

研究紹介

亜鉛の大腸がん抑制効果に関する研究

中川 直也, 西田 圭吾

鈴鹿医療科学大学 薬学部 薬学科

キーワード： 亜鉛, 大腸がん, グランザイム B, 細胞傷害性 T 細胞, 腫瘍免疫

要 旨

亜鉛は必須微量元素のひとつであり、様々な生体反応に関与している。亜鉛が不足すると、免疫力が低下することが知られているが、そのメカニズムは十分に理解されていない。本研究は、亜鉛の腫瘍免疫に対する役割とそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。亜鉛摂取量をコントロールしたマウスにアゾキシメタン（AOM）とデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）を投与し、大腸がんを発生させたところ、亜鉛の摂取量が多いほど大腸がんの数が減少した。加えて、亜鉛の腫瘍抑制効果は T 細胞に依存していることを発見した。マウスの脾臓を用いて、脾臓中の免疫担当細胞の働きが亜鉛によってどのように変化するか解析したところ、亜鉛は細胞傷害性 T 細胞やナチュラルキラー細胞が抗原を認識した際に放出するグランザイム B の転写量を増加させることが明らかになった。よって、本研究により亜鉛の適切な摂取はがんの予防に役立つ可能性が示された。

1. はじめに

亜鉛は必須微量元素の一つであり、ヒトにおいて 300 種類以上の酵素に含有され、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている¹⁾。亜鉛が欠乏すると、免疫異常、味覚異常、創傷治癒遅延、筋力の低下など様々な症状があらわれる^{2, 3)}。厚生労働省の国民健康・栄養調査(2019 年)のデータによると、日本人の 1 日当たりの亜鉛摂取量は男性で 9.2 mg、女性で 7.7 mg となっており、推奨量よりやや少ないことが見て取れる⁴⁾。また、長野県 7 国保診療所で実施されたヒトの血清亜鉛値の調査で、高齢者の約 25% が血清亜鉛値 65 µg/dL 未満を示したという報告もあることから、日本において亜鉛欠乏は決して稀な状態ではなく、特に高齢者で亜鉛欠乏のリスクが高いと考えられる⁵⁾。さらに、抗菌薬の一部やレボドパなどの薬物は亜鉛とキレートを形成することで亜鉛の吸収を阻害し、薬剤性味覚障害の要因となることが示されており^{6, 7)}、薬を服用する機会の多い高齢者において亜鉛不足を悪化させる可能性がある。

2. 亜鉛と免疫機能の関係

亜鉛は免疫機能の調節に重要な役割を果たす栄養素であり、亜鉛欠乏は様々な疾患と関連している。感染症は亜鉛欠乏によって悪化する可能性が示されている疾患の一つである。発展途上国における小児の感染性下痢症に対して亜鉛補充を行うと下痢の期間が短縮するという報告がある⁸⁾。また、新型コロナウイルス感染症において血清亜鉛値 70 µg/dL 未満の成人は重症化リスクが高いことが報告されており、小児においても低い血清亜鉛値は入院率を増加させる可能性が示されている^{9, 10)}。

3. 亜鉛と悪性腫瘍の関係

亜鉛の不足が悪性腫瘍の増悪に関与することは、以前より多くの研究により報告されている。Gyorkey らは前立腺がん患者において、健常者と比較し前立腺組織中の亜鉛含有量が低いことを報告した¹¹⁾。また、Ozeki らは C

型肝炎ウイルス排除後の C 型肝炎患者において、低い血清亜鉛濃度が肝細胞がんのリスク因子となることを示した¹²⁾。これらの報告は、組織中や血清中の亜鉛濃度が低下することは悪性腫瘍の発生や進展などのリスクを増加させることを示唆している。さらに、Epstein らは前立腺がん患者において亜鉛摂取量が多いほど前立腺がんによる死亡リスクが低下することを示した¹³⁾。このことから、亜鉛を適切に摂取することはがんによる死亡リスクを低下させる可能性がある。しかし、亜鉛の腫瘍抑制効果に関するメカニズムは十分に理解されているとは言えない。そこで、本研究では亜鉛が腫瘍免疫システムに影響を与える分子メカニズムを解明することを目的として研究を実施した¹⁴⁾。

