

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：23303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16281

研究課題名(和文)新規亜鉛応答タンパク質の同定と大腸がん予防における意義の解明

研究課題名(英文) Identification of novel zinc-responsive protein and clarification of significance in colorectal cancer prevention

研究代表者

東村 泰希 (HIGASHIMURA, YASUKI)

石川県立大学・生物資源環境学部・助教

研究者番号：70628924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：低亜鉛血症は大腸がん発症のリスクとされているが、その分子機序は明らかでない。大腸がんの発症には慢性的な腸管炎症が関与する。申請者が施行した先行研究より、macrophage (Mph)において、細胞内亜鉛濃度の変化に伴い、インターフェロン応答型転写因子であるIRF5の細胞内局在が変化することを見出している。しかし、腸管炎症や大腸がん過程におけるIRF5の機能に関しては不明であった。申請者は本課題において、Mphが亜鉛欠乏状態に陥ることで、IRF5の核内移行が促進、炎症性サイトカインIL23p19の発現亢進、炎症性リンパ球であるTh17の活性化、大腸炎の増悪、という現象を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Hypozincemia regarded as a risk for colon cancer and colitis. However, the precise mechanisms involved in zinc deficiency of the intestinal inflammation remains unclear. This study demonstrates that zinc deficiency resulting from using a zinc chelator administration aggravates colonic inflammation through the activation of type 17 helper T (Th17) cells in mice. Flow cytometric analysis revealed that zinc deficiency significantly increases the proportion of pro-inflammatory (M1) macrophages in inflamed colon. A zinc chelator up-regulates IL-23p19 expression, which is deeply associated with Th17 development, in mouse bone marrow-derived macrophages (BMDMs). Furthermore, the nuclear accumulation of interferon-regulatory factor 5 is critically involved in IL-23p19 induction in zinc-deficient BMDMs. Thus, zinc deficiency aggravates colonic inflammation through activation of the IL-23/Th17 axis, and the activation is controlled by subcellular distribution of interferon-regulatory factor 5.

研究分野：食品生化学

キーワード：亜鉛 大腸炎 マクロファージ リンパ球 Th17

## 1. 研究開始当初の背景

亜鉛は生命活動に必要な必須微量元素であり、その欠乏は免疫不全や味覚障害など様々な症状を呈する。世界人口の約25%が亜鉛欠乏状態にあると言われ、発展途上国を中心に深刻な問題となっている。一方、本邦を含む先進諸国においても、食習慣の変容とともに、亜鉛欠乏症状を呈する患者数が増加していることは紛れもない事実であり、その予防策の構築は喫緊の課題である。亜鉛欠乏は悪性腫瘍を含む多くの疾患との関連が示唆されている。実際、大腸がんの領域に関しては、低亜鉛血症は大腸がんのリスクとして考えられている。さらに大腸発がんの素地となる慢性的な腸管炎症を主訴とする炎症性腸疾患患者においては、その血中亜鉛濃度は健常者に比べ有意に低値を示す。しかし、低亜鉛血症が大腸がんおよび腸管炎症に与える影響およびその分子機序は明らかでない。近年、炎症性腸疾患を対象に行われた臨床試験において、「亜鉛の過剰投与は腸管炎症の根本治療には至らない」と結論づけられている。その原因として、多くの疾患で散見される低亜鉛血症は亜鉛吸収能の低下に起因することが挙げられる。すなわち、亜鉛に着眼した大腸がん予防に関しては、「低亜鉛血症の実態が亜鉛吸収能の低下に起因すること」、「低亜鉛血症の不明瞭な作用機序」という2つの問題点が存在する。

腸管における慢性的な炎症反応が大腸発がん過程において重要である。申請者らのグループでは、抗酸化酵素であり且つ細胞内の亜鉛保持タンパク質であるメタロチオネンのノックアウトマウスでは腸管炎症が増悪することを報告しており、その背景にはmacrophage (Mph) からの炎症性サイトカインの産生亢進があることを見出している。つまり、細胞内の亜鉛濃度がMphの機能を制御し得ることが推測されるが、その詳細な機序ならびに腸管炎症病態への影響に関しては明らかでない。

## 2. 研究の目的

Mphを用いたこれまでの研究において申請者は、細胞内亜鉛の欠乏に伴いインターフェロン応答型転写因子であるIRF5の核内移行が促進されることを見出した。IRF5は炎症応答を惹起するだけでなく、炎症性腸疾患の原因遺伝子の一つとして考えられている。それゆえ、IRF5は腸管における炎症制御を介した大腸がん予防における分子標的となることが強く示唆される。本研究では、大腸がん予防の主役となりうるIRF5に着目し、MphにおけるIRF5の機能や疾患に対する影響を検討することによって、低亜鉛血症が大腸発がん過程および腸管炎症病態に及ぼす影響、またその分子機序について明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) *In vitro* 試験

