

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09373

研究課題名（和文）腫瘍領域に高発現する亜鉛トランスポーターの役割解明と治療標的としての可能性の探求

研究課題名（英文）Studies of Zinc transporter detected in tumor lesions as a target for cancer therapy

研究代表者

大橋 若奈（Ohashi, Wakana）

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：50381596

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：亜鉛トランスポーターZIP7は小腸上皮細胞の幹細胞維持と増殖に必須であることをこれまでに見出していた。本研究では、大腸がん細胞におけるZIP7の役割について解析を行った。ZIP7の発現を抑制したノックダウン細胞とZIP7を過剰に発現する細胞株を樹立しての検討の結果、ZIP7は細胞、個体レベルで腫瘍の形成に寄与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

亜鉛トランスポーターが種々の生体の正常な機能の発揮に関わっていることが明らかとなり、亜鉛トランスポーターの機能の異常はどのような疾患に関わり、また、その疾患の発症や増悪においてはどのような役割を持っているのかについて注目が集まっている。大腸がん発症進展機構における種々の要因の解明に基づいた大腸の悪性腫瘍の病態概念理解への貢献が本研究成果の学術的・社会的意義である。

研究成果の概要（英文）：We have showed that zinc transporter ZIP7 is critical for intestinal homeostasis by maintaining intestinal epithelial stem cells and progenitor cells. Our investigations focus on the role ZIP7 in the pathogenesis of colorectal cancer. We showed that knockdown of ZIP7 by siRNA or shRNA significantly suppressed cell growth by causing apoptosis and ameliorate tumor growth in vivo. In addition, we demonstrated that increased ZIP7 expression enhanced tumorigenic potential. Our data reveal an important role of ZIP7 in colorectal tumorigenesis, which can contribute to novel therapy for colorectal cancer.

研究分野：上皮生物学、亜鉛生物学

キーワード：亜鉛トランスポーター 腸上皮細胞 大腸がん 悪性腫瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

亜鉛は必須微量元素の一つであり、体内における亜鉛の恒常性を維持することは重要な生命維持機構の一つである。このため、体内には約 20 種以上の亜鉛トランスポーターと呼ばれる膜タンパク質が存在し、膜を介した亜鉛の移動を媒介し、亜鉛の恒常性の維持を担っている。このような亜鉛トランスポーターの機能の異常は、種々の疾患を結びついていることが相次いで報告されており、亜鉛トランスポーターの異常の病態への関わりを解明し、新しい治療法や治療薬の開発へと繋げることは重要な課題である。腫瘍病態においては、腫瘍組織中への亜鉛の蓄積やまたは減少するといった現象が古くから知られてきたが、亜鉛トランスポーターの果たす役割は十分に解明されていないのが現状である。

我々は亜鉛トランスポーターの一つ ZIP7 が小腸の腸上皮細胞に発現していることを見出し、この機能解析を進めた結果、腸上皮幹細胞の維持に必須であり、一過性増殖細胞の増殖に重要な役割を果たしていることを見出し、この機構として ZIP7 は小胞体ストレスの解消に寄与していることを示した。腸上皮細胞の幹細胞からの分化と増殖による系列細胞の産生の制御が破綻し、異常な増殖を続けるのが腫瘍病態の特徴の一つであるが、この異常な増殖機構への ZIP7 の寄与の有無については、腸上皮における ZIP7 の役割は見出されたばかりであり不明である。

2. 研究の目的

本研究においては、大腸がんの悪性腫瘍の形成において亜鉛トランスポーター ZIP7 の発現の変動が与える役割を、培養細胞株および免疫不全マウスを用いて、細胞と個体レベルで解明し、腫瘍病態の理解と ZIP7 が悪性腫瘍の治療標的としての有用性を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 大腸がん細胞において ZIP7 の発現抑制が及ぼす影響の解明

ヒト由来大腸がん細胞株に siRNA または shRNA 法により ZIP7 のノックダウンを行い ZIP7 のタンパク存在量が低下した細胞株を作製した。免疫不全マウスへの移植を行い腫瘍形成能の検証を行った。加えてがん細胞機能評価を行うとともに分子機構についての検討を行った。

