

博士論文

骨格筋と心筋における亜鉛トランスポーター
Slc39a13/ZIP13 の役割

徳島文理大学大学院薬学研究科
薬学専攻 博士課程

大橋拓人

指導教授 深田俊幸
令和六年提出

目次

【序論】	1
第一章：本論文の研究背景	1
1.1：本論文の研究背景 1（亜鉛の生理的意義と恒常性制御）	1
1.1a：必須微量元素	1
1.1b：亜鉛の生理的意義と疾患	2
・亜鉛の吸収と分布	2
・亜鉛欠乏症と低亜鉛血症	3
・亜鉛欠乏が関連する疾患	4
・亜鉛とタンパク質の相互作用	6
1.1c：生体における亜鉛恒常性の制御機構	7
亜鉛トランスポーターとメタロチオネインの役割	7
亜鉛トランスポーターの種類と特徴	7
・Slc39a/ZIP family	8
・Slc30a/ZnT family	10
亜鉛シグナルの特徴と生理的意義	13
1.2：本論文の研究背景 2（Slc39a13/ZIP13 の生理的役割と関連疾患）	13
1.2a：ZIP13 の構造、組織分布と細胞内局在、生理的意義、疾患への関与	13
ZIP13 タンパク質の特徴と発現	13
・ZIP13 タンパク質の特徴、組織分布および細胞内局在	13
・機能喪失型 ZIP13 タンパク質の特徴	13
Zip13-KO マウスの表現型	14
・成長遅延	14
・骨軟骨組織における異常	14
・歯牙組織における異常	14
・皮膚組織における異常	14
・眼球と顔面特徴における変化	15
脊椎手掌異形成型エーラス・ダンロス症候群(EDSSPD3)の症状と、機能喪失型 ZIP13 の特徴	16
EDSSPD3 の症状	16
・成長遅延	16
・脊柱後弯	16
・部分性無歯症	16
・眼瞼列斜下	16
・皮膚脆弱化	16
・下肢静脈瘤	17
・筋緊張低下症	17
機能喪失型 ZIP13 の特徴	17
1.2b：骨格筋と心筋の特徴	19
筋肉の分類	19
骨格筋の分類と基本構造	19
・骨格筋の分類	19
・骨格筋の基本構造	20

心筋の分類と基本構造.....	21
・心筋の分類.....	21
・心筋の基本構造.....	21
筋機能の制御における亜鉛の関与.....	22
・亜鉛欠乏症と加齢性疾患.....	22
・亜鉛欠乏症と運動機能障害.....	22
・亜鉛欠乏症とサルコペニア.....	22
学位論文に関連する問題提起.....	22
・本邦が直面する高齢化社会における運動器障害.....	22
・本研究における検討内容の概要.....	23
【本論】	25
骨格筋における ZIP13 の役割解明.....	25
第二章：Zip13-KO マウスを用いた検討.....	25
表現型の解析.....	25
・検討内容（筋力、体重および筋重量、各種骨格筋の形態）.....	25
・方法.....	25
・結果.....	31
遺伝子の発現解析.....	33
・検討内容（Zip13 遺伝子と筋分化調節因子の発現）.....	33
・方法.....	34
・結果.....	35
小括.....	36
第三章：C2C12 筋芽細胞株を用いた検討.....	37
骨格筋分化における Zip13 遺伝子および筋分化調節因子の発現.....	37
・検討内容（骨格筋分化に伴う遺伝子）.....	37
・方法.....	38
・結果.....	40
Zip13 発現抑制細胞株の作製.....	41
・検討内容 (Zip13sh プラスミドの導入による Zip13 発現抑制).....	41
・方法.....	41
・結果.....	41
骨格筋分化における Zip13 発現抑制の影響.....	41
・検討内容（筋管形成への影響と筋分化調節因子の発現）.....	41
・方法.....	41
・結果.....	41
小括.....	44
第四章：EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞を用いた検討.....	45
・検討内容（EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞株の作製）.....	45
・方法.....	47
・結果.....	49
EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞の骨格筋分化誘導系の構築.....	51
・検討内容（MyoD 強制発現による骨格筋の分化誘導）.....	51

・ 方法.....	51
・ 結果.....	52
Crisper-Cas9 システムによる遺伝子変異の修復.....	55
・ 検討内容 (Crisper-Cas9 を適用した変異型 <i>Zip13</i> 遺伝子の修復).....	55
・ 方法.....	55
・ 結果.....	56
遺伝子修復 EDSSPD3MyoD-iPS 細胞における骨格筋分化.....	58
・ 検討内容 (遺伝子修復後の細胞における筋分化レスキュー実験).....	58
・ 方法.....	58
・ 結果.....	58
小括.....	59
骨格筋に関する研究の小括.....	60
心筋における ZIP13 の役割解明.....	61
第五章：心筋における亜鉛恒常性の意義.....	61
初代培養心筋細胞におけるストレス負荷に伴う影響.....	61
・ 検討内容 (初代培養心筋細胞の調整と亜鉛イオンの影響解析).....	61
・ 方法.....	62
・ 結果.....	62
・ 検討内容 (ドキソルビシンによる心負荷モデルの適用).....	62
・ 方法.....	63
・ 結果.....	63
第六章：心筋における ZIP13 機能喪失の影響.....	65
初代培養心筋細胞の自律的拍動および心電図検査.....	65
・ 検討内容 (心電図および初代培養心筋細胞の解析).....	65
・ 方法.....	65
・ 結果.....	66
第七章：ZIP13 の機能喪失が心筋細胞に与える影響.....	68
<i>Zip13</i> -KO マウス由来初代培養心筋細胞における網羅的な遺伝子発現解析.....	68
・ 検討内容 (RNA-seq による遺伝子の発現解析).....	68
・ 方法.....	68
・ 結果.....	69
心筋に関する研究の小括.....	71
【結論と考察】.....	73
【引用文献】.....	79
【発表論文】.....	89
【参考論文】.....	89
【謝辞】.....	90

略語一覽

7-AAD : 7- amino-actinomycin D

ABC : ATP binding cassette

ALP : alkaline phosphatase

Arg : arginine

Asp : aspartic acid

BMP : bone morphogenetic protein

cAMP:cyclic adenosine monophosphate

Cys : cysteine

DAPI : diamidino-2-phenylindole

DEGs : differentially Expressed Genes

DOX : doxycycline

EDSPD3 : Ehlers-Danlos syndrome spondylodysplastic type3

FBS : fetal bovin serum

Gly : glycine

GPCR : G protein-coupled receptor

HDF : **H**uman **D**ermal **F**ibroblast

HDR : homology directed repair

His : histidine

HS : horse serum

IF : immunofluorescence

IGF : insulin like growth factor

Int-L2 : intracellular loop2

KO : knock out

KSR : knock out serum

MRFs : myogenic regulatory factors

MT : metallothionein

MYH : myosin heavy chain

PAM : protospacer adjacent motif

PB : piggyBac

PDE : phosphodiesterase

PDGF : platelet-derived growth factor

PNC : Primary neonatal cardiomyocyte

RIN : RNA Integrity Number

RNP : ribonucleotide protein

ZIP : Zrt-Irt-like protein (SLC39A: Solute carrier 39A group)

ZnT : Zinc Transporter (SLC30A: Solute carrier 30A group)

SLC : solute carrier

TMD : transmembrane domain

Trp : tryptophan

TGF : transforming growth factor

WB : western blot

【序論】

第一章：本論文の研究背景

1.1 本論文の研究背景 1 (亜鉛の生理的意義と恒常性制御)

1.1a：必須微量元素

生体に含まれる必須元素の中で、存在量が微量である鉄(Fe)、亜鉛(Zn)、銅(Cu)、マンガン(Mn)、コバルト(Co)、ヨウ素(I)、モリブデン(Mo)、セレン(Se)、クロム(Cr)を必須微量元素と呼称する(Figure 1A)。必須微量元素は、その多くが生体内の細胞内外においてさまざまなタンパク質と結合して存在するが、一定の割合で遊離イオンとしても存在する。結合するタンパク質は、酵素、膜型受容体、サイトカインや成長因子等の液性因子、転写因子等の多岐に渡り、それらの活性や発現の制御に関与している(1-9)。

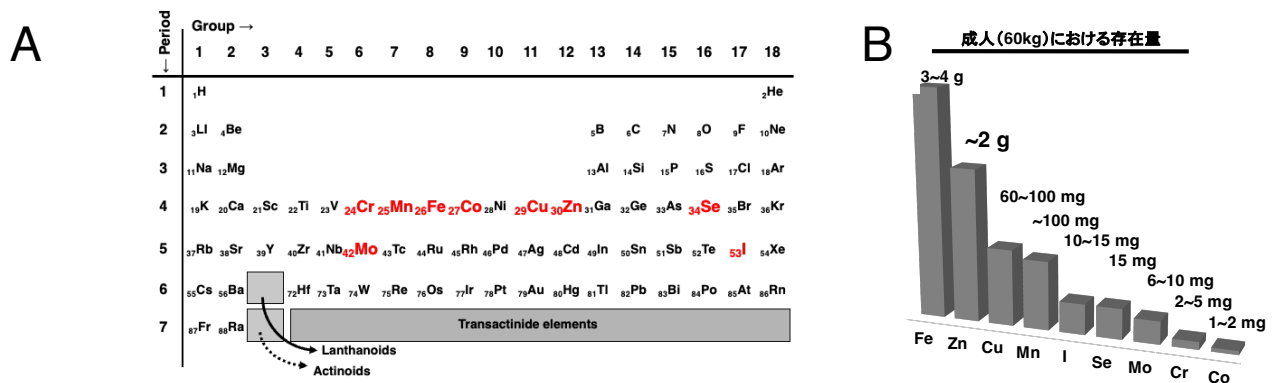


Figure 1：生体内における必須微量元素の存在量

A：ヒトに健康維持に必要とされる元素(必須微量元素)を周期表上に示す(赤字)。

B：ヒト成人における必須微量元素の含有量

ヒト成人の生体内における必須微量元素の含有量を示す。亜鉛において、上記量の維持のためには、毎日約 11mg の亜鉛の摂取が必要とされる(1-9)。

本論文の研究対象である SLC39A13/ZIP13 (ZIP13)は、亜鉛を輸送する輸送体(亜鉛トランスポーター)である。亜鉛は、必須微量元素の中で鉄に次いで多い元素であり、成人には約 2 g の亜鉛が存在する(Figure 1B)。亜鉛は、第 4 周期 12 族に属する元素番号 30 の遷移金属であり、化合物としては 2 価の酸化状態が自然界に優位に存在する。生体は、生命機能の維持のために一定量の亜鉛を摂取する必要があり、ヒトにおけるその欠乏は、成長遅延、皮膚炎、味覚異常等の症状を呈する亜鉛欠乏症をもたらす(Page 3-4)。

1.1b : 亜鉛の生理的意義と疾患

亜鉛の生理的意義

亜鉛の吸収と分布

ヒトにおける総亜鉛量は体重 60 kg 当たり約 2 g であり、その維持のために成人男性で約 10 mg/日、成人女性で約 8 mg/日の摂取が推奨されている(10)。飲食物に含まれる亜鉛は、主に十二指腸および空腸から主に吸収され、血中に移行した亜鉛は、アルブミンやマクログロブリンと結合して全身へ分布する(Figure 2A)。吸収された亜鉛は、骨格筋と骨組織にそれぞれ約 60%と約 30%が蓄積し、皮膚や肝臓等の他組織に約 5%程度が分布する(Figure 2B) (11-12)。

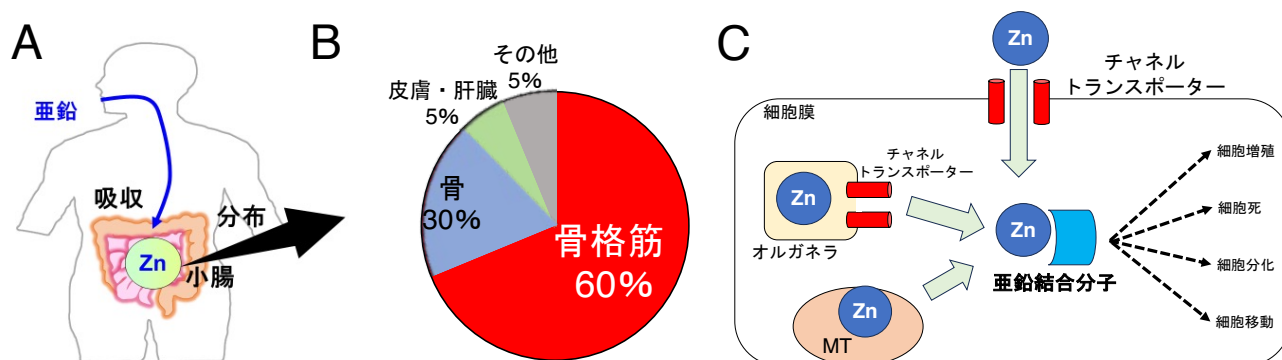


Figure 2 : 生体内における亜鉛の吸収と分布

A : 食物由来の亜鉛の消化管吸収の模式図を示す。亜鉛は主に十二指腸や空腸から吸収されて、血中へ移行した後、全身へ分布される。

B : 各組織における亜鉛含有量を示す。亜鉛の分布は、運動器(骨格筋や骨軟骨組織)が最も多く、皮膚や肝臓等が続く。

C : 亜鉛シグナルの概念図を示す。細胞内外の亜鉛の恒常性は、亜鉛輸送体(トランスポーター)やカチオンチャネル、メタロチオネイン(MT)等によって制御されている。亜鉛トランスポーターおよびチャネルを介する亜鉛イオンや、酸化ストレス等の作用によって MT から放出された亜鉛イオンは、細胞内外の環境においてセカンドメッセンジャーとして機能することが示されており、この現象を亜鉛シグナルと定義する。亜鉛シグナルは、亜鉛結合性の分子に作用してそれらの活性・発現・移動等に影響を与え、細胞の増殖・分化・死・移動等を制御し、それらを構成する臓器や器官およびシステムを統御する事によって、個体恒常性に維持に関与する。(10-12)

亜鉛欠乏症と低亜鉛血症

血清亜鉛の低下により、皮膚障害、神経伝達異常、脱毛、食欲不振、生殖器機能異常などのさまざまな症状を呈する亜鉛欠乏症は、1961年に Prasad らによって初めて報告された(13)。Prasad らの報告以前においては、カビの増殖において亜鉛が必要であることや、ラットで亜鉛欠乏が成長遅延をもたらすことが報告されていたが(14)、ヒトにおける亜鉛の重要性は不明であった。Prasad の研究グループは、成長遅延や性腺機能低下、貧血、肌荒れの症状を呈する疾患をイランで発見し、未報告の症例として報告した。この症例における貧血は、鉄の補充により改善したことから、鉄欠乏性貧血であることが示された。一方、性腺機能低下や成長遅延は下垂体機能低下によるものであることが示唆されたが、下垂体機能の低下は鉄補充では回復せず、他の要因の存在が推測された。本症例患者は顕著に低い血清亜鉛値を示し、この報告が世界で初のヒトにおける亜鉛欠乏と疾患の関連を示唆するものとなった。

さらに Prasad らは、エジプトにおいてイランの症例と類似した症例として、低い血清亜鉛値と成長遅延を呈する疾患を発見し、亜鉛補充による治療が、これらの症状を改善することを発見した(15-16)。これらの報告によって、亜鉛がヒトの健康維持に必須な微量元素であることが明確に示された。

亜鉛欠乏症は、亜鉛摂取量の減少の他に、遺伝的な要因による消化器官からの吸収阻害や排泄機構の異常によっても発症する。代表的な遺伝的要因による亜鉛欠乏症として、母親の ZnT2 機能不全による一過性亜鉛欠乏症や、小児の ZIP4 の機能喪失による腸性肢端皮膚炎が挙げられる。一過性亜鉛欠乏症は、母親が機能喪失型 ZnT2 を有することで低亜鉛母乳を産生し、新生児が低亜鉛母乳を受乳することで発症する(52)。腸性肢端皮膚炎は、機能喪失型 ZIP4 によって亜鉛の吸収低下を招くことにより、亜鉛欠乏症の症状を発症する(53)。

日本では、亜鉛欠乏症は低亜鉛血症と、それに起因する症状を呈する疾患として定義されており、血清亜鉛値が 60 µg/dL 未満を亜鉛欠乏症、60-80 µg/dL を潜在的亜鉛欠乏症、80-130 µg/dL を基準値として定めている。すなわち、血清亜鉛値が 80 µg/dL 未満である場合、亜鉛欠乏症と診断される(17)。本邦における初めての低亜鉛血症に対する治療薬として、2017年に酢酸亜鉛(ノベルジン®)が認可された。本薬は、銅の蓄積に

よるウィルソン病の治療薬として承認されていたものであり、2017 年に低亜鉛血症へ適用拡大された。すなわち、亜鉛補充治療は、銅の吸収低下を伴う貧血を引き起こす可能性があるため、長期の亜鉛補充療法には、定期的な血清銅の測定が必要である。1 日あたりの亜鉛摂取量の上限は 80 mg 程度とされるが、通常食によって亜鉛摂取量の上限を超えることはない。

亜鉛欠乏に関連する疾患

亜鉛欠乏は、さまざまな疾患と関連することが明らかになっている。以下に、代表的な例として糖尿病、腎疾患、がん、および新型コロナウイルス感染症について述べる。

糖尿病：

膵β細胞は、インスリン顆粒内でインスリンの 6 量体(インスリン結晶)を形成する。インスリン結晶の形成には、2 つの亜鉛元素が必要であり、亜鉛トランスポーターZnT8 がインスリン顆粒内に亜鉛を導入する役割を演じる(後述)。ZnT8 を介する亜鉛イオンは、肝臓におけるインスリンクリアランスの制御に関与することが示されており、亜鉛と糖尿病等の代謝性疾患には関連性が示唆されている(18-19)。

腎臓病：

腎機能低下に伴う人工透析患者は、総じて血清亜鉛値の低下を示す傾向があり、その理由として、人工透析時の食事制限による亜鉛供給量の減少や、人工透析に使用するフィルターの影響が提示されている。また、エリスロポエチン抵抗性貧血患者において、血中亜鉛濃度とヘモグロビン量に相関性があることが示されており、低亜鉛を呈する人工透析患者に亜鉛補充療法を適用することにより、ヘモグロビン値が上昇することから(20)、腎機能低下と亜鉛欠乏には関連性があると示唆されている。

がん：

多くのがん患者において血清亜鉛値が低いことが報告されており、亜鉛欠乏状態のがん患者の治療に亜鉛補充が有効であることが示されている(21)。前述の Prasad らによる亜鉛欠乏症の発見以来、亜鉛の欠乏が免疫不全をもたらすことが

示されている。亜鉛の欠乏は、T 細胞、B 細胞、NK 細胞等のリンパ球の減少や、マクロファージの貪食能低下をもたらす。さらに、亜鉛は細胞性免疫の確立に寄与する Th1 サイトカインの誘導に重要な IFN- γ の産生誘導に関与する (22)。すなわち、亜鉛の欠乏は免疫機能の維持に障害をもたらし、結果として、がん細胞に対する制御に支障が生じると考えられる。

亜鉛とがんの関係性については、亜鉛トランスポーターに関する研究からも明らかにされている。後述する亜鉛トランスポーター ZIP6、ZIP7 および ZIP10 は、乳がん細胞に高発現し、がん細胞の増殖、生存、転移に関与することが示されている (23)。また、がん悪液質を呈する患者の骨格筋に ZIP14 が発現上昇し、ZIP14 を介する亜鉛の細胞内導入が筋萎縮を促進する (24-25)。

すなわち、亜鉛の恒常性維持は、がん細胞自身の増殖等に関与するだけでなく、がん細胞が影響を及ぼす組織や免疫機能の維持にとっても不可欠な因子であり、その恒常性の破綻は、がんの病態形成に影響を及ぼすものと考えられている。

新型コロナウイルス感染症：

2019 年に発生した新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は、現時点で約 6 億人にのぼる感染者を出すパンデミックをもたらし、世界保健機関 (World Health Organization: WHO) は緊急事態を宣言した。本邦でも、指定感染症として指定されて以降、多数の死者を出したが、ワクチンの普及に伴い、新規感染者や死者数の減少傾向が見られたため、2023 年より 5 類感染症に引き下げられた。

興味深いことに、COVID-19 重症患者において血清亜鉛値が低いことが報告された。具体的には、COVID-19 感染者を軽度/中等度群と重症群に分け、それぞれの血清亜鉛を測定したところ、70 μ g/dL 未満（国際的に適用されている亜鉛欠乏症の基準値）の患者は、軽度/中等度群において約 14%であったのに対し、重症群では顕著に増加した（約 86%）。すなわち、COVID-19 患者における血清亜鉛濃度の低下は、症状の重症化と関連している可能性が示唆された (26)。

亜鉛とタンパク質の相互作用

生体内に吸収された亜鉛は、メタロチオネイン (Metallothionein : MT) をはじめとするさまざまなタンパク質と相互作用することが知られている。例えば、亜鉛と結合して活性を示す代表的タンパク質として、アルコール脱水素酵素 (Alcohol Dehydrogenase : ADH) がある。ADH は 2 個のシステイン残基と 1 個のヒスチジン残基と亜鉛イオンが配位結合を形成して活性に関与している。炭酸脱水酵素の 0.33% に亜鉛が含まれていることから、亜鉛は生体内における代謝の一部に関与することが示唆されている。また、膵臓の β 細胞におけるインスリンの生成に亜鉛濃度の変化に関与していることが示唆される報告がある (27)。

亜鉛とタンパク質の相互作用の多様性については、*in silico* 解析からも提示されている (28)。Claudia. A らは、以下に示す方法でヒト全遺伝子を解析した。① : X 線解析により既知の亜鉛結合タンパク質の亜鉛結合パターンを抽出し、プロテオーム検索にかけることで亜鉛と結合する可能性のあるタンパク質を抽出した。② : ライブラリを用いて Pfam データベースより既知の金属結合タンパク質の配列を検索した。③ : アクセス可能な公開されているあらゆるヒト遺伝子配列より、亜鉛結合配列を有していると考えられる遺伝子を抽出して検索を行った結果、約 2800 種類のタンパク質が亜鉛と結合する可能性のあるタンパク質であることが示された。ヒトは 2 万種類を超えるタンパク質を有するとされているため、Claudia らの解析結果は、ヒトが有する (または翻訳される可能性のある) 全タンパク質の約 10% が、亜鉛と相互作用する可能性を示唆している (28)。同定された亜鉛と結合すると考えられるタンパク質のうち約 34% は転写因子であり、約 33% がさまざまな酵素、約 15% がジンクフィンガータンパク質、約 8% がシグナル伝達に関連するタンパク質、約 5% が物質の輸送や保管に関連するタンパク質に発現していることが示された。

上記のように、亜鉛はさまざまなタンパク質と結合することで生体内の機能に関与することから、生体における恒常性の維持に必須の因子であることが示唆されている。

1.1c : 生体における亜鉛恒常性の制御機構

亜鉛トランスポーターとメタロチオネインの役割

前述のように、生体内における亜鉛の恒常性は、亜鉛トランスポーターと MT により制御されている。MT は、多くのシステイン残基を有する低分子タンパク質であり、亜鉛をはじめとする二価金属イオンと高い親和性を持つ (Figure 2C)。MT は細胞内の亜鉛量に依存して発現上昇し、亜鉛と結合することによって、細胞内外の亜鉛恒常性を制御する。さらにカドミウムや水銀の暴露によって MT の発現上昇を誘導し、これらと結合して重金属の毒性を軽減化する働きを有する。MT のシステイン残基はヒドロキシルラジカルと高い反応性を示し、ラジカルの消去作用を有していることから、酸化ストレスに対する防御因子としての役割を担っている (29)。亜鉛トランスポーターは、ATP 加水分解エネルギーを利用せずに輸送を行う Solute carrier (SLC) ファミリーに属しており、細胞膜や細胞内小器官膜上に存在する膜タンパク質である。また、一部のカルシウムチャネル等のイオンチャネルも、亜鉛を輸送することが示されている (Figure 2C)。このような分子により調節された亜鉛は、細胞内外においてさまざまな亜鉛結合分子と結合して、それらの活性や遺伝子の発現等を調節する。

亜鉛トランスポーターの種類と特徴

亜鉛トランスポーターは、構造と機能の特徴から、細胞質内亜鉛を低下させる ZnT: Zinc Transporter (SLC30A: Solute carrier 30A group) ファミリーと、細胞質内亜鉛量を増加させる ZIP: Zrt-Irt-like protein (SLC39A: Solute carrier 39A group) ファミリーに大別される (Figure 3A)。哺乳類では、ZnT ファミリーには 10 のサブタイプがあり、ZIP ファミリーは 14 のサブタイプがあることが知られている (Figure 3B) (30)。各亜鉛トランスポーターは、細胞膜あるいは細胞内小器官の膜上に局在し、本論文の研究対象である ZIP13 はゴルジ体の膜上に局在する (Figure 3A) (表 1)。また、亜鉛トランスポーターは組織ごとに分布が異なり、その機能異常は胎生致死をもたらすほか、さまざまな疾患と関連することが報告されている (表 2)。

Slc39a/ZIP family

ZIP ファミリーは、8 つの膜貫通領域(TMD : transmembrane domain)を有する膜タンパク質で(Figure 3A)、ホモダイマーもしくは、他の ZIP ファミリーとヘテロダイマーを形成する(31)。ZIP ファミリーは、アミノ酸一次配列の類似性から ZIPI、ZIPII、LIV-1、gufA のサブファミリーに分類される。以下に、本研究の対象分子である ZIP13 が属する LIV-1 サブファミリーについて解説する。

LIV-1 サブファミリーを代表する LIV-1 は、エストロゲン応答性遺伝子として知られている。LIV 遺伝子の発見はリバプール大学においてエストロゲン受容体陽性乳がんの関連遺伝子として見出され、4 つのサブタイプが報告された(32)。その後、LIV-1 タンパク質の配列が解析されると、亜鉛と結合することで知られている His 残基が豊富であることが判明し、特徴的な配列として HEXPHEXGD モチーフを有していることが同定された。その後、BLAST 検索で HEXPHEXGD モチーフを有している遺伝群が見出され、Slc39A として命名された。ZIP6 をはじめとする LIV-1 サブファミリーは、TMD5 に HEXPHEXGD モチーフを有している(32)。以下に、代表的な LIV-1 サブファミリーの特徴を解説する。

ZIP4: 小腸上皮の管腔側の細胞膜上に発現するトランスポーターであり、消化管からの亜鉛の吸収に重要な役割を担う。ZIP4 の機能喪失は腸管からの亜鉛吸収障害をもたらす、脱毛や下痢、皮膚炎等の症状を呈する腸性肢端皮膚炎を引き起こす(33-34)。Zip4 遺伝子の完全欠損はマウスにおいて致死をもたらす、胚発生初期において重要な役割を演じることが示されている(35)。

ZIP6: 細胞膜上に発現が局在し、細胞質内の亜鉛レベルの上昇に関与している。乳がん細胞において ZIP6 の発現はエストロゲン依存的に発現が上昇し、ZIP6 発現を抑制したがん細胞では増殖能が低下することが示されており、ZIP6 はがん細胞の増殖や転移に関与することから、がん治療の新たな標的分子であることが示されている(36)。ゼブラフィッシュの初期発生においても、上皮間葉転換における細胞移動に関与することが示されており(37-38)、ZIP6 が種を超えて細胞の移動に関与する分子であることが示唆されている。

