

エストロゲン受容体陽性乳がんの 抗がん活性を制御する 亜鉛と亜鉛トランスポーター

崎谷愛未¹⁾ ● 中瀬朋夏^{1, 2)} ●

● 武庫川女子大学薬学部薬剤学研究室¹⁾

● 武庫川女子大学バイオサイエンス研究所²⁾

要約

現在、乳がんは日本人女性（30歳から64歳）の死亡原因第1位であり、年間約9万人が新たに乳がんと診断されている。乳がんの約70%は女性ホルモンであるエストロゲンに感受性があるため、その治療にはタモキシフェンを代表とするホルモン療法が選択される。しかし、ホルモン療法中には、副作用の発現や薬剤耐性を頻繁に引き起こすだけでなく、ホルモン療法が奏効しない症例もあることが報告されており、薬剤感受性の制御機構解明や新たな治療法の開発は喫緊の課題である。我々は、必須微量元素である亜鉛とその輸送体である亜鉛トランスポーターの制御によって、エストロゲン受容体陽性乳がんに対する抗がん活性を操ることに成功した。亜鉛を利用した安全で効果的な新規乳がん治療戦略の開発について、我々の最新の知見を中心に紹介する。

KEY WORDS

エストロゲン受容体陽性乳がん, 亜鉛, 亜鉛トランスポーター, オートファジー, Bcl-2

はじめに

現在、乳がんは日本人女性（30歳から64歳）の死亡原因第1位であり、その患者数・死亡数はともに年々増加の一途を辿っている¹⁾。乳がんの70-80%は女性ホルモン受容体（エストロゲン受容体）が陽性で、細胞増殖は女性ホルモンのエストロゲンに依存する。そのため、抗エストロゲン剤タモキシフェンをはじめとするホルモン療法が選択され、比較的治療効果は高く、予後も良い。しかし、ホルモン療法中に、副作用の発現や効果の減弱・薬剤耐性を引き起こす症例が少なからず報告されている²⁻⁴⁾。さらに、ホルモン療法が奏効しない症例が20%もあり、その予後は極めて悪い²⁾。これは、現在確立されている治療法に限界があることを意味するが、薬剤感受性の制御機構や予後を決める因子は未だ解明されていない。

近年、エストロゲン受容体陽性乳がんのホルモン療法に対する耐性獲得には細胞死制御分子Bcl-2の高い発現が関与することが報告されている²⁻⁴⁾。Bcl-2は、アポトーシス抑制作用を有するがん細胞の生存促進性因子であることから、Bcl-2の阻害は抗がん戦略の1つとして重要視され、効果的な抗がん活性の発揮と薬剤耐性の克服に期待が高まっている。現在、開発されてきたBcl-2阻害剤の一部のリード化合物については臨床試験が進められている⁵⁾。Bcl-2阻害剤の中でも低分子化合物のYC137は、ヒト乳がん細胞MDA-MB435Bに対して分子特異的に、かつがん選択的に細胞毒性を発揮し、アポトーシス誘導療法に有効であることが、*in vitro*実験系で示されてきた⁶⁾。しかし、エストロゲン受容体陽性乳がん細胞においてYC137のBcl-2阻害による反応性は不明で、治療応用には、さらなる基礎的な検討が強く求められている。

さらに、乳がんの細胞機能の制御や悪性化のプロセスには、亜鉛イオン (Zn^{2+}) とその輸送を担う亜鉛トランスポーターが密接に関連しているという報告が相次ぎ (表1), Zn^{2+} は乳がんの治療戦略を考える上での新たなアプローチとして注目されている⁷⁻¹¹⁾。亜鉛は生体内に微量に存在する生命活動の維持に必須な生命金属であり、その生体内分布は亜鉛トランスポーターが担う。亜鉛トランスポーターは、その分子種によって発現が局在化し、細胞内 Zn^{2+} 濃度を厳密に制御することで、生体の恒常性維持に寄与している¹²⁻¹⁴⁾。さらに、亜鉛トランスポーターによって輸送される Zn^{2+} は、選択

