

令和元年6月25日現在

機関番号：34104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15152

研究課題名（和文）マスト細胞放出亜鉛の創傷治癒における役割解明

研究課題名（英文）Elucidation of the roles of zinc released from mast cells in wound healing

研究代表者

西田 圭吾（NISHIDA, KEIGO）

鈴鹿医療科学大学・薬学部・准教授

研究者番号：80360618

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：マスト細胞の顆粒中には亜鉛が豊富に含まれていることが報告されており、脱顆粒に伴って細胞外に放出されることが知られている。しかし、その役割とメカニズムについては明らかにされていなかった。そこで、マスト細胞顆粒中へ亜鉛を取り込む機構、そして細胞外に放出された亜鉛の役割解明を目的とした。

本研究においてマスト細胞における顆粒内への亜鉛取り込みに関与している分子として亜鉛トランスポーターZnT2の同定に成功した。ZnT2欠損マスト細胞では刺激依存的な放出亜鉛が観察されず、またZnT2KOマウスでは皮膚創傷治癒の遅延が生じた。

以上、本研究によりマスト細胞から放出される亜鉛の生理的意義を初めて示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

亜鉛補充療法が有効な疾患がいくつか知られている。例えば、長期入院患者や在宅で介護を受けている老人においてしばしば観察される褥瘡などである。しかしながら、皮膚における創傷治癒において、亜鉛の作用機序に関しては十分に理解されていないのが現状である。今回の研究結果より、マスト細胞からの放出亜鉛が皮膚創傷治癒の炎症相を制御している可能性を示した。以上の知見は、亜鉛を用いた効率の良い治療法の開発や入院患者で問題となっている褥瘡の予防・治療に役立つ可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Mast cell granules contain high levels of zinc which is released upon degranulation. However, its physiological roles and the mechanism of release have not been clear. Therefore, we aimed to elucidate the mechanism of zinc uptake into mast cell granules and the role of extracellularly released zinc.

We identified the zinc transporter ZnT2 as a molecule involved in intragranular uptake of zinc in mast cells. In ZnT2-deficient mast cells, stimulation-dependent zinc release was not observed. Knocking ZnT2 in mice caused delayed wound healing. Overall, we showed a new physiological significance of zinc released from mast cells.

研究分野：免疫学

キーワード：亜鉛 皮膚創傷治癒 マスト細胞 亜鉛トランスポーター サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

亜鉛はわれわれの生存に欠くことのできない必須微量金属元素であり、亜鉛欠乏によって総亜鉛量の維持が破綻した場合には生体内で障害が起こることが明らかになっている。これら亜鉛欠乏症としては、皮膚炎や味覚異常、成長不全などが起こることが知られている。しかしながら亜鉛欠乏症の病態メカニズムに関しては十分に理解されていない。

1960年代に、マスト細胞顆粒内に亜鉛が豊富に存在することが観察されている。また、これら顆粒内に存在する亜鉛が細胞の活性化に伴い細胞外に放出されることも示されている。しかしながら、これらマスト細胞顆粒内亜鉛の役割や放出された亜鉛の生体での特に、皮膚創傷治癒に対する影響に関しては不明である。

2. 研究の目的

本研究では、マスト細胞内顆粒に亜鉛が豊富にたくわえられており、刺激によって細胞外に放出されるという報告から、マスト細胞内の顆粒膜に発現する亜鉛トランスポーターの同定を試みる。さらに、マスト細胞顆粒内亜鉛及び放出亜鉛を特異的に欠損するマウスを樹立することにより、これらマスト細胞から放出された亜鉛と皮膚創傷治癒との関係を明らかとすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マスト細胞からの亜鉛放出機構の解明

マスト細胞にはヒスタミンなどのケミカルメディエーターを含有する顆粒を有しており、顆粒中には亜鉛が豊富に含まれている。これらのことからマスト細胞の活性化に伴い、亜鉛が細胞外に放出される可能性を考えた。これらの仮説を実験的に証明するために、培養マスト細胞を調整し、マスト細胞で高発現している亜鉛トランスポーター、ZnT2 に対する抗体で免疫電子顕微鏡法を実施する。また、ZnT2 遺伝子ノックアウトマストからマスト細胞を調整し、顆粒内亜鉛量を誘導結合プラズマ発光分析 (ICP-AES) にて測定する。

