

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860573

研究課題名(和文) 腸管上皮幹細胞の幹細胞機能維持における亜鉛トランスポーターの役割解明

研究課題名(英文) The role of Zinc transporter in maintenance of stemness of intestinal epithelial stem cell

研究代表者

大橋 若奈(OHASHI, WAKANA)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：50381596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腸管上皮細胞は腸陰窩底部に位置する腸管上皮幹細胞の増殖と分化により常に新しい細胞に置き換わっている。本研究では、亜鉛恒常性を担う分子である亜鉛トランスポーターZip7の腸陰窩における役割について検討を行い、腸陰窩の細胞増殖及び腸管上皮幹細胞の維持に重要な役割を果たしていること、その機構には腸陰窩のERストレス応答制御が関連していることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the role of zinc transporter Zip7 in the intestinal crypt homeostasis and found that Zip7 is essential for the proliferation of crypt cells and the maintenance of intestinal stem cells by regulating ER stress levels in crypt cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：腸管上皮細胞 亜鉛生物学 消化管 腸管上皮幹細胞 ER

## 1. 研究開始当初の背景

必須微量元素である亜鉛の欠乏は、成長障害、免疫不全、味覚障害などを引き起こすことが知られている。亜鉛の恒常性を保つため、生体には亜鉛トランスポーターやメタロチオネインなどの亜鉛制御分子が存在している。亜鉛の恒常性を維持する亜鉛トランスポーターは、細胞外から細胞内へ、または、細胞内小器官から細胞質内へ亜鉛を輸送する Slc39/Zip ファミリーと、細胞内から細胞外へ、または細胞質から細胞内小器官へ亜鉛を輸送する Slc30/Znt ファミリーから構成される。これらの亜鉛トランスポーターの中で、Slc39a4/Zip4 は陽性肢端皮膚炎の原因遺伝子として、また、Slc39a13/Zip13 は、エーラスダンロス症候群の原因遺伝子として同定され、亜鉛トランスポーターの機能異常が様々な疾患の病態形成と深い関わりをもつ可能性が考えられるようになった。これらの亜鉛トランスポーターは進化的に保存されており、ほ乳類においては、現在までの約 20 種類もの亜鉛トランスポーターが同定されているものの、それぞれの亜鉛トランスポーターの生物学的役割については十分には解明されていなかった。

## 2. 研究の目的

これまでの報告から、Slc39a7/Zip7 は細胞内小器官である小胞体に局在することが確認されているトランスポーターであり、これの近縁の Slc39a13/Zip13 は、細胞内小器官であるゴルジ体に局在し、先天性疾患の原因遺伝子として同定されている。小胞体は、細胞内において主要な亜鉛の貯蔵場所であり、薬剤耐性の乳がん細胞株においては Zip7 の発現が亢進していることが報告されている。申請者は、全身における Zip7 の発現分布を解析した結果、Zip7 は腸陰窩において強く発現していることを見いだした。腸陰窩においては、腸管上皮幹細胞が絶えず自己複製を行い、一過性増殖細胞が活発な増殖と分化を行

っていることから、Zip7 はこれらの細胞において機能している可能性が考えられた。しかしながら、Zip7 欠損マウスは胎生致死を示すことから発生における重要性は示唆されていたものの、生体における役割の解析は立ち後れており、生体の腸組織、および腸陰窩においてどのような役割を果たしているのかについては不明であった。本研究では、腸管上皮細胞特異的な Zip7 欠損マウスの作製と解析を行うことにより、その機能を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### Zip7 の腸管上皮細胞における役割の解析

腸管上皮細胞における Zip7 の役割を解析するために、Cre-LoxP システムによる Zip7 flox マウスを作製する。この Zip7 flox マウスを腸管上皮細胞特異的に Cre を発現する Villin-Cre Tg マウス、および、タモキシフェン投与により腸管上皮細胞特異的に Cre が活性化する Villin-CreERT2 Tg マウス、さらに、タモキシフェン投与により Lgr5 陽性腸管上皮幹細胞特異的に Cre が活性化する Lgr5-CreERT2-IRES-EGFP Tg マウスと交配を行い、腸管上皮細胞特異的な Zip7 欠損マウスを樹立した。このマウスを用いて、組織学的解析を行い腸管構築における Zip7 欠損の影響、腸管上皮細胞の系列細胞に対する Zip7 欠損の影響を検討した。このマウスから腸陰窩を採取し、RNA 抽出を行い、遺伝子発現解析を行った。

## 4. 研究成果

Zip7 flox マウスと Villin-Cre Tg マウスを掛け合わせることで腸管上皮細胞特異的な Zip7 を欠損するマウスの樹立を試みた。掛け合わせにより誕生した 130 匹のマウスの遺伝子型を調べた結果、全てのマウスは Zip7<sup>flox/flox</sup>、または、Zip7<sup>flox/+</sup> Villin-Cre、Zip7<sup>flox/+</sup> の遺伝型に分類され、腸管上皮細胞特異的に Zip7 を欠損する遺伝型に相当する Zip7<sup>flox/flox</sup> Villin-Cre マウスはいないこと

が分かった。

次いで、タモキシフェン誘導性に Cre が活性化する Villin-CreERT2 Tg マウスと Zip7<sup>flox/flox</sup> マウスの交配を行った。これにより得られた誘導型腸管上皮細胞 Zip7 欠損マウスにタモキシフェンを経口投与することで Zip7 欠損を誘導した。誘導型腸管上皮細胞 Zip7 欠損マウスは、タモキシフェンの経口投与後、4 日目以降に死亡していった。

