

平成 26 年 5 月 24 日現在

機関番号：35413

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22590126

研究課題名(和文) 亜鉛の殺細胞作用とDNAメチル化阻害による抗がん機構

研究課題名(英文) Anti-carcinogenic effects of zinc by induction of apoptosis and inhibition of DNA methylation

研究代表者

瀧口 益史 (Takiguchi, Masufumi)

広島国際大学・薬学部・教授

研究者番号：90330753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：亜鉛は必須微量元素である。その亜鉛による抗がん機構について研究を行った。一過性の細胞内亜鉛濃度の増加は、がん化した細胞などを死に導くアポトーシスを誘導した。亜鉛により誘導されるメタロチオネイン(MT)のがん悪性化に対する影響を調べた。その結果、MTはがん悪性化を促進する可能性が示唆された。このように、亜鉛は一方ではがん細胞を死に導き、もう一方ではがん悪性化を促進するという二面性を持つことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Zinc (Zn) is an essential metal in humans and rodents. Zn in certain instances can also be anti-carcinogenic. In this study, we clarified that Zn is an inducer of apoptosis, programmed tumor cell death. The concentration of Zn in cells determines mode of Zn-induced cell death. In addition, the involvement of metallothionein (MT), is induced by Zn, in the regulation of MMP2, has been implicated in tumor cell invasion, and cell invasion was examined. The result strongly suggests that MT promotes cell invasion by up-regulating MMP2. These results proposed that Zn can have both carcinogenic and anti-carcinogenic effects.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：亜鉛 抗がん エピジェネティクス DNAメチル化 カドミウム アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

亜鉛は生体にとって必須な金属微量元素として他の微量元素より高濃度で広く分布している。亜鉛は種々の金属酵素の構成成分として亜鉛フィンガー、亜鉛クラスター及び亜鉛ツイストの3種類の結合様式を形成しDNAと結合するなど、生体にとって非常に重要な重金属の一つである。亜鉛の抗がん効果については古くから報告されている。しかし、未だに亜鉛による明確な抗がんメカニズムについては明らかでない。その理由の一つとして、細胞内亜鉛濃度がトランスポーターなどにより、生理的条件下厳しく一定に保たれていることがあげられる。さらに、細胞や組織への亜鉛の曝露は、金属結合タンパク質メタロチオネイン(MT)を誘導し、亜鉛はMTと結合してしまう。そのため、実験的には亜鉛の作用か、MTの作用か識別できず、亜鉛自身の機能を解析することは困難であった。最近、我々は亜鉛イオノフォアであるピリチオンを使い、細胞内亜鉛濃度を増加させると、細胞内亜鉛濃度に依存してアポトーシスを誘導することを見出した(Kondoh, M. ら; *Eur J Biochem.*, 2003)。また、我々はMTの発現を欠損させた(MT-null)細胞は、亜鉛によるアポトーシス誘導が顕著に増加していることを明らかにしている。これらの結果より、ピリチオンやMT-null細胞を用いて生体内亜鉛濃度を増加させることにより、今まで解析が困難であった亜鉛自身の作用を明らかにすることが可能となった。

5-アザデオキシシトシンなどのメチル基転移酵素阻害剤ががん抑制遺伝子やがん転移抑制遺伝子などを再発現させることにより、抗がん活性を持つことが知られている。しかし、5-アザデオキシシトシンなどは毒性が非常に強く臨床的に用いることはできない。我々は最近ラット肝臓由来細胞 lysis と精製されたバクテリア DNA メチル基転位酵素(SssI)を用いた研究から、亜鉛はDNAメチル基転位酵

素活性を阻害することを明らかにした(Takiguchi M ら, *Exp. Cell Res.*, 2003)。また、その阻害機構はDNAと酵素の結合阻害によるものであった。このことは、亜鉛がメチル化阻害をターゲットとした抗がん剤になりうる可能性を示唆するものである。

最近、がん抑制遺伝子の不活性化の機構として遺伝子の異常メチル化が注目されている。がん細胞においてはそのCpGアイランドがメチル化され、様々な遺伝子(がん抑制遺伝子やがん転移抑制遺伝子など)の発現が消失している。そのため、このメチル化を阻害することによりがん抑制遺伝子などの再発現を誘導する新しい抗がん剤の開発が期待されている。