4. 動物倫理に関わる事項

本研究は鈴鹿医療科学大学実験動物の管理及び使用に関する指針の勧告に従って実施された。本研究で実施された全ての動物実験のプロトコールは鈴鹿医療科学大学動物実験倫理委員会(承認番号 75)または北海道大学実験動物管理局(承認番号 14-0039, 19-0035, 19-0065)によって承認された。すべての実験は動物の苦痛を最小限に抑えるよう努力して実施した。

5. 亜鉛による腫瘍発生頻度の低下

大腸がんに対する亜鉛の効果を調べるため、亜鉛含有量が異なる 3 種類の飼料で亜鉛摂取量をコントロールし、マウスに大腸がんを誘導する実験を実施した。マウスにアゾキシメタン(AOM)とデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を投与し、大腸がんを発生させ、飼料中の亜鉛含有量と大腸の腫瘍数、腫瘍面積の関連を観察した。その結果、飼料に亜鉛を 70 mg/kg 添加したマウス(通常亜鉛摂取群)と比較し、飼料に亜鉛を 1000 mg/kg 添加したマウス(高亜鉛摂取群)で腫瘍数が減少し、飼料中の亜鉛含有量を 5 mg/kg 以下に制限したマウス(亜鉛非添加群)では腫瘍数が増加した(Figure 1A)。腫瘍 1 個当たりの面積に大きな差は観察されなかった(Figure 1B)。

また、大腸がんの解析を行う際に採取した血清の亜鉛濃度を測定したところ、高亜鉛摂取群のマウスは他の群と比較して血清の亜鉛濃度が高かった (Figure 2)。これらの結果から、亜鉛は AOM と DSS によって誘導される大腸がんの発生頻度を減少させることが示唆された。

6. T 細胞除去による亜鉛の腫瘍抑制効果の低下

亜鉛の大腸がん抑制効果に T 細胞やナチュラルキラー (NK) 細胞が関わっているかどうかを検討するため、抗体を用いて T 細胞あるいは NK 細胞を除去した状態で

AOM と DSS による大腸がんをマウスに誘導した。細胞を除去しない場合では通常亜鉛摂取群と比較して高亜鉛摂取群はマウス 1 匹あたりの腫瘍数が有意に少なくなるという結果であった。しかし、T 細胞を除去した状態で AOM と DSS による大腸がんを誘導すると、通常亜鉛摂取群と比較して高亜鉛摂取群でマウス 1 匹あたりの腫瘍数が少なくなることが観察されなかった (Figure 3A)。NK 細胞を除去した場合は細胞を除去しない場合と同様の傾向を示した (Figure 3B)。これらの結果から、亜鉛の大腸がん抑制効果には少なくとも T 細胞が関与している可能性が示された。

