

研究

閉塞性肺疾患モデル細胞・マウス
における細胞内亜鉛の役割とその
調節異常熊本大学大学院生命科学研究部(薬学系)遺伝子機能応用学分野¹⁾熊本大学大学院博士課程教育リーディングプログラム「グローバルな健康生命バイオニア養成プログラム HIGO」²⁾亀井竣輔^{1,2)} 首藤 剛¹⁾

要約

閉塞性肺疾患は、慢性気道炎症や過剰な粘液貯留、およびこれらの症状に伴う気道閉塞を主徴とする難治性の呼吸器疾患の総称である。著者らは、粘液貯留・肺気腫・呼吸機能障害を安定的に呈する閉塞性肺疾患モデルマウスを確立し(C57BL/6J-βENaC-Tgマウス)、その遺伝学薬理学的解析から、プロテアーゼ・酸化ストレス経路が、モデルマウスの肺病態の形成に重要であることを明らかにした。また、ヒト閉塞性肺疾患モデル気道上皮細胞やモデルマウス肺組織における亜鉛の細胞内濃度が顕著に減少し、そのことが、閉塞性肺疾患時に特徴的な遺伝子発現変化を惹起することも明らかになった。興味深いことに、閉塞性肺疾患の細胞内亜鉛量の減少には、亜鉛の取り込みトランスポーターの一つである Zrt-Irt-like Protein (ZIP) family の発現調節異常が関与することも明らかになった。本報告は、閉塞性肺疾患における細胞内亜鉛やそのトランスポーターの調節機構の重要性を示す知見である。

KEY WORDS 慢性閉塞性肺疾患(COPD)、嚢胞性線維症(CF)、ZIP2、スプライシング、気道上皮細胞

はじめに

亜鉛は、生体内の数多くのタンパク質の活性化や細胞内シグナルなどに関与する、多彩な機能を持つ必須微量元素の一つである。そのため、生体内での亜鉛量の変化による亜鉛ホメオスタシスの破綻は、数多くの疾患の発症や増悪化を引き起こすことが報告されている。そのような中、近年、慢性閉塞性肺疾患(COPD)や嚢胞性線維症(CF)などの閉塞性肺疾患時における亜鉛の役割が注目されており、病態発症メカニズムの一つに亜鉛が関与することが示唆されている^{1,2)}。しかしながら、気道上皮を含めた呼吸器において亜鉛の取り込み

がどのように調節され、病態に寄与するかは、ほとんど明らかになっていない。

そこで、本稿では、まず、閉塞性肺疾患の発症・進展において重要な役割を担う上皮型 Na⁺チャネル(epithelial sodium channel; ENaC)に着目し、ENaCを気道上皮特異的に過剰発現することで得られる閉塞性肺疾患モデルマウス(C57BL/6J-βENaC-Tgマウス)に関する本研究室の最近の知見についてご紹介する³⁾。また、閉塞性肺疾患時の気道上皮における細胞内亜鉛の役割とその調節機構に着目し、C57BL/6J-βENaC-Tgマウスおよび閉塞性肺疾患モデルヒト気道上皮細胞における細胞内亜鉛量調節を担う亜鉛トランスポーターの発

現解析や、亜鉛量の変化に伴う各種病態関連因子の発現変動の結果について、本研究室の結果に基づきご紹介したい。

1. 閉塞性肺疾患モデルマウス C57BL/6J-βENaC-Tgマウスの創出

閉塞性肺疾患は、慢性気道炎症や過剰な粘液貯留、およびこれらの症状に伴う気道閉塞を主徴とする難治性の呼吸器疾患の総称である。慢性気管支炎や肺気腫を主徴とする COPD⁴⁾、粘液の貯留や慢性細菌感染が認められる難治性遺伝性疾患の CF⁵⁾ などの疾患が、閉塞性肺疾患として知られている。本疾患群に対しては、去痰薬による貯留粘液の除去が望ましいが、現在、臨床において用いられる去痰薬の多くは、その有効性に関する科学的根拠に乏しい。一方、自力で痰を咯出できない患者に対して行われる物理的吸引は、患者の QOL の低下や感染リスクの向上、さらには、吸引を実施する介護者の負担を増加させるなど多くの問題点を有する。したがって、粘液貯留に伴う肺症状を有する疾患の重篤化の抑制、あるいは喀痰除去の補助に繋がる新規薬物の開発は急務であり、適切な動物モデルを用いた評価が重要である。

