

マンガンによるカドミウムの細胞毒性の軽減効果

柳 谷 隆 宏¹⁾, 井 村 伸 正²⁾, 榎 本 秀 一¹⁾, 姫 野 誠一郎²⁾

(¹⁾理化学研究所*, (²⁾北里大学・薬**)

Reduction of Cadmium Accumulation and Cadmium-induced Cytotoxicity by Manganese

Takahiro YANAGIYA¹⁾, Nobumasa IMURA²⁾, Shuichi ENOMOTO¹⁾ and Seiichiro HIMENO²⁾

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

²⁾School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University

Cadmium (Cd) is an environmental pollutant that causes adverse effects in organisms, however, it remains unclear how Cd enters cells. Metallothionein (MT) plays an important role in Cd detoxification. In a previous study, we demonstrated that Cd traverses cells partly via a high-affinity transport system for manganese (Mn) using a Cd-resistant cell line (Cd-rB5) from immortalized MT-null mouse fibroblasts and that the suppression of this pathway is one of the determinants of the reduced susceptibility to Cd in Cd-rB5 cells. To clarify the role of the transport system for Mn in the cytotoxicity of Cd, we investigated the modulation of cytotoxicity and accumulation of Cd by Mn, using Cd-rB5 and their parental cells. Simultaneous addition of MnCl₂ to a medium alleviated the cytotoxicity of Cd in parental cells dose-dependently. In parallel, the accumulation of Cd in parental cells was reduced by the addition of MnCl₂ in a dose dependent manner. However, simultaneous exposure of Cd-rB5 cells to Mn did not modulate the cytotoxicity and accumulation of Cd. These results suggest that Mn may act as a competitor for Cd in entering cells, leading to the reduction of cytotoxicity of Cd. The cytotoxicity and accumulation of Cd in MT-null parental cells was attenuated also by ZnCl₂, but not by CoCl₂, NiCl₂, FeSO₄ or CuCl₂, suggesting that Zn may also have an affinity to the transport system for Mn and Cd. Thus, in addition to MT, the inhibition of cellular Cd uptake by Mn may be an important factor for detoxification for Cd.

カドミウムは有害性重金属の一つであり、体内に取り込まれると腎障害や肝障害など、様々な有害な作用を引き起こす。一方、メタロチオネイン (MT) は構成アミノ酸のうち約1/3をシステインが占める低分子量金属結合蛋白質であり、カドミウムなどの重金属毒性を修飾する重要な生体内因子である。

これまでに、我々は、MT遺伝子を欠損したカドミウム耐性細胞株 (Cd-rB5) を用いたカドミウムの取り込みに関する研究から、哺乳動物細胞へのカドミウムの取り込みの少なくとも一部は、必須金属の一つであるマンガンに対して高い親和性を示す輸送系を介して行われていることを明らかにしている^{1),2)}。一方、マンガンの輸送系がカドミウムの毒性発現においてどのような役割を果たしているかについて検討したところ、細胞の培地中にマンガンを追加することによりカドミウムの細胞毒性が軽減されることを明らかにしている³⁾。そこで、本研究では、どのようにしてマンガンがカ

*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)

ドミウムの細胞毒性を軽減しているのかについて検討した。また、マンガン以外の重金属によるカドミウム毒性の軽減効果についても調べた。

Table 1. Effect of simultaneous addition of MnCl₂, ZnCl₂, CoCl₂, NiCl₂, FeSO₄ or CuCl₂ on Cd-induced cytotoxicity and Cd accumulation in Cd-rB5 and parental cells

Metals added to the medium (μM)		Parental cells		Cd-rB5 cells	
		IC ₅₀ of Cd (μM) ^a	¹⁰⁹ Cd uptake(% of control) ^b	IC ₅₀ of Cd (μM) ^a	¹⁰⁹ Cd uptake(% of control) ^b
MnCl ₂	0	2.21	100.0 ± 3.1	22.46	100.0 ± 2.0
	1	3.86	43.9 ± 1.4*	21.33	97.0 ± 3.0
	3	7.13	17.3 ± 1.4*	21.51	95.8 ± 4.7
	5	14.76	12.8 ± 0.3*	20.86	97.7 ± 3.5
	10	21.32	9.9 ± 0.2*	20.10	95.6 ± 2.7
	20	22.17	9.0 ± 0.8*	16.00	101.2 ± 7.9
ZnCl ₂	0	2.21	100.0 ± 1.2	22.46	100.0 ± 1.3
	1	2.31	97.1 ± 1.3	22.36	101.2 ± 3.1
	3	2.33	86.1 ± 3.4*	21.77	97.2 ± 9.4
	5	3.89	70.6 ± 2.1*	22.50	100.1 ± 4.8
	10	5.64	50.0 ± 4.8*	21.96	97.6 ± 5.6
	20	8.03	38.3 ± 1.8*	21.36	107.5 ± 4.1
CoCl ₂	0	2.21	100.0 ± 7.6	22.46	100.0 ± 3.9
	1	2.45	104.4 ± 2.1	22.52	102.0 ± 4.8
	3	2.51	103.1 ± 3.3	21.09	98.7 ± 1.3
	5	2.40	108.0 ± 3.6	23.00	103.5 ± 4.6
	10	2.42	101.6 ± 6.2	22.66	99.1 ± 2.8
	20	2.46	92.5 ± 3.6	22.97	99.9 ± 8.6
NiCl ₂	0	2.21	100.0 ± 6.5	22.46	100.0 ± 0.2
	1	2.40	97.4 ± 2.8	23.27	100.5 ± 1.5
	3	2.43	102.7 ± 2.9	22.91	98.6 ± 2.4
	5	2.42	97.2 ± 3.5	21.81	97.3 ± 4.3
	10	2.32	96.6 ± 3.4	21.71	100.4 ± 4.0
	20	2.38	100.1 ± 1.4	22.16	100.6 ± 3.6
FeSO ₄	0	2.21	100.0 ± 3.2	22.46	100.0 ± 3.1
	1	2.39	101.7 ± 6.9	22.45	103.1 ± 5.5
	3	2.57	104.9 ± 2.6	22.27	100.9 ± 4.6
	5	2.70	103.9 ± 6.9	23.03	101.6 ± 1.3
	10	2.59	101.2 ± 3.2	22.68	104.0 ± 5.0
	20	2.56	92.8 ± 2.2	22.09	103.5 ± 4.3
CuCl ₂	0	2.21	100.0 ± 2.5	22.46	100.0 ± 3.0
	1	2.51	98.3 ± 2.0	21.96	100.8 ± 3.2
	3	2.45	98.5 ± 1.4	21.11	98.3 ± 1.7
	5	2.61	93.1 ± 1.5	21.88	100.0 ± 7.5
	10	2.55	90.0 ± 2.5*	22.44	98.0 ± 2.5
	20	2.19	84.5 ± 1.7*	22.30	98.2 ± 2.4

