

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07955

研究課題名(和文) 乳がん悪性化における亜鉛トランスポーターの機能的役割と細胞内ネットワーク解析

研究課題名(英文) Role of zinc and zinc transporters in the progression of breast cancers

研究代表者

中瀬 朋夏(高谷朋夏)(Takatani-Nakase, Tomoka)

武庫川女子大学・薬学部・准教授

研究者番号：40434807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、亜鉛イオンとその制御分子である亜鉛トランスポーター(ZIP6)は、これまで隠れていた乳がん悪性化プロセスと密接に関連していることが示され、新たな分子標的治療法開発の重要なアプローチとして注目されている。本研究では、女性ホルモン依存性乳がんの悪性化形質獲得におけるZIP6の機能的役割と重要性を明らかにした。さらに、ZIP6による亜鉛イオンの輸送活性を制御することにより、正常細胞には影響を与えず、乳がん選択的に抗がん剤の効果を操ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Zinc and zinc transporters are key molecules in malignant progression and might lead to novel strategies for the diagnosis and therapy of breast cancer. In this study, we elucidated the novel mechanism underlying estrogen receptor-positive human breast cancer progression involving zinc and zinc transporters (ZIP6). We also demonstrated that the efficacy of anti-breast cancer drugs was controlled by the regulation of zinc action through ZIP6 without the damage to normal cellular functions. Therefore, we propose to provide novel strategies for therapy of breast cancer using zinc network.

研究分野：生物系薬学

キーワード：亜鉛トランスポーター 亜鉛 乳がん 悪性化進展 Bcl-2 YC137 細胞死 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

亜鉛は、生体の機能が正常に働くために必要不可欠な必須微量元素であり、細胞内亜鉛濃度は、細胞膜や細胞内小器官に発現する亜鉛トランスポーターによって、時間的・空間的に厳密に制御されている。近年、亜鉛トランスポーターが制御する亜鉛イオンは、シグナル伝達のセカンドメッセンジャーとして働き、亜鉛トランスポーターに支配される亜鉛シグナルが標的とする分子を介して、細胞機能の変化や重篤な疾患の発症や進行につながることで分子レベルで分かってきた。特に、現在日本で急激に増加傾向にある乳がんにおいては、亜鉛トランスポーターの発現量とその機能が注目され、亜鉛トランスポーターの中でも、細胞の外から細胞質の向きに亜鉛イオンを輸送する ZIP6 は、ヒト乳がんの病理検体において、乳がんの進行ステージに伴い ZIP6 の発現は低下することが報告されている。また、申請者は、ZIP6 ノックダウン乳がん細胞の解析から、細胞死制御を介してストレス環境適応戦略の鍵を握ることを明らかにした (平成 24-26 年度若手研究 B)。これは、ZIP6 と Zn^{2+} が、これまで隠れていた乳がんプロセスと密接に関連していることを示しており、ZIP6 に支配される Zn^{2+} の機能的役割の解明は、乳がんの新たな分子標的治療法開発の有望なアプローチとして期待できる。

一方、細胞死制御分子 Bcl-2 はアポトーシス抑制作用を有するがん細胞の生存促進性因子であることから、Bcl-2 の阻害は抗がん戦略の 1 つとして重要視され、これまで、開発された Bcl-2 阻害剤の一部のリード化合物については臨床試験が進められている。Bcl-2 阻害剤の中でも低分子化合物の YC137 は、ヒト乳がん細胞 MDA-MB435B に対して分子特異的に、かつがん選択的に細胞毒性を発揮し、アポトーシス誘導療法に有効であることが、*in vitro* 実験系で示されてきた。さらに、エストロゲン受容体 (ER) 陽性乳がんのホルモン療法に対する耐性獲得には Bcl-2 の高い発現が関与しており、Bcl-2 の機能を抑制することは薬剤耐性を克服できる戦略として期待が高まっている。しかし、ER 陽性乳がん細胞において YC137 の Bcl-2 阻害による反応性は不明で、さらなる基礎的な検討が必要である。また、乳がんに対する優れた抗がん活性と安全性を兼ね備えた新たな乳がん治療への臨床応用に向けて、薬剤の効果に影響を与えると考えられる Zn^{2+} の観点から YC137 の薬剤感受性や YC137 による

Bcl-2 の阻害効果の有用性を検討した報告は未だない。

以上より、ZIP6 とその制御による Zn^{2+} を治療標的とした新規薬剤・新規治療法開発のため、乳がん悪性化における ZIP6 ならびに亜鉛シグナルの機能的意義を明らかにする必要がある。ZIP6 を起因とする亜鉛ネットワークの理解は、新視点から分子標的薬の候補および治療耐性の回避法の確立につながり、乳がん新戦略の開発に対する重要な方向性を示すことが大きく期待される。

