

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870677

研究課題名(和文) 味覚障害治療に向けた味覚細胞における亜鉛流入分子の同定

研究課題名(英文) Identification of regulator of zinc influx in the taste cell for treatment of taste disorder.

研究代表者

波多野 紀行 (Hatano, Noriyuki)

愛知学院大学・薬学部・講師

研究者番号：50454319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：亜鉛トランスポーターZip8およびZip14強制発現HEK293細胞を用いて、これらトランスポーターを介する細胞内亜鉛流入を測定する系を確立した。また細胞外亜鉛濃度を比色法により測定することで、亜鉛トランスポーターを介した細胞内への亜鉛流入量を定量することができた。さらに、TRPA1強制発現HEK293細胞および炎症性サイトカインにより刺激したヒト初代滑膜線維芽細胞を亜鉛センサーとして活用した実験系を構築した。この実験系を用いた結果より、味覚障害治療薬ポラプレジンクが亜鉛補充薬として有効であること、味覚障害を引き起こすといわれているカプトプリルの亜鉛キレート作用はあまり強くないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We established a system to measure the extracellular zinc influx through zinc transporters in the HEK293 cells overexpressing Zip8 (HEK-Zip8) and Zip14 (HEK-Zip14) using a zinc-sensitive dye FluoZin-3. The extracellular zinc influx in the HEK-Zip8 and HEK-Zip14 were quantitatively measured by quantifying the extracellular zinc content in the medium. The effects of polaprezinc, a chelate compound of zinc ion, were examined using both HEK293 cells overexpressing TRPA1 (HEK-TRPA1) and human fibroblast-like synoviocytes stimulated by IL-1alpha. The polaprezinc increased intracellular Ca²⁺ concentration in both HEK-TRPA1 and IL-1alpha-stimulated synoviocytes. Moreover, the effects of a captopril that cause taste disorder were examined. The captopril did not change the response of polaprezinc in the IL-1alpha-stimulated synoviocytes. These results suggest that polaprezinc is effective as a zinc supplementation drug, and the zinc-chelating effect of captopril is very weak.

研究分野：薬理

キーワード：細胞内亜鉛

1. 研究開始当初の背景

味覚障害とは、食事の味が分からなくなる味覚低下、食事をしていないのに異常な味を感じる自発性異常味覚などの症状を呈する感覚障害である。味覚が障害されると、健全な食生活を維持することが困難となり、二次的に様々な疾病を誘発する。味覚障害は高齢者に多く発症するため、高齢化が進行する我が国の大きな健康問題の一つとなっている。2003年では年間24万人が罹患しており、1990年の年間14万人から約1.8倍に増加している。味覚障害の原因は様々であり、薬剤誘発性、亜鉛欠乏性、精神神経疾患や循環器疾患などによるものが挙げられる。原因別で見ると、薬剤誘発性味覚障害の頻度が最も高く、特発性、亜鉛欠乏性がそれに続く。薬剤誘発性味覚障害を発症した場合、その薬剤の服用を中止することが第一であるが、多くの薬剤の中から味覚障害の原因となる薬剤を同定することが困難であったり、原疾患治療における代替薬が存在しない場合があり、臨床上大きな問題となっている。また血清亜鉛の低下が認められる亜鉛欠乏性味覚障害では、亜鉛製剤を用いた亜鉛補充療法が施され、ほとんどの患者において著効を示すが、血清亜鉛が正常である特発性味覚障害では、約30%の患者において亜鉛補充療法が無効である。そのため、特発性味覚障害の原因解明および新規治療法の開発が強く望まれている。

2. 研究の目的

亜鉛は生体内必須元素であり、300種以上の酵素活性を調節し、様々な蛋白質の転写・翻訳およびその立体構造を制御している。そのため亜鉛欠乏は、小児の成長障害、味覚障害、皮膚障害、免疫不全などを引き起こす。細胞増殖の維持にも亜鉛は必須であり、増殖の速い臓器では亜鉛欠乏による影響が大きい。味覚細胞は細胞の入れ替わりが速く、細胞増殖が非常に盛んであるため、亜鉛欠乏により細胞のターンオーバーが阻害されると味覚障害が発症すると考えられている。