的に標的分子を制御し、この亜鉛シグナルを介して、細胞機能は特異的に調節され、病態形成を時間的・空間的に支配されていることが明らかになってきた (図1)⁷⁻¹⁵⁾。特に乳がんにおいては、細胞の外から細胞質の向きに Zn^{2+} を輸送する亜鉛トランスポーター ZIP6 の発現量が低く、亜鉛シグナルの変調をきたした乳がん患者は、生命予後が著しく悪いことが報告されている¹⁵⁾。

我々も、ZIP6 の発現減少はまた、上皮系細胞が間葉系の悪性化形質を獲得する上皮間葉転換を誘導することや、細胞機能の根幹を支えるアポトーシスの誘導を抑制し、細胞死を制御できることを

表 1 乳がんとの関連性が強い亜鉛トランスポーター

亜鉛トランスポーター (遺伝子名)	関連する乳がんの種類	細胞における局在
ZnT2 (SLC30A2)	エストロゲン受容体陽性乳がん	分泌小胞, リソソーム
ZIP6 (SLC39A6)	エストロゲン受容体陽性乳がん	細胞膜
ZIP7 (SLC39A7)	タモキシフェン耐性乳がん	小胞体
ZIP10 (SLC39A10)	転移性乳がん	細胞膜

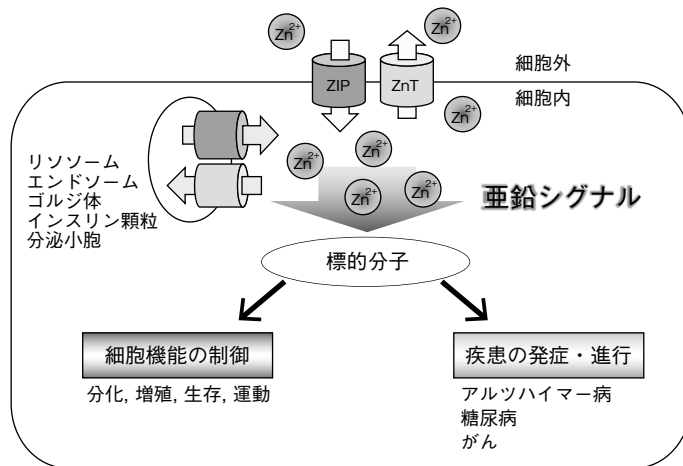


図 1 亜鉛および亜鉛トランスポーターを介した細胞機能と疾患の制御

亜鉛トランスポーターは、細胞内亜鉛濃度を時空間的に調節している。亜鉛トランスポーターによって輸送された亜鉛イオンは、選択的に標的分子を制御する。この亜鉛シグナルを介して、細胞機能は特異的に制御され、病態形成にもつながる。

明らかにしてきた⁹⁾。これらの研究成果は、乳がんにおけるZIP6を発信とする亜鉛ネットワークが、悪性化機構の獲得に重要であることを示唆しており、さらなるZIP6とZn²⁺の機能的役割の解明は、新たな乳がん分子標的治療法開発への突破口になると考える。

本研究では、Zn²⁺を利用した新規乳がん治療法の開発を目指し、エストロゲン陽性ヒト乳がん細胞MCF-7を用いて、乳がん細胞内外のZn²⁺がYC137の抗がん活性に与える影響、ならびに、タモキシフェンとZn²⁺併用投与による効果的な抗がん治療の可能性について検討した。その結果、Zn²⁺を併用するだけでYC137またはタモキシフェンの抗がん活性を著しく増大できた。さらに、ZIP6によるZn²⁺輸送活性が抗がん効果を制御できることを初めて明らかにした。これら我々の最新の知見を中心に概説し、Zn²⁺を用いた乳がん治療応用の可能性について迫る。

1 Bcl-2 阻害剤 YC137 の 抗がん活性を制御する Zn²⁺ と 亜鉛トランスポーター ZIP6

乳がん細胞の生存能力と細胞死機構は、薬剤感受性や作用効果に重要な役割を果たす。Bcl-2は、抗アポトーシス作用や抗オートファジー作用を有し、その発現と機能は乳がん悪性化の鍵を握ることが知られている²⁻⁴⁾。我々はBcl-2に特異的で、がん選択性の高いBcl-2阻害剤としてYC137⁵⁾を使用し、MCF-7におけるYC137の細胞毒性作用とZn²⁺の役割について検討した。

