川下流域において飲料水や土壌および農作物（特に、コメ）がカドミウムに汚染されたことによって起こった公害病である。

今日、わが国において、産業職場や環境汚染によるカドミウム中毒はほとんど認められていない。しかしながら、その一方で、カドミウムはコメをはじめとする様々な食品中に微量ながら含まれており、日本人が1日に摂取するカドミウムの約50%はコメに由来する。したがって、カドミウムはコメなどの食品を介して生涯にわたって身体に取り込まれ、しかも体内残留性が非常に高い（ヒトでの生物学的半減期：15～30年）ため、最近ではカドミウムの微量長期曝露による高齢者の健康影響が問題となっている。

一方、カドミウムの毒性発現機構に関する研究は、国内外の様々な研究グループによって長年にわたって進められてきた。特にわが国においては、イタイイタイ病を代表とするカドミウム公害により一般地域住民が深刻な健康被害を被ったという苦い経験から、カドミウム毒性に関する研究が活発に行われてきた。しかしながら、その分子レベルでの毒性発現機構については、ほとんど解明されていないのが現状である。このような背景のもと、筆者らは、愛知学院大学薬学部衛

生薬学講座に赴任して以来、カドミウムの毒性発現に関与する標的分子の特定とその分子機構解明という難題に取り組んできた。本稿では、カドミウム毒性発現分子機構とその防御について、当研究室での研究成果を中心に紹介したい。

2. カドミウム毒性発現分子機構

(1) カドミウムによる腎毒性発現分子機構

① カドミウム腎毒性に関与する標的遺伝子の同定

筆者らは、カドミウムの毒性発現に関与する標的分子を特定することを目的に、ラットの腎近位尿管上皮細胞（NRK-52E細胞）を用いて、カドミウム曝露によって変動する遺伝子をDNAマイクロアレイ法で網羅的に解析した⁵⁾。その結果、50 μMのカドミウムで4時間処理したNRK-52E細胞では、カドミウムによって73遺伝子が2倍以上の発現上昇を示し、その中にはストレス応答遺伝子である*Mt1*や*Hmox1*などが含まれていた。一方、発現が2分の1以下に減少した遺伝子は42遺伝子が認められ、その中に、選択的タンパク質分解系ユビキチン-プロテアソームシステムで機能するユビキチン転移酵素群*Ube2d*ファミリーの構成因子*Ube2d4*が含まれていた。そこで、カドミウムの腎毒性発現に関与する遺伝子群として*Ube2d*ファミリーの絞って詳細な検討を進めた。

なお、筆者らは、上記で示したNRK-52E細胞の他に、ヒト腎近位尿管上皮細胞（HK-2細胞）⁶⁾、ヒト冠状動脈内皮細胞⁷⁾、マウス肝臓⁸⁾、マウス腎臓⁹⁾、マウス新生仔脳¹⁰⁾、マウス胎仔肝臓¹¹⁾についてもDNAマイクロアレイによる網羅的解析を行って、カドミウムによって変動する遺伝子を数多く見いだしている。特に、HK-2細胞において、カドミウムによって変動した遺伝子のうち、亜鉛輸送体*ZIP1*をコードする遺伝子*SLC39A1*や熱ショックタンパク質ファミリーの構成因子*HSPH1*および*HSPA8*がカドミウム毒性の防御に関与することを明らかにしている^{12,13)}。

② *Ube2d*ファミリー遺伝子の発現抑制を介したp53依存的アポトーシス誘導

上記①で示したように、慢性カドミウム中毒の標的組織である腎臓由来のNRK-52E細胞を用いたDNAマイクロアレイ解析により、*Ube2d4*（ラット、マウス標記）の遺伝子発現がカドミウム処理によって半減する

ことを見いだした⁵⁾。しかも、カドミウム処理した NRK-52E 細胞において、カドミウムによる細胞毒性が出現するよりも早い時期に、*Ube2d4* だけでなく他の *Ube2d* ファミリー遺伝子 (*Ube2d1*, *Ube2d2* および *Ube2d3*) の発現がすべて顕著に抑制されるとともに、アポトーシス誘導因子である p53 タンパク質が顕著に増加することを見いだした^{14,15)}。この時、カドミウムによる p53 mRNA 量の増加やプロテアソーム活性に対する直接的な阻害は認められないことを確認している^{14,15)}。p53 はターナーオーバーの速い短命タンパク質であり、その分解の発端となるユビキチン化に *Ube2d* ファミリーが関与することが知られている¹⁶⁾。したがって、カドミウムによる p53 タンパク質の過剰蓄積は、*Ube2d* ファミリー遺伝子の発現抑制を介した p53 の分解阻害に起因しているものと考えられる。さらに、カドミウム処理によって p53 のリン酸化とともに DNA の断片化を確認し、カドミウムが p53 依存的なアポトーシスを誘導することを明らかにした^{14,15)}。

次に、siRNA の細胞導入が容易である HK-2 細胞を用いて、siRNA による *UBE2D* (ヒト標記) ファミリー遺伝子ノックダウン細胞や p53 ノックダウン細胞を作製し、カドミウムによる p53 タンパク質の細胞内蓄積における *UBE2D* ファミリー遺伝子の関与、およびカドミウムのアポトーシス誘導における p53 の関与を検討した。その結果、カドミウムによる *UBE2D2* および *UBE2D4* 遺伝子の発現抑制が細胞内 p53 タンパク質の過剰蓄積を引き起こすこと、並びにカドミウムによるアポトーシス誘導に p53 の過剰蓄積が深く関与することを明らかにした¹⁷⁾。