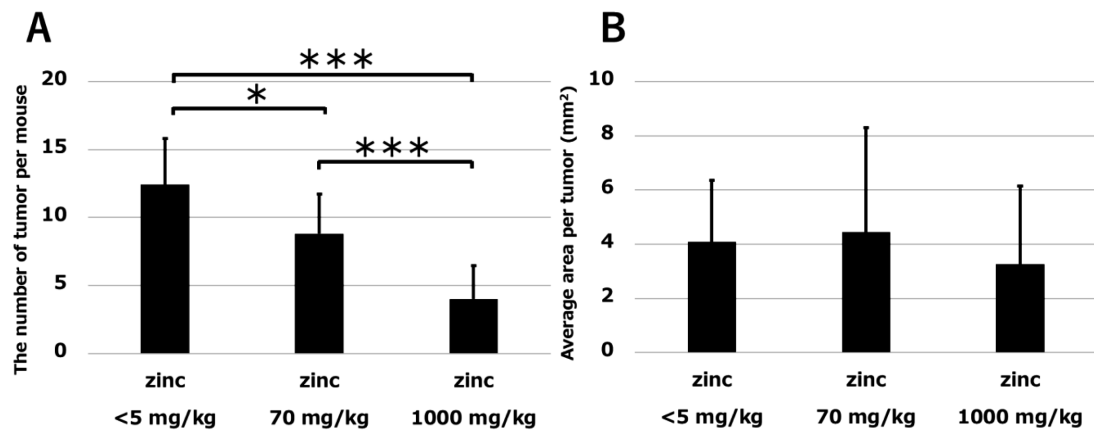


Figure 1

Effect of zinc administration on colon cancer induced by azoxymethane (AOM) and dextran sodium sulfate (DSS). (A) The number of tumors per mouse; (B) average area per tumor (bar: SD; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; Tukey's HSD test).

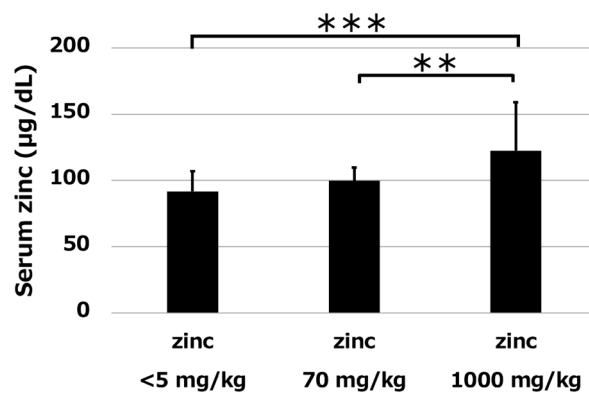


Figure 2

Effect of zinc administration on serum zinc concentrations on colorectal cancer induced by azoxymethane (AOM) and dextran sodium sulfate (DSS) (bar: SD; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; Tukey's HSD test).

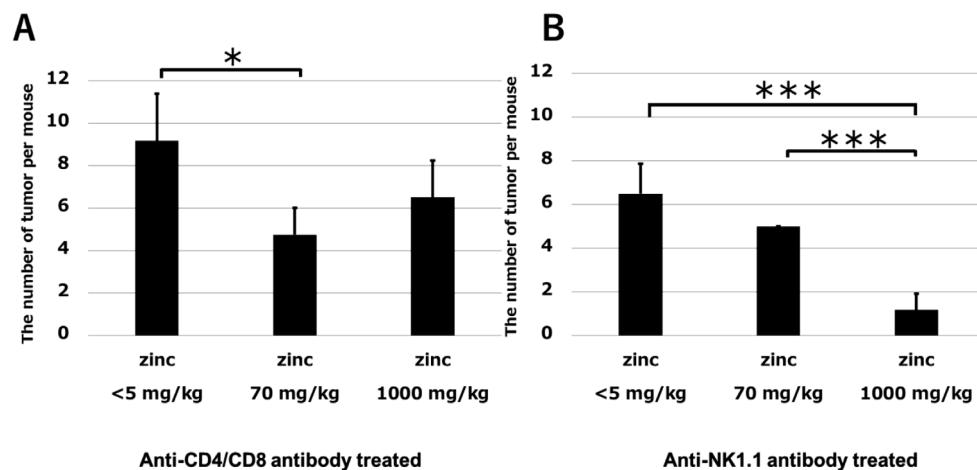


Figure 3

Effect of anti-CD4/CD8 antibody and zinc administration or anti-NK1.1 antibody and zinc administration on colon cancer induced by azoxymethane (AOM) and dextran sodium sulfate (DSS). (A) The number of tumors per mouse (anti-CD4/CD8 antibody administration); (B) The number of tumors per mouse (anti-NK1.1 antibody administration) (bar: SD; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; Tukey's HSD test).