まず、MCF-7にYC137を処置すると、YC137の濃度依存的かつ時間依存的に細胞障害が観察され、細胞生存率は著しく減少した。その細胞生存率の減少には、Bcl-2抑制を介したアポトーシス型細胞死の誘導が大きく関与した。次に、YC137とZn²⁺の併用効果を検討するため、培地中に塩化亜鉛を添加して、YC137を処置すると、YC137の細胞毒性は塩化亜鉛の濃度と処置時間に依存して増大した。そのIC₅₀値は、YC137単独処置よりも、約6分の1にまで低下させることができ、塩化亜鉛

の併用により、YC137の感受性を増大させることに成功した。

さらに、塩化亜鉛の併用によるYC137の細胞毒性増大の機序には、アポトーシスとオートファジーのクロストークとしての役割を有するBeclin-1の系を介したオートファジーの誘発と、アポトーシス型から非アポトーシス型細胞死へのZn²⁺刺激による細胞死タイプの転換が必要であった。また、塩化亜鉛の併用によるYC137の細胞毒性の増強は、MCF-7において細胞内Zn²⁺の供給に重要なZIP6をノックダウンした細胞では消失し、ZIP6によるZn²⁺の供給を必要とすることを明らかにした。細胞透過性Zn²⁺イオノフォアZinc pyrithione (ZnP) で強制的に細胞内亜鉛濃度を上げてYC137を処置すると、YC137単独よりも、細胞生存率は著しく減少した。その減少は、細胞透過性Zn²⁺特異的キレート剤*N,N,N',N'*-tetrakis(2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN) の添加により、消失することを確認している。以上より、YC137の細胞毒性は塩化亜鉛の併用により増大し、その制御にZn²⁺による細胞死タイプの変換とZIP6によるZn²⁺の輸送活性が関与することを明らかにした(図2)。

これまで、細胞外へのZn²⁺の添加や細胞内Zn²⁺の増加は、オートファジーを誘導することが報告されており、本研究においても一致する見解が得られている¹⁶⁾。近年、がんにおけるオートファジーは、細胞死機構の制御に関わり、抗がん効果や薬剤耐性に影響を与えることが分かっているものの、がんのタイプや実験条件によって、オートファジーの役割は様々である¹⁷⁾。一般に、オートファジーは抗がん剤耐性を促進する現象として捉えられ、抗がん剤の耐性を緩和させる手段として、オートファジー阻害剤の使用は有用であることが報告されている¹⁸⁾。

一方、本研究では、塩化亜鉛の処置により、Beclin-1のシステムを介して、細胞生存に必要なオートファジーの恒常性を破綻し、オートファジーを過剰に引き起こすことで、YC137の抗がん活性を増大した。さらに、MCF-7におけるZn²⁺に依存したオートファジーの誘導には、ZIP6を介した

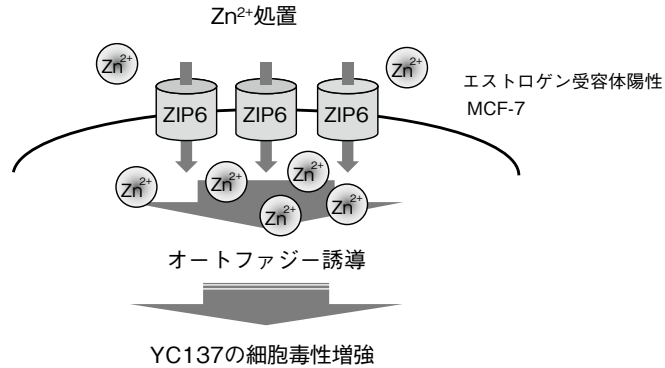


図2 亜鉛によるYC137の抗がん活性増大

ZIP6によるZn²⁺輸送活性が乳がんに対する抗がん効果を制御できることを初めて示し、亜鉛は新たな乳がん治療戦略の強力なツールとして期待される。

Zn²⁺の輸送活性を必要とした。これまで、オートファジーの誘導には、複数の亜鉛トランスポーターが関与するとの報告があるものの、オートファジー誘導シグナルとの関係は明確にされていない¹⁶⁾。塩化亜鉛併用によるYC137の抗がん活性の増大には、ZIP6を中心とするZn²⁺輸送系とその標的分子が細胞死機構とリンクして細胞死のタイプを変えた可能性が考えられ、さらなる詳細な分子機序の解明が期待される。

