

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08354

研究課題名（和文）亜鉛トランスポーターを介した代謝制御機構の解明に基づく大腸がん治療戦略の創出

研究課題名（英文）Therapeutic strategies based on the zinc transporter-mediated molecular pathology of colorectal cancer.

研究代表者

大橋 若奈（Ohashi, Wakana）

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：50381596

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：腫瘍形成動物モデルとして、ヌードマウスを用いて背部皮下に腫瘍細胞株を移植し、腫瘍形成を誘導した。小腸上皮幹細胞の維持と一過性増殖細胞の増殖に関わる亜鉛トランスポーターZIP7の発現の亢進は腫瘍形成能を増大させることが認められた。また、亜鉛トランスポーターZIP7の発現の高まりにより大腸がん細胞株の細胞性が変化すること、がん細胞性の悪性化の進展に寄与することが示唆された。さらに、亜鉛トランスポーターZIP7の発現の亢進により細胞内代謝が変化すること変動する代謝物の特定を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により大腸がん悪性化における亜鉛トランスポーターZIP7の寄与が示唆された。また、この寄与に関わる分子機構の一端が示された。本研究は、大腸がん悪性化進展の分子病態機構の解明に新しい展開を与えるとともに、現時点で確立された治療法のない悪性化進展抑制を目指した療法の開発を模索していく上で意義のある研究となったと思われる。

研究成果の概要（英文）：The study focused on the role of ZIP7, which is essential to maintain the intestinal stem cells and cell growth of transit-amplifying cells in the small intestine in mice, in the pathogenesis of colorectal cancer. The role of ZIP7 expression in tumorigenesis in vivo was investigated by subcutaneously implanting ZIP7-overexpressing cancer cells into the flanks of nude mice. We found that increased expression of ZIP7 enhanced the tumor formation. We investigated the effect of ZIP7 expression on cancer cell properties including cell growth and migration and found that overexpression of ZIP7 affected cellular functions, suggesting that ZIP7 can contribute to malignant progression. In addition, we found that increased expression of ZIP7 induced changes in cancer cell metabolism and analyzed the metabolites that were altered by ZIP7 expression.

研究分野：金属生物学

キーワード：亜鉛 大腸がん 微量元素 腸上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 必須微量元素である亜鉛は、生体内において鉄に次いで二番目に多く含まれる。亜鉛の欠乏は成長遅延、創傷治癒の遅延、免疫機能異常、下痢や夜盲症など全身のあらゆる臓器機能に影響を及ぼす。このことから、体内において亜鉛恒常性の維持は重要な生命維持機構の一つといえる。体内には亜鉛の輸送を担い SLC ファミリーに属する亜鉛トランスポーターが約 20 種以上存在し膜を介した亜鉛の移動を媒介することで、亜鉛の恒常性維持を担っている。近年、種々の疾患病態と亜鉛トランスポーターの発現、機能異常との関わりが多く報告されるようになり、これまで関わりが知られていなかった疾患においても亜鉛トランスポーターの異常に起因する亜鉛恒常性の破綻が関与していることが認められるようになってきた。すなわち、疾患病態に關与する亜鉛トランスポーターとその分子機構を示すことは、新しい治療法や治療薬の開発へと繋がることが期待される。

(2) 我々はこれまでに亜鉛トランスポーターの一つ ZIP7 が小腸の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明らかとした。加えて、大腸がん細胞株を用いた解析から、大腸がん細胞株におけるノックダウン法による ZIP7 の発現の抑制は、大腸がん細胞の増殖の低下とアポトーシス性の細胞死を誘導することを見出している。このことから大腸がんの生存において ZIP7 が重要な役割を果たしていることが示されたが、一方で、その機構や ZIP7 の発現が亢進の影響については解明されていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究においては、亜鉛トランスポーター ZIP7 が大腸がんの癌細胞性に及ぼす影響とそのメカニズムを明らかとすることを旨とする。

3. 研究の方法

(1) ZIP7 の発現亢進細胞株の作製

ヒト ZIP7cDNA をレンチウイルス発現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出した。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た。プラスチサイジンによる薬剤選択を行い、ヒト ZIP7 を恒常的に過剰発現するヒト大腸がん細胞株を選抜した。

(2) 細胞増殖解析

作製した細胞株について細胞数を揃えて 96 穴プレートに播種した。その後経時的に細胞数を計測し、細胞増殖曲線を作製解析した。

(3) 細胞移動能解析

作製した細胞株をボイデンチャンバーに播種した。一定時間経過後にチャンバーから膜を回収し、固定とクリスタルバイオレットによる染色を行った。その後、顕微鏡下で観察し、移動した細胞数を計測した。

(4) 細胞浸潤能解析

コラーゲンを塗布したボイデンチャンバーに細胞を播種した。一定時間経過後にチャンバーから膜を回収し、固定とクリスタルバイオレットによる染色を行った。その後、顕微鏡下で観察し、移動した細胞数を計測した。

(5) 移植モデルの作製

麻酔下でヌードマウスの皮下に作出した細胞株を投与した。経時的に腫瘍径を計測し、腫瘍体積を算出した。皮下より腫瘍組織を摘出し、重量を測定した。

(6) タンパク発現解析

作出した細胞株の細胞溶解液を調製し、ウエスタンブロット法によるタンパク発現解析を実施した。

4. 研究成果

(1) ZIP7 過剰発現細胞株の樹立

ヒト大腸がん細胞株、HT29 株は恒常的に ZIP7 を発現する一方で、SW480 株の ZIP7 発現レベルは低い。そこで、ZIP7 を高発現する HT29 株と低発現する SW480 株を用いて ZIP7 過剰発現株の樹立を行った。樹立した過剰発現細胞株における ZIP7 のタンパク発現をウエスタンブロット法により検証し、過剰発現株では ZIP7 タンパク発現が亢進していることを認めた。コントロール株と ZIP7 過剰発現株の代謝物解析を行い、ZIP7 過剰発現により変動する代謝物の特定を行っ