(2) ZIP7 の発現亢進細胞株の樹立と解析

ヒト ZIP7cDNA をレンチウイルスベクターに組み込み、ヒト ZIP7 発現レンチウイルスベクターを作成した。パッケージング細胞を用いて ZIP7 過剰発現レンチウイルスを作製した後、大腸がん細胞株へ感染させ薬剤選択を行い、ヒト ZIP7 を恒常的に過剰発現するヒト大腸がん細胞株を樹立した。遺伝子発現とウエスタンブロットにより ZIP7 過剰発現を検証した後に、これらの細胞を用いてがん細胞機能への作用を評価した。

4. 研究成果

(1) 大腸がん細胞において ZIP7 の発現抑制が及ぼす影響の解明

これまでに、乳がんにおいては抗悪性腫瘍薬であるタモキシフェン耐性の乳がん細胞株では ZIP7 の発現が亢進しているとの報告がある。薬剤耐性の獲得と ZIP7 発現変動の関係は未だ解明されていないが、同じ癌腫においてもステージやがん細胞が得た性質により ZIP7 の発現量が変動していることが示唆される。

ヒト大腸がん細胞株間において ZIP7 のタンパク質発現量を比較すると、ZIP7 の存在量は一樣ではなく、ZIP7 を高く発現する株とこれらの株に比べて発現量が低い株が存在していた。発現量の高さから ZIP7 を高発現する株では、ZIP7 ががん細胞機能に重要に寄与している可能性が考えられる。そこで、高発現がん細胞株において ZIP7 が担う機能を明らかにするために、ノックダウン法を用いて ZIP7 の発現量の抑制の効果を検証した。ウエスタンブロットによる解析からノックダウンにより ZIP7 の発現量の低下を認めた。ノックダウン細胞株とコントロール株を用いてがん細胞機能への影響を細胞および個体レベルで検証し、ZIP7 が寄与するがん細胞機能の同定を行った。ZIP7 のノックダウンにより細胞増殖が顕著に低下していることを見出し、ZIP7 はがん細胞の増殖に重要であることが示唆された。また、ZIP7 を低発現する株においても、高発現株と同様に ZIP7 が何らかの機能を担っているのではないかと仮定し、高発現株と同様の方法で ZIP7 のノックダウンを行い機能の解析を進めた。その結果、高発現株と同じく低発現株においても ZIP7 のノックダウンを行うと、細胞の増殖が著しく低下した。このような ZIP7 の発現量の変動の要因を探るため、それぞれの株が有する遺伝子変異に着目した。大腸がんの多段階変異において変異が入る遺伝子と変異型と ZIP7 の発現量をがん細胞株間で比較を行ったが、候補となりうる遺伝子の同定には至らなかった。がん細胞において ZIP7 の発現を制御する機構については引き続き検討を進めている。以上より、ZIP7 の発現量には変動が観察される一方で、今回検証したいずれの細胞株においても発現量にかかわらず ZIP7 は細胞の増殖を担っていることが明らかとなった。次に、これらの ZIP7 のノックダウンを行った細胞株とコントロール細胞株を免疫不全マウスに移植し生体中で形成される腫瘍を比較しての検証を行い、ZIP7 のノックダウンにより腫瘍の形成が抑制されることを見出した。

(2) ZIP7 の発現亢進細胞株の樹立と解析

ZIP7 の発現の亢進が大腸がん細胞機能における機能的役割を明らかにするため、レンチウイルス法を用いて ZIP7 を恒常的に発現する大腸がん細胞株の樹立を行った。ZIP7 の発現量が低い