これまで、我々は、乳がん細胞におけるZIP6発現の減少は、乳がんの悪性を促進することを示してきた⁸⁻¹¹⁾。そのため、YC137と塩化亜鉛の併用による治療応用は、ZIP6の発現が高い初期の乳がんを対象として、薬剤耐性を生じにくい有効な手段になり得ると考える。さらには、現在臨床で用いられている抗がん剤の効果をより高める戦略やBcl-2が規定する薬剤耐性を克服する手段に応用できる可能性が考えられる。これまで、Bcl-2を標的とした乳がんの治療戦略には、Bcl-2のRNA干渉(RNAi)法のような遺伝子治療の観点から多くの研究が進められているが、siRNAのがん組織への選択性や血中での安定性など問題が多い。さらに、Bcl-2阻害剤であるベネトクラクスは、現在、急性骨髄性白血病や慢性リンパ性白血病において、すでに臨床応用されているが、適用範囲が限定され、

より高い効果発現が求められている¹⁹⁾。我々は、YC137と塩化亜鉛の併用が正常乳腺細胞には障害を与えないことを明らかにしており、早期実用化を目指して、*in vivo*実験においても副作用なく使用できるか否か、検証が待たれる。

2 亜鉛を用いたホルモン療法剤タモキシフェンの効果制御

タモキシフェンは、現在ホルモン療法に使われている代表的な抗エストロゲン剤である。タモキシフェンの効果発現は、エストロゲン受容体の有無だけではなく、受容体結合と活性に関わる因子や、乳がん細胞自体が持つ細胞死機構によって調節されているが、それら制御の決め手は未だ不明である²⁻⁴⁾。我々はより効果的なホルモン療法を目指して、Zn²⁺の併用により、タモキシフェンの抗がん活性を操ることができるか否か、検討した。その結果、硫酸亜鉛とタモキシフェンを併用処置すると、タモキシフェン単独に比べて、抗がん活性は著しく増大し、IC₅₀値を約50%にまで抑制することに成功した。さらに、ZnPを処置して、細胞内Zn²⁺濃度を強制的に増大させると、タモキシフェンの活性は増大し、その活性増大はTPENの処置により消失した。よって、タモキシフェンの抗がん活性も

細胞内 Zn^{2+} 濃度の増加が重要であることを示した。 Zn^{2+} 併用タモキシフェンの活性増大には、 Zn^{2+} 誘導の過剰なオートファジーが必要であることを明らかにしている。

これまで、大腸がんにおいて、抗がん剤である5-フルオロウラシルは、細胞内の Zn^{2+} 濃度を増加させ、その結果、がん抑制遺伝子p53の活性化やNF- κ Bの抑制を介して、腫瘍増殖を抑制することが報告されている²⁰⁾。また、5-フルオロウラシルと Zn^{2+} の併用は、5-フルオロウラシル単独での処置に比べて、著しく抗がん活性が高く、5-フルオロウラシル耐性細胞の感受性をも回復できることが示されている²⁰⁾。大腸がん細胞移植マウスにおいても、 Zn^{2+} の併用により、抗がん剤であるアドリアマイシンの投与量を減らした条件で、再発なくがん治療に成功している²¹⁾。これらの結果は、亜鉛の動態や亜鉛トランスポーターとの関与が不明で、我々がYC137やタモキシフェンの研究成果で得ている Zn^{2+} によるオートファジーについては示されていない。 Zn^{2+} 併用による抗がん剤の効果増大は、がんのタイプや抗がん剤の種類によって、アウトプットは同じでも、そこに至る効果発現のプロセスは、異なるのかもしれない。現在、 Zn^{2+} 併用タモキシフェンの活性増大の機序について、寄与する亜鉛トランスポーターと標的分子の解明を精力的に進めている。これら研究成果は、これまで困難であったタモキシフェン耐性のメカニズムの解明と、タモキシフェン耐性を回避する治療法開発の手掛かりに直結することが期待される。