た。

(2) 細胞増殖能における効果

作出した細胞株を用いて細胞増殖解析を行い、ZIP7 の過剰発現が細胞増殖能を高めるか検証を行った。その結果、恒常的に ZIP7 を発現する HT29 株に ZIP7 をさらに過剰発現させた株において、さらなる細胞増殖の亢進は認めなかった。また、ZIP7 を低発現する SW480 株に ZIP7 の過剰発現を誘導した株においても細胞増殖能の亢進は認められなかった。

(3) 細胞の移動と浸潤における効果

ボイデンチャンバーアッセイ法を用いて、細胞の移動と浸潤能に対する ZIP7 過剰発現の効果を検証した。その結果、ZIP7 過剰発現株はコントロール株と比較して高い移動能を示した。さらに、コラーゲンコートしたボイデンチャンバーを用いて浸潤能を評価した結果、ZIP7 過剰発現株は高い浸潤能を有することが認められた。

(4) 腫瘍形成能の検証

ヌードマウス皮下に各細胞株を投与した所、いずれの細胞株からも腫瘍の形成を認めた。ZIP7 過剰発現株が形成する腫瘍はコントロールと比較して大きな容積が算出された。摘出した腫瘍の重量についても ZIP7 過剰発現細胞由来の腫瘍はコントロール腫瘍と比較して重いことがわかった。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 大橋若奈 井村穰二	4. 巻 3
2. 論文標題 悪性腫瘍における亜鉛動態と悪性化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊 細胞	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） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Wakana Ohashi
2. 発表標題 The physiological role of endoplasmic reticulum-resident Zinc transporter ZIP7 in the gut epithelium and humoral immunity
3. 学会等名 第46回分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大橋若奈
2. 発表標題 The physiological role of endoplasmic reticulum-resident Zinc transporter ZIP7 in the gut epithelium and humoral immunity
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Wakana Ohashi
2. 発表標題 The intrinsic roles of zinc homeostasis in intestinal development and functions
3. 学会等名 International Conference of Trace Elements and Minerals（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大橋若奈
2. 発表標題 亜鉛トランスポーターZIP7の機能とその異常が結びつく疾患
3. 学会等名 第33回日本微量元素学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Wakana Ohashi, Kay Tanita, Hinata Sugiyama, Tsubasa Okano, Tomiko Ozaki, Tetsu Nose, Yasunori Horiguchi, Zenichiro Kato, Hidenori Onishi, Kosuke Imai, Tomohiro Morio, Koji Hase, Hirokazu Kanegane
2. 発表標題 Novel compound heterozygous variants in the SLC39A7 gene in a Japanese girl with B-cell deficiency
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大橋若奈、谷田けい、杉山ひなた、岡野翼、尾崎富美子、能勢哲、堀口泰典、加藤善一郎、大西秀典、今井耕輔、森尾友宏、長谷耕二、金兼弘和
2. 発表標題 日本人B細胞欠損女児にて発見された亜鉛トランスポーターZIP7遺伝子の新奇複合ヘテロ変異の機能解析
3. 学会等名 第32回日本微量元素学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大橋若奈、谷田けい、杉山ひなた、岡野翼、尾崎富美子、能勢哲、堀口泰典、加藤善一郎、大西秀典、今井耕輔、森尾友宏、長谷耕二、金兼弘和
2. 発表標題 本邦において見つかったB細胞欠損患者の亜鉛トランスポーターZIP7遺伝子新奇複合ヘテロ変異の分子機能解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大橋若奈、谷田けい、杉山ひなた、岡野翼、尾崎富美子、能勢哲、堀口泰典、加藤善一郎、大西秀典、今井耕輔、森尾友宏、長谷耕二、金兼弘和
2. 発表標題 日本人B細胞欠損女兒にて発見された亜鉛トランスポーターZIP7遺伝子新奇複合ヘテロ変異の機能解析
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仙田幸音、大橋若奈、洞口龍介、井村穰二
2. 発表標題 亜鉛トランスポーターZIP7によるがん細胞形質の悪性化
3. 学会等名 第38回日本生化学会北陸支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大橋若奈、仙田幸音、洞口龍介、井村穰二
2. 発表標題 大腸がんの腫瘍形成に関わる亜鉛トランスポーターZIP7
3. 学会等名 第142回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 仙田幸音、大橋若奈、洞口龍介、井村穰二
2. 発表標題 腫瘍形成における亜鉛トランスポーターの機能
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 仙田 幸音、大橋 若奈、洞口 龍介、サイリシバリキヒ、下村 明子、住吉 紗代子、井村 穰二
2. 発表標題 大腸癌おける亜鉛トランスポーターZIP7と移動・転移能の獲得/腫瘍性質との関わり
3. 学会等名 第66回日本病理学会秋期特別総会
4. 発表年 2020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
研究分担者	早川 芳弘 (Hayakawa Yoshihiro) (10541956)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授 (13201)	
研究分担者	井村 穰二 (Imura Joji) (80316554)	獨協医科大学・医学部・非常勤講師 (32203)	

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
---------	---------