IRF5が炎症制御に根差した大腸がん予防における分子標的となりうることを証明するため、細胞内亜鉛濃度に伴い変化するIRF5の細胞内局在に関して、その分子機序ならびにMph機能に及ぼす影響に関して解析をおこなった。実験に際してはマウス骨髄細胞からの分化誘導により得られたマウス骨髄由来Mph (mBMDM) を使用した。

### (2) *In vivo* 試験

本研究項目では、亜鉛欠乏ならびに付随したIRF5の機能的変化が腸管炎症に及ぼす影響に関して、Mphの機能を中心に*in vivo*の解析をおこなった。大腸炎モデルとしては、古典的クローン病モデルであるトリニトロベンゼンスルホン酸誘発大腸炎モデルを用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 亜鉛欠乏マクロファージの機能解析

mBMDMを亜鉛キレーターで処理することにより、IRF5の標的遺伝子である*IL23p19*の発現が亢進することを見出した。また、クロマチン免疫沈降法の結果より、*IL23p19*遺伝子のプロモーター領域に存在するインターフェロン応答配列にIRF5が結合していることを見出し、さらにこの結合が細胞内亜鉛レベルに依存して生じることを明らかにした。

### (2) 亜鉛欠乏に伴うIRF5核内移行に伴う分子機序

IRF5は細胞質内において、COP9シグナロソームに結合していることが知られている。そこで、亜鉛および亜鉛キレーターの添加が、当該の結合に与える影響に関して、免疫沈降法を用いて評価した。しかしながら、mBMDMを用いた解析では、IRF5とCOP9シグナロソームとの結合を確認することが出来なかった。

### (3) 亜鉛欠乏が腸管炎症に及ぼす影響

亜鉛キレート剤を腹腔内に投与することで亜鉛欠乏状態を呈したマウスを用いてトリニトロベンゼンスルホン酸誘発大腸炎モデルを作成した。炎症の程度を比較したところ、亜鉛欠乏に伴い大腸炎が増悪することが判明した。フローサイトメーターを用いた免疫学解析の結果、炎症増悪の背景にはLy6C陽性の炎症型Mphの増加ならびに、炎症性サイトカインであるIL17を産生する17型ヘルパーT細胞の活性化が生じていることを見出した。

### (4) 亜鉛欠乏Mphがリンパ球の分化に及ぼす影響

上記成果(3)より、「亜鉛欠乏→炎症型マクロファージの増加→17型ヘルパーT細胞の活性化→大腸炎増悪」というシナリオが考えら

れる。そこで、mBMDMとリンパ球との共培養実験を実施した。その結果、亜鉛キレート剤を用いて亜鉛欠乏状態とした mBMDM では IL23 の発現が亢進しており、その結果としてリンパ球からの IL17 の産生が増加することを見出した。

#### <引用文献>

Hara A, *et al.*, Zinc and heme iron intakes and risk of colorectal cancer: a population-based prospective cohort study in Japan. *Am. J. Clin. Nutr.* 96(4), 2012, 864-873.

McClain C, *et al.*, Zinc deficiency: a complication of Crohn's disease. *Gastroenterology* 78(2), 1980, 272-279.

Itagaki M, *et al.*, Efficacy of zinc-carnosine chelate compound, Polaprezinc, enemas in patients with ulcerative colitis. *Scand. J. Gastroenterol.* 49(2), 2014, pp. 164-172.

Tsuji T, *et al.*, Role of metallothionein in murine experimental colitis. *Int. J. Mol. Med.* 31(5), 2013, 1037-1046.

#### 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10件)

Uchiyama K, Naito Y, Yagi N, Mizushima K, Higashimura Y, Hirai Y, Dohi O, Okayama T, Yoshida N, Katada K, Kamada K, Handa O, Ishikawa T, Takagi T, Konishi H, Nonaka D, Asada K, Lee LJ, Tanaka K, Kuriu Y, Nakanishi M, Otsuji E, Itoh Y: Selected reaction monitoring for colorectal cancer diagnosis using a set of five serum peptides identified by BLOTCHIP®-MS analysis. *J. Gastroenterol.* 査読有  
DOI: 10.1007/s00535-018-1448-0.