味覚障害を誘発する薬剤の多くは、亜鉛をキレートあるいは亜鉛と相互作用し、細胞内への流入を抑制することにより味覚障害を誘発すると考えられてきた。しかし味覚障害を誘発する薬剤は多岐にわたり、構造も多様であるため、それらすべての薬剤が亜鉛と相互作用するとは考えにくい。また、これらの薬剤と亜鉛の相互作用を解析した報告は皆無であり、これらの薬剤が味覚細胞における亜鉛流入を直接抑制することを示した報告はない。さらに、味覚細胞における亜鉛流入経路は未同定であり、細胞増殖における亜鉛の寄与についても未解明である。つまり、味覚障害を引き起こす原因となる味覚細胞における亜鉛流入抑制および亜鉛補充療法による亜鉛流入増加について、分子レベルの解析はこれまで行われてこなかった。そこで本

研究では、味覚細胞における亜鉛流入を直接観察し、亜鉛流入分子を同定することを最終目標として設定した。その最終目標を達成するためには、細胞内への亜鉛流入を定量的に測定する方法を確立する必要がある。この測定系を確立することによって、味覚細胞における薬剤誘発性亜鉛流入抑制や亜鉛補充療法による亜鉛流入促進を正確に測定することが可能に成り得ると考えられる。

味覚細胞の亜鉛流入分子を同定することにより、多種多様な薬剤が味覚障害を誘発する詳細な分子機構や、原因不明である特発性味覚障害の発症機序の解明を目指す。本研究成果は、味感知や細胞増殖といった味覚細胞の機能と細胞内亜鉛濃度の関連を解明する端緒、また亜鉛製剤が無効である特発性味覚障害患者に対する新規治療薬の開発に向けた糸口になると考えた。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト胎児腎臓由来培養細胞(HEK293)はヒューマンサイエンス研究資源バンク(HSSRB)より入手した。HEK293は非働化した10% FBSを添加し、ペニシリン G(100 U/ml)、ストレプトマイシン(100 µg/ml)を加えた D-MEM(Sigma: D-MEM/FBS10%)で、5% CO₂存在下37℃で培養した。健常人由来ヒト初代培養滑膜線維芽細胞は Cell Applications, Inc.より入手した。ヒト初代培養滑膜線維芽細胞は細胞増殖因子を添加した培地(Cell Applications, Inc.)で、5% CO₂存在下37℃で培養した。

(2) RNA 抽出、逆転写反応および RT-PCR 法

培養細胞から AGPC 法により total RNA を抽出し、OD₂₆₀ から total RNA 濃度を計算した。次に ABI 社の逆転写反応プロトコルに従い、逆転写酵素とランダムヘキサマー(dN₆)を用いて cDNA を合成した。PCR 増幅装置として Gene Amp 2720、Taq DNA polymerase として Fast Start Taq DNA polymerase (Roche)を用いた。総反応液量を 20 µL とし、RT-PCR を行った。PCR 産物の分画は、1.5% アガロースゲル電気泳動を用いて行った。臭化エチジウム染色した後、FAS3000 を用いて可視化した。

(3) 定量的 RT-PCR 法

定量的 RT-PCR 法は PCR 検出定量システム (Thermal Cycler Dice Real Time System, TAKARA Bio.)を用いて行った。Syber Green アッセイ法を用いて、サイクル毎の蛍光強度を測定した。測定した蛍光強度とあらかじめ作成した検量線から求めた傾きから、各標的の mRNA 発現量を求めた。また内部標準として β -actin を使用した。