2. 研究の目的

近年、亜鉛トランスポーターが支配する Zn^{2+} は、細胞内シグナル伝達分子として機能することが示されている。この亜鉛ネットワークの理解は、これまで解明されなかった乳がんの悪性化機構を説明できる可能性があり、乳がん新戦略開発のターゲットとして注目が集まっている。本研究では、乳がんにおいて重要な役割を果たしている亜鉛を利用した革新的乳がん治療戦略を開発するため、(1) 未だ大部分が不明な乳がん悪性化における亜鉛および亜鉛トランスポーターの役割、(2) ヒト ER 陽性乳がん MCF-7 細胞に対する YC137 の細胞毒性効果および細胞内外の Zn^{2+} が YC137 の薬剤感受性に与える影響とその機構について検討した。

3. 研究の方法

細胞培養

女性ホルモン依存性 (ER 陽性) ヒト乳がん細胞 MCF-7、トリプルネガティブ (ER、プロゲステロン受容体および HER2 陰性) ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231、ヒト前立腺がん細胞 DU145、ヒト子宮頸がん細胞 Hela は、5% CO_2 -95% air 条件下、10% 非働化仔ウシ血清を含む MEM 培地で培養した。正常乳腺細胞 MCF-10A は、MEGM™ Mammary Epithelial Cell Growth Medium Kit で培養した。

細胞生存・細胞死・オートファジーの解析

細胞生存率の評価には MTT assay を用い、細胞形態変化は、顕微鏡を用いて観察した。細胞死の様式を検証するために、アポトーシス実行酵素 caspase 阻害剤 (zVAD-fmk)、オートファジー阻害剤 3-methyl adenine (3-MA) を用いた。細胞死型の判定には、Hoechst 33342 と Propidium Iodide (PI) を同時に添加し、Hoechst 33342 で染色された核の中で、核の断片化・凝縮を示す細

胞をアポトーシスと判定し、PI を取込んだ細胞を死細胞と判定した。オートファジーの検出には、オートファゴソームのマーカーである LC3 の分布を指標とし、GFP 標識 LC3 発現ベクター (GFP-LC3) 導入細胞をモニタリングした。さらに、オートリソソームを Monodansylcadaverine (MDC) で染色し、蛍光観察することによりオートファジーを解析した。細胞死関連の蛋白質の発現量の検討には、ウエスタンブロット法を用いた。

Zn²⁺と ZIP6 の機能解析

細胞内での Zn²⁺の役割を解析するため、細胞透過性亜鉛イオノフォア Zinc pyrithione (ZnP)、細胞透過性 Zn²⁺特異的キレート剤 *N,N,N',N'*-tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN) を用いた。細胞内遊離 Zn²⁺濃度は、Zn²⁺特異的蛍光プローブ NewportGreen DCF を細胞に導入し、Tali™ イメージベースサイトメーターを用いた蛍光強度の測定により評価した。細胞間における ZIP6 の発現比較は、細胞を固定後、抗体染色により検討した。

遺伝子ノックダウン実験

MCF-7 に、ヒト ZIP6 を標的とする shRNA 発現プラスミドをトランスフェクションした後、ネオマイシン耐性遺伝子を指標に選択培養し、増殖できるクローンを単離した。ZIP6 に対する RNAi 効果の確認には、Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) 法を用い、NewportGreen DCF を用いて、Zn²⁺の細胞内取り込み活性を測定した。

4. 研究成果

(1) ER 陽性乳がん細胞における亜鉛および亜鉛トランスポーターの役割

乳がんの約 70% は、女性ホルモン受容体陽性で、エストロゲン依存性の luminalA タイプに分類される。ZIP6 は LuminalA タイプである MCF-7 で同定されたが、その発現量と細胞機能制御や抗がん効果との関係については、未だ不明な点が多い。まず、MCF-7 における ZIP6 の重要性を検証するため、乳がん細胞(MCF-7、MDA-MB-231)、前立腺がん細胞(DU145)、子宮頸がん細胞(Hela)の ZIP6 発現量を検討した。その結果、MCF-7 において、ZIP6 の高いタンパクレベルでの発現が認められ、遺伝子発現レベルも臨床所見と同様の傾向を示した。次に、亜鉛イオノフォア ZnP および亜鉛特異的キレート剤 TPEN を用いて、細胞内外の亜鉛ネットワー