(2) 皮膚創傷治癒モデルにおける亜鉛トランスポーター ZnT2 の役割

亜鉛トランスポーター、ZnT2 の皮膚創傷治癒における役割を明らかにする目的で、ZnT2 遺伝子ノックアウトマウスを用いて、創傷治癒モデル実験を実施した。皮膚創傷治癒モデルはマウスの皮膚に生検トレパンで傷を施し、経時的に傷口の面積を計測することで評価した。また、皮膚創傷治癒過程に関与しているサイトカインの転写活性化を検討するために、創傷を施した ZnT2 遺伝子ノックアウトマストとコントロールマウスから皮膚サンプルをそれぞれ採取し、リアルタイム PCR によりサイトカインの転写活性化を測定した。

(3) 樹状細胞・マクロファージ・繊維芽細胞における亜鉛刺激依存的なサイトカインの誘導

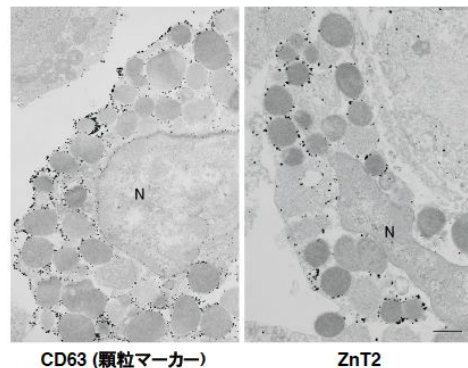
マスト細胞から放出された亜鉛の皮膚炎症関連細胞に対する影響を検討するために、樹状細胞、マクロファージ、繊維芽細胞を用いて、亜鉛刺激依存的なサイトカインの測定を実施した。それぞれ調整したマウス由来樹状細胞、マクロファージ (Raw264.7) 線維芽細胞に、亜鉛を添加した際のサイトカイン放出および、転写への影響を ELISA 及びリアルタイム PCR によって調べた。

4. 研究成果

(1) マスト細胞からの刺激依存的な亜鉛放出は亜鉛トランスポーター、ZnT2 が必要である。

マスト細胞で高発現していた亜鉛トランスポーター、ZnT2 に対する抗体を用いて、免疫電子顕微鏡法を実施したところ、ZnT2 はマスト細胞内顆粒膜に発現していることが判明した(図1)。また、ZnT2 遺伝子ノックアウトマウス由来のマスト細胞では顆粒亜鉛が消失しており、刺激依存的な放出亜鉛も観察されなかった。以上のことから、亜鉛トランスポーター、ZnT2 がマスト細胞内顆粒亜鉛の蓄積と、活性化に伴う亜鉛放出に必須の分子であることが示された。

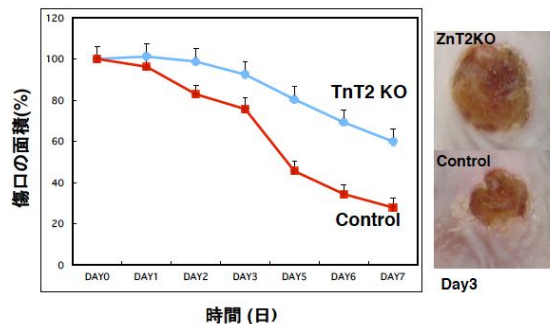
図1、ZnT2はマスト細胞顆粒膜に発現している



(2) 創傷治癒の過程に、亜鉛トランスポーター、ZnT2 が関与している。

マスト細胞顆粒亜鉛蓄積に関与していることが示された ZnT2 遺伝子ノックアウトマウスを用いて、創傷治癒モデルに関して検討を行った。その結果、ZnT2 が皮膚の治癒過程に関与している知見が得られた(図2)。さらに、ZnT2 遺伝子ノックアウトマウスで観察された皮膚創傷治癒の遅延が炎症期にかかわっているか検討するために、皮膚組織におけるサイトカイン活性化の測定を試みた。IL-6 は受傷後の早期で活性化され、血管透過性の亢進、炎症性細胞の遊走を促進する皮膚創傷治癒過程において重要なサイトカインの一つである。マウスに受傷後、1日目の傷周辺の IL-6 転写活性化の定量を実施したところ、ZnT2 遺伝子ノックアウトマウスにおいて、有意に低下していることが示された。以上のことから、マスト細胞の放出亜鉛が皮膚創傷治癒の炎症期 IL-6 の産生に関与していることが示唆された。