また、カドミウム長期曝露マウスを用いて、腎臓での *Ube2d* ファミリー遺伝子の発現と p53 タンパク質の発現を検討した。その結果、カドミウム (300 ppm) 含有固形飼料を用いて、カドミウム長期曝露 (6~12 ケ月) したマウスにおいて、腎毒性が僅かに出現している状態で、腎臓中 *Ube2d1*、*Ube2d2* および *Ube2d3* mRNA 量が有意に減少すること、並びに p53 タンパク質量が有意に増加することを確認し、*in vivo* においても *in vitro* と同様の結果を得ている^{14,15,17)}。さらに、カドミウム長期曝露マウスを用いて、腎臓中 p53 タンパク質およびアポトーシス細胞の局在性について検討した。その結果、カドミウム長期曝露によって、腎近位尿細管細胞特異的に p53 タンパク質が顕著に増加するとと

もに、その同一部位にアポトーシスが検出されることが判明し、カドミウムが腎近位尿細管特異的に p53 依存的なアポトーシスを引き起こすことを明らかにした^{14,15,17)}。

このように、培養腎近位尿細管上皮細胞とマウス腎臓において、カドミウムが *Ube2d* ファミリー遺伝子の発現抑制を介して腎近位尿細管上皮細胞内の p53 タンパク質を過剰蓄積させ、p53 依存的なアポトーシスを誘導することにより細胞毒性を引き起こすことを新たに明らかし、カドミウム毒性の標的因子として *Ube2d* ファミリー遺伝子を見いだすことができた (Fig. 1)。

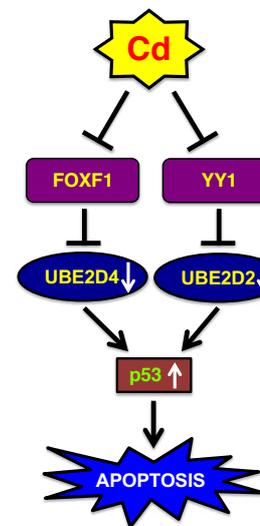


Fig. 1. The new apoptotic pathway of Cd toxicity through the p53 overaccumulation via the downregulation of UBE2D family. Cd causes inactivation of YY1 and FOXF1 transcription factors and induces p53-dependent apoptosis through the suppression of gene expression of their downstream factors UBE2D2 and UBE2D4 in proximal tubular cells.

様々な有害化学物質は、細胞死の主要なプロセスであるネクローシスやアポトーシスを誘発することが知られている。カドミウムの毒性発現においても、ネクローシスやアポトーシスが関与していることが明らかにされている。カドミウムの慢性腎毒性発現におけるアポトーシス誘導のメカニズムについては、筆者らが新たに見いだしたメカニズム以外にもいくつか報告されている。カドミウムの慢性腎毒性発現におけるアポトーシス誘導に関するこれまでの研究については、総説を参照されたい¹⁸⁾。

③ カドミウム腎毒性に関与する転写因子の同定

上記②で示したように、ヒト由来の HK-2 細胞、ラット由来の NRK-52E 細胞およびマウスを用いて、*UBE2D/Ube2d* ファミリー遺伝子の発現抑制がカドミウムの腎毒性発現（アポトーシス誘導）に関与することを新たに見いだした^{14,15,17}。細胞内での遺伝子発現は転写因子の制御下で調節されており、転写調節機構の解明は様々な生命現象の理解に重要である。カドミウム毒性発現にも転写制御機構が関わっていると思われるが、カドミウム毒性の標的転写因子はほとんど明らかにされていない。

筆者らは、HK-2 細胞を用いて、カドミウム処理によって DNA 結合活性が変動する転写因子を Protein/DNA アッセイを利用して網羅的に解析した。その結果、カドミウムによって DNA 結合活性（転写活性）が上昇した転写因子は 345 種のうち 20 種であり、28 種の転写活性がカドミウムによって低下した¹⁹。しかも、カドミウムによる転写活性の低下が認められた *FOXF1* の結合配列が、*UBE2D4* 遺伝子のコーディング領域の上流に存在することを TRNASFAC[®]データベース検索によって確認した¹⁷。そこで、HK-2 細胞を用いて *UBE2D4* の遺伝子発現に及ぼす *FOXF1* 転写因子の影響を検討した。その結果、siRNA による *FOXF1* 遺伝子のノックダウンは *UBE2D4* の遺伝子発現を顕著に抑制するとともに、有意な細胞生存率の低下を引き起こした¹⁷。なお、*FOXF1* 遺伝子のノックダウンは *UBE2D2* の遺伝子発現には影響を与えなかった¹⁷。

カドミウムが *FOXF1* 転写因子の転写活性を抑制することで、*UBE2D4* 遺伝子の発現を抑制していることを見いだしたが、カドミウムによる *UBE2D2* 遺伝子の発現抑制に関わっている転写因子は不明である。筆者らは、NRK-52E 細胞においても、カドミウム処理によって DNA 結合活性が変動する転写因子を Protein/DNA アッセイ解析しており、*YY1* 転写因子の転写活性がカドミウムによって低下することを見いだしている²⁰。なお、*YY1* の転写活性は HK-2 細胞においてもカドミウムにより約 40%低下した¹⁹。さらに、TRNASFAC[®]データベース検索によって、*UBE2D2* の遺伝子領域の上流側に *YY1* の結合配列が存在することを確認した。そこで、siRNA 法を用いて *YY1* 転写因子の細胞内量を低下させたところ、*UBE2D2* の遺伝子発現が有意に減少した¹⁷。なお、*YY1* 遺伝子のノックダウンは *UBE2D4* の遺伝子発現には影響を与えなかった¹⁷。

