

カドミウム毒性発現機序の解明に向けた  
メタロチオネイン発現と  
細胞分化への影響に関する研究

2024 年

小串 祥子

# 目次

緒論	1
本論	
第一章 メタロチオネインの遺伝子発現に対する制御機構	4
第一節 緒言	4
第二節 実験材料および実験方法	6
第三節 実験結果および考察	10
第四節 小括	17
第二章 カドミウムの白血病細胞に対する影響とメタロチオネイン発現変化	18
第一節 カドミウムの急性骨髄性白血病細胞 HL60 分化に対する影響	
第一項 緒言	18
第二項 実験材料および実験方法	20
第三項 実験結果および考察	22
第二節 カドミウムのリンパ肉腫細胞 P1798 に対する影響	
第一項 緒言	28
第二項 実験材料および実験方法	29
第三項 実験結果および考察	36
第三節 小括	44
第三章 カドミウムの胎盤細胞に対する影響とメタロチオネイン発現変化	
第一節 緒言	46
第二節 実験材料および実験方法	47
第三節 実験結果および考察	50

第四節 小括	62
総括	63
結論	66
謝辞	67
参考文献	68

## 緒 論

カドミウム (Cd) は環境中に広く存在する重金属であり、銅や亜鉛 (Zn) の採掘過程において鉱石に含まれる不純物として土壌や水中に拡散される。環境中の Cd は、土壌を通して植物に吸収され、飲料水や食料として動物に取り込まれて体内に蓄積する。稲は Cd を吸収しやすい性質を持つため、米を主食とする日本人の Cd 曝露の半分近くが米由来であるとも言われており、生活において切り離せない環境リスク因子である。また、タバコの葉にも多くの Cd が含まれており、喫煙による Cd 曝露も問題となっている<sup>1</sup>。我が国において、高濃度の Cd 環境汚染を介した、腎障害および骨軟化症を主な症状とするイタイイタイ病が発生したことは有名である<sup>2</sup>。Cd の暫定耐容週間摂取量 (PTWI) は、腎尿細管機能障害のバイオマーカーである  $\alpha$ 1-マイクログロブリンの尿中濃度への影響に基づいて、7  $\mu$ g/kg 体重/週と設定されている<sup>3</sup>。現在日本国内においては、工場排水中や米に含まれる Cd 量が法律で規制されていることから、イタイイタイ病を引き起こす程高濃度での曝露はあり得ない状況であり、平均的な曝露量も PTWI の 40%程度であると見積もられている。しかしながら、Cd は生物学的半減期が 15~30 年と極めて長く、日常的に曝露した Cd は加齢に伴って体内に蓄積されるため、低濃度であっても長期間曝露することで健康被害を引き起こすことが懸念される。実際に、喫煙者における尿中および血中 Cd 濃度の上昇と疾患発症リスクとの関連性<sup>1</sup>や、妊婦の血中 Cd 濃度と胎児の健康リスクとの関連性<sup>4,5</sup>など、日常生活で想定される Cd 曝露と疾患発症率増加の相関性を指摘した疫学調査があるが、その科学的エビデンスは非常に乏しく、毒性発現機序もほとんど明らかになっていないという課題がある。

Cd の毒性はメタロチオネイン (MT) との結合によって軽減されることが良く知られている。体内に吸収された Cd は、肝臓で MT 発現を誘導して Cd-MT 複合体となり、血液循環を介して腎臓を主とした様々な臓器に蓄積する。MT は、

分子量約 6500 と低分子量の金属結合性タンパク質であり、構成アミノ酸残基の 1/3 をシステインが占めている。システインの SH 基が Zn などの金属との結合に関わっており、MT1 分子あたり最大 7 個の Zn が結合できる。1990 年代に MT1/2 欠損マウスが作成され<sup>6,7</sup>、野生型マウスと比較して Cd、Zn、鉛などの金属曝露おける半数致死量が少ないことから、有害金属の解毒に関与していることが示された<sup>8,9</sup>。一方で MT は金属解毒以外に、亜鉛恒常性の維持<sup>10,11</sup>、活性酸素種の消去<sup>12</sup> などにも関わっていることが明らかにされており、生体防御において重要な役割を担っていると考えられる。すなわち、Cd 曝露によって MT 発現が過剰に誘導されることで、体内における MT 量のバランスが乱れ、これら作用を攪乱する可能性も考えられる。また、Cd による MT 転写活性化機構については、Cd がタンパク質などに結合した Zn を遊離させ、この遊離 Zn が転写因子を活性化すると考えられているが、Cd は Zn よりも低濃度で MT を誘導することから、この機構のみでは十分に説明できていない。

長期的な Cd 曝露は発がんリスクを増加させることが知られており、その作用点のひとつとして、Cd がエピジェネティックな変化を引き起こすことが多数報告されている<sup>13</sup>。エピジェネティックな変化とは、DNA 塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現制御機構のことであり、主に DNA メチル化やヒストン修飾（メチル化、アセチル化、ユビキチン化）などが関与している。このうち最もよく研究されているのが DNA のメチル化である。哺乳類における DNA のメチル化は、CG の並びのシトシンでのみ観察され、DNA メチル基転移酵素 (DNMT) によってメチル基供与体 (S-アデノシルメチオニン) からシトシンにメチル基が転移されることで起こるとされている。遺伝子上流のプロモーター領域において、CG が高頻度に繰り返される CpG アイランドと呼ばれる領域が存在するとき、CpG アイランドが高度にメチル化されている場合には遺伝子発現は抑制され、逆にメチル基が外れると発現が促進されることが知られている<sup>14</sup>。メチル化

による転写抑制機構として、メチル化シトシンを認識して結合するメチル CpG 結合タンパク質 (MeCP2) が遺伝子のプロモーター領域に結合し、転写因子の結合を阻害することが報告されている<sup>15</sup>。また、MeCP2 によってヒストン脱アセチル化酵素が誘導されるため、メチル化されたゲノム領域のクロマチン構造が凝縮し、不活性なヘテロクロマチンとなることも報告されている<sup>16</sup>。DNA のメチル化や脱メチル化は、環境中に存在する化学物質などによって変化するという報告も多く、このようなエピジェネティックな変化を引き起こす環境因子は、エピ変異原と呼ばれ、どの環境化学物質がエピ変異原として作用するのかについての研究や、化学物質のエピ変異原性を調べるための手法開発が精力的に進められている<sup>17-19</sup>。Cd のエピ変異原性については、妊娠中の母体血中の Cd 濃度と子どもの DNA メチル化状態の変化との関連性<sup>20,21</sup> や、喫煙者に見られる DNA メチル化の変化と血中 Cd 濃度との相関<sup>22</sup> が報告されており、Cd によってメチル化頻度が増える遺伝子と減る遺伝子の両方が示されている。発がんについては、DNMT の発現を上昇させ、DNA 修復遺伝子の発現を抑制することが、リスク因子となる作用点である可能性が示唆されている<sup>23-25</sup> が、発がん以外の疾患リスクについては具体的な影響や作用点についての知見が少ないのが現状である。

本研究では、日常生活で起こり得るレベルの低濃度 Cd への長期曝露が引き起こす悪影響とその作用点の解明を目指した。Cd 曝露による影響には、Cd 毒性に対する主要な防御因子である MT の発現変化が関わっているのではないかと予想し、まずは MT の発現制御機構を明らかにした。次に、エピジェネティック変異に焦点を絞って、エピジェネティック変異による影響を受けやすいと考えられる細胞分化への Cd の影響を調べ、一般人の血中濃度としてあり得る濃度であっても、長期間曝露することで細胞分化が阻害されることを明らかにした。

# 本 論

## 第一章 メタロチオネイン遺伝子発現に対する制御機構

### 第一節 緒言

Cd や Zn などの重金属曝露によって MT 発現が誘導される際の発現制御機構については、金属応答配列 (metal responsive element, MRE) への MRE-binding transcription factor-1 (MTF1) の結合を介した経路がよく知られている<sup>26-29</sup>。マウス MT には MT1, 2, 3, 4、ヒト MT には MT1A, 1B, 1E, 1F, 1G, 1H, 1M, 1X, 2A, 3, 4 と複数のアイソフォームが存在し、それらの発現量は組織・細胞種ごとに異なるため、何らかの役割分担があることが予想される<sup>30,31</sup>。アイソフォーム間の差異として、ヒト MT の金属応答性が異なることが、ヒト子宮頸部上皮細胞腫 HeLa 細胞<sup>32,33</sup>、乳がん細胞株 PMC42 細胞<sup>34</sup>、ヒト尿路上皮細胞株 NHU 細胞<sup>35</sup> など複数の細胞で明らかにされており、特定の MT アイソフォームが特定のタンパク質と相互作用するという報告もアイソフォームの役割分担の可能性を支持している<sup>36-38</sup>。このように、アイソフォームの発現制御や機能の違いが研究されてきたが、未だその必要性を説明するには至っていない。アイソフォームごとの機能や、Cd 応答性の違いが明らかになれば、Cd が MT 発現誘導を介して生体に及ぼす影響の予測につながると考えられる。

本章では、Cd の毒性発現機構解明の第一歩として、Cd 毒性に密接に関わる MT の発現制御機構についての解明を試みた。MT アイソフォームのコード領域は高度に保存されており、特にシステインの位置はアイソフォーム間でよく保存されている (Fig. 1A) のに対し、プロモーター領域における MRE や CpG の数や位置はそれぞれに異なる (Fig. 1B)。このプロモーター領域の配列の違いが、アイソフォーム間の発現の違い、つまり Cd 応答性の違いにつながっていると予想し、MRE に着目して MT アイソフォームの発現制御の違いについて調べた。

**A**

**Mouse metallothionein:**

```

MT-1 : MDPN-CSCSTGGSTCTTSSCACKNCKCTSCKKSCCSPPVGCASKAQQGVCKGA-----ADKCTCCA
MT-2 : MDPN-CSCASDGS CSCAGACKCKQCKCTSCKKSCCSPPVGCASKSQGCIKKA-----SDKSCCA
MT-3 : MDPETCPPTGGSTCTSDKCKCKGCKCTNCKKSCCSPPAGCEKCAKDCVCKGEEGAKAEAEKSCCQ
MT-4 : MDPRECVCMGGICMCGDNCKCTTCNCKTYWKS CCPPPGCAKCAARGCTCKGG-----SDKSCCP

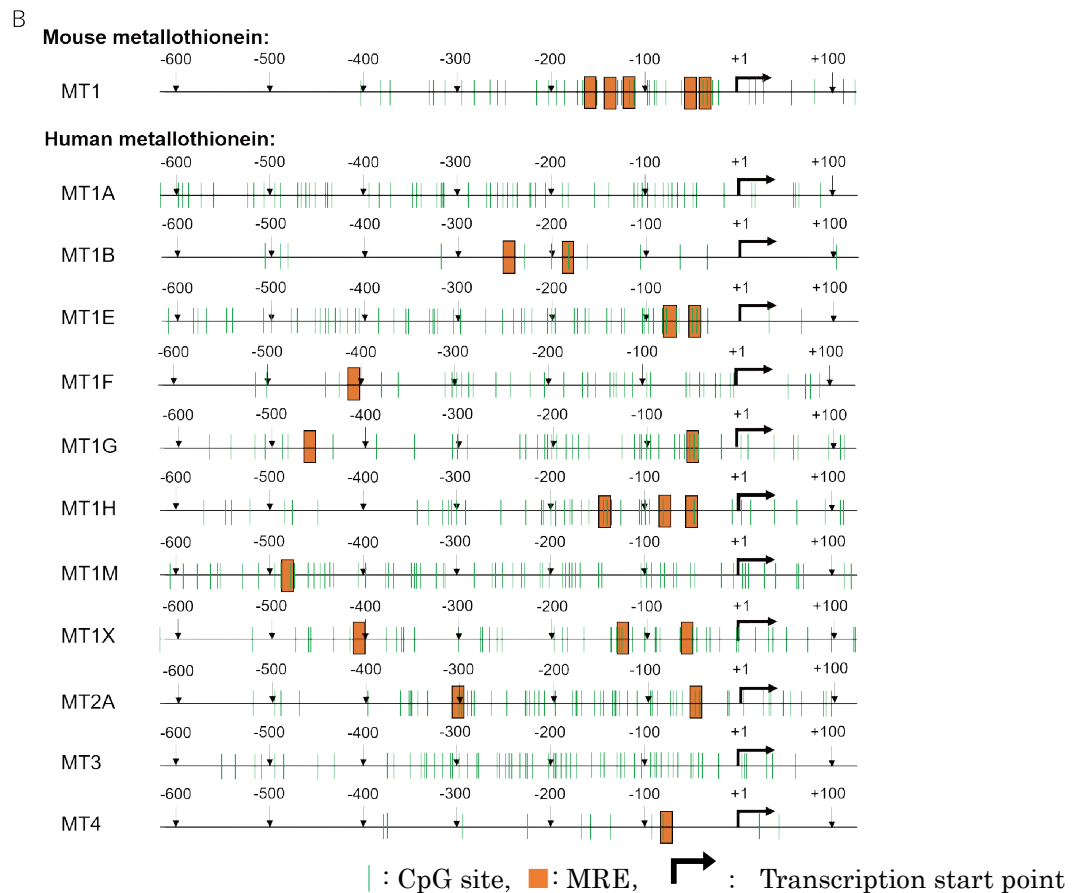
```

**Human metallothionein:**

```

MT-1A : MDPN-CSCATGGSTCTTGSCKCKECKCTSCKKSCCSPPMSCAKAQQGCIKKGAS -----EKSCCA
MT-1B : MDPN-CSCATTGGSCACAGSCKCKECKCTSCKKCCCSPPVGCASKAQQGVCKGSS -----EKCRCCA
MT-1E : MDPN-CSCATGGSTCTCAGSCKCKECKCTSCKKSCCSPPVGCASKAQQGVCKGAS -----EKSCCA
MT-1F : MDPN-CSCAACVSTCTCAGSCKCKECKCTSCKKSCCSPPVGCASKAQQGVCKGAS -----EKSCCD
MT-1G : MDPN-CSCAAGVSTCTCASSCKCKECKCTSCKKSCCSPPVGCASKAQQGCIKKGAS -----EKSCCA
MT-1H : MDPN-CSCAAGVSTCTCASSCKCKECKCTSCKKSCCSPPVGCASKAQQGCIKKGAS -----EKSCCA
MT-1M : MDPN-CSCATTGVSCACTGSCCTCKECKCTSCKKSCCSPPVGCASKAQQGVCKGTL -----ENCSCCA
MT-1X : MDPN-CSCSPVGSACAGSCKCKECKCTSCKKSCCSPPVGCASKAQQGCIKGTSS -----DKSCCA
MT-2A : MDPN-CSCAAGDSTCTCAGSCKCKECKCTSCKKSCCSPPVGCASKAQQGCIKKGAS -----DKSCCA
MT-3 : MDPETCPSPGGSTCTCAGSCKCKECKCTSCKKSCCSPPAECCEKCAKDCVCKGGEEAAEAEKSCCQ
MT-4 : MDPRECVCMGGICMCGDNCKCTTCNCKTYWKS CCPPPGCAKCAARGCTCKGG-----DKSCCP

```



**Fig. 1. Mouse and human MT isoforms.** (A) Comparison of amino acid sequences of mouse and human MT isoforms. The yellow marker portion indicates the position of cysteine. (B) Location of CpG sites and MRE sequences in the promoter region of MT isoforms. The location and number of MRE sequences in mouse MT1 were obtained from literature information<sup>39</sup> and that of human MT isoforms was searched for the binding sequence of MTF1 (Matrix ID: MA0863.1) at -600 to +100 bp using JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>). Relative profile score threshold was set at 80%.



## 第二節 実験材料および実験方法

### 細胞培養

HeLa 細胞は理研バイオリソースセンター細胞バンク (Tsukuba, Japan) から購入した。10%牛胎仔血清 (FBS, Biowest, Nuaille, France)、抗生物質 (Antibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solution; Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) を含んだ DMEM 培地 (1.0 g/l glucose) を用いて 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下にて培養し、2~3 日ごとに継代を行った。qPCR では  $6.0 \times 10^4$  cells/well の密度で 12 well plate に、ルシフェラーゼレポーターアッセイでは  $3.3 \times 10^4$  cells/well の密度で 24 well plate に播種した。Zn 処理には ZnSO<sub>4</sub> を用いた。Chelex®-100 キレート樹脂は Bio-Rad (Hercules, CA, USA) から購入した。メーカーのプロトコールに従って Chelex®-100 キレート樹脂で処理した 10%Chelex®-100 処理 FBS を添加し、Zn 欠乏培地を調製した。生細胞数は Trypan Blue Dye (Bio-Rad) で染色後 TC20TM 全自動セルカウンター (Bio-Rad) を用いて計数した。

### Real time RT-PCR

RNA 抽出試薬 Isogen (Nippon Gene Co, Ltd, Tokyo, Japan) を用い、製造元のプロトコールに従って、細胞から Total RNA を抽出した。High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, MA, USA) を用いて、Total RNA からランダムプライマーを用いて逆転写を行い、cDNA を合成した。qPCR は、PCR 試薬 TB Green Premix Ex Taq (Tli RNase H Plus) (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan) または Premix Ex Taq (Probe qPCR; Takara Bio, Inc.) を用い、Eco Real-Time PCR System (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) で行った。各 MT アイソフォームの mRNA 発現量測定のための qPCR に使用したプライマーを Table 1 に示した。プライマーは、Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, IA, USA) から購入した。

**Table 1. Primers used for qPCR.**

Gene	Sequence	
MT1A	F	5'-GCTCGAAATGGACCCCAAC-3'
	R	5'-TAAATGGGTCAGGGTTGTATGG-3'
MT1B	F	5'-CTCCTGCCCTGACTTCTCA-3'
	R	5'-CTCTGATGAGCCTTTCAGAC-3'
MT1E	F	5'-GCTTGTTTCGTCTCACTGGTG-3'
	R	5'-CAGGTTGTGCAGGTTGTTCTA-3'
MT1F	F	5'-CGCTTCTCTCTTGGAAAGTCC-3'
	R	5'-CTGTTTACATCTGGGAGAAAGGTTG-3'
MT1G	F	5'-CTAGTCTCGCCTCGGGTTG-3'
	R	5'-GCAGCTGCACTTCTCCGAT-3'
MT1H	F	5'-GCTCCTGCAAGTGCAAAAAG-3'
	R	5'-AGGAATGTAGCAAATGAGTCG-3'
MT1M	F	5'-AGCAGTCGCTCCATTTATCG-3'
	R	5'-GCTCTTCTTGCAGGAGGTG-3'
MT1X	F	5'-TTGATCGGGAACCTCCTGCTT-3'
	R	5'-CAGCAGCTGCACTTGTCTG-3'
MT2A	F	5'-CTAGCCGCCTCTTCAGCTC-3'
	R	5'-AAGTCGCGTTCTTTACATCTGG-3'
MT3	F	5'-TCCTGCAAGTGCGAGGGATG-3'
	R	5'-GGACACCAGCCACACTTCA-3'
MT4	F	5'-GCAAATGCACAACCTGCAAC-3'
	R	5'-AGACACTTCCCAGGTTTCTC-3'

#### ルシフェラーゼレポーターアッセイ

MT アイソフォームの各プロモーター領域を PCR で増幅し、HindIII/SacI で切断した pGL4.12[luc2CP] (Promega, Madison, WI, USA) のホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech Laboratories, Inc., CA, USA) を用いた In-Fusion 反応で連結したレポーターベクター、pGL4.12-hMT1A-1858/+23、pGL4.12-MT1E-1928/+49、pGL4.12-hMT1G-636/+59、

pGL4.12-hMT1X-1879/+71、pGL4.12-hMT2A-1672/+55 を構築した。PCR に用いたプライマーの配列を Table 2 に示した。また、C 末端に Flag タグをつけたマウス MTF1 を発現するベクター pcDNA3.1-mMTF1flag<sup>40</sup> の mMTF1 部分をヒト MTF1 に入れ替えて、pcDNA3.1-hMTF1flag を構築し、MTF1 共発現のために使用した。ヒト MTF1 は、pRc/CMV-MTF<sup>41</sup> から PCR 反応により得た。PCR に用いたプライマーの配列は Table 2 に示した。細胞を 24 well plate に  $4.0 \times 10^4$  cells/well で播種し、24 時間後に培地を交換した後、FuGENE<sup>®</sup> HD (Promega) を用いてルシフェラーゼレポーターベクターの導入を行った。遺伝子導入の際、Opti-MEM<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific, Inc.) に DNA 0.3  $\mu$ g を加え 40  $\mu$ l とした混合液に、FuGENE<sup>®</sup> HD 2  $\mu$ l を加えて室温で 15 分静置した後、この DNA-FuGENE<sup>®</sup> HD 複合体混合液を 40  $\mu$ l/well で添加した。各 MT レポーターベクター、pRL-SV40 (Promega)、pEGFP (Clontech Laboratories, Inc.) または pcDNA3.1-hMTF1flag を、Opti-MEM<sup>®</sup> 中で 1 : 0.04 : 7.5 の割合で混合し、導入に使用した。遺伝子導入から 24 時間後に各濃度の ZnSO<sub>4</sub> を添加し、そのさらに 6 時間後に回収した。回収は以下の通り行った。まず、各 well に PBS を添加して洗浄した。次に、1  $\times$  Passive Lysis Buffer (Promega) 25  $\mu$ l を加え、室温にて 15 分間放置することで細胞を完全に溶解した。この試料は活性測定するときまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。ルシフェラーゼ活性は、Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega) を用いて測定した。発光の検出には GloMax 20/20 Luminometer (Promega) を用いた。ホタルルシフェラーゼ活性は、pRL-SV40 から SV40 プロモーター依存的に発現するウミシイタケルシフェラーゼの活性に対する相対量として算出した。

**Table 2. Primers used for cloning.**

Gene	Sequence
MT1A	F 5'- <u>GCTCGCTAGCCTCGAGTATTAGGGCAGGGAGGTG</u> -3'
	R 5'- <u>TCTTGATATCCTCGAGAAGGCGCACGTGGAAGGC</u> -3'
MT1E	F 5'- <u>CTCGGCGGCCAAGCTCTGCTCCACAAAATCATC</u> -3'
	R 5'- <u>CCGGATTGCCAAGCTACCAGTGAGACGAACAAGC</u> -3'
MT1G	F 5'- <u>GCTCGCTAGCCTCGAGGAGGACCTGGACAAATGGG</u> -3'
	R 5'- <u>TCTTGATATCCTCGAGGAGACTAGAGTTCCAAGC</u> -3'
MT1X	F 5'- <u>GCTCGCTAGCCTCGACACATGGCAAATGATCTATAA</u> -3'
	R 5'- <u>TCTTGATATCCTCGATTCGAGGCAAGGAGAAGC</u> -3'
MT2A	F 5'- <u>GCTCGCTAGCCTCGAGCAGGGTGGTCAAGAGGTG</u> -3'
	R 5'- <u>TCTTGATATCCTCGAGGCTAGAGTCGGGACAGGT</u> -3'
hMTF1	F 5'- <u>GTTTAAACTTAAAGCTATGGGGGAACACAGTCCA</u> -3'
	R 5'- <u>CTTGTAGTCCTTGAGCTTGGAGAAGCTGCTGGT</u> -3'

Underlines indicate the sequences homologous to the vector.

