

# 筋疾患における亜鉛シグナルの分子基盤と新規治療戦略

徳島文理大学薬学部 先端医療薬学コース病態分子薬理学研究室  
深田 俊幸

## 1. 報告の要旨

本研究は、骨格筋における亜鉛シグナルの役割と、亜鉛シグナルの制御による創薬と再生医療を究明するものである。具体的には、骨格筋の機能に関与する亜鉛トランスポーターZIP13と筋萎縮に関わるZIP14に着目して、骨格筋の恒常性における亜鉛シグナルの分子基盤と新たな治療戦略について研究した。骨格筋特異的 *Zip13*-KOマウスおよびEDSSPD3患者由来iPS細胞を用いて検討した結果、ZIP13が骨格筋の糖代謝に関与することが示された。一方、*Zip14*-GFP-KIマウスを作成し、本マウス由来細胞にGFP陽性の細胞集団を確認した。さらに、薬剤誘導性ZIP14発現細胞を用いて、ZIP14阻害剤のスクリーニング系を構築した。本研究で作成した遺伝子改変マウスや実験系は、骨格筋の恒常性における亜鉛シグナルの分子基盤の解明と、筋疾患に対する新たな創薬と再生医療研究に貢献すると考える。

## 2. 目的

亜鉛は生命維持に必須であり、亜鉛の恒常性は全ライフコースの様々な生理現象や病態形成に関わっている。具体的には、加齢に伴って次第に体内の亜鉛量が低下すること、亜鉛の減少が運動器の機能低下・骨粗鬆症・関節リウマチ・二型糖尿病などの病態形成に関与することが示されている。また、これらの病気の治療に用いられるキレート作用を持つ医薬品によっても亜鉛欠乏がもたらされることが示されている。すなわち、亜鉛の恒常性の異常と、現代人が対峙する加齢に伴う運動器の機能低下や生活習慣病の間には、密接な関連があることが示唆されている。このように、亜鉛恒常性の変化と運動器の機能には関連性があると認識される一方で、亜鉛がどのように骨格筋の形成と維持に関わるのか、その役割と分子メカニズムはまだ解明されていない。骨格筋は、運動器としてだけでなく、各種ホルモンの産生器官や受容器官としての役割も演じる。従って、骨格筋の機能低下の影響は臓器間の連携にも波及し、個体全体の生命活動に支障をもたらす。超高齢化社会を迎えた日本では、運動機能に支障をもたらす筋疾患の機序解明と、その異常を改善する治療方法の開発が求められている。これらの背景から、骨格筋の理解と治療戦略に亜鉛シグナルに着目して究明することを目的として本研究を開始した。

報告者らの先行研究から、骨格筋の機能低下に亜鉛シグナルの異常に関わることが示されている(文献1,2,3)。具体的には、亜鉛トランスポーターZIP13の亜鉛シグナルは骨格筋の機能に必要であり、ZIP13の機能破綻は筋力の低下をもたらす。一方、炎症性サイトカインは骨格筋関連細胞にZIP14を発現誘導し、ZIP1の亜鉛シグナルは骨格筋の萎縮を促進する。これらの結果は、骨格筋の維持における亜鉛シグナルの相反する役割を示している。申請者は、この「ZIP13とZIP14を介する亜鉛シグナルの相反する役割」に着目して骨格筋における亜鉛シグナルの役割と分子機序を解明し、亜鉛シグナルの制御による新しい治療戦略を構築することを目的として開始した。本研究の成果は、高齢化が進む日本で問題視されている骨格筋の機能低下に新しい理解をもたらして、従来法とは異なる治療戦略の構築に貢献すると考えている。