7. 亜鉛のグランザイム B 転写促進作用

亜鉛は GATA Binding Protein 3 (*GATA3*) の発現を増加させることにより NK 細胞の分化増殖を誘導することが示されており¹⁵⁾、亜鉛は免疫担当細胞の分化増殖に関わっていると考えられる。今回の研究では T 細胞を除去したことにより亜鉛の腫瘍抑制効果が一部観察されなくなったことから、免疫担当細胞の分化増殖促進による亜鉛の腫瘍免疫に対する効果を検討した。はじめに、我々は 1 日 0.3 mg の亜鉛を 7 日間経口投与したマウスでコントロール群と比較して免疫担当細胞の分化増殖に変化があるかどうか観察した。マウス脾臓中の T 細胞、NK 細胞、B 細胞、1 型樹状細胞、2 型樹状細胞などの免疫担当細胞の割合をフローサイトメトリーで解析したところ、亜鉛の追加摂取によって分化増殖に変化が起こる免疫担当細胞は認められなかった (Data not shown)。*GATA3* はヒト及びマウスにおいて免疫担当細胞の分化増殖に重要な転写因子であるが¹⁶⁾、ヒトとマウスでは *GATA3* の亜鉛要求性に差がある可能性があり、今回の実験ではマウスにおいて亜鉛が NK 細胞の分化増殖に影響を与えなかったと考えられる。

亜鉛は T 細胞の補助受容体である CD4 や CD8 がチロシinkinase Lck と会合するときに必須の分子であり、

T 細胞などの免疫担当細胞の機能発現に重要な役割を果たすことが示されている¹⁷⁾。今回の研究では、亜鉛が免疫担当細胞の分化増殖に影響を与えなかったことから、亜鉛は免疫担当細胞の分化増殖ではなく免疫担当細胞の機能を変化させるのではないかと考え、亜鉛追加摂取による免疫担当細胞の機能の変化を観察した。1 日 0.3 mg の亜鉛を 7 日間経口投与したマウスの脾臓から細胞を取り出し、抗 CD3/CD28 抗体で T 細胞に抗原刺激を与え、インターフェロン γ (IFN- γ)、インターロイキン 2 (IL-2)、インターロイキン 4 (IL-4)、グランザイム B などのエフェクター分子の転写量を解析した。その結果、コントロール群と比較して亜鉛を追加摂取した群ではグランザイム B の転写量が有意に高かった (Figure 4)。IFN- γ 、IL-2、IL-4 の転写量に大きな変化は観察されなかった (Data not shown)。また、亜鉛摂取量をコントロールしていないマウスの脾臓から取り出した細胞の培養液に硫酸亜鉛を添加し同様に抗原刺激を与えると、硫酸亜鉛の用量依存的にグランザイム B 転写量が増加した (Figure 5A)。さらに、亜鉛キレート剤の N, N, N', N'- (2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN) を添加するとグランザイム B 転写量の低下が観察された (Figure 5B)。グランザイム B は細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞などによって放出されるセリンプロテアーゼであり、これらの細

胞の細胞傷害活性の発現に重要な役割を果たす分子である。グランザイム B は細胞のパイロトーシスに関わるガスダーミン E を活性化することにより腫瘍抑制に関与することが示されており^{18, 19)}、腫瘍免疫においても重要な役割を果たすことが知られている。また、グランザイム B は positron emission tomography (PET) による測定で抗 PD-1 療法などのがん免疫療法における治療応答性の初期バイオマーカーとして利用できる可能性が示されるなど²⁰⁾、細胞傷害性 T 細胞の抗腫瘍活性と相関する分子である。我々は亜鉛の投与により脾臓から取り出した細胞に含まれる T 細胞のグランザイム B 転写活性化が促進

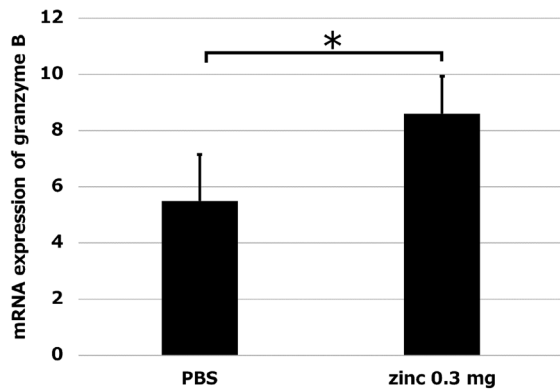


Figure 4
Effect of zinc on granzyme B transcript levels in antigen-stimulated T cells (bar: SD; * $p < 0.05$; two-tailed Student's t-test).

