

マンガンによるカドミウム輸送の阻害とカドミウム毒性の変化

柳谷隆宏¹⁾, 井村伸正²⁾, 榎本秀一¹⁾

近藤幸尋³⁾, 姫野誠一郎²⁾

(¹⁾ 理化学研究所*, (²⁾ 北里大学・薬**, (³⁾ 日本医大・泌***)

Alleviation of Cadmium Cytotoxicity by Manganese

Takahiro YANAGIYA¹⁾, Nobumasa IMURA²⁾, Shuichi ENOMOTO¹⁾,

Yukihiro KONDO³⁾ and Seiichiro HIMENO²⁾

¹⁾ *RIKEN (The Institute of Physical and Chemical Research)*,

²⁾ *School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University,*

³⁾ *Department of Urology, Nippon Medical School*

Cadmium (Cd) is a highly toxic metal that causes adverse effects in organisms, but little is known about how Cd enters cells. Recently, we established a Cd-resistant cell line (Cd-rB5) from immortalized metallothionein-null mouse fibroblasts, and found that Cd-rB5 cells exhibited a marked decrease in cellular uptake of manganese (Mn) as well as that of Cd when low concentrations of these metals were added in the medium. Competition and kinetic analyses of cellular uptake of Cd and Mn have revealed that a high affinity transport system for Mn is used for cellular incorporation of Cd. To further elucidate the role of Mn transport in Cd toxicity, we examined the effect of Mn added in the medium on cytotoxicity of Cd using Cd-rB5 and their parental cells. The addition of MnCl₂ in the medium enhanced the viability of Cd-exposed parental cells dose-dependently. IC₅₀ value of CdCl₂ obtained in the presence of 10 μM MnCl₂ was approximately 10 times higher than that obtained in the absence of MnCl₂. However, no alleviation of Cd cytotoxicity by MnCl₂ addition was observed in Cd-rB5 cells in which the high-affinity Mn transport system is down-regulated. These data suggest that Mn may play an important role in both transport and cytotoxicity of Cd.

* 所在地：埼玉県和光市広沢2-1 (〒351-0198)

** 所在地：東京都港区白金5-9-1 (〒108-8641)

*** 所在地：東京都文京区千駄木1-1-5 (〒113-8602)

カドミウムは、イタイイタイ病の主因と考えられる有害性重金属であり、体内に取り込まれると腎障害を初めとする様々な有害な作用を引き起こす。カドミウムの毒性を修飾する生体内因子として最も重要なのはメタロチオネイン (MT) である。MTは構成アミノ酸の約30%をシステインが占める低分子量金属結合蛋白質であり、システインのSH基を介してカドミウムなどの重金属と結合することにより毒性を軽減するものと考えられる。MT以外にもグルタチオンや抗酸化因子等がカドミウムに対する耐性の要因になると考えられているが、これまでに報告されたカドミウム耐性細胞の多くは、細胞内MT濃度が顕著に上昇しており、MT以外の耐性因子の研究は困難であった。

最近、我々は gene targeting により MT 遺伝子を欠失したマウスの胎仔由来の繊維芽細胞株を利用してカドミウム耐性細胞株 (Cd-rB5) を樹立し、Cd-rB5のカドミウムに対する耐性獲得機構を調べたところ、Cd-rB5はカドミウムの取り込み量が著しく減少しており、カドミウムの蓄積性の違いがカドミウムに対する耐性獲得に深く関係していることを明らかにした¹⁾。さらに、Cd-rB5は必須金属であるマンガンの取り込み量も著しく減少しており、カドミウムはマンガンに対して高い親和性を示す輸送系を介して細胞内へ取り込まれていることを明らかにしている²⁾。

そこで、本研究では、細胞の培地中にマンガンを追加することによってカドミウムの細胞毒性が修飾されるかどうかについて検討することにより、マンガンの輸送系がカドミウムの取り込みと細胞毒性にどのような役割を果たしているかについて明らかにすることを目的としている。

実験方法

1. 細胞

すでに樹立されている MT 遺伝子を欠損したマウス繊維芽細胞由来のカドミウム耐性細胞株 (Cd-rB5) を用いた¹⁾。細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium に fetal bovine serum (10%) を添加した培地を用いて、37℃、5% CO₂の条件下で培養した。