#### 電気泳動移動度シフトアッセイ (EMSA)

pcDNA3.1-hMTF1flag と TnT<sup>®</sup> T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) を用いて、製造元のプロトコールに従ってヒト MTF1 タンパク質を合成した。Cy5 標識 MRE (Cy5-MRE) は Integrated DNA Technologies, Inc. から購入し、各プロモーターにおける MTF1 の相対スコアが最も高い MT1A プロモーター領域内の推定 MRE (MRE<sub>MT1A-c</sub>) および MT2A プロモーター領域内の推定 MRE (MRE<sub>MT2A-a</sub>) は Fasmac Co. (Atsugi, Japan) から 2 本鎖 DNA として購入した。Table 3 にはそれぞれセンス鎖の配列を示した。MTF-1 1 μL を、10 μL の 2×Buffer, pH 7.9 (24 mM HEPES、120 mM KCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM DTT) および 1 μL の 1mg/mL の poly (dI-dC) 中で、50 μM の Zn とともに 37°C で 15 分間インキュベートした。次に、1.0 μL の 0.1 μM Cy5-MRE と MRE<sub>MT1A</sub> または MRE<sub>MT2A</sub> を加え、4°C で 15 分間インキュベートした。この混合物を 6% アクリルアミドゲル上で電気泳動し、遊離 Cy5-MRE と MTF1-Cy5-MRE 複

合体を分離した。これらの  $Cy5$ -MRE は、PharosFX System (Bio-Rad) を用いて可視化した。

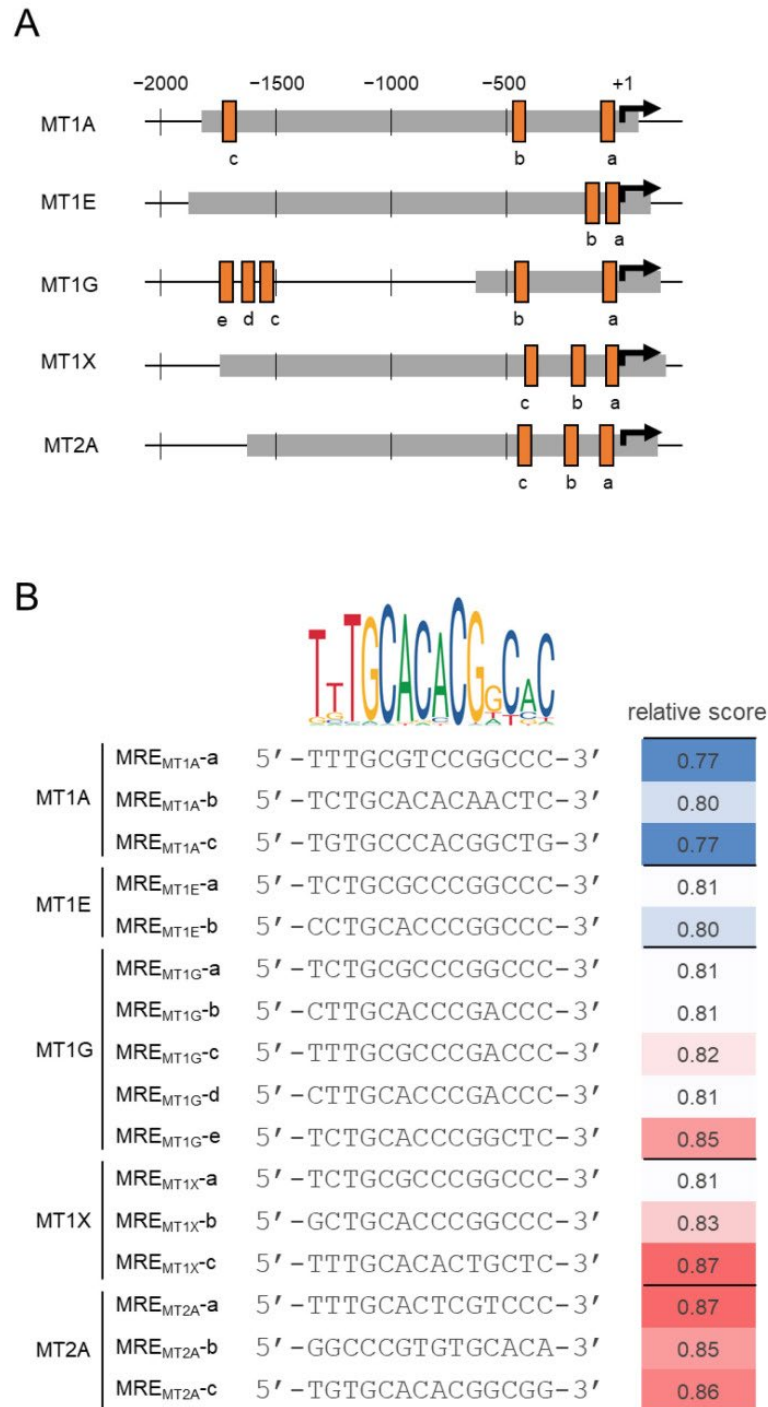
**Table 3. Oligo DNA sequence used for EMSA.**

	Sequence
$Cy5$ -MREs	5'-GATCCAGGGAGCTCTGCACACGGCCCGAAAAGTA-3'
MRE <sub>MT1A-b</sub>	5'-CGGTGGCGGTTGCTCTGCACACAACCTCGCTCGCTACCGCA-3'
MRE <sub>MT2A-a</sub>	5'-CCGGGGCGGGGCTTTTGCACTCGTCCCGGCTCTTTCTAGC-3'

Underlines indicate the MRE consensus sequence.

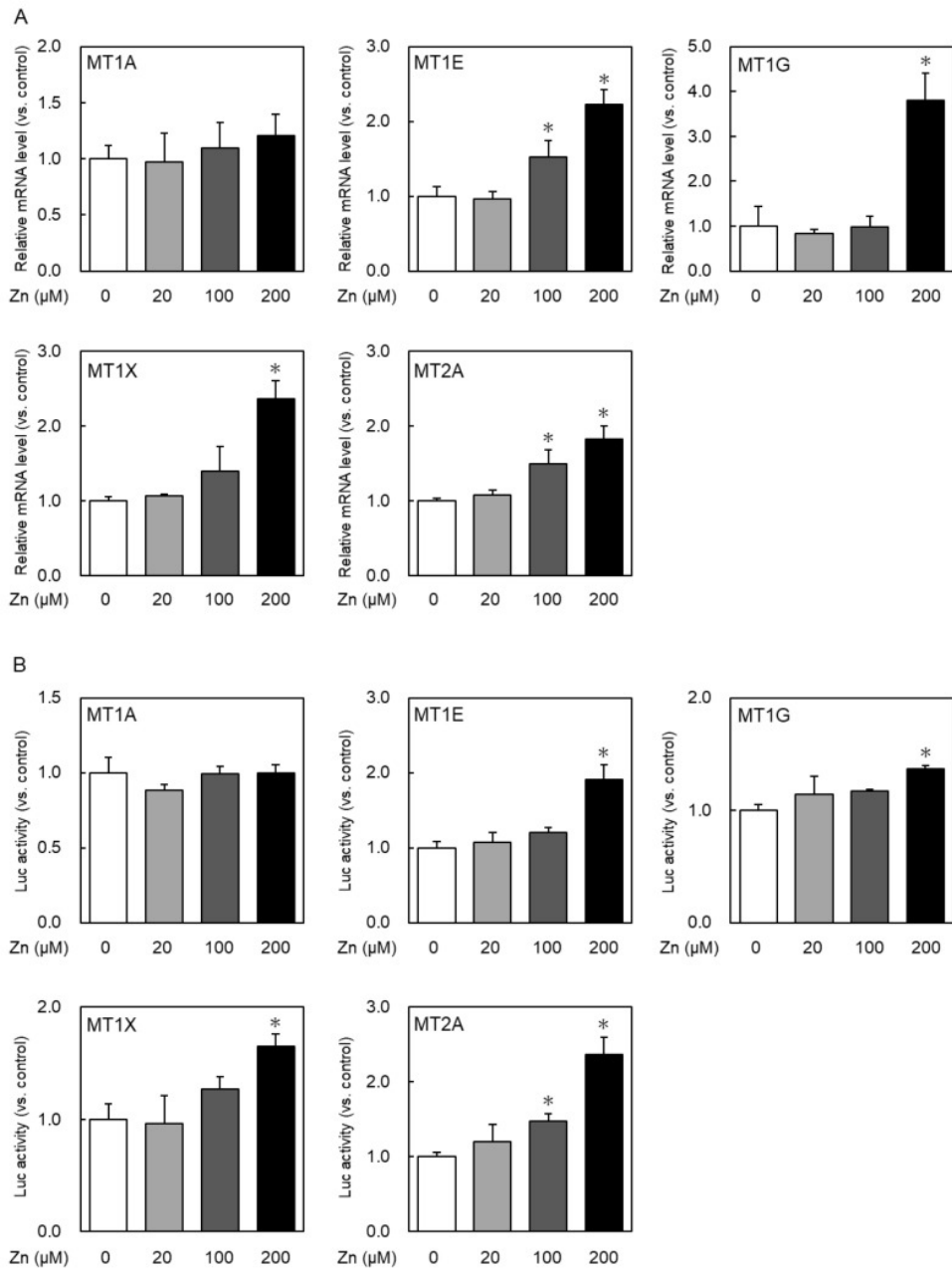
### 第三節 結果および考察

MT アイソフォームのプロモーター領域-600~+100 bp において、JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>) で MTF1 (Matrix ID:MA0863.1) の結合配列 MRE を推定した結果は Fig. 1B に示した通りであり、MT1A には推定 MRE 配列が存在しなかった。MT1A は MTF1 による制御を受けていない可能性も考えられるが、検索範囲を広げて-2000bp~+100 bp とし、MRE コンセンサス配列とどれくらいの相同性があるかを示した値である Relative profile score threshold を 0.8 から 0.7 に変更して再検索したところ、Relative score が 0.8 以下の配列が 3 つ見つかった (Fig. 2)。多くの組織で高発現している MT アイソフォーム、MT1E、MT1G、MT1X、MT2A についても同様に再検索し、アイソフォームごとに数や位置が異なるが、それぞれ 2~5 つの MRE 推定配列が見つかった。Relative score を比較したところ、MT1A の MRE 推定配列はすべて 0.8 以下であり他のアイソフォームに比べて低いのに対し、MT2A はすべて 0.85 以上と高かったことから、この違いが Cd による MT 誘導の主要な経路である MTF1 を介した発現制御に影響を与えているのではないかと予想した。



**Fig. 2. Schematic diagram of the MT promoter region.** (A) The arrows indicate the transcription start sites. Orange squares indicate MREs (designated a–e, from the side closest to the transcription start site) that is identified by the JASPAR search for MTF1 (Matrix ID: MA0863.1). (B) Comparison between MRE consensus sequence and MRE sequences on each MT promoter. The relative scores obtained from the JASPAR search are shown in color scale on the right : 0.81 (white); 1.0 (dark red); 0.7 (dark blue).

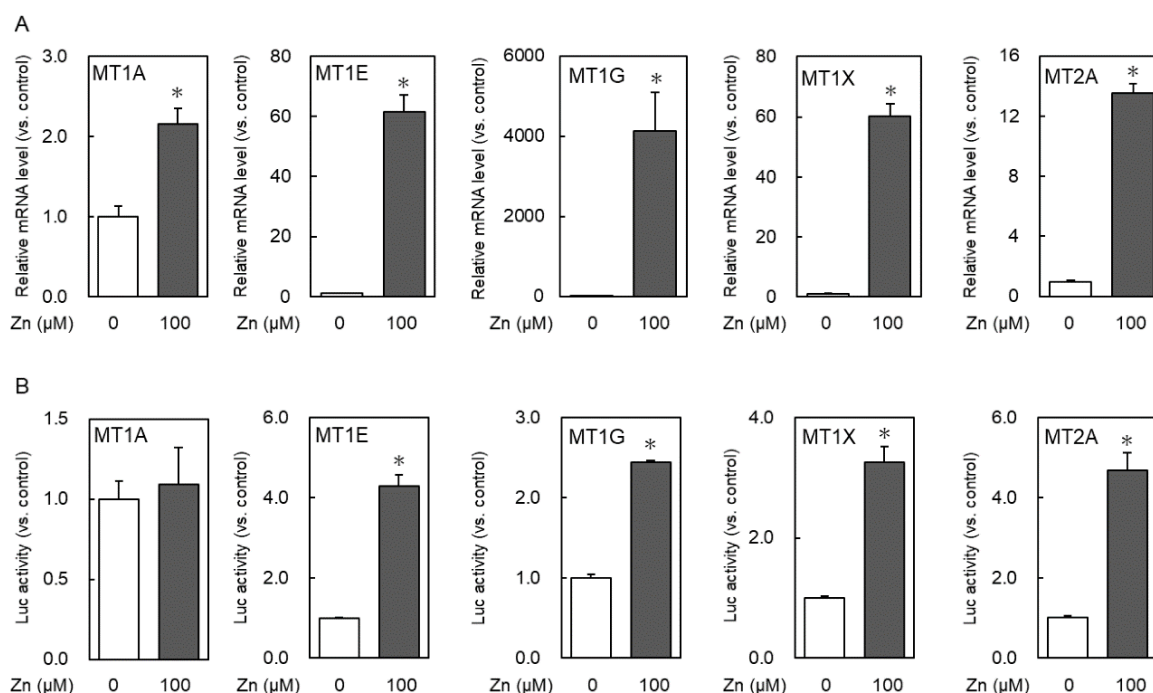
Relative score と金属応答性の違いとの関連性の有無を明らかにするため、MTF1 活性化による MT 発現量と MT プロモーター活性の変化を、アイソフォーム間で比較した。先述の通り、Cd は MTF1 を直接的には活性化できないため、MTF1 活性化には Zn を用いた。Zn や Cd、Cu などの金属応答性がアイソフォーム間で異なっていることが報告されている<sup>32,33</sup>、HeLa 細胞を Zn (20-200  $\mu$ M) で 6 時間処理し、MT1A、MT1E、MT1G、MT1X、MT2A の mRNA 発現量を測定した (Fig. 3A)。Zn は濃度依存的に MT1E、MT1G、MT1X、MT2A の発現を上昇させたが、MT1A は 200  $\mu$ M 処理でも誘導されなかった。一般に、遺伝子発現は mRNA の発現は主に転写レベル、すなわちプロモーターの活性化と mRNA の安定性によって制御される。そこで、MT1A mRNA 発現量の違いがプロモーター活性の変化によるものかどうかを調べるために、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。HeLa 細胞にレポーターベクターを導入後、Zn (20-200  $\mu$ M) で 6 時間処理し、各 MT アイソフォームのプロモーター活性を比較した (Fig. 3B)。mRNA 発現量と同様にプロモーター活性においても、MT1E、MT1G、MT1X、MT2A では Zn 濃度依存的な上昇が見られたが、MT1A では変化がなかった。Zn 濃度依存的なプロモーター活性の上昇が見られたアイソフォームの中で、最も上昇の程度が大きかったのは MT2A であり、Relative score と Zn 処理によるプロモーター活性上昇に関連性が見られたが、mRNA 発現については MT1G の方が MT2A よりも大きく上昇しており、Relative score との関連性はなかった。



**Fig. 3. Each MT isoform expression after zinc treatment.** (A) HeLa cells were treated with zinc at the indicated concentrations for 6 h, and the MTs mRNA expression was determined via real-time RT-PCR. (B) HeLa cells were co-transfected with luciferase reporter vector, pRL-SV40 vector for internal control, and pEGFP. At 24 h after transfection, the cells were treated with zinc at the indicated concentrations for 6 h, and luciferase activity was measured using the dual-luciferase assay system. pGL4.12-MT1A-1858/+23, pGL4.12-MT1E-1925/+43, pGL4.12-MT1G-636/+59, pGL4.12-MT1X-1879/+71, and pGL4.12-MT2A-1672/+55 were used as luciferase reporter vectors. \* $p < 0.05$  indicates significant difference from the untreated group.

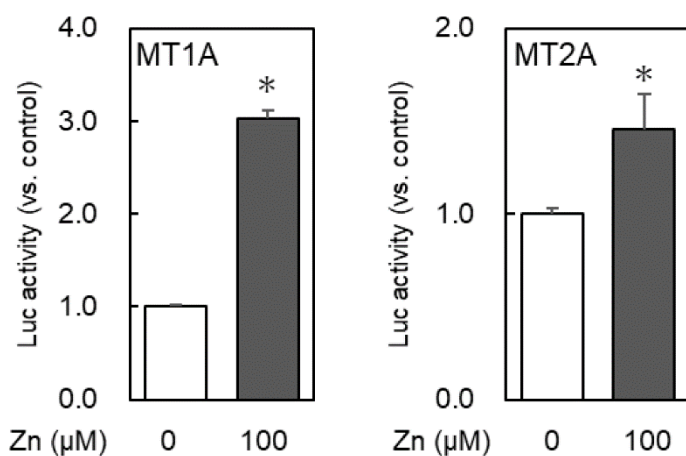


通常培地中には Zn が含まれており、未処理群の MT 発現もその影響を受けている可能性が考えられる。そこで、培地含有 Zn による影響を軽減するため、Zn 欠乏培地で 2 日間培養した細胞を用い、Zn 処理後の MT 発現量およびプロモーター活性を調べた。MT1E、MT1G、MT1X、MT2A では、100  $\mu$ M Zn 処理により、mRNA 量とプロモーター活性が通常培地を用いた場合よりも著しく上昇したが、MT1A では mRNA 発現量が上昇したもののその程度は低く、プロモーター活性には変化が見られなかった (Fig. 4)。これらの結果から、MT1A は他のアイソフォームと異なり、Zn による誘導が非常に乏しいことが示された。特にプロモーター活性については全く変化が見られなかったことから、MT1A は MTF1 による転写制御を受けないのではないかと予想した。



**Fig. 4. Each MT isoform expression after zinc treatment in 2-day zinc-deficient cultured cells.** (A) HeLa cells, which were precultured for 2 days with zinc-deficient medium, were treated with zinc at the indicated concentrations for 6 h, and the MTs mRNA expression was determined via real-time RT-PCR. (B) The promoter activity after 6 h of zinc treatment was measured. The same vectors used in Fig. 3 were used. \* $p < 0.05$  indicates significant difference from the untreated group.

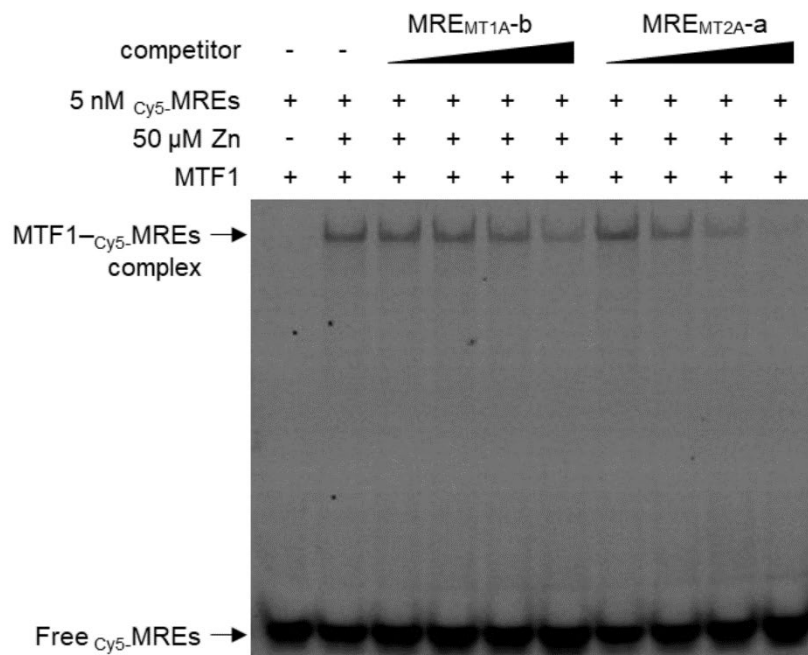
MTF1 が MT1A 転写制御に関与しているかどうかを確認するため、MTF1 発現ベクターを共導入して、Zn 処理後の MT1A プロモーター活性の変化を調べた。MTF1 発現ベクターを共導入した細胞では、非導入細胞と比較して MT1A プロモーター活性が上昇し、Zn 処理によってさらに上昇した (Fig. 5)。したがって、他のアイソフォームと同様に、MT1A も MTF1 による転写制御を受けていることが示された。



**Fig. 5. MTF1 co-expression effect on promoter MT1A and MT2A activity.** HeLa cells were co-transfected with luciferase reporter vector, pRL-SV40 vector for internal control, and MTF1 expression vector. At 24 h after transfection, the cells were treated with zinc at the indicated concentrations for 6 h, and luciferase activity was measured using the dual-luciferase assay system. \* $p < 0.05$  indicates significant difference from the untreated group.

MT1A は、他の MT アイソフォームと同様、MTF1 によって制御されているが、その程度は大きく異なる。本研究において調べたアイソフォームのうち、プロモーター活性上昇が最も大きいのは Fig. 2 において Relative score が高かった MT2A であることから、MT1A プロモーターの MRE 配列は MTF1 との親和性が低い可能性を考えた。そこで、EMSA を行い、MT2A および MT1 プロモーター領域の MRE 配列と MTF1 との結合親和性を比較した。Cy5-MREs と MTF1 の結合反応液に MT1A プロモーター領域の MRE 配列 ( $\text{MRE}_{\text{MT1A}}$ ) または MT2A

プロモーター領域の MRE 配列 ( $MRE_{MT2A}$ ) を加えて競合実験を行い、MT1A および MT2A プロモーター領域の MRE に対する MTF1 の結合親和性を比較した (Fig. 6)。MREs は、MTF1 と親和性の高い MRE 配列として 1985 年に Stuart 博士によって報告された配列である<sup>42</sup>。 $Cy5$ -MREs と MTF1 が結合すると、Free の  $Cy5$ -MREs による下部のバンドよりも上の位置にバンドが見られる。この結合反応液に  $MRE_{MT1A}$  もしくは  $MRE_{MT2A}$  を加えたとき、MTF1 がそれらと結合し、 $Cy5$ -MREs との結合が阻害されるとバンドが消失する。 $MRE_{MT2A}$  は  $MRE_{MT1A}$  よりも低濃度で MTF1- $Cy5$ -MRE 複合体形成を阻害した。ここでは  $MRE_{MT1A-b}$  と  $MRE_{MT2A-a}$  を比較したデータのみを示したが、 $MRE_{MT1A-a}$  および  $MRE_{MT2A-b}$  で比較した場合にも同様の結果となった。つまり、 $MRE_{MT1A}$  は  $MRE_{MT2A}$  よりも MTF1 に対して親和性が低いことが示された。



**Fig. 6. The MRE-MT1A and MRE-MT2A competitive effects on the binding reaction between MTF1 and MREs were examined via EMSA analysis.** MTF1 protein was synthesized in a coupled transcription/translation reaction and incubated in a buffer containing 50  $\mu$ M zinc. EMSA reactions were carried out containing competitive DNAs at 5, 100, 250, and 1000 nM. Binding of MTF1 to MREs was visualized by detecting Cy5-floorescence as low mobility MTF1- $Cy5$ -MREs complex band.