おわりに

乳がんは、診断技術の進歩により早期発見が可能な疾患になりつつあるが、乳がん細胞は常にその性質を巧みに変化させている。エストロゲン陽

性乳がんの悪性化が進行すると、ZIP6やエストロゲン受容体の発現が減少することが知られており、分子標的治療が困難になるため、乳がん初期段階での確実な治療法の確立が強く求められている。今回、我々はエストロゲン受容体陽性乳がんにおいて、ZIP6により細胞内に供給された Zn^{2+} が抗がん剤の効果を精密に制御できる可能性を示し、 Zn^{2+} は初期乳がん治療の有効な手段になる可能性を見出した。これまで、乳がん患者では、健常人と比較して、血清中の亜鉛濃度は低く、乳がん組織で亜鉛量が高い傾向にあることが臨床において報告されている²²⁻²⁴⁾。そのため、 Zn^{2+} の投与は乳がんの促進につながる懸念があった。しかし、我々は、 Zn^{2+} と抗がん剤の併用により、乳がんの恒常性が破綻し、より細胞死を誘導できる結果を得た。 Zn^{2+} は新たな乳がん治療戦略の強力なツールとして期待できる。これからも、ZIP6を中心とした乳がんにおける亜鉛ネットワークを明らかにし、*in vivo*実験においても、抗がん剤の効果と副作用の発現を Zn^{2+} によって制御することが可能か否か、挑戦していきたい。

謝辞

本稿で紹介した研究の一部は、武庫川女子大学薬学部薬剤学研究室で実施したものであり、松井千紘助教、波多野有紀修士、片居博文那氏、関根由梨佳氏、田中杏氏、中瀬友梨香氏、中西優奈氏、錦見佳苗氏、藤原知里氏、巻野七海氏、松本薫氏、三好陽香氏、湯谷玲子講師に心から感謝致します。また、ご助言をいただいた大阪府立大学大学院理学系研究科中瀬生彦教授に深謝致します。本稿で取り上げた研究の一部は、JSPS科研費21K06567(中瀬朋夏)、18K06676(中瀬朋夏)、15K07955(中瀬朋夏)、内藤記念科学振興財団(中瀬朋夏)の助成を受けたものです。