以上の結果より、カドミウムの *UBE2D* ファミリー遺伝子の発現抑制を介した毒性発現機構において、*FOXF1* および *YY1* 転写因子が関与していることが明らかとなった (Fig. 1)。

次に、HK-2 細胞を用いて、カドミウムによって転写活性が低下した 28 種の転写因子のうち、18 種の転写因子の各遺伝子を siRNA でそれぞれノックダウンした時の細胞生存率の変化を検討した。その結果、*ARNT*、*MEF2A* および *GATA* ファミリーの遺伝子をそれぞれノックダウンさせた細胞はコントロール細胞に比べて顕著な細胞生存率の低下を示した^{19,21,22}。これまでに、*ARNT*、*MEF2A* および *GATA* ファミリーとカドミウム毒性発現との関係を示す報告はほとんどなく、本研究で同定された転写因子はカドミウム毒性発現に関わる新たな標的因子である可能性を強く示唆している。

④ *ARNT* 転写活性阻害を介した *BIRC3* 遺伝子の発現抑制によるアポトーシス誘導

上記③で示した通り、Protein/DNA アッセイを利用した網羅的解析で、カドミウムによって転写活性の阻害が確認された転写因子のうち、*ARNT* 転写因子について siRNA 法を用いて *ARNT* 遺伝子をノックダウンした HK-2 細胞で、顕著な細胞生存率の低下が示された¹⁹。そこで、カドミウム毒性発現に関与している *ARNT* 転写因子の下流因子を同定するため、*ARNT* 遺伝子を siRNA 法によりノックダウンさせた細胞を用いて DNA マイクロアレイを行った。その結果、*ARNT* ノックダウンにより 27 遺伝子が発現低下を示した¹⁹。*ARNT* 遺伝子のノックダウンにより遺伝子発現が抑制された因子のうち、*BIRC3* 遺伝子に着目して、*BIRC3* 遺伝子を siRNA 法によりノックダウンしたところ、HK-2 細胞の生存率が顕著に減少した¹⁹。*BIRC3* は IAP (inhibitor of apoptosis protein) ファミリーに属するタンパク質であり、アポトーシス抑制因子（カスパーゼ活性阻害によるアポトーシス抑制作用）として知られている。

そこで、*ARNT* 転写因子の活性阻害および *BIRC3* 遺伝子の発現抑制とカドミウム毒性発現との関係を HK-2 細胞を用いて検討した。その結果、カドミウムは *BIRC3* の遺伝子発現のみならずタンパク質量も著しく減少させた¹⁹。さらに、カドミウムによる *BIRC3* 遺伝子の発現抑制における *ARNT* 転写因子の関与を調べた

ところ、その経路には ARNT が関与していることを見いだした¹⁹⁾。なお、8 種類の *BIRC* 遺伝子ファミリーのうち、*BIRC3* 遺伝子のみがカドミウムによって発現抑制されることを確認した¹⁹⁾。また、細胞内 *BIRC3* 量の減少は、細胞生存率を有意に低下させるとともにアポトーシスも誘導させ、HK-2 細胞におけるカドミウム毒性も増強させることを明らかにした¹⁹⁾。しかも、カドミウムは細胞内 ARNT タンパク質量を減少させることにより転写活性を阻害させることも確認した¹⁹⁾。*BIRC3* はアポトーシス誘導因子であるカスパーゼ 3 の活性を阻害してアポトーシスを抑制することが知られている。そこで、次に、HK-2 細胞におけるカスパーゼ 3 活性化に及ぼすカドミウムおよび *BIRC3* 遺伝子ノックダウンの影響を調べたところ、*BIRC3* 遺伝子のノックダウンは、カドミウムと同様に HK-2 細胞内のカスパーゼ 3 を活性化させた¹⁹⁾。

カドミウム長期曝露マウスを用いて、腎臓での *Birc3* 遺伝子の発現を検討したところ、カドミウム長期曝露したマウスの腎臓中 *Birc3* mRNA 量が有意に減少することを確認し、*in vivo* においても *in vitro* と同様の結果を得ている²³⁾。

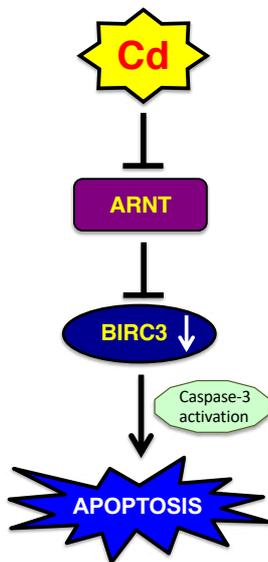


Fig. 2. The new apoptotic pathway of Cd toxicity through the inhibition of ARNT transcription factor activity. Cd causes inactivation of ARNT transcription factor and induces caspase-3-dependent apoptosis through the suppression of gene expression of its downstream factor *BIRC3* in proximal tubular cells.

