

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19319

研究課題名(和文) 亜鉛トランスポーターによる腸管上皮幹細胞維持機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of Zinc transporter in intestinal stem cell maintenance.

研究代表者

大橋 若奈 (Ohashi, Wakana)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：50381596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：亜鉛トランスポーターは生体内の亜鉛の恒常性を維持する分子であり、この亜鉛トランスポーターの機能は様々な組織の恒常性維持に重要であることが知られている。今回、腸上皮細胞特異的に亜鉛トランスポーターを欠損するマウスの解析から、亜鉛トランスポーターZIP7によるTA細胞(Transit amplifying cell)と腸上皮幹細胞の小胞体ストレスの解消が腸陰窩細胞の細胞増殖及び、腸上皮幹細胞の維持において重要な役割を果たしていることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Zinc transporters play a central role in the maintenance of zinc homeostasis. Emerging evidence indicates important roles of zinc transporters in the regulation of various tissue functions. In this study, using the intestinal-epithelial specific or Lgr5-positive stem cell-specific ZIP7 deletion mice, we show that ZIP7 contribute to the maintenance of intestinal epithelial homeostasis by resolving ER stress in transit amplifying cells and intestinal stem cells.

研究分野：上皮生物学、亜鉛生物学

キーワード：腸管上皮細胞 亜鉛トランスポーター 腸管上皮幹細胞

1. 研究開始当初の背景

亜鉛は生体における必須微量元素であり、その欠乏は、成長障害、免疫不全、味覚障害などの障害に繋がることが知られている。故に、亜鉛の恒常性を維持することは生体において重要な課題であり、この亜鉛の恒常性は亜鉛トランスポーターやメタロチオネインなどの亜鉛制御分子によって維持されている。亜鉛トランスポーターは、哺乳類においては約 20 種類が同定され、亜鉛を輸送する方向により二つのファミリーに分類される。一つは、細胞外から細胞内へ、または、細胞内小器官から細胞質内へ亜鉛を輸送する SLC39/ZIP ファミリーであり、もう一つは細胞内から細胞外へ、または細胞質から細胞内小器官へ亜鉛を輸送する SLC30/ZnT ファミリーである。これらの亜鉛トランスポーターの変異や機能の異常と組織形成障害や様々な疾患との関わりが明らかとなりつつある一方で、それぞれの亜鉛トランスポーターの生物学的役割は未だ十分には解明されていない。小胞体は細胞内において主要な亜鉛の貯蔵場所として知られており、この小胞体に局在する亜鉛トランスポーターとして SLC39A7/ZIP7 が報告されている。しかしながら、SLC39A7/ZIP7 の生物学的役割は未知のままであった。我々は、これまでの検討から ZIP7 は腸陰窩において強く発現していることを見いだしていた。腸陰窩は腸管上皮幹細胞が絶えず自己複製を行い、TA 細胞 (Transit amplifying cells) が、活発な増殖を行っている場所である。薬剤誘導性に腸管上皮細胞特異的 ZIP7 欠損マウスを樹立しての解析により ZIP7 は腸管上皮幹細胞の維持と TA (Transit amplifying cells) の増殖に必須の役割を果たしていた。

2. 研究の目的

腸管上皮特異的 ZIP7 欠損マウスを用いた解析から、ZIP7 は腸管上皮恒常性維持に重要な役割を果たすことが分かった。ZIP7 の欠損により腸管上皮幹細胞が喪失し、腸管上皮構造は著しく破壊する。本研究では、腸管上皮特異的

ZIP7 欠損マウスを用いて、ZIP7 欠損による腸管上皮崩壊と腸管上皮幹細胞喪失のメカニズムを解析し、腸管上皮幹細胞維持における ZIP7 の役割を明らかとすることにより、腸管上皮幹細胞及び腸管上皮恒常性維持における亜鉛トランスポーター介在性の機構についての新しい知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

