

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06711

研究課題名(和文) 心臓の機能と疾患における亜鉛シグナルの役割解明：新しい治療戦略の開発を目指して

研究課題名(英文) Implication of zinc transporter ZIP13 on cardiac functions

研究代表者

原 貴史 (Hara, Takafumi)

徳島文理大学・薬学部・講師

研究者番号：90546722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：亜鉛トランスポーターは、生体内の亜鉛恒常性を制御する膜輸送体タンパク質であり、これまでに免疫応答や発生への関与など様々な役割が知られている。しかし現在までに亜鉛シグナルと循環器についての報告はほとんどない。そこで本申請課題は、心循環器の恒常性維持における亜鉛シグナルの役割と病態の関与について検討を行なった。本申請課題では、主に以下の知見を得るに至った。1) Zip13-K0マウス由来初代培養心筋細胞を用いた解析においては、不規則な拍動が認められた。2) Zip13-K0マウスの心機能解析においては、心機能の顕著な障害と特徴的な遺伝子発現の変動が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請課題で着目したZIP13については、ヒトにおける機能欠損型遺伝子変異が報告されており、脊椎手掌異形成型エーラスダンロス症候群(EDS-SPD3)の原因遺伝子として知られている。EDS-SPD3患者においては、成長遅延、皮膚の脆弱化、筋緊張低下などの症状が報告されているが、心循環器との関連についてはこれまでに報告がない。本申請課題では、ZIP13が心循環器の新たな制御分子であるとの知見に至った。本結果は、心循環器の制御メカニズムとしてZIP13が重要な役割を果たすことを示しており、ZIP13が新たな心疾患の治療標的となる可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Zinc transporter is a membrane transporter protein that controls zinc homeostasis in the living body, and has been known to play various roles such as immune response and involvement in development. However, there have been few reports of zinc signals and cardiovascular system so far. Therefore, in this research, we investigated the role of zinc signal in maintaining homeostasis of the cardiovascular system and the involvement of pathological conditions. In this project, we were able to obtain the noble findings as follows; 1) Irregular pulsations and characteristic changes in gene expression were observed in primary cultured cardiomyocytes derived from Zip13-K0 mice. 2) Cardiac function analysis of Zip13-K0 mice revealed marked impairment of cardiac function and characteristic changes in gene expression.

研究分野：分子生物学

キーワード：亜鉛シグナル 亜鉛 微量元素 心循環器

1. 研究開始当初の背景

亜鉛は生命活動に必須の微量元素である。亜鉛トランスポーターによって輸送される亜鉛は亜鉛シグナルとして細胞機能を調節し、生体の恒常生維持に寄与している。近年、老化に伴い生体の亜鉛量は減少することが判明し、加齢性疾患と亜鉛や亜鉛シグナルとの関わりが、生理学的な重要性や、治療標的としての有用性の観点からも注目されている。一方、心血管系は、生命の維持を担う最も重要なシステムであり、機能の維持が健康寿命にも大きく関連する。超高齢社会において、加齢に伴う循環器の機能障害と、その病態の多様化が問題となっている。加齢と共に血清亜鉛値は低下する傾向にあり、様々な病態への関連が知られていること、また平成 29 年に、低亜鉛血症に対する国内で初めての治療薬(亜鉛製剤: ノベルジン)の保険適用が認可されたことから、健康の維持と多様な疾患における亜鉛の役割への関心が、一般市民の間でも高まっている状況である。