以上の結果より、カドミウムは、ARNT 転写因子の細胞内量を減少させることによってその転写活性を阻

害し、その結果として *BIRC3* の遺伝子発現が抑制されるとともに、細胞内 *BIRC3* 量の低下を引き起こすことで、カスパーゼ 3 の活性化を介したアポトーシスを誘導することが新たに明らかとなった (Fig. 2)。

⑤ MEF2A 転写活性阻害を介した *GLUT4* 遺伝子の発現抑制による細胞内グルコースの低下作用

上記③で示した通り、Protein/DNA アッセイを利用した網羅的解析で、カドミウムによって転写活性の阻害が確認された転写因子のうち、ARNT 転写因子以外に、MEF2A 転写因子についても検討を行った結果、siRNA 法により *MEF2A* 遺伝子をノックダウンした HK-2 細胞で、顕著な細胞生存率の減少が示された²²⁾。*MEF2A* は細胞内グルコーストランスポーターの一種である *GLUT4* の転写制御に関与していることが報告されている^{24, 25)}。そこで、筆者らは、HK-2 細胞を用いて *GLUT4* の遺伝子発現に及ぼすカドミウムおよび *MEF2A* ノックダウンの影響を検討した。その結果、siRNA 法による *MEF2A* 遺伝子のノックダウンは *GLUT4* の遺伝子発現を有意に減少させ、カドミウムも *GLUT4* 遺伝子発現を顕著に減少させた²¹⁾。しかも、カドミウムによって *GLUT4* タンパク質量も低下した²¹⁾。さらに、siRNA 法による *GLUT4* 遺伝子のノックダウンは、HK-2 細胞に顕著な細胞毒性を与えた²¹⁾。

一方、腎臓には *GLUT2* も多く発現していることが知られている²⁶⁾が、siRNA 法による *GLUT2* 遺伝子のノックダウンは細胞毒性を示さなかった²¹⁾。さらに、siRNA 法による *MEF2A* 遺伝子のノックダウンは、*GLUT2* 遺伝子の発現を抑制せず、*GLUT4* 遺伝子の発現のみを有意に抑制した²¹⁾。これらの結果より、MEF2A の転写活性阻害を介したカドミウム腎毒性発現機構には *GLUT4* が深く関与していることが示唆された。

次に、*GLUT4* がグルコーストランスポーターであることから、カドミウムおよび *GLUT4* 遺伝子ノックダウンによる細胞内グルコース濃度の変動について調べたところ、*GLUT4* 遺伝子に対する siRNA 処理およびカドミウム処理は、ともに有意な HK-2 細胞内グルコース量の低下を引き起こした²¹⁾。したがって、カドミウムによる *GLUT4* 遺伝子の発現抑制は、細胞内グルコース量を低下させて毒性を発現していることを示唆している。さらに、グルコース不含培地で HK-2 細胞

を培養し、細胞内グルコース量を減少させることによって、細胞生存率が抑制されることを見いだした²¹⁾。これらの結果より、カドミウムは MEF2A 転写活性阻害を介して GLUT4 の細胞内量を低下させ、細胞内へのグルコースの取り込みを抑制し細胞毒性を示していることが示唆された (Fig. 3)。

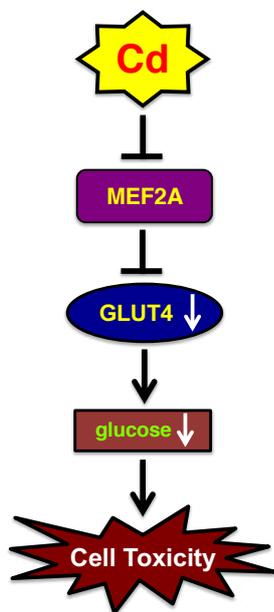


Fig. 3. The new pathway of Cd toxicity through the inhibition of MEF2A transcription factor activity. Cd suppresses GLUT4 gene expression through the inhibition of MEF2A transcriptional activity, resulting in reduced glucose uptake into cells, causing cytotoxicity in proximal tubule cells.

⑥ その他の転写因子について

カドミウムによる活性低下が認められた転写因子の中には、ARNT 転写因子以外に、GATA ファミリーの転写因子もカドミウム毒性発現に関与している可能性が示されている²²⁾。ほ乳類の GATA ファミリーは、主に二つのグループに分類され (GATA-1/-2/-3 または GATA-4/-5/-6)、様々な遺伝子の発現を調節することが報告されている²⁷⁾。しかしながら、カドミウムの腎毒性発現における GATA ファミリーの役割についてはこれまで全く検討されていない。したがって、今後、GATA ファミリーの転写因子とカドミウム毒性発現との関係について研究を進めていくことによって、転写因子の活性阻害を介した新たなカドミウム毒性発現分子機構が解明されるものと期待される。

(2) カドミウムによる鉄欠乏性貧血発現分子機構

カドミウムの慢性毒性として、腎機能障害のほかに鉄欠乏性貧血が挙げられる^{28,29)}。カドミウムは鉄の体内貯蔵量を低下させることによって鉄欠乏性貧血を誘発することが国内外の研究グループによって報告されている^{28,29)}。カドミウムの腸管吸収には、鉄の輸送体として知られる DMT1 が関与することが報告されている^{30,31)}。したがって、カドミウムが DMT1 を介した腸管からの鉄吸収を競合的に阻害する可能性が考えられるが、この競合阻害作用については否定的な報告や矛盾する報告が多く、結論を得るに至っていない。このように、カドミウムによる鉄欠乏性貧血の発症機構はほとんど明らかにされていないのが現状である。そこで、筆者らは、カドミウムが引き起こす鉄欠乏性貧血の発症機構を解明することを目的に、カドミウムによる腸管での鉄輸送関連遺伝子の発現変動と鉄の体内貯蔵量との関係をマウスおよび培養細胞を用いて検討した。

① カドミウムによるマウス小腸での鉄輸送関連分子の発現変動 (*in vivo* 検討)