^a Cells were exposed to CdCl₂ in the absence or presence of 1, 3, 5, 10 and 20 μM MnCl₂, ZnCl₂, CoCl₂, NiCl₂, FeSO₄ or CuCl₂ for 48 hr, and then the surviving cells were determined by MTT assay. The concentration of metals required to kill 50% of the cells as calculated by MTT assay.

^b Cells were exposed to 2 μM [¹⁰⁹Cd]-CdCl₂ in the absence or presence of 1, 3, 5, 10, and 20 μM MnCl₂, ZnCl₂, CoCl₂, NiCl₂, FeSO₄ or CuCl₂ for 48 hr. Asterisks indicate significant differences from the value obtained in the absence of metal inhibitors by *t* test (**p* < 0.01).

実験方法

1. 細胞

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) とその親株を用いた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. カドミウムの毒性発現におけるマンガンおよびその他の重金属の影響

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, 5, 10, 20 μ M の塩化マンガン、塩化亜鉛、塩化コバルト、塩化ニッケル、硫酸第一鉄、塩化第二銅を添加して 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。

3. カドミウムの細胞への蓄積におけるマンガンおよびその他の重金属の影響

細胞の培地中に 2 μ M の [¹⁰⁹Cd]CdCl₂ と同時に 1, 3, 5, 10, 20 μ M の塩化マンガン、塩化亜鉛、塩化コバルト、塩化ニッケル、硫酸第一鉄、塩化第二銅を添加して 37℃ で 48 時間培養した。細胞を洗浄後、細胞中の ¹⁰⁹Cd の放射活性を測定した。

結果と考察

細胞の培地にマンガンとカドミウムを同時添加することによって、カドミウムの細胞毒性がどのように変化するかにについて検討したところ、親株においては、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。また、親株の培地にカドミウムと同時にマンガンを添加してカドミウムの蓄積量を調べたところ、添加したマンガンの濃度に依存してカドミウムの蓄積量が減少しており、20 μ M のマンガンを同時添加した場合にはマンガンを添加しなかったときの約 10% の値であった。一方、Cd-rB5 を用いて同様の実験を行ったところ、マンガン添加によるカドミウム毒性の軽減効果や蓄積量の減少は認められなかった。このことから、親株においては、培地にマンガンを添加することによって、マンガンの輸送系を介したカドミウムの取り込みが阻害されたためにカドミウム毒性が軽減されたが、Cd-rB5 ではその取り込み系が抑制されているために、マンガンによるカドミウム毒性の軽減効果が認められなかったものと考えられる。

次に、マンガン以外の重金属によるカドミウム毒性の軽減効果について検討した。親株の培地にカドミウムと同時に亜鉛 (II)、コバルト (II)、ニッケル (II)、鉄 (II) または銅 (II) を添加して細胞の生存率を調べたところ、亜鉛においてのみ、培地に添加した亜鉛の濃度に依存したカドミウム毒性の軽減効果が認められた。また、親株の培地にカドミウムと同時に亜鉛を添加したときのカドミウムの蓄積量を調べたところ、添加した亜鉛の濃度に依存してカドミウムの蓄積量が減少していたが、亜鉛以外の重金属を同時添加した場合には、カドミウムの蓄積量は変化しなかった。一方、Cd-rB5 を用いて同様の実験を行ったところ、亜鉛、コバルト、ニッケル、鉄または銅によるカドミウム毒性の軽減効果、カドミウムの蓄積性の変化は認められなかった。これらのことから、カドミウムとマンガんに共通する輸送系は亜鉛に対しても親和性を示す系であると考えられる。

本研究により、マンガンの輸送系はカドミウムの細胞への取り込みやカドミウムの細胞毒性の発現に重要な役割を果たしていることを明らかにすることができた。

参考文献

- 1) Yanagiya, T., Himeno, S., Kondo, Y. and Imura, N. (1999) Life Sci 65 : PL177 – 182.
- 2) Yanagiya, T., Imura, N., Enomoto, S., Kondo, Y. and Himeno, S. (2000) J. Pharmacol. Exp. Therap. 292 1080 – 1086.
- 3) 柳谷隆宏, 井村伸正, 榎本秀一, 近藤幸尋, 姫野誠一郎 (2000) 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, 微量栄養素研究第 17 集, 135 – 137.