タモキシフェン投与後 3 日目に小腸組織を採取し、HE 染色を行い観察した結果、絨毛、陰窩の構造が著しく崩壊すると共に、炎症細胞の浸潤を認めた。また、Ki67 陽性となる増殖細胞及び、腸管上皮幹細胞のマーカである Olfm4 の陽性細胞は Zip7 欠損マウスで顕著に減少しており、腸管上皮細胞に発現する Zip7 は、腸陰窩の細胞増殖及び腸管上皮幹細胞の維持に重要であることが明らかとなった。

この Zip7 欠損による腸管組織の崩壊及び腸管上皮増殖細胞の増殖と幹細胞の消失が腸管上皮細胞の要因のみにより起こるのかを調べるため、コントロール及び、誘導型腸管上皮細胞特異的 Zip7 欠損マウスより腸陰窩を採取し、マトリゲル中に埋め込み種々の成長因子と共に *in vitro* による培養を行った。*In vitro* 培養開始と共にタモキシフェン代謝物である 4-OHT を 2 日間投与し Zip7 欠損を誘導したところ、コントロールマウス由来の腸陰窩が増殖していくのに体して、Zip7 欠損誘導腸陰窩は 2,3 日のうちに死滅していった。近年、腸管上皮幹細胞と隣り合って存在する Paneth 細胞は種々の因子を産生し腸管上皮幹細胞のニッチ細胞として機能し、*in vitro* による腸陰窩培養においては Paneth 細胞の存在が不可欠であることが報告されている。Zip7 欠損による腸管上皮幹細胞の消失及び *in vitro* 培養条件での腸陰窩の死滅は、Paneth 細胞に起因しているのかどうかについて検討を行った。*In vitro* 培養においては、外因性に Wnt3a を添加することにより、Paneth 細胞の機能不全のレスキューが

可能であることから、Wnt3a 存在下において腸陰窩培養を実施し Zip7 欠損を誘導し腸陰窩の生存、増殖を調べた。その結果、Wnt3a 存在下においても Zip7 欠損誘導により腸陰窩の死滅することが分かった。これらのことから、Zip7 欠損による腸陰窩の死滅は Paneth 細胞以外の要因によっていることが考えられた。

次に、Zip7 欠損腸陰窩にどのような変化が生じているのかをトランスクリプトーム解析を行いコントロール腸陰窩と比較した。Zip7 腸陰窩では Chop などのアポトーシス遺伝子及び ER ストレス応答遺伝子群の発現が上昇していた。GO 解析から Zip7 欠損誘導により ER 機能と関連する遺伝子群の発現が変動していた。Zip7 の欠損により ER 機能が障害され、ER ストレス応答が惹起されている可能性が考えられた。4-OHT により Zip7 を欠損するマウス胚性線維芽細胞においても、Zip7 欠損誘導により ER ストレス応答が惹起されることを確認した。さらにレトロウイルスを用いての野生型 Zip7 の強制発現下では、Zip7 欠損誘導による ER ストレス応答の惹起はほとんど見られなかった。以上のことから、Zip7 は腸陰窩において、腸陰窩細胞の増殖及び腸管上皮幹細胞を維持するための ER 機能に重要な役割を果たす遺伝子であると考えられた。

## 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 4 件 )

1. Kambara K, Ohashi W, Tomita K, Takashina M, Fujisaka S, Hayashi R, Mori H, Tobe K, Hattori Y. In vivo depletion of CD206+ M2 macrophages exaggerates lung injury in endotoxemic mice The American Journal of Pathology 185(1), 162-171 (2015) (査読あり)

2. Tomita K, Takashina M, Mizuno N, Sakata K, Hattori K, Imura J, Ohashi W, Hattori Y. Cardiac fibroblasts: contributory role in septic cardiac

dysfunction. Journal of Surgical Research 193(2), 874-887 (2014) (査読あり)

3. Bin BH, Hojyo S, Hosaka T, Bhin J, Kano H, Miyai T, Ikeda M, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Cho EG, Fukue K, Kambe T, Ohashi W, Kim KH, Seo J, Choi DH, Nam YJ, Hwang D, Fukunaka A, Fujitani Y, Yokoyama S, Superti-Furga A, Ikegawa S, Lee TR, Fukada T. Molecular pathogenesis of Spondylocheirodysplastic Ehlers-Danlos syndrome caused by mutation of ZIP13 proteins. EMBO Mol. Med. 6(8), 1028-1042 (2014) (査読あり)

4. Taguchi K, Sakata K, Ohashi W, Imaizumi T, Imura J, Hattori Y. Tonic inhibition by G protein-coupled receptor kinase 2 of Akt/endothelial nitric-oxide synthase signaling in human vascular endothelial cells under conditions of hyper glycemia with high insulin levels. J. Pharmacol. Exp. Ther. 349(2), 199-208 (2014) (査読あり)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計2件)

1. 大橋若奈 トピックス「カルモジュリンによる水チャネルゲート開閉のアロステリック調節機構」ファルマシア 2014年 50(4)
2. 大橋若奈, 北條慎太郎, 深田俊幸, 亜鉛によるシグナル伝達:「亜鉛シグナル」とは 分子消化器病 2013年 6月号

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 若奈 (OHASHI WAKANA)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：50381596

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：