## 3. 方法

### ZIP13の亜鉛シグナルの役割の解明

ZIP13の亜鉛シグナルがどのように骨格筋の恒常性に関わるのか、その役割と分子機序は未解明である。そこで、*Zip13*遺伝子をノックダウン(*Zip13*-KD)したマウス筋芽細胞株C2C12と、EDSSPD3患者に由来する線維芽細胞から樹立したiPS細胞株を用いて、骨格筋細胞の分化と機能におけるZIP13の亜鉛シグナルの作用点を同定する。具体的には、上述の細胞株に筋分化誘導系を適用し、ZIP13の機能喪失で生じる変化を解析する。さらに、

EGFP-IRES-CreERT2遺伝子カセットを*Zip13*プロモーター下流にノックイン(KI)した*Zip13*-GFP-KIマウスを作成し、当該マウスとTd-Tomato-KIマウスを交配して、*Zip13*-GFP/Tomato-KIマウスを作成する。本マウスを用いて細胞系譜を解析することで、骨格筋形成におけるZIP13発現細胞の発生から分化までの系譜を解明する。さらに、*Zip13*遺伝子 floxed(*Zip13*flox)マウスをMyoD-Creマウスと交配して作成した骨格筋特異的*Zip13*欠損マウス(*Zip13*<sup>MyoD</sup>-cKO)を用いて、骨格筋におけるZIP13の生理的役割を精査する。

#### ZIP14 の亜鉛シグナルの役割の解明

申請者は、ZIP14の亜鉛シグナルが骨格筋の萎縮をもたらして、がん悪液質の発症に関わることを見出した。この結果は、骨格筋の萎縮におけるZIP14の促進的な役割を示すものであるが、その詳細な分子機序は不明である。そこで、*Zip14*遺伝子を誘導的に発現するHEK293細胞株を適用して、ZIP14の発現上昇で生じる遺伝子発現の変化を解析する。さらに、上記の細胞にZn<sup>2+</sup>-conditional proteomics法を適用して、筋萎縮に関わるZIP14の亜鉛シグナル伝達経路を構成する分子群を同定する。加えて、EGFP-IRES-CreERT2遺伝子カセットを*Zip14*プロモーター下流に挿入した*Zip14*-GFP-KIマウスを用いて、骨格筋の萎縮過程におけるZIP14発現細胞の役割とその運命系譜について解明する。

### 4.成果および考察

#### ZIP13 の亜鉛シグナルの役割の解明

*Zip13*-KD C2C12細胞において、糖の取り込み能の低下が確認された。EDSSPD3患者に由来する線維芽細胞から樹立したiPS細胞株から分化させた骨格筋細胞で精査した結果、患者由来iPS細胞株から分化させた骨格筋細胞においても糖取り込み能の低下を確認した。そこで、これらの細胞における糖輸送体GLUT4の発現を精査した結果、両者において*Glut4*遺伝子の顕著な減少が確認された。すなわち、ZIP13はGLUT4の発現を介して、骨格筋細胞の糖代謝に関与する可能性が示唆された。*Zip13*-KD C2C12細胞を用いてインスリン誘導性の糖取り込み能を検討した結果、*Zip13*-KD C2C12細胞では対照細胞と比較して糖取り込み能が優位に低下した。インスリン刺激を介する応答性の低下が示唆されたため、*Zip13*<sup>MyoD</sup>-cKOMausを用いてインスリン抵抗性を解析した。その結果、*Zip13*<sup>MyoD</sup>-cKOMausでは、インスリンに対する応答の顕著な低下が確認された。さらに、本マウスを用いて活動量と酸素消費量を解析した結果、*Zip13*<sup>MyoD</sup>-cKOMausの活動量と酸素消費量の顕著な低下を確認した。すなわち、*Zip13*<sup>MyoD</sup>-cKOMausの糖代謝とエネルギー代謝の低下が示唆された。一方、*Zip13*-GFP-KIマウスとTd-Tomato-KIマウスを交配することにより、*Zip13*-GFP/Tomato-KIマウスを作成した。今後、本マウスを用いて骨格筋形成におけるZIP13発現細胞の系譜を解明する。