ZIP7 : 細胞内の小胞体に局在する。ZIP7は小胞体ストレスの軽減化に関与し(39-40)、その輸送活性はプロテインキナーゼ CK2 (casein kinase 2)を介したリン酸化により活性化されることが明らかにされている。ZIP7は、皮膚の形成や腸管上皮の恒常性維持に関与することが遺伝子改変マウスを用いた研究から判明している。さらに、ZIP7の機能低下がB細胞欠如を主訴とする原発性免疫不全をもたらすことから、ZIP7がB細胞の発生に必須であることが示された。

ZIP8 : ZIP8は細胞膜表面やミトコンドリア、リソソームに局在している。Zip8欠損マウスは胎生致死を示すほか、ZIP8の機能低下は新生児致死や発育不全、多臓器形成不全、重度の貧血等の表現型を示す他、Zip8の変異がクローン病や小脳萎縮症の原因因子となること、また変形性関節炎患者においてZip8の発現上昇が報告されている。さらにZIP8の機能異常が高マンガ血症を呈することから、ZIP8がマンガンを輸送することが示されている。その他にもカドミウムの防御因子として知られているMT-KOマウスよりカドミウム耐性細胞を樹立して解析した結果、ZIP8がカドミウムの輸送を担うことが示されている(41)。

ZIP10 : 免疫担当細胞や皮膚毛包を構成する細胞の細胞膜上に局在する。B細胞の初期発生と機能に必要であり、マクロファージの機能に関与することから、免疫機能におけるZIP10の重要性が示されている(42)。皮膚においてZIP10は毛包外根鞘に多く発現し、遺伝子改変マウスを用いた研究から、ZIP10が皮膚のバリア機能の維持や毛包形成に必須であることが明示されている(43)。

ZIP12 : ZIP12の1塩基置換が、統合失調症や肺動脈性高血圧症と関連することが報告されている(44-45)。

ZIP13 : ゴルジ体膜上に局在しており、間葉系組織を構成する細胞に特異的に発現していることが知られている。ZIP13の機能喪失は、皮膚の脆弱化や骨・歯の形成不全などの硬組織や結合組織の病変を主訴とする脊椎手掌異形成型エーラスダンロス症候群(Ehlers-Danlos syndrome spondylodysplastic type3:EDSSPD3)の発症原因である(46-49)。EDSSPD3の臨床的特徴については後述する。

ZIP14 : 細胞膜に局在しており、肝臓や脾臓に比較的多く発現する。遺伝子改変マウスの解析から、ZIP14はGPCR (G protein-coupled receptor) シグナルを介した軟骨細胞の

分化や糖新生に関与することが示されている(50)。一方、ZIP14 の発現は IL-6 等の炎症性サイトカインやリポ多糖の刺激によって亢進する。ZIP14 はがん悪液質患者の骨格筋において発現が亢進し、ZIP14 を介する過剰な亜鉛導入が筋萎縮を促進することから、ZIP14 ががん悪液質に対する新たな治療標的として注目されている(51)。

Slc30a/ZnT family

ZnT ファミリーは、6 つの α ヘリックス構造が亜鉛輸送を担う TMD を形成する。第 2 および第 5TMD に存在する 2 つのヒスチジン(His : Histidine)と 2 つのアスパラギン酸(Asp : aspartic acid)残基が、亜鉛の輸送活性に重要であることが解明されている(31)。

ZnT2 : 細胞内のエンドソームやリソソームに局在する。ZnT2 遺伝子は 1 塩基置換により 54 番目のヒスチジンがアルギニンに変異することで低亜鉛母乳を呈し、乳児における一過性の亜鉛欠乏症の原因となることが明らかになっている(52)。

ZnT4 : エンドソームやリソソームに局在し、乳腺上皮に多く発現する。ZnT4 遺伝子の変異もマウスにおいて ZnT2 変異と同様に低亜鉛母乳を呈し、乳児における一過性の亜鉛欠乏症の原因となる(53)。

ZnT5 : ゴルジ体に局在し、ZnT6 とヘテロ 2 量体を形成する。ZnT5 を介して輸送された亜鉛は、亜鉛要求性酵素であるアルカリフォスファターゼ (ALP : Alkaline Phosphatase) の活性に必要であり(54)、ZnT5 の酵素活性制御における重要性が示唆されている。また、ZnT5 遺伝子欠損マウスの解析から、ZnT5 が全身成長、骨代謝、心機能の制御、およびアレルギー応答に関与することが示されている(55–57)。

ZnT8 : ランゲルハンス島 β 細胞のインスリン顆粒膜上に発現し、インスリンの結晶形成に必要な亜鉛の供給を担う。ZnT8 は、糖尿病に関与することが報告されている。具体的には、ZnT8 の 325 番目の Arg が Try への変異が 2 型糖尿病に関連すること、さらに ZnT8 に対する自己抗体は 1 型糖尿病の発症に関与することが示されている(58)。

ZnT10 : ゴルジ体に局在しており、脳や肝臓に高発現する。89 番目のロイシンがプロリンに変異するミスセンス変異や 196 番目のスレオニンが終始コドンに置き換わる

ナンセンス変異を有する *ZnT10* 変異患者において、高マンガン血症を発症することから、*ZnT10* はマンガンの代謝に関与する可能性が示唆されている (59-60)。

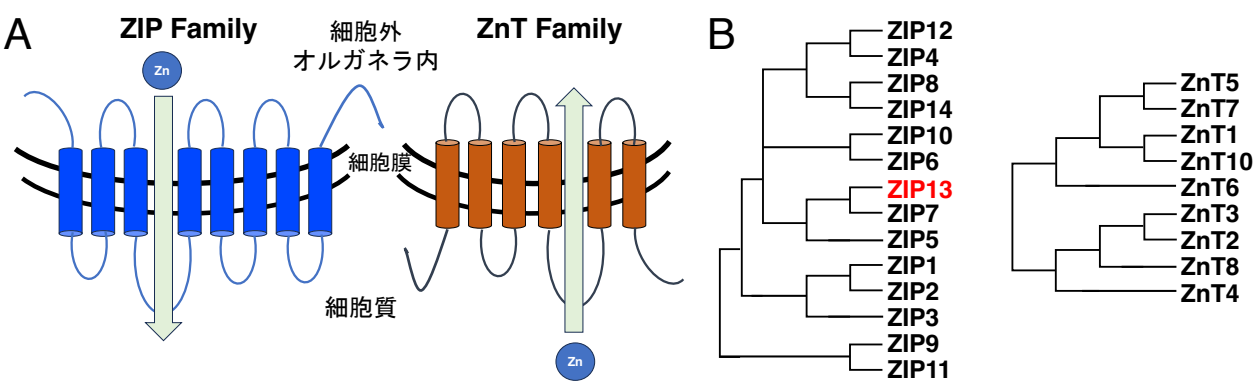


Figure 3 : 亜鉛トランスポーターの分類と構造的特徴
A : 亜鉛トランスポーターファミリーのタンパク質トポロジーを模式的に示す。亜鉛トランスポーターファミリーは、細胞質亜鉛量を増加する方向に働く ZIP ファミリーと、低下させる ZnT ファミリーに大別される。ZIP ファミリーは 8 回膜貫通型領域を、ZnT ファミリーは 6 回膜貫通型領域を有し、双方ともに機能的なホモダイマーもしくはヘテロダイマーを形成する。
B : ヒト亜鉛トランスポーターファミリーの分子進化学的系統図を示す (ZIP13 を赤字で示す) (30, 32)。

表 1. 亜鉛トランスポーターの細胞内局在

局在	細胞膜	ゴルジ体	小胞体	エンドソーム リソソーム	シナプス 小胞	インスリン 小胞	ミトコン ドリア
ZIP	ZIP1~6 ZIP8 ZIP10 ZIP12 ZIP14	ZIP7 ZIP9 ZIP11 ZIP13	ZIP7	ZIP8	——	——	ZIP8
ZnT	ZnT1	ZnT5~6 ZnT7 ZnT10	ZnT7	ZnT2 ZnT4	ZnT3	ZnT8	——

* 各亜鉛トランスポーターの細胞内局在を示す (本研究対象の ZIP13 は、ゴルジ体膜上に局在する) (89)。

表 2. 亜鉛トランスポーターの組織分布と病態生理学的関連性

	サブタイプ	組織分布	関連項目
ZIPファミリー	ZIP4	小腸上皮	腸性肢端皮膚炎
	ZIP6	広域な組織	乳がん
	ZIP7	広域な組織	B細胞の成熟
	ZIP8	広域な組織	クローン病・小脳萎縮症
	ZIP10	皮膚	B細胞の成熟・皮膚のバリア機能
	ZIP12	脳・神経系・肺	統合失調症・肺動脈性高血圧
	ZIP13	間葉系組織	脊椎手掌異形成型エーラスダンロス症候群
	ZIP14	肝臓・がん細胞	がん悪液質
ZnTファミリー	ZnT2	広域な組織・胎盤	低亜鉛母乳
	ZnT4	広域な組織	低亜鉛母乳
	ZnT5	広域な組織	アルカリフォスファターゼ活性
	ZnT8	膵臓	1型糖尿病
	ZnT10	脳・肝臓	高マンガン血症

*各亜鉛トランスポーターの組織分布と関連項目(遺伝子欠損や機能喪失による異常や疾患等)を示す。

亜鉛シグナルの特徴と生理的意義

亜鉛イオンは、チャネルや輸送体あるいは MT などの亜鉛保持タンパク質を介して供給される。この亜鉛イオンが特異性を持ち、特定の分子に作用することで細胞や組織の機能を制御する。亜鉛イオンがシグナル因子として作用する働きを亜鉛シグナルという (Figure 2C) (30)。

近年の研究によって、亜鉛シグナルが生体において重要な役割を担うことが示されている。具体的には、ZIP10 を介した亜鉛シグナルは、カスパーゼや CD45 の酵素活性を制御して B 細胞の初期発生と恒常性維持に関与する (42, 59) とともに、p63 の核移行を制御して表皮と毛包の形成に寄与する (43)。また、ZIP14 の亜鉛シグナルは、ホスホジエステラーゼ (phosphodiesterase: PDE) を阻害することで、細胞内環状アデノシン一リン酸 (cyclic adenosine monophosphate; cAMP) を調節して GPCR を介するシグナル伝達を亢進する。一方、本論文の研究対象である ZIP13 の亜鉛シグナルは、BMP/TGF- β 経路のシグナル伝達に重要な SMADs の核移行に関与し、マウスとヒトの結合組織の形成に必要であることが示されている。

1.2 : 本論文の研究背景 2 (Slc39a13/ZIP13 の生理的役割と関連疾患)

1.2a : ZIP13 の構造、組織分布と細胞内局在、生理的意義、疾患への関与

ZIP13 タンパク質の特徴と発現

・ ZIP13 タンパク質の特徴、組織分布および細胞内局在

ZIP13 は、骨や腱、皮膚などの結合組織や硬組織などの間葉系組織を構成する細胞に発現し、細胞内のゴルジ体膜上に局在する膜タンパク質である。8 回膜貫通ドメインを有し、N 末端と C 末端をゴルジ体管腔側に配置して、ゴルジ体から細胞質側へ亜鉛を輸送することが示されている (47)。

・ 機能喪失型 ZIP13 タンパク質の特徴

機能喪失型 ZIP13 に起因して発症する EDSSPD3 には、複数の遺伝子変異が報告されている。我々のグループは、SLC39A13/ZIP13 遺伝子のエクソン 2 にホモ接合性の点変異 (c.221G>A, p.G64D) により、64 番目のアミノ酸である Gly (G) が Asp (D) に変異した症例を報告した (ZIP13^{G64D}) (48)。Giunta らは、ZIP13 遺伝子座のエクソ

ン 4 の 9 塩基欠損による Phe-Leu-Ala の欠失変異を同定した (ZIP13^{ΔFLA}) (49)。
Maja らは、830 番目の G が D に置換された点変異を報告している (46)。

Zip13-KO マウスの表現型

Zip13-KO マウスは、ZIP family に共通に保存されている金属透過ドメインをコードする 6-8 番目のエクソンを欠損させることで作製された。Zip13-KO マウスは、成長遅延、骨軟骨・歯牙の形成異常、皮膚・眼球の脆弱化等の結合組織の形成異常を呈する。前述のように、ZIP13 はこれらの結合組織に分布しており、ZIP13 の欠損によって、ZIP13 発現細胞が関与する結合組織に異常が現れている (48)。

・成長遅延

Zip13-KO マウスは、生後 2 週から 3 週齢以降において、雌雄ともに成長遅延を示す (Figure 4A)。

・骨軟骨組織における異常

Zip13-KO マウスは、生後 3 週齢以降において、脊柱後弯、骨密度低下、軟骨成長板の形態異常等のさまざまな骨軟骨組織の異常を示す (Figure 4B)。Zip13-KO マウスを用いた骨形態計測解析の結果、Zip13-KO マウスでは骨芽細胞の活性低下している一方で、破骨細胞の活性は変化がないことから、Zip13-KO マウスは骨形成に障害を有することが判明した。

・歯牙組織における異常

Zip13-KO マウスは、切歯の破折、不正咬合、湾曲等の異常を呈する (Figure 4D)。臼歯においては、歯冠に異常を認めない一方で、歯根は顕著な脆弱化を認めた。歯冠は、上皮性細胞であるエナメル芽細胞がその形成に関与し、歯根は間葉系細胞である象牙芽細胞が関与する。臼歯の形成は、上皮間葉相互作用によって最初に歯冠形成が開始され、歯冠完成後の生後 2 週齢以降に歯根の形成が開始する。これらの歯牙形成における異常は、Zip13-KO マウスの表現形が生後に間葉系組織において進行的に生じるものであることを強く示唆している。

・皮膚組織における異常

皮膚組織に関して、Zip13-KO マウスは顕著な脆弱性を示す。表皮組織に顕著な

異常を認めないが、真皮層と脂肪層の薄弱化と、真皮層におけるコラーゲン線維や弾性線維の減少を示す (Figure 4E)。

・眼球と顔面特徴における変化

Zip13-KO マウスの眼球は、角膜上皮に異常を認めない一方で、角膜固有層のコラーゲン線維の減少を呈する。さらに、眼瞼下垂様の顔面特徴を示す (Figure 4C)。これらの眼球や顔面特徴の変化は、ヒト結合組織疾患における症状の一部と類似する。

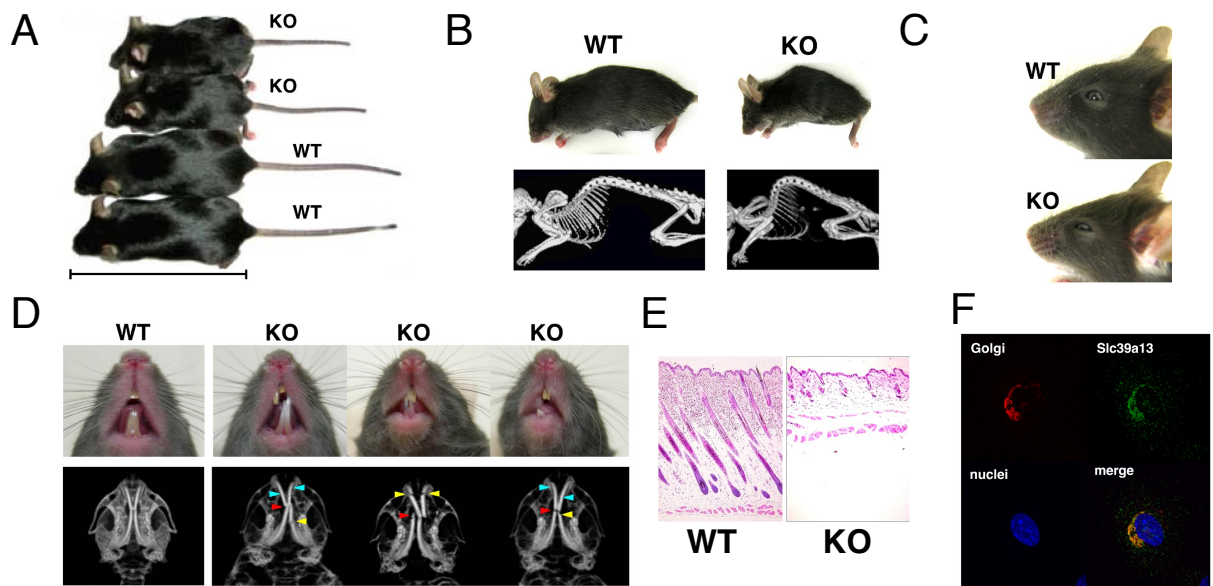


Figure 4 : *Zip13*-KO マウスの表現型を示す

A. 成長遅延 B. 脊柱後弯 C. 顔面特徴変化 D. 不正咬合 (赤), 湾曲 (青), 破折 (黄) E. 皮膚脆弱化
F. ZIP13 の細胞内局在を示す。ZIP13 は、間葉系組織を構成する細胞のゴルジ体膜上に発現する (48)。

脊椎手掌異形成型エーラスダンロス症候群 (EDSPD3) の症状と、機能喪失型 ZIP13 の特徴

EDSPD3 は、成長遅延、皮膚の脆弱化、骨異形成、部分性無歯症、脂肪層減少、筋緊張低下、ミオパチー等を主訴とし、エーラス・ダンロス症候群と骨形成不全症の特徴を併せ持つ希少疾患である。その発症は、第 11 染色体に存在する *ZIP13* 対立遺伝子の双方に変異を必要とする潜性(劣性)遺伝の機序に基づく (46, 48)。下記に示す本疾患の諸症状は、いずれも *Zip13*-KO マウスの表現型と非常に高い相関性を示す。すなわち、*Zip13*-KO マウスは、EDSPD3 における病態メカニズムの解明に極めて有用な疾患モデルであると考ええる。

EDSPD3 の症状

・成長遅延

EDSPD3 患者は低身長と体躯の短小化を呈する。我々の研究グループが報告した EDSPD3 患者は、兄妹で疾患を発症しており、成長遅延は生後 6 ヶ月の時点で確認され、兄は 22 歳時点において身長 140cm 台の低身長を呈した (Figure 5A) (48)。他の症例では、7 歳の時点の成長遅延が確認されている (61)。

・脊柱後弯

EDSPD3 患者は、骨密度低下を伴う骨組織の形成不全を伴う。椎骨端板の硬化により脊椎の平坦化を認めるとともに、脊柱は後弯を示す (Figure 5F)。

・部分性無歯症

EDSPD3 患者は、切歯喪失を認める部分性無歯症の症状を呈する (Figure 5C)。

・眼瞼列斜下

EDSPD3 患者は、眼窩周囲組織のコラーゲン層減少と皮膚張力低下に起因する眼瞼列斜下を示す (Figure 5B)。

・皮膚脆弱化

手指の皮膚は弱く細かい皺を認める。これらは、上述の眼瞼列斜下と同様に、コラーゲン層の減少により皮膚張力が低下することに起因するものと考えられる (Figure 5E)。

・下肢静脈瘤

EDSSPD3 患者は、下肢に重度の静脈瘤の症状を呈する (Figure 5E)。

・筋緊張低下症

EDSSPD3 患者は、筋緊張低下症またはミオパチーを示す (46, 48)。筋緊張低下とは、骨格筋の緊張が低下して緊張状態を保てなくなる症状の総称を指し、その原因には、筋萎縮や形成不全等の器質的な異常の他、神経伝達異常や代謝異常などが挙げられる (62–64)。一方、ZIP13 の機能喪失に伴う筋力低下の詳細なメカニズムは、現時点で不明である。

機能喪失型 ZIP13 の特徴

ZIP13^{G64D} と ZIP13^{ΔFLA} の機能喪失のメカニズムについては、変異型 ZIP13 の不安定化と分解系への移行による発現量の現象が提示されている。我々の研究グループは、これらの機能喪失型 ZIP13 変異遺伝子を細胞株に発現させ、各遺伝子由来の転写や翻訳に関して解析した。その結果、上記の機能喪失型 ZIP13 の mRNA 量は、野生型 (WT) ZIP13 と顕著な差異は認められなかったが、機能喪失型 ZIP13 タンパク質の発現量は有意に減少した。さまざまな翻訳後分解を制御する阻害剤を用いて検討した結果、機能喪失型 ZIP13 タンパク質は、翻訳後に直ちにユビキチン・プロテアソーム系による分解を受けることが判明した。すなわち、ZIP13^{G64D} と ZIP13^{ΔFLA} は翻訳後に分解されること、これらの変異型 ZIP13 を有する EDSSPD3 患者においては、機能的な ZIP13 タンパク質を喪失することが明らかになった (46, 49, 65)。

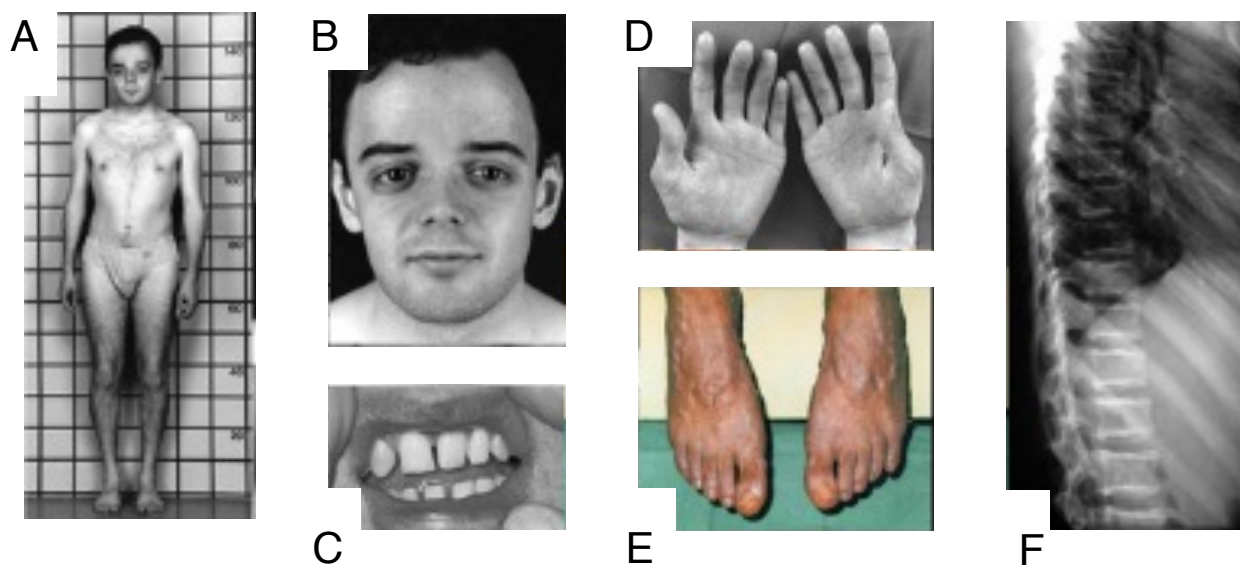


Figure 5 : 機能喪失型 ZIP13 を保有する EDSSPD3 症例を示す

A 低身長 B 眼瞼列斜下 C 部分性無歯症 D 皮膚脆弱化 E 下肢静脈瘤 F 脊椎異形成 (48)

1.2b : 骨格筋と心筋の特徴

上述のように、骨格筋の形成と機能における ZIP13 の役割は現時点で不明であり、ZIP13 の機能喪失に伴う筋力低下のメカニズムも解明されていない。本研究では、主に骨格筋に焦点を当てて ZIP13 の役割を解明するとともに、心筋における ZIP13 の意義も究明することを目的とする。本章では、骨格筋と心筋の分類と構造について概説する。

筋肉の分類

筋肉は横紋筋と平滑筋に大別され、さらに横紋筋は、運動機能を制御する骨格筋と、循環機能を制御する心筋に分類される。平滑筋は、血管や消化管等の臓器における蠕動運動を制御している。骨格筋は、運動神経支配の随意筋であるのに対し、心筋をおよび平滑筋は自律神経支配の不随意筋である。

骨格筋の分類と基本構造

骨格筋の分類

骨格は主に遅筋と速筋およびその中間型に分類される。遅筋は、ミトコンドリアが多くて赤みを帯びていることから赤筋と呼ばれ、主に高い筋持久力を示す。一方で速筋は、遅筋と比較してミトコンドリアの含有量は少なく、白色の色調が優位であることから白筋と呼ばれ、主に高い筋瞬発力を示す。遅筋線維は、*Myh7* 遺伝子から発現されたミオシン重鎖から構成される Myosin Type1 で形成されている。速筋線維は、*Myh1* の遺伝子から発現されたミオシン重鎖から構成される Myosin Type2B で形成される。中間型の筋線維は、*Myh2* 遺伝子から発現されたミオシン重鎖から構成される Myosin Type2A で形成される。

分化が完了して成熟した筋線維は、持続的な運動習慣等によって筋線維組成が変化する。この現象は Fiber Type switch と呼称され、継続的な運動によって持久力が増大することに関与している (Figure 6) (66)。

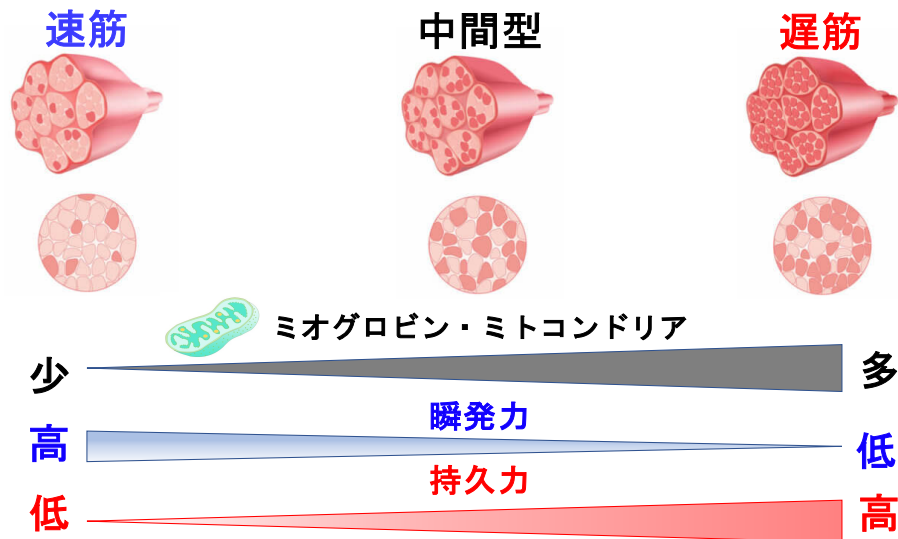


Figure 6：骨格筋の分類

各骨格筋の特徴を模式的に示す。骨格筋は、機能的側面から速筋・遅筋・中間型に分類される。速筋は、ミオグロビンやミトコンドリアの含有量が少なく、グルコースをエネルギー源とする筋瞬発力に關与する。遅筋は、ミオグロビンの含有による赤色の色調が優位であり、脂肪をエネルギー源とする筋持久力に關与する (66)。

骨格筋の基本構造

骨格筋の最小単位は筋原線維であり、筋原線維が密集して筋線維を形成する。筋原線維は、ミオシンからなる比較的太いフィラメントと、アクチンやトロポニンおよびトロポミオシンにより構成される細いフィラメントから形成される。筋線維は、分化した筋芽細胞が融合することで形成される筋管細胞が成熟したものであるため、多数の核を保有しており、また1本の細長い構造をであることが特徴である。また、筋線維は筋鞘と呼ばれる膜に包まれており、筋鞘の内側には筋原線維の他に筋小胞体とミトコンドリアが観察される。筋線維の表面には筋衛星細胞が存在しており、筋組織の損傷を受けて活性化して骨格筋へ分化することで筋肉の再生の役割を担っている。

