

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03409

研究課題名(和文) 亜鉛シグナリングの機序解明と、その制御に基づく創薬および再生医療研究

研究課題名(英文) Investigation of zinc signaling in molecular basis for drug discovery and regenerative medicine

研究代表者

深田 俊幸 (Fukada, Toshiyuki)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：70373363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：亜鉛トランスポーターと亜鉛シグナルに関する本研究で次の成果を得た。1: Zip13-KOマウス、Zip13-EGFP-KIマウス、EDSSPD3患者由来iPS細胞を用いて検討した結果、ZIP13が筋サテライト細胞に発現し、筋形成に関与する可能性が示された。2: ZIP10発現細胞を可視化できるZip10-EGFP-KIマウスを用いて検討した結果、毛包外根鞘の幹細胞分画に存在するZIP10発現細胞は、毛包の形成過程に他の領域へ移動することが示唆された。3: ZIP14を阻害する化合物のスクリーニングを実施した結果、ZIP14の輸送能を特異的に阻害する化合物を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

亜鉛シグナルの解析に有用な遺伝子改変マウスを作成した。Zip13-EGFP-KIマウスとZip10-EGFP-KIマウスは、各亜鉛トランスポーターを発現する細胞の役割解明に貢献すると思われる。また、ZIP14を特異的に阻害する化合物を同定した。ZIP14を介する過剰な金属の取り込みは、筋喪失や鉄過剰症をもたらすため、ZIP14は創薬標的であると考えられている。我々が発見した化合物は、ZIP14を研究するツールとして有用であり、ZIP14関連疾患に対する治療薬の開発に貢献する可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the physiological roles of ZIP10 and ZIP13 by generating and analyzing genetically modified mice including deficient mice, EGFP-knock in mice, and by using patient-derived iPS cells. We found that ZIP13 marks muscle satellite cells, and that ZIP10 is expressed in hair follicle stem cells which might move to bulge area during hair follicle development. We also screened the small compounds that inhibit the transporting activity of ZIP14.

研究分野：亜鉛生命医科学

キーワード：亜鉛トランスポーター 亜鉛シグナル 骨格筋 皮膚 創薬 再生医療 阻害剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究は、骨格筋と皮膚組織における亜鉛シグナリングの意義と分子機序を解明し、亜鉛シグナリングの制御に基づく創薬と再生医療を研究することを目指して開始した。亜鉛は全ての生物種の生命維持に不可欠であり、その恒常性は亜鉛トランスポーターが制御している。申請者はこれまでに、亜鉛トランスポーターが輸送する亜鉛イオンがシグナル因子として作用し、この亜鉛シグナリングがヒトの健康と病気に関与することを明らかにした。一方、骨格筋と皮膚組織における亜鉛シグナリングの役割とその分子機序は、まだ十分に解明されていなかった。

2. 研究の目的

骨格筋は、個体の恒常性維持に関わるホルモンの産生と受容の器官としても機能する。皮膚組織は、バリアとして機能するだけでなく、免疫応答にも重要に関与している。さらに、骨格筋と皮膚組織は、他臓器との連関によって個体全体の生命活動に貢献している。体内の亜鉛量は加齢に伴って減少するため、その影響による骨格筋と皮膚組織の機能低下は、超高齢化を迎えた日本では、特に留意すべき事象として捉えられている。

本研究は、骨格筋と皮膚組織における亜鉛シグナリングの意義を解明して、その制御に基づく治療方法を開発することを目的に本研究を計画した。その成果は、健康と病気の機序に新たな理解をもたらして、今までにない視点による創薬と再生医療の究明に貢献するものと考えた。本研究は、骨格筋と皮膚組織の形成と機能における亜鉛シグナリングの役割と、これら組織に関連する病気に対して、亜鉛シグナリングの制御に基づく創薬と再生医療を研究する目的で、以下に示す実験を実施した。

3. 研究の方法

(1)筋形成における ZIP13 の役割に関する研究

当グループは、先行研究で亜鉛トランスポーターZIP13 の失調が筋力の低下をもたらすことを示したが(Fukada *et al*, *PLoS One*, 2008)、骨格筋の形成と再生における ZIP13 の役割は十分に解明されていない。本研究では、骨格筋の恒常性維持に重要な筋サテライト細胞における ZIP13 の役割を解明するために、*Zip13* 遺伝子欠損(-KO)マウスと、ZIP13 発現細胞をモニターできる *Zip13-EGFP* ノックイン(-KI)マウスを用いて以下の検討を行った。