#### ZIP14の亜鉛シグナルの役割の解明

*Zip14*-GFP-KIマウスを作成し、この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1)。現在、*Zip14*-GFP-KIマウスとTd-Tomato-KIマウスを交配して*Zip14*-GFP/Tomato-KIマウスを作成している。*Zip14*-GFP/Tomato-KIマウスについては、筋萎縮におけるZIP14発現細胞の特徴と、ZIP14発現細胞の運命系譜の解析に適用する。

一方、ZIP14を介する亜鉛シグナルの機序を解明するために、AIZin-2試薬を用いたZn<sup>2+</sup>conditional proteomics法で薬剤誘導性ZIP14発現細胞を処理し、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)。さらに、薬剤誘導性ZIP14発現細胞を適用して、ZIP14の発現に依存した亜鉛導入を確認するとともに、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(図3)。薬剤誘導性ZIP14発現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。

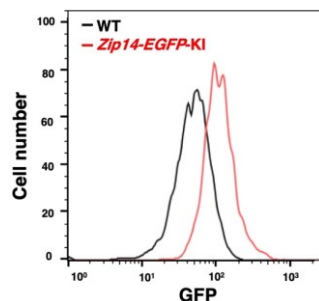


図1. *Zip14*-GFP-KI マウスの初代培養肝細胞におけるGFPの発現  
*Zip14*-GFP-KIマウスに由来する初代培養肝細胞におけるGFPの発現を示す。

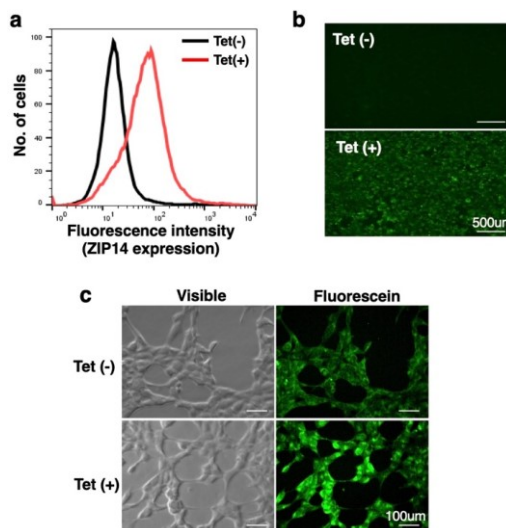


図2.  $Zn^{2+}$ conditional proteomics 法を用いたZIP14依存的に導入した亜鉛と相互作用する分子の検出

- 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) ZIP14依存的に亜鉛イオンと相互作用するタンパク質をAIZin-2試薬で検出した。

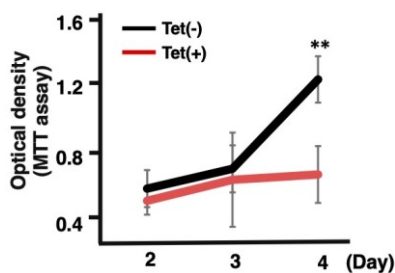


図3. ZIP14 の発現依存的な亜鉛導入による細胞増殖の抑制

薬剤(Tet)誘導性ZIP14発現HEK293細胞を適用して、ZIP14を介する亜鉛導入による細胞増殖の抑制作用を確認した。\*\*: $p < 0.01$  (Student's t-test)

### 謝辞

アステラス病態代謝研究会より拝受しました助成金により、本研究は大きく進展いたしました。本研究にご支援を賜りました公益財団法人アステラス病態代謝研究会に、心より深く感謝申し上げます。

### 文献

1. **Zinc Signaling, second edition** (edited by Fukada T, and T. Kambe), Springer Nature, Singapore, 2019
2. Fukada T, et al. *PLoS ONE* 3: e3642, 2008
3. Wang G, et al. *Nature Medicine* 24: 770–781, 2018.