文 献

- 1) World Cancer Research Fund International. Cancer survival statistics <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-survival-statistics/> (accessed February 21, 2022)
- 2) Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG); Davies C, Godwin J, Gray R, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *The Lancet* 378: 771-784, 2011
- 3) Musgrove EA, Sutherland RL. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer* 9: 631-643, 2009
- 4) Davies C, Pan H, Godwin J, et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *The Lancet* 381: 805-816, 2013
- 5) Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med* 19(2): 202-208, 2013
- 6) Real PJ, Cao Y, Wang R, et al. Breast cancer cells can evade apoptosis-mediated selective killing by a novel small molecule inhibitor of Bcl-2. *Cancer Res* 64(21): 7947-7953, 2004
- 7) Takatani-Nakase T, Matsui C, Maeda S, et al. High glucose level promotes migration behavior of breast cancer cells through zinc and its transporters. *PLOS ONE* 9(2): e90136, 2014
- 8) Takatani-Nakase T, Matsui C, Takahashi K. Role of the LIV-1 subfamily of zinc transporters in the development and progression of breast cancers: A mini review. *Biomed Res Clin Prac* 1(3): 71-75, 2016
- 9) Matsui C, Takatani-Nakase T, Hatano Y, et al. Zinc and its transporter ZIP6 are key mediators of breast cancer cell survival under high glucose conditions. *FEBS letters* 591(20): 3348-3359, 2017
- 10) Takatani-Nakase T. Zinc Transporters and the Progression of Breast Cancers. *Biol Pharm Bull* 41(10): 1517-1522, 2018
- 11) Takatani-Nakase T, Matsui C, Sakitani M, et al. ZIP6-centered zinc regulatory and malignant characteristics of breast cancer cells. *Metallomics Research*. 2022
- 12) Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, et al. The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism. *Physiol Rev* 95: 749-784, 2015
- 13) Kambe T, Taylor KM, Fu D. Zinc transporters and their functional integration in mammalian cells. *J Biol Chem* 296: 100320, 2021
- 14) Hara T, Takeda T, Takagishi T, et al. Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *J Physiol Sci* 67(2): 283-301, 2017
- 15) Kasper G, Weiser AA, Rump A, et al. Expression levels of the putative zinc transporter LIV-1 are associated with a better outcome of breast cancer patients. *Int J Cancer* 117(6): 961-973, 2005
- 16) Liuzzi JP, Guo L, Yoo C, et al. Zinc and autophagy. *Biometals* 27(6): 1087-1096, 2014
- 17) Li X, He S, Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Mol Cancer* 19(1): 12, 2020
- 18) Wang C, Hu Q, Shen HM. Pharmacological inhibitors of autophagy as novel cancer therapeutic agents. *Pharmacol Res* 105: 164-175, 2016
- 19) Suvarna V, Singh V, Murahari M. Current overview on the clinical update of Bcl-2 anti-apoptotic inhibitors for cancer therapy. *Eur J Pharmacol* 862: 172655, 2019
- 20) Arriaga JM, Greco A, Mordoh J, et al. Metallothionein 1G and zinc sensitize human colorectal cancer cells to chemotherapy. *Mol C Ther* 13(5): 1369-1381, 2014
- 21) Garufi A, Ubertini V, Mancini F, et al. The beneficial effect of Zinc(II) on low-dose chemotherapeutic sensitivity involves p53 activation in wild-type p53-carrying colorectal cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* 34: 87, 2015
- 22) Jouybari L, Kiani F, Akbari A, et al. A meta-analysis of zinc levels in breast cancer. *J Trace Elem Med Biol* 56: 90-99, 2019
- 23) Feng Y, Zeng JW, Ma Q, et al. Serum copper and zinc levels in breast cancer: A meta-analysis. *J Trace Elem Med Biol* 62: 126629, 2020
- 24) Rusch P, Hirner AV, Schmitz O, et al. Zinc distribution within breast cancer tissue of different intrinsic subtypes. *Arch Gynecol Obstet* 303: 195-205, 2021

Zinc and zinc transporter ZIP6 regulate the anticancer efficacy of targeted drug therapy for estrogen receptor-positive breast cancer

Manami Sakitani¹⁾, Tomoka Takatani-Nakase^{1, 2)}

Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University¹⁾, Institute for Bioscience, Mukogawa Women's University²⁾

Breast cancer is the leading cause of death among Japanese women (aged 30-64), and the number of patients and deaths is increasing year by year. About 70% of breast cancer is estrogen-dependent, a female hormone, and hormone therapy such as tamoxifen is selected for the standard regimens. However, it has been reported that hormone therapy not only causes frequent side effects and drug resistance, but also fails in some cases, therefore the elucidation of the regulatory mechanism of drug sensitivity and the development of new treatment methods is an urgent issue. We have succeeded in regulating the anticancer activity against estrogen receptor-positive breast cancer by using zinc, an essential trace element, through its transporter, zinc transporter ZIP6. In this paper, we focus on recent progress in understanding the emerging roles of zinc and ZIP6 in the regulation of drug therapy. We also discuss the possibility and future challenges of innovative new breast cancer strategies using zinc and ZIP6.

Keyword: Estrogen receptor-positive breast cancer, Zinc, Zinc transporters, Autophagy, Bcl-2

Address for correspondence

Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,
Mukogawa Women's University
11-68, Koshien Kyuban-cho, Nishinomiya, Hyogo 663-8179, Japan
E-mail: nakase@mukogawa-u.ac.jp



■ 崎谷愛未 略歴

- 2019年 ● 北海道大学理学部化学科 卒業
- 2021年 ● 北海道大学大学院総合化学院
修士課程 修了
- 2021年 ● 武庫川女子大学薬学部薬剤学研究室
助手