筋線維が密集したものが、筋線維群である。筋線維群は、筋内膜と筋周膜に包まれており、その内部には毛細血管が筋組織に栄養等を補充している。筋線維群が密集したものが骨格筋である。骨格筋は筋線維群を筋外膜が包み込んだ構造をしており、その末端には腱組織が結合している。腱組織は硬組織である骨に結合して筋肉を支えていることから、骨格筋や腱組織、骨組織のいずれかの異常は筋力に影響を与える (Figure 7) (67-68)。

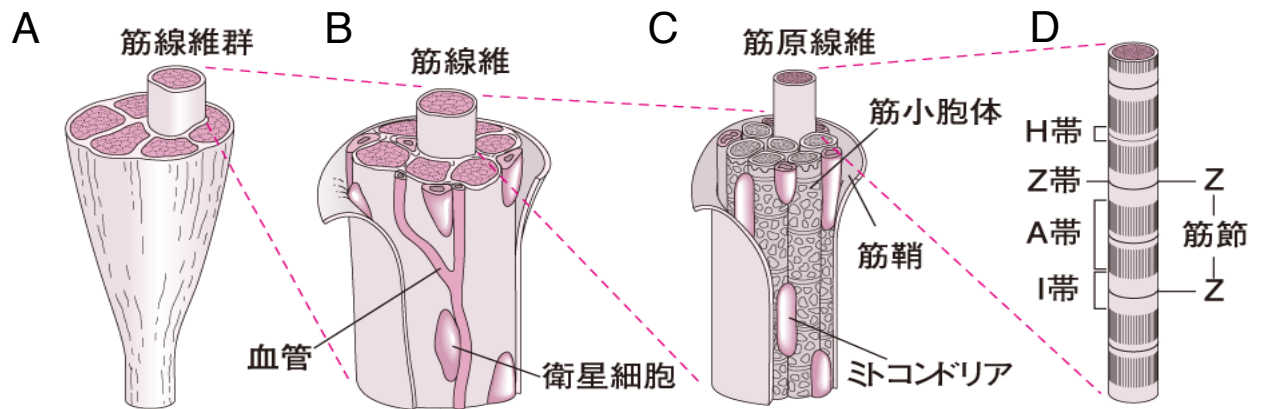


Figure 7：筋線維の内部構造

筋線維の内部構造を模式的に示す。A：骨格筋 B：筋線維群 C：筋線維 D：筋原線維(90)

心筋の分類と基本構造

心筋の分類：心筋は横紋筋で構成され、固有心筋と特殊心筋に分類される。

固有心筋：

固有心筋は心臓の収縮力に関与しており、心房の収縮に関与する心房筋と心室の収縮に関与する心室筋に大別される。

特殊心筋：

特殊心筋は、心臓における興奮の伝達に関与することから、刺激伝達系とも呼ばれる。特殊心筋は、洞房結節、房室結節、ヒス束、左脚右脚およびプルキンエ線維に分けられる。平常時の心臓の拍動は自動性を持ち、洞房結節がペースメーカーとなり、一定のリズムで収縮を繰り返すが、交感神経や副交感神経の興奮により調整される。また、骨格筋と比較すると心筋の横紋筋構造は不明瞭であることも特徴である。

心筋の基本構造

骨格筋とは異なり、心筋の細胞は分岐して網目状に結合している。細胞同士はギャップ結合によって結合しており、この結合のことを介在板という。

筋機能の制御における亜鉛の関与

亜鉛欠乏症と加齢性疾患

血中亜鉛量は、加齢に伴い減少する。その原因として、食事量の減少や、筋肉量の低下などが考えられている。健康な状態と要介護状態の中間とされるフレイル（虚弱）状態の高齢者は、顕著な血清亜鉛値の低下を示すことが報告されている(69)。

亜鉛欠乏症と運動機能障害

高齢の下肢機能障害患者において、亜鉛補充が運動機能を改善することが報告され(69)、高齢者における低亜鉛状態が、運動機能の低下に深く関与している可能性が示されている。加齢に伴う運動機能の低下は、健康寿命に密接に関与するため、高齢者の亜鉛摂取量の減少は、筋力低下による転倒等のリスクを高める可能性があると考えられている。

亜鉛欠乏症とサルコペニア

サルコペニアとは、加齢に伴って筋肉量と筋力が低下することによる身体能力の低下を指す。筋肉は、亜鉛の最大の貯蔵臓器であることから、加齢に伴う亜鉛量の低下は、さらなる筋肉量の低下をもたらし、サルコペニアに至るリスクを高める可能性がある。実際に、高齢者における亜鉛の摂取量低下や生体内亜鉛量の低下が、サルコペニアの発症と相関することを示す報告があり、亜鉛欠乏症はサルコペニアの悪性因子である可能性が考えられる(70–72)。

学位論文に関連する問題提起

本邦が直面する高齢化社会における運動器障害

前述したように、ZIP 13 の失調に起因する EDSSPD3 は筋緊張低下を示す。さらに、当該患者には脳出血や脳梗塞の既往歴があり(患者および担当医からの情報提供)、心血管系の疾患に起因する二次性の脳血管疾患が疑われる。しかしながら、骨格筋と心筋における ZIP13 を介した亜鉛恒常性の意義については、まだ解明されていない。

一方、超高齢社会を迎えた本邦では、高齢者のロコモティブシンドロームや脳血管

疾患による健康寿命の低下が大きな社会問題となっており、これらの理解と画期的な治療方法の開発が急務である。

そこで筆者は、ZIP13 を介した亜鉛シグナルが骨格筋および心筋においてどのような役割を演じているのか、その解明を目的として本研究を実施した。骨格筋および心筋における ZIP13 の役割解明は、運動機能障害や脳血管疾患の新たなメカニズムを示すとともに、新規性の高い治療戦略の構築が期待されると考える (73)。

本研究における検討内容の概要

第二章では EDSSPD3 の疾患モデルマウスである *Zip13*-KO マウスを用いた検討について述べる。具体的には *Zip13*-KO マウスを解析に用いて表現型を解析するとともに、骨格筋組織における遺伝子の発現状況を解析することで、ZIP13 の機能喪失が生体の骨格筋組織に与える影響について精査した。

EDSSPD3 は、症例数が極めて少ない希少疾患であるため、EDSSPD3 の疾患モデルである *Zip13*-KO マウスは、ZIP13 の生理的意義の解明に寄与するだけでなく、EDSSPD3 の病態解明や治療方法の開発に有用であると考えている。

第三章ではマウス筋芽細胞由来の C2C12 細胞株を用いた検討について述べる。具体的には C2C12 細胞より *Zip13* 発現抑制細胞を作製して、骨格筋分化における ZIP13 機能低下の影響を精査した。

第四章では EDSSPD3 患者より作製した iPS 細胞を用いた検討について述べる。具体的には EDSSPD3 患者由来の皮膚線維芽細胞を用いて、iPS 細胞株を樹立し、骨格筋へ分化させることで、第二章および第三章においてマウス組織および細胞において認められた現象が、ヒト患者由来細胞でも認められるのかを確認するとともに、遺伝子修復を行うことで、これらの異常が回復するのかを確認した。

また、iPS 細胞は多様な細胞へ分化することが可能であるため、本研究で確立した患者由来 iPS 細胞株は、ZIP13 の失調に起因する異常の分子メカニズムを解明するための有用なツールであると考ええる。

第五章では心筋における亜鉛恒常性の意義について述べる。具体的には野生型 (WT) マウスより調整した初代培養心筋細胞を用いて、心筋細胞において亜鉛の枯渇が生存

に致命的な影響を与えるのかを精査するとともに、心毒性モデルを適用することで、心負荷が *Zip13* の発現に関与するのかを検証した。

第六章では *Zip13*-KO マウスの心筋機能について述べる。具体的には WT および *Zip13*-KO マウスより調整した初代培養心筋細胞の拍動を画像解析するとともに、心臓の組織切片を作製して解剖学的所見を考察した。さらに、WT および *Zip13*-KO マウスの心電図を解析した。

第七章では *Zip13*-KO マウス遺伝子発現について述べる。具体的には WT および *Zip13*-KO マウスより調整した初代培養心筋細胞を用いて RNA-seq を行い、網羅的な遺伝子の発現を解析することで、心筋細胞における ZIP13 失調の影響を精査した。

【本論】

骨格筋における ZIP13 の役割解明

序論に記述したように (Page 22)、ZIP13 の機能喪失は骨格筋の異常を呈するが、骨格筋における ZIP13 の役割は解明されていない。本項から始める本論では、骨格筋における ZIP13 の役割解明のために実施した実験内容を記述する。

具体的には、*Zip13* 欠損マウスの表現型を解析するとともに、マウス筋芽細胞由来 C2C12 細胞株を用いて骨格筋の分化における ZIP13 の機能を解析した。さらに、EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞株を作製し、樹立した iPS 細胞株を用いて、ヒトにおける ZIP13 機能喪失に起因する骨格筋分化への影響を解析した。

第二章：Zip13-KO マウスを用いた検討

表現型の解析

検討内容(筋力、体重および、筋重量の測定と、各種骨格筋の形態観察)

ZIP13 の失調が骨格筋に与える影響を精査するために、*Zip13*-KO マウスの筋力、体重筋重量、および各種骨格筋の形態を以下の方法で評価した。

方法

筋力測定

EDSSPD3 患者の筋力が低下することから、*Zip13*-KO マウスの筋力を測定して、野生型(WT : Wild type)マウスと比較した。具体的には、金網にマウスを静置して反転させ、落下までに要する時間を測定する Wire hang test と (Figure 8A)、マウス前肢の握力を測定する Grip strength test (Figure 8B)を実施した。重力に逆らう Wire hang test の状態では、マウスは姿勢の維持に持続的な筋緊張を要することから、遅筋の機能である筋持久力を評価できる。一方、Grip strength test は、筋肉の最大出力を測定することから、速筋の機能である筋瞬発力の評価が可能である。

A



B



Figure 8 : Wire hang test と Grip strength test

本研究に適用した筋力測定方法を示す。

A : Wire hang test

マウスを金網上に静置した後に反転させ、落下までに要する時間を測定した(76)。

B : Grip strength test

マウスの尻尾を保持し、前肢を金属バーに掴ませ、水平方向に引き、バーを離すまでの最大出力を測定した(74-76)。

Wire hang test の方法

1cm 四方の格子状金網(1 辺は 30cm の正方形)の外枠に、マウスの運動範囲を制御するために幅約 5cm のガムテープを貼付した。マウスを金網上に乗せて反転させ、金網を高さ 80cm の位置に静置した。金網を反転させてからマウスが落下するまでに要する時間を計測した(76)。本試験に対するマウスの学習による影響を排除するために、各マウスに対する測定は 1 週間おきに 1 回に留め、3 回の平均値を 1 個体の結果とした。*Zip13-KO* マウスは成長遅延による矮小化を示すため、測定値を体重で除すことで、体重差による影響を排除した。各個体の測定値を平均化し、T 検定で有意性を評価した。

マウス

- ・ 週齢 : 15-16 週齢
- ・ 性別 : 雄 (WT : n=3, *Zip13-KO* : n=3)
- ・ 系統 : C57BL/6

実験機器等

- ・ 金網 (1 辺 30cm 正方形)
- ・ 布ガムテープ
- ・ ストップウォッチ

Grip strength test の方法

GPM-101B を設置し、マウスの前肢を測定用バーに掴ませ、尻尾を親指と人差し指で摘み、水平方向に徐々に牽引した(74-76)。同様の測定を 3 回実施し、平均値を算出して、各個体における体重で除した値をマウスの筋力とした。各個体の筋力値を平均化し、T 検定で有意性を評価した。

マウス：

- ・ 週齢：15-16 週齢
- ・ 性別：雄 (n=3)
- ・ 系統：C57BL/6

実験機器：

- ・ GPM-101B (有限会社メルクエスト)

体重および筋重量の評価方法

方法

体重測定の概略

筋肉量は体重と相関する (77)。筋重量と体重の比率の変化は、筋力に影響すると考えられるため、各マウス由来の速筋と遅筋の重量は、体重あたりの筋重量に換算した。

マウス

- ・ 週齢：15-16 週齢
- ・ 性別：雄 (WT : n=6, *Zip13*-KO : n=7)
- ・ 系統：C57BL/6

実験機器：

- ・ 電子天秤

体重および筋重量の測定方法：

電子天秤を用いてマウスの体重を測定 (Figure 10A) した後に、頸椎脱臼で屠殺したマウスの後肢脛脛側の皮膚を切開して、筋組織を露出させた。筋組織から、本実験には必要のない外腓腹筋を除去し、踵側および膝側の腱を切断して骨格筋組織とした。

摘出した骨格筋組織は、皮膚側より順に、速筋の腓腹筋 (Gastrocnemius : Gas)、足底筋 (Plantaris : Pla)、および遅筋のヒラメ筋 (Soleus : Sol) に分類される (Figure 9A-D)。上記方法で WT および *Zip13*-KO マウスから骨格筋組織を採材し、各筋重量を計測した (Figure 10B)。

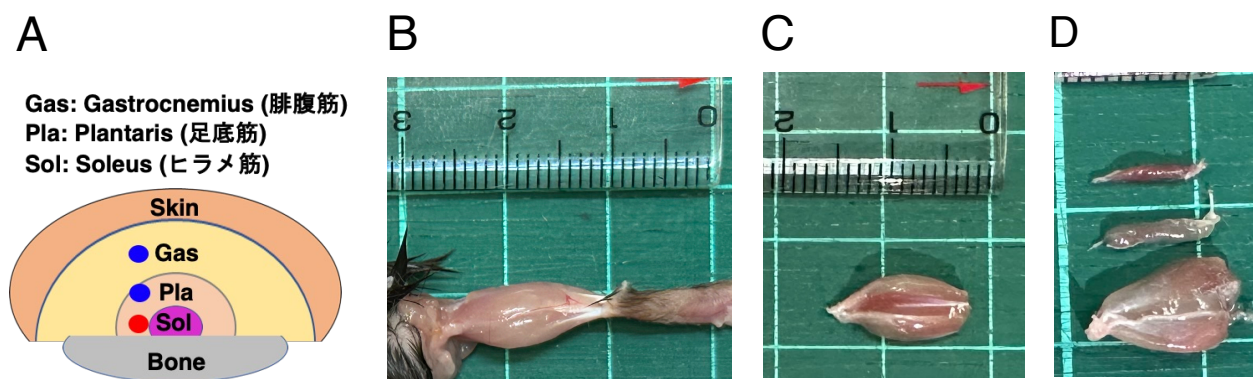


Figure 9 : マウス後肢の骨格筋

A : マウス骨格筋断面の模式図

マウス後肢脛腓側の骨格筋は皮膚側より腓腹筋 (Gastrocnemius : Gas)、足底筋 (Plantaris : Pla)、および遅筋のヒラメ筋 (Soleus : Sol) に分類される

B : マウス後肢皮膚側の組織画像

マウス後肢脛腓側の皮膚を剥離すると外腓腹筋が露出する。外腓腹筋を除去すると腓腹筋が露出する。

C : 骨格筋の種類毎の画像

画像上部よりヒラメ筋、足底筋、腓腹筋。ヒラメ筋と足底筋は形状、大きさおよび重量が類似していることから、遅筋と速筋の比較対象として用いられる。

D : マウス後肢骨側の組織画像

骨と筋肉を結合している腱を切断すると、腓腹筋と結合した足底筋およびヒラメ筋が剥離できる。赤い色調が強い箇所がヒラメ筋に該当する。

骨格筋組織の評価

方法

骨格筋組織評価の概略

筋力低下の原因には、筋発生障害、筋形成不全、筋肉量低下、骨格筋組成の変化、神経伝達異常をはじめとする骨格筋以外の要因がある。そこで、*Zip13*-KO マウスの骨格筋における基質的な変化の有無を確認するために、WT および *Zip13*-KO マウスの骨格筋凍結切片を作製し、HE 染色と免疫染色を適用して、骨格筋組織の性状を解析した。

徳島文理大学倫理委員会の承認

本研究は、徳島文理大学倫理委員会の承認（承認番号 19-4）と関連法規に従い、検討した。

マウス

- ・ 週齢 : 10 週齢
- ・ 性別 : 雄 (WT : n=3, *Zip13*-KO : n=3)
- ・ 系統 : C57BL/6

実験試薬等

- ・ トラガントゴム (ナカライ : 34409-62)
- ・ 液体窒素 (四国大陽日産)
- ・ コルクボード
- ・ イソペンタン (キシダ化学 : 000-59895)
- ・ マイヤーヘマトキシリン溶液 (Wako : 131-09665)
- ・ エオシン Y (Wako : 058-00062)
- ・ キシレン (ナカライ : 36611-03)
- ・ ウシ血清アルブミン (ナカライ : 01860-36)
- ・ PBS (-) (ナカライ : 14249-95)
- ・ Triton X-100 (ナカライ : 35501-02)
- ・ Anti Laminin2 α antibody Rat monoclonal (シグマアルドリッチ : L0663-25UL)
- ・ PBST : PBS1L に対し Triton X-100 1mL を添加
- ・ マリノール (武藤化学 : 2009-1)
- ・ Normal Goat Serum Blocking solution (Vector Laboratories : S-1000)
- ・ Anti -Laminin2 (α -2Chain) antibody Rat monoclonal (シグマアルドリッチ : L0-663-25UL)
- ・ Goafit anti Rat-IgG (H+L) Alexa Fluor™ Plus594 (Invitrogen : A48264)
- ・ Hoechst33342 (Invitrogen : H3570)
- ・ Blocking Buffer : Normal Goat Serum Blocking solution 80 μ L、10% ウシ血清アルブミン (Bovine Serum Albumin : BSA) / PBS 溶液 160 μ L、PBST 560 μ L を混合し、Blocking Buffer とした。
- ・ 抗体希釈液 : 10% BSA / PBS 200 μ L、PBST 800 μ L を混合し、抗体希釈液とした。

実験機器

- ・クリオスタット (Leica)
- ・BZ-X800 (キーエンス)

凍結切片の作製・HE 染色・筋線維の断面積測定

凍結切片の作製：

トラガントゴム 200 mg に対して 1 mL の水を加えて混合し、1.5 cm 四方にカットしたコルクボードに山状になるように盛り付けて、固定用の土台とした。Page 27-28 に記載した筋重量の測定と同様の方法で骨格筋を採取し、踵側の腱をトラガントゴムに埋没させた。80 mL 程のイソペンタンで満たした 100 mL ビーカーを液体窒素で十分に冷却し、骨格筋組織の装着したコルクボードをピンセットで固定して、イソペンタン内に浸潤して激しく 1 分間程度攪拌し、骨格筋組織の凍結ブロックとした。作製した凍結ブロックをクリオスタットで厚さ 5 μm の切片を切り出し、スライドガラス上に貼り付けて切片とした。

HE 染色による形態観察：

作製した凍結切片を 30 分間風乾し、スライドガラス用チャンバーに PBST を入れた容器に移し、30 分間浸漬して透過処理を行った。その後、流水で 2-10 分間洗浄し、ヘマトキシリン溶液に 2 分間浸漬した。2 分間の流水水洗の後に、エオシン Y 溶液に 1 分間浸漬して流水水洗した。その後、100%エタノールに浸漬してキシレンで 3 分間×3 回処理し、マリノールで封入した後に、蛍光顕微鏡 (キーエンスオールインワン BZ-X800) を用いて観察した。

骨格筋線維の断面積解析：

作製した凍結切片を 30 分間風乾し、スライドガラス用チャンバーに PBST を入れた容器に移し、30 分間浸漬して透過処理を行った。その後、組織上に Blocking Buffer を 100 μL 滴下して湿潤器に入れ、室温で 60 分間静置した後に、PBST で 5 分間の洗浄を 4 回実施した。抗体希釈液 200 μL に対し Anti -Laminin2 (α -2Chain) antibody Rat monoclonal 1 μL を添加して (200 倍希釈) 1 次抗体液とした。Blocking 処理した凍結切片上に 1 次抗体液 100 μL を滴下して湿潤器に入れ、室温で 60 分間静置した。PBST で 5 分間×4 回の洗浄を行った後に、抗体希釈液 1 mL

に Goat anti Rat-IgG (H+L) Alexa Flour™ Plus594 および Hoechst33342 をそれぞれ 1 μ L ずつ添加して 2 次抗体液とし、PBST 洗浄後の凍結切片上に 100 μ L 滴下し、遮光した湿潤器に入れ、室温で 60 分間静置した。PBST 洗浄を 5 分間×4 回行い、マリノールで封入処理して、蛍光顕微鏡 (BZ-X800) を用いて標的タンパク質の発現状況を解析した。

Laminin2 α は骨格筋細胞の基底膜に高発現することから、免疫染色により染色された領域は骨格筋細胞の輪郭を示している。すなわち、Laminin2 α 陽性領域の内側を筋線維の細胞質と定義して、Laminin2 α 陽性領域の内側の平均断面積を測定した。

結果

Zip13-KO マウスにおいて、顕著な体重低下を示した (Figure 10A)。Wire hang test の結果、*Zip13*-KO マウスが落下までに要した時間は、WT マウスと比較し短かった (Figure 10B)。Grip strength test の結果、*Zip13*-KO マウスの最大筋力は低い値を示した (Figure 10C)。筋重量を測定した結果、*Zip13*-KO マウスにおいて、体重非依存的な後肢筋重量の低下を示し (Figure 10D)、骨格筋を細分化して重量を検証した場合、速筋である Gas の筋重量は体重非依存的に減少し (Figure 10E)、同様に遅筋である Sol の筋重量も体重非依存的に減少した (Figure 10F)。さらに HE 染色の結果、*Zip13*-KO マウスの筋線維は見上、速筋線維において矮小化を認めた (Figure 10G)。免疫染色による筋断面積を解析した結果、*Zip13*-KO マウスの速筋において顕著な矮小化を示した (Figure 10H-I)。これらの結果は、ZIP13 が骨格筋形成に関与しており、ZIP13 の機能喪失に起因して筋形成に異常が起きた結果、筋力の低下を招いた可能性を示唆している。

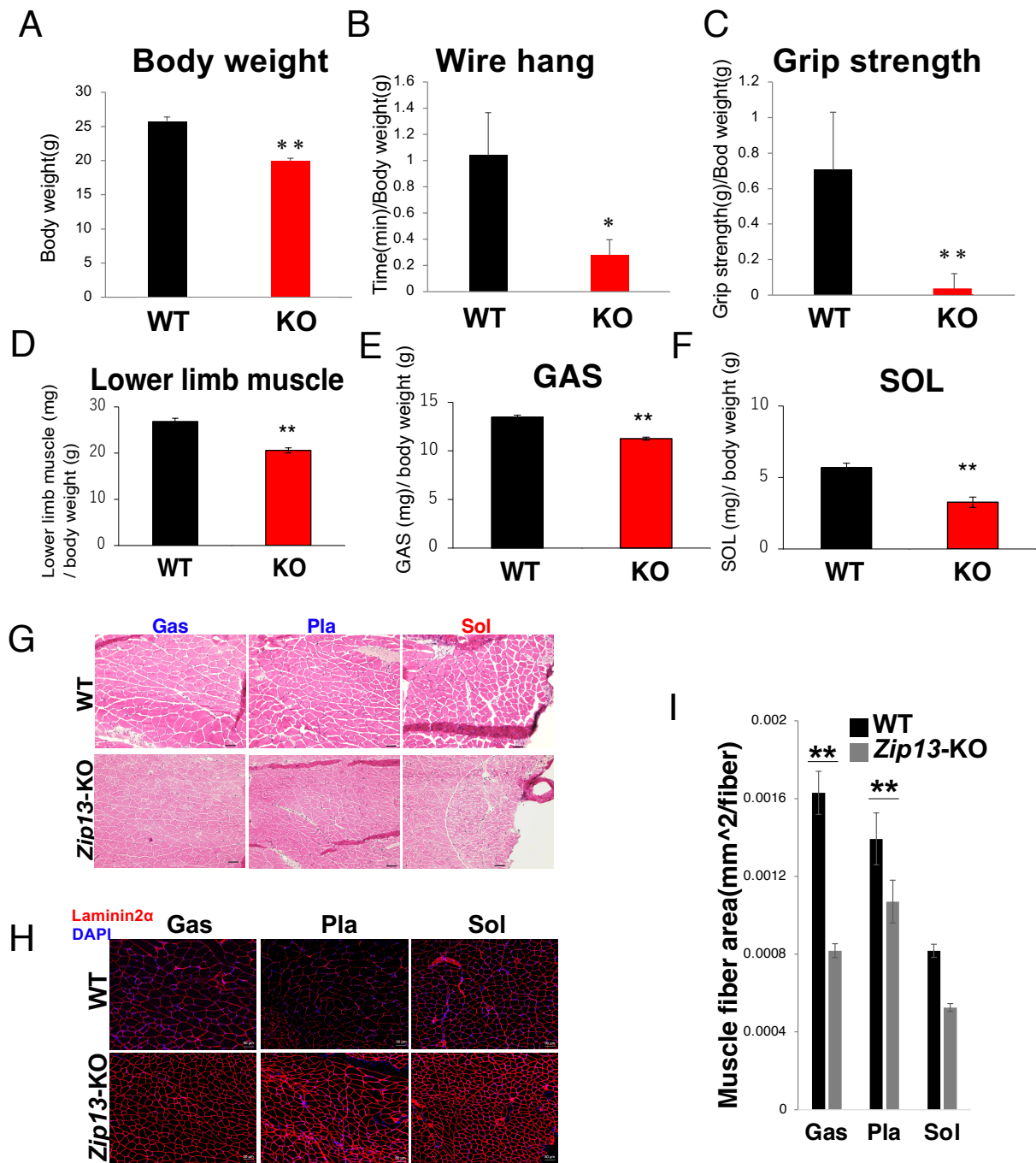


Figure 10 : *Zip13*-KO マウスの筋力および筋重量の評価

A : 体重測定

B : Wire hang test C : Grip Strength test

15-16 週齢の雄マウスの各個体の体重を測定し、筋力測定の測定値を体重で除した (A-B)。(WT:n=3, *Zip13*-KO : n=3)

D-F : 筋重量の測定

D : 後肢筋重量 (Gas+Pla+Sol)、E : Gas 重量、F : Sol 重量

15-16 週齢の雄マウスの体重及び筋重量の測定し、筋重量は体重で除した (WT : n=6, *Zip13*- : n=7)。

G : HE 染色 H-I : 蛍光免疫染色と画像解析

10 週齢の雄マウスの Gas、Pla および Sol の組織切片に HE 染色および蛍光免疫染色を適用し、画像を撮影した。免疫染色は筋基底膜に高発現している Laminin2α で骨格筋切片を蛍光免疫染色して、画像解析により筋断面積を測定した (WT : n=3, *Zip13*-KO : n=3)。それぞれの結果は、独立した施行により平均値を求め、T 検定を適用して有意差を評価した。エラーバーは平均標準誤差。p* < 0.05, p** < 0.01

遺伝子の発現解析

検討内容(筋分化調節因子の発現)

