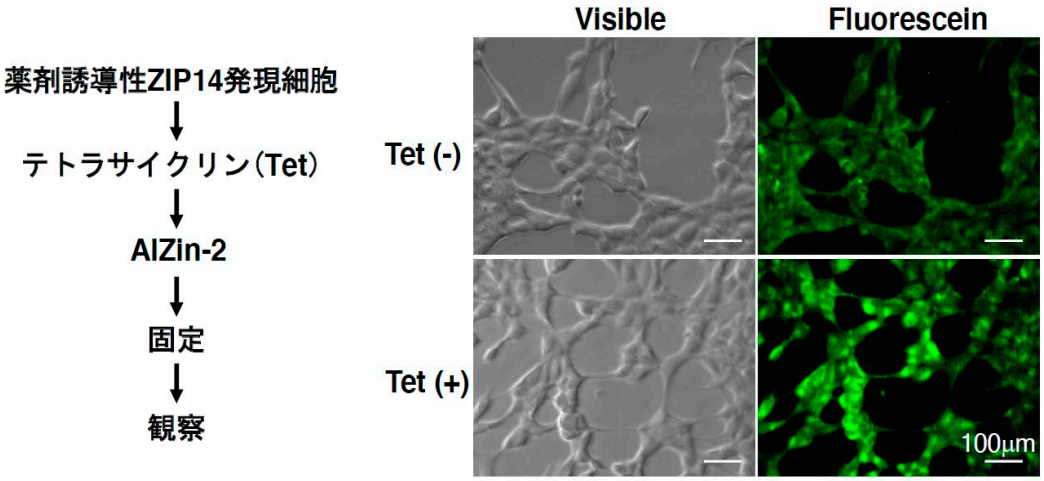
47　亜鉛シグナリングの機序解明とその制御による創薬研究	深田　俊幸

【目的】本研究の動機は、亜鉛トランスポーターから放出される亜鉛イオンが、細胞内シグナル因子として機能すること（亜鉛シグナリング）、この亜鉛シグナリングが骨格筋と皮膚の維持に重要であることの発見にある。具体的には、転移がんの増殖に伴って亜鉛トランスポーターZIP14 が骨格筋で発現し、ZIP14 の亜鉛シグナルが筋萎縮（がん悪液質）をもたらすことを見出した。さらに、亜鉛トランスポーターZIP10 を介する亜鉛シグナルが表皮形成に必須であり、アトピー性皮膚炎患者の皮膚では、ZIP10 が減少していることを発見した。これらは、亜鉛シグナリングが骨格筋と皮膚の維持に関与することを示しているが、亜鉛シグナリングの機序と創薬については十分に研究されていない。一方、高齢化が進む日本では、運動機能障害や皮膚脆弱化による QOL の低下が問題視されている。骨格筋および皮膚の疾患の予防と治療に係る方法の開発は、今後迎える超高齢化に備えるべき急務な課題であると考えた。これらの研究背景から、骨格筋と皮膚の理解と治療戦略に亜鉛シグナリングから究明することを目的として本研究を開始した。

【方法】1. 筋萎縮における ZIP14 の役割解明：筋萎縮における ZIP14 の役割を解明するために、ZIP14 発現細胞の特徴を解析する目的で、*Zip14* プロモーター下流に *EGFP-IRES-creERT2* 遺伝子カセットを挿入（knock-in：KI）した *Zip14-GFP*-KI マウスを作製した。さらに、AIZin-2 試薬を用いた Zn^{2+}conditional proteomics 法を適用して、ZIP14 の亜鉛シグナリングの標的分子を同定する実験系を構築した。2. 表皮形成における ZIP10 役割解明：表皮形成における ZIP10 役割を解明するために、ZIP10 発現細胞の特徴を解析する目的で、*Zip10* プロモーター下流に *EGFP-IRES-creERT2* 遺伝子カセットを KI した *Zip10-GFP*-KI マウスを作製した。3. 創薬関連研究：ZIP14 の機能や発現に影響を与える化合物のスクリーニング系の構築を試行した。