マウスの十二指腸における鉄輸送関連遺伝子の発現や血清鉄に及ぼすカドミウム単回経口投与の影響について検討した。なお、鉄輸送関連遺伝子として、非ヘム鉄の輸送に関わる二価金属輸送体 DMT1 (gene name *Slc11a2*)、鉄還元酵素 DCYTB (gene name *Cybrd1*)、鉄排出輸送体 FPN1 (gene name *Slc40a1*) および鉄酸化酵素 HEPH (gene name *Heph*)、並びにヘムの輸送体である HCP (gene name *Slc46a1*) の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。その結果、カドミウムを経口投与して 3 時間後のマウスの十二指腸における DMT1、DCYTB、FPN1 および HEPH の mRNA 量は、いずれもコントロール群に比べて有意に低下した³²⁾。さらに、十二指腸におけるヘムの輸送体である HCP1 の mRNA 量も非ヘム鉄輸送関連遺伝子と同様にカドミウム投与 3 時間後にコントロール群と比較して顕著に減少した³²⁾。また、カドミウムが十二指腸における DMT1 および FPN1 タンパク質の発現も顕著に抑制することが示された³²⁾。一方、カドミウム投与 24 時間後の血清鉄はコントロール群と比較して有意な減少が認められた³²⁾。

これらの結果より、マウスにおいて十二指腸中の非ヘム鉄およびヘム鉄の輸送関連遺伝子の発現がカドミウムの経口摂取によって速やかに抑制されることが明らかとなった。したがって、カドミウムの経口曝露は十二指腸で鉄輸送関連分子の発現を抑制することを通じて、消化管からの鉄吸収を阻害し、その結果、体内の鉄が不足することによって鉄欠乏性貧血を引き起こしている可能性が示唆された。

② カドミウムによるヒト小腸上皮細胞での鉄輸送関連分子の発現変動 (*in vitro* 検討)

ヒト小腸上皮細胞モデルである Caco-2 細胞における鉄輸送関連遺伝子の発現に及ぼすカドミウム曝露の影響について検討した。その結果、カドミウム (10 μ M) 処理した Caco-2 細胞内の DMT1、DCYTB、FPN1 および HEPH の mRNA 量はいずれもコントロールに比べて有意に減少した³²⁾。また、カドミウムが DMT1 および FPN1 タンパク質の発現も抑制することが示された³²⁾。

これらの結果より、小腸上皮細胞モデルである Caco-2 細胞においても、マウス十二指腸と同様にカドミウムは DMT1、DCYTB、FPN1 および HEPH の遺伝子発現を抑制することが示された。したがって、細胞レベルにおいてもカドミウムが鉄輸送関連分子の発現抑制を引き起こすことを通じて、鉄輸送に影響を及ぼす可能性が示唆された。

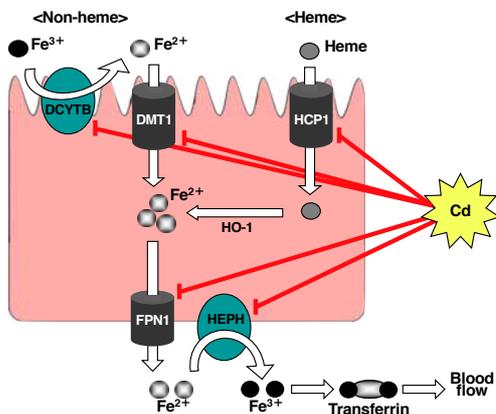


Fig. 4. Model of the inhibitory effect of Cd on Fe transport. Cd causes inhibition of iron absorption from duodenal epithelial cells through suppression of the expression of iron transport-related genes *DMT1*, *FPN1*, *DCYTB*, *HEPH* and *HCP1*.

以上の結果より、経口摂取されたカドミウムは、十二指腸上皮細胞に直接的に作用して、鉄輸送関連遺伝

子である DMT1、FPN1、DCYTB、HEPH および HCP1 の発現を抑制し、それらの分子のタンパク質量を減少させることを通じて、消化管からの鉄吸収阻害を引き起こすことが新たに明らかとなった (Fig. 4)。

3. カドミウム毒性とメタロチオネイン

(1) メタロチオネインについて

メタロチオネイン (metallothionein, MT) は、1957年に Margoshes と Vallee によってウマの腎皮質からカドミウム結合タンパク質として単離された³³⁾。メタロチオネインはヒトやマウスおよびラットなどにおいて、4種の亜型が存在し、これらの亜型はいずれも構成アミノ酸 (メタロチオネイン-I/II : 61 個、メタロチオネイン-III : 68 個、メタロチオネイン-IV : 62 個) のうち 20 個をシステインが占め、しかも芳香族アミノ酸を含まない特徴を持っている³⁴⁻³⁶⁾。1957年に発見されたメタロチオネインは、メタロチオネイン-I にあたり、その後、メタロチオネイン-II が確認され、両者ともに、すべての組織に存在することが確認されている。また、メタロチオネイン-III は、1989年に Uchida らによってラットの脳から神経細胞成長抑制因子 (growth inhibitory factor, GIF) として単離され^{37,38)}、当初、脳に発現が局限するとされていたが、後に精巣や卵巣などの生殖器および腎臓などにも発現していることが確認されている。メタロチオネイン-IV は、1994年に Quaife らによってマウスの舌より単離され、舌から食道、胃上部までの扁平上皮と皮膚で存在が確認されている³⁹⁾。メタロチオネイン-I およびメタロチオネイン-II の主な機能は、金属に対する親和性が高いこと、並びにフリーラジカル消去作用を有することである。したがって、メタロチオネイン-I およびメタロチオネイン-II は、カドミウムをはじめ金属の毒性軽減や蓄積、並びに銅や亜鉛などの必須金属の恒常性の維持に関与していると考えられている。また、メタロチオネイン-I およびメタロチオネイン-II は、種々の活性酸素種 (O_2^- , H_2O_2 , $\cdot OH$) や活性窒素種 (NO, ONOO $^-$) を消去できることから、酸化ストレスに対する生体内防御因子としても極めて重要な役割を果たしている^{40,41)}。さらに、メタロチオネイン-I およびメタロチオネイン-II は、カドミウムなどの金属をはじめ様々な要因によってその発現が誘導されることもユニークな特徴の 1 つである^{34,35)}。カドミウム毒性に対するメタロチオネ