#### 第四節 小括

Cd による MT 発現誘導の主な経路として、遊離 Zn 濃度上昇を介した間接的な MTF1 活性化により、MTF1 が MT プロモーター領域の MRE へ結合して MT 発現を誘導することが知られている<sup>43</sup>。本章では、MT の発現制御機構について、アイソフォームごとに異なるプロモーター領域の配列がどのように影響しているのか、MRE 配列に着目して調べた。

Zn 処理による mRNA 発現量とプロモーター活性上昇の程度がアイソフォームごとに異なったことから、MTF1 による発現制御がアイソフォーム間で不均一であり、MT1A については特にその関与が乏しいことを明らかにした。特にプロモーター活性上昇の程度については、プロモーター領域の推定 MRE 配列と MRE コンセンサス配列との相同性を示した値である Relative score との関連性が見られた。それを手がかりに親和性を比較したところ、MT1A プロモーター領域の MRE 配列は、MTF1 との結合親和性が他のアイソフォームの MRE 配列と比べて低い可能性が示された。MT は金属以外にも、グルココルチコイド<sup>44,45</sup>、サイトカイン<sup>46,47</sup>、ビタミン<sup>48</sup>、発がん促進剤<sup>49</sup>、エンドトキシン<sup>50</sup>、アルキル化剤<sup>51</sup>、農薬<sup>52</sup>など様々な物質および拘束ストレス<sup>53</sup>や紫外線照射<sup>54</sup>によっても発現が誘導されることが知られており、MT プロモーターには MRE 以外にも、それら様々な因子に対する応答配列が含まれている<sup>55</sup>。MT1A においては、他のアイソフォームと比べて MTF1 による発現制御が乏しく、それら他の因子による発現への寄与が大きいことが予想される。つまり、MT1A は Cd による誘導の程度が低いアイソフォームであることが明らかとなった。一方で、Zn によるプロモーター活性上昇の程度が大きかった MT2A や、mRNA 発現が大きく増加した MT1G は Cd による影響が大きいことが懸念される。

## 第二章 カドミウムの白血病細胞に対する影響とメタロチオネイン発現変化

高濃度での曝露がほとんどなくなった現代においても、Cdが疾患の発症リスクなどに関連していることを示す疫学調査をもとにした報告は依然として存在する<sup>1,4,5,56-58</sup>。腎障害が見られない低濃度でのCd曝露の毒性については未解明であるが、発がん作用にはCdのエピ変異原性が関わっていることが報告されており<sup>13</sup>、その他の生体への影響についてもエピジェネティックな変化が関与している可能性は高い。また、Cdは生体防御に関わる重要なタンパク質であるMTの発現を大きく変化させるため、MT機能の攪乱による毒性も懸念される。そこで本章では、日常生活で起こり得るレベルのCdへの長期曝露が引き起こす悪影響について明らかにするため、低濃度Cdの毒性を評価し、エピゲノム変異やMT発現変化との関連性を調べた。Cdによる影響が予想される細胞として、疫学調査で血中Cd濃度上昇と疾患発症率増加の相関性が指摘されているものに着目した。

### 第一節 カドミウムの急性骨髄性白血病細胞 HL60 分化に対する影響

#### 第一項 緒言

Cdのエピ変異原性が毒性発現に関与していると仮定すると、ダイナミックなエピジェネティック変化が起こる生命現象が、特に標的となる可能性が考えられ、そのような生命現象として細胞分化が挙げられる。幹細胞が増殖し、異なる性質を持った多様な細胞へと分化する際に、エピジェネティックな変化によって遺伝子発現が制御されることは広く知られている。細胞の分化異常は、骨髄異形成症候群（MDS）<sup>59</sup>、自己免疫疾患<sup>60</sup>など様々な疾患に繋がる。分化に影響を与えるエピ変異原として、抗てんかん薬に用いられるバルプロ酸は、ヒストン脱アセチル化酵素の働きを阻害するが、妊婦が服用すると胎児の神経幹細胞分化を阻害し、大脳皮質の形成異常を引き起こす<sup>61</sup>。Cdについては、一

一般人の曝露濃度に比べると高濃度で検討された結果ではあるが、骨髄間葉系幹細胞の分化に影響を与えることで骨形成を阻害するとの報告がある<sup>62,63</sup>。

血球系細胞は、造血幹細胞が骨髄系幹細胞およびリンパ系幹細胞へと分化し、それぞれさらに赤血球、血小板、骨髄芽球、単球、リンパ球へと分化することでできていく。骨髄芽球はさらに顆粒球へと分化し、単球、リンパ球とともに白血球として機能する。このような造血系に異常が見られるのが MDS であるが、さらに進行すると急性骨髄性白血病 (AML) を発症する。AML は、がん化して分化能を失った骨髄芽球が、未分化のまま無制限に増殖を繰り返す病気であり、血球分化を促進する効果をもつ全トランス型レチノイン酸 (ATRA) が標準化学療法に用いられている<sup>64</sup>。疫学調査において、Cd が AML の発症リスク因子となること<sup>56,57</sup>、急性骨髄性白血病患者の予後不良に関連しているといった報告があり<sup>58</sup>、*in vivo* においても Cd がマウスの骨髄細胞数を増加させ、リンパ球数を減少させることが報告されている<sup>65</sup>。

ヒト白血病細胞由来の細胞株として、HL60、K562、NB4、THP-1、U937 など造血系譜のさまざまな段階で分化が停止した細胞が報告されており、それらは標的治療や薬剤研究に広く使用されている<sup>66</sup>。これらの中には、誘導剤で処理すると異なる造血系に分化する性質を持つものもある<sup>67,68</sup>。骨髄系細胞の分化において、転写因子 PU.1 が分化に必須な遺伝子の発現を上昇させるマスターレギュレーターとして働くことが、複数の細胞株によって明らかにされており、このとき MT1A および MT1G 発現は負に制御されていることが知られている<sup>69-71</sup>。また、NB4 細胞において、MT1G の過剰発現が ATRA による分化誘導を阻害することがわかっている<sup>69</sup>。そこで本研究では、Cd が MT 発現誘導を介して AML 発症および予後不良に関係している可能性を明らかにするため、ATRA 処理によって顆粒球へと分化することが知られているヒト急性骨髄性白血病細胞株 HL-60<sup>72</sup> において、MT 発現および細胞分化に及ぼす Cd の影響を検討した。

## 第二項 実験材料および実験方法

### 細胞培養

HL-60 細胞は理研バイオリソースセンター細胞バンクから購入し、10%FBS (Biowest)、抗生物質 (Antibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solution; Nacalai Tesque, Inc.) を含んだ RPMI1640 (Nacalai Tesque, Inc.) を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。細胞は 2、3 日ごとに継代し、継代時には  $1.68 \times 10^5$  cells/mL となるよう播種した。ATRA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) で処理する際には、細胞を  $8.4 \times 10^4$  cells/mL で播種した。生細胞数は、第一章に順じて計数した。

### ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 還元試験

HL60 細胞の顆粒球分化の指標として、NBT 還元活性を測定した<sup>73</sup>。細胞を回収し、 $2.0 \times 10^5$  cells/0.5 mL となるように RPMI1640 で再懸濁した。次に、0.2%NBT および 20%FBS を含む等量のリン酸緩衝液を細胞懸濁液と混合し、さらに終濃度 2  $\mu$ M となるように 12-*O*-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート (Tocris Bioscience, Bristol, UK) を添加して 37°C で 30 分間インキュベートした。その後、細胞内に沈着した青色ホルマザンをジメチルスルホキシド 500  $\mu$ L で溶解し、波長 550 nm の吸光度を測定した。

### MT 発現量の評価

Real time RT-PCR は第一章に準じて行った。測定に用いたプライマーの塩基配列は Table 1 に示した。Total RNA 中の各 cDNA のコピー数を算出するため、Qubit dsDNA high-sensitivity assay (Thermo Fisher Scientific, Inc.) で定量した cDNA クローンベクターを DNA 標準として用いた。検出下限は約 500 コピー/10 ng RNA であった。RT-qPCR の結果を既報の知見と比較するために、

HL-60 細胞の遺伝子発現データを Reference Expression Dataset (RefEx)から入手した<sup>73</sup>。

#### バイサルファイトシーケンス

ゲノム DNA は NucleoSpin® Tissue kit (TaKaRa Bio, Inc.) を用いて精製した。MethylEasy™ Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit (TaKaRa Bio, Inc.) を用いて 100~500 ng のゲノム DNA をバイサルファイト処理し、メチル化されていないシトシンをウラシルへと変換した。その後、TaKaRa EpiTaq™ HS (TaKaRa Bio, Inc.) を用い、次の PCR 条件で増幅した：98°C/30 秒、60°C/15 秒、72°C/1 分×35 サイクル。Methyl Primer Express Software v1.0 (Applied Biosystems) を用いてプライマーをデザインし、PCR 増幅に使用した。使用したプライマーの塩基配列は、Table 4 に示した。TA クローニングを行うため、増幅した DNA を pGEM-T Easy vector (Promega) にライゲーションし、コンピテントセル Competent Quick DH5α (TOYOBO Co., Ltd., Osaka, Japan) を形質転換した。TA クローニングした PCR 産物は Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.) および DNA analyzer (Applied Biosystems) を用いて解析し、塩基配列を決定した。CpG メチル化解析のための配列データの整列、可視化、定量化には QUMA (<http://quma.cdb.riken.jp/>) を用いた<sup>74</sup>。TA クローニング後のシーケンス解析は、ユーロフィンジェノミクス株式会社に委託した。



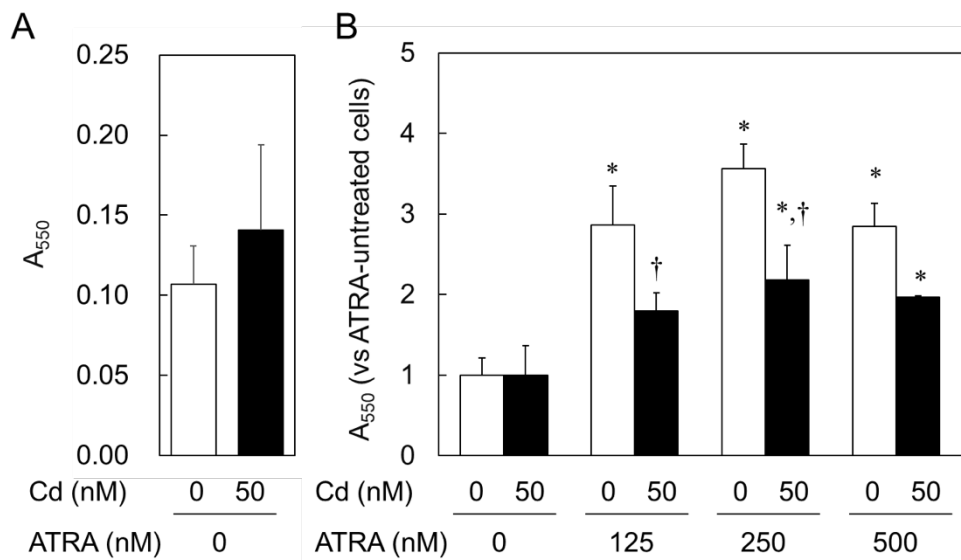
**Table 4. Primers used for bisulfite sequencing assay**

Gene	Sequence
MT1A	F 5'-GGATTAGGGTGGGAAGGTAATT-3'
	R 5'-ATCCCAAACAAAAAATTAACAAAC-3'
MT1G	F 5'-GGTAATTTTAGGGAAGTTGGG-3'
	R 5'-TTTAAACATCCCAAACACAAAA-3'
MT1X	F 5'-ATGTAAAGGAGGATTTGGGTAA-3'
	R 5'-CTTACCTACCCAATTTCCCTAA-3'
MT2A	F 5'-AGGGAGGGGAGTTGTGTATA-3'
	R 5'-ACTAAACATCCCAAACCTCTTA-3'

Underlining indicates T and A nucleotides that are C and G nucleotides, respectively, in the original genomic sequence.

### 第三項 結果および考察

ATRA による HL-60 分化誘導に対する Cd の影響を明らかにするため、無処理もしくは Cd 処理しながら 14 日間培養した細胞を、ATRA で 4 日間処理し、顆粒球分化の程度の指標として NBT 還元活性を測定した。ヒトの平均血中 Cd 濃度は約 20 nM であり、高い人でも 80 nM 程度であることが知られている<sup>75-78</sup> ため、本研究では HL-60 細胞を 50 nM の Cd で処理した。その結果、ATRA 未処理つまり未分化の HL-60 細胞においては、NBT 還元活性に対する Cd 処理の影響は見られなかった (Fig. 7A)。一方で、Cd 未処理細胞では ATRA 処理によって NBT 還元活性が約 3 倍に増加したのに対し、Cd 処理細胞では、ATRA 処理した際の NBT 還元活性の増加が有意に抑制された (Fig. 7B)。これらの結果は、低濃度の Cd を長期間曝露すると、HL-60 細胞の分化が阻害されることを示唆している。



**Fig. 7. Cadmium inhibits ATRA-induced NBT reduction activity in HL-60 cells.** (A) Cells were cultured for 18 days with or without 50 nM cadmium and then NBT reduction activity was measured as the change in absorbance at a wavelength of 550 nm. (B) Cells were cultured with or without 50 nM cadmium. On the 14th day, ATRA was treated at the indicated concentrations. Four-day after ATRA treatment, NBT reduction activity was measured. Data are presented as means  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p$  < 0.05, significantly different from the ATRA-untreated group; †  $p$  < 0.05, significantly different from the cadmium-untreated group.

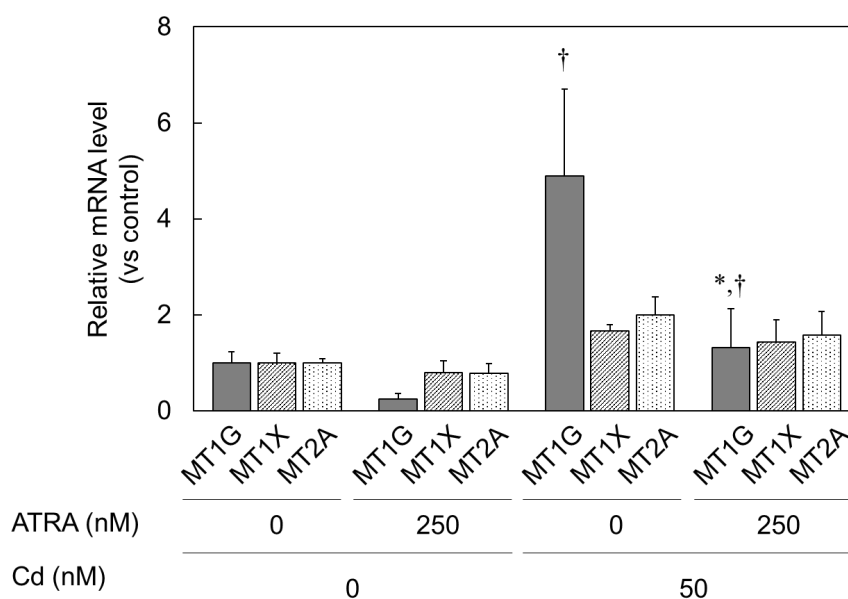
前述の通り、MT 発現は血球細胞分化に伴って抑制されることが報告されている。HL60 細胞分化においても同様の傾向が見られるかどうか確かめるため、まずは RT-qPCR によって各 MT アイソフォームの mRNA 発現量を測定し、RefEx における CAGE 値と比較した (Table 5)。その結果、CAGE と RT-qPCR で発現量が多少異なるものの、HL60 細胞では MT1G、MT1X、MT2A が恒常的に発現していることがわかった。MT1F については RefEx おける CAGE 値は 0.66 であったが、RT-qPCR では検出下限以下であった。その他アイソフォームは RefEx、RT-qPCR ともに未発現もしくは検出下限以下であった。

**Table 5. Metallothionein isoforms expressed in HL-60 cells**

Isoform	CAGE value (relative log expression)	RT-qPCR ( $\times 10^5$ copies/10 ng RNA)
MT1A	0	n.d.
MT1B	0	n.d.
MT1E	no data	n.d.
MT1F	0.66	n.d.
MT1G	2.82	9.8 $\pm$ 2.3
MT1H	0	n.d.
MT1M	0	n.d.
MT1X	4.76	78.5 $\pm$ 15.5
MT2A	0.15	69.9 $\pm$ 6.1
MT3	0	n.d.
MT4	0	n.d.

n.d.: not detected; CAGE values were obtained from the RefEx database.

HL60 細胞において恒常的に発現していた MT1G、MT1X、MT2A について、Cd や ATRA 処理による発現量の変化を調べた (Fig. 8)。MT1G は、Cd 処理によって 4.9 倍と顕著に発現量が増加し、ATRA 処理によって減少した。しかし、Cd 処理群では発現が上昇し、ATRA 処理しても ATRA 単独処理程には低下しなかった。一方、MT1X と MT2A の発現には、有意な変化が見られなかった。血球細胞分化に対する MT アイソフォームの阻害作用については、MT1G によるものが報告されている<sup>69</sup>。これらの結果は、Cd による HL60 分化阻害が、MT1G の発現誘導を介して起こっている可能性を示している。前述の通り、MT1 および MT2 のアミノ酸配列はアイソフォーム間で高度に保存されており、MT1G とその他アイソフォームでは、9 番目 (アラニン) と 11 番目 (バリン) と 13 番目 (セリン) のアミノ酸が異なるだけである (Fig. 1A)。つまり、MT1G のみが血球分化阻害作用を持つ可能性が示唆されるが、その阻害作用はこれらの数箇所のアミノ酸配列の違いに起因するものであるのかもしれない。

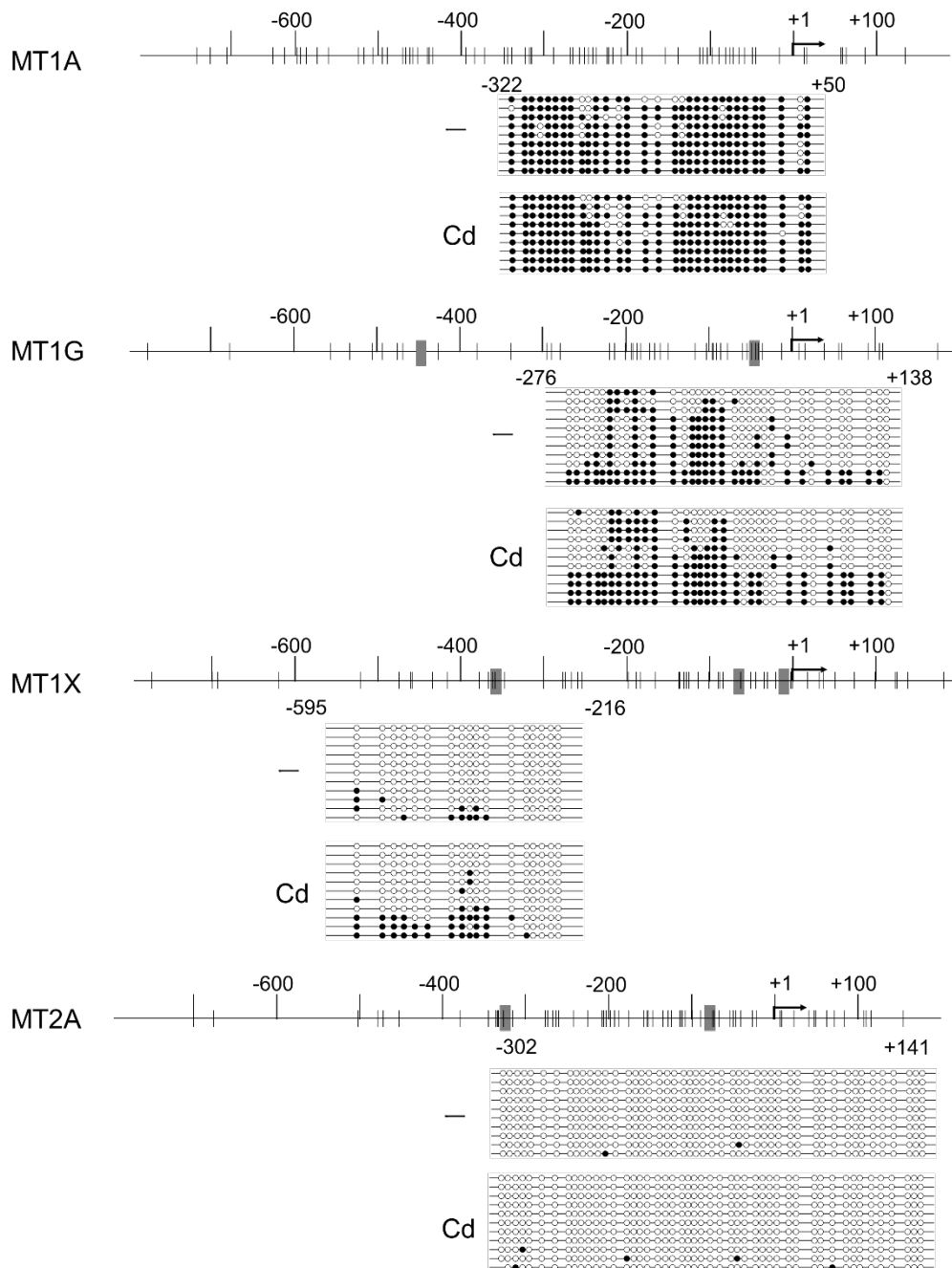


**Fig. 8. Effect of cadmium on metallothionein expression in ATRA-treated HL-60 cells.** HL-60 cells were treated as described in the caption to Fig. 7. MT1G, MT1X, and MT2A mRNA was measured 1 day after ATRA treatment by RT-qPCR with values normalized to total RNA content. Data are presented as means  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p < 0.05$ , significantly different from the ATRA-untreated group; † $p < 0.05$ , significantly different from the cadmium-untreated group.

第一章の通り、MT1GはCdによる発現誘導を受けやすいアイソフォームであると予想される。また、Cdにはエピ変異原性があり、MT発現低下とDNAメチル化レベルとの関連も報告されていることから、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構もMT発現が関与する可能性も考えられる<sup>79-83</sup>。

長期間の低濃度Cd曝露はP1798細胞におけるMT1プロモーターのCpG脱メチル化を引き起こすことが示されている<sup>84</sup>。そこで、このHL-60細胞におけるMT発現誘導についても、DNAメチル化状態の変化に由来するものであると予想し、14日間Cd処理を行ったHL-60を用いて、MT1A、1G、1X、2Aプロモーター領域のCpGメチル化状態の変化を解析した (Fig. 9)。RT-qPCRで検出下限以下であったMT1Aのプロモーター領域は、どのクローンも高度にメチル化されていた。発現量の低いMT1Gでも、メチル化の割合は高かつ

た。MT1Xでは、メチル化率の低いクローンが多く見られたが、クローンによる差異が大きかった。MT2Aでは、全てのクローンが脱メチル化状態であった。つまり、各アイソフォーム発現量とメチル化状態とに関連性が認められた。一方、すべてのアイソフォームにおいて、Cd処理によるメチル化状態の変化は認められなかった。今回検討を行ったいずれのMTアイソフォームのプロモーター領域においても、Cd処理によるCpGメチル化状態の著しい変化は観察されなかったことから、50 nMのCd曝露によるMT1G発現誘導は、CpG脱メチル化に依存しない経路で起こっていることが示唆された。CdはDNAメチル化状態を変化させる他、ヒストン脱メチラーゼ活性の阻害を介してヒストンのメチル化を誘導する<sup>85</sup>など、ヒストン修飾にも影響を与えることが報告されており、MT発現誘導にもヒストン修飾の関与が指摘されている<sup>82</sup>ことから、ヒストン修飾の変化がCdによるMT1G誘導に関わっている可能性が考えられる。



**Fig. 9. Effect of cadmium on CpG methylation status of MT1A, 1G, 1X, and 2A in HL-60 cells.** HL-60 cells were cultured for 14 days with or without 50 nM cadmium. After the culture, genomic DNA was extracted and bisulfite sequencing was performed. In the schematic, CpG dinucleotides are represented by | . Open circles represent unmethylated cytosine; closed circles represent methylated cytosine. Gray boxes represent putative MTF1-binding sites, as discovered via a search of the JASPAR database of transcription factor profiles<sup>22</sup>) (<http://jaspar.genereg.net>; matrix ID:MA0863.1; relative profile score threshold: 80%).

## 第二節 カドミウムのリンパ肉腫細胞 P1798 に対する影響

### 第一項 緒言

マウスリンパ肉腫細胞 P1798 は MT1 の発現が極めて低い細胞であり、高濃度の Cd に一時的に曝露 (10  $\mu$ M、3 時間) しても MT 発現が誘導されないが、長期間の低濃度 Cd 曝露 (0.1  $\mu$ M、7 日間) を行った後に高濃度の Cd に曝露した際には、MT 発現が誘導されることが先行研究においてわかっている<sup>84</sup>。また、このような現象が引き起こされる原因として、Cd が MT1 遺伝子プロモーター領域の CpG 部位の DNA メチル化を減少させ、それによって MT1 の発現誘導が促進されることが示唆された<sup>84</sup>。Cd の毒性は、急性毒性よりもイタイイタイ病に代表されるように慢性毒性が懸念されることから、この現象の詳細を明らかにすることは、低濃度 Cd 曝露の慢性毒性解明に繋がると予想される。一方、第二章 第一節ではヒト由来の血球系細胞である HL-60 細胞の MT 発現誘導について、DNA メチル化状態の変化は見られなかった。そこで、ヒトとマウス、もしくはアイソフォーム間の違いを理解するため、P1798 細胞において Cd による DNA メチル化頻度の低下が、MT 発現を誘導する機構の詳細について解析した。

第一章において金属による MT 発現誘導のアイソフォーム間の差異が、MRE 配列の違いに起因するものであると結論づけられたことから、ここでも MRE 配列に着目した。マウス MT1 遺伝子のプロモーター領域には、多数の CpG 部位と 5 つの MRE 配列 (MREa, b, c, d, e) が存在する (Fig. 10)。この 5 つの MRE 配列の中で、Zn による転写活性化率が高いのは MREd であることが知られていることから<sup>39,86,87</sup>、メチル化による制御においても MT1 プロモーター中の特定の CpG 部位が MT1 遺伝子の発現に重要であるという仮説を立て、MT 発現制御に関わる CpG 領域の特定を目指した。

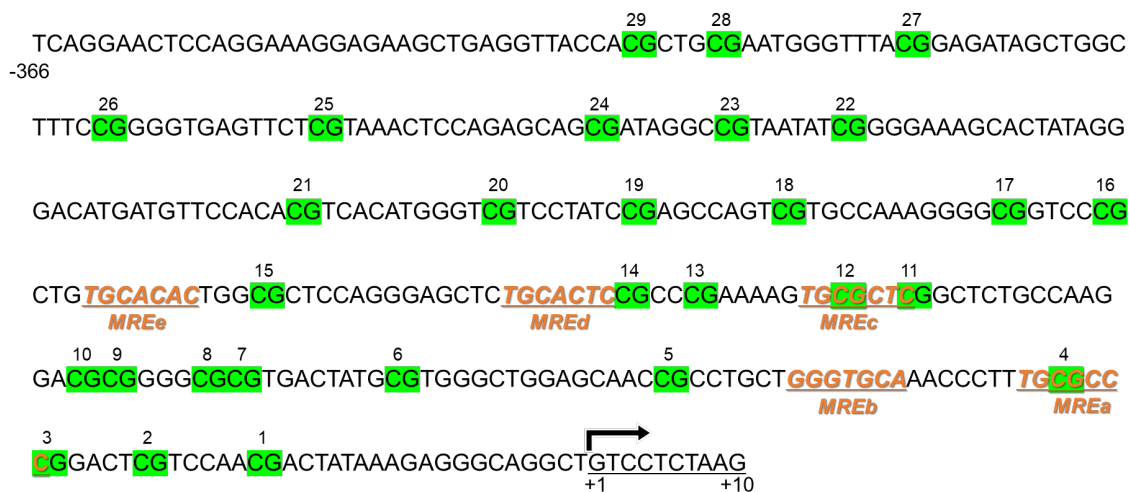


Fig. 10. Nucleotide sequence upstream of mouse MT1 gene and location of CpG sites and MRE sequences. The 29 CpG sites in -366~+10 were designated CpG1-29 in order from the transcription start point upstream.