ENaC は、上皮細胞の管腔側形質膜上に発現するアミロライド感受性の Na⁺チャネルであり、α、β、γ の 3 つの相同性のあるサブユニットから構成され、それぞれのサブユニットはヘテロ多量体を形成し、最終的に形質膜上で Na⁺イオンチャネルとして機能する⁶⁾。Mall らは、ENaC の β サブユニットをマウス気道上皮特異的に過剰発現させると (β ENaC-Tg マウス)、Na⁺ の過吸収に伴いマウス気道の水分量が減少し、粘液繊維毛輸送が滞り、粘液(喀痰)が蓄積することを見出した⁷⁾。著者らも、β ENaC-Tg マウスを C57BL/6J マウスに戻し交配を繰り返し、低致死率の COPD 様マウスを確立することに成功した (C57BL/6J-β ENaC-Tg マウス)³⁾。ENaC は、COPD の主要因である喫煙により活性化が誘導されること、また、COPD 患者の肺機能と ENaC の発現量に負の相関が認められることなどに鑑みると、β ENaC-

Tg マウスは、その成因から見てもヒト COPD 病態を模擬する COPD モデルマウスとして活用できる可能性は高い。

2. C57BL/6J-βENaC-Tg マウスの薬効解析、分子病態解析

著者らは、低致死率化した C57BL/6J-β ENaC-Tg マウスの肺組織 RNA を用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、COPD 病態の典型である酸化ストレス・抗酸化ストレス不均衡及びプロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡が本マウスの分子病態にも反映されていることを見出し、本マウスが、分子レベルで COPD 肺病態を模擬したモデルであることを示した³⁾。また、C57BL/6J-β ENaC-Tg マウスに対するセリンプロテアーゼ阻害剤 ONO3405、抗酸化剤 N-アセチルシステイン (NAC) 及びビタミン C (VC) の影響について検討し、これらの薬物・成分が病態保護作用を有することを見出した³⁾。これらは、COPD において、NAC などの抗酸化物質が有用であるという一部の臨床報告を支持するものである。

3. 亜鉛と閉塞性肺疾患

近年、閉塞性肺疾患時に血清中及び喀痰中の亜鉛量が増加し、その変化と病態進行度に相関があることが報告された¹²⁾。肺や気道における亜鉛量の変化は、Superoxide dismutase (SOD) の活性低下等を介して酸化ストレスを誘導することで、肺胞や気道の上皮細胞を傷害し、それに続いた炎症が惹起されることで肺器質全体へと傷害が拡大する^{8,9)}。肺器質の傷害は、最終的に肺の気腫化やそれに伴う呼吸機能低下、粘液貯留へつなげると考えられているが、これはあくまでも仮説の域に過ぎず、亜鉛量の変化が呼吸器に及ぼす影響は不明な点が多い。また、閉塞性肺疾患時に亜鉛の体内動態が変化する理由についても未だ明らかになっていない。

このような背景を受け、著者らは、閉塞性肺疾患モデルヒト気道上皮細胞 (ENaC 過剰発現細胞¹⁰⁾、

CF 患者由来細胞^{11,12)} を用いて、細胞内亜鉛量と亜鉛トランスポーターの観点から、種々の検討を行った。その結果、①閉塞性肺疾患モデル細胞における細胞内亜鉛量は、正常気道上皮細胞と比し、共通して低値を示すこと、②閉塞性肺疾患モデル細胞では、細胞内への亜鉛取り込みトランスポーターである Zrt-Irt-like Protein (ZIP) family 群¹³⁾ (ZIP2, ZIP4, ZIP8, ZIP10, ZIP14) の発現量の減少が認められること、③正常気道上皮細胞