クを攪乱させた結果、細胞内外の亜鉛イオン量の変化に伴って、ZIP6 の発現量は大きく変動し、ZIP6 を介した Zn²⁺恒常性は、MCF-7 の生存能力に重要な役割を果たしていることを示した。さらに、ZIP6 の機能的役割を詳細に検討するため、MCF-7 に ZIP6 を標的とする shRNA 発現プラスミドを導入した安定ノックダウン細胞を作製した。ZIP6 安定ノックダウン MCF-7 は、コントロール細胞と比較して、著しく Zn²⁺取り込み活性は低下した。また、ZIP6 安定ノックダウン MCF-7 は細胞内亜鉛イオンの恒常性が破綻し、その結果、上皮としての形質を失い、間葉系細胞の形質を獲得する上皮間葉分化転換(EMT)の誘導とがん難治化の原因となる低酸素環境適応性を獲得することを明らかにした。これらの研究成果は、乳がんの進行ステージに伴って、原発巣の ZIP6 の発現は低下すると臨床所見を支持することから、原発巣の ZIP6 の発現量はがん悪性度の規定に大きく貢献し、予後因子になる可能性を示唆している。ZIP6 安定ノックダウン MCF-7 はまた、抗エストロゲン剤タモキシフェンの抗がん効果を減弱した。これは、ZIP6 を起点とする亜鉛ネットワークがタモキシフェンの抗がん活性を制御することを示しており、現在、関与する亜鉛シグナルについて解析を進めている。

(2) 乳がん細胞内外の Zn²⁺が Bcl-2 阻害剤 YC137 の薬剤感受性に与える影響とその機序

MCF-7 に対する YC137 の薬剤感受性は、塩化亜鉛(ZnCl₂)併用により増大し、その感受性増大は細胞内 Zn²⁺濃度に依存した。さらに、細胞内 Zn²⁺の濃度が高くなるにつれ、YC137 の毒性作用機序はアポトーシス型から非アポトーシス型へ変化し、その細胞死変調の起因に、Zn²⁺による Beclin 1 依存性オートファジーの誘導が必要であった。細胞外から細胞内へ Zn²⁺の輸送を担う ZIP6 をノックダウンした結果、Zn²⁺併用による YC137 の細胞毒性の亢進は消失し、Zn²⁺併用による YC137 感受性増大には、ZIP6 を介して細胞内へ輸送された Zn²⁺が誘発するオートファジーを必要とすることを明らかにした。さらに、ZnCl₂ 存在あるいは非存在下で YC137 を処置後、ZnCl₂ と YC137 を除き、通常の培養に戻すことで、細胞死を免れた細胞の増殖能を検討した。その結果、YC137 を単独で処置して生き残った細胞は、コントロール群とほぼ同程度にまで細胞数が回復したのに対し、

ZnCl₂ との併用で YC137 を処置して生き残った細胞は、ほとんど増殖できなかった。また、Zn²⁺を併用した YC137 は、正常乳腺細胞 MCF-10A に対しては細胞障害を示さず、MCF-7 選択的に細胞毒性作用を増強することに成功した。ZnCl₂ を併用した YC137 は、優れた抗がん作用を示し、さらには、アポトーシス誘導による抗がん剤の効果をより高める戦略や Bcl-2 が規定する薬剤耐性を克服する手段に応用できる可能性が考えられる。

本研究において、ER 陽性乳がん細胞は、ZIP6 の厳密な発現制御を介して悪性化性質を獲得し、Zn²⁺とその制御分子である ZIP6 は、乳がん細胞の運命を支配することを明らかにした。さらに、ZIP6 による Zn²⁺輸送活性が YC137 の抗がん効果を制御できることを初めて示し、亜鉛は新たな乳がん治療戦略の強力なツールとして期待できる。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 20 件)

Zinc transporters and the progression of breast cancers.

Tomoka Takatani-Nakase

Biological and Pharmaceutical Bulletin (in press).

High Glucose Level Promotes Migration Behavior of through Zinc and Its Transporters. Potential roles of GLUT12 for glucose sensing and cellular migration in MCF-7 human breast cancer cells under high glucose conditions.

Chihiro Matsui, Tomoka Takatani-Nakase, Sachie Maeda, Ikuhiko Nakase and Koichi Takahashi

Anticancer Research **37**, 6715-6722 (2017).

Zinc and its transporter ZIP6 are key mediators of breast cancer cell survival under high glucose conditions.

Chihiro Matsui, Tomoka Takatani-Nakase, Yuki Hatano, Satomi Kawahara, Ikuhiko Nakase and Koichi Takahashi

FEBS Letters **591**, 3348-3359 (2017).