イン-Iおよびメタロチオネイン-IIの防御効果については、遺伝子改変マウスや遺伝子改変培養細胞を用いた研究が数多く報告されている。それらの結果をまとめると、メタロチオネイン-I およびメタロチオネイン-IIはカドミウムの急性毒性（肝毒性）や慢性毒性（腎毒性、肝毒性、骨毒性、血液毒性、免疫毒性並びに肝臓発がん）の防御に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。また、メタロチオネイン-I およびメタロチオネイン-II がカドミウムの体内動態に対しても深く関与することが示されている。上記も含めて、カドミウムの毒性や体内動態と、メタロチオネイン-I およびメタロチオネイン-II との関係については、優れた総説が発表されているので、総説を参照されたい^{35, 42-44)}。一方、メタロチオネイン-IIIに関する研究は脳に主眼が置かれており、メタロチオネイン-III が強い抗酸化作用を有し、種々の脳疾患（カイニン酸による痙攣発作、脳虚血による脳梗塞、家族性筋萎縮性側索硬化症など）に対して保護作用を有することが明らかにされている^{45, 46)}が、脳以外の組織におけるメタロチオネイン-III の生理的役割についてはほとんど不明である。また、メタロチオネイン-IV は、1994年にその存在が確認されて以降、全く研究が進められていないのが現状である。

なお、当研究室では、ジーンターゲット法によりメタロチオネイン-Iとメタロチオネイン-IIの発現を抑えたメタロチオネイン-I/II 欠損マウスおよびメタロチオネイン-IIIの発現を抑えたメタロチオネイン-III 欠損マウスを保有しており、メタロチオネイン研究に活用している。

(2) カドミウム急性毒性に及ぼすメタロチオネイン-IIIの影響

上記のように、メタロチオネイン-I およびメタロチオネイン-II はカドミウムの毒性軽減に深く関与することが明らかにされているが、メタロチオネイン-IIIとカドミウム毒性との関係については、ほとんど検討されていない。そこで、筆者らは、カドミウムの急性肝毒性並びに精巣毒性に対するメタロチオネイン-I/II 欠損マウスおよびメタロチオネイン-III 欠損マウスの感受性を比較検討した。その結果、カドミウムによる急性肝毒性が、野生型マウスに比べてメタロチオネイン-I/II 欠損マウスでは増強され、メタロチオネイン-III

欠損マウスでは減弱されることを明らかにした^{47, 48)}。一方、カドミウムによる精巣毒性については、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスは野生型マウスと同程度であったが、メタロチオネイン-III 欠損マウスは野生型マウスに比べてその毒性は減弱した⁴⁹⁾。さらに、Somjiらはヒト近位尿細管細胞にメタロチオネイン-III を過剰発現させると、カドミウムによる感受性が增大することを報告している⁵⁰⁾。

このように、メタロチオネイン-IIIは、カドミウムの急性毒性に対してメタロチオネイン-I やメタロチオネイン-II とは相反する効果を示すことが示唆されている。しかしながら、何れもそのメカニズムについては明らかにされておらず、カドミウム急性毒性に対するメタロチオネイン-III の新たな機能解明のために、詳細な検討が必要である (Table 1)。

Table 1. Susceptibility of metallothionein-I/II null mice and metallothionein-III null mice to Cd toxicity.

Cd toxicity	Comparison with wild-type mice (susceptibility)	
	MT-I/II null mice	MT-III null mice
Single injection		
Hepatotoxicity	○	△
Testicular toxicity	-	△
Long-term exposure		
Lethal toxicity	○	-
Hepatotoxicity	○	-

○: High sensitivity, △: Resistance, -: No change.

(3) カドミウム慢性毒性に及ぼすメタロチオネイン-IIIの影響

筆者らは、カドミウムの慢性毒性に対するメタロチオネイン-I/II 欠損マウスおよびメタロチオネイン-III 欠損マウスの感受性を比較検討した。300 ppmのカドミウムを含む飼料で飼育したところ、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスでは18週目にすべて死亡したが、野生型マウスおよびメタロチオネイン-III 欠損マウスは67週間生存し、両マウスともに軽微な肝毒性を示した⁵¹⁾。したがって、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスはカドミウムの長期曝露に対して高感受性であったが、メタロチオネイン-III 欠損マウスは野生型マウスと同程度であった。メタロチオネイン-III 欠損マウスは、カドミウムによる急性肝毒性に対して抵抗性であったが、慢性肝毒性に対しては抵抗性も高感受性も示さなかった (Table 1)。その理由として、メタロチオネ

ン-III 欠損マウスは、野生型マウスと同様にメタロチオネイン-Iやメタロチオネイン-IIが発現しているためと考えられる。

4. おわりに

DNA マイクロアレイ解析、Protein/DNA アッセイ解析および siRNA 法を駆使して、カドミウムの毒性発現に関与する標的分子の特定とその分子機構解明に取り組んだ結果、新たなカドミウム標的転写因子として YY1、FOXF1、ARNT および MEF2A 転写因子を同定し、それらの下流因子である UBE2D2、UBE2D4、BIRC3 並びに GLUT4 の遺伝子発現抑制が細胞毒性を引き起こすことを新たに明らかにすることができた。このように、これまで必ずしも明確にされていなかった分子レベルでのカドミウム毒性発現機構について、種々の転写因子を標的とする新たなカドミウム腎毒性発現機構を明らかにすることができ、これらの研究成果はカドミウム毒性研究に大きく貢献できたものとする。