(16HBE14o-) に対する細胞内の亜鉛量の減少は、粘液・炎症等の閉塞性肺疾患病態の増悪因子の発現上昇を惹起すること、④ZIP2, ZIP4, ZIP10 の発現低下が閉塞性肺疾患モデル細胞内の亜鉛量の低下や病態増悪因子の発現上昇に寄与し、その中でも、特に ZIP2 の寄与が大きいこと、⑤閉塞性肺疾患モデル細胞における ZIP2 の発現低下には、ZIP2 遺伝子の intron 1 が exon に変化し、C 末端を大幅に欠損した ZIP2 蛋白質を産生する新規ア

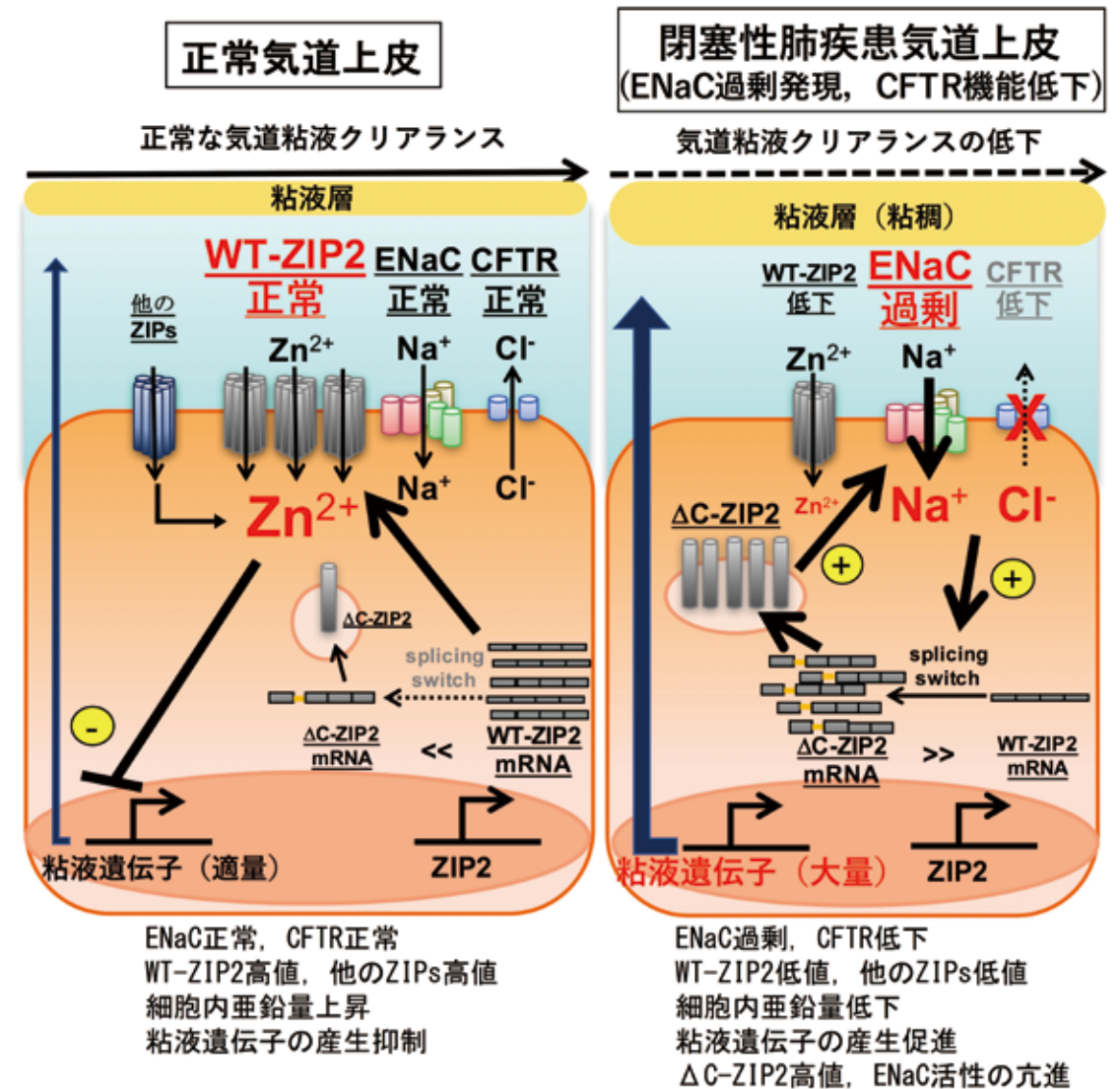


図1 正常及び閉塞性肺疾患気道上皮細胞における細胞内亜鉛の役割とその調節異常

イソフォーム(Δ C-ZIP2)の産生促進を介していることを明らかにした(図1)。要約すると、閉塞性肺疾患時には、気道上皮細胞レベルでの細胞内亜鉛量の低下が粘液・炎症等の病態増悪因子の発現上昇に寄与すること、さらに、その細胞内亜鉛量の低下には、ZIP2転写産物のスプライシングの変化いわゆる「スプライシングスイッチ」による完全型ZIP2発現量の減少が寄与することが明らかになった。このとき、「スプライシングスイッチ」により生成された不完全型ZIP2(Δ C-ZIP2)は、閉塞性肺疾患の原因タンパク質の一つである β ENaCの発現量を増大させ、ENaCチャネル活性を上昇させることも明らかになり、「閉塞性肺疾患気道上皮(ENaC活性高値) \rightarrow ZIP2スプライシングスイッチ・細胞内亜鉛量の低下 \rightarrow ENaC活性上昇」という負のフィードバックループが存在することも明らかになり、閉塞性肺疾患と細胞内亜鉛は、極めて密接な関わりがあることが明らかとなっている(図1)。

おわりに