1.*Zip13*-KO マウスの骨格筋の形態と筋分化調節因子の発現

Zip13-KO マウスおよび対照マウス(WT)の後肢脛脛側より骨格筋切片を作製し、HE 染色を適応した骨格筋組織の解剖学的観察を行うとともに、骨格筋の基底膜に発現する Laminin2 による免疫染色を適用して、筋断面積を測定した。さらに、組織切片に免疫染色を適用して、遅筋タンパク質である MYH7 の発現量を解析した。また、*Zip13*-KO マウスの骨格筋の特徴を精査するために、野生型(WT)と *Zip13*-KO マウスの骨格筋から調製した cDNA を用いて、筋分化調節因子 *Pax3*, *Pax7*, *MyoD* 遺伝子の発現を定量 PCR 法で解析した。

2.*Zip13-EGFP*-KI マウスの筋サテライト細胞における GFP の検出

Zip13-EGFP-KI マウスの骨格筋から調整した筋サテライト細胞分画に、GFP 陽性細胞(ZIP13 発現細胞)が存在するか、免疫染色と FACS によって解析した。

3.患者由来 iPS 細胞を用いた検討

機能喪失型 ZIP13 に起因する脊椎手掌型エーラスダンロス症候群患者に由来する iPS 細胞を作成し、骨格筋へ分化誘導してその性状を解析した。

(2)筋喪失における ZIP14 の役割に関する研究

亜鉛トランスポーターZIP14 は、転移がん患者の骨格筋に高発現し、がん悪液質に伴う筋萎縮を促進することから、ZIP14 が関連疾患の創薬標的として注目されている(Wan *et al*, *Nature Medicine*, 2018)。一方、ZIP14 の亜鉛シグナルの細胞機能に対する意義や、その病態への関与は十分に解明されていない。ZIP14 依存的な亜鉛シグナルの意義の解明のために以下の項目を解析し、がん悪液質の治療戦略の構築を試みた。

1.ZIP14 依存的な亜鉛シグナルの意義

Tetracycline(Tet)誘導性ヒト ZIP14 細胞株に Tet および亜鉛を添加して培養した後、ZIP14 を介する亜鉛シグナルに依存した過酸化酸素種(reactive oxygen species:ROS)の産生を評価した。

2.*Zip14-EGFP*-ノックイン(KI)マウスの解析

Zip14 遺伝子に *EGFP* 遺伝子を挿入した *Zip14-EGFP*-KI マウスを作製し、ZIP14 が高発現することが知られている肝臓における GFP の発現を評価した。さらに、本マウスに LPS を投与して全身性の炎症(敗血症)を誘導し、肝臓と骨格筋(腓腹筋、足底筋、ヒラメ筋)における *Zip14* および *GFP*、筋萎縮マーカーの発現変動を精査した。

3.ZIP14 の金属輸送能を阻害する化合物の探索

ZIP14 の亜鉛輸送能に影響を与える化合物を単離するために、Tet 誘導性ヒト ZIP14 細胞株を用いて、約 3 万の化合物ライブラリーをスクリーニングした。ZIP14 に対する特異性は、ZIP14 と最も相似性が高い ZIP8 を発現する細胞株を用いて検討した。

(3)皮膚における ZIP10 の役割に関する研究

我々はこれまでに、亜鉛トランスポーターZIP10 が B リンパ球の分化成熟および免疫応答に関与すること(Miyai et al, *PNAS* 2014, Hojyo et al, *PNAS* 2014)、表皮と毛包の形成に必要であることを報告した(Bin et al, *PNAS*, 2017)。しかしながら、ZIP10 の発現制御の機序や、皮膚組織の形成過程における ZIP10 発現細胞の運命系譜は、まだ十分に解明されていない。そこで、Zip10 遺伝子プロモーターの下流に EGFP 遺伝子を導入した Zip10-EGFP-IRES-CreERT2 ノックイン (Zip10-EGFP-KI) マウスを作製し、ZIP10/GFP 発現細胞の遺伝子発現と細胞系譜を以下の方法で解析した。

1.ZIP10/GFP 発現細胞の特徴解析

毛周期に依存した ZIP10/GFP 発現細胞の動態変化について、Zip10-EGFP-KI マウス皮膚由来の細胞懸濁液を用いて FACS で解析した。さらに、ZIP10/GFP 発現細胞を単離し、遺伝子発現を定量 PCR 法で確認した。

2.ZIP10/GFP 発現細胞の系譜解析

ZIP10/GFP 発現細胞の系譜を解析するために、Rosa26-tdTomato レポーターマウスと Zip10-EGFP-KI マウスを交配させて、Zip10-EGFP/tdTomato-KI マウスを作製した。本マウスに Tamoxifen を投与して、tdTomato 蛍光タンパク質を発現する細胞 (ZIP10/GFP 発現細胞の子孫細胞) の特徴を FACS で解析するとともに、同マウス皮膚の凍結切片を作製してそれらの局在を蛍光顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1)筋形成における ZIP13 の役割に関する研究

