

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 26 日現在

機関番号：34509

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560071

研究課題名(和文) 亜鉛輸送配位子を用いた亜鉛欠乏予防に関する基礎研究

研究課題名(英文) Fundamental research on the prevention of zinc deficiency using zinc transport ligands

研究代表者

河合 裕一(kawai, yuichi)

神戸学院大学・薬学部・教授

研究者番号：00102921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：亜鉛の1日当たりの摂取量の目安は、乳児で約5mg、小児や成人では約15mgである。亜鉛は小腸で吸収され、その吸収量は腸上皮細胞に発現する亜鉛トランスポーターにより調節されている。亜鉛欠乏症では、これら機能に問題を抱えており、亜鉛欠乏症の患者には1日摂取量の6～10倍の亜鉛が処方される。本研究では、効率的に亜鉛を輸送する配位子を同定することで、亜鉛欠乏を治療・予防できると考えた。本申請課題では、亜鉛単独と比べ、腸管上皮細胞への取込み効率の増加する3種類の配位子の同定に成功し、また、これら配位子を含む亜鉛錯体は、亜鉛欠乏と関連する肥満や骨疾患への効果が動物実験により確認された。

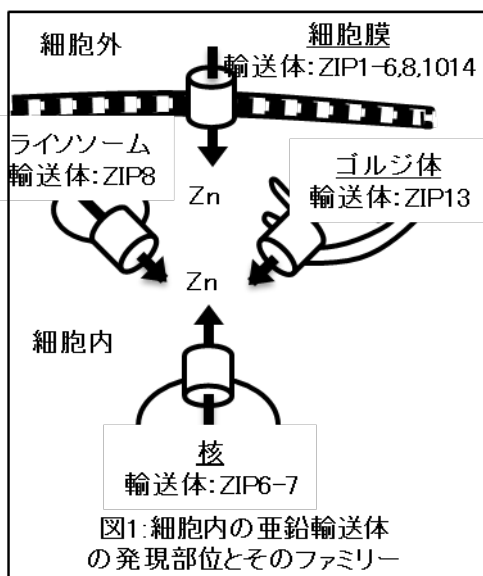
研究成果の概要(英文)：The recommended consumption of zinc per day is approximately 5 mg for infants and 15 mg for children and adults. Zinc is absorbed from the intestine, and the amount of absorption is regulated by intestinal epithelial cells that express zinc transporters. Reduced function of zinc transporters is one of the reasons to cause the symptoms of zinc deficiency, and patients with a zinc deficiency are prescribed zinc in an amount that is approximately 6-10 times that of the recommended consumption per day. We thought that identification of ligands that can efficiently transport zinc could lead to treatments that may prevent and reduce symptoms of zinc deficiency. In this study, we identified three types of ligands that increased the uptake efficiency of intestinal epithelial cells, and a zinc complex that included these ligands was confirmed to be effective in treating obesity and osteoporosis associated with zinc deficiency in animal experiments.

研究分野：分子生物学

キーワード：亜鉛 腸管上皮 トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

必須微量元素元素の亜鉛は、ヘム蛋白質をはじめとする様々な酸化・還元酵素蛋白質の活性中心として、またジンクフィンガー蛋白質などの高次構造形成に必須である。細胞内の亜鉛濃度は、内外への取込み・排出を制御する亜鉛トランスポーターとメタロチオネインによる貯蔵を介して厳密に制御されており、亜鉛トランスポーターには細胞内局在の異なる複数のファミリーが知られている(図1)。亜鉛は細胞内で合成できないため、食事を介し摂取するが、偏食や亜鉛トランスポーターの機能低下により亜鉛欠乏症を発症する。生活習慣の改善により、偏食による亜鉛不足は補えるが、老化や遺伝子異常の場合、食生活での改善は難しく、亜鉛の体内への取込みを容易にする技術開発が求められている。



2. 研究の目的

亜鉛は、生体機能調節に重要な必須微量元素である。そのため、亜鉛不足はこれら機能に重篤な影響を与え、亜鉛欠乏症・亜鉛代謝異常などを発症することもある。亜鉛不足の原因は、食生活の乱れが主な原因であるが、老化などによる亜鉛トランスポーターの機能低下との関連が示唆されている。亜鉛トランスポーター欠損マウスを用いた解析では、発生や免疫機能に異常を示すことが報告されており、生体内での亜鉛ホメオスタシスにおいて亜鉛の摂取やトランスポーターの機能維持が重要と考えられる。

そこで本申請研究では、亜鉛トランスポーター非依存的に、亜鉛の輸送・取込みを可能にする金属輸送配位子の同定を目的に、金属錯体の安全性と機能性について下記3項目を中心に研究を進めた。