## 第二項 実験材料および実験方法

### 細胞培養

P1798 マウスリンパ肉腫細胞は、University of Texas (Galveston, TX, USA) の A.E. Thompson より供与していただいた<sup>88</sup>。P1798 は、25mM HEPES (pH7.2)、0.2 μM β-メルカプトエタノール、5%FBS (Biowest) を含む RPMI1640 培地 (Nacalai Tesque, Inc.) を用いて、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養し、2.5×10<sup>5</sup> cells/mL の密度で 2 日ごとに継代した。マウス線維芽細胞株 (MEF) および MTF1 欠損細胞 (MTF-KO) は、University of Kansas Medical Center の Glen K. Andrews より供与していただいた<sup>40</sup>。MEF および MTF-KO は、10%FBS、抗生物質 (Antibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solution; Nacalai Tesque, Inc.) を含んだダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM, 4.5 g/l glucose, Nacalai Tesque, Inc.) を用いて 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養し、2~3 日ごとに継代を行った。生細胞数は、第一章に順じて計数した。



## Real time RT-PCR

第一章に準じて行った。MT1 cDNA の測定には、TaqMan プローブ (MT1 用 : Mm00496660\_g1; 18S rRNA 用 : 4319413E; Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) を用いた。β-actin の測定に用いたプライマーの配列は、次の通りである。

F primer : 5'-GAAATCGTGCGTGACATCAAAG-3'、R primer : 5'-TGTAGTTTTCATGGATGCCACAG-3'

## PrimeFlow RNA Assay

PrimeFlow RNA Assay Kit (eBioscience, San Diego, CA, USA)<sup>74</sup> を使用した。RNase Inhibitors を含む Permeabilization Buffer を P1798 細胞 ( $5.0 \times 10^6$  cells) に加えてインキュベートし、固定した後、標的遺伝子特異的プローブでハイブリダイズした。その後、PreAmp Mix、Amp Mix、MT1 については Alexa Fluor 647 (Type 1)、β-actin については Alexa Fluor 488 (Type 4) で標識したプローブを用い、メーカーのプロトコールに従って細胞を染色した。フローサイトメトリー解析は、BD FACS Aria Fusion cell sorter (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を用いて行った。MT1 発現レベルに応じて、 $3 \times 10^2$  以下 (arbitrary unit) を低発現細胞、それ以上を高発現細胞として細胞を選別し、回収した。

## バイサルファイトシーケンス

第二章 第一節に準じて行った。PCR 増幅に使用したプライマーの配列は、Table 6 に示した。

**Table 6. Primers used for bisulfite sequencing assays.**

Gene	Sequence
MT1	F 5'- <u>TTAGGAATTTTAGGAAAGGAGA</u> -3'
	R 5'- <u>TAAAAACAACCTACCCTCTTT</u> -3'

Underlining indicates T and A nucleotides that are substituted for C and G nucleotides, respectively, in the original genomic sequence.

### GT115 コンピテントセルの作成

*E. coli* GT115 株は、変異型の *pir* 遺伝子を発現し、Dcm メチラーゼが欠損した大腸菌株であり、通常とは異なる複製起点である R6K $\gamma$  をもつプラスミドの増幅に使用することができる。LB 培地 5 ml において 37°C で一晩振盪培養した GT115 培養液を、LB 培地 50 ml 中に 500  $\mu$ l 加え、OD600 を測定しながらさらに振盪培養した。OD600 が 0.5 になる直前で培養を止め、氷中で 30 分間静置後、遠心分離して上清を除去し、50 mM CaCl<sub>2</sub> を 12.5 ml 加えて氷中で懸濁した。遠心分離して上清を除去し、50 mM CaCl<sub>2</sub>/20%グリセロールを 2.5 ml 加えて氷中で懸濁した後、100  $\mu$ l ずつ分注して液体窒素中で急速凍結し、-80°C に保存した。

### ベクターの構築

CpG 部位を含まないレポーターベクター pCpG-basic-Lucia を InvivoGen (San Diego, CA, USA) から購入した。pCpGfree-bacic-Lucia はすべての CpG を除去するために、複製起点として R6K $\gamma$  を含んでいる。これに Fig. 11 の通りに pGL4.12-MT-264/+42<sup>89</sup> から得た、マウス MT1 プロモーター領域 -264/+10 (転写開始点からの距離) を連結し、pCpGf-WT を構築した。その手順は次の通りである。まず、pCpG-basic-Lucia と pGL4.12-MT-264/+42 を HindIII/NcoI で切断した。必要な断片は、アガロースゲル電気泳動とゲル抽出

キット Nucleo Spin Gel and PCR Clean up (Takara Bio, Inc.) による抽出によって得た。その後、Ligation high Ver.2 (TOYOBO Co., Ltd.) を用いて連結し、GT115 コンピテントセルに導入することで pCpGf-MT-264/+42 を構築した。次に PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (Takara Bio, Inc.) および MT+11/+42 欠失プライマー (Table 7) によるインバース PCR と GT115 コンピテントセルへの導入によって pCpGf-WT を構築した。

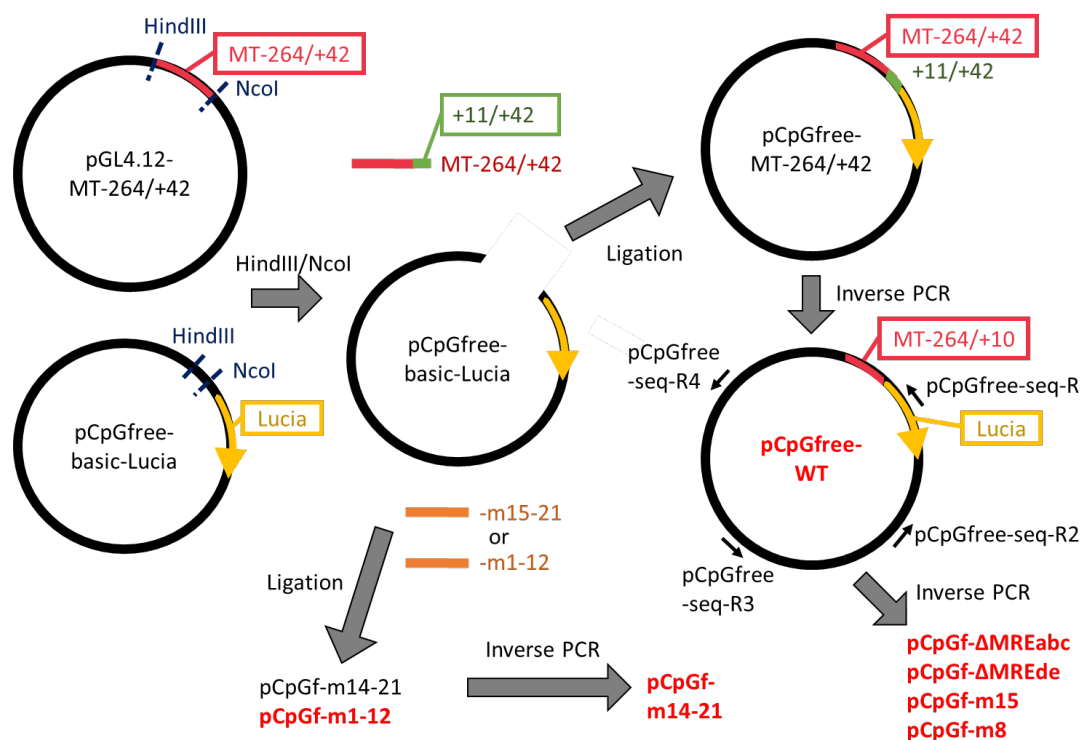


Fig. 11. Flow of pCpGf-WT and other vector construction.

→ : Indicates the sequence primer binding position and its orientation.

pCpGf-WT をもとに Table 7 のプライマーを用いたインバース PCR によって特定の部分に欠失もしくは変異を導入し、pCpGf-ΔMREabc (-124/-22 欠失)、pCpGf-ΔMREde (-264/-123 欠失)、pCpGf-m15 (15 番目の CG を CC に置換)、pCpGf-m8 (8 番目の CG を CC に置換) を構築した。また、HindIII/NcoI で切断した pCpG-basic-Lucia に Integrated DNA Technologies, Inc. に合成依頼

して得た合成二本鎖 DNA (Table 7) の HindIII/NcoI 切断断片を連結し、pCpGf-m15-21 (15~21 番目の CG を CC あるいは GG に置換)、pCpGf-m1-12 (1~12 番目の CG を CC あるいは GG あるいは CA に置換) を構築した。pCpGf-m15-21 の 14 番目の CG にインバース PCR によってさらに変異導入し、pCpGf-m14-21 を構築した。置換の際、MRE 配列と重複している CpG 部位については、MTF1 のコンセンサス配列に近い配列となるように設計した。

内部標準として、ホタルルシフェラーゼ発現ベクターである pGL4.12-SV40 を構築した。ウミシイタケルシフェラーゼ発現コントロールベクター pRL-SV40 (Promega) から PCR によって SV40 プロモーター配列を増幅し、HindIII/SacI で切断した pGL4.12[luc2CP] (Promega) に、In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech Laboratories, Inc.) を用いた In-Fusion 反応で連結した。その後、コンピテントセル Competent Quick DH5 $\alpha$  (TOYOBO Co., Ltd.) に導入してクローニングした。各レポーターベクターは、NucleoSpin Plasmid (Takara Bio, Inc.) を用いて GT115 や DH5 $\alpha$  から精製し、シーケンス解析によって配列が正しいことを確認した。哺乳細胞へ遺伝子導入するためのベクターは QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) によって精製し、NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて濃度を測定した。ベクター構築に用いたプライマー、合成二本鎖 DNA の配列は Table 7 に示した。

**Table 7. Primer and synthetic DNA sequences for construction of reporter vectors.**

	Target	Template	Sequence
PCR	SV40	pRL-SV40	F 5' -ACTGGCCGGTACCTGAGATCTGCGCAGCACCAT-3' R 5' -CCGGATTGCCAAGCTCAAGCTTTTTGCAAAAAGCCT-3'
	$\Delta +11/+42$	pCpGf-MT-264/+42	F 5' -CCTCTAAGCCATGGAAATCAAGGTGC-3' R 5' -TCCATGGCTTAGAGGACAGCCTGCC-3'
	$\Delta$ MREabc	pCpGf-WT	F 5' -CCGCCCGAGACTATAAAGAGGGCAGG-3' R 5' -TATAGTCTCGGGCGGAGTGCAGAGC-3'
Inverse PCR	$\Delta$ MREde	pCpGf-WT	F 5' -AAGCTTGAAAAGTGCCTCGGCTCTG-3' R 5' -GCACTTTTCAAGCTTTCATGCTAC-3'
	m14 CG→CC	pCpGf-m15-21	F 5' -GCACTCAGCCCGAAAAGTGCCTCGG-3' R 5' -TTTCGGGCTGAGTGCAGAGCTCCCTG-3'
	m15 CG→CC	pCpGf-WT	F 5' -CACTGGCCCTCCAGGGAGCTCTGCAC-3' R 5' -CCTGGAGGGCCAGTGTGCACAGCGGG-3'
	m8 CG→CC	pCpGf-WT	F 5' -GCGGGGCCCGTACTATGCGTGGGCT-3' R 5' -GTCACGGGCCCCGCTCCTTGGCAG-3'
	m 15-21		5' -TGGCCTCGGCGCCAAGCTTGATAGGCCGTAATATCGGGGAAAGCACTAT AGGGACATGATGTTCCACACCTCACATGGGTCCCTATCCCAGCCAGTC CTGCCAAAGGGGGGTCCCCCTGTGCACACTGGCCCTCCAGGGAGCTCTG CACTCCGCCCCGAAAAGTGCCTCGGCTCTGCCAAGGACGCGGGGCGGTG ACTATGCGTGGGCTGGAGCAACCCCTGCTGGGTGCAAACCCTTTGCGCC CGGACTCGTCCAACGACTATAAAGAGGGCAGGCTGTCTCTAAGCGTCAC CAGACTTCAACGTCTGAGTACCTTCCCATGGAAGATGCCAAAAACATT -3
m 1-12		5' -TGGCCTCGGCGCCAAGCTTGATAGGCCGTAATATCGGGGAAAGCACTAT AGGGACATGATGTTCCACACGTCACATGGGTGCTCCTATCCCAGCCAGTC GTGCCAAAGGGGCGGTCCCCCTGTGCACACTGGCGCTCCAGGGAGCTCTG CACTCCGCCCCGAAAAGTGCCTCAGCTCTGCCAAGGAGGGGGGGCCCCCTG ACTATGCCTGGGCTGGAGCAACCCCTGCTGGGTGCAAACCCTTTGCACC CAGACTCCTCCAACCACTATAAAGAGGGCAGGCTGTCTCTAAGCCATGG AAGATGCCAAAAACATT-3	

## シーケンス解析

サンガー法に基づくシーケンス解析を、Eurofins Genomics K.K. (Tokyo, Japan) に委託した。シーケンスサンプルは、プラスミド DNA 量 450~900 ng、プライマー 9.6 pmol をミリ Q 水と混合し、液量が 21  $\mu$ l となるように調製した。プラスミド DNA 濃度の測定には、Qubit<sup>®</sup> dsDNA HS Assay Kit と Qubit<sup>®</sup> 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いた。シーケンス解析に使用したプライマーは、Table 8 に示した。

**Table 8. Primers for reporter vector sequencing.**

Name	Target vector	Direction	Sequence
RVprimer3	pGL4.12	Forward	5'-CTAGCAAAATAGGCTGTCCC-3'
pCpGfree-seq-R	pCpGfree-Lucia	Reverse	5'-TCAGTGGGTTTTGCCTCAGC-3'
pCpGfree-seq-R2	pCpGfree-Lucia	Reverse	5'-TGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGT-3'
pCpGfree-seq-R3	pCpGfree-Lucia	Reverse	5'-AGAGTTTCTCTTTCATCTGTTCAAAT-3'
pCpGfree-seq-R4	pCpGfree-Lucia	Reverse	5'-ACAGCCAGTTCACATGCCTT-3'

## ベクターのメチル化

各レポーターベクターのメチル化には、CpG methyltransferase (M.SssI; New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) もしくは HhaI methyltransferase (New England Biolabs Inc.) を用いた。M.SssI の認識配列は CG、HhaI methyltransferase は GCGC であり、認識配列中に含まれる CpG 部位の C をメチル化する。プラスミド DNA 1  $\mu$ g に対して M.SssI もしくは HhaI methyltransferase を 1  $\mu$ l (25 U/ $\mu$ l) 加え、37°C で 1 時間以上インキュベートした後、65°C で 20 分間インキュベートし酵素を失活させた。メチル化ベクターは、Nucleo Spin Gel and PCR Clean up (Takara Bio, Inc.) を用いて精製した。

### ルシフェラーゼレポーターアッセイ

細胞への遺伝子導入および回収は、第一章 第一節に準じて行った。DNA は、各 pCpGfree ベクター、pEGFP、pGL4.12-SV40 を 1:1:0.005 の割合で混合した。ルシフェラーゼレポーターベクター導入から 30 時間後に細胞を回収した。Lucia 活性は、pGL4.12-SV40 から SV40 プロモーター依存的に発現するホタルルシフェラーゼの活性に対する相対量として算出した。

### 第三項 実験結果および考察

先行研究では、長期的に低濃度 Cd 処理した P1798 細胞において、高濃度 Cd 処理時の MT1 発現上昇が見られ、そのような細胞群では MT1 プロモーター領域のメチル化が低下していた<sup>84</sup>ことから、脱メチル化とその状態での Cd 処理が MT 発現を誘導すると考えられる。実際に、P1798 を脱メチル化剤 5-azacytidine (AzaC) 処理後に高濃度 Zn や Cd で処理すると、MT1 発現上昇が起こることが知られている<sup>83</sup>。そこで、メチル化による MT 発現制御について詳細を明らかにするため、まずは脱メチル化と Cd 処理による発現上昇が再現できるか確かめた。その結果、MT1 mRNA の発現は、Cd 処理のみでは変化せず、5-AzaC 処理後に Cd 処理した群のみで顕著に上昇した (Table 9)。

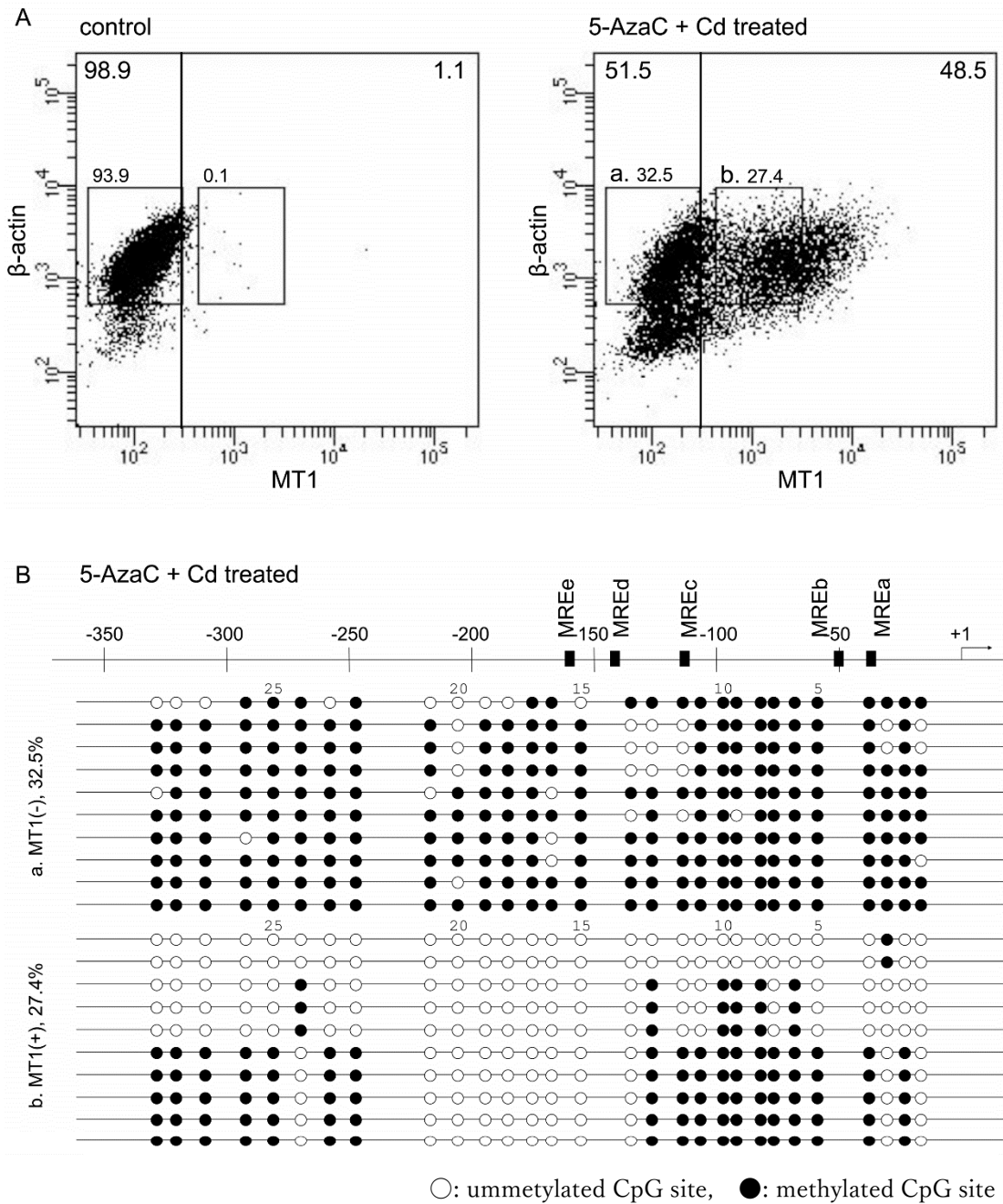
**Table 9. Relative metallothionein-1 (MT1) and  $\beta$ -actin mRNA levels after 5-AzaC and Cd treatment.**

Gene	Control	Cd	5-AzaC/Cd
MT1	1.0 $\pm$ 1.9	0.9 $\pm$ 0.7	31,214.4 $\pm$ 16,310.7 *
$\beta$ -actin	1.0 $\pm$ 0.6	0.9 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.5

Expression levels were normalized using 18S rRNA. Values are expressed as the means  $\pm$  SD from 3–4 independent experiments. \*  $p < 0.01$  versus the control group.

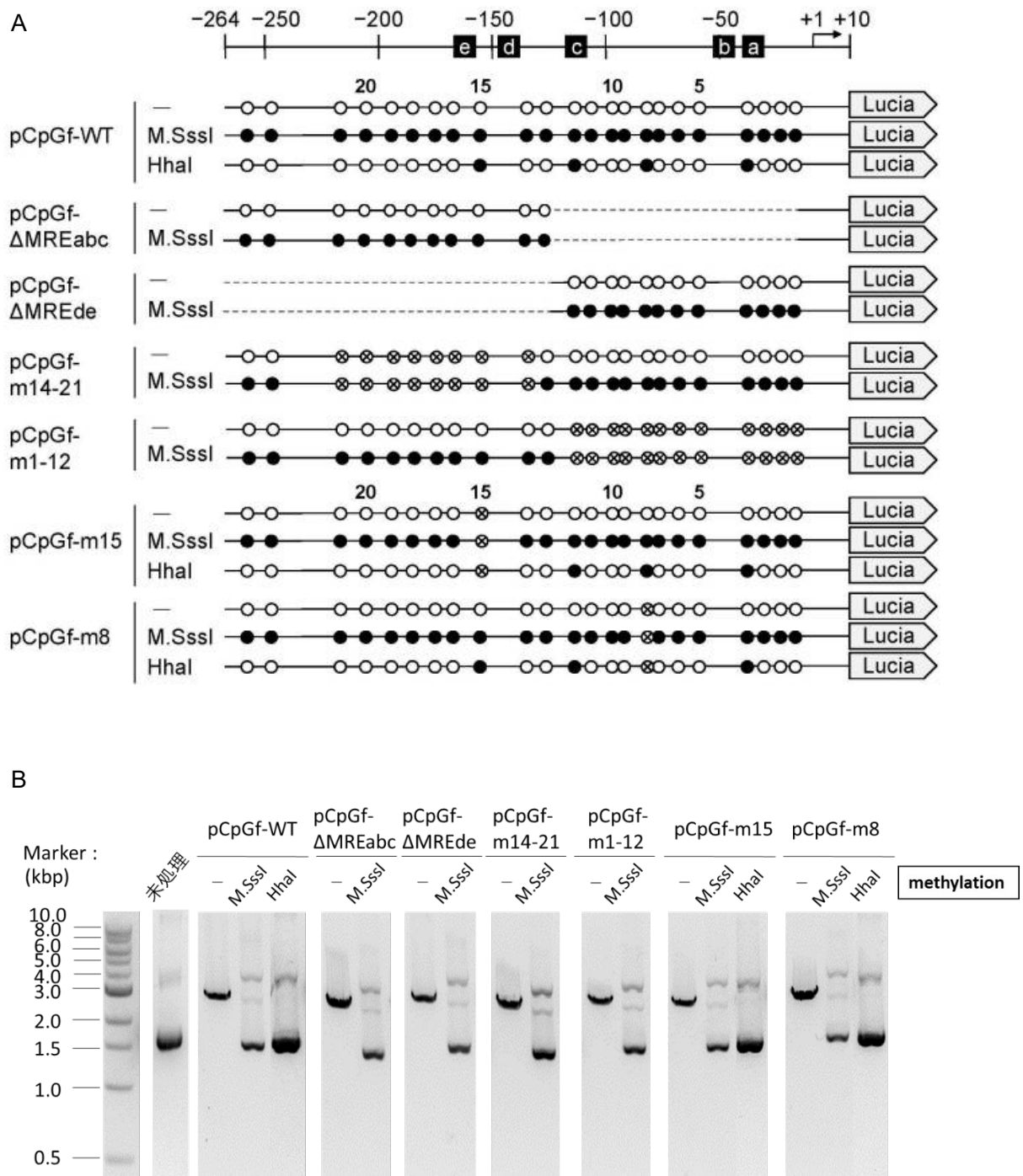
5-AzaC/Cd 処理による MT1 発現上昇が全ての細胞で起こっているのか、もしくは一部の細胞のみで起こっているのかを明らかにするため、PrimeFlow RNA Assay によって 1 細胞ごとの MT 発現量解析を行った。その結果、MT1 低発現細胞 ( $3 \times 10^2$  以下) が、未処理群では 98.9%であった (Fig. 12A, 左パネル) のに対し、5-AzaC/Cd 処理では MT1 発現が低い 51.5%の細胞と、高い 48.5%の細胞に分かれた (Fig. 12A, 右パネル)。また、 $\beta$ -actin が一定以上発現していた ( $5 \times 10^2$  以上であった) MT1 低発現細胞 32.5%および MT1 高発現細胞 27.4% について、バイサルファイトシーケンスを行い、MT1 プロモーター領域のメチル化状態を調べた。その結果、一部の領域にある CpG 部位のシトシンにおいて、MT1 低発現細胞ではメチル化されているが、高発現細胞ではメチル化されていない傾向があることが示された (Fig. 12B)。転写開始点から 1 番目の CpG 部位 (CpG1) に加え、CpG14~21 (-215bp~-127bp) は、MT1 発現量の多いすべての細胞で脱メチル化状態であった (Fig. 12B)。CpG14~21 は MREd と MREe の近傍であり、前述の通り MREd は Zn に対する応答において最も活性の高い MRE 配列であることから、これらの CpG 部位の脱メチル化が MT1 の発現制御に関与している可能性が考えられる。