Zip13-KO マウスの骨格筋線維に縮小像と Pax3, Pax7, MyoD の発現減少を認め、速筋である足底筋においては MYH7 陽性筋線維の割合が上昇していた。すなわち、Zip13-KO マウスの骨格筋では、Zip13 の失調によって筋分化が障害されている可能性が示唆された。一方、Zip13-EGFP-KI マウスの筋サテライト細胞の分画に、GFP 陽性細胞 (ZIP13 発現細胞) の存在を確認し、筋サテライト細胞に ZIP13 が発現すること、ZIP13 が筋サテライト細胞の性状を規定することで骨格筋の恒常性維持に関わる可能性が示唆された。さらに、脊椎手掌型エーラスダンロス症候群患者に由来する iPS 細胞を骨格筋へ分化誘導し、その特徴を解析した結果、患者由来 iPS 細胞は筋分化に障害を有することが判明した (論文リバイス中)。これらの結果から、ZIP13 が骨格筋の分化と形成に重要であることが示唆された。

(2)筋喪失における ZIP14 の役割に関する研究

Tet 誘導性ヒト ZIP14 細胞株を用いて検討した結果、ZIP14 依存的な亜鉛の導入により、ROS の産生亢進と、細胞増殖の顕著な抑制を確認した。また、Zip14-EGFP-KI マウスを用いて LPS 投与による *in vivo* 炎症誘導性筋萎縮モデル実験を行なった結果、肝臓と骨格筋に Zip14 および GFP 遺伝子の発現上昇を確認した。加えて、遅筋であるヒラメ筋よりも速筋である腓腹筋および足底筋において Zip14 および筋萎縮マーカーの発現が高いことを確認した。すなわち、ZIP14 依存的な亜鉛シグナルによる細胞障害には ROS が関与すること、炎症時における ZIP14 の発現変動が筋萎縮に関与することが示唆された。さらに我々は、ZIP14 の輸送能を特異的に阻害する化合物を同定した (特許出願中)。

(3)皮膚における ZIP10 の役割に関する研究

Zip10-EGFP-KI マウスを用いて、毛周期における ZIP10/GFP 発現細胞の変化を観察した結果、ZIP10/GFP 発現細胞集団の割合は、毛周期に伴って経時的に減少した。また、Tamoxifen を投与した Zip10-EGFP/tdTomato-KI マウス皮膚由来の細胞懸濁液において、tdTomato 陽性の細胞集団を確認した。さらに、ZIP10/GFP 発現細胞が主に毛包に局在するのに対して、tdTomato 発現細胞は ZIP10/GFP 発現細胞とは異所的な局在を示すことを確認した。これらの結果は、皮膚組織の形成時において、ZIP10/GFP 発現細胞には時空間的变化が生じていることを示唆しており、当該マウスは ZIP10/GFP 発現細胞の役割と運命決定の機序解明に有用であると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hara T, Yoshigai E, Ohashi T, Fukada T.	4. 巻 148
2. 論文標題 Zinc transporters as potential therapeutic targets: An updated review.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci.	6. 最初と最後の頁 221-228
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2021.11.007	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 Mi-Gi Lee, Sehyun Chae, SKimiko Nakajima, Miho Ibi, Hozumi Sano, Takafumi Hara, Hantae Jo, Teruhisa Takagishi, Byungsun Cha, Jin-myung Baek, Emi Yoshigai, Takuto Ohashi, Tarou Irie, Shigetoshi Sano, Jong-Soo Lee, Fukada T, Bum-Ho Bin.	4. 巻 98
2. 論文標題 Implication of the zinc-epigenetic axis in epidermal homeostasis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 203-206
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2020.04.010.	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 該当する
1. 著者名 Prajapati Milankumar, Pettiglio Michael A., Conboy Heather L., Mercadante Courtney J., Hojyo Shintaro, Fukada Toshiyuki, Bartnikas Thomas B.	4. 巻 34
2. 論文標題 Characterization of in vitro models of SLC30A10 deficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioMetals	6. 最初と最後の頁 573 ~ 588
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10534-021-00296-y	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 該当する
1. 著者名 Prajapati Milankumar, Conboy Heather L., Hojyo Shintaro, Fukada Toshiyuki, Budnik Bogdan, Bartnikas Thomas B.	4. 巻 297
2. 論文標題 Biliary excretion of excess iron in mice requires hepatocyte iron import by Slc39a14	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100835 ~ 100835
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.100835	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 該当する