(4) 細胞内 Ca²⁺濃度測定法

細胞内 Ca²⁺濃度変化の測定には、高速冷却 CCD カメラ蛍光画像解析システム ARGUS

/HiSCa(浜松ホトニクス株式会社)を用い、Ca²⁺蛍光変化を観察した。蛍光指示薬には fura2-AM を用いた。測定用チャンパーに細胞をセットした後、fura2-AM を 10 μM の最終濃度になるように加え、30 分間静置して色素を細胞内に取り込ませた。その後、HEPES 溶液(組成(mM):137 NaCl, 5.4 KCl, 2.2 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 14 glucose, 10 HEPES, pH 7.4)で灌流し、過剰な色素を洗浄した後、測定を開始した。実験はすべて室温(25 ± 1 °C)で行った。fura2-AM を用いた実験では、細胞内の色素を励起波長 340 nm および 380 nm の光で励起させ、放出された 510 nm の蛍光をカメラで取得し、蛍光強度比(F₃₄₀/F₃₈₀)として解析した。

(5) 細胞内 Zn²⁺濃度測定法

細胞内 Zn²⁺濃度変化の測定には、高速冷却 CCD カメラ蛍光画像解析システム ARGUS/HiSCa を用い、Zn²⁺蛍光変化を観察した。蛍光指示薬には FluoZin-3-AM を用いた。測定用チャンパーに細胞をセットした後、FluoZin-3-AM を 10 μM の最終濃度になるように加え、15 分間静置して色素を細胞内に取り込ませた。その後、HEPES 溶液で灌流し、過剰な色素を洗浄した後、測定を開始した。実験はすべて室温(25 ± 1 °C)で行った。FluoZin-3-AM を用いた実験では、細胞内の色素を励起波長 488 nm の光で励起させ、放出された 516 nm の蛍光をカメラで取得し、測定時における蛍光強度を蛍光強度比(F/F₀)として解析した。

(6) 細胞外 Zn²⁺濃度測定法

細胞外 Zn²⁺濃度の測定には Metallogenics 社製キットを用い、添付されたプロトコルに従って実施した。1 検体あたり R-A Buffer 液(230 μL)に R-R Chelate color 液(5 μL)を加え、発色液を調製した。その後、発色液(230 μL)に試料(12 μL)を加え十分に混合し、室温で 5 分静置後、紫外可視分光光度計を用いて励起波長 570 nm の光で励起させ、吸光度を測定した。測定した吸光度とあらかじめ作成した検量線から求めた傾きから、細胞外 Zn²⁺濃度の定量を行った。

(7) 遺伝子導入法

Lipofectamine 3000 を用いたりポフェクション法により HEK293 への一過性発現実験を行った。Invitrogen 社のプロトコルに従ってトランスフェクションを行い、トランスフェクションから 24~48 時間程度経過した細胞を実験に使用した。各イオンチャンネルの選択的なアゴニストに反応する細胞を計測することによりりポフェクション法による遺伝子導入効率は 80-90%であった。

4. 研究成果

(1) HEK293 強制発現系における亜鉛トランスポータを介した細胞内亜鉛流入測定法の確立

細胞外の Zn²⁺が細胞内 Zn²⁺濃度に及ぼす

作用について定量的に測定する方法を確立する目的で、以下の検討を行った。Zip8 あるいは Zip14 を強制発現させた HEK293 (HEK/Zip8、HEK/Zip14)を用いて、FluoZin-3-AM による細胞内 Zn²⁺濃度の測定を行った。まず、Zip8 および Zip14 を強制発現することによって細胞内 Zn²⁺濃度に変化があるのか検討した。その結果、HEK/control に比べ、HEK/Zip8 および HEK/Zip14 において細胞内 Zn²⁺濃度が有意に増加していた。次に、Zn²⁺急性投与による作用について検討した結果、HEK/control に比べて、HEK/Zip8 および HEK/Zip14 では、細胞外 ZnSO₄ 添加による細胞内 Zn²⁺濃度上昇作用が有意に増加していた。さらに、Zn²⁺慢性投与による作用について検討した結果、HEK/control に比べ、HEK/Zip8 および HEK/Zip14 において、細胞内 Zn²⁺キレーターである TPEN は ZnSO₄ による細胞内 Zn²⁺濃度上昇を有意に低下させた。これらの結果より、Zip8、Zip14 により細胞内に Zn²⁺が流入し細胞内 Zn²⁺濃度が上昇することが明らかとなった。