- (1)「安全な亜鉛錯体の創製」
- (2)「小腸上皮細胞の亜鉛トランスポーターノックダウン細胞株の樹立」
- (3)「疾患への効果」

3. 研究の方法

(1)「細胞及び動物実験による亜鉛錯体の安全性の評価」:本研究では、安全な亜鉛錯体を同定するため、まずアミドブラック染色法による細胞増殖への影響を解析した。アミドブラック染色は、アミドブラック 10B 色素が塩基性アミノ酸と結合し、青く染色されることを利用したタンパク質の染色法である。塩基性アミノ酸のモル数とアミドブラックの結合量は正の相関を示すことから、本方法により細胞増殖率を評価することができる。そこで、腸管上皮細胞 Caco-2 及び間葉系細胞 ST2 の細胞増殖への影響を評価した。さらに本研究では、マウスリンフォーマ TK 試験による遺伝毒性を評価した。本試験法は、マウスリンパ腫細胞 L5178Y(TK+/-3.7.2C)株のチミジンキナーゼ遺伝子座の変異を指標とした遺伝毒性誘発性の有無を評価することができる。動物実験による安全性の評価では、生存率および血液生化学検査による各種臓器への障害の程度を評価した。

(2)「亜鉛トランスポーターZIP4 または ZIP5 のノックダウン細胞の樹立」:本研究では、腸管上皮細胞に発現している亜鉛トランスポーターZIP4またはZIP5をノックダウンするため、RNAi 法によりノックダウン可能なベクターを構築した。また本解析では、ヘアピン型の RNA を発現するノックダウンベクターを構築した。ZIP4 および ZIP5 の標的配列は、TAKARA BIO INC の「Human shRNA Library」を用いて設計した。

(3)「骨粗しょう症モデルを用いた解析」:本研究では、骨形成を担う骨芽細胞の ALP 活性および骨粗しょう症モデルマウスを用いた亜鉛錯体の有効性を評価した。骨粗しょう症モデルマウスは、卵巣摘出及び低 Ca 食により作出し、大腿骨の骨密度の変化を X 線撮影像や骨重量を指標に評価した。

4. 研究成果

(1)本研究では、2~3つのベンゼン環に対し1つの亜鉛を含む錯体を作成した。ベンゼン環は、日本国内で使用されている医薬品の約3割に含まれ、リガンド-受容体複合体形成に重要な疎水性相互作用の要となる構造である。アスピリンやロキソニンは、ベンゼン環を含む医薬品の代表例であり、それぞれ1つのベンゼン環を持つ。本研究グループでは、数十種類の亜鉛錯体を創製し、0.1-10 μM の濃度範囲について細胞増殖試験と遺伝毒性試験により安全性を評価し3種の亜鉛錯体を決定した。次に、これら3種の亜鉛錯体は、動物実験で無毒性量を決定するため、DDYマウスの腹腔へ2日に1回、合計3回投与し、最終投与から2日後の生存率及び臓器障害の程度を評価した。その結果、3種の亜鉛錯体は、個体の重量(Kg)当たり3.8 mg Znの投

与濃度であれば、生存率の低下や臓器毒性を示さないことが明らかとなった。

(2) ZIP4 と ZIP5 をノックダウンするための shRNA 配列を決定し、ノックダウンベクターへの組み込みが完了した。また、トランジェントな発現系でのノックダウン効果を RNA 発現により評価し、それぞれ 6~8 割程度の発現量の低下が確認された。一方、ZIP4 および ZIP5 の安定的なノックダウン細胞株の樹立が遅れており、研究期間終了後もこの作成を進めている。

(3) 亜鉛には骨形成を増強する作用があることが報告されている。そこで、亜鉛錯体の有効性を評価するため、骨粗しょう症モデルマウスを用い評価した。骨粗鬆症モデルマウスは、ddY 系の 12 週齢・雌性マウスから卵巣を摘出し、低カルシウム餌での飼育により作製した。亜鉛錯体は、個体の重量 (Kg) 当たり 3.8 mg Zn を週に 3 回 8 週間、腹腔内へ投与し、最終投与から 24 時間後に、大腿骨の骨密度を X 線撮影及び骨重量測定により評価した。その結果、海綿骨骨梁の骨密度は、偽手術群と比較し骨粗しょう症モデルマウスは低下傾向にあるものの、亜鉛錯体投与群では同程度であった (図 2)。



図2:骨粗しょう症モデルマウスへの亜鉛錯体の効果

さらに、大腿骨の重量は、偽手術群と比較し骨粗しょう症モデルマウスは低下したが、亜鉛錯体投与群ではむしろ増加していた。骨を作る骨芽細胞は、海綿骨骨梁付近に存在していることから、亜鉛錯体は、骨芽細胞を活性化することで骨粗しょう症の改善傾向が観察されたと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

小野寺 章、河合 裕一、その他 8 名.
骨芽細胞活性化と骨粗鬆症モデルマウスへの Zn(bpy)Cl₂ の効果. 第 24 回 金属の関与する生体反応シンポジウム(京都) 2014 年 6 月

小野寺 章、河合 裕一、その他 3 名.
Zn(bpy)Cl₂ activates osteoblast function and promotes bone formation. 第 85 回 日本衛生学会学術総会(和歌山) 2015 年 3 月

〔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
<http://kobegakuin-yakugaku.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河合 裕一 (KAWAI Yuichi)
神戸学院大学・薬学部・教授
研究者番号: 00102921

(2) 研究分担者

小野寺 章 (ONODERA Akira)

神戸学院大学・薬学部・助教
研究者番号： 40598380

(3)研究協力者

根津 菜摘 (NEZU Natsumi)

石橋 孝文 (IHIBASHI Takafumi)

下別府 里奈 (SHIMOBEPU Rina)