1. 著者名 Hara Takafumi, Yamada Ikuko, Ohashi Takuto, Tamura Masaru, Hijikata Atsushi, Watanabe Takashi, Gao Minghao, Ito Kana, Kawamata Saeko, Azuma Shiori, Yoshigai Emi, Sumiyoshi Yukiko, Yasuhiro Natsumi, Ohara Osamu, Santos Heloisa G. dos, Fukada Toshiyuki	4. 巻 17
2. 論文標題 Role of Sc139a13/ZIP13 in cardiovascular homeostasis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0276452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0276452	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 該当する

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 14件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 深田俊幸
2. 発表標題 ヒト疾患とモデルマウスから究明する 亜鉛の重要性
3. 学会等名 第21回日本抗加齢医学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深田俊幸
2. 発表標題 ヒト疾患とモデル動物から究明する亜鉛の重要性：亜鉛がなぜ生命維持に必要なのか？
3. 学会等名 第45回日本女性栄養代謝学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深田俊幸
2. 発表標題 なぜ亜鉛は健康に必要なのか？ ヒト疾患とモデルマウスから究明する亜鉛の重要性
3. 学会等名 第61回 日本臨床化学会年次学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深田俊幸
2. 発表標題 「亜鉛の基礎と臨床」 なぜ亜鉛は健康に必要なのか？
3. 学会等名 第61回中国・四国精神神経学会 第44回中国・四国精神保健学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深田俊幸
2. 発表標題 基礎と臨床の融合研究が紐解く亜鉛の意義と重要性
3. 学会等名 第94回日本胃癌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深田俊幸
2. 発表標題 ヒト疾患とモデルマウスから究明する亜鉛恒常性システムの重要性：皮膚器官系の新しい治療戦略の構築を目指して
3. 学会等名 第50回日本皮膚免疫アレルギー学会総会学術大会モーニングセミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 深田俊幸
2. 発表標題 Zinc transporters in skeletal muscle physiology and disease
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会ワークショップ「Advances of zinc signal study by integration of zinc biology and chemistry」
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toshiyuki Fukada
2. 発表標題 Zinc transporters and signaling as potential therapeutic targets
3. 学会等名 The 12th International NO Conference & The 22nd NOSJ (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshiyuki Fukada
2. 発表標題 Zinc transporter ZIP10 in immunity and skin barrier function
3. 学会等名 ICTEM conference 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshiyuki Fukada
2. 発表標題 Revisiting the old and learning the new of zinc in health and disease
3. 学会等名 The 22nd International Congress of Nutrition (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshiyuki Fukada
2. 発表標題 New tools for investigation of ZIP family members in vivo
3. 学会等名 ISZB-Asia/Oceania: Zinc Biology Asia/Oceania Regional Zoom Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深田俊幸
2. 発表標題 “ 亜鉛の温故知新 ” 皮膚疾患とがん悪液質における関与について
3. 学会等名 第7回日本がんサポーターブケア学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深田俊幸
2. 発表標題 「 亜鉛に関する温故知新 」 なぜ亜鉛は健康に必要なのか？ 新しい病気の発見 ・ 患者様との交流 ・ 創薬への挑戦
3. 学会等名 第721回徳島県製薬協会定例研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深田俊幸
2. 発表標題 健康と病気における亜鉛の意義 その歴史的背景から基礎・臨床の研究まで
3. 学会等名 第33回日本消化器癌発生学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深田俊幸
2. 発表標題 「 亜鉛に関する温故知新 」 健康と病気における亜鉛の意義
3. 学会等名 第52回日本腎臓学会西部学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Fukada T, Bin BB, Hara T, Takagishi T, Yoshigai E, Lian X.	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 326
3. 書名 Essential and Toxic Trace Elements and Vitamins in Human Health	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 金属トランスポーターZIP14阻害剤	発明者 深田俊幸	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-63076	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>亜鉛の欠乏は、エピジェネティクスを攪乱する。 -亜鉛欠乏症がもたらす細胞障害の原因を発見- http://p.bunri-u.ac.jp/wp/wp-content/uploads/2020/05/TBUp519_Press-release.pdf 亜鉛欠乏症がもたらす細胞障害の原因を発見 http://p.bunri-u.ac.jp/4937/</p>
--

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
研究協力者	原 貴史 (Hara Takafumi) (90546722)	徳島文理大学・薬学部・講師 (36102)	
研究協力者	吉開 会美 (yoshigai Emi) (00546723)	徳島文理大学・薬学部・特別研究員 (36102)	

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			
韓国	Ajou University			
ポルトガル	S. Maria Hospital			
米国	Brown University			
米国	University of Florida			