ZIP7^{fllox/fllox} マウスと Villin-CreERT2 Tg マウス、または Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2 マウスを掛け合わせてタモキシフェン誘導性腸管上皮細胞特異的 ZIP7 欠損マウス及びタモキシフェン誘導性腸管上皮幹細胞特異的 ZIP7 欠損マウスを作成した。腸管上皮幹細胞における ZIP7 の役割を調べるために、タモキシフェン誘導性腸管上皮幹細胞特異的 ZIP7 欠損マウスにタモキシフェンを投与することにより Lgr5 陽性腸管上皮幹細胞に ZIP7 欠損を誘導し組織学的解析を行った。また、これらのマウスを用いて放射線照射モデルを用いて、放射線障害からの回復における ZIP7 の役割を調べた。タモキシフェンを投与することにより ZIP7 欠損を誘導した後、マウスより小腸を取り出し、EDTA 及び酵素処理を行い、腸管上皮細胞を得た。フローサイトメーターを用いて Lgr5 陽性腸管上皮幹細胞及び TA 細胞を単離した。単離したこれらの細胞を用いて DNA マイクロアレイ解析を行い ZIP7 欠損により発現が変動する遺伝子群の同定を行った。ZIP7^{fllox/fllox} マウスと Rosa26-CreERT2 Tg マウスを掛け合わせ、タモキシフェン誘導性全身性 ZIP7 欠損マウスを作成した。このマウスの胎仔よりマウス胎仔繊維芽細胞 (Mouse embryonic fibroblast: MEF) を調製した。得た MEF を用いて ZIP7 欠損に対する亜鉛の救済効果の検証を行った。

4. 研究成果

これまでの検討により、腸管上皮細胞特異的に ZIP7 を欠損すると腸管上皮構造が著しく乱れ、更には腸管上皮幹細胞が喪失することを見

出している。そこで、腸上皮幹細胞における ZIP7 の役割を解析するため、腸管上皮幹細胞特異的 ZIP7 欠損マウスにタモキシフェンを投与し、腸管上皮幹細胞に ZIP7 欠損を誘導した。誘導後の小腸組織の組織学的解析を行った。その結果、腸上皮組織に大きな変化は認めなかった。通常の腸上皮恒常性においては、Lgr5 陽性腸上皮幹細胞は細胞増殖を行なっている幹細胞として知られているが、Lgr5 陽性腸上皮幹細胞を欠失すると、周辺の休眠期にある腸上皮幹細胞や前駆細胞からの幹細胞化などの機構により腸上皮恒常性が維持されることが知られている。このため、通常の腸上皮恒常性維持においては、Lgr5 陽性腸上皮幹細胞は必ずしも必要ではないとされている。一方で、放射線障害からの回復においては、Lgr5 陽性幹細胞は重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、腸管上皮幹細胞特異的 ZIP7 欠損マウスにタモキシフェン投与と共に放射線を照射し、放射線障害からの回復に対する ZIP7 の寄与を調べた。その結果、7.5Gy の放射線照射によりコントロールマウスは約半数が2ヶ月以上生存した一方で、腸上皮幹細胞特異的 ZIP7 欠損マウスは数日のうちに全個体が死亡した。放射線障害からの回復過程において腸上皮幹細胞の ZIP7 が重要な役割を果たしていることが分かった。

これまでの検討から ZIP7 を欠損すると腸陰窩において小胞体ストレスが高まることが分かっている。腸陰窩には、腸管上皮幹細胞、TA 細胞、及びパネート細胞が存在する。これらのどの細胞において ZIP7 欠損により小胞体ストレスが高まるのかは分かっていない。そこで ZIP7^{lox/lox} と Villin-CreERT2 Tg 及び Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2 を掛け合わせたマウスを作成し、タモキシフェン投与による ZIP7 欠損誘導後、腸陰窩細胞を単離し、フローサイトメトリーにより Lgr5 陽性腸上皮幹細胞及び TA 細胞を得た。これらの細胞を用いて DNA マイクロアレイを行なった結果、ZIP7 欠損により TA 細胞において強く小