2. カドミウム毒性に及ぼすマンガンの影響

細胞を 96-well microplate に 1×10^4 細胞/well の濃度になるように播き、24時間培養後、様々な濃度の塩化カドミウム (0-100 μ M) と同時に 1, 3, 10 μ M の塩化マンガン を培地中に添加して、細胞を 37℃ で 48時間培養した。その後、MTT法により細胞の生存率を測定した。

結果と考察

これまでの MT 遺伝子を欠損したカドミウム耐性細胞株 (Cd-rB5) とその親株を用いた研究から、カドミウムはマンガンに対して高い親和性を示す系 (high-affinity を示す取り込み系) を利用して細胞内へ取り込まれており、Cd-rB5ではこの取り込み系に何らかの変化が生じたためにカドミウムおよびマンガンの取り込みが抑制されていることを明らかにしている²⁾。また、低濃度のカドミウムの取り込みは等モル量のマンガンによって阻害され、同様に、低濃度のマンガンの取り込みも等モル量のカドミウムによって阻害されることも明らかにしている²⁾。そこで、カドミウムの細胞毒性をマンガンが修飾するかどうかについて調べるために、細胞の培地中にカドミウムと同時にマンガンを追加して 48時間後の細胞の

生存率を検討した。その結果、親株を塩化カドミウムで48時間処理したときのカドミウムのIC₅₀は約1.6 μ Mであったのに対して、培地に1, 3, 10 μ Mの塩化マンガンと同時に添加した場合、IC₅₀はそれぞれ、3.6, 8.4, 16.9 μ Mとなり、培地に添加したマンガンの濃度に依存して細胞の生存率が上昇した。一方、Cd-rB5では培地に添加したマンガンによるカドミウム毒性の軽減効果は認められなかった (Fig. 1)。従って、確かに親株ではカドミウムとマンガンに共通した輸送系が存在しており、カドミウムが細胞内へ取り込まれる際に培地中に添加したマンガンが拮抗するためにカドミウムの毒性が軽減されたものと考えられる。一方、Cd-rB5ではカドミウムとマンガンに共通した輸送系が抑制されているために、マンガンによる拮抗作用が認められなかったものと考えられる。

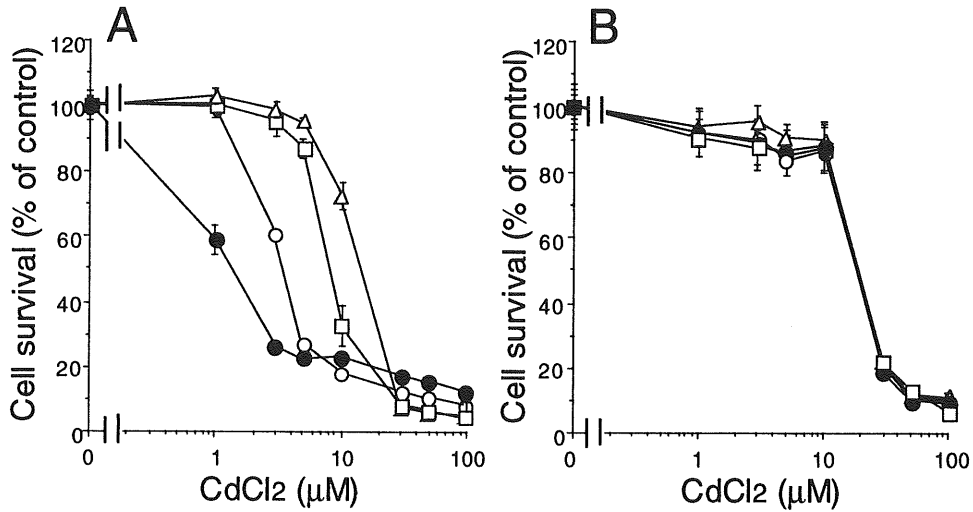


Fig. 1 Effect of manganese on cadmium toxicity in Cd-resistant and parental cells. Parental cells (A) and Cd-rB5 cells (B) were exposed to CdCl₂ in the absence (closed circles) or presence of 1 (open circles), 3 (open squares) or 10 μ M MnCl₂ for 48 hr, and then the surviving cells were determined by MTT assay. (Mean \pm S.D., n=4).

以上のことから、マンガンの輸送系はカドミウムの細胞への取り込みや毒性発現において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

参 考 文 献

- 1) Takahiro Y., N. Imura, Y. Kondo and S. Himeno (1999) Life Sci. 65 : PL177
- 2) Takahiro Y., N. Imura, S. Enomoto, Y. Kondo and S. Himeno (2000) J. Pharmacol. Exp. Therap. 292 : 1080