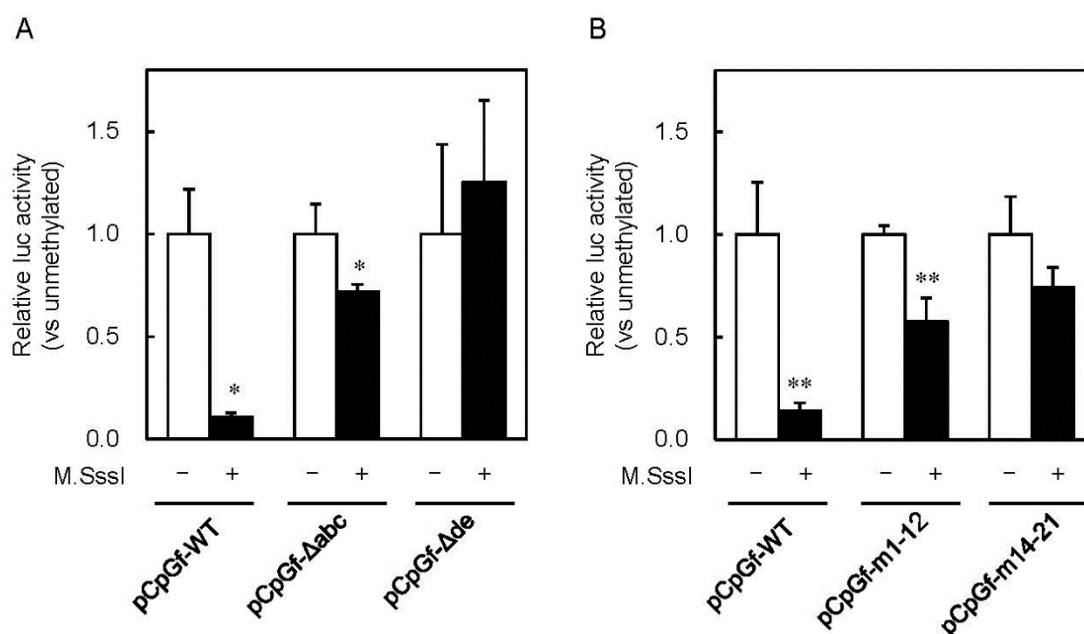
**Fig. 12. PrimeFlow RNA assay of 5-AzaC and Cd-treated P1798 cells and bisulfite sequencing.** (A) P1798 cells were treated with vehicle (control) or 5-AzaC (2.5  $\mu$ M, 2 days) and Cd (10  $\mu$ M, 3 h). Experiments were reproduced three times with similar results. Results from a representative experiment are shown. (B) Results of bisulfite sequencing of (a) and (b) cell fractions. Designations of CpG dinucleotides are represented by circles: closed—methylated; open—unmethylated. Each row represents data from a single cell.

そこで、MT 発現制御に関わる CpG 領域の特定を目指し、第一項の通り各種レポーターベクターを構築し、pCpGf-WT、pCpGf-m15、pCpGf-m8 を M.SssI もしくは HhaI methyltransferase で、pCpGf- $\Delta$ MREabc、pCpGf- $\Delta$ MREde、pCpGf-m14-21、pCpGf-m1-12 を、M.SssI で処理し、メチル化ベクターを作成した (Fig. 13A)。認識配列がメチル化されていると切断できない制限酵素 HhaI (認識配列: GCGC) によって消化することで、メチル化部位がメチル化されていることを確認した (Fig. 13B)。メチル化されていない場合には、HhaI によって切断され、ベクターサイズから 3000 bp 程度のバンドが観察される。どのベクターにも制限酵素 HhaI 処理によって切断されたと思われるバンドがわずかに見られるが、全体の 1 割にも満たない量であると考えられるため、これらをメチル化ベクターとして使用した。



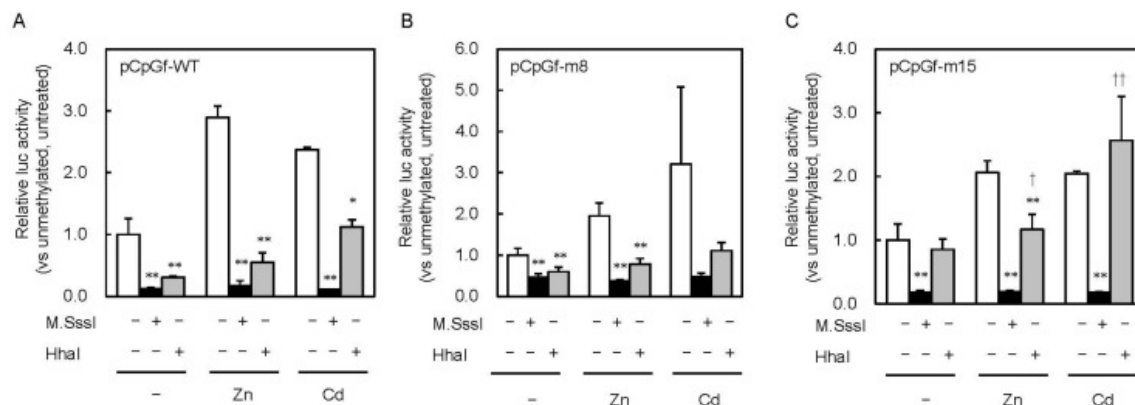
**Fig. 13. Confirmation of methylation sites and methylation reaction ratio for each reporter vector.** (A) Schematic of each vector methylated with M.SssI or HhaI methyltransferase. ○ : unmethylated CpG site, ● : methylated CpG site, ⊗ : mutated CpG site, ■ : MRE. (B) Methylation reaction ratio by restriction enzyme HhaI digestion. Electrophoresis results after each vector digestion.

細胞に Fig. 13A に示したベクターを導入し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。P1798 細胞は遺伝子導入が難しく、レポーターアッセイには向かないため、ここからは導入が容易な MEF 細胞を用いた。その結果、pCpGf- $\Delta$ MREabc では M.SssI メチル化による活性低下が見られたのに対し、pCpGf- $\Delta$ MREde では認められなかった (Fig. 14A)。また、pCpGf-m14-21 と pCpGf-m1-12 で M.SssI メチル化による活性低下が認められ、その程度は pCpGf-m14-21の方が大きかった (Fig. 14B)。これらの結果は、MREd,e 付近におけるメチル化の有無がプロモーター活性に大きな影響を与えることを示している。



**Fig. 14. Effect of CpG methylation in MT1 promoter on Lucia luciferase activity.** Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were transfected with unmethylated or M.SssI-methylated Lucia reporter vectors carrying (A) deletions or (B) point mutations. Luciferase reporter vector (pGL4.12-SV40) was co-transfected for normalization of transfection efficiency. Reporter gene expression was measured using the Dual-Luciferase Reporter Assay System, and Lucia (luc) activity was normalized to firefly luciferase activity. Values are expressed as the means  $\pm$  SD from three independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  versus the unmethylated vector group.

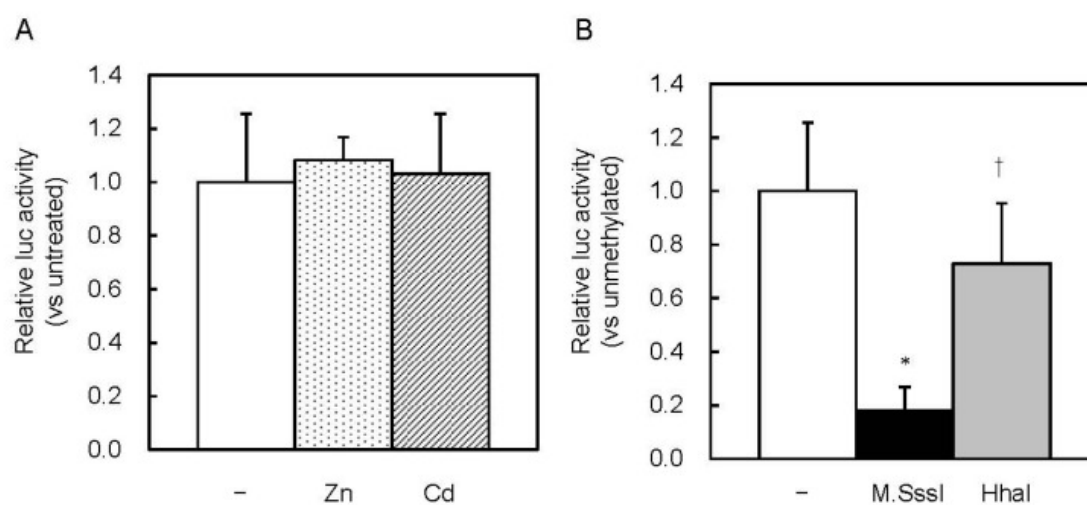
メチル化による活性低下において、より深く関与している CpG 部位をさらに特定するため、MREd と e の間に位置する CpG15 にのみ変異導入したベクター (pCpGf-m15) および、MRE と離れたところに位置する CpG8 にのみ変異導入したベクター (pCpGf-m8) を用いてルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。その結果、pCpGf-WT で認められていた HhaI メチル化処理による活性低下が、pCpGf-m8 では同様に認められたにも関わらず、pCpGf-m15 ではメチル化による活性低下が消失した (Fig. 15)。これは Fig. 14 の結果とも一致しており、MREd,e 付近におけるメチル化がプロモーター活性に特に影響を与えると考えられる。



**Fig. 15. Effect of partial CpG methylation in the MT1 promoter on Zn- and Cd-induced Lucia luciferase activity.** MEFs were transfected with unmethylated or M.SssI- or HhaI methyltransferase-methylated Lucia reporter vectors carrying wild-type (A), point mutations of CpG8 (B) and CpG15 (C). Reporter gene expression was measured 6 h after Zn or Cd addition. Values are expressed as the means  $\pm$  SD from three independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  versus the unmethylated group. †  $p < 0.05$ , ††  $p < 0.01$  versus the M.SssI-methylated group.

DNA メチル化によるプロモーター活性の低下は、メチル化が MTF1 の結合を阻害することで引き起こされるのではないかと考え、MTF-KO 細胞でメチル化の影響を調べた。MTF-KO 細胞では MT 発現が低く、Zn や Cd で処理しても発現が上昇しないことが報告されている<sup>90</sup>が、この結果を反映して MT1 プ

ロモーター活性もメチル化されていないにも関わらず、Zn および Cd 処理による上昇は見られなかった (Fig. 16A)。一方で、HhaI による部分的なメチル化はプロモーター活性を低下させなかったが、M.SssI による完全なメチル化では、予想に反して顕著なレポーター活性の低下が見られた (Fig. 16B)。完全に CpG がメチル化されると、MTF1 以外の転写因子の結合を阻害するか、もしくはクロマチン構造を変化させる可能性が考えられる。



**Fig. 16. Effect of CpG methylation on MT1 promoter activity in MTF1 KO cells.**

(A) Cells were transfected with unmethylated Lucia reporter vectors. Reporter gene expression was measured 6 h after Zn or Cd addition. Values for neither treatment group were significantly different from the untreated group. (B) MTF1-KO cells were transfected with unmethylated or M.SssI- or HhaI methyltransferase-methylated Lucia reporter vectors. Values are expressed as the means  $\pm$  SD from three independent experiments. \* $p < 0.01$  versus the unmethylated group. † $p < 0.01$  versus the M.SssI-methylated group.

### 第三節 小括

本章では、まず第一節において、Cd が MT1G の発現上昇を介して、白血病細胞の分化を阻害することを見出した。低濃度 Cd による分化阻害のメカニズムには、エピジェネティックな変化が関わっていると予想したが、この MT1G 発現誘導はメチル化頻度の低下によるものではないことが示された。細胞は、DNA 合成の準備期間である G1 期、DNA 複製が行われる S 期、DNA 合成から有糸分裂が起こるまでの間である G2 期、細胞が分裂する M 期という過程を経て増殖し、分化する前には細胞増殖が停止して G1 期のような状態（G0 期）にとどまり、次の分裂期に入らないことが一般的に知られている。NB4 細胞において、MT1G の過剰発現が ATRA による分化誘導を阻害する際には S 期の細胞が増加することが報告されており<sup>91</sup>、Cd 曝露による MT1G 発現上昇が、細胞周期を増殖期へと移行させることで、血球系細胞分化を阻害している可能性が考えられる。

一方で、Cd は様々な遺伝子の DNA メチル化頻度を変化させ、低下する遺伝子と上昇する遺伝子の両方が知られており、マウス MT1 についてはプロモーター領域のメチル化頻度が Cd によって低下することで、MT 発現が上昇することが報告されている<sup>84</sup>。第二節では、特定の領域の CpG メチル化が、MT1 プロモーター活性に特に影響を与えることを見いだした。MT1 および MT2 は多くの組織で発現しており、プロモーターのメチル化状態も低いことが知られている。そのようなプロモーターにおいて、特定部位のメチル化がプロモーター活性を変化させるということは、エピ変異原等の環境要因で生じた僅かなメチル化の変化が、MT 発現の低下につながり得る可能性を示している。

第一節における MT 誘導はメチル化低下によるものではないと結論づけたが、ヒト MT についても、がん細胞においていくつかのアイソフォームが MT プロモーター領域のメチル化状態と発現量に関連性があるという報告<sup>92-94</sup>があり、

マウスとヒトで制御機構が異なるとは考え難い。血球細胞である THP-1 が単球に分化する際には、PU.1 と MeCP2 が MT1A プロモーター領域に結合し、メチル化を増加させることも報告されている<sup>70</sup>。一方で、がん特異的なメチル化増加が見られるアイソフォームとそうでないものがあるといった報告があり<sup>95</sup>、アイソフォームや細胞腫ごとにメチル化による発現制御の程度が異なっている可能性が考えられる。



### 第三章 カドミウムの胎盤細胞に対する影響とメタロチオネイン発現変化

#### 第一節 緒言

生活レベルの Cd が生体に影響を与える可能性を示した報告として、Cd が子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）において、日本人妊婦の血中 Cd 濃度と早期早産に関連性が見出された<sup>4</sup>。早期早産の原因の一つとして知られている妊娠高血圧症候群（HDP）<sup>96</sup>とヒト胎盤 Cd 濃度に関連性があることや<sup>97,98</sup>、動物実験レベルにおいて Cd が HDP を引き起こすことが報告されている<sup>99,100</sup>ことから、Cd による HDP 発症が早期早産につながっている可能性が考えられる。

胎盤は母体から胎児へと酸素や栄養を受け渡す役割を持ち、妊娠を維持する上で非常に重要な臓器である<sup>101</sup>。妊娠初期に細胞性栄養膜細胞（CT）が増殖して絨毛外性栄養膜細胞（EVT）および合胞体性栄養膜細胞（ST）へと分化し<sup>102</sup>、胎児母体間の血管が構築されることで胎盤が形成される（Fig. 17）が、この過程に異常が起これば、HDP 発症につながることは知られている<sup>102</sup>。また、CT の分化過程において、DNA メチル化パターンの変化などエピジェネティックな修飾のダイナミックに変化が正常な分化に必須であることが明らかになっている<sup>103</sup>。この変化がエピ変異原など環境要因によって攪乱されると、胎盤形成不全や HDP 発症に繋がることが予想される。Cd は既報や第 2 章の結果より、エピ変異原性を持つことが知られているため、Cd によるエピゲノム変異が CT の分化異常を引き起こし、胎盤形成不全を誘発する作用点となっているのではないかと仮説の元、Cd の胎盤細胞分化に対する毒性解明を目指した。

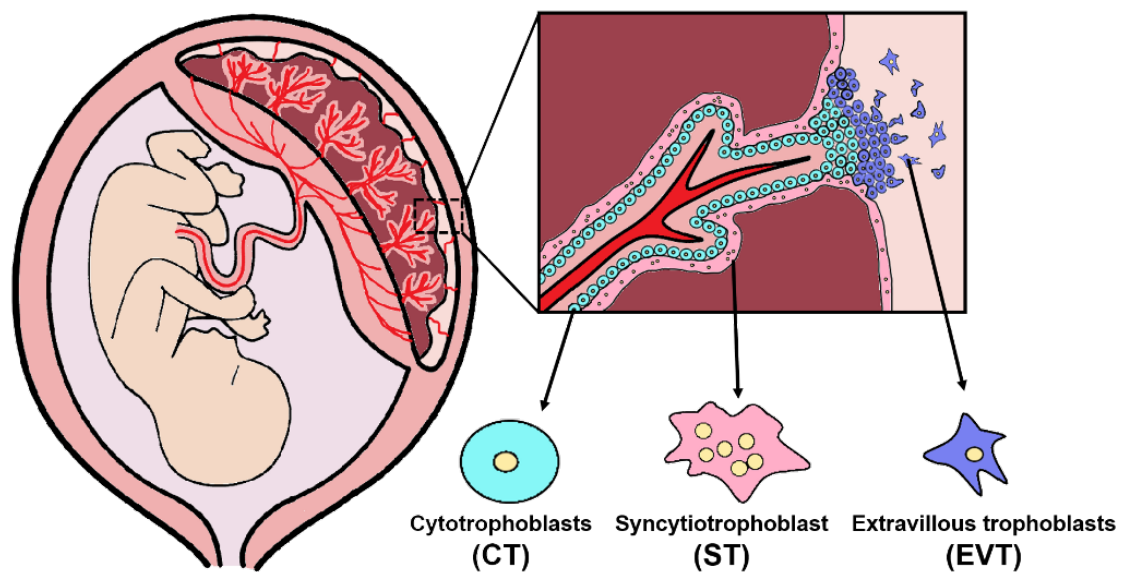


Fig. 17. Schema of human placenta.

## 第二節 実験材料および実験方法

### 細胞培養

BeWo および CT27 細胞は理研バイオリソースセンター細胞バンクから購入した。BeWo 細胞は、10%FBS (Biowest)、抗生物質 (Antibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solution; Nacalai Tesque, Inc.) を含んだ Ham's F12 培地 (Nacalai Tesque, Inc.) を用いて 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養し、2~3 日ごとに継代を行った。分化誘導時には、12 well plate に  $0.5 \times 10^5$  cells/well で播種し、24 時間後に 1.0 μM FSK (Calbiochem, Gibbstown, NJ, USA) で処理した。cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) 阻害試験では、H89 (LKT Laboratories, Inc., St. Paul, MN, USA) を使用した。CT27 細胞は TS 培地 (DMEM/F12 [Fujifilm Wako, Osaka, Japan] に 0.5%ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液 [Nacalai Tesque, Inc.]、0.15%BSA [Fujifilm Wako]、1%ITS-X supplement [Fujifilm Wako]、25 ng/ml

EGF [Fujifilm Wako]、2  $\mu$ M CHIR99021 [Fujifilm Wako]、5  $\mu$ M A83-01 [Fujifilm Wako]、0.8 mM バルプロ酸 [Fujifilm Wako]、2.5  $\mu$ M Y27632 [Nacalai Tesque, Inc.]、1% KnockOut Serum Replacement [KSR; Thermo Fisher Scientific, Inc.; 10828028]、0.2 mM L-ascorbic acid phosphate magnesium salt hydrate [Fujifilm Wako] を添加した)を用いて、5% CO<sub>2</sub>条件下にて培養し、3日ごとに継代を行った。TS 培地は、CT27 細胞を未分化状態に保つため使用した。継代の際には、細胞を TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて 37°Cで 15 分間解離させ、6 well plate に 2 ml の TS 培地あたり 1  $\mu$ l の iMatrix511(ReproCELL Inc, Yokohama, Japan) を添加して 37°Cで 10 分間以上コートしておいたプレートに、 $0.5 \times 10^5$  cells/well で播種した。EVT 細胞および ST 細胞への分化は、既報のプロトコールに従って誘導した<sup>102</sup>。未分化もしくは分化誘導した CT27 は回収前に IX83 倒立顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) で位相差画像を記録した。

#### Cell viability assay

96 well plate に  $4.75 \times 10^3$  cells/well で細胞を播種し、24 時間後に Cd (0-100  $\mu$ M) で処理した。さらに 24 時間後に Cell Counting Kit-8 (CCK-8, 10  $\mu$ L/well; Dojindo, Kumamoto, Japan) を 10  $\mu$ L 添加し、4 時間後に 450 nm の吸光度を測定した。

#### Real time RT-PCR

第一章に準じて行った。使用したプライマーと TaqMan プローブの配列を Table 10 に示した。MT アイソフォーム発現量の測定には、Table 1 に示した配列のプライマーを用いた。

**Table 10. Primers used for qPCR.**

	Gene		Sequence
Undifferentiation markers	CDH1	F	5'-GTCTGTCATGGAAGGTGCTC-3'
		P	5'-CAGACGCGGACGATGATGTGAACA-3'
		R	5'-CTGAGGATGGTGTAAAGCGATG-3'
	LRP5	F	5'-AGAGGAAGGAGATCCTGAGTG-3'
		R	5'-ACAGCGAGTGTGGAAGAAAG-3'
	EVT markers	HLA-G	F
R			5'-CCTTTTCAATCTGAGCTCTTCTTTCT-3'
PLAC8		F	5'-CAGAACTCCAAGTGGCAGAC-3'
		R	5'-CATATCAGCTGCAACTTGACAC-3'
ITGA1		F	5'-GACTGGCTTCAGTGCTCATT-3'
		R	5'-TTGACTAGCCTTCTGCATGAC-3'
ST markers	LGALS13	F	5'-GAGCTGTGCATCTACGTACA-3'
		R	5'-ACACTTGCACCATCTTCACA-3'
	ERVFRD1	F	5'-TCAAATGGTGCAGTGAAGTCG-3'
		R	5'-GTTCTGGCTCTGGAGTTTAAGG-3'
	SDC1	F	5'-TCCTGGACAGGAAAGAGGT-3'
		P	5'-CTCATCTTTGCTGTGTGCCTGGTG-3'
CGB	R	5'-CCTTCTTCTTCATGCGGTACA-3'	
	F	5'-TCGACTAGTCCCTAGCACTC-3'	
Normalizer	GAPDH	R	5'-GCAAGAGGTAGACAAGGC-3'
		F	5'-GGTGTGAACCATGAGAAGTATGA-3'
		P	5'-AGATCATCAGCAATGCCTCCTGCA-3'
		R	5'-GAGTCCTTCCACGATACCAAAG-3'

F: forward primer, R: reverse primer, P: probe. For amplification of CGB, a primer set that non-specifically amplifies CGB3/5/8 was used. The genes *CGB3/5/8* code for identical proteins, whereas the often neglected CGB7 isoform differs in three amino acids from CGB3/5/8<sup>104,105</sup> and is not amplified by this primer set.