次に、この細胞内への亜鉛流入を定量する方法について検討を行った。HEK/control および HEK/Zip8、HEK/Zip14 に ZnSO₄ を添加後、24 時間経過した培地中の残留 Zn²⁺濃度を比色法により計測した。計測した吸光度は、検量線のパラメーターを用いて細胞外 Zn²⁺濃度に変換し定量した。その結果、HEK/Zip8 あるいは HEK/Zip14 では、HEK/control と比較して細胞外 Zn²⁺濃度が約 2 μM 減少していた。つまり、Zip8 あるいは Zip14 を強制発現させることにより 2 μM の Zn²⁺が細胞内へ流入したことを定量的に測定することができた。

これらの結果より、HEK293 を用いた強制発現系において、亜鉛トランスポータを介した細胞内への亜鉛流入を定量的に測定する方法を確立することができた。

(2) ヒト初代培養滑膜線維芽細胞(408)を用いた細胞内亜鉛流入測定法の確立

408 に炎症性サイトカイン(TNF-α、IL-1α)を添加することにより、細胞内 Zn²⁺濃度が増加することが示唆されている。そこで、408 に IL-1α を添加することにより亜鉛トランスポータの発現量が増加すると考え、ZnT ファミリーおよび Zip ファミリーの mRNA 発現量について、Q-PCR 法を用いることにより検討した。その結果、Zip8 および Zip14 の mRNA 発現量の顕著な増加が観察された。そこで、IL-1α 処置 408 を用いることで、強制発現系ではなく native 細胞における細胞内 Zn²⁺流入量の測定を試みた。

HEK293 強制発現系において用いた FluoZin-3-AM による細胞内 Zn²⁺濃度測定は 408 の自家蛍光のため、測定することができなかった。そこで、細胞外亜鉛を測定することにより、亜鉛流入量の定量測定を行った。その結果、IL-1α 処置 408 において、非処置 408 と比べて

細胞外 Zn^{2+} 濃度の有意な変化は観察できなかった。これらの結果より、HEK293 強制発現系に比べて、IL-1 α 処置 408 における細胞内 Zn^{2+} 流入量は小さいと考えられた。

本研究では、マウス舌およびラット舌から味覚細胞を単離することはできなかったため、408 を用いて検討を行ったが、native な細胞において細胞内 Zn^{2+} 流入を定量的に測定することはできなかった。細胞内 Zn^{2+} 流入を定量的に測定するためには、より鋭敏な測定系を開発する必要があると考えられる。

(3) TRPA1 強制発現 HEK293 および IL-1 α 処置 408 を亜鉛センサーとして活用した薬剤誘発性味覚障害発症メカニズムの解明

薬剤誘発性味覚障害の原因の多くは、原因薬剤と生体内 Zn^{2+} がキレート形成し、細胞内への Zn^{2+} 流入を抑制するためであると考えられている。また亜鉛欠乏による味覚障害治療薬として、亜鉛錯体ポラプレジンクが汎用されている。しかしながら、実際に原因薬剤が細胞内 Zn^{2+} 流入を抑制するメカニズムは未解明であり、その分子メカニズムの解明が期待されている。そこで、実際にポラプレジンクが生体内亜鉛と同じような挙動を示すのか、また味覚障害誘発薬剤カプトプリルが細胞内亜鉛流入を抑制するのか、TRPA1 強制発現 HEK293 および IL-1 α 処置 408 を用いて検討を行った。

TRPA1 は細胞外亜鉛に感受性を有するカチオンチャンネルであり、亜鉛添加により細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を惹起することが知られている。つまり、TRPA1 は亜鉛センサーとして働き、細胞内 Ca^{2+} 濃度を指標とすることで細胞外亜鉛を感知することができると考えられる。そこで、TRPA1 強制発現 HEK293 (HEK/TRPA1) を作成し、細胞外亜鉛に反応して細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇する測定系を確立した。この実験系において、細胞外からポラプレジンクを添加すると濃度依存的に細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することを明らかにした。この EC_{50} はおよそ $1 \mu M$ であり、 $ZnSO_4$ とほぼ同じ値であった。つまり、ポラプレジンクは細胞外において $ZnSO_4$ と同じ挙動を示すことが示唆された。