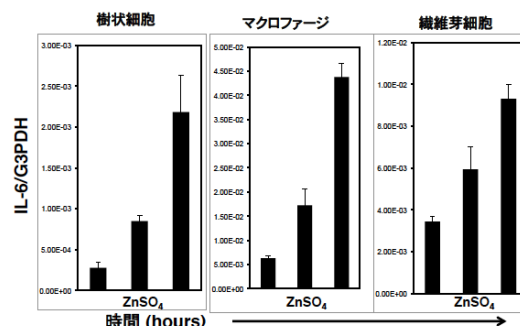
図2、亜鉛トランスポーターZnT2はマウスの創傷治癒に関与している



(3) 亜鉛は皮膚炎症関連細胞に作用して炎症性サイトカインを誘導する。

亜鉛刺激によって、樹状細胞、マクロファージ、線維芽細胞の IL-6 の転写率が上昇した(図3)。また、マクロファージを用いた実験より、亜鉛刺激により 12 時間後まで炎症性サイトカインである IL-6 や TNF- α 量が上昇し、24 時間後には未刺激時まで低下した。加えて亜鉛刺激によるサイトカイン産生のメカニズムを検証するために、亜鉛受容体である G タンパク質共役型受容体 39(GPR39)との関係を siRNA による GPR39 のノックダウン実験により調べたところ、線維芽細胞の GPR39 をノックダウンし、亜鉛刺激を行った結果、IL-6 の転写率がコントロールに比べて有意に低下することが確認できた。以上のことから、亜鉛は亜鉛受容体 GPR39 を介して、樹状細胞、マクロファージ、線維芽細胞からのサイトカイン産生を調節していることが明らかとなった。

図3、亜鉛は樹状細胞、マクロファージ、線維芽細胞のサイトカイン転写を活性化する



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

Uchida R, Xiang H, Arai H, Kitamura H, and Nishida K. L-type calcium channel-mediated Zinc wave is involved in the regulation of IL-6 by stimulating non-IgE with LPS and IL-33 in mast cells and dendritic cells. *Biol. Pharm. Bull.* 42:87-93, 2019. DOI: 10.1248/bpb.b18-00565.

Uchida R, Egawa T, Fujita Y, Furuta K, Taguchi H, Tanaka S, and Nishida K. Identification of the minimal region of peptide derived from ADP-ribosylation factor1 (ARF1) that inhibits IgE-mediated mast cell activation. *Molecular Immunology*. 105:32-37, 2019. DOI:10.1016/j.molimm.2018.11.002.

Fujita Y, Uchida R, Nishida K, Taguchi H. Characterization of Toll-like Receptor 7/8 Agonist Amino Acid for Antigen-Adjuvant Conjugation Co-delivery System. *Journal of Targeted Drug Delivery*. 1:1-3 2018.

Nishida K and Uchida R, Role of zinc signaling in the regulation of mast cell-, basophil- and T cell-mediated allergic responses. *Journal of Immunology Research*. 2018, 5749120, 2018 DOI: 10.1155/2018/5749120.

西田圭吾、内田亮太、亜鉛による皮膚創傷治癒の制御機構、*ファルマシア*、54:675-679、2018 DOI:https://doi.org/10.14894/faruawpsj.54.7_675

西田圭吾、内田亮太、マスト細胞からの亜鉛による皮膚創傷治癒の制御機構、*臨床免疫・アレルギー科*、69:264-270、2018

Oikawa H, Miyazaki S, Nishida K, Zhang W, Hirata T, Hosoo S, Yamaguchi Y, Yamasaki H, Nishida S, Fujikawa T. Promotion of osteoblastic Ca²⁺ accumulation by Eucommia leaf extract. *Global Drug and Therapeutics*. 3:1-6 2017. DOI: 10.15761/GDT.1000S2002
Takai Y, Hiramoto K, Nishimura Y, Uchida R, Nishida K* and Ooi K*. Association between itching and the serum zinc levels in patients with varicose veins. *Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences*. 3:24, 2017. DOI: 10.1186/s40780-017-0092-9
*, equal corresponding

Nishida K and Uchida R, Regulatory mechanism of mast cell activation by zinc signaling, *YAKUGAKU ZASSHI*, 137(5):495-501, 2017 DOI: 10.1248/yakushi.16-00239-1

Nishida K and Kashiwakura JI, Frontiers in Researches of Allergy, *YAKUGAKU ZASSHI*, 137(5):493-494, 2017 DOI: 10.1248/yakushi.16-00239-F

Ugajin T, Shibama S, Nishida K, and Yokozeki H. Metallothioneins are required for human basophil interleukin-4 gene induction via Fc ϵ R stimulation. *Allergology International*. 65:466-468, 2016. doi:10.1016/j.alit.2016.03.005

Yasuda T, Fukada T, Nishida K, Nakayama M, Matsuda M, Miura I, Dainichi T, Fukuda S, Kabashima K, Nakaoka S, Bin BH, Kubo M, Ohno H, Hasegawa T, Ohara O, Koseki H, Wakana S, and Yoshida H. Hyperactivation of JAK1 tyrosine kinase induces stepwise, progressive pruritic dermatitis. *J. Clin. Invest.* 126:2064-2076, 2016. doi:10.1172/JCI82887.