一方、心血管系は、生命の維持を担う最も重要なシステムであり、機能の維持が健康寿命にも大きく関連する。超高齢化社会を迎えた日本では、加齢と共に心血管系疾患の発症も増加していることから、治療と共に予防の観点においても、新たな分子機序の解明に基づく病態の理解が期待されている。しかし研究開始当初において、心血管系関連疾患と亜鉛シグナルとの関連についてほとんど報告はなく、新たな疾患メカニズムの解明に向けた重要な命題であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究課題は、心血管系の機能と心血管系疾患における亜鉛シグナルの役割と分子機序の解明、および創薬研究の遂行を目的とする。申請者らの研究グループではこれまでに、骨格筋に発現する亜鉛トランスポーター *ZIP13* の機能欠損型遺伝子の変異が、筋緊張低下を呈する脊椎手掌異形成型エーラス・ダンロス症候群 (EDS-SPD3)の原因となることを報告している。また興味深いことに、EDS-SPD3 患者において、脳梗塞や脳溢血の可能性が示唆されていることから、*ZIP13* によって制御される亜鉛シグナルは、心循環器系の機能維持にも関与している可能性が考えられる。しかし、心循環器系関連疾患における亜鉛シグナルの役割はこれまでほとんど報告がない。そこで本申請課題では、独自に開発した遺伝子改変マウスを用いて心血管系における亜鉛シグナルの分子機序を解明し、疾患治療への応用を目指すものである。本研究課題により、心循環器系疾患メカニズムを亜鉛シグナルから解明することは、心循環器系の恒常性制御の理解に新たな知見をもたらす生物学的に重要な課題である。また、循環器系疾患の新たな病態メカニズムの解明を通じて、亜鉛シグナルを基軸とする創薬展開を目指す新しい治療戦略の開発に貢献する課題であると考えられる。

3. 研究の方法

1) 心筋細胞における亜鉛トランスポーター遺伝子の発現様式と亜鉛依存性について

マウス胎児初代培養心筋細胞を調製し、亜鉛トランスポーターの遺伝子発現について、定量 PCR により検討した。また、マウス胎児の各発生段階および生体マウスの心筋から RNA を調製し、亜鉛トランスポーター遺伝子の発現様式を定量 PCR により検討した。さらに、マウス胎児初代培養心筋細胞を調製し、培養過程における亜鉛の影響を、培地中への硫酸亜鉛の添加および亜鉛のキレート作用を有する TPEN の添加による、細胞増殖や細胞形態の変化を評価した。

2) ストレス負荷状態における初代培養心筋細胞の形態観察および亜鉛トランスポーター遺伝子の発現変動について

マウス胎児初代培養心筋細胞に対して、低酸素下における培養もしくは心毒性が知られているドキシソルピシンによる刺激を行い、細胞の形態変化および亜鉛トランスポーターの発現変動について評価した。ドキシソルピシンを用いた検討については、マウス腹腔内にドキシソルピシンを投与することで心毒性モデルマウスを作製し、マウス心臓における亜鉛トランスポーターの発現について評価した。

3) *Zip13*-KO マウスにおける心筋細胞の性状と遺伝子発現解析について

Zip13 の心機能における役割を検討するために、*Zip13*-knockout (KO) マウスの胎児初代培養心筋細胞を用いて、拍動と RNA-seq 解析により網羅的な遺伝子発現の解析を実施し、野生型 (WT) マウスの遺伝子発現と比較した。

4) *Zip13*-KO マウスの心機能解析について

WT および *Zip13*-KO マウスについて、テレメトリー法により経時的に心機能を計測し

た。次に、ドキシソルピシンを単回腹腔内投与し、7 日後の心機能を同様に計測した。その後、心臓を摘出し、炎症性サイトカインや線維化に関連する遺伝子の発現量を qPCR 法で解析した。

4. 研究成果

1) 心筋細胞における亜鉛トランスポーター遺伝子の発現様式と亜鉛依存性について

マウス胎児初代培養心筋細胞における亜鉛トランスポーターの発現を評価したところ、*Zip7* 遺伝子と *Zip13* 遺伝子の発現は高値を示し、一方で *Zip10* 遺伝子と *Zip14* 遺伝子の発現は低値を示した。次に、マウス胎児の各発生段階および生体マウスの心筋における、これらの亜鉛トランスポーター遺伝子の発現を評価したところ、*Zip7* 遺伝子と *Zip13* 遺伝子は発生段階の進行に伴い発現の上昇が認められた。一方で *Zip10* 遺伝子と *Zip14* 遺伝子の発現には大きな変動は認められなかった。従って、心臓の発生段階において特定の亜鉛トランスポーターが重要な役割を有している可能性が示唆された。