【結果】1. *Zip14-GFP*-KI マウスを完成した。さらに、Zn^{2+} conditional proteomics 法を薬剤（Tet）誘導性 ZIP14 発現細胞に適用して、ZIP14 の発現に依存した細胞内の蛍光発色を確認した（下図）。2. *Zip10-GFP*-KI マウスを完成した。ZIP10 発現細胞の子孫細胞を可視化するために、*Zip10-GFP*-KI マウスと *tdTomato*-KI マウスを交配して *Zip10-GFP/Tomato*-KI マウスを作製した。さらに、本マウスの皮膚における ZIP10 発現細胞の子孫細胞の存在を免疫染色法で確認した。3. 薬剤誘導性 ZIP14 発現 HEK293 細胞を適用して、ZIP14 の発現に依存した亜鉛の導入による細胞増殖抑制作用を確認した。さらに、ZIP14 依存的な細胞増殖抑制作用に焦点を当てた化合物スクリーニング系を確立した。

Zn^{2+} conditional proteomics 法を用いた ZIP14 亜鉛シグナルの標的分子の可視化



47. 亜鉛シグナリングの機序解明とその制御による創薬研究

深田　俊幸

徳島文理大学 薬学部 薬学科

Key words：必須微量金属，亜鉛シグナリング，亜鉛トランスポーター，骨格筋，皮膚

緒　言

本研究の動機は、亜鉛トランスポーターから放出される亜鉛イオンが、カルシウムイオンのように細胞内シグナル因子として機能すること（亜鉛シグナリング）[1]、この亜鉛シグナリングが、骨格筋と皮膚の維持に重要であることの発見にある。具体的には、転移がんの増殖拡大に伴って産生される炎症性サイトカインによって、亜鉛トランスポーターZIP14 が骨格筋で発現し、ZIP14 の亜鉛シグナルが筋萎縮（がん悪液質）をもたらすことを見出した。この結果は、ZIP14 の亜鉛シグナルが「がん悪液質の病態形成に関与する」ことを示している [2]。一方、亜鉛トランスポーター ZIP10 を介する亜鉛シグナルが表皮の形成に必須であること、アトピー性皮膚炎患者の皮膚では、ZIP10 の発現が顕著に減少していることを発見した [3]。すなわち、ZIP10 の亜鉛シグナルが「機能的な表皮の形成に必要である」ことを示唆している。

上記の知見は、亜鉛シグナリングが骨格筋と皮膚の維持に関与することを明示している。実際に、成人の総亜鉛量の約 70%が骨格筋と皮膚に存在し、その量は加齢に伴って減少して、亜鉛の減少とサルコペニアや褥瘡等の老齢性疾患との関連性が報告されている。しかしながら、「亜鉛シグナリングはどのように骨格筋や皮膚の維持に貢献し、その異常はどのように病気を発症させるのか」については、まだ十分に解明されていない。一方、高齢化が進む日本では、有効な治療法が少ないロコモティブ症候群等の運動機能障害や、皮膚脆弱化による QOL の低下が問題視されている。すなわち、骨格筋および皮膚の形成と維持の機序解明と、関連疾患の予防と治療に係る方法の開発は、今後迎える超高齢化に備えるべき急務な課題であると考えた。

以上を背景として、骨格筋と皮膚に関連する事象の理解とそれらの病気の治療戦略に対し、亜鉛シグナリングという従来とは異なるアプローチから挑むことを目的として本研究を遂行した。現時点において、ZIP10 または ZIP14 を発現する細胞を追跡できる遺伝子改変マウスを完成した。さらに、亜鉛シグナリングの標的分子を単離する実験系を構築した。加えて、亜鉛シグナリングに影響を及ぼす化合物のスクリーニング系を確立した。これらの研究資材は、骨格筋と皮膚の理解と疾患の治療法開発に新しい知見をもたらす可能性があると考える。