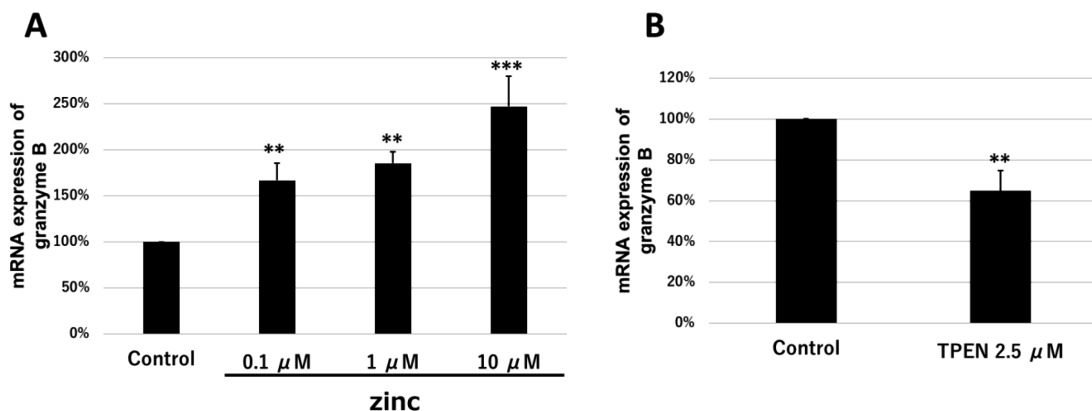


Figure 5
Effect of zinc on granzyme B transcript levels in antigen-stimulated T cells. (A) mRNA expression of granzyme B when zinc sulfate was added; (B) mRNA expression of granzyme B when 2.5 μ M N, N, N', N'-(2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN) was added (bar: SD; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; Tukey's HSD test).

されることを示した。このことから、亜鉛は細胞傷害性 T 細胞のグランザイム B の転写量を増加させることにより腫瘍抑制に関与していることが示唆された。

8. 亜鉛のグランザイム B 転写促進効果の解析

亜鉛は細胞傷害性 T 細胞のグランザイム B 転写量を増加させることで腫瘍抑制に関与していることが示唆された。そこで我々は、亜鉛がグランザイム B の転写量をどのように増加させているか検討した。カルシニューリンの阻害剤であるシクロスポリン A をマウスの脾臓から取り出した細胞の培養液に添加し、前項と同様に抗原刺激を与えたところ、グランザイム B 転写量が抑制された (Figure 6A)。また、硫酸亜鉛とシクロスポリン A を同時に添加すると、亜鉛によるグランザイム B 転写量の増加を打ち消す結果となった (Figure 6B)。カルシニューリンは亜鉛含有酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) により、活性酸素種による不活性化から保護されることが示されており²¹⁾、亜鉛は SOD を介してカルシニューリンの活性を維持している可能性がある。このことから、亜鉛は細胞傷害性 T 細胞のグランザイム B 転写量を、カルシニューリンを介する経路で活性化していることが示唆された。