Fujita Y, Hirai K, Nishida K, Taguchi H. 6-(4-Amino-2-butyl-imidazoquinolyl)-norleucine: Toll-like Receptor 7 and 8 Agonist Amino Acid for Self-Adjuvanting

Peptide Vaccine. *Amino Acids*. 48:1319-1329,2016. doi:10.1007/s00726-016-2190-7
西田圭吾、内田亮太、皮膚創傷治癒における亜鉛：亜鉛トランスポーターの役割、内分泌・
糖尿病・代謝内科、43:121-127、2016

〔学会発表〕(計 15 件)

内田亮太、西田圭吾、(一般講演、口頭)、第 6 回 メタロミクス研究フォーラム プラズマ分光分析研究会 第 104 回講演会、TLR およびサイトカイン受容体シグナル経路における亜鉛ウェーブの役割、東京薬科大学、11 月 1-2 日 2018 年

内田亮太、西田圭吾、(一般講演、口頭)、第 64 回 日本薬学会東海支部会総会・大会、亜鉛は亜鉛受容体 GPR39 を介してサイトカイン産生を促すはたらきを持つ、金城学院大学、6 月 30 日 2018 年

藤田快男、西田圭吾、田口博明(一般講演、口頭)、第 64 回 日本薬学会東海支部会総会・大会、二重標的化したペプチドワクチンの開発研究、金城学院大学、6 月 30 日 2018 年

高井靖、西村善幸、西田圭吾、大井一弥、下肢静脈瘤患者における掻痒は血清亜鉛の低下と関係する、医療薬学フォーラム 2018 (東京)、6 月 23 日 2018 年

内田亮太、新井裕也、西田圭吾、Toll 様受容体およびサイトカイン受容体のシグナル経路における亜鉛ウェーブの役割、日本薬学会第 138 年会(金沢)、3 月 26 日 2018 年

内田亮太、西田圭吾、(一般講演、口頭)、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2017、亜鉛シグナルによる LPS 誘導性のサイトカイン転写制御、三重 鈴鹿 11 月 26 日 2017 年

鈴木宏治、佐藤英介、西田圭吾、西岡淳二、柑橘類「新姫」果実成分の生体機能に及ぼす効果の解析、第 15 回 日本機能性食品医学会 総会、東京慈恵会医科大学、9 日 12 月 2017 年

内田亮太、西田圭吾、(一般講演、口頭)、第 63 回 日本薬学会東海支部会総会・大会、L 型カルシウムチャネル遮断薬のサイトカイン産生抑制効果、岐阜薬科大学・岐阜大学医学部、7 月 9 日 2017 年

Kyosuke Inui, Junichi Kashiwakura, Keigo Nishida, Yuichi Sekine, Kodai Saitoh, Ryuta Muromoto, Yuichi Kitai, Akihiko Yoshimura, Kenji Oritani, Tadashi Matsuda, STAP-2 negatively controls FceRI-mediated mast cell activation、第 46 回日本免疫学会学術集会、仙台国際センター(仙台)、12 月 12 日-14 日 2017 年

内田亮太、西田圭吾、マスト細胞における ARF ペプチドの抗アレルギー効果の構造活性相関、日本薬学会第 137 年会(仙台)、3 月 26 日 2017 年

内田亮太、西田圭吾、(一般講演、口頭)、第 62 回 日本薬学会東海支部会総会・大会 細胞内亜鉛シグナルにおける亜鉛イオンのターゲット分子の検索、愛知学院大学楠元キャンパス、7 月 9 日 2016 年

藤田快男、平井一行、西田圭吾、田口博明(一般講演、口頭)、第 62 回 日本薬学会東海支部会総会・大会 TLR7/8 活性化能を有する免疫自己賦活型インフルエンザワクチンの開発、愛知学院大学楠元キャンパス、7 月 9 日 2016 年

藤田快男、平井一行、西田圭吾、田口博明、TLR7/8 を標的とした新規アミノ酸型アジュバント、第 9 回 次世代アジュバント研究会、千里ライフサイエンスセンター(大阪)、1 月 19 日 2016 年

西田圭吾、内田亮太、(シンポジウム、口頭)、第 65 回 日本アレルギー学会学術大会、マ

スト細胞から放出される亜鉛は皮膚創傷治癒に關与する、東京、6月17日、2016年
西田圭吾、(シンポジウム、口頭)、日本薬学会第136年会、亜鉛シグナルによるマスト細胞活性化調節機構、横浜、3月28日、2016年