さらに、カドミウムによる鉄欠乏性貧血の発症機構がほとんど明らかにされていない状況の中、経口摂取されたカドミウムが、十二指腸上皮細胞に直接的に作用して、鉄輸送関連分子 (DMT1、FPN1、DCYTB、HEPH および HCP1) の発現を抑制することで、消化管からの鉄吸収阻害を引き起こすことを新たに明らかにすることができた。

また、メタロチオネインはカドミウム毒性に対する生体内防御因子として知られているものの、防御効果を有するのは4つの分子種のうち、メタロチオネイン-Iとメタロチオネイン-IIである。カドミウム毒性との関係について、ほとんど検討されていなかったメタロチオネイン-III がカドミウムの急性毒性に対してメタロチオネイン-Iやメタロチオネイン-IIとは相反する効果を示すことを明らかにし、メタロチオネインの生体内での役割について新たな知見を提供した。

一方、カドミウムによる慢性中毒(腎毒性)の発症には個体差が認められていることから、人間集団におけるカドミウムの健康リスク評価の際には、個々人の感受性要因を解明する必要がある。そのため、当研究室では、カドミウム毒性発現機構とその防御に関する研究に加えて、カドミウム感受性因子の特定とそのメカニズムに関する研究も新たに着手しており、カドミ

ウム感受性因子の特定については、興味深い知見が出始めている。

最後に、愛知学院大学薬学部衛生薬学講座が開設されて、本年度で15年目になる。本稿では、当研究室で進めてきた研究活動のうち、「カドミウム」に焦点を当てて紹介させていただいた。当研究室では、今後も環境毒性学、特に金属毒性学の歴史にしっかりとした足跡を残せるよう、研究室一丸となって引き続き研究活動を進めていく所存である。

謝辞

本稿で紹介した研究の一部は、環境省「重金属等の健康影響に関する総合研究(イタイイタイ病及び慢性カドミウム中毒に関する総合的研究)」(主任研究者:佐藤雅彦、2006年度~2021年度)、文部科学省(日本学術振興会)科学研究費補助金「基盤研究(B)(一般)」(研究代表者:佐藤雅彦、2008年度~2010年度、2018年度~2020年度)、文部科学省(日本学術振興会)科学研究費補助金「基盤研究(C)(一般)」(研究代表者:李辰竜、2016年度~2018年度)、公益財団法人住友財団「環境研究助成」(佐藤雅彦、2006年度)、公益財団法人大幸財団「自然科学系学術研究助成」(李辰竜、2016年度)、公益財団法人薬学研究奨励財団「研究助成金」(徳本真紀、2017年度)、一般財団法人愛知健康増進財団「医学研究・健康増進活動等の助成」(徳本真紀、2018年度)および公益財団法人武田科学振興財団「薬学系研究助成」(李辰竜、2020年度)の助成を受けて実施された。

本研究にご協力いただいた当研究室配属の大学院生(坂野博紀氏、小室広明氏、森 稚景氏)、卒業研究生並びに講座研究員(2006年6月~2008年3月)であった今井峻司先生(現・日本新薬株式会社)に心より感謝申し上げます。

引用文献

- [1] Jarup L., Scand. J. Work Environ. Health., 24, 1-52 (1998).
- [2] Aoshima K., Jpn. J. Hyg., 67, 455-463 (2012).
- [3] Satoh M., Koyama H., Kaji T., Kito H., Tohyama C., Tohoku J. Exp. Med., 196, 23-32 (2002).
- [4] Friberg L., J. Ind. Hyg. Toxicol., 30, 32-36 (1948).
- [5] Tokumoto M., Ohtsu T., Honda A., Fujiwara Y., Nagase H., Satoh M., J. Toxicol. Sci., 36, 127-129 (2011).
- [6] Lee J. Y., Tokumoto M., Fujiwara Y., Satoh M., J. Toxicol. Sci., 38, 959-962 (2013).