体重および筋重量の評価方法 (Page 27-28) で示した方法で WT および *Zip13*-KO マウスから採取した Sol より全 RNA を抽出して、筋分化調節因子の発現状況を qPCR 法で解析した。骨格筋は、分化が亢進することで筋分化調節因子 (MRFs : Myogenic Regulatory Factors) の発現が変動する。筋幹細胞では *Pax7* の発現が高く、その発現は分化が進行するにつれて減少し、中期分化マーカー遺伝子の *MyoD* や *Myf5* の発現が上昇する。さらに分化が進むと、中期分化マーカー遺伝子の発現は減少し、*Myogenin*、*Desmin*、*Myh* 等の後期分化マーカー遺伝子の発現が上昇する。この遺伝子の発現量を測定することで、骨格筋の分化段階を評価できる (78)。

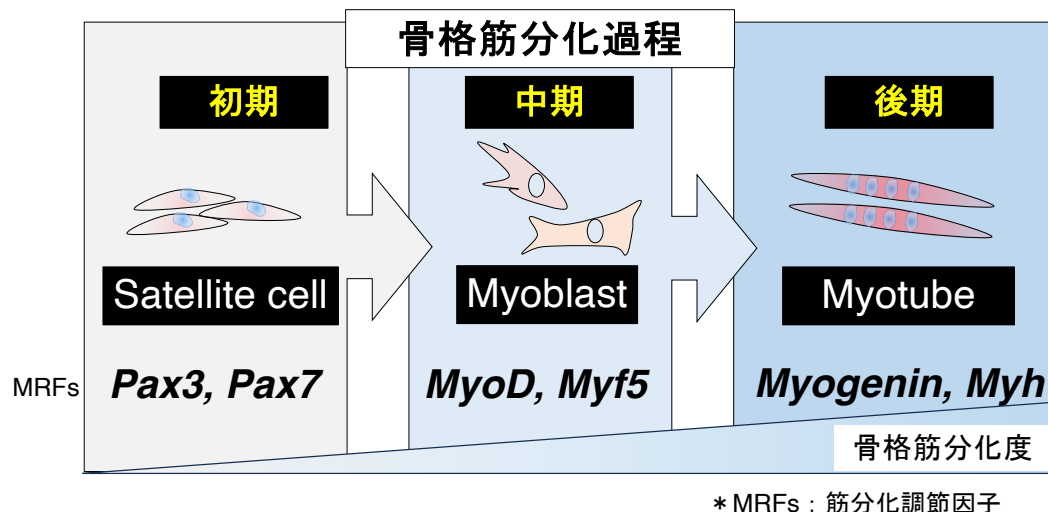


Figure 11 : 筋分化過程における筋分化調節因子の発現

骨格筋は分化に伴い、MRFs の発現が変動する。筋幹細胞では、初期分化遺伝子の *Pax3* や *Pax7* の発現が高いが、分化が亢進するとこれらの発現は低下し、*MyoD* などの中期分化遺伝子の発現が亢進する。さらに分化が亢進して筋管を形成すると、*Myogenin* や *Myh* の発現が上昇する。これらの MRFs の発現を解析すること、骨格筋分化誘導系における骨格筋の分化状況を評価することができる (78)。

マウス

- ・ 週齢 : 18-21 週齢
- ・ 性別 : 雄 (WT : n=3, *Zip13*-KO : n=3)
- ・ 筋組織 : Sol
- ・ 系統 : C57BL/6

実験試薬

- ・ ジルコニアビーズ 3 mm (バイオメディカルサイエンス : ZZ30-0001)
- ・ セパゾール (ナカライ : 09379-55)
- ・ クロロホルム (Wako : 038-02606)
- ・ イソプロパノール (ナカライ : 29112-05)
- ・ エタノール (Wako : 057-00456)
- ・ UltraPureDistilled water (invitrogen : 10977-015)
- ・ PrimeScript RT Master Mix (Takara : RR036A)
- ・ THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix (TOYOBO : QPX-201)
- ・ 70%エタノール溶液

実験機器

- ・ Homogenizer Shakeman 6 (バイオメディカルサイエンス)
- ・ nano drop DS-11 (Denovix)
- ・ Quant Studio3 (Ehermo Fisher)

実験方法

全 RNA は、フェノール抽出法によって抽出した。具体的には、スクリュウキャップ付き 2 ml コニカルチューブに各マウス大腿筋 (Gas・Sol・Pla) を入れ、ジルコニアチューブおよびセパゾール 1 ml を添加し、Homogenizer Shakeman 6 (4000 rpm 30 秒×4 回) を用いて組織を破碎した。クロロホルムを 200 μ L 添加して Vortex を用いて 1 分間攪拌した後に遠心分離し (12000 rpm, 4°C 条件, 10 分間)、上層 (水層) を 1.5 ml エッペンチューブに移して、同量のイソプロパノールを添加し、転倒混和で混合した。10 分間静置した後に遠心分離処理 (12000 rpm, 4°C 条件, 10 分間) し、上清を除去して 70% エタノール溶液を添加した。遠心分離処理 (12000 rpm, 4°C 条件, 10 分間) した後に上清を除去して風乾し、UltraPureDistilled water を 50 μ L 添加して RNA ペレットを完全に溶解した。RNA 溶液を nano drop を用いて濃度と純度を測定した。

調整した全 RNA 溶液を用いて、complementary DNA (cDNA) を合成した。具体的には、全 RNA 溶液 1 μ g と PrimeScript RT Master Mix 2 μ L を混合し、UltraPureDistilled water を添加して全量 10 μ L に調整して、37°C 15 分→85°C 5 秒→4°C の条件で逆転写反

応を行い cDNA を得た。

合成した cDNA を用いて、quantitative PCR (qPCR) を実施した。具体的には、作製した cDNA 溶液 1 μ L と HUNDEBIRD Next SYBR qPCR Mix 10 μ L および、10 μ M に調整した目的遺伝子の Primer F と Primer R をそれぞれ 0.8 μ L 混合し、UltraPureDistilled water を加えて全量 20 μ L に調整し、Quant Studio3 を用いて 95°C30 秒→95°C5 秒*→60°C30 秒** (*および**を繰り返し 40 サイクル) の条件で DNA を増幅させた。得られたデータは β -actin でノーマライズを行い、各サンプルについて同一の施行を 3 回実施し、各サンプルの測定値を平均化し、T 検定で有意性を評価した。

結果

q PCR による解析の結果、*Zip13*-KO マウスの大腿筋では、骨格筋分化初期遺伝子の *Pax3* および *Pax7* の発現は顕著に高く (Figure 12A-B)、中期分化マーカー遺伝子の *MyoD* は顕著に低値を示した (Figure 12C)。しかしながら、後期分化マーカー遺伝子の発現に優位な差を示さなかった。すなわち、*Zip13*-KO マウスの骨格筋は、分化が抑制されている可能性が示唆された。

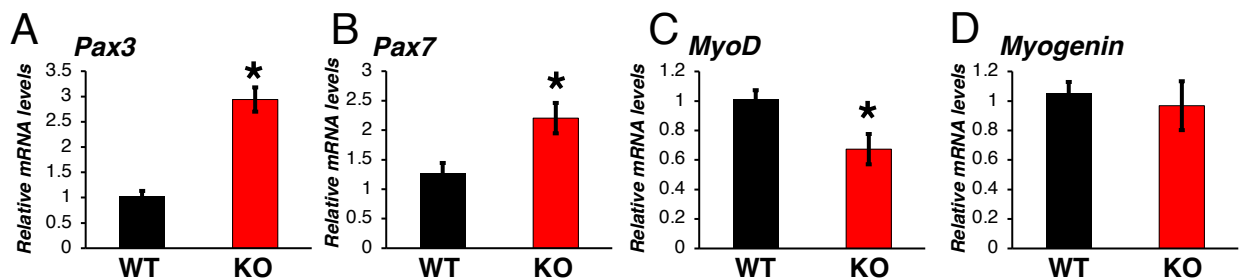


Figure 12 : *Zip13*-KO マウスにおける遺伝子発現解析

18-21 週齢、雄の WT および KO マウスのそれぞれ 3 個体より単離した後肢骨格筋 (Gas・Sol・Pla) を用いて、各遺伝子の発現を qPCR で解析した (A. *Pax3* B. *Pax7* C. *MyoD* D. *Myogenin*)。

それぞれの平均値を求め、T 検定を適用して有意差検定を行った。エラーバーは平均標準誤差。(WT : n=3, *Zip13*-KO : n=3) $p^* < 0.05$

小括

Zip13-KO マウスは顕著な筋力低下を示し、その筋線維は矮小化を示した (Figure 10)。骨格筋における遺伝子の発現状況を解析したところ、筋分化調節因子の発現制御に異常を呈した (Figure 12)。以上の結果から、ZIP13 は骨格筋の正常な形成と恒常性の維持に関与する可能性が示唆された (表 3)。

一方、骨格筋組織にはさまざまな細胞が混在し、筋機能には骨や腱もしくは神経組織を構築する細胞も関与する。骨格筋細胞自律的な分化に ZIP13 が関与するのかを精査するために、次項に示す骨格筋関連細胞株を用いた検討を行った。

表 3. *Zip13*-KO マウスは、筋力の低下、筋線維形態の異常および、骨格筋における筋分化調節因子の発現制御の異常を示す。

Figure 10	Figure 10	Figure 12
筋力	筋線維	筋分化調節因子の発現
筋力低下 Wire hang (遅筋) Grip strength (速筋)	矮小化 速筋における筋断面積の縮小	制御異常 <i>Pax3</i> , <i>Pax7</i> (発現上昇) <i>MyoD</i> (発現低下)

結果の概要

- *Zip13*-KO マウスは筋力の低下を呈し、骨格筋における筋線維の縮小化と筋分化遺伝子の発現変動を確認した。
- ZIP13 は、正常な骨格筋の形成と恒常性維持および、機能に必要である可能性が示唆された。

第三章：C2C12 細胞株を用いた検討

Zip13-KO マウスを用いた検討結果から、ZIP13 が骨格筋の形成に関与している可能性が示唆された。そこでマウス筋芽細胞由来 C2C12 細胞株を用いて骨格筋の分化における ZIP13 の役割を解明するために以下の検討を行った。

C2C12 細胞株の骨格筋分化

マウス筋芽細胞由来の C2C12 細胞株は IGF (Insulin like growth factors) を多く含有するウマ血清 (Horse Serum : HS) による分化刺激を加えることで、骨格筋へ分化することが知られている (Figure 13) (79-80)。そこで、骨格筋の分化による ZIP13 の関与を精査するために、野生型 (WT) C2C12 を HS による分化誘導を行うことで (Figure 14A)、MRFs および *Zip13* の発現変動を qPCR 法を適用して解析した。



Figure 13：骨格筋の分化

C2C12 における骨格筋分化のスキーム

マウス筋芽細胞由来の C2C12 はウマ血清 (Horse Serum : HS) による刺激を加えることで、骨格筋へ分化することが知られている (79-80)。

骨格筋分化における *Zip13* 遺伝子および筋分化調節因子の発現

検討内容 (骨格筋の分化に伴う遺伝子の発現解析)

細胞：C2C12

実験試薬：

- DMEM (High Glucose) (Wako : 043-30085)
- PBS (-) (ナカライ : 14249-95)
- Antibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solution (100x) (Stabilized) (ナカライ : 09366-44)
- Fetal Bovine Serum (シグマアルドリッチ : 173012)
- Horse Serum (シグマアルドリッチ : H1270-500ml)
- Trypsin-EDTA (ナカライ : 32777-15)

- ・ pSUPER.retro.puro vector plasmid (OligoEngine)
- ・ Lipofectamine LTX (Thermo Fisher Scientific)
- ・ セパゾール(ナカライ : 09379-55)
- ・ クロロホルム(Wako : 038-02606)
- ・ イソプロパノール(ナカライ : 29112-05)
- ・ エタノール(Wako : 057-00456)
- ・ UltraPureDistilled water (invitrogen : 10977-015)
- ・ PrimeScript RT Master Mix (Takara : RR036A)
- ・ THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix (TOYOBO : QPX-201)
- ・ 70%エタノール溶液 : UltraPureDistilled water を用いてエタノールを 70%となるように調整
- ・ RIPA Buffer (ナカライ)

実験機器 :

- ・ nano drop DS-11 (Denovix)
- ・ Quant Studio3 (Ehermo Fisher)

実験方法

細胞培養

細胞の培養は T75 フラスコもしくは 10 cm dish に細胞を播種して継代培養を行った。培地には DMEM にウシ胎児血清 (Fetal Bovin Serum : FBS) 10%、抗生物質(ペニシリン・ストレプトマイシン・アムホテリシン B) 1%の組成となるように添加して使用(以後 FBS 培地)した。

細胞継代

細胞の継代はアスピレーターを用いて培地を除去し、PBS 2 mL を添加して細胞を洗浄した。その後 PBS をアスピレーターにより除去して、Trypsin-EDTA を 2 mL 添加して、37°Cインキュベーター内で 5 分間静置して細胞を剥離させた。細胞の剥離を顕微鏡を用いて確認した後に、FBS 培地を 5 mL 添加して Trypin-EDTA を失活させた。その後、ピペッティングにより細胞を完全に隔離させ、15 mL コニカルチューブに細胞懸濁液を採取した。細胞懸濁液を遠心分離機を用いて 4°Cにて 1000 rpm,

5 分間の遠心により、細胞と培養液を分離した。その後、アスピレーターを用いて上清を除去し、新たな FBS 培地を 5 mL 添加して再懸濁した。細胞懸濁液をトリパンブルー溶液により染色して血球計数板を用いて生細胞数を算出した。その後、細胞を新たな培養容器に 5×10^4 個となるように播種した。播種後は 5%CO₂・37℃条件で培養した。

C2C12 細胞の骨格筋分化誘導

6 Well plate に C2C12 細胞を 1 Well あたり 1×10^5 個播種して、翌日 DMEM にウマ血清 (Horse Serum : HS) 2%、抗生物質 1% の組成となるように添加した培地 (以後 HS 培地) に培地交換して、2 日おきに新しい HS 培地に培地交換して 6 日間分化誘導した。分化 0 より 6 日目までの各日数における全 RNA を抽出して、*Zip13* および MRFs の発現状況を qPCR 法を適用して解析した (Figure 14A)。

RNA 抽出

各 Well の培養液を除去し、PBS を 1 mL 添加して、PBS を除去する操作を 2 回繰り返した後に、セパゾールを 1 mL 添加してピペッティングにより細胞を完全に溶解させ、1.5 mL チューブに全量を採取した。ボルテックスによる攪拌を 1 分間行い、その後、クロロホルムを 200 μ L 添加して再度ボルテックスによる攪拌を 1 分間行い、遠心分離機を用いて 4℃にて 12000 rpm, 15 分間の遠心により、中間層のタンパク質をコンタミさせないように注意しながら、上層の水層のみを約 500 μ L 採取して新しい 1.5mL チューブに移した。その後、移した液と同量のイソプロパノールを添加して転倒混和し、室温において 10 分間静置した。遠心分離機を用いて 4℃にて 12000 rpm, 10 分間の遠心を行った後に上清を除去して、70%エタノールを添加したのちに再度、遠心分離機を用いて 4℃にて 12000 rpm, 10 分間の遠心を行った後に上清を除去して、クリーンベンチ内で 10 分間の風乾を行った。風乾後、精製した RNA ペレットを Ultrapure water を 30 μ L 添加して完全に溶解させた。

骨格筋分化誘導細胞における *Zip13* および MRFs の発現解析

骨格筋分化誘導の各培養日数において、細胞より全 RNA を抽出して qPCR 法を適用して *Zip13* と MRFs の発現状況を解析した。RT-PCR および q-PCR の条件は Page 34-35 で示した方法に従い実施した。

結果

C2C12 細胞は分化誘導刺激により分化 3 日目より *Zip13* mRNA は発現上昇を示した (Figure 14B)。中期分化マーカー遺伝子である *MyoD* mRNA は分化 2 日目に上昇し、3 日目に発現減少を示すが、6 日目に再度上昇した (Figure 14C)。後期分化マーカー遺伝子である *Myogenin* は分化 2 日目より日数経過とともに発現は上昇した (Figure 14D)。上記の結果より、*Zip13* は骨格筋の分化に関与する可能性が示唆された。

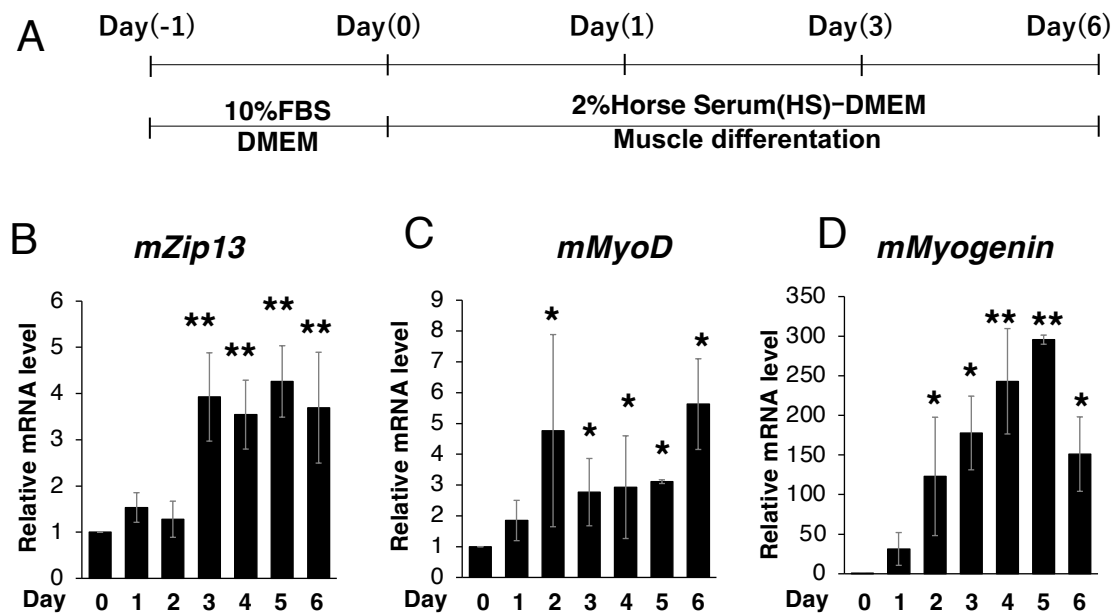


Figure 14 : C2C12 細胞の骨格筋分化における遺伝子発現

A : C2C12 細胞を用いた筋分化誘導実験方法を示す。C2C12 細胞を播種し、翌日にウマ血清含有培地へ交換して静置培養を行なった。48 時間毎に培地を交換し、分化誘導前 (Day0) から指定日に細胞を回収した。

B-D : 上記 A で調整した細胞から RNA を抽出し、各遺伝子の発現を qPCR 法で解析した。同一の施行を 3 回繰り返して、平均値を算出した。Day0 における遺伝子の発現量に対して各指定日における遺伝子発現を、T 検定を適用して有意差検定を行った。エラーバーは平均標準誤差。n=3 p* < 0.05, p** < 0.01

(B : *Zip13* C : *MyoD* D : *Myogenin*)

Zip13 発現抑制細胞株の作製

検討内容 (Zip13sh プラスミドの導入による Zip13 発現抑制)

実験方法

製作者のプロトコールに従い、マウス *Zip13*-shRNA もしくは *Scramble* (Scr) 配列を pSUPER.retro.puro vector plasmid に挿入してマウス *Zip13*-shRNA もしくは *Scramble* plasmid を作製した。C2C12 細胞に Lipofectamine LTX を用いて作製した plasmid をトランスフェクションした。トランスフェクション後にピューロマイシン 5 µg/ml を含有する FBS 培地に培地交換して 48 時間インキュベーションを行い、qPCR 法を適用して *Zip13* の knock down (KD) 効率を評価した。残りの細胞を限界希釈法を適用して播種することで、12 クローンの細胞株を得た。得られた細胞株の *Zip13* の発現を解析して、KD 効率を評価して KD 効率の高い 2 クローンを選択した (KD#6 および#7)。

骨格筋分化誘導条件における Zip13 発現抑制の影響

検討内容 (筋管形成への影響と筋分化調節因子の発現)

実験方法

KD および Scr 細胞を Page 38-39 で示した方法に従って分化誘導を行い、顕微鏡を用いて分化 0 日および 3 日目における形態観察を行うとともに、分化 3 日目までの各培養日数における細胞より全 RNA を抽出して、qPCR 法を適用して *Zip13* および MRFs の発現状況を解析した。さらに、分化 0 日目および 3 日目における骨格筋の後期分化マーカータンパク質である MYH (Myosin Heavy Chain : MYH) の発現をウェスタンブロット (Western blot : WB) を適用して解析した。

結果

KD 効率約 50% の KD6 と、KD 効率 60% の KD7 の 2 クローンを得た (Figure 15A)。分化誘導後の細胞を形態観察した結果、Scr 細胞は分化 3 日目において筋管の形成を確認したが (Figure 15B 右上)、*Zip13*-KD 細胞では筋管の形成はほとんど確認できなかった (Figure 15B 右下)。qPCR の結果、Scr 細胞は分化日数の経過に伴い *MyoD* の発現は上昇したが、*Zip13*-KD 細胞は *MyoD* の上昇をほとんど認めず、Scr と比較して

Day2 および Day3 において KD7 は顕著な発現低下を認め、KD6 は Day2 では有意差は認めなかったものの、Day3 顕著な発現低下を示した (Figure 15C)。Scr 細胞において中期分化マーカー遺伝子である *Myf5* の発現は分化日数の経過とともに上昇したが、*Zip13*-KD 細胞は Day1 において発現の上昇を示したものの、Day2 では発現減少を示したのちに Day 3 において再び発現は上昇した。また、Scr 細胞と比較して Day0 および Day1 では発現量に有意な差を認めなかったものの、Day2 以降において顕著な発現低下を示し、KD7 は Day 3 でも顕著な発現低下を示した (Figure 15E)。後期分化マーカー遺伝子である *Myogenin* は、*Zip13*-KD 細胞および Scr 細胞において分化日数の経過とともに発現上昇を示し、Day0 では顕著な発現低下を示し、Day1 および Day2 日においては発現量に有意な差を示さなかったものの、Day3 では *Zip13*-KD 細胞において顕著な発現低下を示した (Figure 15D)。さらに、*Myh2* 遺伝子は Scr 細胞および *Zip13*-KD 細胞において、分化に伴い発現上昇を示し、Scr 細胞と比較して *Zip13*-KD 細胞は有意ではないものの発現の低下傾向を示した (Figure 15E)。また、WB の結果、Scr 細胞と比較して *Zip13*-KD 細胞では Day0 において MYH タンパク質の発現に差は見られなかったが、Day3 では発現量が低下した (Figure 15G)。上記の結果から ZIP 13 は骨格筋の分化において重要な役割を担う可能性が示唆された。

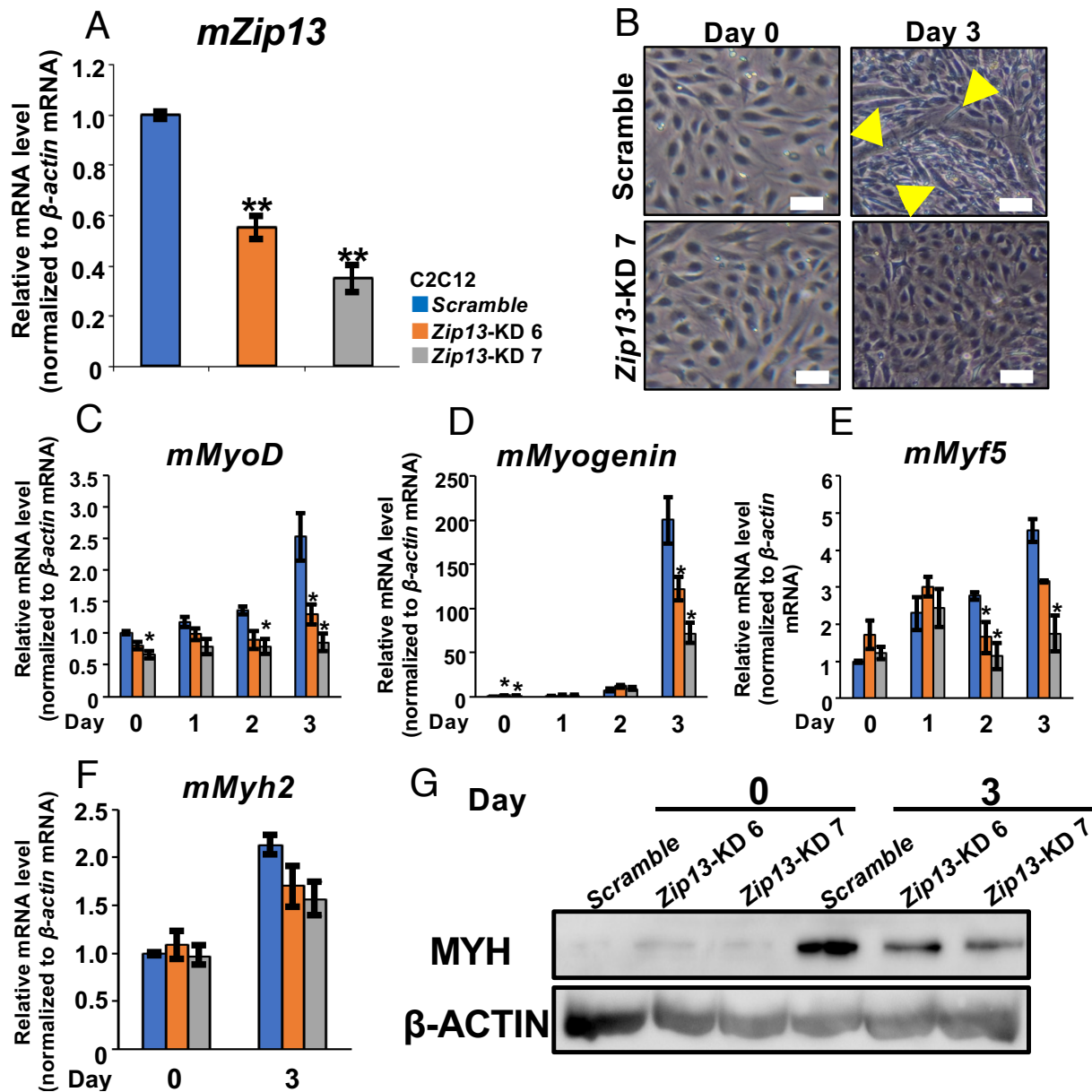


Figure 15 : *Zip13*-KD 細胞における骨格筋分化

- A : *Zip13* に対する siRNA 発現プラスミドを導入した安定的細胞株クローンにおける *Zip13* 遺伝子の発現を記す。同一の施行を 3 回繰り返し、平均値を求めた。エラーバーは平均標準誤差。各指定日について Scramble と KD 細胞を比較し、Dunnett 検定を適用して有意差検定を行った。n=3, $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$
- B : 骨格筋誘導時における細胞形態を示す。Scramble を導入した対照細胞株 (Scramble) で観察される筋管構造 (黄色矢頭) は、*Zip13* に対する siRNA 発現プラスミドを導入した細胞株 (*Zip13*-KD7) では観察されない。
- C-F : 筋分化調節因子 (C.*MyoD*, D.*Myogenin*, E.*Myf5*, F.*Myh2*) の発現状況を示す。*Zip13* に対する siRNA 発現プラスミドを導入した細胞株 (*Zip13*-KD6, *Zip13*-KD7) では、上記の筋分化調節因子の発現が有意に抑制されている。同一の施行を 3 回繰り返し、平均値を求めた。エラーバーは平均標準誤差。各指定日について Scramble と KD 細胞を比較し、Dunnett 検定を適用して有意差検定を行った。n=3, $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$
- G : *ZIP13* の失調は、骨格筋誘導時における MYH タンパク質の発現上昇を抑制する。対照細胞株 (Scramble) および、*Zip13* に対する siRNA 発現プラスミドを導入した細胞株 (*Zip13*-KD6, *Zip13*-KD7) にウマ血清で骨格筋分化を誘導して経時的に細胞を回収し、それらの全細胞溶解液を用いて MYH タンパク質の発現状況を Western blotting で解析した。

小括

骨格筋の分化に伴い、*Zip13* 遺伝子の発現が変動した。また、*Zip13*-KD 細胞は分化に伴う筋管構造を呈する細胞の減少を示すとともに、筋分化調節因子の発現低下を示した(表 4)。以上の結果から、ZIP13 は骨格筋の正常な分化に必要である可能性が示唆された。

Zip13-KO マウスおよび KD 細胞を用いた実験結果の一般性を検証するため、EDSSPD3 患者の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を作製して、骨格筋分化による影響を検討した。iPS 細胞に関する検討内容を次項以降に解説する。

表 4. *Zip13* の発現抑制は、C2C12 細胞の骨格筋分化誘導を阻害する.