方　法

1. 筋萎縮における ZIP14 の役割解明

筋萎縮における ZIP14 の役割を解明するために、ZIP14 発現細胞の特徴と、ZIP14 を介する亜鉛シグナリングの機序を解析した。ZIP14 発現細胞の特徴を解析するために、*EGFP-IRES-creERT2* 遺伝子カセットを *Zip14* プロモーター下流に挿入（KI）した *Zip14-GFP*-KI マウスを作製した。

ZIP14を介する亜鉛シグナリングの機序を解明するために、Zn^{2+} conditional proteomics法（AIZin-2試薬を用いて亜鉛イオンと相互作用するタンパク質をFITCで標識する）を薬剤誘導性ZIP14発現HEK293細胞に適用した。具体的には、ZIP14の発現に依存して細胞内に導入した亜鉛イオンと相互作用するタンパク質を検出するために、AIZin-2試薬を用いたZn^{2+} conditional proteomics法を薬剤誘導性ZIP14発現HEK293細胞に適用して、ZIP14の発現に依存した細胞内の蛍光発色の検出を試行した。

2. 表皮形成における ZIP10 役割解明

表皮形成における ZIP10 の役割を解明するために、ZIP10 発現細胞の特徴を解析した。具体的には、*Zip10* プロモーター下流に *EGFP-IRES-CreERT2* 遺伝子カセットを KI した *Zip10-GFP*-KI マウスを作製した。ZIP10 発現細胞とその子孫細胞を可視化するために、*Zip10-GFP*-KI マウスと *tdTomato*-KI マウスを交配して *Zip10-GFP/Tomato*-KI マウスを作製した。本マウスの ZIP10 発現細胞には、タモキシフェン依存的に活性化する CreERT2 が発現するため、当該マウスをタモキシフェンで処理すると、ZIP10 発現細胞では遺伝子組換えが生じて Tomato を発現する。従って、本マウスを用いることにより、ZIP10 発現細胞の子孫細胞を赤色に発光させることが可能となる。本マウスにタモキシフェンを投与し、皮膚における GFP と Tomato の発現を免疫染色法で解析した。

3. 創薬関連研究

薬剤誘導性 ZIP14 発現 HEK293 細胞を適用して、ZIP14 の発現に依存した亜鉛導入に伴う細胞増殖能の変化を指標にした化合物スクリーニング系の構築を試行した。

結果および考察

1. 筋萎縮における ZIP14 の役割解明

1）ZIP14 発現細胞の特徴解析

Zip14-GFP-KI マウスを作製し（図 1a）、この *Zip14-GFP*-KI マウスに由来する細胞を用いて GFP の発現状況を精査した。具体的には、ZIP14 を高発現することが知られている肝臓由来の初代培養肝細胞における GFP の発現状況を FACS で解析した。その結果、*Zip14-GFP*-KI マウス由来の肝細胞では、GFP 陽性の細胞集団が確認された（図 1b）。現在、*Zip14-GFP*-KI マウスと *tdTomato*-KI マウスを交配して *Zip14-GFP/Tomato*-KI マウスを作製している。*Zip14-GFP/Tomato*-KI マウスは、がん悪液質の病態形成時における ZIP14 発現細胞の特徴と運命系譜の解析に適用する。