2. 研究の目的

本研究では亜鉛による抗がん機構を解明することを目的として、

(1) 亜鉛によるがん細胞に対する殺細胞作用の機構解析

(2) 亜鉛による抗がん作用機構解析の検討を行う計画であった。しかしながら、亜鉛による細胞の形質転換が成功しなかった。そこで、亜鉛と同族の元素であるカドミウムを用いて検討を加えることにした。また、亜鉛により誘導されるメタロチオネイン(MT)のがん悪性化に対する影響を調査することにより、亜鉛の抗がん作用について考察を加えようと計画した。

3. 研究の方法

(1) 亜鉛によるがん細胞に対する殺細胞作用の機構解析

野生型(MT+/+)とMT欠損(MT-/-)マウス腺維芽細胞を用いた。亜鉛及び亜鉛イオノフォア(ピリチオン)を処理し、細胞の生存率をMTT法により測定した。細胞内亜鉛濃度は原子吸光度計を用いて測定した。アポトーシスの誘導はDNAの断片化を指標に解析した。

(2) 亜鉛(カドミウム)による抗がん作用機構解析

カドミウムにより形質転換した細胞の遺伝子発現変化

金属曝露

ラット肝臓培養細胞(TRL1215)を使用した。細胞は 10% ウシ胎児血清(fetal bovine serum; FBS)を含む RPMI-1640 培地を用いて 37 °C、5% CO₂ 条件下で培養された。カドミウム(0, 1.0, 2.5, 5.0μM)を TRL1215 細胞に曝露し、1 週間毎に継代した。10 週間連続曝露した後、無カドミウム培地へ変更し、さらに 4 週間培養した。対照として無カドミウム培地で 14 週間培養し続けた細胞を用いた。

インベーションアッセイ

BD 社製 BioCoat マトリゲルインベーションチャンパーを用いて、各カドミウム濃度(1.0, 2.5, 5.0μM)で曝露した 7 週目の TRL1215 細胞と control 細胞の浸潤能を比較した。誘引物質として 10% FBS を用い、ウェル下部に 0.75ml 入れた。各濃度のカドミウム曝露細胞と control 細胞の 1 × 10⁶ cells/ml 細胞懸濁液を無血清 RPMI-1640 培地を用い調整し、0.5ml をインサート内に添加した後、37 °C、5% CO₂ 条件下で 24 時間インキュベーションし、細胞を浸潤させた。その後、細胞を固定化し、クリスタルバイオレットで染色後、浸潤した細胞数を顕微鏡を用いて計測した。

DNA マイクロアレー

14 週間培養した control 細胞と 2.5μM カドミウム曝露細胞を株式会社エコジェノミクスに委託し、DNA マイクロアレー分析による遺伝子発現定量を行った。TRL1215 細胞から、RNeasy Mini total RNA 抽出キット(キアゲン社)を使用して total RNA の抽出・精製を行った。

オリゴ DNA マイクロアレーは NCBI (National Center for Biotechnology Information)に公表されているラットの塩基

配列のうち、3,779 種選択し、それぞれから 1 種類の 35 ~ 40 塩基長オリゴ DNA プローブ配列を設計し(1 遺伝子につき 1 プローブ)、設計したプローブ配列を Combi Matrix 社製の B3-マイクロアレー作製機に入力して作製した(総プローブ数:12,000)。DNA マイクロアレーに用いる c RNA サンプルは、抽出したラット total RNA 各 1μg から、Quick Amp Labeling Kit(アジレント社)を用いて合成した。c RNA 合成時に、それぞれのサンプルに蛍光色素 Cy5(GE Healthcare 社)を標識し Cy5-c RNA サンプルとした。

2.5μM カドミウム曝露細胞群に対する DNA マイクロアレー解析では、発現変動が統計学的に有意であり(Control 群 3 サンプルに対する、カドミウム曝露群 3 サンプルの *z*-検定($p < 0.05$))、さらに control 群の発現量に対するカドミウム曝露群の発現量の比 EXP/CLT)が 2 倍以上または 1/2 以下という基準により、発現変動遺伝子を検出した。