Figure15		
細胞の形態	筋分化調節因子の発現	
筋管細胞	遺伝子	タンパク質
筋管構造を呈する細胞の減少	発現低下 <i>MyoD, Myf5, Myogenin, Myh2</i>	発現低下 MYH2

結果の概要

- ・ *Zip13*-KD 細胞において、筋管形成の抑制と、筋分化調節因子の発現低下を確認した。
- ・ ZIP13 は、筋管形成に至る筋芽細胞の正常な分化誘導に必要である可能性が示唆された。

第四章：EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞を用いた検討

Zip13-KO マウスおよび C2C12 細胞株を用いた検討結果から、ZIP13 が骨格筋の正常な分化形成および機能の維持に必要である可能性が示唆された。ヒトの細胞における役割を明らかにするために、EDSSPD3 患者由来の細胞から iPS 細胞株を作製し、骨格筋へ分化させることで、ヒト細胞の骨格筋分化における ZIP13 の機能を解析した。さらに、遺伝子編集技術を適用して EDSSPD3 における遺伝子の変異を正常化修復し、ZIP13 の機能破綻による骨格筋分化異常が回復するのか解析した。

徳島文理大学倫理委員会の承認

本研究は、徳島文理大学倫理委員会の承認(承認番号 R2-19 および R3-16)と関連法規に従い、検討した。EDSSPD3 患者 2 名(女性 1 名、男性 1 名)由来のヒト皮膚芽細胞(HDF : Human Dermal Fibroblast)の使用に関しては、当該患者のインフォームドコンセントを得て実施した (48)。

HDF の播種

Cell Applications より健常人女性(白人 36 歳)、および男性(白人 49 歳)の HDF を購入した。これらは終濃度がそれぞれ 10%FBS (Hyclone Laboratories)、1×GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific)、および 1%P/S/A となるように添加した DMEM (WAKO) 中で播種し、5%CO₂ 存在下、37℃の条件で増殖・維持した。

検討内容(EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞株の作製)

検討内容(健常者および EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞株の樹立)

ヒト iPS 細胞の作製は京都大学 iPS 研究所の公開しているプロトコールに従い(<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/e/research/protocol.html>)、iPS 細胞を作製した。

細胞

- ・ 健常者由来 HDF
- ・ EDSSPD3 患者由来 HDF
- ・ SNL76/7 (DS pharma Biomedical)

実験試薬

- ・ DMEM (High Glucose) (Wako : 043-30085)
- ・ FBS (Hyclone)

- PBS (-) (ナカライ : 14249-95)
- Horse Serum (シグマアルドリッチ : H1270-500 ml)
- GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific : 35050061)
- Antibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solution (100x) (Stabilized) (ナカライ : 09366-44)
- エピソーマルプラスミドベクター
pCXLE- hOCT3/4-shp53-F (Addgene : #27077)
pCXLE-hUL (Addgene : #27080)
pCXLE-hSK (Addgene : #27078)
- マイトマイシン C (協和発酵キリン)
- 線維芽細胞成長因子(塩基性) (FGF-basic / bFGF / FGF2), ヒト, 組換え体 (154aa)
(WAKO : 068-04544)
- Primate ES/iPS 細胞用培地 (Repro CELL : RCHEMD001)
- iMatrix-511 (Laminin-511 E8) (ニッピ、892001/892002)
- Y-27632 (WAKO、253-00511)
- PBS (-) (ナカライテスク、14249-24)
- 0.5X TrypLE Select (Thermo Fisher Scientific)
- 2.5% トリプシン (Thermo Fisher Scientific)
- 1mg/ml コラゲナーゼIV (Thermo Fisher Scientific)
- Knock Out Serum (KSR) (Thermo Fisher Scientific)
- 0.1 M CaCl₂
- 細胞剥離液 (0.5X TrypLE Select および 0.75 mM EDTA より調整)
- CTK 溶液 (2.5% トリプシン、1 mg/ml コラゲナーゼIV、0.1 M CaCl₂、20%KSR
より調整)
- StemFit (味の素)
- RNeasyMini Kit (Qiagen)
- 4%パラホルムアルデヒド (WAKO)
- Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit (シグマアルドリッチ)
- Stain Buffer (BD Biosciences)

- diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Thermo Fisher Scientific)
- 7- amino-actinomycin D (7-AAD) (BioLegend)

実験機器

- nano drop DS-11 (Denovix)
- Quant Studio3 (Ehermo Fisher)
- Neon transfection system (Thermo Fisher Scientific : MPK5000)
- BZ-9000 (キーエンス)
- FACS Melody セルソーター (BD Bioscience)
- FlowJo

実験方法

・ iPS 因子の導入

エピソードマルプラスミドベクターを各種 1 μ g 混合したプラスミド溶液を調整した。調整したプラスミド溶液と 3×10^5 個の EDSSPD3 患者および健常者由来 HDF をそれぞれ混合し、Neon システムを用いて 1650V・10 ms の条件で 3 回パルス照射して、エレクトロポレーション法による遺伝子導入を行った。遺伝子導入を行った日を 1 日目と起算して、7 日間 37°C5%CO₂ 条件において培養し、7 日目に 5×10^4 個の細胞をマイトマイシン C 処理した SNL フィーダー細胞上へ播種した。SNL 上へ播種した翌日に 4 ng/mL の組換えヒト塩基性芽球増殖因子と Antibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solution が 100 倍希釈になるように添加した霊長類 ES/iPS 細胞用培地に交換した。2 日おきに培地交換を行い、コロニーを形成させた。培養 20-30 目まで培養を行い、形成した 2 mm 以下のコロニーを選択して継代培養した。

・ Feeder Free 条件による iPS 細胞の培養

作製した iPS 細胞の解析を行うために Feeder Free 条件において細胞培養を行う必要がある。そこで樹立時に On Feeder 条件において培養していた iPS 細胞株を、Feeder Free 条件で培養を行うために順化を行った。

具体的には培地を除去後、PBS を 1 ml 添加してすぐに除去し、CKT を添加して 25°C10 分間静置して Feeder 細胞を剥離させ Feeder 細胞を除去した。Feeder 細胞を除去後、細胞剥離液を添加し 25°C条件で 10 分間静置した。単一コロニーを広口ピ

ペットを用いて剥離して Rho キナーゼ阻害剤である 10 μ M の Y27632、コイルドコイル含有プロテインキナーゼ阻害剤、および Antibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solution を添加した StemFit 培地に懸濁した。懸濁液は 0.25 μ g/cm² iMatrix-511 ラミニン-511 E8 フラグメント、10 μ M Y27632、および Antibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solution を添加した StemFit 培地を用いた培養プレートに細胞を 2×10^4 個播種し、翌日に Antibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solution を添加した StemFit 培地に培地交換した。培養開始 4 日目以降は毎日培地交換を実施した。細胞は 95%コンフルエントまで培養して継代を行い、iMatrix-511 を用いたフィーダーフリー培養を適用して維持培養した。

作製した iPS 細胞の塩基配列を解析するために、RNeasy Mini Kit を用いて全 RNA を抽出して cDNA を合成し、合成した cDNA を鋳型としてヒト *Zip13* エクソン 2 mRNA のプライマーDNA を用いて PCR を行い、サンガー法を用いて配列を決定した。

iPS 細胞株樹立の確認

継代した細胞の一部を用いてアルカリフォスファターゼ (ALP:Alkaline Phosphatase) 染色、蛍光免疫 (IF:Immunofluorescence) 染色およびフローサイト (FACS) を適用して iPS 細胞株の樹立を確認した。IF および FACS には多能性幹細胞マーカータンパク質として知られている抗 SSEA-4 抗体および抗 TRA-1-81 抗体を用いた。

・ ALP 染色

iPS コロニーを 4%パラホルムアルデヒドで 25℃条件で 10 分間処理した。水で洗浄後、コロニーを BZ-9000 を用いて位相差画像を撮影した。その後、Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit を用いて指示されたプロトコールに従い、ALP 染色を行い、染色したコロニーを BZ-9000 を用いて撮影した。

・ IF 染色

iPS コロニーを 4%パラホルムアルデヒドで 25℃条件で 10 分間処理し、0.3% Triton X-100 を添加して 25℃条件で 20 分間透過処理した。その後、PBS による洗浄を行うとともに、FBS を添加した Stain Buffer によるブロッキングを行った。さらにそれぞれ対応する 1 次抗体と 2 次抗体を用いて目的のタンパク質を検出した。

核は diamidino-2-phenylindole (DAPI) による染色を実施した。蛍光色素は BZ-9000 を用いて検出した。

・ FACS

Feeder Free 条件で培養した iPS 細胞を細胞剥離液を用いて 25℃、10 分間処理し、コロニーを単一細胞に解離させ、FBS を添加した **Stain Buffer** に懸濁した。1 次抗体で 4℃2 時間、次いで 2 次抗体により 1 時間処理を行い染色した。死細胞は 7-amino-actinomycin D (7-AAD) により染色することで除外した。染色した細胞は FACS Melody セルソーターを用いて分析を行い、得られたデータはソフトウェア FlowJo を用いて解析した。

結果

ALP 染色の結果、樹立した iPS 細胞株は赤色に染色され、健常者および EDSSPD3 患者由来 HDF は未分化状態を獲得したことが示された (Figure 16A)。IF 染色の結果、健常者 iPS 細胞および EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞 (EDSSPD3 患者 iPS 細胞) はヒト iPS 細胞における多能性幹細胞マーカータンパク質である SSEA4 の発現を確認した (Figure 16B)。さらに、TRA-1-81 の発現を確認した (Figure 16C)。FACS による解析の結果、コントロールとしてアイソタイプマウス IgG3 を用いて SSEA4 および TRA-1-81 を展開したところ、ヒストグラムは健常者および EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞は、ピークが同程度右側にシフトした (Figure 16D)。以上の結果から、EDSSPD3 患者と健常者の皮膚線維芽細胞に由来する iPS 細胞株の樹立を確認した。

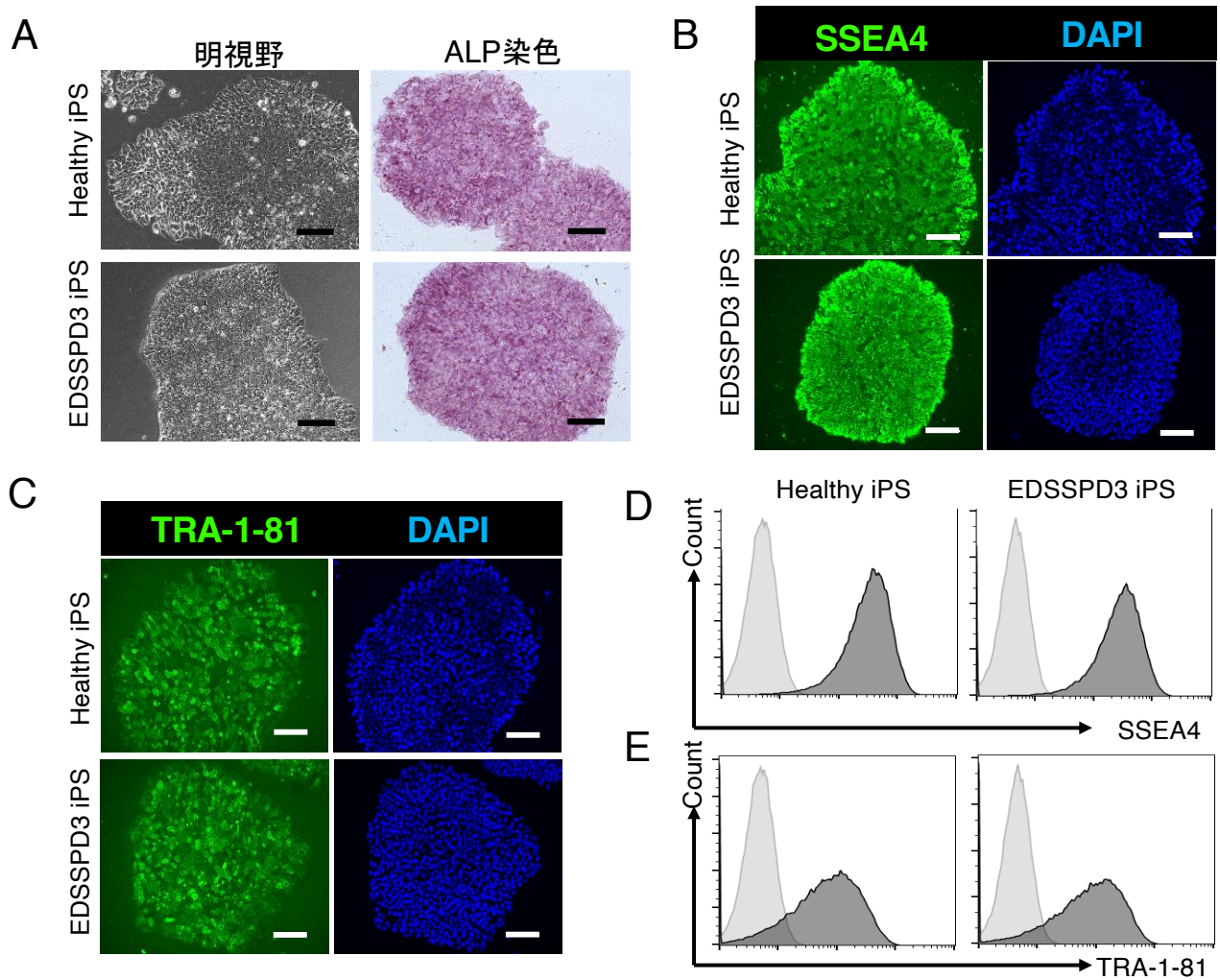


Figure 16 : 健常者および EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞株の作製

- A : EDSSPD3 患者および健常者由来の線維芽細胞から作製した iPS 細胞株コロニー (EDSSPD3 iPS, Healthy iPS) の明視野および alkaline phosphatase の活性化状況 (ALP 染色法) を示す。
- B-C : 免疫染色による多能性幹細胞マーカーの発現解析結果を示す。
- B : Stage-specific embryonic antigen-4 (SSEA4) の発現を示す。
- C : Transformer-1-81 (TRA -1-81) の発現を示す。
- D-E : FACs による多能性幹細胞マーカーの発現解析結果を示す。
- D : SSEA4
- E : TRA -1-81

EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞の骨格筋分化誘導系の構築

検討内容 (*MyoD* 強制発現による骨格筋の分化誘導)

iPS 細胞株の骨格筋分化誘導法として、骨格筋の分化において重要な因子として知られている *MyoD* の発現を誘導することで、筋分化を誘導する方法が知られている (68, 81-82)。そこで PiggyBac (PB) Transposon システムを利用したテトラサイクリン誘導性 *MyoD* 発現 iPS 細胞株 (*MyoD*-iPS) を樹立した。

実験試薬

- R Buffer (Thermo Fisher Scientific)
- Doxycycline (Dox) (LKT Laboratories)
- Matrigel Growth Factor Reduced Basement Membrane Matrix (Corning)
- Y27632 (WAKO)
- Knockout Serum (Thermo Fisher Scientific)
- StemFit (味の素)
- 2-メルカプトエタノール (Thermo Fisher Scientific)
- Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification (α -MEM) (ナカライ)
- 細胞剥離液 (0.5 X TrypLE Select (Thermo Fisher Scientific) および 0.75 mM EDTA より調整)
- Primate ES/iPS 細胞用培地 (Repro CELL : RCHEMD001)

実験機器

- nano drop DS-11 (Denovix)
- Quant Studio3 (Thermo Fisher)
- Neon transfection system (Thermo Fisher Scientific : MPK5000)

実験方法

テトラサイクリン誘導性ヒト *MyoD*、mCherry およびネオマイシン耐性遺伝子プラスミドを PB ベクターもしくは EF1a プロモーター駆動性 PB トランスポゼース遺伝子を pHL ベクター (pHL-EF1a-hcPBase) に組み込むことで調整した (83) (Figure 17A)。Feeder free 条件において維持された iPS 細胞を遺伝子導入の 2 時間以上前に Y27632 により処理を行った。その後、細胞剥離液を用いて単一細胞に解離させ、 5×10^5 個の

細胞を R Buffer により懸濁した。細胞懸濁液に PB-h*MyoD* および pHL-EF1a-hcPBase を各 1 μg 添加し、Neon システムを用いて 1200 V、20 ms の条件で 2 回パルス照射してエレクトロポレーションによる遺伝子導入を行った。遺伝子導入した細胞は iMatrix-511 による Feeder Free 条件で培養した。遺伝子導入 2 日後、2-4 mg/ml ネオマイシンを添加した StemFit 培地に培地交換し、ネオマイシンによるセレクションを行った。ネオマイシンセレクション iPS 細胞を限界希釈法を適用してシングルセルクローニングを行った。

得られた細胞はテトラサイクリン系薬剤であるドキシサイクリン (Doxycycline : Dox) を 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加することによって、mCherry が発現することを確認した。作製した細胞の骨格筋分化は上記のように Dox 添加によって *MyoD* を強制発現させることにより誘導した。

実験の 2 時間以上前に Matrigel Growth Factor Reduced Basement Membrane Matrix により 24 Well Plate をコーティングした。細胞剥離液を用いて細胞を剥離し、10 μM Y27632 を添加した StemFit 培地に懸濁して、1 Well あたり 0.6×10^5 個の細胞を播種した。翌日に Primate ES/iPS 細胞用培地へ培地交換し 2 日目に 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Dox を添加し、3 日目に 5%KSR、200 μM 2-メルカプトエタノールおよび 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Dox を添加した Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification (α -MEM) に培地交換した。3 日目時点における mCherry の発現状況を BZ-9000 を用いて観察した。培地は 4、5 および 7 日目に培地交換を行い、8 日目まで 5%CO₂ 37°C 条件において培養した (Figure 17B)。

培養 3、6 および 8 日目における MRFs の発現状況を qPCR 法を適用して解析するとともに、8 日目における骨格筋分化マーカータンパク質の発現を IF 染色および WB を適用して解析した。

結果

IF 染色の結果、健常者の iPS 細胞と比較して EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞は骨格筋後期分化タンパク質である MYH の同等の発現を確認したことから、骨格筋分化系の構築に成功した (Figure 17C)。

PCR の結果、健常者および EDSSPD3 患者 iPS 細胞は分化日数の経過に伴い *Zip13*

の発現は上昇した (Figure 17D)。内因性 *MyoD* の発現は分化誘導 Day3 では健常者 iPS 細胞と比較して EDSSPD3 患者 iPS 細胞との差は認めなかったが、Day6 および Day8 において顕著な発現低下を示した (Figure 17E)。*Myogenin* の発現は分化誘導 Day3 では健常者 iPS 細胞と比較して EDSSPD3 患者 iPS 細胞との差は認めなかったが、Day6 および Day8 において顕著な発現低下を示した (Figure 17F)。WB の結果、健常者 iPS 細胞と比較して、EDSSPD3 患者 iPS 細胞の MYOD および MYOGENIN タンパク質の発現量は有意に低下した (Figure 17G)。

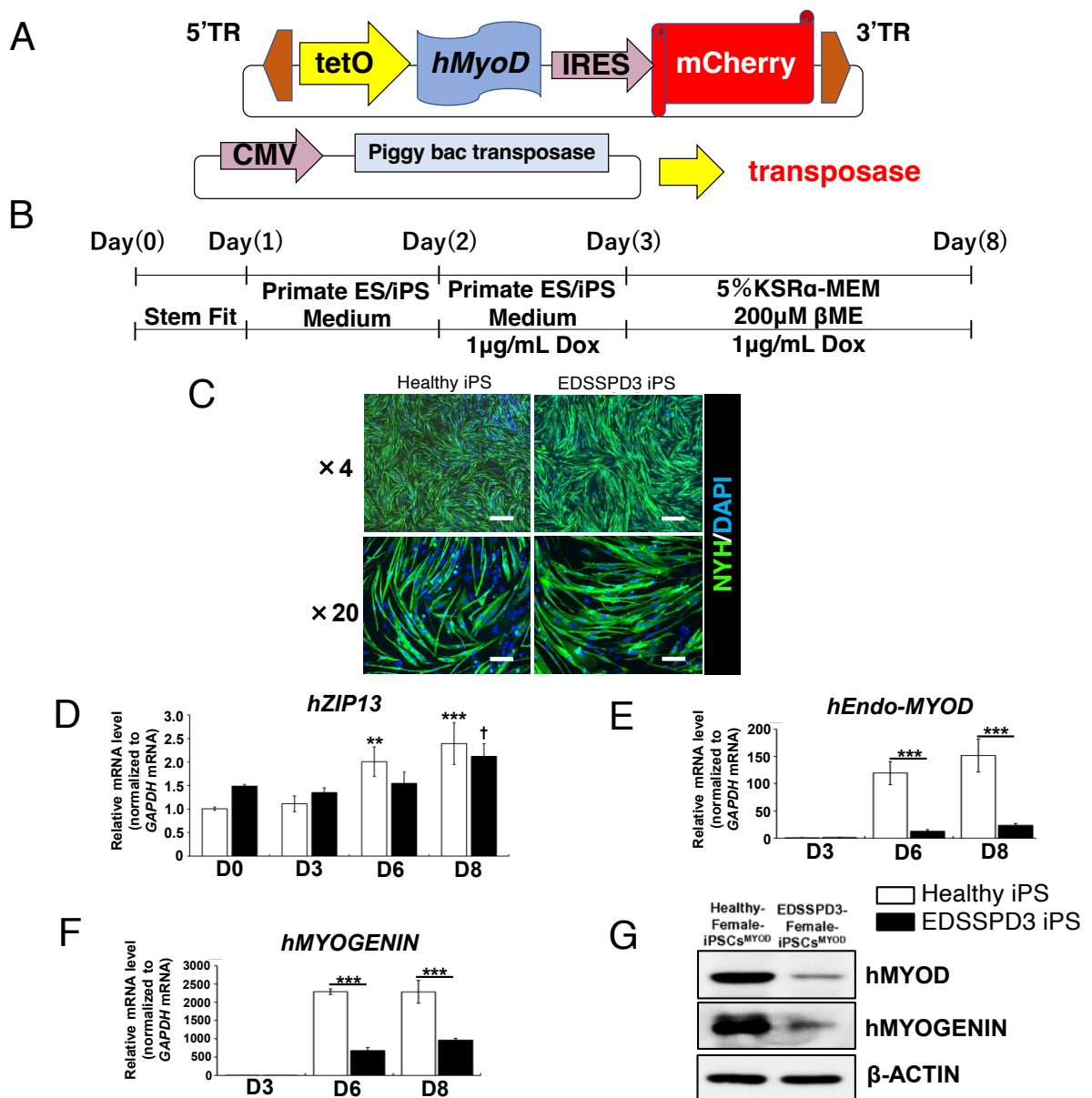


Figure 17: 薬剤添加による骨格筋分化誘導系の確立

A: 薬剤(ドキシサイクリン: Dox)添加によって誘導的に外来ヒト *MyoD* (*hMyoD*) を発現するプラスミドの構成図(上)を示す。本プラスミドと transposase を発現するベクター(下)と co-transfection することにより、目的とする DNA 配列を iPS 細胞のゲノム内に非ウイルス的に組み込むことができ、安定発現細胞株を樹立することが可能である(83)。

B: 薬剤添加による骨格筋分化誘導系の概略を示す。マトリゲルコートした 24Well plate 上に、各 iPS 細胞を 10 µM の Y27632 を添加した Stem Fit 培地を用いて 1 Well あたり 6×10^4 個播種し、翌日に Primate ES/iPS 培地へ培地交換した。さらに、翌日に Dox を最終濃度 1 µg/ml となるように添加した。3 日目に 2-メルカプトエタノール(最終濃度 200 µM)および Dox (最終濃度 1 µg/ml)を添加した 5%KSR-α MEM に培地交換し、4、5 および 7 日目に培地交換を行って、指定された日に回収した。

C: 分化誘導開始 8 日目における筋分化調節因子 MYH タンパク質の発現を示す(免疫染色)。EDSSPD3 患者および健康者由来の線維芽細胞から作製した iPS 細胞株ともに、同等の筋管形成と MYH タンパク質の発現が確認された。

D-F: ZIP13 および筋分化調節因子の発現を示す(qPCR 法)。

D: *Zip13* E: 内因性 *MyoD* (*hEndo-MyoD*) F: *Myogenin*

同一の施行を 3 回繰り返し、平均値を求めた。エラーバーは平均標準誤差。T 検定を適用して有意差検定を行った。n=3 p **<0.01 p ***<0.001

G: 培養 8 日目における各細胞の内因性 MYOD と MYOGENIN のタンパク質発現を示す(western blotting)。

Crisper Cas9 システムによる遺伝子変異の修復

検討内容 (Crisper-Cas9 を適用した変異型 *Zip13* の修復)

これまでの検討結果から、ZIP13 の変異が骨格筋の形成や機能に関与している可能性が示唆された。そこで EDSSPD3 患者由来 *MyoD*-iPS 細胞に、CRISPR-Cas9 システムによる遺伝子編集技術を適用して *Zip13* の変異を修復し、骨格筋へ分化誘導することで、これまでの骨格筋における異常の回復を精査した。

実験試薬

- R Buffer (Thermo Fisher Scientific)
- Y27632 (WAKO)
- TrueCut Cas9 protein v2 (Thermo Fisher Scientific)
- scaffold-modified ZIP13^{G64D}_sgRNA (Thermo Fisher Scientific)
- doxycycline (DOX) (LKT Laboratories)
- StemFit (味の素)
- 2-メルカプトエタノール (Thermo Fisher Scientific)
- 細胞剥離液 (0.5X TrypLE Select および 0.75 mM EDTA より調整)
- Alt-R HDR-modified ZIP13G64D-corrected_ssODN (IDT)
- electroporation enhancer (IDT)
- Geno Plus Mini kit (VIOGENE)
- In-Fusion cloning kit (Takara Bio)
- pGEM-T easy vector (Promega)

実験機器

- nano drop DS-11 (Denovix)
- Quant Studio3 (Thermo Fisher)
- Neon transfection system (Thermo Fisher Scientific : MPK5000)