胞体ストレス応答が高まっており、小胞体ストレス性のアポトーシス遺伝子群の発現が誘導されていた。腸上皮幹細胞においても ZIP7 欠損により小胞体ストレスの亢進を認めた。電子顕微鏡解析から、腸上皮での ZIP7 欠損により TA 細胞に著しいアポトーシスが起ること、このアポトーシス小体が腸上皮幹細胞内に取り込まれていることが見出されており、これらの結果より腸上皮細胞で ZIP7 が欠損すると腸上皮幹細胞と TA 細胞に小胞体ストレスが高まり TA 細胞のアポトーシスが誘導され、腸上皮幹細胞が死滅していくことが示唆された。

ZIP7 は小胞体に局在する亜鉛トランスポーターであり、ZIP7 欠損により小胞体から細胞質への亜鉛輸送が阻害されることが予想される。実際、細胞質内亜鉛レベルに応じて遺伝子発現量に変化するメタロチオネイン 1 を指標として用いて検証すると、ZIP7 欠損によりメタロチオネイン 1 発現量の低下を認めた。これは細胞質内亜鉛レベルが低下していることを示唆する。そこで、細胞質への亜鉛補充の ZIP7 欠損の表現型への影響を検討した所、亜鉛補充による ZIP7 欠損誘導性の小胞体ストレスの亢進の抑制効果は認めなかった。一方で、ZIP7 の過剰発現は ZIP7 欠損誘導性の小胞体ストレスの亢進を抑制することが分かった。これらの結果から ZIP7 による亜鉛輸送が小胞体ストレスの解消に重要な役割を果たしていることが示唆された。以上より、腸上皮幹細胞の維持と TA 細胞の素早い増殖には ZIP7 による小胞体ストレスの解消機構が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

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 5 件)

1. Ohashi W, Hase K, Fukada T.

“Emerging role of zinc homeostasis by zinc transporter ZIP7 in intestinal homeostatic self-renewal” *Inflammation & Cell signaling*

- 4, e1509 (2017)
2. Takashina M, Inoue S, Tomihara K, Tomita K, Hattori K, Zhao Q, Suzuki T, Noguchi M, Ohashi W, Hattori Y.
“Different effect of resveratrol to induction of apoptosis depending on the type of human cancer cells” International Journal of oncology 50(3):787-797 (2017)
 3. Hattori M, Yamazaki M, Ohashi W, Tanaka S, Hattori K, Todoroki K, Fujimori T, Ohtsu H, Matsuda N, Hattori Y.
“Critical role of endogenous histamine in promoting end-organ tissue injury in sepsis” Intensive Care Med. Exp. 4(1):36 (2016)
 4. Ohashi W, Kimura S, Iwanaga T, Furusawa Y, Irie T, Izumi H, Watanabe T, Hijikata A, Hara T, Ohara O, Koseki H, Sato T, Robin S, Mori H, Hattori Y, Watarai H, Mishima K, Ohno H, Hase K, Fukada T.
“Zinc transporter SLC39A7/ZIP7 promotes intestinal epithelial self-renewal by resolving ER stress” PLOS Genetics 12(10):e1006349 (2016)
 5. 大橋若奈
「腸管恒常性における亜鉛トランスポーターの役割」 “The role of Zinc transporter in the maintenance of intestinal epithelial homeostasis” 亜鉛栄養治療 (2016 年) Vol.7 No.1 Journal of Zinc Nutritional Therapy

[学会発表] (計 3 件)

1. Wakana Ohashi, Koji Hase, Toshiyuki Fukada
Zinc transporter-mediated intestinal homeostatic self-renewal via ER stress

regulation

The 39th Annual meeting of the molecular biology society of Japan

Nov. 30th – Dec. 2nd, 2016

パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)

(シンポジウム、口頭発表)

2. 大橋若奈
腸管恒常性における亜鉛トランスポーターの役割
第 13 回 亜鉛栄養治療研究会
2016 年 8 月 6 日
新大阪丸ビル別館 (大阪府、大阪市)
(招待講演)

3. Wakana Ohashi, Koji Hase, Toshiyuki Fukada
Role of the zinc transporter in intestinal homeostasis self-renewal

The 93rd annual meeting of the physiology society of Japan

Mar. 22-24, 2016

札幌コンベンションセンター (北海道、札幌市)

(シンポジウム、口頭発表)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[ホームページ]

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/pharma/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 若奈 (OHASHI, WAKANA)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：50381596

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()