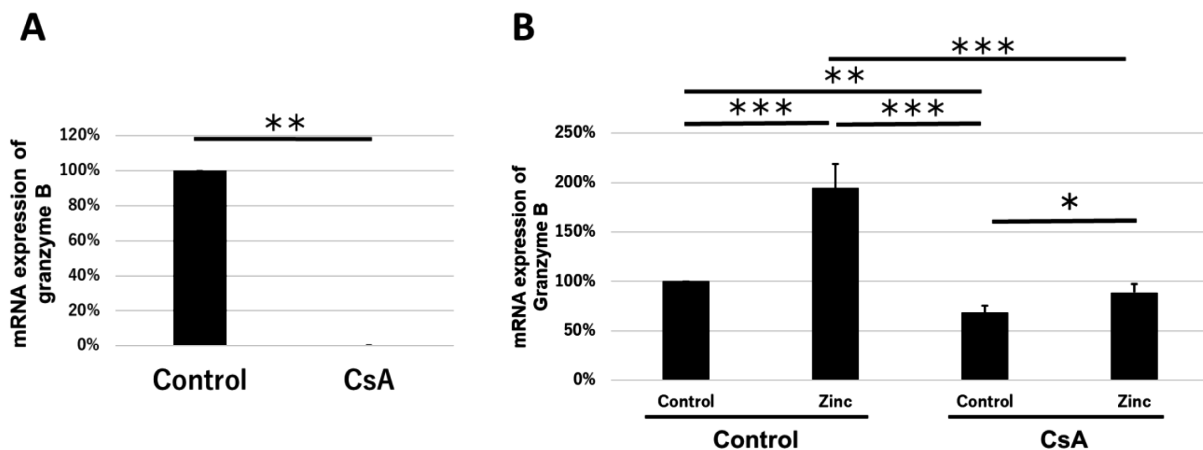


Figure 6

Effect of ciclosporin A (CsA) or CsA and zinc on granzyme B transcript levels in antigen-stimulated T cells. (A) mRNA expression of granzyme B when 0.1 μ M CsA was added (bar: SD; ** $p < 0.01$; two-tailed Student's t-test); (B) mRNA expression of granzyme B when 10 nM CsA and 1 μ M zinc sulfate was added (bar: SD; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; Tukey's HSD test).

9. 全体を通しての考察

本研究の結果から、亜鉛は細胞傷害性 T 細胞のグランザイム B 転写量を増加させ、その機能を活性化させることで腫瘍抑制に関与している可能性が示された。また、亜鉛が細胞傷害性 T 細胞のグランザイム B 転写量を増加させる際にカルシニューリンを介する経路が関与している可能性も示された。しかし、T 細胞を除去した状態で大腸がんを誘導すると、通常亜鉛摂取群と比較して、高亜鉛摂取群で亜鉛の腫瘍抑制効果が観察されなかったのに対し、亜鉛非添加群では T 細胞を除去しなかった場合と同様に亜鉛による腫瘍抑制効果が観察された。よって、亜鉛の腫瘍抑制効果には少なくとも T 細胞が関わっていると考えられた。今回の研究では亜鉛非添加群の飼料で完全に亜鉛を除去できず、5 mg/kg 未満の亜鉛が飼料中に含有されていた。また、亜鉛摂取量を制限することにより腸管から腸細胞内に亜鉛を運搬する Zrt, Irt-like protein 4 (zip4) の発現が増加することが示されていることから²²⁾、今回の亜鉛非添加群のマウスにおいて、血清中の亜鉛濃度が維持された可能性がある。今回使用したマウスの糞便中の亜鉛含有量は亜鉛摂取量と相関していたため (Data not shown)、血清だけではなく様々な臓器や体液中の亜鉛含有量を測定し検討する必要がある。ま

た、亜鉛の腫瘍抑制効果には他の機序も存在する可能性がある。他の機序として、亜鉛は G protein-coupled receptor 39 (GPR39) を介して腸管バリアの完全性の維持に関与することが示されており²³⁾、亜鉛の大腸がん抑制効果には GPR39 も関与している可能性がある。また、大腸がんにおいて、亜鉛トランスポーターのひとつである Zrt, Irt-like protein 7 (zip7) の発現ががん細胞で高まると予後が悪化するとの報告があり²⁴⁾、亜鉛トランスポーターとの関わりも検討する必要がある。このように、亜鉛の大腸がん抑制効果については、本研究のみでは完全に記述することは出来ず、GPR39 の関与など他の機序も含めてさらに発展させていく必要がある。