細胞株と内因性に ZIP7 を高く発現する細胞株の両方を用いて、ZIP7 の過剰発現株を作製し機能を解析し、ZIP7 の発現が高まった際の影響と、ZIP7 を高く発現する細胞において更に ZIP7 の発現が高まった際に生じるがん細胞機能の変化を検証し、ZIP7 発現の高まりによって亢進する機能を同定した。これらの機能獲得を担う分子機構を解析するため、RNA-seq を用いた網羅的な遺伝子発現量解析と細胞内シグナル伝達因子の活性状態の検証を進め、候補経路の絞り込みを行っている。今後、候補経路の阻害剤や刺激薬を用いた検証等を行い、この機能変化をもたらす分子機構の解明に取り組んでいく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Palikhe S, Ohashi W, Sakamoto T, Hattori K, Kawakami M, Andoh T, Yamazaki H, Hattori Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Regulatory Role of GRK2 in the TLR Signaling-Mediated iNOS Induction Pathway in Microglial Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2019.00059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ohashi W, Fukada T	4. 巻 -
2. 論文標題 Contribution of Zinc and Zinc Transporters in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Immunology Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/8396878	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ohashi W, Hara T, Takagishi T, Hase K, Fukada T	4. 巻 -
2. 論文標題 Maintenance of Intestinal Epithelial Homeostasis by Zinc Transporters.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dig. Dis. Sci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10620-019-05561-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohashi W, Yamamine N, Imura J, Hattori Y.	4. 巻 493
2. 論文標題 SKL2001 suppresses colon cancer spheroid growth through regulation of the E-cadherin/ -Catenin complex	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 1342-1348
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2017.09.161.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Wakana Ohashi, Koji Hase, Toshiyuki Fukada
2. 発表標題 Zinc transporter SLC39A7/ZIP7 is essential for intestinal homeostatic self-renewal
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryusuke Horaguchi, Wakana Ohashi, Naoki Yamamine, Tetsuro Oda, and Yuichi Hattori
2. 発表標題 Zinc transporter SLC39A7/ZIP7 contributes to the tumorigenic potentials of human colorectal cancer cells
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大橋若奈、長谷耕二、深田俊幸
2. 発表標題 腸上皮恒常性維持における亜鉛トランスポーターZIP7の役割
3. 学会等名 第29回日本微量元素学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 洞口龍介、大橋若奈、山峯直樹、服部裕一
2. 発表標題 亜鉛トランスポーターZIP7ががん細胞性へ及ぼす影響についての検討
3. 学会等名 第18回日本亜鉛栄養治療研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wakana Ohashi, Ryusuke Horaguchi, and Yuichi Hattori
2. 発表標題 Zinc transporter ZIP7 regulates tumorigenic potential in human colorectal cancer cells
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wakana Ohashi, Koji Hase, and Toshiyuki Fukada.
2. 発表標題 Role of the zinc transporter SLC39A7/ZIP7 in intestinal homeostatic self-renewal
3. 学会等名 International Society for the ISZB meeting 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大橋若奈、山峯直樹、井村穰二、服部裕一
2. 発表標題 大腸がんにおけるWntアゴニストSKL2001の増殖制御機構の解析
3. 学会等名 第90回日本薬理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大橋若奈、長谷耕二、深田俊幸
2. 発表標題 腸上皮恒常性における亜鉛トランスポーターZIP7の役割
3. 学会等名 第12回トランスポーター研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大橋 若奈、長谷 耕二、深田 俊幸、服部 裕一
2. 発表標題 亜鉛トランスポーター ZIP7 による腸管上皮恒常性維持機構
3. 学会等名 第68回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山峯 直樹、大橋 若奈、織田 哲郎、洞口 龍介、服部 裕一
2. 発表標題 大腸がんにおける亜鉛トランスポーター ZIP7 の役割
3. 学会等名 第68回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山峯 直樹、大橋 若奈、織田 哲郎、洞口 龍介、服部 裕一
2. 発表標題 亜鉛トランスポーターZIP7の大腸がんにおける機能解析
3. 学会等名 2017年度 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大橋若奈、井村穰二	4. 発行年 2020年
2. 出版社 北陸館	5. 総ページ数 4
3. 書名 細胞	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	服部 裕一 (Hattori Yuichi) (50156361)	富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授 (13201)	
研究分担者	井村 穰二 (Imura John) (80316554)	富山大学・学術研究部医学系・教授 (13201)	