方法

EDSSPD3 患者由来 *MyoD*-iPS 細胞における 1 塩基置換を修復するために、CRISPR-Cas9 システムおよび ssODNs²⁴ を組み合わせた相同指向性修復 (homology directed repair : HDR) を適用して遺伝子編集を行い、EDSSPD3 の遺伝子変異を修復した。Cas9

による再切断を防止する目的で、アミノ酸にサイレント変異を導入した ssODN を設計した (65 位 Ser : TCC<TCA、66 位 Leu : CTC<CTA)。また、GGG 部位にはプロトSpacer隣接モチーフ (Protospacer adjacent motif : PAM) 配列を示した (Figure 18 左上)。

遺伝子導入の前日に EDSSPD3 患者由来 *MyoD*-iPS 細胞を 10 μ M Y27632 で処理し、翌日に細胞剥離液を用いて細胞を剥離して 8×10^4 個の細胞を R Buffer により懸濁した。リボヌクレオチドタンパク質 (Ribonucleotide protein : RNP) エレクトロポレーションを行うにあたり、2 μ g の TrueCut Cas9 protein v2 と 500 μ g の scaffold-modified ZIP13^{G64D}_sgRNA を 25°C で 5 分間インキュベーションを行い、細胞懸濁液に 3 μ g の Alt-R HDR-modified ZIP13^{G64D}-corrected_ssODN と 3 μ M の electroporation enhancer とともに添加した。Cas9/sgRNA 複合体と ssODN および細胞懸濁液の混合物は、Neon トランスフェクションシステムを用いて遺伝子導入した。条件は 1050 V $\cdot$ 20 ms $\cdot$ 2 回照射とした。遺伝子導入した細胞は、30 μ M electroporation enhancer を添加した StemFit 培地と iMatrix-511 を用いて Feeder Free 条件で培養した。培養液は毎日培地交換を行い、培養 3 日目に限界希釈法を適用して細胞をクローニングした。得られたクローンは iMatrix-511 を用いて Feeder Free 条件で維持培養した。

EDSSPD3 の遺伝子変異の修復を確認するために、遺伝子導入した細胞の溶解液から Geno Plus Mini kit を用いてゲノム DNA を抽出し、ヒト ZIP13 エキソン 2 プライマーを用いてゲノム PCR を行った。各 PCR 産物はサンガーシーケンスを適用して配列を解析した。また、個々の対立遺伝子を個別に解析するために ZIP13^{G64D} を補正した 3 クローンの各ゲノムを鋳型として、In-Fusion-pGEM 用ヒト ZIP13 エクソン 2 ゲノムプライマーを用いてゲノム PCR を行った。PCR 産物は pGEM-T easy vector の制作者の指示に従い、In-Fusion cloning kit を用いて挿入を行い、PCR 産物を挿入したプラスミドをクローニングし、サンガー法を適用して配列を解析した。

結果

EDSSPD3 患者由来 *MyoD*-iPS 細胞 3 クローンの細胞において、ZIP13 遺伝子修復を確認した。また、各クローンにおける対立遺伝子のノックインパターンをサンガー法

により解析した (Figure 18 左)。

各クローンにおける個々の対立遺伝子を個別に解析した結果、各クローンはいずれも補正された対立遺伝子を 1 つ有していることが判明した (Figure 18 右)。上記の結果は ZIP13 のホモ変異がヘテロ変異へ置換されたことを示している。

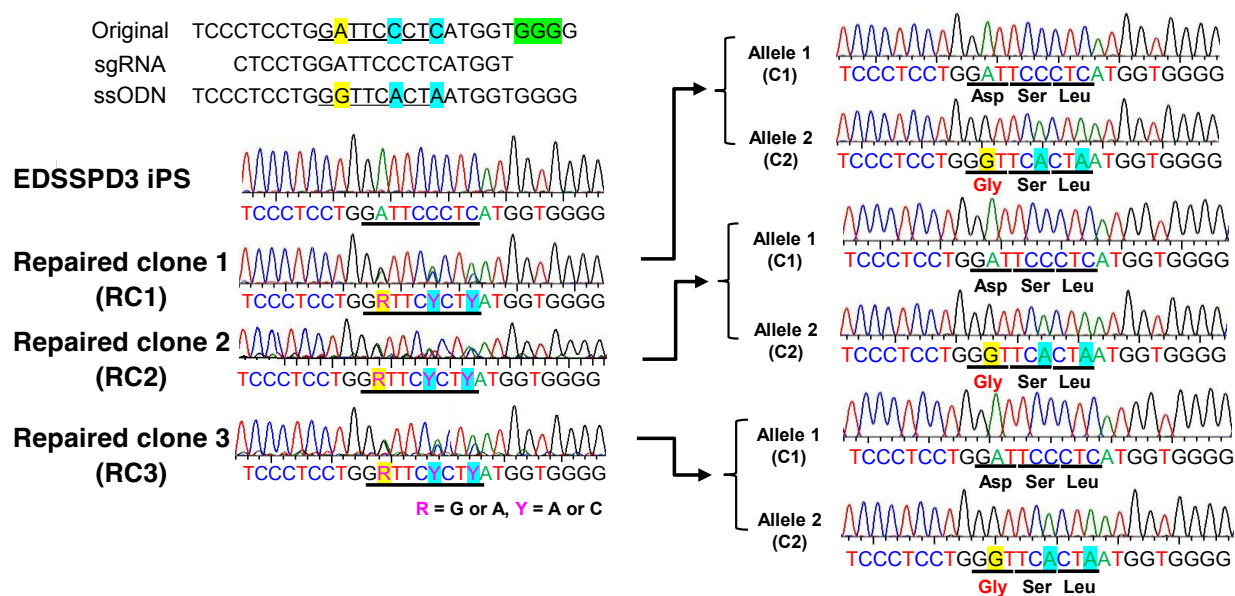


Figure 18 : EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞の遺伝子変異修復

CRISPR-Cas9 システムを適用して、EDSSPD3 患者の遺伝子変異 (EDSSPD3 iPS) を修復した。具体的には、遺伝子変異の下流に存在している PAM 配列を基準にしてガイド RNA (sgRNA) と、相同組み換えによる挿入を行う修復遺伝子鎖 (ssODN) を合成して、複合体化した Casp/sgRNA と ssODN をエレクトロポレーション法を適用して遺伝子導入した。遺伝子修復した遺伝子変異箇所の配列は、サンガー法を用いて確認した。本実験によって、3 つの遺伝子修復 iPS 細胞クローンを得た (Repaired clone : RC1, RC2, RC3)。

遺伝子修復 EDSSPD3*MyoD*-iPS 細胞における骨格筋分化

検討内容(遺伝子修復後の細胞における筋分化レスキュー実験)

方法

遺伝子修復を行った EDSSPD3 患者由来 *MyoD*-iPS 細胞に、前述 (Page 51-54) で示した方法に従い、骨格筋分化誘導を行うことで、遺伝子修復による骨格筋分化への影響を精査した。IF 染色を適用して MYH タンパク質の発現を確認するとともに qPCR 法を適用して *Myogenin* の発現を解析した。クローン間の外因性 *MyoD* の発現量をノーマライズする目的で、*Myogenin* 発現量から *Exo-MyoD* を除して評価した。

結果

IF 染色の結果、Dox による骨格筋分化誘導により遺伝子修復した EDSSPD3 患者由来 *MyoD*-iPS 細胞は、コントロールと同様の筋管を形成した (Figure 19A)。qPCR の結果、*Myogenin* 遺伝子の発現量は *Zip13* 遺伝子修復前の EDSSPD3 患者由来 *MyoD*-iPS 細胞と比較して顕著に発現が亢進した (Figure 19B)。上記の結果から、ZIP13 の遺伝子修復により骨格筋分化の機能が回復し、ZIP13 が正常な骨格筋の分化に必要であることを示唆している。

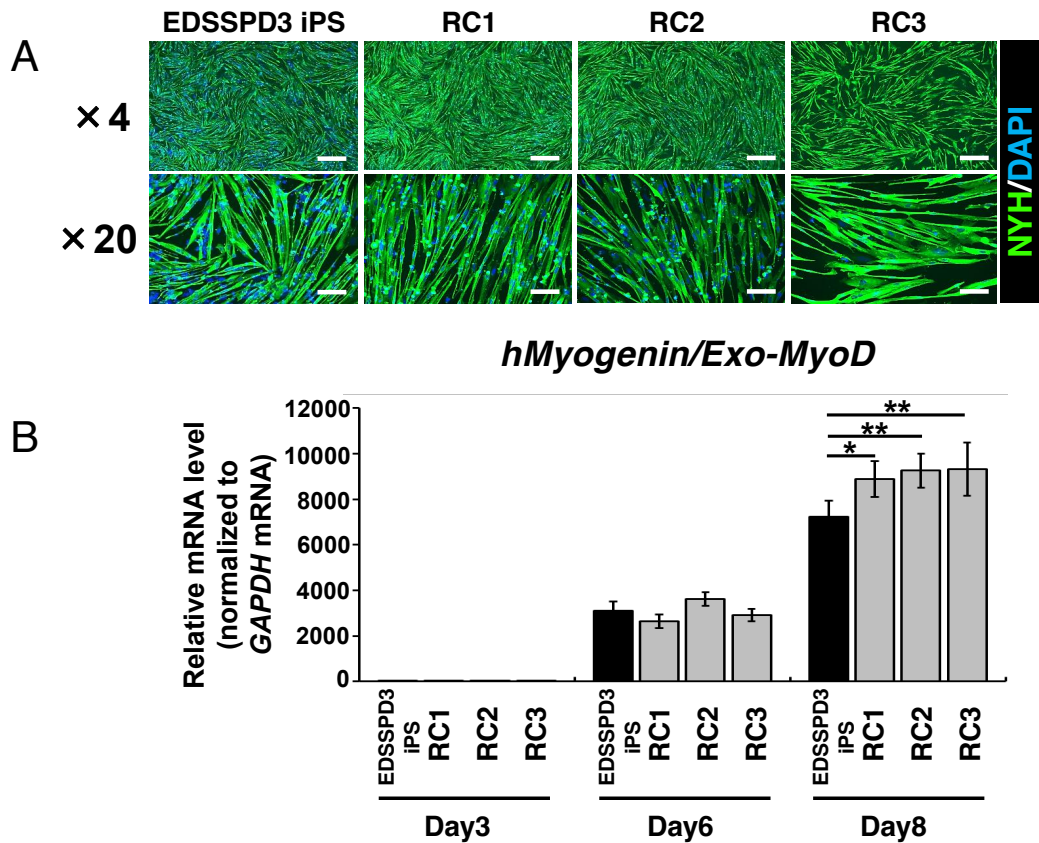


Figure 19 : 遺伝子修復された患者由来 iPS 細胞の骨格筋分化に関する検討

A : Dox 添加 (骨格筋分化誘導) 8 日後の各細胞の形態と、MYH タンパク質の発現を示す (免疫染色法)。

B : Dox 添加 8 日後における相対的ヒト *Myogenin* (*hMyogenin*) の発現量を示す (qPCR 法)。*hMyogenin* 発現を薬剤誘導的に発現させた外来性 *MyoD* (*Exo-MyoD*) 発現量で除して算出した。同一の施行を 3 回繰り返し、平均値を求めた。エラーバーは平均標準誤差。遺伝子修復前 iPS 細胞を標準として各クローンにおける *Myogenin* の発現を、T 検定を適用して有意差検定を行った。n=3 p*<0.05 p**<0.01

小括

健常者 iPS 細胞と比較して、EDSSPD3 患者由来の iPS 細胞は MRF s の発現低下を示し、遺伝子変異の修復により、これらの異常は回復した。以上の結果から、ZIP13 は骨格筋の正常な分化に必要であることが示された (表 5)。

表 5. ZIP13 は、iPS 細胞の正常な骨格筋分化誘導に必要である。

	iPS細胞の遺伝子型	筋分化調節因子の発現
Figure 17	EDSSPD3患者由来iPS	発現抑制 <i>MyoD</i> <i>Myogenin</i>
Figure 19	遺伝子修復EDSSPD3患者由来iPS	正常化 <i>Myogenin</i>

結果の概要

- ・ EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞において、筋分化調節因子の発現制御の異常を確認した。
- ・ EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞に確認された筋分化調節因子の発現制御の異常は、遺伝子編集による修復によって正常化された。
- ・ ZIP13 は、iPS 細胞の正常な骨格筋分化誘導に必要であることが示唆された。

骨格筋に関する研究結果の小括

C2C12 細胞と iPS 細胞を用いた検討結果から、ZIP13 は MRFs の発現を調節することで、骨格筋の正常な形成と機能に必要であることが示唆された。

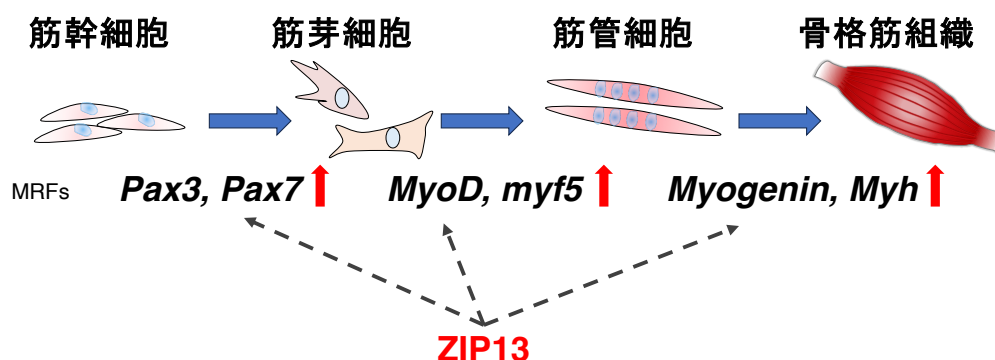


Figure 20 : ZIP13 は筋分化調節因子(MRFs)の発現制御に必要であり、ZIP13 は MRFs の発現調節を介して正常な骨格筋分化誘導に関与する。

生体内の各組織における ZIP13 の発現を調査すると、骨格筋と同じ横紋筋構造を有する心筋においても、ZIP13 の発現が比較的高いことが判明した。冒頭 (Page 15) で示したように、我々の報告した症例の EDSSPD3 患者は、2 名とも脳梗塞や脳出血の既往歴がある。心房細動等の不整脈により形成される血栓は脳へと移行することで、二次性脳梗塞の原因となることから、ZIP13 の失調が心循環器に与える影響を解析した。

心筋における ZIP13 の役割解明

亜鉛の欠乏はアテローム性の動脈硬化のリスクを増大し、心筋梗塞の因子となることが報告されている(84-85)。また、TPEN による細胞内亜鉛の枯渇が、ZIP13 の発現上昇を招くこと(86)が報告されている。これらの報告のように、亜鉛恒常性の破綻は、心血管系疾患のリスク因子となることが示唆されるが、心筋組織における亜鉛の生理的意義は明確に示されていない。

最近、EDSSPD3 患者の担当医から、当該患者において脳梗塞と脳出血の症例が私信として、筆者が所属する研究グループに通知された。不整脈等の心機能低下は二次性の脳血管疾患と関連することから、筆者は ZIP13 の機能喪失が心機能の恒常性を破綻させた可能性を考え、*Zip13*-KO マウスおよび初代培養心筋細胞を用いて、心機能における ZIP13 の関与について解析した。

第五章：心筋における亜鉛恒常性の意義

初代培養心筋細胞におけるストレス負荷に伴う影響

亜鉛イオンが心筋細胞に与える影響を精査するとともに、ドキソルビシン(DOX)による心毒性モデルを適用して、心毒性が ZIP13 の発現制御に関与するのか精査した。

徳島文理大学倫理委員会の承認

本研究は、徳島文理大学倫理委員会の承認(承認番号 19-4)と関連法規に従い、検討した。

検討内容(初代培養心筋細胞の調整と亜鉛イオンの影響解析)

実験試薬

- Primary Cardiomyocyte isolation kit (Thermo Fisher Scientific)
- DMEM (High Glucose) (Wako : 043-30085)
- FBS (Gibco Invitrogen)
- ペニシリン 100 U/ml ストレプトマイシン 0.1 mg/ml (Sigma Aldrich)
- TPEN
- ZnSO₄

マウス

- ・ 週齢：3 日齢以内
- ・ 性別：不明 (n=3)
- ・ 系統：C57BL/6

方法

Primary Cardiomyocyte isolation kit のプロトコールに準じて、初代培養心筋細胞 (Primary neonatal cardiomyocyte : PNC) を培養した。具体的には、出生後 3 日齢以内の WT マウスの心臓を解剖用はさみを用いて細断し、kit 付属培地 (10% FBS, 100 U/ml ペニシリン, 0.1 mg/ml ストレプトマイシン) で培養した。増殖した PNC は、24 Well plate に 5×10^5 個 /well となるように播種し、1 日おきに培地交換した。培養開始後約 3 日目において、PNC 塊の拍動現象を確認した。

播種した PNC に、TPEN (亜鉛キレート剤, 最終濃度 10 mM)、ZnSO₄ (最終濃度 100 μ M)、または TPEN (最終濃度 10 mM) と ZnSO₄ (最終濃度 100 μ M) を添加して 24 時間培養し、細胞形態の変化を顕微鏡で観察した。

結果

TPEN 添加条件では、無添加や ZnSO₄ 添加時には認められない細胞の縮小化を確認し、その形態異常は、TPEN と ZnSO₄ の同時添加条件では認められなかった (Figure 21A)。以上の結果から、心筋初代培養細胞の恒常性維持に亜鉛が必要である可能性が示唆された。

検討内容 (ドキソルビシンによる心負荷モデルの適用)

アントラサイクリン系の抗がん剤として臨床現場で使用されるドキソルビシン (DOX) は、代表的な副作用として心筋毒性や心不全を示す。心筋細胞に与える心毒性負荷が ZIP13 と関連するのか明らかにするために、PNC とマウスを用いて DOX による心毒性モデル実験を実施した。具体的には、DOX 添加の心毒性負荷による心筋細胞と心臓組織における ZIP13 の発現状況を解析した。

実験試薬とマウス

- Primary Cardiomyocyte isolation kit (Thermo Fisher Scientific)
- DMEM (High Glucose) (Wako : 043-30085)
- FBS (Gibco Invitrogen)
- ペニシリン 100 U/ml ストレプトマイシン 0.1 mg/ml (Sigma Aldrich)
- セパゾール(ナカライ)
- Primer Script RT kit (タカラバイオ)
- SYBR Green (TOYOBO)
- マウス

週齢：出生後 3 日齢以内

性別：不明 (WT : n=3, *Zip13*-KO : n=3)

系統：C57BL/6

実験機器

- Quant Studio3 (Thermo Fisher)

方法

先述の方法に従って PNC を調製して播種した翌日に、DOX (最終濃度 10 ng/ml) を添加し、24 時間後にセパゾールで細胞を溶解して全 RNA を抽出した。Primer Script RT kit を用いて cDNA を調整し、qPCR 法を適用して各種遺伝子の定量的な発現解析を行なった。また、野生型マウスに DOX (15 mg/kg) を腹腔内投与し、2 週間飼育した後に屠殺して、心臓を摘出した。摘出した心臓組織から上記と同様に全 RNA を抽出して cDNA を調整し、qPCR 法を適用して各種遺伝子の発現を解析した。

結果

DOX 添加された PNC では、炎症性サイトカインの *IL-1 β* の発現が上昇したことから、心毒性負荷の亢進が示唆された。さらに同細胞では、*Zip13* の発現減少を確認した (Figure 21B)。同様の結果は、DOX を投与されたマウス心臓で

も確認された (Figure 21C)。以上の結果から、ZIP13 の発現が心毒性負荷に
 答して減少することが示され、心臓や心筋細胞の機能や恒常性維持における
 ZIP13 の関与が示唆された。

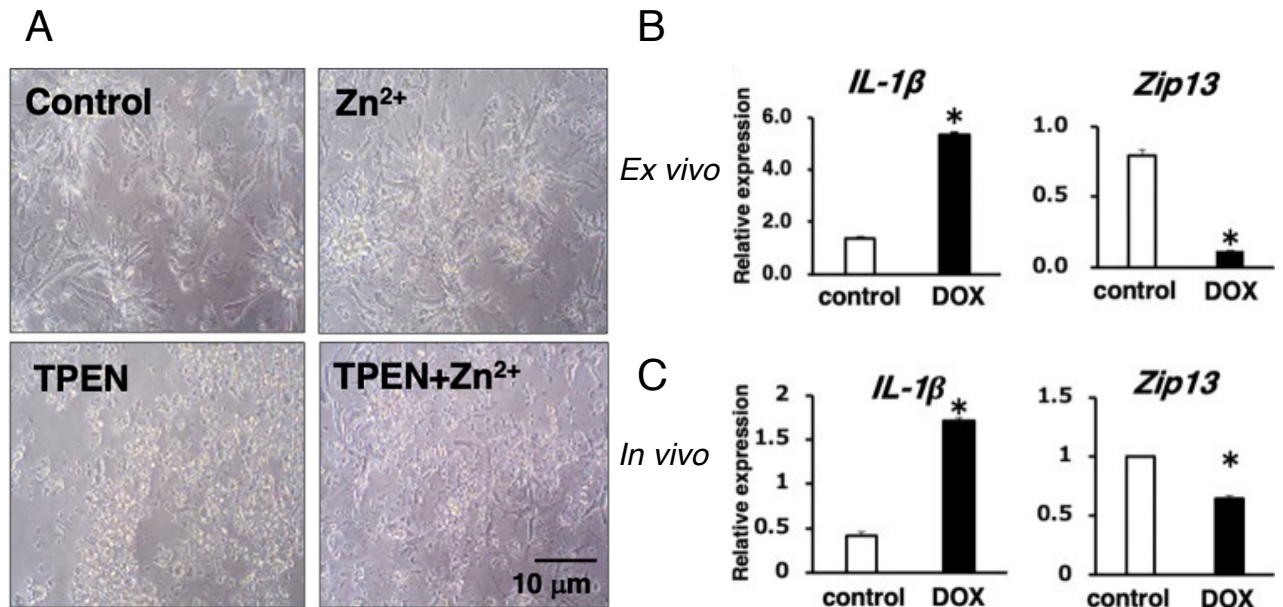


Figure 21 : 心筋組織への亜鉛要求性と心負荷モデルの適用

A : マウス初代培養心筋細胞に対する亜鉛欠乏および亜鉛過剰の影響

3 日齢マウス心臓から調整した初代培養心筋細胞を TPEN による亜鉛欠乏条件 (最終濃度 10μM) および、ZnSO₄ 添加による亜鉛過剰条件 (最終濃度 100 μM) で 24 時間培養した後に、BZX-810 (キーエンス) を用いて細胞形態を観察した。

B-C : *Zip13* 発現に対するドキソルビシン心毒性負荷の影響

B : 初代培養心筋細胞

初代培養心筋細胞にドキソルビシン (DOX) を添加し (最終濃度 10 ng/ml)、24 時間培養した後に細胞を回収して、*Zip13* および *IL-1β* 遺伝子の発現を qPCR 法により解析した (n=3)。

C : マウスへの腹腔内投与

7-10 週齢の雄マウスの腹腔内に、15mg/kg の DOX を投与して 2 週間飼育し、屠殺後に心臓を摘出して *Zip13* および *IL-1β* 遺伝子の発現を qPCR 法で解析した (n=3)。

n=3 における平均値を求め、それぞれコントロールである DOX 非刺激条件と比較し、T 検定を適用して有意差検定を行った (B-C)。エラーバーは平均標準誤差。p * < 0.05

第六章：心筋における ZIP13 機能喪失の影響

初代培養心筋細胞の自律的拍動および心電図検査

ZIP13 の機能喪失が心筋に与える影響を精査するために、*Zip13*-KO マウス由来の PNC を用いて心筋細胞の自律的拍動を解析するとともに、*Zip13*-KO マウスの心電図検査を実施した。

実験試薬とマウス

- ・液体窒素(四国大陽日産)
- ・マイヤーヘマトキシリン溶液(Wako : 131-09665)
- ・エオシン Y (Wako : 058-00062)
- ・キシレン(ナカライ : 36611-03)
- ・マウス

週齢 : 7-10 週齢

性別 : 雄(WT : n=4, *Zip13*-KO : n=4)

系統 : C57BL/6

実験機器

- ・BZX-810 (キーエンス)
- ・クリオスタット(Leica)
- ・Wireless radiofrequency telemetry device (Data Sciences International)

方法

初代培養心筋細胞の自律的拍動評価

前述 (Page 42) した方法に準じて WT および *Zip13*-KO マウスから PNC を調整し、初代培養心筋細胞の拍動を BZX-810 を用いて録画して、拍動に伴うピクセルの変化を画像解析ソフト Image J を用いて評価した。

心臓組織の形態解析

WT および *Zip13*-KO マウスから心臓を摘出し、体重あたりの心臓重量を測定した。さらに摘出した心臓を、Leica クリオスタットを用いて凍結切片を作製した。作製した組織切片に HE 染色を適用し、心臓組織の形態を観察した。

心電図検査

WT および *Zip13*-KO マウスの腹腔内に、Wireless radiofrequency telemetry device を外科的に設置して 1-2 週間ほど飼育した後に、心電図を 24 時間モニタリングした。

結果

Zip13-KO マウス由来 PNC の拍動は不規則であり、WT マウス由来 PNC に認められる規則的な拍動を示さなかった (Figure 22A)。 *Zip13*-KO マウスの心臓組織の形態や重量に異常を認めなかったが (Figure 22B-C)、心電図検査の解析から、 *Zip13*-KO マウスは不整脈様の症状を呈することが示された (Figure 22D)。以上の結果から、ZIP13 は心臓の機能制御に関与することが示唆された。