次に、亜鉛センサーとして IL-1 α 処置 408 を用いて同様の実験を行った。408 は IL-1 α 処置を行うことにより、亜鉛トランスポーターである Zip8 および Zip14 だけでなく、亜鉛センサーである TRPA1 の発現量も増加することが明らかになっており、HEK/TRPA1 と同様に鋭敏な亜鉛センサーに成り得ると考えられた。この測定系においてもポラプレジンクは細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させた。また、生体内亜鉛とキレートを形成し、薬剤誘発性味覚異常を引き起こすといわれているカプトプリルの Zn^{2+} に対する作用についても検討した。IL-1 α 処置 408 において、カプトプリルはポラプレジンク誘発性細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇をまったく抑制しなかった。

カプトプリルによる味覚障害の原因は生体内亜鉛とキレートを形成し、細胞内への亜鉛流入を抑制するためであるといわれている。本研究結果はその仮説と矛盾する。本研究結果より、カプトプリルによる味覚異常は生体内亜鉛とのキレート形成が原因ではない可能性が示唆された。

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3件)

(1) Muraki K, Hatano N, Suzuki H, Muraki Y, Iwajima Y, Maeda Y, Ono H.

Oseltamivir blocks human neuronal nicotinic acetylcholine receptor-mediated currents.

Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 116: 87-95 (2015)

査読有, DOI: 10.1111/bcpt.12290.

(2) Matsuba S, Niwa S, Muraki K, Kanatsuka S, Nakazono Y, Hatano N, Fujii M, Zhan P, Suzuki T, Ohya S.

Downregulation of Ca^{2+} -activated Cl channel TMEM16A by the inhibition of histone deacetylase in TMEM16A-expressing cancer cells.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 351: 510-518 (2014)

査読有, DOI: 10.1124/jpet.114.217315.

(3) Suzuki H, Hatano N, Muraki Y, Itoh Y, Kimura S, Hayashi H, Onozaki K, Ohi Y, Haji A, Muraki K.

The NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium activates the human TRPA1 nociceptor.

Am. J. Physiol. Cell Physiol. 307: C384-C394 (2014)

査読有, DOI: 10.1152/ajpcell.00182.2013.

[学会発表](計3件)

(1) 金塚早希、中園裕利華、松葉紗代、波多野紀行、鬼頭宏彰、丹羽里実、藤井正徳、鈴木孝禎、村木克彦、大矢進

乳癌細胞におけるヒストン脱アセチル化酵素阻害による Ca^{2+} 活性化 K^+ チャンネル $KCa_{3.1}$ 転写及び活性調節。

日本薬学会第135年会。2015年3月28日、デザイン・クリエイティブセンター神戸 KIITO ホール(兵庫県・神戸市)

(2) Robert A. Rose, Lisa Chilton, Robert Clark, Noriyuki Hatano, Mary M. Malekar, Wayne R. Giles.

TRP channel expression and function in cardiac fibroblasts and myofibroblasts.

日本薬理学会・日本生理学会 合同シンポジウム、2015年3月19日、名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）

(3) 松葉紗代、金塚早希、中園裕利華、丹羽里実、村木克彦、波多野紀行、藤井正徳、鈴木孝禎、大矢進

ヒト乳がん細胞株におけるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による Ca^{2+} 活性化 Cl⁻チャネル TMEM16A 発現・活性抑制

生体機能と創薬シンポジウム 2014 . 2014年8月28-29日、近畿大学東大阪キャンパス（大阪府・東大阪市）

〔その他〕

愛知学院大学薬学部薬効解析学講座 HP

http://www.phar.agu.ac.jp/lab/cell_pharm/cellpharmacol.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

波多野 紀行 (HATANO, Noriyuki)

愛知学院大学・薬学部・講師

研究者番号:50454319