がん悪性化に対する MT の影響

野生型(MT^{+/+})及び MT 欠損マウス線維芽細胞(MT^{-/-})を使用した。MT2 遺伝子を pcDNA3.1/Zeo(+) (Invitrogen Life Tech. Japan Ltd.)に組み込んだ MT2 遺伝子発現 plasmid (pcMT2 plasmid)を作製した。FuGene (Roche 社製)を用い、MT 欠損マウス線維芽細胞に pcMT2 plasmid を導入し、抗生物質入り培地で培養し、安定形質転換細胞(MT^{-/-}MT2)を作成した。各細胞を培養後、Trizol(Gibco 社)を用いて total RNA を抽出し、3 シャーレ分を 1 つに合わせ、RT-PCR 用サンプルとした。

4. 研究成果

1) 亜鉛によるがん細胞に対する殺細胞作用の機構解析

細胞内亜鉛濃度は生理的条件下、一定に保たれており、培養液中に亜鉛を添加したのでは一過性細胞内亜鉛の増加を再現できない。

また、亜鉛は MT と結合するため、亜鉛自身の機能解析が困難であった。そこで、今回は MT 欠損細胞を用い亜鉛イオノフォアにより一過性に細胞内亜鉛濃度を増加させ、亜鉛の細胞毒性を解析した。併せて亜鉛の細胞毒性に対する MT の影響を検討した。

Pyrithione 添加により細胞内亜鉛濃度は対照群の約 1.8 倍に増加した。亜鉛を同時に添加すると細胞内亜鉛濃度は対照群の約 7.5 倍に増加し、MT+/+細胞と MT-/-細胞間で差はなかった。Pyrithione 単独による細胞毒性は MT-/-の方が高く、MT が一過性細胞内亜鉛濃度増加に対して防御的に作用していることが考えられた。しかし、亜鉛を同時に添加すると両細胞間の感受性に差は認められなかった。細胞死の形態を解析した結果、pyrithione により DNA の断片化が観察され、アポトーシスが誘導されていた。その程度は MT-/-細胞の方が強かった。亜鉛を同時に添加すると DNA の断片化は観察されなかった。これらの結果より、亜鉛による細胞死の形態は細胞内亜鉛濃度によってアポトーシスかネクローシスのいずれを取るか決定されると考えられる。また、MT は亜鉛によるアポトーシスを抑制する可能性が示唆された。

2) 亜鉛 (カドミウム) による抗がん作用機構解析の検討

カドミウムにより形質転換した細胞の遺伝子発現変化

形態変化

7 週目、14 週目の control 細胞および 2.5 μ M カドミウム曝露細胞の細胞形態写真を示した。Control 細胞は、肝臓細胞特有のダイヤ型をしているのに対し、2.5 μ M カドミウム曝露細胞は線維芽細胞状へ形態変化していた。

細胞浸潤能

悪性形質転換した細胞の特徴として、浸潤能の増加が知られている。そこで、7 週間カドミウムで曝露した細胞の細胞浸潤能試験

を行った。1.0 μ M および 2.5 μ M カドミウム曝露細胞群は control 細胞群に比べ、有意に細胞浸潤能が増加していた。一方、5.0 μ M カドミウム曝露細胞群では浸潤能が減少傾向にあった。

DNA マイクロアレー

2.5 μ M カドミウム曝露群では、control 群と比較し、76 種類の遺伝子において有意な遺伝子発現量の変化が認められた。

カドミウムにより形質転換した細胞中のがん遺伝子・がん抑制遺伝子の遺伝子発現量の変化を示した。カドミウム曝露により 7 種類 (Myc など) のがん遺伝子に、発現量の有意な増加がみられた。しかしながら、Egfr などの 3 種類のがん遺伝子の発現量は有意に減少していた。一方、がん抑制遺伝子では、カドミウム曝露により Ext2 のみ発現量が有意に減少し、Msh2, Pten では発現量が有意に増加した。