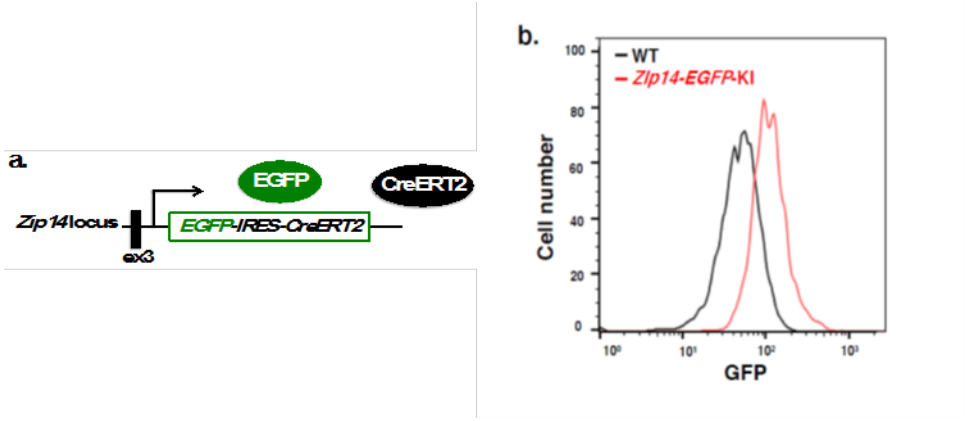


図1. *Zip14-GFP*-KIマウスの作製と初代培養肝細胞におけるGFPの発現

a）*Zip14-GFP*-KIマウスの*Zip14*遺伝子座の構造を示す。*EGFP-IRES-creERT2* 遺伝子カセットを*Zip14*遺伝子座のエクソン3（ex3）に挿入した。

b）*Zip14-GFP*-KIマウス由来の初代培養肝細胞におけるGFPの確認

2）ZIP14 を介する亜鉛シグナルの機序解明

ZIP14 を介する亜鉛シグナルの機序を解明するために、Zn^{2+}conditional proteomics 法を薬剤誘導性 ZIP14 発現 HEK293 細胞に適用して、ZIP14 依存的に導入した亜鉛イオンと相互作用するタンパク質の検出を試行した。具体的には、AIZin-2 試薬で薬剤誘導性 ZIP14 発現 HEK293 細胞を処理し、ZIP14 の発現誘導に依存した細胞内の蛍光発色を検出した（図 2）。