本稿でご紹介した閉塞性肺疾患気道上皮細胞におけるZIP2スプライシングスイッチの変化は、これまで前例のないユニークな分子機序に基づくものである。一方、興味深いことに、不完全型アイソフォームZIP2の発現は、C57BL/6- β ENaC-Tgマウスの気道上皮細胞やCF患者由来初代培養細胞においても認められており、ZIP2発現異常の肺疾患病態における普遍性が示唆されている。いずれにせよ、著者らの見出した知見は、閉塞性

肺疾患における細胞内亜鉛やそのトランスポーターの調節機構の重要性を示唆するものである。このことは、閉塞性肺疾患の患者血清中の亜鉛量は低値を認めることや、CF患者に対する亜鉛補充は積極的に推進されていることなどからも支持されるものである^{1,2,14)}。今後、閉塞性肺疾患患者に対する亜鉛補充療法の是非の検討、また、亜鉛トランスポーターの発現量に基づいた治療アプローチの開発などが必要であり、基礎研究から臨床への橋渡しを期待するところである。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なる支援と助言を頂いた本分野の甲斐広文教授、Mary Ann Suico助教、本学動物資源開発研究施設(CARD)の中潟直己教授、竹尾透講師、崇城大学薬学部の中藤恵子助教に心から感謝申し上げます。また、C57BL/6- β ENaC-Tgマウスの作製および実験に際しご協力頂いた、本分野の菅原卓哉博士、小野智美修士、松本千鶴修士、坂口由起修士、野原寛文修士、藤川春花学士、丸田かすみ学士、中嶋竜之介氏、川上太聖氏、江藤結花氏に対しても、この場を借りて深謝いたします。なお、本研究は、著者らに対する日本学術振興会の科学研究費補助金(首藤:JP25460102, JP21790083, 亀井:JP15J09420)及び著者が担当研究者であった日本学術振興会の「頭脳循環を加速する若手研究者戦略的海外派遣プログラム(S2510)」の研究推進費により実施された。