がん細胞に特徴的な無限増殖には、細胞周期関連遺伝子の増加が関係している。そこで、カドミウム曝露による、細胞周期関連遺伝子の遺伝子発現量の変化を示した。カドミウム曝露により、細胞増殖マーカーとして知られている Ccnd1, Ccnd2, Mgmt, PcnA 遺伝子に発現量の有意な増加がみられた。しかしながら、Ccnm1 の遺伝子発現量は、カドミウム曝露により有意に減少した。

酸化ストレス曝露時などに、発現が増加することが知られている生体防御酵素である NADPH キノンオキシドリダクターゼ 1 (Nqo1), グルタチオン-S-トランスフェラーゼ p1 (Gstp1), ヘムオキシゲナーゼ 1 (Hmox1) の遺伝子発現量がカドミウム曝露により有意に増加した。これら遺伝子は Nrf2 と呼ばれる転写因子により転写調節されており、カドミウムにより形質転換した細胞では Nrf2 による遺伝子の活性化が起こっている可能性が考えられた。

がん細胞のような増殖細胞において Nrf2 は

ペントースリン酸経路やグルタミン代謝に関わる酵素の転写を活性化させ、細胞増殖を活性化させる事が知られている。しかしながら、カドミウム曝露により、これら遺伝子発現量に有意な変化はみられなかった。

がん悪性化に対する MT の影響

亜鉛により誘導される MT のがん悪性化に対する影響を調べた。その結果、pcMT2 plasmid を MT^{-/-}細胞に導入することにより、MT2 遺伝子の発現が確認された。この MT2 遺伝子発現細胞クローン(MT^{-/-}MT2) の MMP2 遺伝子発現量を調べたところ、MT^{-/-}MT2 細胞の方が MT^{-/-}細胞に比べ明らかに高かった。さらに、ゼラチンザイモグラフィの結果、MMP2 活性も MT^{-/-}MT2 の方が MT^{-/-}細胞に比べ明らかに高かった。これらのことより、MT は MMP2 遺伝子発現のための重要な要因であると考えられる。一方、細胞浸潤能は MT^{-/-}細胞の方が野生型細胞と比べ明らかに低かった。その MT^{-/-}細胞に MT2 遺伝子を導入すると細胞浸潤能は増加した。このことから、亜鉛により誘導される MT は、がん悪性化を促進する可能性が示唆された。

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 1 件)

Minoru Higashimoto, Naohiro Isoyama, Satoshi Ishibashi, Naoko Ogawa, Masufumi Takiguchi, Shinya Suzuki, Yoshinari Ohnishi, and Masao Sato
Preventive effects of metallothionein against DNA and lipid metabolic damages in dyslipidemic mice under repeated mild stress. The Journal of Medical Investigation, 査読有, 60, 240-248, 2013

〔学会発表〕(計 7 件)

西谷典子
種々の重金属が細胞内MMP2活性に与える影響
日本薬学会 134 年会
平成 26 年 3 月 28 日
熊本大学黒髪キャンパス

瀧口 益史

カドミウムの長期曝露により形質転換したラット肝(TRL1215)細胞の遺伝子発現変動

フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー

平成 25 年 9 月 13 日

九州大学医学部百年講堂

西谷典子

種々の金属が MMP2 活性に与える影響

日本薬学会 133 年会

平成 25 年 3 月 30 日

パシフィコ横浜

西谷典子

種々の金属が MMP2 活性に与える影響

第 51 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会

平成 24 年 11 月 30 日

松江

瀧口益史

メタロチオネインとマトリックスメタロプロテアーゼ 2 発現及び細胞浸潤能の関係

メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会 2011

平成 23 年 12 月 8 日

中電ホール

松田千奈

カドミウム毒性に対するラット系統差に関する研究：亜鉛トランスポーターの関与

第 50 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会

平成 23 年 11 月 12 日

サンポートホール高松

瀧口益史

マトリックスメタロプロテアーゼ 2 発現及び細胞浸潤能に対するメタロチオネイン 2 の影響

フォーラム 2011：衛生薬学・環境トキシコロジー

平成 23 年 10 月 27 日

金沢エクセルホテル東急

〔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：

〔その他〕
ホームページ等
なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧口 益史 (TAKIGUCHI, Masufumi)
広島国際大学・薬学部・教授
研究者番号：90330753

(2) 研究分担者

なし。()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし。()

研究者番号：