バイサルファイトシーケンス

第一章 第一節に準じて行った。PCR 増幅に用いたプライマーの配列 (Table 11) は、既報のものを参考に設計した<sup>106</sup>。

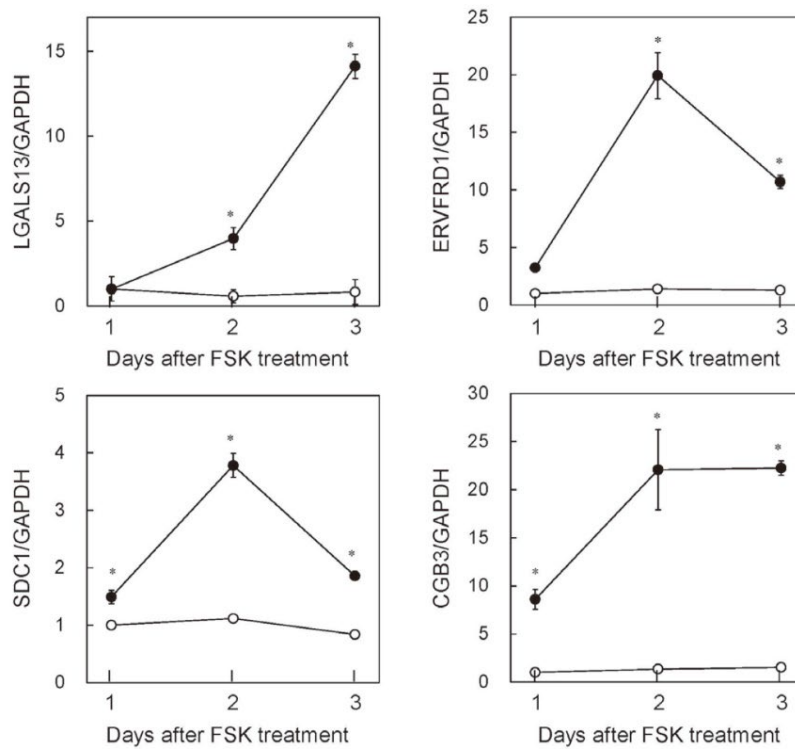
**Table 11. Primers used for bisulfite sequencing assays.**

Gene	Sequence
HLA-G	F 5'-AAGAGTATAGGAGGATAGGTAAGG-3'
	R 5'-AACACCATAACCACCATCCTTAAC-3'

Underlining indicates T and A nucleotides that are substituted for C and G nucleotides, respectively, in the original genomic sequence.

### 第三節 結果および考察

ヒト胎盤絨毛癌由来 BeWo 細胞は、1966 年に Pattillo と Gey によって樹立された妊娠性絨毛癌由来の細胞株であり<sup>107</sup>、古くから胎盤研究に用いられてきた。BeWo 細胞をフォルスコリン (FSK) で処理すると、合胞体化が誘導され、ST 様の細胞に分化する。このとき発現が上昇する遺伝子 (以下、ST マーカーと呼ぶ) がいくつか知られているが、各遺伝子発現が上昇のタイミングについてはよくわかっていない。そこでまず、分化誘導後 1~3 日間の時間経過に伴う ST マーカー発現変化を測定した。その結果、ERVFRD1 および SDC1 の発現量は、FSK 処理 2 日後に最も高くなり、3 日後には低下していた。CGB3 も 2 日後に上昇したが、2 日目と 3 日目で発現量に差はなかった。LGALS13 では、3 日後に最も高くなった (Fig. 18)。Bio Project Accession No.PRJNA397241 として NCBI のウェブサイトで公開されている RNA-seq データを再解析したところ、概ね同様の傾向が見られた (Table 12)。



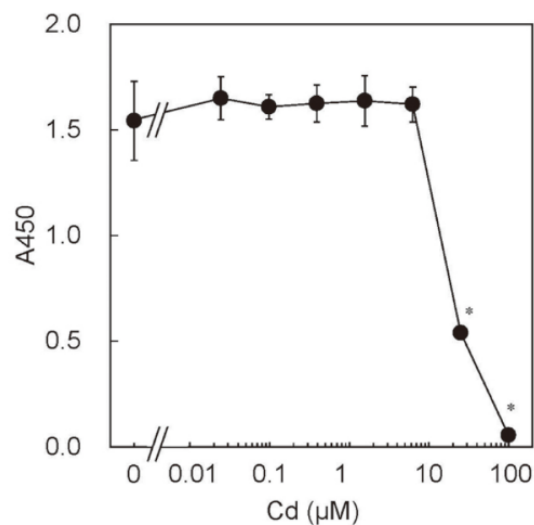
**Fig. 18. Time-course change of the expression levels of LGALS13, ERVFRD1, SDC1, and CGB3 after FSK treatment in BeWo cells.** Cells were cultured with (closed circle) or without (open circle) FSK and total RNAs were extracted at indicated time. These mRNAs were measured through RT-qPCR, and values were normalized by endogenous GAPDH expression. Data represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p < 0.05$ , significantly different from FSK-untreated group.

**Table 12. Reanalyzed results of RNA-seq obtained from BioProject Accession No. PRJNA397241.**

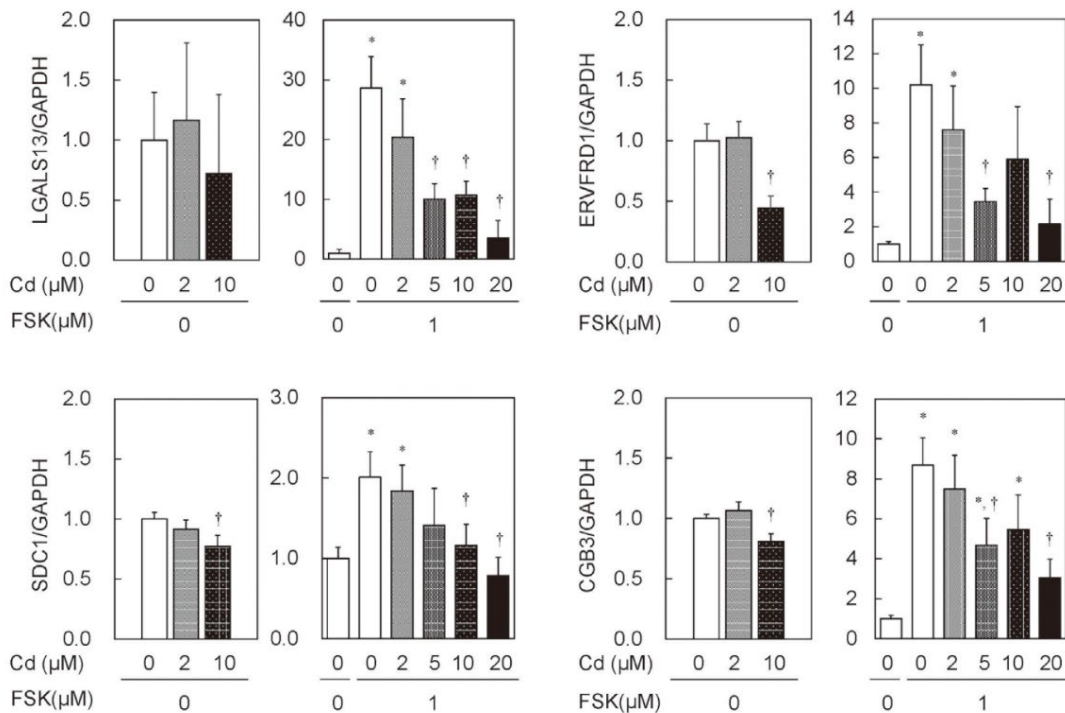
FSK ( $\mu$ M)	Culture (hr)	Expression (TPM)						
		LGALS13	ERVFRD1	SDC1	CGB3	GAPDH	ACTB	B2M
100	0	1.46	19.1	132	73.3	5772	4551	1051
100	24	1.36	51.4	184	252.7	6782	3729	572
100	48	1.52	202.3	1205	1777.5	10082	2425	506
100	72	2.96	145.9	1863	6147.5	10797	2105	489
0	72	0.90	17.6	181	125.4	5669	2749	1556

TPM, transcripts per kilobase million

次に、BeWo 細胞に対する Cd の細胞毒性を明らかにするため、Cell viability assay を行い、Cd 処理 24 時間後の生存率を測定した。Fig. 19 の通り、25  $\mu\text{M}$  以上の Cd は顕著な細胞毒性を示すことがわかったため、分化に対する Cd の影響は 2-20  $\mu\text{M}$  で調べることにした。分化に伴う ST マーカーの発現上昇は、5-10  $\mu\text{M}$  の Cd 処理によって抑制された (Fig. 20)。



**Fig. 19. Cell viability after 24 hr treatment.** BeWo cells were treated with Cd, and cell viability was determined using the Cell Counting Kit-8 for 4 hr. Data represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p < 0.05$ , significantly different from Cd-untreated group.

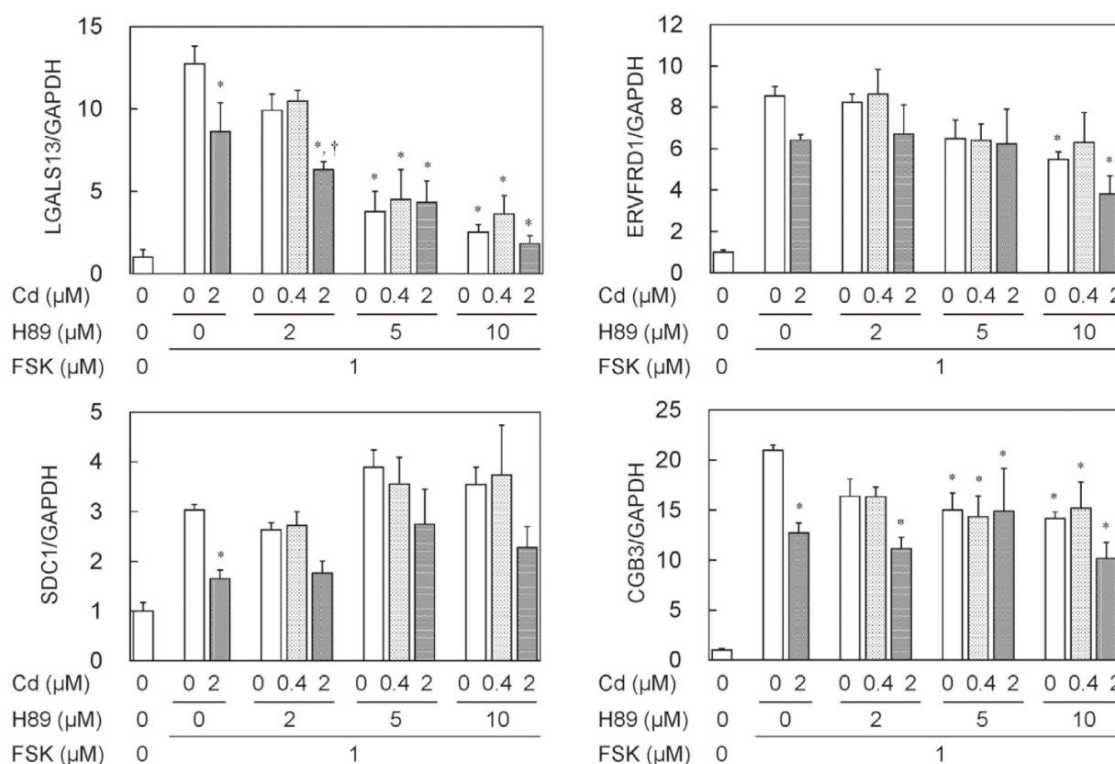


**Fig. 20. Inhibitory effect of Cd on the expression of FSK-induced LGALS13, ERVFRD1, SDC1, and CGB3 in BeWo cells.** Cd and FSK were simultaneously added. Three days after Cd and FSK treatment, RNA was extracted and expression levels were measured through RT-qPCR. The values were normalized with endogenous GAPDH expression. Data represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p < 0.05$ , significantly different from FSK-untreated group. † $p < 0.05$ , significantly different from Cd-untreated group.

FSK はアデニルシクラーゼ活性化剤であり、細胞内 cAMP を増加させることで PKA を活性化し、BeWo 細胞の合胞体化を誘導する。一方、PKA 阻害剤である H89 は、合胞体化マーカーの発現を部分的に阻害する<sup>108</sup>。Cd の阻害作用が PKA 阻害を介するものであるかどうかを明らかにするため、BeWo 細胞を H89 と Cd で処理し、分化に与える影響を調べた。Cd による阻害が PKA 阻害によってのみ引き起こされるのであれば、低濃度 H89 との同時処理では相加効果を示し、高濃度 H89 処理ではそれ以上の阻害を引き起こさないと予想される。

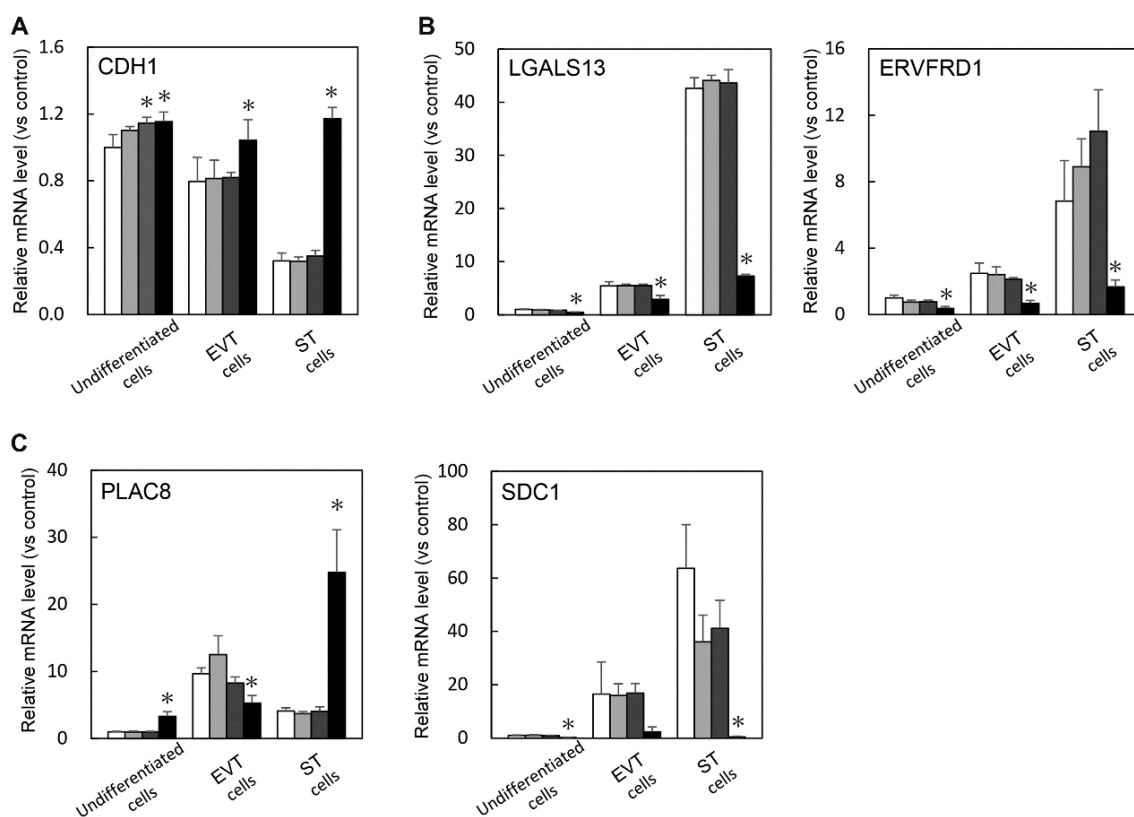


Fig. 21 に示した通り、H89 は LGALS13 の発現上昇を阻害したが、その他の ST マーカーの発現上昇には部分的にしか影響を与えなかった。これらの結果は、LGALS13 タンパク質および mRNA 発現は H89 によって有意に減少したのに対し、CGB タンパク質発現は変化しなかったという Orendi らの報告<sup>108</sup> と一致しており、FSK による BeWo の分化誘導には PKA 以外の経路も関わっていると考えられる。Cd による BeWo 分化阻害は PKA 経路の阻害を介している一方で、同時に他の経路も阻害している可能性が示唆された。



**Fig. 21. Effect of H89 on Cd-inhibited LGALS13, ERVFRD1, SDC1, and CGB3 expression in BeWo cells.** H89 was simultaneously treated with Cd and FSK. Three days after the treatment, RNA was extracted and expression levels were measured through RT-qPCR. The values were normalized with endogenous GAPDH expression. Data represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p < 0.05$ , significantly different from the Cd/H89-untreated and FSK-treated group. † $p < 0.05$ , significantly different from Cd-untreated and H89/FSK-treated group.

Cd が BeWo 細胞の合胞体化を阻害することが明らかとなったが、BeWo 細胞は古くから胎盤研究に使われてきたものの、がん組織由来の細胞であり初代栄養膜細胞とは遺伝子発現プロファイルが異なるため、栄養膜細胞の理想的な機能モデルとは言い難い<sup>109</sup>。この問題に対処するため、2018年に岡江らによって、初産婦胎盤由来の CT27 や胚盤胞由来の bTS5 などのヒト栄養膜幹細胞モデルが樹立された<sup>102</sup>。これらの栄養膜幹細胞モデルは、対応する初代栄養膜細胞と同様のトランスクリプトームを示し、ST および EVT のどちらにも分化する能力を持つ。この CT27 の分化に対する Cd の影響を明らかにするため、CT27 細胞を分化誘導時から 6 日間 Cd (0, 0.1, 0.4, 2  $\mu$ M) 処理し、未分化もしくは ST、EVT へと分化した細胞で発現量が高い遺伝子の発現量を未分化・分化マーカーとして測定した。未分化マーカーとしては CDH1、ST マーカーとしては LGALS13、ERVFRD1、SDC1、EVT マーカーとしては PLAC8 を測定した。未分化マーカーである CDH1 の発現量は未分化細胞では高く、ST および EVT へと分化すると低下するが、高濃度 (2  $\mu$ M) の Cd で処理した細胞 (Fig. 22A、黒棒) では分化誘導によって低下しなかった。また、EVT もしくは ST へと分化誘導した細胞において、各分化マーカーの発現上昇も阻害された (Fig. 22B, C)。しかし、低濃度 Cd (0.1, 0.4  $\mu$ M) 処理群では、変化はほとんど見られなかった。つまり、2  $\mu$ M 以上の Cd 曝露は CT の ST および EVT への分化を阻害すると考えられ、これは先述の BeWo 細胞での結果とも一致している。

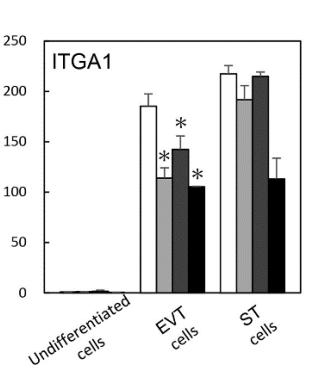
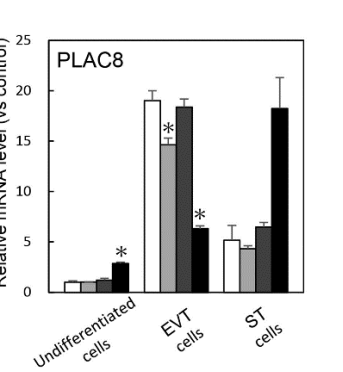
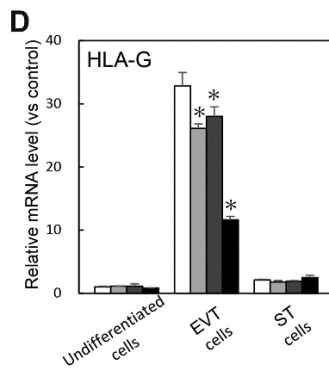
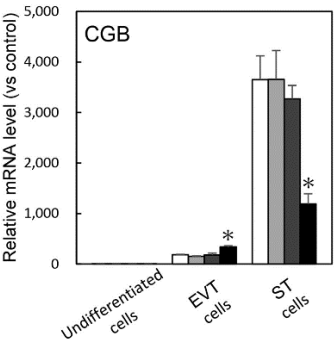
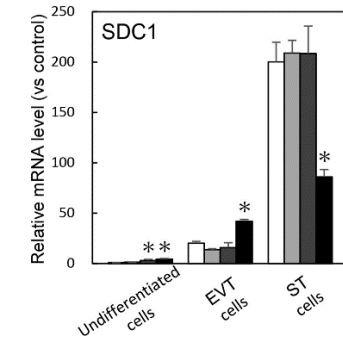
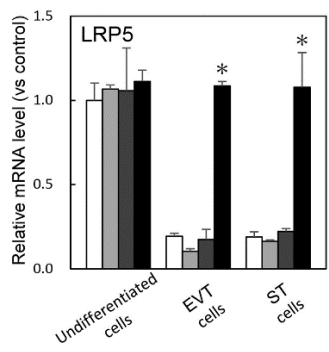
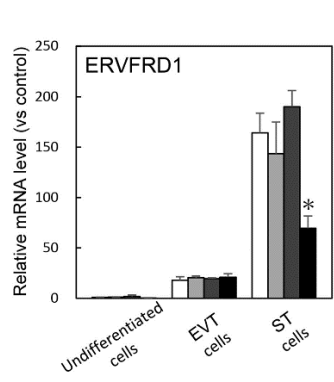
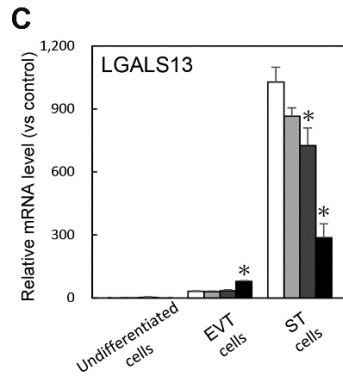
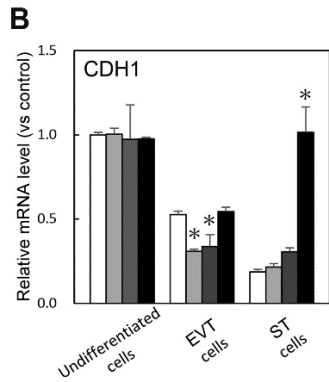
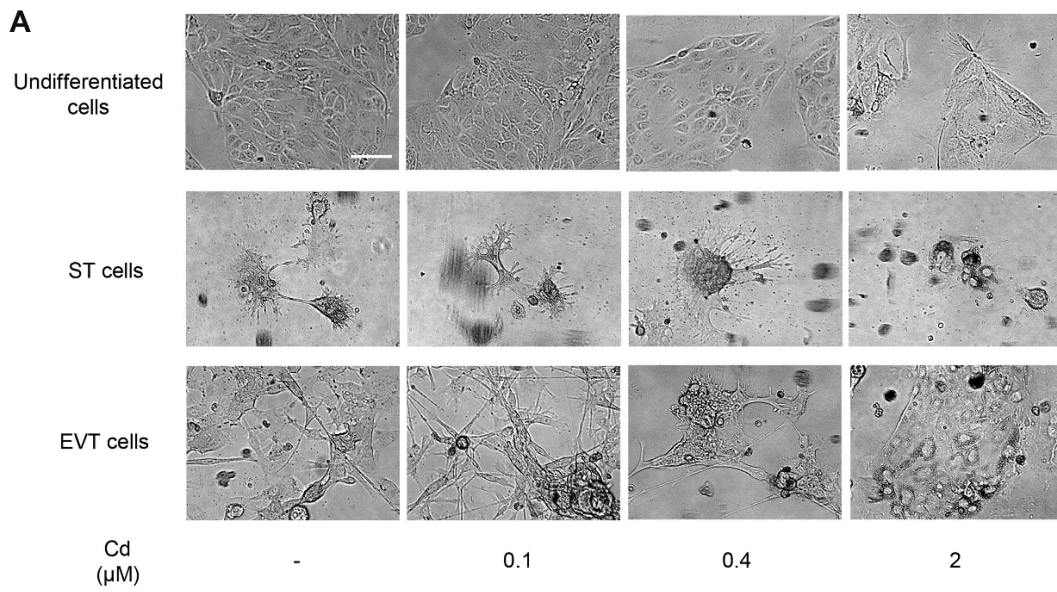


**Fig. 22. Effects of Cd on marker gene expression in CT27 human trophoblast stem cells.** (A) Undifferentiated cell marker CDH1. (B) ST markers LGALS13, ERVFRD1, and SDC1. (C) EVT marker PLAC8. CT27 cells were treated with Cd in the differentiation medium EVT or ST for 6 days. Cd concentrations are indicated by bar color: no Cd (white); 0.1  $\mu$ M Cd (light gray); 0.4  $\mu$ M Cd (dark gray); and 2  $\mu$ M Cd (black). mRNA levels measured by RT-qPCR for the marker genes were expressed as fold change relative to the control (GAPDH) levels. Bar height represents the means  $\pm$  SD of 3 independent experiments. Significant difference from untreated cells is indicated by \* ( $p < 0.05$ ). Abbreviations: Cd, cadmium; EVT, extravillous cytotrophoblast; ST, syncytiotrophoblast.