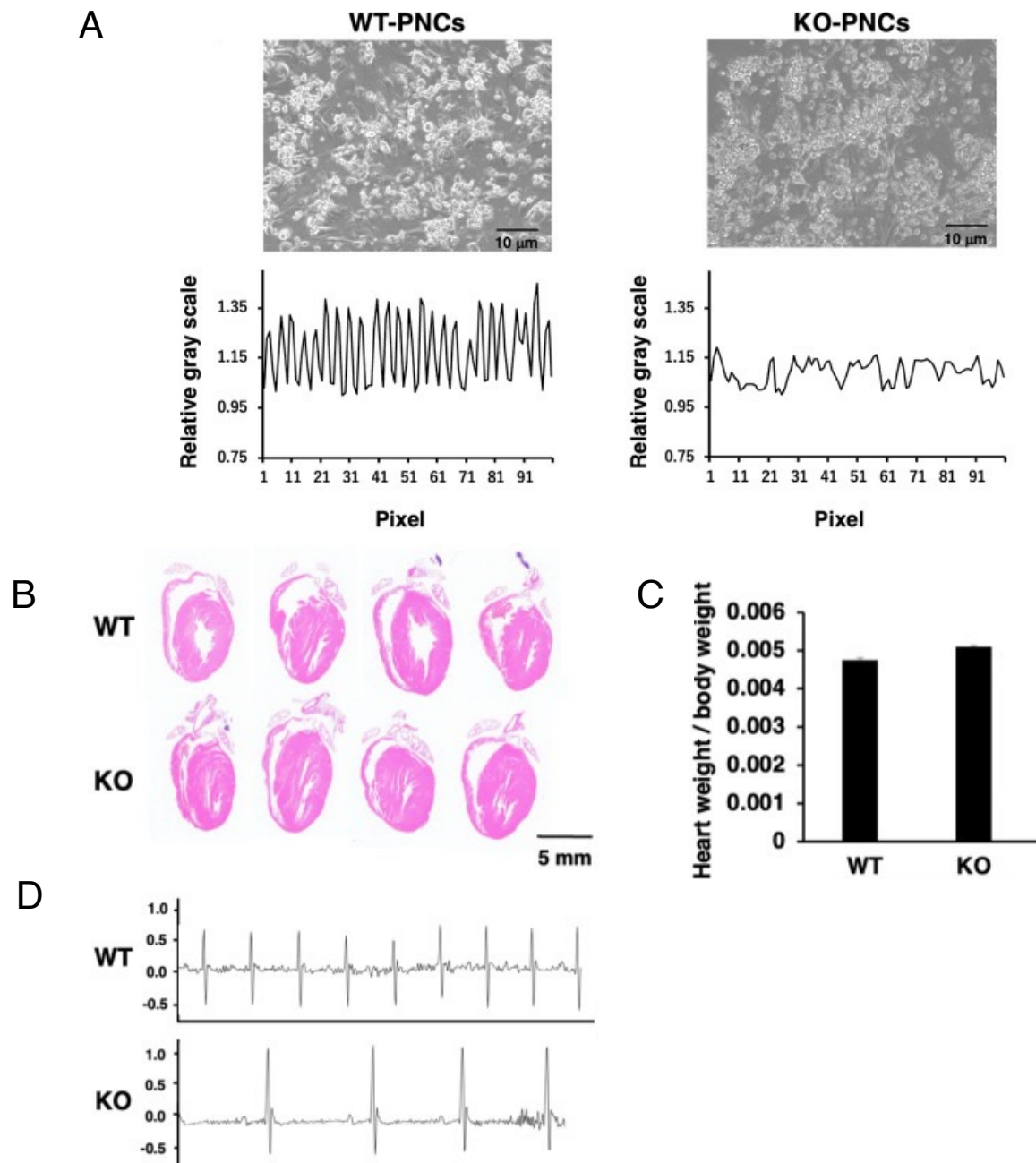


Figure 22 : *Zip13*-KO マウスの拍動解析と心負荷モデルの定期用による影響

A : *Zip13*-KO マウス由来初代培養心筋細胞における拍動現象の異常

3 日齢の野生型 (WT) および *Zip13*-KO マウス (KO) 心臓由来の初代培養心筋細胞を 10% ウシ胎児血清 (Fetal Bovin serum:FBS) 培地で培養し、播種後 3-4 日目に観察された拍動を動画撮影して。ピクセル解析で得られたデータをキモグラフで表示した。

B-C : *Zip13*-KO マウスの心臓における解剖学的所見

野生型 (WT) および KO マウスの心臓の形態と (B. HE 染色)、体重あたりの心臓重量 (C) を示す (7-10 週齢、雄)。WT および KO マウスのそれぞれ 4 個体の心臓重量を測定し、平均値を求め、T 検定による有意差検定を行った。

D : WT および *Zip13*-KO マウスの心電図検査

WT および KO マウスの心電図を解析結果を示す。7-10 週齢の雄マウスの腹腔内に無線式高周波テレメトリー装置を外科手術位により埋め込み、1-2 週間かけて傷を回復させた後にテレメトリー心電図を 24 時間記録した。

第七章：ZIP13 の機能喪失が心筋細胞に与える影響

Zip13-KO マウス由来初代培養心筋細胞における網羅的な遺伝子発現解析

検討内容(RNA-seq による遺伝子の発現解析)

ZIP13 の機能喪失が心筋細胞に与える影響について明らかにするために、*Zip13*-KO マウスの初代培養心筋細胞における遺伝子発現の変化と、その特徴について RNA-seq を適用して網羅的に解析した。

実験試薬とマウス

- ・セパゾール(ナカライ：09379-55)
- ・クロロホルム(Wako：038-02606)
- ・イソプロパノール(ナカライ：29112-05)
- ・エタノール(Wako：057-00456)
- ・UltraPureDistilled water (invitrogen：10977-015)
- ・マウス

週齢：出生後 3 日齢以内

性別：不明(WT：n=4, *Zip13*-KO：n=4)

系統：C57BL/6

実験機器

- ・Illumina Hi Seq 1500

方法

Page 42 に記した方法に準じて、WT および *Zip13*-KO マウスから調整した PNC にセパゾールを 1 mL 添加し、ピペッティングにより細胞を完全に溶解して、1.5 mL チューブに全量を回収した。ボルテックスで 1 分間攪拌し、クロロホルムを 200 μ L 添加して 1 分間攪拌し、4℃、12000 rpm で 15 分間遠心して、上層を採取した。上層と同量のイソプロパノールを添加して転倒攪拌し、室温に 10 分間静置した後に同上の条件で遠心処理して上清を除去した。70%エタノールで沈殿物を洗浄した後に、クリーンベンチ内で 10 分間風乾した。得られた RNA 沈殿物は、30 μ L の Ultrapure water で溶解して濃度を確認した後に、Illumina Hi Seq 1500 を用いて配列を解析した。得られたリー

ド配列は HISAT2 を用いて参照配列と一致する箇所を並べ替えるマッピング処理を行い、マッピングされた各遺伝子の発現量は String Tie2 を用いてカウントすることで定量化した。その後、EdgrR を用いて False Discover Rate(FDR)<0.05 かつ Fold-change>2 のものを抽出し、Volcano Plot を作成するとともに、ヒートマップ解析および GO 解析を行った。

結果

ZIP13 の機能喪失によって 392 遺伝子が発現上昇し、214 遺伝子の発現が低下した (Figure 23A)。これらの遺伝子をヒートマップで分類した結果 (Figure 23B)、および GO 解析によって炎症反応や走化性、細胞接着に関連した遺伝子の発現が亢進し (Figure 23C)、一方で膜組織や膜輸送に関連する遺伝子の発現は抑制された (Figure 23D)。以上の結果から、*Zip13*-KO マウス由来 PNC において、炎症関連刺激に対する応答性が亢進している可能性が示唆された。

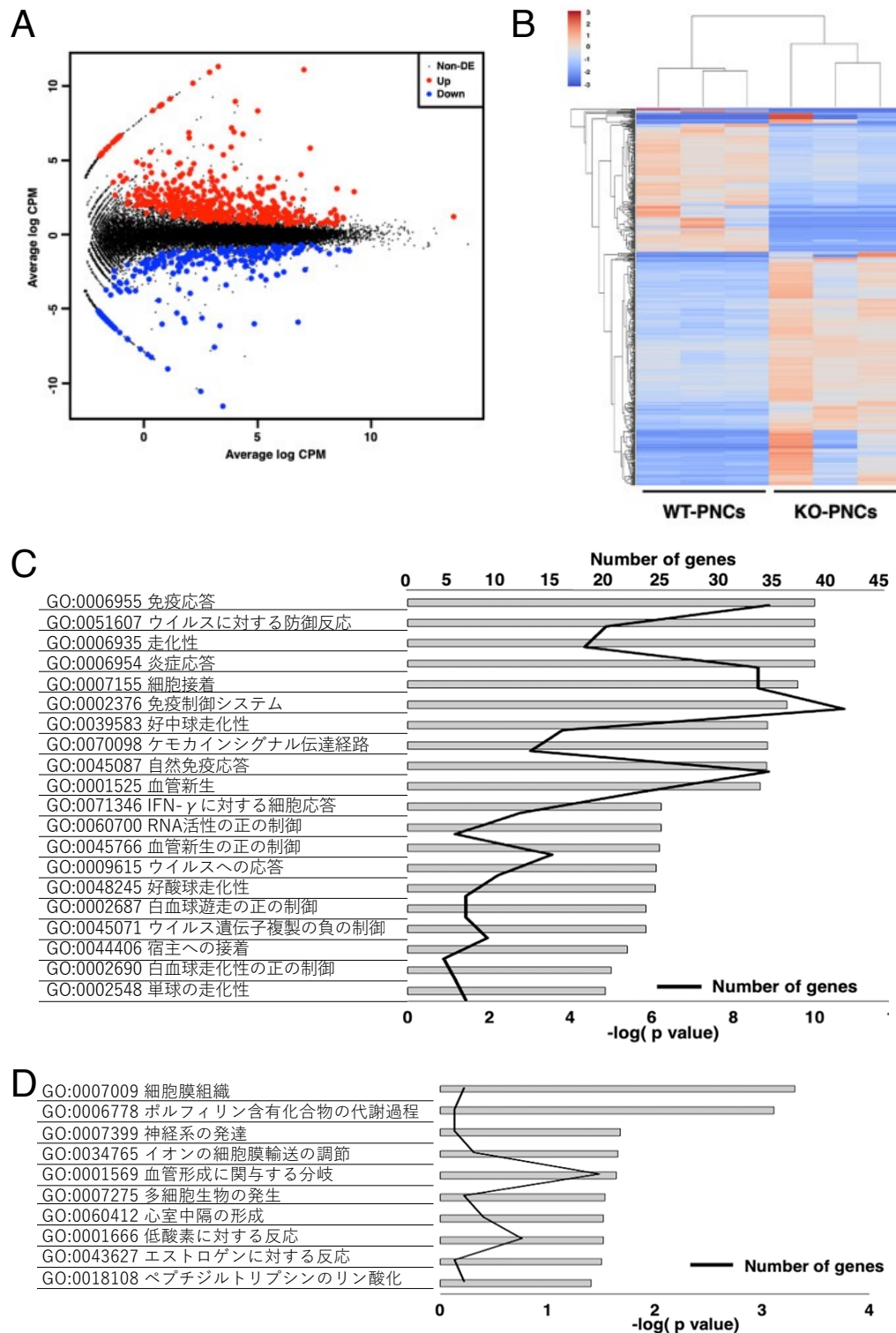


Figure 23 : RNA-seq による *Zip13*-KO マウスの網羅的な遺伝子発現解析

WT および *Zip13*-KO マウス (3 日齢, 各 4 個体) の心臓から調製した初代培養心筋細胞を用いて RNA-seq を実施し、遺伝子発現の網羅的解析を行った。A : MA plot 解析結果を示す。 B : ヒートマップ解析結果を示す。 C-D : GO 解析結果を示す (C : 発現上昇した遺伝子群 ; D : 発現低下した遺伝子群)。

GO 解析の結果、*Zip13*-KO マウス由来心筋細胞は、炎症反応や細胞接着、走化性の発現レベルの上昇を示し、膜組織やイオン膜輸送の調節、心室中隔の形成に関連する遺伝子の発現減少を示した。これらの結果から、ZIP13 は心筋細胞の正常な機能に必要である可能性が示唆された。

心筋に関する研究結果の小括

WT マウス由来 PNC は亜鉛の枯渇により細胞の形態変化と死細胞の増加を呈した。ドキソルビシンによる心負荷モデルの適用により、炎症性サイトカインである *IL-1 β* の発現亢進を伴う *Zip13* の発現低下を確認した(表 6)。以上の結果から、正常な心筋細胞の恒常性の維持において亜鉛が必要であり、また炎症応答において ZIP13 が関与している可能性が示唆された。

上記の実験結果をもとに、心筋における ZIP13 の役割を精査するために、*Zip13*-KO マウスおよび、*Zip13*-KO マウス由来 PNC を用いて検討したところ、*Zip13*-KO マウスは不整脈の兆候を示すとともに、*Zip13*-KO マウス由来 PNC は不規則な拍動を示した。RNA-seq 解析の結果、炎症応答に関連する遺伝子の発現が亢進し、膜輸送に関連する遺伝子の発現は低下していた(表 7)。

ZIP13 心筋細胞において膜輸送を介した亜鉛の恒常性維持を担うことで、炎症応答反応を制御し、正常な心機能と心筋細胞の機能に必要であることが示唆された。

表 6. 心筋細胞における亜鉛の必要性と心負荷モデルにおける *Zip13* の発現

Figure 21	
亜鉛枯渇の影響	心負荷による遺伝子の発現
細胞の形態異常 死細胞の増加	亢進 <i>IL-1β</i> (炎症反応) 低下 <i>Zip13</i>

結果の概要

- ・亜鉛の欠乏や過剰は、初代培養心筋細胞の増殖と生存を障害した。
- ・ドキソルビシンによる心毒性負荷によって、初代培養心筋細胞および心臓における *Zip13* の発現が減少した。

表 7. *Zip13*-KO マウスの心臓と *Zip13*-KO マウス由来 PNC における異常

Figure 22	Figure 23
心臓と心筋細胞	遺伝子の発現
異常 不整脈の傾向 (<i>in vivo</i>) 不規則な拍動 (<i>ex vivo</i>)	亢進 炎症反応・走化性・細胞接着 低下 膜構造や膜輸送に関連する分子

結果の概要

- *Zip13*-KO マウス由来初代心筋細胞は、対照細胞が呈する規則的な拍動を喪失した。
- *Zip13*-KO マウスは、不整脈様の症状を呈した。
- *Zip13*-KO マウス由来初代心筋細胞は、炎症応答の亢進を示した。

上記の結果より、ZIP13 は心筋の正常な機能の維持に必要である可能性が示唆された。

【結論と考察】

本研究において、ZIP13 が骨格筋の機能と形成に関与することを、*Zip13*-KO マウス、マウス筋芽細胞 C2C12、EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞を適用した実験から示した。さらに、ZIP13 が心機能と心筋細胞の恒常性維持に必要であることを、*Zip13*-KO マウスと初代培養心筋細胞を用いた検討から示した。

Zip13-KO マウスの骨格筋は縮小化を示し、筋力低下を呈した (Figure 10) (表 2・1)。さらに、*Zip13*-KO マウスの骨格筋において、骨格筋初期分化遺伝子の *Pax3* および *Pax7* の発現が亢進し、骨格筋中期分化遺伝子の *MyoD* の発現が低下した (Figure 12) (表 2・1)。すなわち、ZIP13 の失調は骨格筋の初期分化段階以降への進行を阻止すること、言い換えれば、ZIP13 は骨格筋の初期分化段階以降への進行に必要であることを示している。

骨格筋分化の初期段階における ZIP13 の関与は、マウス筋芽細胞 C2C12 を用いた実験結果からも示唆される。すなわち、筋分化誘導された C2C12 では ZIP13 の発現が亢進すること、ZIP13 の発現は *MyoD* をはじめとする MRFs の発現上昇に伴うこと (Figure 14) (表 2・2)、ZIP13 を失調させた *Zip13*-KD 細胞は、筋管細胞への分化誘導が抑制されることから、ZIP13 は筋芽細胞から筋管細胞への分化誘導に重要であることが示唆される。興味深いことに、*Zip13*-KD 細胞では MRFs の発現も減少する (Figure 15) (表 2・2)。これらの結果は、MRFs は ZIP13 の発現上昇に関与する一方で、ZIP13 も MRFs の発現維持に必要であること、すなわち、ZIP13 と MRFs が相互に影響して発現を誘導することにより、正常な骨格筋の形成に寄与していることを示している。

上記の事象は、病原性変異型 ZIP13 を保持する EDSSPD3 患者から作成した iPS 細胞を用いた実験でも立証した。すなわち、EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞から筋分化誘導した細胞では、対照細胞と比較して MRFs の発現は顕著に低下していた (Figure 17) (表 2・3)。一方、この MRFs の発現低下は、病原性変異型 ZIP13 遺伝子を正常な ZIP13 遺伝子の配列へ修復 (Figure 18)することによって上昇した (Figure 19) (表 2・3)。

以上の *Zip13*-KO マウス、マウス筋芽細胞 C2C12、EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞を用いた実験結果から、ZIP13 の発現は MRFs の制御下にあり、ZIP13 も MRFs の発現制御に参加し、ZIP13 と MRFs が相互に影響して正常な骨格筋の形成に関与する構図が明らかとなった。すなわち、ZIP13 は新たな筋分化調節因子である可能性を示している (Figure 24 上)。また、*Zip13*-KO マウスの骨格筋には *Pax3* および *Pax7* が高発現する筋衛星細胞 (筋幹細胞) が含まれていることから、骨格筋分化の初期から後期までの様々な細胞の遺伝子発現を反映しており、C2C12 細胞は筋衛星細胞が分化した筋芽細胞由来であることから、*Pax3* および *Pax7* 発現以降の分化について反映したものであると考えられる。さらに iPS 細胞を用いた検討は、*MyoD* を強制発現させることで骨格筋分化を誘導したことから、骨格筋分化の中期以降を反映したものであると考えられる。すなわち、本件研究結果は異なる骨格筋分化段階における評価を行ったことになる。しかしながら、いずれの検討結果も MRFs の発現異常を示した。この結果は、骨格筋のさまざまな分化段階において、ZIP13 が異なる作用点を持つ可能性を示唆している。一方、ZIP13 を介する亜鉛シグナルが、どの様に *MyoD* 等の MRFs の発現制御に関わっているのか、また、*MyoD* がどの様に ZIP13 の発現誘導に関与するのか、これらの詳細な分子メカニズムは現時点で不明である。各 MRFs の遺伝子発現を抑制することや、*Zip13* 遺伝子のプロモータ領域の解析によって、MRFs と ZIP13 の相互の遺伝子発現調節機構が解明され则认为。これらの解析には、本研究で利用および開発した C2C12 細胞関連細胞が有用と考える。すなわち、C2C12 細胞において各種 MRFs を発現抑制し、骨格筋分化誘導時における *Zip13* の発現を解析することで、骨格筋分化における ZIP13 がどの MRFs の影響下にあるのかを解明することができる。さらに、本研究で作製した *Zip13*-KD 細胞を用いて各種 MRFs を発現抑制し、MRFs・*Zip13* ダブルノックダウン細胞を作製することで、様々な骨格筋分化段階における ZIP13 機能低下の影響を精査できるものと考えている。上さらに、本研究で作成した各種マウスの骨格筋や初代培養細胞を用いて、RNA-seq による網羅的な遺伝子解析を行うことにより、骨格筋分化における ZIP13 を介した亜鉛恒常性や亜鉛シグナルの意義解明に関する新たな知見が得られるものと思われる。

EDSSPD3 患者に脳梗塞の既往歴があること (Page 15)、不整脈等の心機能低下は二次性の脳血管疾患と関連することから、ZIP13 の機能喪失が心機能の恒常性を破綻させた可能性を考え、ZIP13 の心臓機能への関与について検討した。具体的には、*Zip13*-KO マウスおよび初代培養心筋細胞を用いて、心毒性負荷への影響、心電図検査および、遺伝子発現等を解析した。その結果、亜鉛の枯渇が心筋細胞の生存に必要であり、ドキシソルビシンによる心毒性負荷によって、ZIP13 の発現が顕著に減少することから心毒性の負荷に対する耐性に関与する可能性が示唆された (Figure 21) (表 3・1)。*Zip13*-KO マウスを用いた心電図検査の結果から、*Zip13*-KO マウスは不整脈の兆候を呈することが判明した (Figure 22D) (表 3・2)。さらに、*Zip13*-KO マウス由来初代培養心筋細胞は、対照細胞には見られない異常な拍動を示し (Figure 22A) (表 3・2)、網羅的遺伝子発現の解析から、炎症関連遺伝子の亢進と、膜輸送に関わる分子の発現減少を認めた (Figure 23) (表 3・2)。

以上の結果から、ZIP13 は正常な心機能に必要であり、心毒性負荷への抵抗性獲得に寄与している可能性が示された (Figure 24 下)。一方、ZIP13 を介する亜鉛シグナルが、どの様に心筋細胞の拍動調節に関与するのか、心筋の形成に関与するのか、また、ZIP13 が、どの様に炎症関連遺伝子の発現制御に関与するのか、については、現時点で不明である。加えて、これらの実験で見出された ZIP13 の失調に起因する心機能の異常が、EDSSPD3 患者の脳梗塞と関連するのかは現時点で不明であり、*Zip13*-KO マウスや心臓組織特異的 *Zip13*-KO マウス等を用いた今後の更なる検討が必要であると考え。

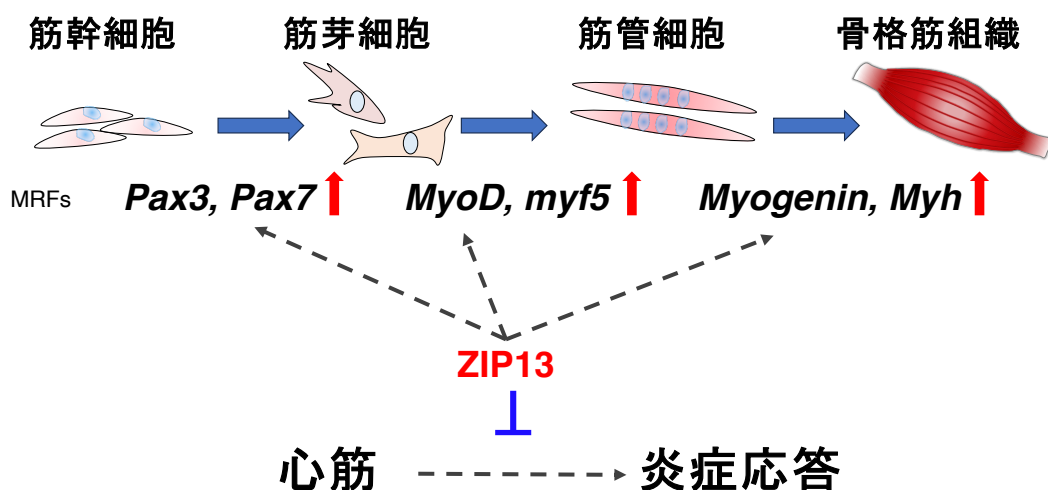


Figure 24 : ZIP13 は、筋分化調節因子の発現制御を介して骨格筋の正常な形成と機能に関与する。さらに、ZIP13

は新機能に関与し、心毒性負荷時における炎症反応の抑制に関与する。

ZIP13 は、骨格筋関連細胞自身の機能に必要なのか、それとともに間接的に骨格筋の形成や機能に関わる組織を形成する細胞 (例えば、腱細胞や間葉系前駆細胞等) に必要とされるのか、については現時点で明らかにされていない。この課題を解明するためには、*Zip13*-KO マウスに運動負荷モデル実験を適用することで、ZIP13 の機能喪失が運動による影響を精査するとともに、*Zip13* 遺伝子座に *loxP* 配列を挿入した *Zip13*^{flox} マウスを使用した骨格筋特異的 *Zip13* 欠損マウスの解析が不可欠である。*Zip13*^{flox} マウスと *MyoD* 転写活性化領域の下流に *Cre recombinase* を連結させた *MyoD*-*Cre* マウスを交配することで、骨格筋特異的 *Zip13* 欠損マウスを作成することが可能である。また、間葉系前駆細胞における ZIP13 の関与に関しては、血小板由来増殖 (成長) 因子 (platelet-derived growth factor:PDGF) 受容体 α の転写活性化領域の下流に *Cre recombinase* を連結させた *P α* -*Cre* マウスと *Zip13*^{flox} マウスを交配することで、間葉系前駆細胞特異的 *Zip13* 欠損マウスを作成することが可能であり、現在、骨格筋特異的 *Zip13* 欠損マウスと合わせて、両マウスの解析を行なっている。これらのマウスの筋力等の表現型を解析することにより、ZIP13 を必要とする細胞が筋実質細胞であるのか、または筋間質細胞であるのかが明らかになると思われる。さらに、骨格筋の初期分化段階における ZIP13 の役割を明確にするために、骨格筋の幹細胞である筋衛星細胞で高発現している *Pax7* 転写活性化領域の下流に *Cre recombinase* を連結させた *Pax7*-*Cre* マウスを交配することで、筋衛星細胞特異的 *Zip13* 欠損マウスを作成することも視野に入れて検討を進めている。これらの研究結果を検証する上で、我々が開発した EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞は有用であると考ええる。

一方、我々は ZIP13 発現細胞を可視化するために、*Zip13* のエクソン 2 領域に EGFP 遺伝子を挿入した *Zip13*GFP-*CreERT2* マウスを作製した (未発表)。現時点で、筋衛星細胞が ZIP13 を発現することを見出しているが、筋衛星細胞における ZIP13 の意義は不明である。その意義の解明のためには、*Zip13*-KO マウスの筋衛星細胞の性状解析と、*Zip13*GFP-*CreERT2* マウスから ZIP13 陽性筋衛星細胞を単離して、その特徴を解明することが必要である。*Zip13*GFP-*CreERT2* マウスは、*Rosa26*-td Tomato マウスと交配することによって、ZIP13 陽性細胞の子孫細胞の解析が可能になる。本研究で開発

したこれらのマウス系統は、骨格筋の形成と機能のみならず、ZIP13が発現する細胞の役割解明に極めて有用なツールになると考える。

ZIP13は、Slc39a/ZIPファミリーに属する亜鉛トランスポーターである。では、ZIP13を介する亜鉛シグナルが、どのように骨格筋の形成や機能の制御に関与するのか。ZIP13がBMP/TGF- β のシグナル伝達に関与すること(48)、CaMKIIの活性化に必要であることが示されているが(87)、その分子メカニズムはまだ十分に解明されていない。

上述したように、*Zip13*-KO マウス由来初代培養心筋細胞は、膜輸送に関わる分子の発現減少を示すこと(Figure 23)、ZIP13はゴルジ体に局在することから、ZIP13とゴルジ体との機能的な関連性が示唆される。ゴルジ体は、タンパク質翻訳後修飾と細胞内輸送を決定する重要な細胞小器官であるが、ZIP13のゴルジ体における意義は明らかにされていない。近年、さまざまな負荷によるゴルジ体機能の低下に伴って、ゴルジ体を構築する遺伝子発現が上昇または減少することが報告されており、この現象はゴルジ体ストレス応答と呼ばれている。現在、ZIP13の失調に伴うゴルジ体ストレス応答に関して、ゴルジ体の主な機能である糖鎖修飾の変化について解析を進めており、ZIP13の機能低下が糖鎖修飾に関与する可能性を見出している(未発表)。これらの結果は、ZIP13とゴルジ体の関連性を明らかにするだけでなく、個々の細胞におけるZIP13を解する亜鉛シグナルの機序を提示するものと思われる。

最後に、本研究で開発したiPS細胞について言及する。ZIP13の失調に起因するEDSSPD3は多くの結合組織に障害をもたらす希少疾患である。症例数は限られており、ZIP13の機能回復による治療法はまだ確立されていない。筆者らは、EDSSPD3患者由来の皮膚線維芽細胞からiPS細胞を世界で初めて樹立し、骨格筋分化過程におけるZIP13の役割解明に適用した。前述のように、EDSSPD3は骨軟骨組織、皮膚真皮、脂肪組織、歯組織、眼球角膜の形成と機能に障害をもたらすため、EDSSPD3由来iPS細胞は、これら結合組織を形成する細胞の分化や機能を解析する上で、極めて有用であると思われる。さらに、結合組織を形成する細胞の分化誘導系を評価系に適用することで、ZIP13の機能破綻を相補する化合物の同定が可能になるとと思われる。そのような化合物は、ZIP13が制御する経路の活性化に関与すると考えられ、ZIP13を介す