Gefitinib enhances mitochondrial biological functions in NSCLCs with EGFR mutations at a high cell density.

Tomoya Takenaka, Miku Katayama, Ayaka Sugiyama, Masaya Hagiwara, Ikuo Fujii,

Tomoka Takatani-Nakase, Susumu S. Kobayashi and Ikuhiko Nakase

Anticancer Research **37**, 4779-4788 (2017).

Hydrogen sulfide donor micelles protect cardiomyocytes from ischemic cell death.

Tomoka Takatani-Nakase, Miku Katayama, Chihiro Matsui, Kenjiro Hanaoka, André J. van der Vlies, Koichi Takahashi, Ikuhiko Nakase and Urara Hasegawa

Molecular BioSystems **13**, 1705-1708 (2017).

Loosening of Lipid Packing Promotes Oligoarginine Entry into Cells.

Tomo Murayama, Toshihiro Masuda, Sergii Afonin, Kenichi Kawano, Tomoka Takatani-Nakase, Hiroki Ida, Yasufumi Takahashi, Takeshi Fukuma, Anne S. Ulrich and Shiroh Futaki

Angewandte Chemie International Edition **56**, 7644-7647 (2017).

Cytosolic antibody delivery by lipid-sensitive endosomolytic peptides.

Misao Akishiba, Toshihide Takeuchi, Yoshimasa Kawaguchi, Kentaro Sakamoto, Hao-Hsin Yu, Ikuhiko Nakase, Tomoka Takatani-Nakase, Fatemeh Madani, Astrid Gräslund and Shiroh Futaki

Nature Chemistry **9**, 751-761 (2017).

Arginine-rich cell-penetrating peptide-modified exosomes for active macropinocytosis induction and efficient intracellular delivery.

Ikuhiko Nakase, Kosuke Noguchi, Ayako Aoki, Tomoka Takatani-Nakase, Ikuo Fujii and Shiroh Futaki

Scientific Reports **16**, 1991 (2017).

Receptor clustering and activation by multivalent interaction through recognition peptides presented on exosomes.

Ikuhiko Nakase, Natsumi Ueno, Miku Katayama, Kosuke Noguchi, Tomoka Takatani-Nakase, Nahoko Bailey Kobayashi, Tetsuhiko Yoshida, Ikuo Fujii and Shiroh Futaki

Chemical Communications **53**, 317-320 (2016).

Role of the LIV-1 subfamily of transporters in the development and progression of breast cancers: A mini review.

Tomoka Takatani-Nakase, Chihiro Matsui and Koichi Takahashi

Biomedical Research and Clinical Practice, **1**, 71-75 (2016).

Leptin suppresses non-apoptotic cell death in ischemic rat cardiomyocytes by reduction of iPLA₂ activity.

Tomoka Takatani-Nakase and Koichi Takahashi

Biochemical and Biophysical Research Communications **463**, 13-7 (2015).

Active macropinocytosis induction by stimulation of epidermal growth factor receptor and oncogenic Ras expression potentiates cellular uptake efficacy of exosomes.

Ikuhiko Nakase, Nahoko Bailey Kobayashi, **Tomoka Takatani-Nakase** and Tetsuhiko Yoshida

Scientific Reports **5**, 10300 (2015).

Sesquiterpenoids: phytochemicals for the fight against cancers.

Tomoka Takatani-Nakase and Koichi Takahashi

Nihon Yakurigaku Zasshi **146**, 130-4 (2015).

亜鉛トランスポーターと乳がんの悪性化進展

中瀬朋夏

亜鉛栄養治療 **6**, 32-40 (2015).

[学会発表](計 56 件)

乳がんの悪性化機構と亜鉛トランスポーター (招待依頼講演)

中瀬朋夏

日本薬学会 138 年会 2018.3.26-28

高濃度グルコース環境によるヒト乳がん細胞MCF-7の悪性化形質獲得とその修飾因子としてのトランスポーターの解明

松井千紘、**中瀬朋夏**、川原さと実、波多野有紀、前田幸千恵、中瀬生彦、高橋幸一

日本薬学会138年会 2018.3.26-28

Exosome-based receptor recognition and intracellular delivery using artificial leucine-zipper peptides. (YCPs 2017 Best Presentation Award 受賞)

Natsumi Ueno, Miku Katayama, Kosuke Noguchi, **Tomoka Takatani-Nakase**, Nahoko Bailey Kobayashi, Tetsuhiko Yoshida, Ikuo Fujii, Shiroh Futaki, Ikuhiko Nakase

第 11 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 2017.10.21

アルテミシニンとスルファサラジンの併用効果について (招待依頼講演)