Fuke N, Takagi T, Higashimura Y, Tsuji T, Umeda R, Mizushima K, Tanaka M, Suganuma H, Aizawa K, Yoshikawa T, Yajima N, Naito Y: Lactobacillus brevis KB290 with vitamin A ameliorates murine intestinal inflammation associated with the increase of CD11c<sup>+</sup> macrophage/CD103<sup>-</sup> dendritic cell ratio. *Inflamm. Bowel Dis.* 査読有, 24(2), 2018, 317-331.  
DOI: 10.1093/ibd/izx003.

Higashimura Y, Baba Y, Inoue R, Takagi T, Mizushima K, Ohnogi H, Honda A, Matsuzaki Y, Naito Y: Agaro-oligosaccharides regulates gut microbiota and adipose tissue accumulation in mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 査読有, 63, 2017, 269-276.  
DOI: 10.3177/jnsv.63.269.

Tanaka M, Takagi T, Naito Y, Uchiyama K, Hotta Y, Toyokawa Y, Ushiroda C, Hirai Y,

Aoi W, Higashimura Y, Mizushima K, Okayama T, Katada K, Kamada K, Ishikawa T, Handa O, Itoh Y. Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine Functions in Colitis via IL17A Regulation in Mucosal CD4<sup>+</sup> T Cells. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 査読有, 33(3), 2018, 671-680.  
DOI: 10.1111/jgh.13842.

Uchiyama K, Yagi N, Mizushima K, Higashimura Y, Hirai Y, Okayama T, Yoshida N, Katada K, Kamada K, Handa O, Ishikawa T, Takagi T, Konishi H, Kuriu Y, Nakanishi M, Otsuji E, Itoh Y, Naito Y: Serum metabolomics analysis for early detection of colorectal cancer. *J. Gastroenterol.* 査読有, 52(6), 2017, 677-694.  
DOI: 10.1007/s00535-016-1261-6.

東村泰希, 内藤裕二, 胆汁酸代謝と大腸がん. *Vitamins (Japan)*, 査読有, 91(1), 2017, 53-56.

東村泰希, 内藤裕二, 腸管バリア機能における亜鉛の重要性. *Vitamins (Japan)*, 査読有, 91(7), 2017, 437-440.

Takagi T, Naito Y, Higashimura Y, Ushiroda C, Mizushima K, Ohashi Y, Yasukawa Z, Ozeki M, Tokunaga M, Okubo T, Katada K, Kamada K, Uchiyama K, Handa O, Itoh Y, Yoshikawa T: Partially hydrolysed guar gum ameliorates murine intestinal inflammation in association with modulating luminal microbiota and SCFA. *Br. J. Nutr.* 査読有, 116(7), 2016, 1199-1205.

Steiger C, Uchiyama K, Takagi T, Mizushima K, Higashimura Y, Gutmann M, Hermann C, Botov S, Schmalz HG, Naito Y, Meinel L: Prevention of colitis by controlled oral drug delivery of carbon monoxide. *J. Control Release* 査読有, 239, 2016, 128-136.  
DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.08.030.

東村泰希, 高木智久, 内藤裕二, 亜鉛機能と消化器系疾患. *日本臨床*, 査読有, 74(7), 2016, 1121-1125.

#### [学会発表](計6件)

東村泰希ら: 亜鉛欠乏に伴う IL17A 産生亢進における分子機序の解明, 日本ビタミン学会第 68 回大会, 2016 年 6 月, 富山.

東村泰希ら: Participation of IRF5 in the up-regulation of IL-17A production mediated by zinc deficiency, 第 27 回日本微量元素学会学術集会, 2016 年 7 月, 京都.

東村泰希: 亜鉛欠乏に伴う腸管炎症増悪における分子機序の解明, 第 9 回北陸合同バイオシンポジウム, 2016 年 11 月,

福井（招待講演）。

東村泰希ら：Aggravation of intestinal inflammation mediated by zinc deficiency, 第28回日本微量元素学会学術集会, 2017年7月, 仙台（招待講演）。

東村泰希：栄養・食品成分による腸管免疫細胞の機能制御を基軸とした大腸炎予防, カロテノイド研究会若手の会, 2017年9月, 京都（招待講演）。

東村泰希：亜鉛欠乏と腸管炎症, 第16回亜鉛栄養治療研究会学術集会, 2018年2月, 大阪（招待講演）。

〔産業財産権〕

出願状況（計 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 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

東村 泰希 (HIGASHIMURA YASUKI)  
石川県立大学・生物資源環境学部・助教  
研究者番号：70628924

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：