結論として、本研究により亜鉛の大腸がん抑制効果に関して、そのメカニズムの一端が明らかとなった。耐用上限量を超えない範囲で、亜鉛を適切に摂取することにより腫瘍免疫を高め、がんの予防に役立つ可能性が示された。

参考文献

- 1) Muhamed, P.K. and S. Vadstrup, [Zinc is the most important trace element]. Ugeskr Laeger, 2014. **176**(5).
- 2) Prasad, A.S., *Clinical and biochemical manifestations*

- of zinc deficiency in human subjects*. J Am Coll Nutr, 1985. **4**(1): p. 65-72.
- 3) Reddy, S.S., U.R. Addi, R. Pullakhandam, and G.B. Reddy, *Dietary zinc deficiency disrupts skeletal muscle proteostasis and mitochondrial biology in rats*. Nutrition, 2022. **98**: p. 111625.
- 4) 厚生労働省, 国民健康・栄養調査. 2019.
- 5) 日本臨床栄養学会, 亜鉛欠乏症の診療指針 2018. 2018.
- 6) Kan, Y., J. Nagai, and Y. Uesawa, *Evaluation of antibiotic-induced taste and smell disorders using the FDA adverse event reporting system database*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 9625.
- 7) Matsuyama, H., K. Matsuura, H. Ishikawa, Y. Hirata, N. Kato, A. Niwa, et al., *Correlation between Serum Zinc Levels and Levodopa in Parkinson's Disease*. Nutrients, 2021. **13**(11).
- 8) Lazzerini, M. and H. Wanzira, *Oral zinc for treating diarrhoea in children*. Cochrane Database Syst Rev, 2016. **12**(12): p. CD005436.
- 9) Yasui, Y., H. Yasui, K. Suzuki, T. Saitou, Y. Yamamoto, T. Ishizaka, et al., *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, 2020. **100**: p. 230-236.
- 10) Ekemen Keles, Y., D. Yilmaz Ciftcioglu, A. Colak, A. Kara Aksay, G. Ustundag, A. Sahin, et al., *Serum zinc levels in pediatric patients with COVID-19*. Eur J Pediatr, 2022. **181**(4): p. 1575-1584.
- 11) Gyorkey, F., K.W. Min, J.A. Huff, and P. Gyorkey, *Zinc and magnesium in human prostate gland: normal, hyperplastic, and neoplastic*. Cancer Res, 1967. **27**(8): p. 1348-53.
- 12) Ozeki, I., T. Nakajima, H. Suii, R. Tatsumi, M. Yamaguchi, T. Arakawa, et al., *Predictors of hepatocellular carcinoma after hepatitis C virus eradication following direct-acting antiviral treatment: relationship with serum zinc*. J Clin Biochem Nutr, 2020. **66**(3): p. 245-252.
- 13) Epstein, M.M., J.L. Kasperzyk, O. Andren, E.L. Giovannucci, A. Wolk, N. Hakansson, et al., *Dietary zinc and prostate cancer survival in a Swedish cohort*. Am J Clin Nutr, 2011. **93**(3): p. 586-93.
- 14) Nakagawa, N., Y. Fujisawa, H. Xiang, H. Kitamura, and K. Nishida, *Inhibitory Effect of Zinc on Colorectal Cancer by Granzyme B Transcriptional Regulation in Cytotoxic T Cells*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(11).
- 15) Muzzioli, M., R. Stecconi, A. Donnini, F. Re, and M. Provinciali, *Zinc improves the development of human CD34+ cell progenitors towards Natural Killer cells and induces the expression of GATA-3 transcription factor*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(5): p. 955-65.
- 16) Oosterwegel, M., J. Timmerman, J. Leiden, and H. Clevers, *Expression of GATA-3 during lymphocyte differentiation and mouse embryogenesis*. Dev Immunol, 1992. **3**(1): p. 1-11.
- 17) Kim, P.W., Z.Y. Sun, S.C. Blacklow, G. Wagner, and M.J. Eck, *A zinc clasp structure tethers Lck to T cell coreceptors CD4 and CD8*. Science, 2003. **301**(5640): p. 1725-8.
- 18) Liu, Y., Y. Fang, X. Chen, Z. Wang, X. Liang, T. Zhang, et al., *Gasdermin E-mediated target cell pyroptosis by CAR T cells triggers cytokine release syndrome*. Sci Immunol, 2020. **5**(43).
- 19) Zhang, Z., Y. Zhang, S. Xia, Q. Kong, S. Li, X. Liu, et al., *Gasdermin E suppresses tumour growth by activating anti-tumour immunity*. Nature, 2020. **579**(7799): p. 415-420.
- 20) Larimer, B.M., E. Wehrenberg-Klee, F. Dubois, A. Mehta, T. Kalomeris, K. Flaherty, et al., *Granzyme B PET Imaging as a Predictive Biomarker of Immunotherapy Response*. Cancer Res, 2017. **77**(9): p. 2318-2327.
- 21) Volkel, H., M. Scholz, J. Link, M. Selzle, P. Werner, R. Tunnemann, et al., *Superoxide dismutase mutations of familial amyotrophic lateral sclerosis and the oxidative inactivation of calcineurin*. FEBS Lett, 2001. **503**(2-3): p.