- [7] Fujiwara Y., Honda A., Yamamoto C., Kaji T., Satoh M., *J. Toxicol. Sci.*, 36, 141–143 (2011).
- [8] Tokumoto M., Ohtsu T., Imai S., Honda A., Nagase H., Satoh M., *J. Toxicol. Sci.*, 38, 155–157 (2013).
- [9] Tokumoto M., Lee J. Y., Fujiwara Y., Satoh M., *J. Toxicol. Sci.*, 38, 799–802 (2013).
- [10] Honda A., Watanabe C., Yoshida M., Nagase H., Satoh M., *J. Toxicol. Sci.*, 38, 151–153 (2013).
- [11] Kurita H., Nagase H., Tokumoto M., Lee J. Y., Satoh M., *Fundam. Toxicol. Sci.*, 3, 257–280 (2016).
- [12] Lee J. Y., Tokumoto M., Fujiwara Y., Lee M. Y., Satoh M., *Fundam. Toxicol. Sci.*, 1, 131–133 (2014).
- [13] Lee J. Y., Tokumoto M., Hwang G. W., Satoh M., *Fundam. Toxicol. Sci.*, 5, 93–97 (2018).
- [14] Tokumoto M., Fujiwara Y., Shimada A., Hasegawa T., Seko Y., Nagase H., Satoh M., *J. Toxicol. Sci.*, 36, 191–200 (2011).
- [15] Tokumoto M., Satoh M., *Jpn. J. Hyg.*, 67, 472–477 (2012).
- [16] Saville M. K., Sparks A., Xirodimas D. P., Wardrop J., Stevenson L. F., Bourdon J. C., Woods Y. L., Lane D. P., *J. Biol. Chem.*, 279, 42169–42181 (2004).
- [17] Lee J. Y., Tokumoto M., Fujiwara Y., Hasegawa T., Seko Y., Shimada A., Satoh M., *Sci. Rep.*, 6, 21968 (2016).
- [18] Fujiwara Y., Lee J. Y., Tokumoto M., Satoh M., *Biol. Pharm. Bull.*, 35, 1892–1897 (2012).
- [19] Lee J. Y., Tokumoto M., Hwang G. W., Lee M. Y., Satoh M., *Sci. Rep.*, 7, 17287 (2017).
- [20] Tokumoto M., Lee J. Y., Fujiwara Y., Satoh M., *J. Toxicol. Sci.*, 39, 735–738 (2014).
- [21] Lee J. Y., Tokumoto M., Satoh M., *FASEB J.*, in press (2020).
- [22] Lee J. Y., Tokumoto M., Hwang G. W., Satoh M., *BPB Rep.*, 2, 25–28 (2019).
- [23] Lee J. Y., Tokumoto M., Hwang G. W., Satoh M., *Fundam. Toxicol. Sci.*, 4, 275–278 (2017).
- [24] Smith J. A., Kohn T. A., Chetty A. K., Ojuka E. O., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 295, 698–704 (2008).
- [25] Gong H., Xie J., Zhang N., Yao L., Zhang Y., *Med. Sci. Sports Exerc.*, 43, 1441–1450 (2011).
- [26] Welch K. C. Jr., Allalou A., Sehgal P., Cheng J., Ashok A., *PLoS One.*, 8(10), e77003 (2013).
- [27] Lentjes M. H., Niessen H. E., Akiyama Y., de Bruïne A. P., Melotte V., van Engeland M., *Expert Rev. Mol. Med.*, 18, e3 (2016).
- [28] Hamilton D. L., Valberg L. S., *Am. J. Physiol.*, 227, 1033–1037 (1974).
- [29] Horiguchi H., *Jpn. J. Hyg.*, 62, 888–904 (2007).
- [30] Gunshin H., Mackenzie B., Berger U. V., Gunshin Y., Romero M. F., Boron W. F., Nussberger S., Gollan J. L., Hediger M. A., *Nature*, 388, 482–488 (1997).
- [31] Picard V., Govoni G., Jabado N., Gros P., *J. Biol. Chem.*, 275, 35738–35745 (2000).
- [32] Fujiwara Y., Lee J. Y., Banno H., Imai S., Tokumoto M., Hasegawa T., Seko Y., Nagase H., Satoh M., *Toxicol. Lett.*, 332, 130–139 (2020).
- [33] Margoshes M., Vallee B.L., *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 1813 (1957).
- [34] Miles A.T., Hawksworth G. M., Beattie J. H., Rodilla V., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 35, 35–70 (2000).
- [35] Satoh M., *YAKUGAKU ZASSHI*, 127, 709–717 (2007).
- [36] Hozumi I., Inuzuka T., Tsuji S., *Neurochem. Res.*, 23, 319–328 (1998).
- [37] Uchida Y., Tomonaga M., *Brain Res.*, 481, 190–193 (1989).
- [38] Uchida Y., Takio K., Titani K., Ihara Y., Tomonaga M., *Neuron*, 7, 337–347 (1991).
- [39] Quaipe C. J., Findley S. D., Erickson J. C., Froelick G. J., Kelly R. J., Zambrowicz B. P., Palmiter R. D., *Biochemistry*, 33, 7250–7259 (1994).
- [40] Sato M., Bremner I., *Free Rad. Biol. Med.*, 14, 325–337 (1993).
- [41] Cai L., Satoh M., Tohyama C., Cherian M. G., *Toxicology*, 132, 85–98 (1999).
- [42] Klaassen C. D., Liu J., Choudhuri S., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 39, 267–294 (1999).
- [43] Satoh M., *Jpn. J. Hyg.*, 59, 317–326 (2004).
- [44] Klaassen C. D., Liu J., Diwan B. A., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 238, 215–220 (2009).
- [45] Hozumi I., Asanuma M., Yamada M., Uchida Y., *J. Health Sci.*, 50, 323–331 (2004).
- [46] Vasak M., Meloni G., *Int. J. Mol. Sci.*, 18, 1117–1132 (2017).
- [47] Honda A., Komuro H., Hasegawa T., Seko Y., Shimada A., Nagase H., Hozumi I., Inuzuka T., Hara H., Fujiwara Y., Satoh M., *J. Toxicol. Sci.*, 35, 209–215 (2010).
- [48] Honda A., Komuro H., Nagase H., Hozumi I., Inuzuka T., Hara H., Fujiwara Y., Satoh M., *J. Toxicol. Sci.*, 35, 271–273 (2010).
- [49] Honda A., Komuro H., Shimada A., Hasegawa T., Seko Y., Nagase H., Hozumi I., Inuzuka T., Hara H., Fujiwara Y., Satoh M., *Life Sci.*, 87, 545–550 (2010).
- [50] Somji S., Garrett S. H., Sens M. A., Gurel V., Sens D. A., *Toxicol. Sci.*, 80, 358–366 (2004).
- [51] Lee J. Y., Tokumoto M., Fujiwara Y., Hwang G. W., Lee M. Y., Satoh M., *Fundam. Toxicol. Sci.*, 3, 285–289 (2016).