中瀬朋夏

第1回日本フェロトーシス臨床研究会 2017.9.3

Exosome-based receptor recognition and intracellular delivery using artificial coiled-coil peptides. (優秀ポスター受賞)

Natsumi Ueno, Miku Katayama, Kosuke Noguchi, **Tomoka Takatani-Nakase**,

Nahoko Bailey Kobayashi, Tetsuhiko Yoshida, Ikuo Fujii, Shiroh Futaki, Ikuhiko Nakase

第9回日本RNAi研究会、第4回日本細胞外小胞学会 2017.8.31

乳がんにおける亜鉛および亜鉛トランスポーターの役割 (招待依頼講演)

中瀬朋夏

第 12 回トランスポーター研究会年会 2017.7.8

Bcl-2 阻害剤 YC137 の抗がん活性を制御する亜鉛と亜鉛トランスポーター ZIP6

中瀬朋夏、松井千紘、高橋幸一

日本薬剤学会第 32 年会 2017.5.11-13

乳がん薬物療法の効果に影響を与える亜鉛と亜鉛トランスポーター

中瀬朋夏、波多野有紀、久下愛加、南賀菜里、松井千紘、高橋幸一

日本薬学会第137年会 2017.3.25

高濃度グルコース環境がヒト乳がん細胞 MCF-7 の低酸素適応能獲得に与える影響と亜鉛/亜鉛トランスポーター ZIP6 の重要性

松井千紘、**中瀬朋夏**、波多野有紀、高橋幸一

日本薬学会第 137 年会 2017.3.25

高濃度グルコース環境における乳がん細胞の動態とグルコーストランスポーター GLUT12 の役割

松井千紘、**中瀬朋夏**、川原さと実、高橋幸一

日本薬剤学会第 31 年会 2016.5.19

亜鉛が乳がん細胞の運命に与える影響

波多野有紀、**中瀬朋夏**、松井千紘、細谷麻衣子、川原さと実、高橋幸一

日本薬剤学会第 31 年会 2016.5.19

既存医薬品を用いたトリプルネガティブ乳がんの新規治療戦略 (招待依頼講演)

松井千紘、**中瀬朋夏**、川原さと実、高橋幸一

日本薬学会第 136 年会 2016.3.27

ヒト乳がん細胞の運命を支配する亜鉛トランスポーターと亜鉛イオン (報道機関用講演ハイライト採択)

中瀬朋夏、波多野有紀、松井千紘、川原さと実、高橋幸一

日本薬学会第 136 年会 2016.3.28

亜鉛トランスポーターと乳がんの悪性化

進展 (招待依頼講演)

中瀬朋夏

第 11 回 近畿亜鉛栄養治療研究会
2015.8.1

中瀬 朋夏 (高谷朋夏)

(TAKATANI-NAKASE, Tomoka)

武庫川女子大学・薬学部・准教授
研究者番号：40434807

〔図書〕(計 3 件)

乳がんにおける亜鉛と亜鉛トランスポーターの重要性

中瀬朋夏、松井千紘、高橋 幸一

ファルマシア (in press).

伝統薬から開発された抗マラリア薬でがんを治す-漢方がん治療：アルテミシニンの抗がん活性-

中瀬朋夏

アルテミシニンおよび誘導体アルテスネイトに関する論文和訳集 170-3 (2016).

癌細胞へのマクロピノサイトーシスを介したエクソソームの取込み効率が增强される仕組みの発見

中瀬生彦、ベイリー小林菜穂子、**中瀬朋夏**、吉田徹彦

細胞工学 34, 982-3 (2015).

〔その他〕

2017年9月1日 *Molecular BioSystems* 誌
表紙掲載

Molecular BioSystems 誌の掲載論文に関するイラストが、2017年9月号のジャーナルアートワーク(表紙)に採択され、掲載された。

http://pubs.rsc.org/en/journals/journalissues/mb?_ga=2.230209876.93784543.1511157122-285094003.1511157122#!issueid=mb013009&type=current&issnprint=1742-206x

2016年7月25日 日本経済新聞 朝刊科学技術面 記事掲載

「難病乳がん治療基礎成果 武庫川女子大、薬2種使い細胞死滅」

現在有効な治療方法がないタイプの乳がんに対して、別の病気向けの2つの薬を併用すると、がん細胞を死滅できるとの研究成果について紹介された。この取組みは、新たな乳がん治療方法の早期実用化に向けて注目されている。

<http://www.nikkei.com/article/DGXLZO05206280U6A720C1TJM000/>

http://www.mukogawa-u.ac.jp/newspaper/news_07.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者