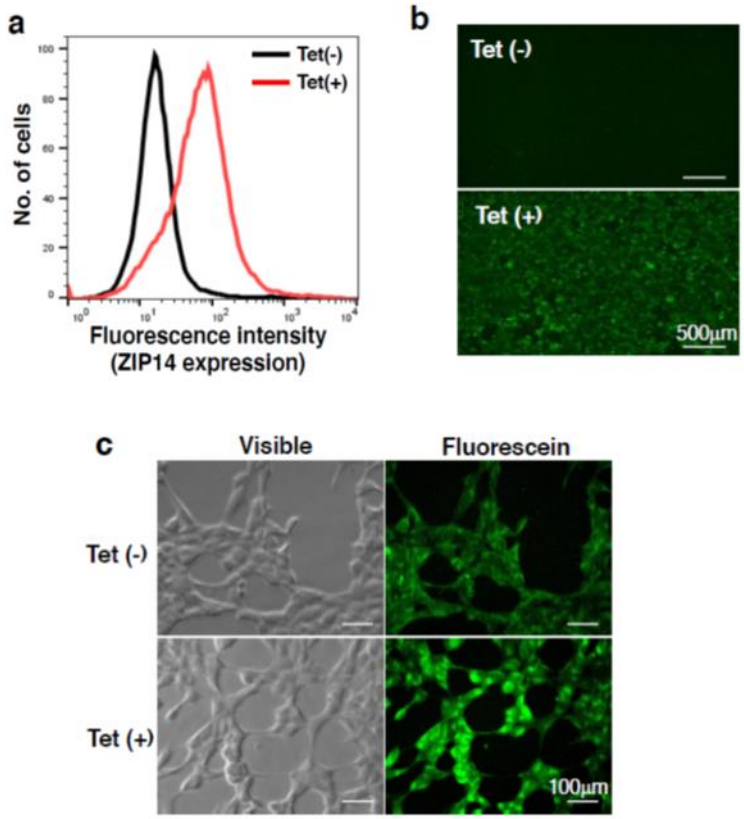


図2. ZIP14依存的に導入された亜鉛イオンと相互作用する分子の検出

a) テトラサイクリン（Tet）を処理した薬剤誘導性ZIP14発現HEK293細胞に発現誘導されるZIP14をFACSで検出した。

b) ZIP14の発現依存的に細胞内に導入した亜鉛イオンをFluozin 3で検出した。

c) AIZin-2試薬を適用して、ZIP14依存的に亜鉛イオンと相互作用するタンパク質を検出した。

2. 表皮形成における ZIP10 役割解明

ZIP10 発現細胞の子孫細胞を可視化するために、*Zip10-GFP*-KI マウスと *tdTomato*-KI マウスを交配して *Zip10-GFP/Tomato*-KI マウスを作製した（図 3a）。本マウスの ZIP10 発現細胞には、タモキシフェン依存的に活性化される CreERT2 が発現する。当該マウスをタモキシフェンで処理すると、処理期間以降に遺伝子組換えが生じて、ZIP10 発現細胞の子孫細胞は Tomato を発現して赤色発光する（図 3b）。したがって、本マウスは ZIP10 発現細胞とその子孫細胞の可視化に有効である。本マウスにタモキシフェンを投与し、皮膚における GFP と Tomato の発現を免疫染色法で解析した。その結果、タモキシフェンで処理した本マウスの皮膚では、本来 ZIP10 が発現する毛包外根鞘（図 3c 右、3d 左）とは異なる部位に、Tomato の発現を確認した（図 3d 右）。すなわち、ZIP10 発現細胞の子孫細胞が、毛包外根鞘以外の部位に移動していることが示唆された。

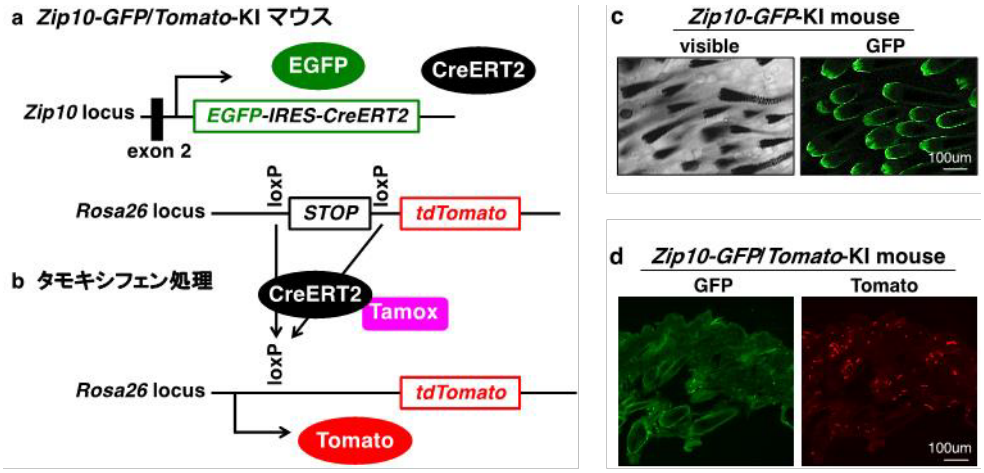


図3. *Zip10-GFP*-KIマウスと*Zip10-GFP/Tomato*-KIマウスの作製と解析

a) *Zip10-GFP*-KIマウスおよび*Zip10-GFP/Tomato*-KIマウスの遺伝子座の構成を示す。*Zip10-GFP*-KIマウスは、*EGFP-IRES-creERT2*遺伝子カセットを*Zip10*遺伝子座のエクソン2（exon2）に挿入して作製した（上）。

b) タモキシフェン（Tamox）処理によるTomatoの発現機構

c) *Zip10-GFP*-KIマウスの毛包外根鞘におけるGFPの発現

d) *Zip10-GFP/Tomato*-KIマウスの皮膚におけるGFPの発現（左）とTomatoの発現（右）

皮膚の広域な部位にZIP10発現細胞の子孫細胞（Tomato発現細胞）が存在することが示されたことから、ZIP10発現細胞の子孫細胞が皮膚組織の形成や維持に多様な役割を持つことが示唆された。実際に、ZIP10はB前駆細胞に発現することが示されており、Tomatoを発現するZIP10発現細胞の子孫細胞は血球系細胞である可能性も考えられた。今後は、*Zip10-GFP/Tomato*-KIマウスからGFPとTomatoを指標にしてZIP10発現細胞とその子孫細胞を単離し、RNA-sequenceやsinge cell analysisで遺伝子発現を精査して、ZIP10発現細胞とその子孫細胞の特徴を解析する。