次に、初代培養心筋細胞における亜鉛の役割を評価するために、培養液中に亜鉛を添加し、細胞形態を評価したところ、亜鉛添加により細胞増殖に促進傾向が認められ、拍動する心筋細胞の増加が認められた。一方、亜鉛のキレート作用を有する TPEN の添加により、細胞形態は経時的に萎縮する様子が認められ、細胞障害が生じていることが確認された。従って、これらの結果から、亜鉛が心筋細胞の増殖や分化を制御し、心機能の維持に重要な役割を有していることが示唆された。

2) ストレス負荷状態における初代培養心筋細胞における亜鉛トランスポーター遺伝子の発現変動について

低酸素下培養による酸化ストレスの負荷によって、初代培養心筋細胞における *Zip7* 遺伝子と *Zip13* 遺伝子の発現が有意に上昇した。ドキシソルピシン負荷による心毒性モデルマウスを用いた実験では、マウス心臓と初代培養心筋細胞において、心筋の繊維化マーカーや複数の炎症性サイトカインの有意な発現上昇が認められたことから、ドキシソルピシン負荷によって、心負荷モデルが確立できているものと考えられた。亜鉛トランスポーターの発現については、特に *Zip13* 遺伝子の顕著な発現低下が認められた。従って、心筋に対するストレス負荷によって、複数の亜鉛トランスポーターの発現が顕著に変動すること、また中でも *Zip13* 遺伝子の発現変動が心筋の障害に関与している可能性が示唆された。

3) *Zip13*-K0 マウスにおける心筋細胞の性状と遺伝子発現解析について

Zip13-K0 マウスから得られた初代培養心筋細胞は、野生型マウスと比較して細胞の形態や拍動に違いがあることが確認された。また、*Zip13*-K0 マウス心臓由来の初代培養心筋細胞は、一定期間の培養後に呈する心筋細胞の拍動現象に関して、野生型と比較して顕著な不規則性を示した。*Zip13*-K0 マウス由来初代培養心筋細胞の RNA-seq の結果より、野生型マウスの初代培養心筋細胞と比較して、分化、細胞接着、炎症などに関連する遺伝子群の発現に変動が認められた。*Zip13*-K0 マウス由来初代培養心筋の培養時に確認された形態や拍動の違いが、これらの因子による可能性が示唆された。

4) *Zip13*-K0 マウスの心機能解析について

定常状態において、*Zip13*-K0 マウスでは WT マウスには検出されない QT や JT 間隔延長など不整脈に起因する特徴的な心電図像を示した。この現象は、オスに比べてメスマウスで顕著であった。ドキシソルピシン投与による心毒性モデルにおいては、ZIP13 の発現の有無に関わらず、不整脈に起因する心機能の障害を示した。心臓組織を用いた遺伝子発現解析においては、*Zip13*-K0 マウス特異的に、接着因子に関連する遺伝子や、ZIP13 が局在するゴルジ体の機能に関連する遺伝子について、発現の変動が認められた。

以上の検討結果より、本申請課題において ZIP13 が心機能の維持に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。特に、ZIP13 の遺伝子欠損により心機能障害が認められたことは、ZIP13 や ZIP13 の亜鉛シグナルによって制御される分子が、疾患メカニズムと密接に関連することを示唆しているものである。今後は、ZIP13 のより詳細な分子メカニズムについて、ZIP13 が局在するゴルジ体機能に着目し検討を行うことで、ZIP13 の心疾患治療の新たな標的としての有用性を検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原 貴史
2. 発表標題 亜鉛シグナルの生理機能解析と創薬標的としての有用性
3. 学会等名 第 143 回 日本薬学会中国四国支部例会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原貴史
2. 発表標題 心機能と亜鉛トランスポーター
3. 学会等名 第16回日本亜鉛栄養治療研究会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原貴史
2. 発表標題 心臓における亜鉛恒常性の意義と機能解析
3. 学会等名 第13回トランスポーター研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------