しかしながら、前述のエコチル調査において早期早産のリスク上昇が見られた群の母体血中 Cd 濃度は  $>0.902$  ng Cd/g ( $>8$  nM) であり、胎盤 Cd 濃度は約  $0.52\sim 14.5$  ng/g と血中 Cd 濃度の約 4 倍程度であるという報告もあるが<sup>97,98</sup>、今回の実験で影響が見られた 2  $\mu$ M はそれと比較してもかなり高い濃度のため、これで Cd が早期早産のリスク因子となる理由が解明できたとは結論づけられ

ない。一方で、胎盤が形成されるには 5 週間程度かかると言われているのに対し、今回の実験における Cd の処理期間は CT27 のものでも 6 日間と短い。第一章 第一節、第二章 第一節に述べたように、低濃度の Cd が細胞に影響を与えるには、1 週間以上の処理期間が必要である可能性が考えられる。そこで、CT27 細胞を分化誘導前に 8 日間 Cd (0, 0.1, 0.4, 2  $\mu$ M) 含有培地で培養し、その細胞での影響を調べることにした。未分化群として播種した細胞は分化誘導に合わせて回収したので Cd 処理期間は 8 日間であるが、分化誘導後も Cd 処理を継続したため、ST もしくは EVT への分化誘導群における Cd 処理期間は 14 日間となった。形態上の変化についても把握するため、回収時に位相差顕微鏡で細胞の様子を記録した。また、特定の分化マーカーに影響が見られる可能性を考え、Fig. 22 に示したマーカーに加え、未分化マーカーとして LRP5、ST マーカーとして CGB を、EVT マーカーとして HLA-G と ITGA1 の発現量を測定した。

細胞の様子を比較すると、2  $\mu$ M Cd 処理群では未分化・分化誘導群ともに明らかな形態変化が見られたが、0.4  $\mu$ M 以下では顕著な変化は観察されなかった (Fig. 23A)。遺伝子発現変化においても、未分化および ST へと分化誘導した細胞では、短期曝露の影響と同様 2  $\mu$ M Cd 処理群のみで影響が見られた (Fig. 23B, C)。一方で、EVT へと分化誘導した細胞では、低濃度 Cd (0.1, 0.4  $\mu$ M) 処理群においても、EVT マーカー発現上昇の阻害が観察された (Fig. 23D)。つまり、低濃度の Cd への長期曝露が、CT から EVT への分化を特異的に阻害することが示された。



**Fig. 23. Effects of Cd pretreatment on CT27 cell differentiation.** CT27 cells were treated with 0.1, 0.4, or 2  $\mu$ M Cd for 8 days before being cultured in a differentiation medium containing Cd at the same concentration for 6 days. A, Representative photomicrographs of cells. Scale bar, 100  $\mu$ m. Gene expression levels for (B) undifferentiated cell markers CDH1 and LRP5; (C) ST markers LGALS13, ERVFRD1, SDC1, and CGB; and (D) EVT markers HLA-G, PLAC8, and ITGA1. Data are presented as bar charts in the same organization as described in Fig. 22A–C. Significant difference from untreated cells is indicated by \* ( $p < .05$ ). Abbreviations: Cd, cadmium; EVT, extravillous cytotrophoblast.

これまで述べてきた通り、MT は Cd 毒性を理解する上で重要なタンパク質である。低濃度 Cd は CT の ST よりもむしろ EVT への分化を特に阻害することが明らかになったが、そのような差異に MT 発現が関与しているという作業仮説を立て、未分化 CT27 細胞および ST または EVT に分化誘導した細胞における各 MT アイソフォームの発現量を測定した。その結果、ST と EVT のいずれにおいても、MT アイソフォームの遺伝子発現レベルは全体的に未分化細胞よりも上昇していたが、その上昇幅はアイソフォーム間で大きく異なっていた (Table 13)。一方で、全アイソフォームに共通して、未分化細胞に対する発現上昇の割合は、EVT よりも ST の方が顕著に大きかった (11 アイソフォームの中央値は、ST が 46.5 倍であるのに対し、EVT は 5.5 倍であった)。このことから、Cd による EVT 分化抑制が ST 分化抑制に比べて感受性が高い原因としては、各細胞における MT 発現上昇の違いに起因している可能性が考えられた。

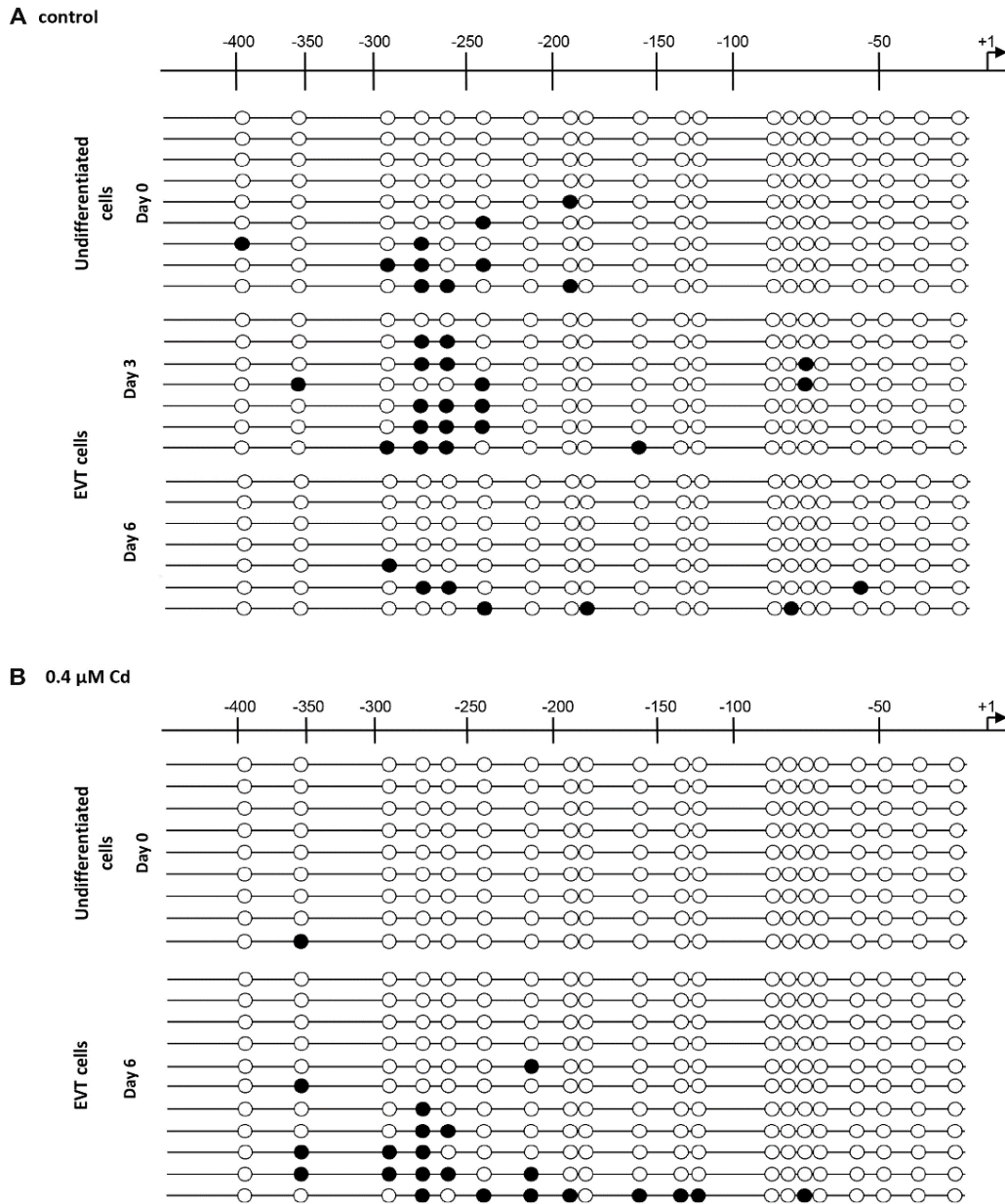
**Table 13. Expression levels of MT isoform genes changed upon CT27 differentiation**

Isoform	Levels of gene expression in units of cDNA copy number/ $\mu$ g RNA (Mean $\pm$ SD)		
	Undifferentiated cells	ST cells	EVT cells
MT1A	1.5 $\pm$ 0.09	2.4 $\pm$ 0.7	1.9 $\pm$ 0.3
MT1B	BLQ	191.0 $\pm$ 30.7	3.0 $\pm$ 0.3
MT1E	430.5 $\pm$ 35.0	3491.8 $\pm$ 1634.2	701.2 $\pm$ 65.4
MT1F	23.3 $\pm$ 2.3	268.3 $\pm$ 136.5	110.6 $\pm$ 13.7
MT1G	47.7 $\pm$ 6.8	14729.3 $\pm$ 9811.6	1083.7 $\pm$ 274.2
MT1H	0.9 $\pm$ 0.4	471.4 $\pm$ 60.4	45.1 $\pm$ 5.7
MT1M	0.005 $\pm$ 0.0005	1.5 $\pm$ 0.04	2.0 $\pm$ 0.1
MT1X	162.9 $\pm$ 15.0	6616.7 $\pm$ 1468.3	901.4 $\pm$ 131.1
MT2A	418.8 $\pm$ 35.7	19485.1 $\pm$ 5084.0	339.8 $\pm$ 31.1
MT3	BLQ	BLQ	BLQ
MT4	0.06 $\pm$ 0.02	14.6 $\pm$ 1.5	0.7 $\pm$ 0.06

Expression levels were determined by real-time PCR. BLQ: below limit of quantitation.

EVT マーカーの一つである HLA-G は、免疫細胞との相互作用を介したらせん動脈のリモデリングの誘導や、免疫寛容に寄与しているなど、胎盤形成において重要な役割を持つとともに、胎盤形成後も NK 細胞の成長促進因子の分泌を刺激することによって胎児の発育を促進すると考えられている<sup>110</sup>。また、HDP 患者では HLA-G プロモーター領域の DNA メチル化率上昇によって、発現が低下することが報告されている<sup>106</sup>。このことから、Cd が HLA-G プロモーター領域の DNA メチル化状態を変化させることで発現上昇阻害を引き起こしている可能性を考え、0.4  $\mu$ M Cd で 8 日間処理した CT27 細胞およびその後 EVT へと分化誘導した細胞における、HLA-G 遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態を調べた。Cd 処理細胞では、EVT への分化誘導前にはプロモーター領域が低メチル化状態であった。しかし分化誘導から 6 日後、Cd 処理細胞ではプロモーター領域がメチル化されている細胞が、無処理細胞よりも増加した (Fig. 24)。こ

の結果は、CdがHLA-G遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態を変化させることを示唆している。



**Fig. 24. Effects of Cd pretreatment on the methylation status of the promoter region of the gene encoding HLA-G in CT27 cells at different stages of differentiation.** Cells pretreated for 8 days with (A) no Cd (control) and (B) 0.4 μM Cd. After treatment, cells were cultured in an EVT differentiation medium for 6 days before the genomic DNA was extracted for bisulfite sequencing. CpG dinucleotides with unmethylated cytosine (open circles) or methylated cytosine (closed circles) are indicated at their relative position in the promoter sequence. Abbreviations: Cd, cadmium; EVT, extravillous cytotrophoblast.



#### 第四節 小括

本章では、第二章 第一節に次いで、Cd が胎盤を構成する細胞である栄養膜細胞の分化を阻害することを見出した。細胞分化に対する Cd の影響については、前述の骨髄間葉系幹細胞以外にも、生殖細胞<sup>111</sup> や神経細胞<sup>112,113</sup>、筋線維芽細胞<sup>114</sup> などにおける報告があるものの、どれも数  $\mu\text{M}$  以上の高濃度での影響について示されたものであるのに対し、本研究では一般的なヒトの血中濃度に近い低濃度の Cd でも長く曝露することで細胞分化に影響を与えることを示した。

胎盤形成において重要である栄養膜幹細胞の EVT への分化が、低濃度 Cd によって特に阻害されること、Cd 処理した EVT では HLA-G のプロモーター領域においてメチル化状態が変化していることを明らかにした。HLA-G は EVT で発現が高いことが知られているが、HLA-G 発現上昇が分化のトリガーとなるのか、もしくは分化の結果 HLA-G 発現が上昇するのかについてはわかっておらず、Cd による分化阻害の作用点が HLA-G であるかどうかを断定するには、更なる検討が必要である。一方で、妊娠において、胎児が非自己として母体に拒絶されないのは、胎盤の機能によるものであり、その重要な役割を担っているのが母児の接点である EVT 上に発現する HLA-G である。つまり、HLA-G は EVT が母体側へと遊走・浸潤し、らせん動脈を再構築して胎盤を形成していく過程において、必要不可欠な因子であるといえる。すなわち、Cd がこの発現を低下させるということは、分化のみならず EVT の機能をも阻害し得る可能性も考えられる。また、EVT は ST よりも MT の発現が低く、これが Cd の影響を受けやすい要因となっていることが予想される。これは、細胞における Cd 感受性が恒常的な MT 発現の程度によって予測できる可能性を示唆しているものと考えられる。

## 総 括

Cd の毒性については、腎障害や骨軟化症、発がん性が広く知られているが、これは動物実験や職業曝露および汚染地帯の住民の高濃度曝露データに基づいたものである。一方で、高濃度曝露がなくなった現在においても、人々は米など食品や喫煙を介して、微量な Cd を曝露し続けている。そのような状況下において、これまで行われてきたような高濃度曝露による毒性発現機序解明に向けた研究では、一般人の曝露条件として注目すべき、低濃度での長期間曝露の影響を知ることはできない。前述の高濃度曝露に比べると一般人の曝露濃度は非常に低いにも関わらず、現在においても血中 Cd 濃度と疾患の関連性を示唆するような疫学調査の報告は確かに存在しており、低濃度 Cd による毒性発現機序の解明は急務である。また、Cd によって発現が誘導される MT は、金属解毒以外にも非常に多くの物質に対する生体防御機構に関わっている重要なタンパク質であり、発現の変化や Cd との複合体形成によって、それら機能への影響も懸念される。しかし、Cd による MT 発現誘導機構は完全には解明されておらず、その詳細を明らかにすることは、Cd 毒性を理解する上で重要な手がかりとなることが予想される。

本研究では、まず第一章において、Cd による MT 発現誘導の経路として最もよく知られている MTF1 による制御について、アイソフォーム間の応答性の違いの解明を試みた。結果として、MTF1 による転写制御の程度、つまり Cd に対する応答性が、アイソフォームごとに異なること、それが各プロモーター領域にある MRE と MTF1 との結合親和性に依存したものであることが示された。MT には数多くのアイソフォームが存在するにも関わらず、その役割についてはほとんど理解されていないのが現状である。コード領域は配列が高度に保存されていることから、プロモーター領域の配列の違い、つまり転写制御の違いが、組

織・細胞ごとの発現量の差異やアイソフォームの役割分担につながっていることが予想され、本研究の結果はそれらを解明するための一助となることが期待される。

次いで第二章 第一節では、低濃度 Cd による慢性曝露の影響について、血中濃度としてあり得る低濃度の Cd であっても、血球系細胞の分化を阻害することが明らかになった。長期間の Cd 処理はマウス MT1 プロモーター領域の DNA メチル化頻度を低下させることで発現を上昇させることが知られており、Cd による HL60 の分化阻害においても同様の経路で MT1G 発現上昇を引き起こし、分化を阻害していると予想したが、MT プロモーター領域におけるメチル化状態の変化は観察されなかった。そこで第二節において、MT1 プロモーターのメチル化低下による発現上昇の機序を詳細に解析し、マウスとヒト、アイソフォーム間での違いについて考察した。結果として、MT1 はプロモーター領域のメチル化によって発現が抑制されるが、その作用にはすべての CpG が均一に関与するわけではなく、特定の部分のメチル化に寄与しているものであることが示唆された。ヒト MT でもメチル化状態と発現量に関連性が見られるとの報告があり<sup>92-94</sup>、マウスとヒトの種差ではなく、細胞腫やアイソフォーム間の差異であると考えられる。本研究で解析したのはマウス MT1 についてのみであり、プロモーター配列がアイソフォーム間で大きく異なることを考えると、全てのアイソフォームが同様に制御されているかを確認するためには、更なる検討が必要であるが、他のアイソフォームでも発現に特に寄与するメチル化領域があると仮定すると、エピ変異原によって生じたわずかなメチル化が発現量に影響することが予想される。

第三章では、2 週間程度の長期間処理した場合にのみ、低濃度 Cd が栄養膜幹細胞の EVT への分化を、特に阻害することが明らかになった。Cd による EVT への分化阻害については、EVT マーカーのひとつである HLA-G のプロモータ

一領域のメチル化状態の変化が関与している可能性が示された。また、ST に比べて EVT は MT 発現が低かったことから、それが Cd の影響を受けやすい要因となっているのではないかと考えられるとともに、細胞における MT の発現量が Cd 感受性の指標となることを示唆している。

このように Cd は低濃度曝露であっても、MT 発現の変化やエピジェネティックな変化を介して細胞分化に影響を及ぼすことが明らかになった。作用機序は異なるものの、複数の細胞種において同程度の濃度の Cd による分化阻害が見られたことから、他の細胞種においても同様の影響が見られる可能性が考えられる。また、MT が関わっている生体機能や、エピジェネティックな変化が伴う生命現象は細胞分化以外にも多く存在し、それらへの影響についても懸念される。以上、健常人の血中濃度としてあり得る数十 nM 程度でも、生涯に渡って曝露し続ければ、生体に悪影響を及ぼす可能性が十分にあることを示した本研究成果は、低濃度 Cd 曝露による毒性とさらなるメカニズム解明の必要性を示した重要な知見となり得る。

## 結 論

低濃度 Cd 曝露による毒性解明のため、MT の発現調節機構および細胞分化に対する Cd の影響評価に関する検討を行い、以下の結論を得た。

1. MT アイソフォームのうち、MT1A は MTF1 による制御が他のアイソフォームに比べて乏しく、その原因は MT1A プロモーター領域に存在する MRE 配列と MTF1 との親和性が他のアイソフォームの MRE 配列と比べて低いためであった。
2. Cd は MT1G 発現上昇を介して HL60 の分化を阻害した。また、この MT1G 発現上昇は、MT1G プロモーター領域の DNA メチル化状態の変化を介さない機序によって引き起こされていた。
3. マウス MT1 遺伝子の発現制御には、プロモーター領域における DNA メチル化の変化が関与しており、MREd および MREe 付近の CpG 部位のメチル化が特に発現に寄与していた。
4. 高濃度 Cd 曝露によって、BeWo の合胞体化、CT27 の ST および EVT への分化が阻害された。低濃度の Cd を長期間曝露して場合には、EVT への分化のみが特に阻害され、その作用点のひとつは、HLA-G プロモーター領域での DNA メチル化状態の変化であった。

## 謝 辞

本研究の遂行および本研究をまとめるにあたり、多くの先生方のご理解とご協力ならびに多大なるご指導とご助言をいただきましたことを、厚く御礼申し上げます。

恩師である摂南大学薬学部 木村 朋紀 教授には、学部学生の頃より現在に至るまで、終始暖かいご指導ならびにご鞭撻を賜り、研究に対する姿勢やノウハウを一から教えていただきました。私がこれまで研究を続けることができたのは、ひとえに先生のご尽力のおかげと、心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、ご指導ご協力を賜りました、岐阜薬科大学 中西 剛 教授、横浜薬科大学薬学部 三浦 伸彦 教授、摂南大学薬学部 吉田 侑矢 講師に深謝いたします。

本研究をまとめるにあたり、ご指導ご助言をいただきました岐阜薬科大学 檜井 栄一 教授、小林 亮 准教授、栗田 尚佳 准教授、松丸 大輔 准教授、石田 慶士 助教、摂南大学理工学部 西村 仁 教授、中嶋 義隆 教授、摂南大学薬学部 中村 武浩 講師、鈴鹿医療科学大学薬学部 廣森 洋平 助教に謹んで感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、P1798 細胞を供与いただきました University of Texas の A.E. Thompson 教授、MEF 細胞を供与いただきました University of Kansas Medical Center の Glen K. Andrews 教授に御礼申し上げます。

本研究における実験の実施にあたりご協力いただきました、田中 亮也 修士、池本 崇二 学士、安東 優斗 学士をはじめとする、摂南大学理工学部生命科学科環境毒性学研究室の後輩諸氏に感謝いたします。

最後に、これまでの研究生生活において、私のことを理解し、支え続け、いつも励ましてくれた家族や友人に心から感謝の意を捧げます。

## 参 考 文 献

1. Richter, P., Faroon, O. & Pappas, R. S. Cadmium and Cadmium/Zinc Ratios and Tobacco-Related Morbidities. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **14**, 1154 (2017).
2. Nordberg, G. F., Fowler, B. A. & Nordberg, M. *Handbook on the Toxicology of Metals. Handb. Toxicol. Met.* (2014).
3. Fisher, C. E., Hattan, D. G., Kawamura, Y., Kuznesof, P. M., Meyland, I., Pascal, G., Veerabhadra Rao, M., Schlatter, J., Speijers, G. J. A., Vavasour, E., Verger, P., Walker, R., Wallin, H., Whitehouse, D. B., Abbott, P. J., Bellinger, D. C., Benford, D., Brooke-Taylor, S., Cantrill, R. C., DiNovi, M., Egan, S. K., Ehara, T., Fawell, J., Feeley, M., Kayama, F., Kroes, R., Lawrie, C. A., Leclercq, C., Viñuela, E. L., Luetzow, M., Mattia, A., Mattock, H., Moreau, G., Moy, G., Munro, I. C., Nishikawa, A., Olempska-Bier, Z., Page, S. & Pronk, I. M. E. J. Evaluation of certain food additives and contaminants. *World Heal. Organ. - Tech. Rep. Ser.* **922**, at (2004)
4. Tsuji, M., Shibata, E., Morokuma, S., Tanaka, R., Senju, A., Araki, S., Sanefuji, M., Koriyama, C., Yamamoto, M., Ishihara, Y., Kusuhara, K., Kawamoto, T., Saito, H., Kishi, R., Yaegashi, N., Hashimoto, K., Mori, C., Ito, S., Yamagata, Z., Inadera, H., Kamijima, M., Nakayama, T., Iso, H., Shima, M., Hirooka, Y., Suganuma, N. & Katoh, T. The association between whole blood concentrations of heavy metals in pregnant women and premature births: The Japan Environment and Children's Study (JECS). *Environ. Res.* **166**, 562–569 (2018).
5. Ma, C., Iwai-Shimada, M., Nakayama, S. F., Isobe, T., Kobayashi, Y., Tatsuta, N., Taniguchi, Y., Sekiyama, M., Michikawa, T., Yamazaki, S. & Kamijima, M. Association of prenatal exposure to cadmium with neurodevelopment in children at 2 years of age: The Japan Environment and Children's Study. *Environ. Int.* **156**, 106762 (2021).
6. Masters, B. A., Kelly, E. J., Quaife, C. J., Brinster, R. L. & Palmiter, R. D. Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 584–588 (1994).
7. Michalska, A. E. & Choo, K. H. A. Targeting and germ-line transmission of a null mutation at the metallothionein I and II loci in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 8088–8092 (1993).
8. Klaassen, C. D., Liu, J. & Diwan, B. A. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **238**, 215–220 at <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.03.026> (2009)

9. Park, J. D., Liu, Y. & Klaassen, C. D. Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals. *Toxicology* **163**, 93–100 (2001).
10. Dalton, T., Fu, K., Palmiter, R. D. & Andrews, G. K. Transgenic mice that overexpress metallothionein-I resist dietary zinc deficiency. *J. Nutr.* **126**, 825–833 (1996).
11. Kelly, E. J., Quaife, C. J., Froelick, G. J. & Palmiter, R. D. Metallothionein I and II protect against zinc deficiency and zinc toxicity in mice. *J. Nutr.* **126**, 1782–1790 (1996).
12. Thornalley, P. J. & Vašák, M. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* **827**, 36–44 (1985).
13. Arita, A. & Costa, M. Epigenetics in metal carcinogenesis: nickel, arsenic, chromium and cadmium. *Metallomics* **1**, 222–228 (2009).
14. Li, E. & Zhang, Y. DNA Methylation in Mammals. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a019133–a019133 (2014).
15. Nan, X., Campoy, F. J. & Bird, A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* **88**, 471–481 (1997).
16. Jones, P. L., Veenstra, G. J. C., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J. & Wolffe, A. P. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.* **19**, 187–191 (1998).
17. Angrish, M. M., Allard, P., McCullough, S. D., Druwe, I. L., Chadwick, L. H., Hines, E. & Chorley, B. N. Epigenetic applications in adverse outcome pathways and environmental risk evaluation. *Environ. Health Perspect.* **126**, 045001-1-045001-12 (2018).
18. Dolinoy, D. C., Huang, D. & Jirtle, R. L. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 13056–13061 (2007).
19. Cheng, T.-F., Patton, G. W. & Muldoon-Jacobs, K. Can the L5178Y Tk<sup>+/-</sup> mouse lymphoma assay detect epigenetic silencing? *Food Chem. Toxicol.* **59**, 187–190 (2013).
20. Gliga, A. R., Malin Igra, A., Hellberg, A., Engström, K., Raqib, R., Rahman, A., Vahter, M., Kippler, M. & Broberg, K. Maternal exposure to