る亜鉛シグナル経路の解明と、ZIP13 を標的とする治療薬開発に貢献する可能性を有するものである。

再生医療の観点から、本研究で開発した遺伝子修復型 EDSSPD3 由来 iPS 細胞の確立は、今後の創薬および臨床関連の研究において有用であると考ええる。具体的には、本細胞は、*in vitro* における組織再生実験で、正常な器官形成を確認した上で、ヒト化マウスを用いた移植実験による機能的な各種間葉系組織の再生実験を可能にするものである。実際に、EDSSPD3 由来 iPS 細胞は、本論文の目標である骨格筋における ZIP13 の役割解明において重要な知見を提供した (Figure XXX)。EDSSPD3 由来 iPS 細胞と、その変異修復 iPS 細胞の使用によって、結合組織の形成と機能における ZIP13 のさらなる理解と、その失調による EDSSPD3 の病態形成の解明、および、新規治療法の開発が進むことを期待する。

【引用文献】

1. Office of Dietary Supplements - Iodine (NIH*)
2. 山根靖弘(1990) 生体中の微量元素の役割. *保健物理*, 25, 269-277
3. Office of Dietary Supplements - Iron (NIH*)
4. Office of Dietary Supplements - Zinc (NIH*)
5. Office of Dietary Supplements - Copper (NIH*)
6. Office of Dietary Supplements - Selenium (NIH*)
7. Office of Dietary Supplements - Molybdenum (NIH*)
8. Office of Dietary Supplements - Manganese (NIH*)
9. Office of Dietary Supplements - Chromium (NIH*)
10. 西藤有希奈, 直木志保, 神戸大朋. (2018) 生体内の亜鉛代謝制御における亜鉛輸送体の役割 *微量栄養素研究* 35:92-97
11. Takagishi, T., Hara, T., and Fukada, T. (2017) Recent Advances in the Role of SLC39A/ZIP Zinc Transporters In Vivo. *Int J Mol Sci.* **18**, 2708
12. Hara, T., Yoshigai, E., Ohashi, T., and Fukada, T. (2023) Zinc in Cardiovascular Functions and Diseases: Epidemiology and Molecular Mechanisms for Therapeutic Development. *Int J Mol Sci.* **24**, 7152
13. Prasad, A. S., Halsted, J. A., and Nadimi, M. (1961) Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. *Am J Med.* **31**, 532–546
14. W.R., T. (1980) Nutrition classics. The American Journal of Physiology. Volume 107, 1934, pages 146-156. “Zinc in the nutrition of the rat” by W.R. Todd, C.A. Elvehjem and E.B. Hart. *Nutr Rev.* **38**, 151–154
15. Jakinovich, W., and Osborn, D. W. (1981) Zinc nutrition and salt preference in rats. *Am J Physiol.* **241**, R233-239
16. Prasad, A. S., Miale, A., Farid, Z., Sandstead, H. H., and Schulert, A. R. (1963) Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism, and hypogonadism. *J Lab Clin Med.* **61**, 537–549

17. 児玉浩子, 板倉弘重, 大森啓充, 佐々木雅也, 篁俊成, 布施養善, 細井孝之, 吉田博. (2018) 亜鉛欠乏症の治療ガイドライン. *日本臨床栄養学会雑誌* 40(2):120-167
18. Tamaki, M., Fujitani, Y., Hara, A., Uchida, T., Tamura, Y., Takeno, K., Kawaguchi, M., Watanabe, T., Ogihara, T., Fukunaka, A., Shimizu, T., Mita, T., Kanazawa, A., Imaizumi, M. O., Abe, T., Kiyonari, H., Hojyo, S., Fukada, T., Kawauchi, T., Nagamatsu, S., Hirano, T., Kawamori, R., and Watada, H. (2013) The diabetes-susceptible gene *SLC30A8*/ZnT8 regulates hepatic insulin clearance. *J Clin Invest.* **123**, 4513–4524
19. Jansen, J., Karges, W., and Rink, L. (2009) Zinc and diabetes--clinical links and molecular mechanisms. *J Nutr Biochem.* **20**, 399–417
20. 福島達夫, 堀家英之. (2011) 慢性腎疾患(CKD)における亜鉛欠乏性貧血. *亜鉛栄養治療* 1巻2号65-73
21. Gelbard, A. (2022) Zinc in Cancer Therapy Revisited. *Isr Med Assoc J.* **24**, 258–262
22. Skrajnowska, D., and Bobrowska-Korczak, B. (2019) Role of Zinc in Immune System and Anti-Cancer Defense Mechanisms. *Nutrients.* 10.3390/nu11102273
23. Takatani-Nakase, T. (2018) Zinc Transporters and the Progression of Breast Cancers. *Biol Pharm Bull.* **41**, 1517–1522
24. Wang, G., Biswas, A. K., Ma, W., Kandpal, M., Coker, C., Grandgenett, P. M., Hollingsworth, M. A., Jain, R., Tanji, K., López-Pintado, S., Borczuk, A., Hebert, D., Jenkitkasemwong, S., Hojyo, S., Davuluri, R. V., Knutson, M. D., Fukada, T., and Acharyya, S. (2018) Metastatic cancers promote cachexia through ZIP14 upregulation in skeletal muscle. *Nat Med.* **24**, 770–781
25. Shakri, A. R., Zhong, T. J., Ma, W., Coker, C., Kim, S., Calluori, S., Scholze, H., Szabolcs, M., Caffrey, T., Grandgenett, P. M., Hollingsworth, M. A., Tanji, K., Kluger, M. D., Miller, G., Biswas, A. K., and Acharyya, S. (2019) Upregulation of ZIP14 and Altered Zinc Homeostasis in Muscles in Pancreatic Cancer Cachexia. *Cancers (Basel).* **12**, 3
26. Yasui, Y., Yasui, H., Suzuki, K., Saitou, T., Yamamoto, Y., Ishizaka, T., Nishida, K., Yoshihara, S., Gohma, I., and Ogawa, Y. (2020) Analysis of the predictive factors for a critical illness of COVID-19 during treatment — relationship between serum zinc level

- and critical illness of COVID-19 –. *Int J Infect Dis.* **100**, 230–236
27. Li, Y. V. (2014) Zinc and insulin in pancreatic beta-cells. *Endocrine.* **45**, 178–189
 28. Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., and Rosato, A. (2006) Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J Proteome Res.* **5**, 196–201
 29. Baltaci, A. K., Yuce, K., and Mogulkoc, R. (2018) Zinc Metabolism and Metallothioneins. *Biol Trace Elem Res.* **183**, 22–31
 30. Hara, T., Takeda, T., Takagishi, T., Fukue, K., Kambe, T., and Fukada, T. (2017) Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *J Physiol Sci.* **67**, 283–301
 31. Fujishiro, H., and Kambe, T. (2022) Manganese transport in mammals by zinc transporter family proteins, ZNT and ZIP. *J Pharmacol Sci.* **148**, 125–133
 32. Taylor, K. M. (2023) The LIV-1 Subfamily of Zinc Transporters: From Origins to Present Day Discoveries. *Int J Mol Sci.* **24**, 1255
 33. Kürý, S., Kharfi, M., Kamoun, R., Taieb, A., Mallet, E., Baudon, J.-J., Glastre, C., Michel, B., Sabag, F., Brooks D., Schuster, V., Scoul, C., Dreno, B., Bezieau, S., Moisan, J.-P. (2003) Mutation spectrum of human SLC39A4 in a panel of patients with acrodermatitis enteropathica. *Human Mutation.* **4**, 337-8
 34. Kürý, S., Dréno, B., Bézieau, S., Giraudet, S., Kharfi, M., Kamoun, R., and Moisan, J.-P. (2002) Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica. *Nat Genet.* **31**, 239–240
 35. Geiser, J., Venken, K. J. T., De Lisle, R. C., and Andrews, G. K. (2012) A Mouse Model of Acrodermatitis Enteropathica: Loss of Intestine Zinc Transporter ZIP4 (Slc39a4) Disrupts the Stem Cell Niche and Intestine Integrity. *PLoS Genet.* **8**, e1002766
 36. Jones, S., Farr, G., Nimmanon, T., Ziliotto, S., Gee, J. M. W., and Taylor, K. M. (2022) The importance of targeting signalling mechanisms of the SLC39A family of zinc transporters to inhibit endocrine resistant breast cancer. *Explor Target Antitumor Ther.* **3**, 224–239
 37. Yamashita, S., Miyagi, C., Fukada, T., Kagara, N., Che, Y.-S., and Hirano, T. (2004) Zinc

- transporter LIVI controls epithelial-mesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer. *Nature*. **429**, 298–302
38. Zhao, L., Tan, J., Li, D., Jiang, L., Li, T., Yang, Y., Wang, G., Shang, Z., Wang, J., and Zhou, J. (2019) SLC39A6/ZIP6 is essential for zinc homeostasis and T-cell development in zebrafish. *Biocheml Biophys Res Commun*. **511**, 896–902
 39. Lee, M.-G., and Bin, B.-H. (2019) Different Actions of Intracellular Zinc Transporters ZIP7 and ZIP13 Are Essential for Dermal Development. *Int J Mol Sci*. **20**, 3941
 40. Ohashi, W., Kimura, S., Iwanaga, T., Furusawa, Y., Irié, T., Izumi, H., Watanabe, T., Hijikata, A., Hara, T., Ohara, O., Koseki, H., Sato, T., Robine, S., Mori, H., Hattori, Y., Watarai, H., Mishima, K., Ohno, H., Hase, K., and Fukada, T. (2016) Zinc Transporter SLC39A7/ZIP7 Promotes Intestinal Epithelial Self-Renewal by Resolving ER Stress. *PLoS Genet*. **12**, e1006349
 41. 藤代瞳, 姫野誠一郎. (2018) 生体内カドミウム・マンガン輸送における亜鉛輸送体 ZIP8の役割. *日本生化学会誌*. **90**, 340–347
 42. Miyai, T., Hojyo, S., Ikawa, T., Kawamura, M., Irié, T., Ogura, H., Hijikata, A., Bin, B.-H., Yasuda, T., Kitamura, H., Nakayama, M., Ohara, O., Yoshida, H., Koseki, H., Mishima, K., and Fukada, T. (2014) Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 facilitates antiapoptotic signaling during early B-cell development. *Proc Natl Acad Sci*. **111**, 11780–11785
 43. Bin, B.-H., Bhin, J., Takaishi, M., Toyoshima, K., Kawamata, S., Ito, K., Hara, T., Watanabe, T., Irié, T., Takagishi, T., Lee, S.-H., Jung, H.-S., Rho, S., Seo, J., Choi, D.-H., Hwang, D., Koseki, H., Ohara, O., Sano, S., Tsuji, T., Mishima, K., and Fukada, T. (2017) Requirement of zinc transporter ZIP10 for epidermal development: Implication of the ZIP10–p63 axis in epithelial homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **114**, 12243–12248
 44. Zhu, T., Wang, X., Zheng, Z., Quan, J., Liu, Y., Wang, Y., Liu, T., Liu, X., Wang, M., and Zhang, Z. (2022) ZIP12 Contributes to Hypoxic Pulmonary Hypertension by Driving Phenotypic Switching of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. **79**, 235

45. Davis, D. N., Strong, M. D., Chambers, E., Hart, M. D., Bettaieb, A., Clarke, S. L., Smith, B. J., Stoecker, B. J., Lucas, E. A., Lin, D., and Chohanadisai, W. (2021) A role for zinc transporter gene SLC39A12 in the nervous system and beyond. *Gene*. **799**, 145824
46. Dusanic, M., Dekomien, G., Lücke, T., Vorgerd, M., Weis, J., Epplen, J. T., Köhler, C., and Hoffjan, S. (2018) Novel Nonsense Mutation in SLC39A13 Initially Presenting as Myopathy: Case Report and Review of the Literature. *Mol Syndromol*. **9**, 100–109
47. Bin, B.-H., Fukada, T., Hosaka, T., Yamasaki, S., Ohashi, W., Hojyo, S., Miyai, T., Nishida, K., Yokoyama, S., and Hirano, T. (2011) Biochemical characterization of human ZIP13 protein: a homo-dimerized zinc transporter involved in the spondylocheiro dysplastic Ehlers-Danlos syndrome. *J Biol Chem*. **286**, 40255–40265
48. Fukada, T., Civic, N., Furuichi, T., Shimoda, S., Mishima, K., Higashiyama, H., Idaira, Y., Asada, Y., Kitamura, H., Yamasaki, S., Hojyo, S., Nakayama, M., Ohara, O., Koseki, H., Santos, H. G. dos, Bonafe, L., Ha-Vinh, R., Zankl, A., Unger, S., Kraenzlin, M. E., Beckmann, J. S., Saito, I., Rivolta, C., Ikegawa, S., Superti-Furga, A., and Hirano, T. (2008) The Zinc Transporter SLC39A13/ZIP13 Is Required for Connective Tissue Development; Its Involvement in BMP/TGF- β Signaling Pathways. *PLOS ONE*. **3**, e3642
49. Giunta, C., Elçioğlu, N. H., Albrecht, B., Eich, G., Chambaz, C., Janecke, A. R., Yeowell, H., Weis, M., Eyre, D. R., Kraenzlin, M., and Steinmann, B. (2008) Spondylocheiro Dysplastic Form of the Ehlers-Danlos Syndrome—An Autosomal-Recessive Entity Caused by Mutations in the Zinc Transporter Gene SLC39A13. *Am J Hum Genet*. **82**, 1290–1305
50. Hojyo S., Fukada T., Shimoda S., Ohashi W., Bin B.-H., Koseki H., and Hirano T. (2011) The Zinc Transporter SLC39A14/ZIP14 Controls G-Protein Coupled Receptor-Mediated Signaling Required for Systemic Growth. *PLoS ONE*. **6**, e18059
51. 藤代瞳, 姫野誠一郎. (2018) カドミウムとマンガンの生体内輸送における亜鉛輸送体の役割. *日本生化学会誌*. **90(3)**, 340–347
52. Chohanadisai, W., Lönnerdal, B., and Kelleher, S. L. (2006) Identification of a mutation in SLC30A2 (ZnT-2) in women with low milk zinc concentration that results in transient neonatal zinc deficiency. *J Biol Chem*. **281**, 39699–39707

53. Murgia, C., Vespignani, I., Rami, R., Perozzi, G. (2006) The Znt4 mutation in lethal milk mice affects intestinal zinc homeostasis through the expression of other Zn transporters. *Genes & Nutrition*. (1):61-70
54. Suzuki, T., Ishihara, K., Migaki, H., Matsuura, W., Kohda, A., Okumura, K., Nagao, M., Yamaguchi-Iwai, Y., and Kambe, T. (2005) Zinc Transporters, ZnT5 and ZnT7, Are Required for the Activation of Alkaline Phosphatases, Zinc-requiring Enzymes That Are Glycosylphosphatidylinositol-anchored to the Cytoplasmic Membrane*. *J Biol Chem*. **280**, 637–643
55. Inoue, K., Matsuda, K., Itoh, M., Kawaguchi, H., Tomoike, H., Aoyagi, T., Nagai, R., Hori, M., Nakamura, Y., and Tanaka, T. (2002) Osteopenia and male-specific sudden cardiac death in mice lacking a zinc transporter gene, Znt5. *Hum Mol Genet*. **11**, 1775–1784
56. Petkovic, V., Miletta, M. C., Eblé, A., Flück, C. E., and Mullis, P.-E. (2014) Alteration of ZnT5-Mediated Zinc Import into the Early Secretory Pathway Affects the Secretion of Growth Hormone from Rat Pituitary Cells. *Horm Res Paediatr*. **82**, 245–251
57. Nishida, K., Hasegawa, A., Nakae, S., Oboki, K., Saito, H., Yaamasaki, S., Hirano T. (2009) Zinc transporter Znt5/Slc30a5 is required for the mast cell-mediated delayed-type allergic reaction but not the immediate-type reaction. *J Exp Med*. 206(6):1351-64
58. Qiong, H., Jie, D., Chengfeng, M., Zhicheng, G. (2019) Genetic, Functional, and Immunological Study of ZnT8 in Diabetes. *Int J Endocrinol*. 1524905
59. Hojyo, S., Miyai, T., Fujishiro, H., Kawamura, M., Yasuda, T., Hijikata, A., Bin, B.-H., Irié, T., Tanaka, J., Atsumi, T., Murakami, M., Nakayama, M., Ohara, O., Himeno, S., Yoshida, H., Koseki, H., Ikawa, T., Mishima, K., and Fukada, T. (2014) Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 controls humoral immunity by modulating B-cell receptor signal strength. *Proc Natl Acad Sci*. **111**, 11786–11791
60. Kambe T. (2013) Overview of and Update on the Physiological Functions of Mammalian Zinc Transporters. *Jpn. J. Hyg*. **68**, 92–102
61. Agrawal, P., Kaur, H., Kondekar, A., and Rath, S. (2023) A case of Ehlers–Danlos

- syndrome presenting as short stature: a novel mutation in SLC39A13 causing spondylodysplastic Ehlers–Danlos syndrome. *Oxf Med Case Reports*. **2023**, omac107
62. Levin, C M., 筋力低下 (2019) *MSD マニュアル プロフェッショナル版*.
 63. De Santos-Moreno, M. G., Velandrino-Nicolás, A. P., and Gómez-Conesa, A. (2023) Hypotonia: Is It a Clear Term and an Objective Diagnosis? An Exploratory Systematic Review. *Pediatr Neurol*. **138**, 107–117
 64. Mercuri, E., Pera, M. C., and Brogna, C. (2019) Neonatal hypotonia and neuromuscular conditions. *Handb Clin Neurol*. **162**, 435–448
 65. Bin, B.-H., Hojyo, S., Hosaka, T., Bhin, J., Kano, H., Miyai, T., Ikeda, M., Kimura-Someya, T., Shirouzu, M., Cho, E.-G., Fukue, K., Kambe, T., Ohashi, W., Kim, K.-H., Seo, J., Choi, D.-H., Nam, Y.-J., Hwang, D., Fukunaka, A., Fujitani, Y., Yokoyama, S., Superti-Furga, A., Ikegawa, S., Lee, T. R., and Fukada, T. (2014) Molecular pathogenesis of spondylocheirodysplastic Ehlers-Danlos syndrome caused by mutant ZIP13 proteins. *EMBO Mol Med*. **6**, 1028–1042
 66. Slow vs Fast Twitch. BioNinja
 67. Structure of Skeletal Muscle. SEER Training
 68. Yoshida, T., Awaya, T., Jonouchi, T., Kimura, R., Kimura, S., Era, T., Heike, T., and Sakurai, H. (2017) A Skeletal Muscle Model of Infantile-onset Pompe Disease with Patient-specific iPS Cells. *Sci Rep*. **7**, 13473
 69. Vega-Cabello, V., Caballero, F. F., Lana, A., Arias-Fernandez, L., Banegas, J. R., Rodríguez-Artalejo, F., Lopez-Garcia, E., and Struijk, E. A. (2022) Association of Zinc Intake With Risk of Impaired Physical Function and Frailty Among Older Adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. **77**, 2015–2022
 70. Scott, D., Blizzard, L., Fell, J., Giles, G., and Jones, G. (2010) Associations Between Dietary Nutrient Intake and Muscle Mass and Strength in Community-Dwelling Older Adults: The Tasmanian Older Adult Cohort Study. *J Am Geriatr Soc*. **58**, 2129–2134
 71. Borg, ter S., de Groot, L. C. P. G. M., Mijnders, D. M., de Vries, J. H. M., Verlaan, S., Meijboom, S., Luiking, Y. C., and Schols, J. M. G. A. (2016) Differences in Nutrient

- Intake and Biochemical Nutrient Status Between Sarcopenic and Nonsarcopenic Older Adults—Results From the Maastricht Sarcopenia Study. *J Am Med Dir Assoc.* **17**, 393–401
72. Verlaan, S., Aspray, T. J., Bauer, J. M., Cederholm, T., Hemsworth, J., Hill, T. R., McPhee, J. S., Piasecki, M., Seal, C., Sieber, C. C., ter Borg, S., Wijers, S. L., and Brandt, K. (2017) Nutritional status, body composition, and quality of life in community-dwelling sarcopenic and non-sarcopenic older adults: A case-control study. *Clin Nutr.* **36**, 267–274
73. Nakamura, K. (2008) A “super-aged” society and the “locomotive syndrome.” *J Orthop Sci.* **13**, 1–2
74. Hosoi, T., Yakabe, M., Sasakawa, H., Sasako, T., Ueki, K., Kato, S., Tokuoka, S. M., Oda, Y., Abe, M., Matsumoto, T., Akishita, M., and Ogawa, S. (2023) Sarcopenia phenotype and impaired muscle function in male mice with fast-twitch muscle-specific knockout of the androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **120**, e2218032120
75. Onoki, T., Izumi, Y., Takahashi, M., Murakami, S., Matsumaru, D., Ohta, N., Wati, S. M., Hatanaka, N., Katsuoka, F., Okutsu, M., Yabe, Y., Hagiwara, Y., Kanzaki, M., Bamba, T., Itoi, E., and Motohashi, H. (2021) Skeletal muscle-specific Keap1 disruption modulates fatty acid utilization and enhances exercise capacity in female mice. *Redox Biol.* **43**, 101966
76. Deacon, R. M. J. (2013) Measuring the strength of mice. *J Vis Exp.* 10.3791/2610
77. Gallagher, D., and Heymsfield, S. B. (1998) Muscle distribution: variations with body weight, gender, and age. *Appl Radiat Isot.* **49**, 733–734
78. Zammit, P. S., Partridge, T. A., and Yablonka-Reuveni, Z. (2006) The Skeletal Muscle Satellite Cell: The Stem Cell That Came in From the Cold. *J Histochem Cytochem.* **54**, 1177–1191
79. Fujita, H., Endo, A., Shimizu, K., and Nagamori, E. (2010) Evaluation of serum-free differentiation conditions for C2C12 myoblast cells assessed as to active tension generation capability. *Biotechnol Bioeng.* **107**, 894–901
80. Lawson, M. A., and Purslow, P. P. (2000) Differentiation of myoblasts in serum-free media: effects of modified media are cell line-specific. *Cells Tissues Organs.* **167**, 130–

81. Tanaka, A., Woltjen, K., Miyake, K., Hotta, A., Ikeya, M., Yamamoto, T., Nishino, T., Shoji, E., Sehara-Fujisawa, A., Manabe, Y., Fujii, N., Hanaoka, K., Era, T., Yamashita, S., Isobe, K., Kimura, E., and Sakurai, H. (2013) Efficient and Reproducible Myogenic Differentiation from Human iPS Cells: Prospects for Modeling Miyoshi Myopathy In Vitro. *PLOS ONE*. **8**, e61540
82. Shoji, E., Sakurai, H., Nishino, T., Nakahata, T., Heike, T., Awaya, T., Fujii, N., Manabe, Y., Matsuo, M., and Sehara-Fujisawa, A. (2015) Early pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy modelled in patient-derived human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep*. **5**, 12831
83. Uchimura, T., Otomo, J., Sato, M., and Sakurai, H. (2017) A human iPS cell myogenic differentiation system permitting high-throughput drug screening. *Stem Cell Res*. **25**, 98–106
84. Little, P. J., Bhattacharya, R., Moreyra, A. E., and Korichneva, I. L. (2010) Zinc and cardiovascular disease. *Nutrition*. **26**, 1050–1057
85. Choi, S., Liu, X., and Pan, Z. (2018) Zinc deficiency and cellular oxidative stress: prognostic implications in cardiovascular diseases. *Acta Pharmacol Sin*. **39**, 1120–1132
86. Sandhya, T., Vijaya, L-B., Madhukar, R-K., Sreedhar, B. (2019) Comparative Response of Cardiomyocyte ZIPs and ZnTs to Extracellular Zinc and TPEN. *Biol Trace Elem Res*. Vol192, 297-307
87. Hara, T., Yamada, I., Ohashi, T., Tamura, M., Hijikata, A., Watanabe, T., Gao, M., Ito, K., Kawamata, S., Azuma, S., Yoshigai, E., Sumiyoshi, Y., Yasuhiro, N., Ohara, O., dos Santos, H. G., and Fukada, T. (2022) Role of Scl39a13/ZIP13 in cardiovascular homeostasis. *PLoS One*. **17**, e0276452
88. Yamashita, S., Miyagi, C., Fukada, T., Kagara, N., Che, Y.-S., and Hirano, T. (2004) Zinc transporter LIV1 controls epithelial-mesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer. *Nature*. **429**, 298–302

89. Hara T, Yoshigai E, **Ohashi T**, Fukada T. (2022) Zinc transporter as potential therapeutic targets: An updated review. *J Pharmacol Sci.* 148(2):221-228.
90. 片野由美, 内田勝雄. (2015) 新訂版 図解ワンポイント生理学. サイオ出版 p.52

*NIH : Natioinal Institutes of Health

【発表論文】

原著論文

1. Hara T *, Yamada I *, **Ohashi T***, Tamura M, Hijikata A, Watanabe T, Gao M, Ito K, Kawamata S, Azuma S, Yoshigai E, Sumiyoshi Y, Yasuhiro N, Ohara O, Santos DGH, Fukada T.
Role of Scl39a13/ZIP13 in cardiovascular homeostasis.
PLoS One 17(10):e0276452 (2022), (*: equal contribution)

【参考論文】

原著論文

1. Shoji M *, **Ohashi T** *, Nagase S, Yuri H, Ichihashi K, Takagishi T, Takagishi T, Nagata Y, Nomura Y, Fukunaka A, Kenjou S, Miyake H , Hara T, Yoshigai E, Fujitani Y, Sakurai H, Santos DGH, Fukada T, Kuzuhara T
Zinc transporter ZIP13 is involved in myogenic differentiation: establishment of Ehlers–Danlos syndrome spondylodysplastic type 3 induced pluripotent stem cells
Sci Rep (Preprints) , (*: equal contribution)
2. Lee M, Chae S, Nakajima S, Ibi M, Sano H, Hara T, Jo H, Takagishi T, Cha B, Baek J, Yoshigai E, **Ohashi T**, Irié T, Sano S, Lee J, Fukada T, Bin B
Implication of the zinc-epigenetic axis in epidermal homeostasis
J Dermatol Sci. 98(3):203-206. (2020).

総説

1. Hara T, Yoshigai E, **Ohashi T**, Fukada T.
Zinc transporter as potential therapeutic targets: An updated review.
J Pharmacol Sci. 148(2):221-228 (2022).
2. Hara T, Yoshigai E, **Ohashi T**, Fukada T.
Zinc in Cardiovascular Functions and Diseases: Epidemiology and Molecular Mechanisms for Therapeutic Development.
Int J Mol Sci. 24(8):7152. (2023).

【謝辞】

本研究を遂行するあたり、御指導を賜りました本学病態分子薬理学研究室、深田俊幸教授に深謝いたします。当研究室准教授 原貴史先生、元助教 東野（高岸）照久先生、特別研究員 吉開会美先生に心より感謝申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、多大なご指導とご助言を賜りました群馬大学生体調節研究所分子糖代謝制御分野 教授 藤谷与士夫先生、助教 福中彩子先生、大学院生 島田正晴先生、本学生化学研究室 教授 葛原隆先生、准教授 畠山大先生、講師 庄司正樹先生に深謝いたします。本研究を行うにあたり、サンプルとして細胞をご提供いただくとともに、提供いただいた細胞を用いて研究を行うことにご快諾いただきました2名の EDSSPD3 患者様に厚く御礼申し上げます。また、さまざまな便宜を図って頂きました本学病態分子薬理学研究室の皆様、後輩諸氏に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人日本薬学会 日本薬学会長井記念薬学研究奨励金（Nagai Memorial Research Scholarship from the Pharmaceutical Society of Japan）のご支援を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

最後に、ここに至るまで支え続けてくれた両親と祖父母、弟に感謝申し上げます。

令和6年3月