201-5.

- 22) Cousins, R.J., *Gastrointestinal factors influencing zinc absorption and homeostasis*. Int J Vitam Nutr Res, 2010. **80**(4-5): p. 243-8.
- 23) Xia, P., L. Yan, X. Ji, Y. Wu, S. Lian, and G. Zhu, *Functions of the Zinc-Sensing Receptor GPR39 in Regulating Intestinal Health in Animals*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(20).
- 24) Luo, Y., Y. Shen, Z. Ju, and Z. Zhang, *ZIP7 (SLC39A7) expression in colorectal cancer and its correlation with clinical prognosis*. Transl Cancer Res, 2020. **9**(10): p. 6471-6478.

— プロフィール —

中川 直也 鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科・助手
博士（薬学）

〔経歴〕2020年鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科卒業，
2024年鈴鹿医療科学大学大学院薬学研究科博士課程
修了，2024年より現職。〔専門〕薬学，免疫学，分子細
胞生物学。

西田 圭吾 鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科・教授
博士（医学）

〔経歴〕2001年大阪大学大学院医学系研究科博士課程修
了，2001年日本学術振興会特別研究員（PD），2002年
独立行政法人 理化学研究所横浜研究所免疫・アレルギー
科学総合研究センター上級研究員，2014年鈴鹿医
療科学大学薬学部薬学科・准教授，2020年より現職。
〔専門〕免疫学，医学，薬学。

Research on the Inhibitory Effect of Zinc on Colorectal Cancer

Naoya NAKAGAWA, Keigo NISHIDA

Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Suzuka University of Medical Science

Key words: zinc, colorectal cancer, granzyme B, cytotoxic T cells, tumor immunity

Abstract

Zinc is one of the essential trace elements and is involved in various biological reactions. Zinc deficiency is known to reduce immunity, but the mechanism is not fully understood. The aim of this study was to elucidate the role of zinc in tumor immunity and its mechanisms. Mice with controlled zinc intake were treated with azoxymethane (AOM) and dextran sodium sulfate (DSS) to develop colorectal cancers, and we have shown that zinc exerts its tumor suppressive effect. In addition to this, we found that inhibitory effect of zinc was dependent on T cells. Using the spleens of mice, we analyzed how the function of immunocompetent cells in the spleen was altered by zinc, and found that zinc increased the transcription of granzyme B, which is released by cytotoxic T cells and natural killer cells when they recognize an antigen. Thus, this study indicates that adequate intake of zinc may be useful in the prevention of cancer.