- cadmium during pregnancy is associated with changes in DNA methylation that are persistent at 9 years of age. *Environ. Int.* **163**, 107188 (2022).
21. Park, J., Kim, J., Kim, E., Won, S. & Kim, W. J. Association between prenatal cadmium exposure and cord blood DNA methylation. *Environ. Res.* **212**, 113268 (2022).
  22. Lee, J. E., Kim, H. R., Lee, M. hee, Kim, N. H., Wang, K. M., Lee, S. hyeop, Park, O., Hong, E. J., Youn, J. W. & Kim, Y. Y. Smoking-Related DNA Methylation is Differentially Associated with Cadmium Concentration in Blood. *Biochem. Genet.* **58**, 617–630 (2020).
  23. Jiang, G., Xu, L., Song, S., Zhu, C., Wu, Q., Zhang, L. & Wu, L. Effects of long-term low-dose cadmium exposure on genomic DNA methylation in human embryo lung fibroblast cells. *Toxicology* **244**, 49–55 (2008).
  24. Zhou, Z. heng, Lei, Y. xiong & Wang, C. xia. Analysis of aberrant methylation in DNA repair genes during malignant transformation of human bronchial epithelial cells induced by cadmium. *Toxicol. Sci.* **125**, 412–417 (2012).
  25. Xu, P., Wu, Z., Xi, Y. & Wang, L. Epigenetic regulation of placental glucose transporters mediates maternal cadmium-induced fetal growth restriction. *Toxicology* **372**, 34–41 (2016).
  26. Otsuka, F., Iwamatsu, A., Suzuki, K., Ohsawa, M., Hamer, D. H. & Koizumi, S. Purification and characterization of a protein that binds to metal responsive elements of the human metallothionein IIA gene. *J. Biol. Chem.* **269**, 23700–23707 (1994).
  27. Wang, Y., Wimmer, U., Lichtlen, P., Inderbitzin, D., Stieger, B., Meier, P. J., Hunziker, L., Stallmach, T., Forrer, R., Rüllicke, T., Georgiev, O. & Schaffner, W. Metal - responsive transcription factor - 1 (MTF - 1) is essential for embryonic liver development and heavy metal detoxification in the adult liver. *FASEB J.* **18**, 1071–1079 (2004).
  28. Radtke, F., Heuchel, R., Georgiev, O., Hergersberg, M., Gariglio, M., Dembic, Z. & Schaffner, W. Cloned transcription factor MTF-1 activates the mouse metallothionein I promoter. *EMBO J.* **12**, 1355–1362 (1993).
  29. Kägi, J. H. R. & Schäffer, A. Biochemistry of Metallothionein. *Biochemistry* **27**, 8509–8515 (1988).
  30. Vašák, M. & Meloni, G. Chemistry and biology of mammalian metallothioneins. *J. Biol. Inorg. Chem.* **16**, 1067–1078 at <https://doi.org/10.1007/s00775-011-0799-2> (2011)

31. Mehus, A. A., Muhonen, W. W., Garrett, S. H., Somji, S., Sens, D. A. & Shabb, J. B. Quantitation of human metallothionein isoforms: A family of small, highly conserved, cysteine-rich proteins. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 1020–1033 (2014).
32. Reinecke, F., Levanets, O., Olivier, Y., Louw, R., Semete, B., Grobler, A., Hidalgo, J., Smeitink, J., Olckers, A. & Van Der Westhuizen, F. H. Metallothionein isoform 2A expression is inducible and protects against ROS-mediated cell death in rotenone-treated HeLa cells. *Biochem. J.* **395**, 405–415 (2006).
33. Miura, N. & Koizumi, S. Heavy metal responses of the human metallothionein isoform genes. *Yakugaku Zasshi* **127**, 665–673 at <https://doi.org/10.1248/yakushi.127.665> (2007)
34. Barnes, N. L., Ackland, M. L. & Cornish, E. J. Metallothionein isoform expression by breast cancer cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 895–903 (2000).
35. McNeill, R. V., Mason, A. S., Hodson, M. E., Catto, J. W. F. & Southgate, J. Specificity of the metallothionein-1 response by cadmium-exposed normal human urothelial cells. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1344 (2019).
36. Ma, H., Su, L., Yue, H., Yin, X., Zhao, J., Zhang, S., Kung, H., Xu, Z. & Miao, J. HMBOX1 interacts with MT2A to regulate autophagy and apoptosis in vascular endothelial cells. *Sci. Rep.* **5**, 15121 (2015).
37. Peng, B., Gu, Y., Xiong, Y., Zheng, G. & He, Z. Microarray-Assisted Pathway Analysis Identifies MT1X & NF  $\kappa$  B as Mediators of TCRP1-Associated Resistance to Cisplatin in Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One* **7**, e51413 (2012).
38. Cui, Y., Wang, J., Zhang, X., Lang, R., Bi, M., Guo, L. & Lu, S. H. ECRG2, a novel candidate of tumor suppressor gene in the esophageal carcinoma, interacts directly with metallothionein 2A and links to apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302**, 904–915 (2003).
39. Searle, P. F., Stuart, G. W. & Palmiter, R. D. Building a metal-responsive promoter with synthetic regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 1480–1489 (1985).
40. Jiang, H., Daniels, P. J. & Andrews, G. K. Putative zinc-sensing zinc fingers of metal-response element-binding transcription factor-1 stabilize a metal-dependent chromatin complex on the endogenous metallothionein-I promoter. *J. Biol. Chem.* **278**, 30394–30402 (2003).

41. Kimura, T., Itoh, N., Sone, T., Tanaka, K. & Isobe, M. C-terminal deletion mutant of MRE-binding transcription factor-1 inhibits MRE-driven gene expression. *J. Cell. Biochem.* **93**, 609–618 (2004).
42. Stuart, G. W., Searle, P. F. & Palmiter, R. D. Identification of multiple metal regulatory elements in mouse metallothionein-I promoter by assaying synthetic sequences. *Nature* **317**, 828–831 (1985).
43. Günther, V., Lindert, U. & Schaffner, W. The taste of heavy metals: Gene regulation by MTF-1. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1823**, 1416–1425 (2012).
44. Karin, M., Andersen, R. D., Slater, E., Smith, K. & Herschman, H. R. Metallothionein mRNA induction in HeLa cells in response to zinc or dexamethasone is a primary induction response. *Nature* **286**, 295–297 (1980).
45. Hager, L. J. & Palmiter, R. D. Transcriptional regulation of mouse liver metallothionein-I gene by glucocorticoids. *Nature* **291**, 340–342 (1981).
46. LEE, D. K., CARRASCO, J., HIDALGO, J. & ANDREWS, G. K. Identification of a signal transducer and activator of transcription (STAT) binding site in the mouse metallothionein-I promoter involved in interleukin-6-induced gene expression. *Biochem. J.* **337**, 59–65 (1999).
47. Schroeder, J. J. & Cousins, R. J. Interleukin 6 regulates metallothionein gene expression and zinc metabolism in hepatocyte monolayer cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 3137–3141 (1990).
48. Satomi Onosaka, Daisuke Kawakami, Kyong-Son Min, Kahori Oo-Ishi & Keiichi Tanaka. Induced synthesis of metallothionein by ascorbic acid in mouse liver. *Toxicology* **43**, 251–259 (1987).
49. Garrett, S. H., Xiaoyan, X., Apizono, K. & Brady, F. O. Phorbol ester induction of rat hepatic metallothionein in vivo and in vitro. *Int. J. Biochem.* **24**, 1669–1676 (1992).
50. De, S. K., McMaster, M. T. & Andrews, G. K. Endotoxin induction of murine metallothionein gene expression. *J. Biol. Chem.* **265**, 15267–15274 (1990).
51. Kotsonis, F. N. & Klaassen, C. D. Increase in hepatic metallothionein in rats treated with alkylating agents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **51**, 19–27 (1979).
52. Masao, S., Atsushi, O., Koichiro, T., Hiroshi, M. & Yasushi, N. Metallothionein-I accumulation in the rat lung following a single paraquat administration. *Toxicol. Lett.* **45**, 41–47 (1989).

53. Ghoshal, K., Wang, Y., Sheridan, J. F. & Jacob, S. T. Metallothionein induction in response to restraint stress. Transcriptional control, adaptation to stress, and role of glucocorticoid. *J. Biol. Chem.* **273**, 27904–27910 (1998).
54. Fornace, A. J., Schalch, H. & Alamo, I. Coordinate induction of metallothioneins I and II in rodent cells by UV irradiation. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 4716–4720 (1988).
55. Kimura, T. & Itoh, N. Function of metallothionein in gene expression and signal transduction: Newly found protective role of metallothionein. *J. Heal. Sci.* **54**, 251–260 at <https://doi.org/10.1248/jhs.54.251> (2008)
56. Asenjo, S., Nuñez, O., Segú-Tell, J., Pardo Romaguera, E., Cañete Nieto, A., Martín-Méndez, I., Bel-lan, A., García-Pérez, J., Cárceles-Álvarez, A., Ortega-García, J. A. & Ramis, R. Cadmium (Cd) and Lead (Pb) topsoil levels and incidence of childhood leukemias. *Environ. Geochem. Health* **44**, 2341–2354 at <https://doi.org/10.1007/s10653-021-01030-w> (2022)
57. Djulejic, V., Petrovic, B., Jevtic, J., Vujacic, M., Clarke, B. L., Cirovic, A. & Cirovic, A. The role of cadmium in the pathogenesis of myeloid leukemia in individuals with anemia, deficiencies in vitamin D, zinc, and low calcium dietary intake. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **79**, 127263 (2023).
58. Ohanian, M., Telouk, P., Kornblau, S., Albarede, F., Ruvolo, P., Tidwell, R. S. S., Plesa, A., Kanagal-Shamanna, R., Matera, E. L., Cortes, J., Carson, A. & Dumontet, C. A heavy metal baseline score predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Am. J. Hematol.* **95**, 422–434 (2020).
59. Bejar, R., Levine, R. & Ebert, B. L. Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol.* **29**, 504–515 at <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.31.1175> (2011)
60. Geltink, R. I. K., Kyle, R. L. & Pearce, E. L. Unraveling the Complex Interplay between T Cell Metabolism and Function. *Annu. Rev. Immunol.* **36**, 461–488 at <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053019> (2018)
61. Fujimura, K., Mitsuhashi, T., Shibata, S., Shimozato, S. & Takahashi, T. In utero exposure to valproic acid induces neocortical dysgenesis via dysregulation of neural progenitor cell proliferation/differentiation. *J. Neurosci.* **36**, 10908–10919 (2016).
62. Lv, Y. J., Wei, Q. Z., Zhang, Y. C., Huang, R., Li, B. S., Tan, J. Bin, Wang, J., Ling, H. T., Wu, S. X. & Yang, X. F. Low-dose cadmium exposure acts on rat mesenchymal stem cells via RANKL/OPG and downregulate osteogenic differentiation genes. *Environ. Pollut.* **249**, 620–628 (2019).

63. Wu, L., Song, J., Xue, J., Xiao, T., Wei, Q., Zhang, Z., Zhang, Y., Li, Z., Hu, Y., Zhang, G., Xia, H., Li, J., Yang, X. & Liu, Q. MircoRNA-143-3p regulating ARL6 is involved in the cadmium-induced inhibition of osteogenic differentiation in human bone marrow mesenchymal stem cells. *Toxicol. Lett.* **331**, 159–166 (2020).
64. Nakamura, F. & Kurokawa, M. 造血器腫瘍診療ガイドライン2013年版. *Nihon Naika Gakkai Zasshi* **106**, 797–801 (2017).
65. Zhang, Y., Yu, X., Sun, S., Li, Q., Xie, Y., Li, Q., Zhao, Y., Pei, J., Zhang, W., Xue, P., Zhou, Z. & Zhang, Y. Cadmium modulates hematopoietic stem and progenitor cells and skews toward myelopoiesis in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **313**, 24–34 (2016).
66. Sak, K. & Everaus, H. Established Human Cell Lines as Models to Study Anti-leukemic Effects of Flavonoids. *Curr. Genomics* **18**, 3–26 (2016).
67. Xu, S., Wang, S., Xing, S., Yu, D., Rong, B., Gao, H., Sheng, M., Tan, Y., Zhang, Y., Sun, X., Wang, K., Xue, K., Shi, Z. & Lan, F. Erratum: KDM5A suppresses PML-RARa target gene expression and APL differentiation through repressing H3K4me2 (Blood Adv. (2021) 5: 17 (3241-3253) DOI: 10.1182/bloodadvances.2020002819). *Blood Adv.* **6**, 2443 at <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021006376> (2022)
68. Mendoza-Coronel, E. & Castañón-Arreola, M. Comparative evaluation of in vitro human macrophage models for mycobacterial infection study. *Pathog. Dis.* **74**, ftw052 (2016).
69. Hirako, N., Nakano, H. & Takahashi, S. A PU.1 Suppressive Target Gene, Metallothionein 1G, Inhibits Retinoic Acid-Induced NB4 Cell Differentiation. *PLoS One* **9**, e103282 (2014).
70. Suzuki, S., Nakano, H. & Takahashi, S. Epigenetic regulation of the metallothionein-1A promoter by PU.1 during differentiation of THP-1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **433**, 349–353 (2013).
71. Imoto, A., Okada, M., Okazaki, T., Kitasato, H., Harigae, H. & Takahashi, S. Metallothionein-1 isoforms and vimentin are direct PU.1 downstream target genes in leukemia cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 10300–9 (2010).
72. Basu, J., Madhulika, S., Murmu, K. C., Mohanty, S., Samal, P., Das, A., Mahapatra, S., Saha, S., Sinha, I. & Prasad, P. Molecular and epigenetic alterations in normal and malignant myelopoiesis in human leukemia 60 (HL60) promyelocytic cell line model. *Front. Cell Dev. Biol.* **11**, (2023).
73. Collins, S. J., Ruscetti, F. W., Gallagher, R. E. & Gallo, R. C. Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells

- (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide. *J. Exp. Med.* **149**, 969–974 (1979).
74. Henning, A. L., Sampson, J. N. B. & McFarlin, B. K. Measurement of Low - Abundance Intracellular mRNA Using Amplified FISH Staining and Image - Based Flow Cytometry. *Curr. Protoc. Cytom.* **76**, 7.46.1-7.46.8 (2016).
  75. Horiguchi, H., Oguma, E., Sasaki, S., Okubo, H., Murakami, K., Miyamoto, K., Hosoi, Y., Murata, K. & Kayama, F. Age-relevant renal effects of cadmium exposure through consumption of home-harvested rice in female Japanese farmers. *Environ. Int.* **56**, 1–9 (2013).
  76. Jarup, L. & Akesson, A. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **238**, 201–208 (2009).
  77. Watanabe, T., Zhang, Z. W., Moon, C. S., Shimbo, S., Nakatsuka, H., Matsuda-Inoguchi, N., Higashikawa, K. & Ikeda, M. Cadmium exposure of women in general populations in Japan during 1991-1997 compared with 1977-1981. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **73**, 26–34 (2000).
  78. Ikeda, M., Moon, C. S., Zhang, Z. W., Iguchi, H., Watanabe, T., Iwami, O., Imai, Y. & Shimbo, S. Urinary alpha1-microglobulin, beta2-microglobulin, and retinol-binding protein levels in general populations in Japan with references to cadmium in urine, blood, and 24-hour food duplicates. *Environ. Res.* **70**, 35–46 (1995).
  79. Majumder, S., Kutay, H., Datta, J., Summers, D., Jacob, S. T. & Ghoshal, K. Epigenetic regulation of metallothionein-I gene expression: Differential regulation of methylated and unmethylated promoters by DNA methyltransferases and methyl CpG binding proteins. *J. Cell. Biochem.* **97**, 1300–1316 (2006).
  80. Majumder, S., Ghoshal, K., Li, Z., Bo, Y. & Jacob, S. T. Silencing of metallothionein-I gene in mouse lymphosarcoma cells by methylation. *Oncogene* **18**, 6287–6295 (1999).
  81. Ghoshal, K., Majumder, S., Li, Z., Dong, X. & Jacob, S. T. Suppression of metallothionein gene expression in a rat hepatoma because of promoter-specific DNA methylation. *J. Biol. Chem.* **275**, 539–547 (2000).
  82. Okumura, F., Li, Y., Itoh, N., Nakanishi, T., Isobe, M., Andrews, G. K. & Kimura, T. The zinc-sensing transcription factor MTF-1 mediates zinc-induced epigenetic changes in chromatin of the mouse metallothionein-I promoter. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1809**, 56–62 (2011).

83. Ghoshal, K., Datta, J., Majumder, S., Bai, S., Dong, X., Parthun, M. & Jacob, S. T. Inhibitors of Histone Deacetylase and DNA Methyltransferase Synergistically Activate the Methylated Metallothionein I Promoter by Activating the Transcription Factor MTF-1 and Forming an Open Chromatin Structure. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8302–8319 (2002).
84. Kimura, T., Hosaka, T., Nakanishi, T. & Aozasa, O. Long-term cadmium exposure enhances metallothionein-1 induction after subsequent exposure to high concentrations of cadmium in P1798 mouse lymphosarcoma cells. *J. Toxicol. Sci.* **44**, 309–316 (2019).
85. Xiao, C., Liu, Y., Xie, C., Tu, W., Xia, Y., Costa, M. & Zhou, X. Cadmium Induces Histone H3 Lysine Methylation by Inhibiting Histone Demethylase Activity. *Toxicol. Sci.* **145**, 80–89 (2015).
86. Searle, P. F. Zinc dependent binding of a liver nuclear factor to metal response element MRE-a of the mouse metallothionein-1 gene and variant sequences. *Nucleic Acids Res.* **18**, 4683–4690 (1990).
87. Labbé, S., Prévost, J., Remondelli, P., Leone, A. & Séguin, C. A nuclear factor binds to the metal regulatory elements of the mouse gene encoding metallothionein-I. *Nucleic Acids Res.* **19**, 4225–4231 (1991).
88. Aubrey Thompson, E. Properties of a cell-culture line derived from lymphosarcoma p1798. *Mol. Cell. Endocrinol.* **17**, 95–102 (1980).
89. Kimura, T., Li, Y., Okumura, F., Itoh, N., Nakanishi, T., Sone, T., Isobe, M. & Andrews, G. K. Chromium (VI) inhibits mouse metallothionein-I gene transcription by preventing the zinc-dependent formation of an MTF-1-p300 complex. *Biochem. J.* **415**, 477–482 (2008).
90. Heuchel, R., Radtke, F., Georgiev, O., Stark, G., Aguet, M. & Schaffner, W. The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *EMBO J.* **13**, 2870–2875 (1994).
91. Hirako, N. & Takahashi, S. Upregulation of Metallothionein-1G Accelerates G1/S Transition in the Growth Phase of Acute Promyelocytic Leukemia NB4 Cells. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **51**, 38–43 (2021).
92. Mao, J., Yu, H., Wang, C., Sun, L., Jiang, W., Zhang, P., Xiao, Q., Han, D., Saiyin, H., Zhu, J., Chen, T., Roberts, L. R., Huang, H. & Yu, L. Metallothionein MT1M is a tumor suppressor of human hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis* **33**, 2568–2577 (2012).
93. Nobeyama, Y. & Nakagawa, H. Silencing of metallothionein 1A gene in melanoma. *J. Dermatol. Sci.* **88**, 232–237 (2017).

94. Liu, Q., Lu, F. & Chen, Z. Identification of MT1E as a novel tumor suppressor in hepatocellular carcinoma. *Pathol. - Res. Pract.* **216**, 153213 (2020).
95. Maleckaite, R., Zalimas, A., Bakavicius, A., Jankevicius, F., Jarmalaite, S. & Daniunaite, K. DNA methylation of metallothionein genes is associated with the clinical features of renal cell carcinoma. *Oncol. Rep.* **41**, 3535–3544 (2019).
96. Poudel, K., Kobayashi, S., Miyashita, C., Yamaguchi, T., Tamura, N., Ikeda-Araki, A., Ait Bamai, Y., Itoh, S., Yamazaki, K., Masuda, H., Itoh, M. & Kishi, R. Hypertensive Disorders during Pregnancy and Anthropometric Measurement of Children up to 7 Years of Age: The Hokkaido Birth Cohort Study in Japan. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **18**, 10951 (2021).
97. Laine, J. E., Ray, P., Bodnar, W., Cable, P. H., Boggess, K., Offenbacher, S. & Fry, R. C. Placental Cadmium Levels Are Associated with Increased Preeclampsia Risk. *PLoS One* **10**, e0139341 (2015).
98. Wang, F., Fan, F., Wang, L., Ye, W., Zhang, Q. & Xie, S. Maternal cadmium levels during pregnancy and the relationship with preeclampsia and fetal biometric parameters. *Biol. Trace Elem. Res.* **186**, 322–329 (2018).
99. Zhang, Q., Huang, Y., Zhang, K., Huang, Y., Yan, Y., Wang, F., Wu, J., Wang, X., Xu, Z., Chen, Y., Cheng, X., Li, Y., Jiao, J. & Ye, D. Cadmium-induced immune abnormality is a key pathogenic event in human and rat models of preeclampsia. *Environ. Pollut.* **218**, 770–782 (2016).
100. Wang, F., Zhang, Q., Zhang, X., Luo, S., Ye, D., Guo, Y., Chen, S. & Huang, Y. Preeclampsia induced by cadmium in rats is related to abnormal local glucocorticoid synthesis in placenta. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **12**, 77 (2014).
101. Liu, Y., Fan, X., Wang, R., Lu, X., Dang, Y. L., Wang, H., Lin, H. Y., Zhu, C., Ge, H., Cross, J. C. & Wang, H. Single-cell RNA-seq reveals the diversity of trophoblast subtypes and patterns of differentiation in the human placenta. *Cell Res.* **28**, 819–832 (2018).
102. Okae, H., Toh, H., Sato, T., Hiura, H., Takahashi, S., Shirane, K., Kabayama, Y., Suyama, M., Sasaki, H. & Arima, T. Derivation of Human Trophoblast Stem Cells. *Cell Stem Cell* **22**, 50-63.e6 (2018).
103. Kwak, Y. T., Muralimanoharan, S., Gogate, A. A. & Mendelson, C. R. Human trophoblast differentiation is associated with profound gene regulatory and epigenetic changes. *Endocrinology* **160**, 2189–2203 (2019).



104. Policastro, P. F., Daniels-McQueen, S., Carle, G. & Boime, I. A map of the hCG beta-LH beta gene cluster. *J. Biol. Chem.* **261**, 5907–5916 (1986).
105. Bo, M. & Boime, I. Identification of the transcriptionally active genes of the chorionic gonadotropin beta gene cluster in vivo. *J. Biol. Chem.* **267**, 3179–3184 (1992).
106. Tang, Y., Liu, H., Li, H., Peng, T., Gu, W. & Li, X. Hypermethylation of the HLA-G promoter is associated with preeclampsia. *Mol. Hum. Reprod.* **21**, 736–744 (2015).
107. Pattillo, R. A. & Gey, G. O. The Establishment of a Cell Line of Human Hormone-synthesizing Trophoblastic Cells in Vitro. *Cancer Res.* **28**, 1231–1236 (1968).
108. Orendi, K., Gauster, M., Moser, G., Meiri, H. & Huppertz, B. The choriocarcinoma cell line BeWo: Syncytial fusion and expression of syncytium-specific proteins. *Reproduction* **140**, 759–766 (2010).
109. Karahoda, R., Kallol, S., Groessl, M., Ontsouka, E., Anderle, P., Fluck, C., Staud, F. & Albrecht, C. Revisiting steroidogenic pathways in the human placenta and primary human trophoblast cells. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–18 (2021).
110. Xu, X., Zhou, Y. & Wei, H. Roles of HLA-G in the Maternal-Fetal Immune Microenvironment. *Front. Immunol.* **11**, 592010 at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.592010> (2020)
111. Liu, J., Li, L., Zhu, J., Luo, L., Li, Y., Zhang, C. & Zhang, W. Cadmium disrupts mouse embryonic stem cell differentiation into ovarian granulosa cells through epigenetic mechanisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **235**, 113431 (2022).
112. Gulisano, M., Pacini, S., Punzi, T., Morucci, G., Quagliata, S., Delfino, G., Sarchielli, E., Marini, M. & Vannelli, G. B. Cadmium modulates proliferation and differentiation of human neuroblasts. *J. Neurosci. Res.* **87**, 228–237 (2009).
113. Pak, E. J., Son, G. D. & Yoo, B. S. Cadmium inhibits neurite outgrowth in differentiating human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Int. J. Toxicol.* **33**, 412–418 (2014).
114. Li, F. J., Surolia, R., Li, H., Wang, Z., Liu, G., Liu, R. M., Mirov, S. B., Athar, M., Thannickal, V. J. & Antony, V. B. Low-dose cadmium exposure induces peribronchiolar fibrosis through site-specific phosphorylation of vimentin. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **313**, L80–L91 (2017).