3. 創薬関連研究

ZIP14の発現に依存した亜鉛導入を確認するとともに（図2b）、ZIP14を介した亜鉛の導入による細胞増殖抑制作用を確認した（図4）。薬剤誘導性ZIP14発現HEK293細胞を用いることにより、ZIP14に依存した亜鉛の過剰導入による細胞増殖障害作用を指標にしたZIP14阻害剤のスクリーニング系の構築が可能になると考える。

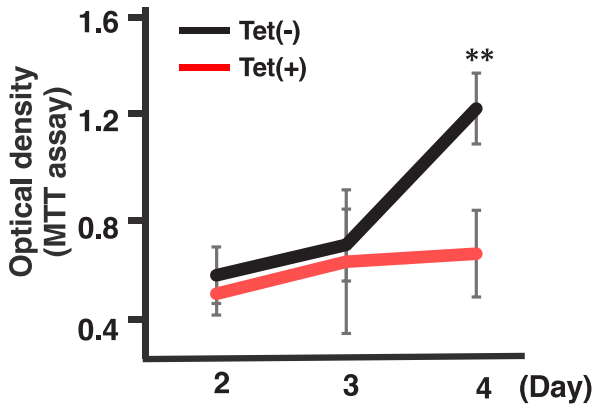


図4. 薬剤誘導性ZIP14発現HEK293細胞におけるZIP14の発現依存的な亜鉛導入と細胞増殖抑制効果

薬剤（Tet）誘導性ZIP14発現HEK293細胞を適用して、ZIP14を介した亜鉛導入による細胞増殖抑制作用を確認した。Student's t-testにより解析し、$p<0.01$の場合に**を表示した。

共同研究者

本研究は、京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻生物化学講座の浜地格教授、高知大学医学部皮膚科学講座の佐野栄紀教授、徳島文理大学薬学部薬学科の原貴史講師との共同研究である。

文　献

1) Zinc Signaling, second edition (edited by Fukada T, and T. Kambe), Springer Nature, Singapore, 2019. doi: 10.1007/978-981-15-0557-7, ISBN 978-981-15-0557-7

2) Wang G, A. Biswas, W. Ma, M. Kandpal, C. Coker, P. Grandgenett, M. Hollingsworth, R Jain, K Tanji, S Lopez-Pintado, A. Borczuk, D. Hebert, S. Jenkitkasemwong, S. Hojyo, R. Davuluri, M. Knutson, T. Fukada, S. Acharyya1. Metastatic cancers promote cachexia through ZIP14 upregulation in skeletal muscle. Nature Medicine 24: 770–781, 2018. doi: PubMed PMID: 29875463, PubMed Central PMCID: PMC6015555.

3) Bin BH, J. Bhin, M. Takaishi, K. Toyoshima, S. Kawamata, K. Ito, T. Hara, T. Watanbe, T. Irie, T.Takagishi, SH. Lee, HS. Jung, S. Rho, J. Seo, DH. Choi, D. Hwang, H. Koseki, O. Ohara, S. Sano, T. Tsuji, K. Mishima, T. Fukada. Requirement of zinc transporter ZIP10 for epidermal development: Implication of the ZIP10–p63 axis in epithelial homeostasis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 114: 12243-12248, 2017. doi: 10.1073/pnas.1710726114. PubMed PMID: 29078349; PubMed Central PMCID: PMC5699059