◆文献

- 1) Gray RD, et al : Sputum trace metals are biomarkers of inflammatory and suppurative lung disease. *Chest* 137 : 635-641, 2010
- 2) El-Attar M, et al : Serum trace element levels in COPD patient : the relation between trace element supplementation and period of mechanical ventilation in a randomized controlled trial. *Respirology*. 14 : 1180-1187, 2009
- 3) Shuto T, et al : Pharmacological and genetic reappraisals of protease and oxidative stress pathways in a mouse model of obstructive lung diseases. *Sci Rep* 6 : 39305, 2016
- 4) Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD : Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) , 2016 (Available from : <http://goldcopd.org/>)
- 5) Ratjen F, et al : Cystic fibrosis. *Lancet* 361 : 681-689, 2003
- 6) Firsov D, et al : The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC) . *EMBO J* 17 : 344-352, 1998
- 7) Mall M, et al : Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med* 10 : 487-493, 2004
- 8) Zalewski PD, et al : Zinc metabolism in the airway : basic mechanisms and drug targets. *Curr Opin Pharmacol* 6 : 237-243, 2006
- 9) Wu W, et al : Zinc ions as effectors of environmental oxidative lung injury. *Free Radic Biol Med* 65 : 57-69, 2013
- 10) Caldwell RA, et al : Neutrophil elastase activates near-silent epithelial Na⁺ channels and increases airway epithelial Na⁺ transport. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288 : L813-819, 2005
- 11) Shuto T, et al : Promoter hypomethylation of Toll-like receptor-2 gene is associated with increased proinflammatory response toward bacterial peptidoglycan in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *FASEB J* 20 : 782-784, 2006
- 12) Mizunoe S, et al : Synergism Between Interleukin (IL) -17 and Toll-like Receptor 2 and 4 Signals to Induce IL-8 Expression in Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells. *J Pharmacol Sci* 118 : 512-520, 2012
- 13) Fukada T, et al : Zinc homeostasis and signaling in health and diseases. *J Biol Inorg Chem* 16 : 1123-1134, 2011
- 14) Van Biervliet S, et al : Serum zinc concentrations in cystic fibrosis patients aged above 4 years : A cross-sectional evaluation. *Biol Trace Elem Res* 119 : 19-26, 2007



◆首藤剛略歴

- | | |
|-------|------------------------------------|
| 1999年 | 熊本大学薬学部 卒業 |
| | 米国ハウスイヤー研究所 (HEI) 実験助手 |
| 2001年 | 熊本大学大学院薬学研究科博士前期課程修了 |
| | 熊本大学大学院薬学研究科遺伝子機能応用学分野助手 |
| 2004年 | 米国カリフォルニア太平洋医療センター研究所 (CPMCRI) 研究員 |
| 2006年 | 薬学博士号取得 |
| | 熊本大学大学院医学薬学研究部遺伝子機能応用学分野講師 |
| 2013年 | 熊本大学大学院生命科学研究部 (薬学系) 遺伝子機能応用学分野准教授 |

Role of intracellular zinc and its dysregulation in murine and cellular models of obstructive lung diseases

Shunsuke Kamei^{1,2)}, Tsuyoshi Shuto¹⁾

1) Department of Molecular Medicine, Graduate School of Pharmaceutical Sciences

2) Program for Leading Graduate Schools "HIGO(Health life science: Interdisciplinary and Global Oriented)Program", Kumamoto University

Ion transport across the cell membrane is essential for many biological processes in airway epithelial cells; however, its dysregulation causes intractable lung diseases such as cystic fibrosis(CF) and chronic obstructive pulmonary disease(COPD). We have recently established airway-specific overexpression of the epithelial Na⁺ channel β subunit in mice with C57BL/6J background (C57BL/6J- β ENaC-Tg mice) as a pathophysiologically highly useful COPD/CF mouse models. The mice showed key pulmonary abnormalities of COPD/CF, including mucus hypersecretion, inflammatory and emphysematous phenotypes and pulmonary dysfunction. Pharmacological and genetic approaches further revealed that protease-antiprotease imbalance and oxidative stress are critical pathways that exacerbate the pulmonary phenotypes of C57/BL6J- β ENaC-Tg mice, consistent with the characteristics of human COPD/CF. Interestingly, intracellular Zn²⁺ level was decreased in murine and cellular models of obstructive lung diseases, which contributes up-regulation of the gene expression of mucus and inflammatory cytokines. Moreover, dysregulation of zinc importer ZIP/SLC39A family was associated with reduction of intracellular zinc concentration in human CF/COPD airway epithelial cells. The study emphasizes the importance of mechanism underlying regulation of zinc transporters in obstructive lung diseases.

Keyword : chronic obstructive pulmonary disease(COPD), cystic fibrosis(CF), ZIP2/SLC39A2, splicing defect, airway epithelial cells

Address for correspondence

5-1 Oe-Honmachi, Chuo-ku, Kumamoto, 862-0973, Japan

Tel : +81-96-371-4407

E-mail address

tshuto@gpo.kumamoto-u.ac.jp