

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790484

研究課題名（和文） 亜鉛シグナルによるサイトカイン産生制御機構の解析

研究課題名（英文） Identification of the role and molecular mechanism of Zn signal-mediated cytokine production

研究代表者

山崎 哲 (YAMASAKI SATORU)

独立行政法人理化学研究所・サイトカイン制御研究グループ・研究員

研究者番号：30392161

研究成果の概要（和文）：

申請者は以前の研究において、亜鉛ウェーブと名前を付けた抗原刺激依存的な細胞内亜鉛濃度上昇を見いだした。本研究では、亜鉛透過能を有する膜電位依存性L型カルシウムチャンネルが亜鉛ウェーブを制御することを明らかにした。さらに、マウスにおいてもL型カルシウムチャンネル阻害剤の塗布により接触性皮膚炎が抑制されたことから、このL型カルシウムチャンネルが新たなサイトカイン制御因子であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We have revealed the Zn wave, FcεRI-mediated intracellular Zn elevation upon antigen stimulation in mast cells. In this study, we further revealed that Zn-permeable voltage-gated L-type calcium channel (LTCC) is the channel for the Zn wave. In addition, LTCC-antagonist treatment suppressed the delayed-type hypersensitivity in mice, suggesting that LTCC might be the novel regulator for the cytokine production in mast cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：サイトカイン産生、亜鉛ウェーブ、マスト細胞、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

亜鉛は我々の生存に不可欠の必須微量元素であり、亜鉛の恒常性の破綻により、免疫不

全・炎症性皮膚炎・成長不全・生殖能低下などの障害が生じることが報告されている。

亜鉛は、酵素の活性部位形成や zinc finger などの転写因子などの立体構造維持の構成

因子としての機能が良く知られているが、近年、細胞内で遊離状態の亜鉛の存在が明らかになるに従い、細胞間・細胞内シグナル伝達物質としての重要性が示唆されてきている (Hirano T et al., *Adv Immunol*, 2008; 97: 149-176)。

マスト細胞はアレルギー反応・自然免疫・自己免疫疾患などで役割を果たしている骨髄由来の顆粒細胞である。マスト細胞は、ヒスタミンなどの化学伝達物質を貯蔵した顆粒を有しており、さらにその顆粒中には亜鉛が蓄積していることが明らかになっている。しかしながら、顆粒中の亜鉛の役割やマスト細胞の活性化における亜鉛の重要性については明らかになっていなかった。これまでに当研究室では、亜鉛の選択的キレート剤 TPEN が脱顆粒反応とサイトカイン産生の両方が抑制することを明らかにした。(Kabu K et al., *J Immunol*, 2006; 177: 1296-1305)。さらに、脱顆粒反応においては亜鉛依存的な顆粒の細胞膜移行の制御を明らかにし(Nishida et al., *J Immunol*. 2011; 187: 932-41.)、炎症性サイトカイン産生のシグナル伝達の調節に亜鉛トランスポーター ZnT5 が役割を果たしていることを明らかにした (Nishida et al., *J Exp Med*. 2009; 206(6): 1351-64.)。当研究室では、これらの知見に加えて、マスト細胞内の亜鉛イオン濃度が刺激依存的に上昇する亜鉛ウェーブと名付けた現象を明らかにした。亜鉛ウェーブは、細胞内で発生してサイトカイン産生のシグナル伝達を調節する細胞内セカンドメッセンジャー (亜鉛シグナル) としての機能していることを見いだした(Yamasaki S et al., *J Cell Biol*, 2007; 177(4): 637-645)。

2. 研究の目的

免疫担当細胞であるマスト細胞のサイトカイン産生機構の解明は、われわれがアレルギー反応を制御する上で非常に重要な問題である。近年、マスト細胞において亜鉛が細胞内シグナル伝達物質 (亜鉛シグナル) として機能していることが示されたが、その制御機構や標的タンパク質は明らかになっていない。

そこで本研究では、亜鉛シグナルの制御機構を詳細に解析しサイトカイン産生機構を解明することで、従来とは異なるアレルギー治療法につながる新たな知見の獲得を目的とする。

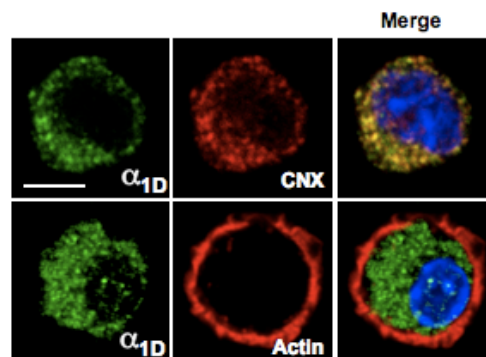
3. 研究の方法

本研究では、亜鉛シグナル依存的なマスト細胞サイトカイン産生機構の解明のために、以下の項目の達成を試みた。

- 1) 亜鉛シグナルの調節に関わるタンパク質を同定する。
- 2) 亜鉛シグナルの調節に関わるタンパク質の作用機構を解明する。
- 3) 亜鉛シグナルの標的タンパク質を同定する。
- 4) 生体の免疫反応における亜鉛シグナルの重要性を検討する。

4. 研究成果

亜鉛シグナルの調節には亜鉛透過型チャネルの関与が考えられたので、亜鉛透過性カルシウムチャネルである L 型カルシウムチャネルに着目した。L 型カルシウムチャネルのポアを形成する α_1 サブユニットのうち、Cav1.3 のポアを形成する α_{1D} の発現がマスト細胞で発現していることが明らかになった。そこで、このタンパク質の細胞内局在を検討したところ、細胞膜ではなく、ER マーカーと局在が一致していることが示された (図 1)。

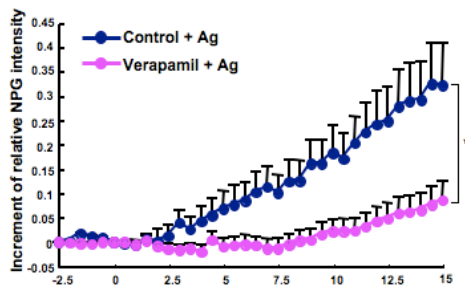


(図 1) α_{1D} は細胞膜上ではなく、主に ER 膜上で発現している。

同様の結果は、スクロース密度勾配実験法においても確認されたことから、マスト細胞において α_{1D} サブユニットは亜鉛ウェーブが発生する ER の膜上に発現していることが示唆された。

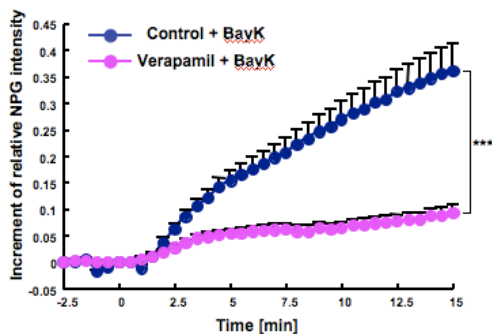
そこで、L 型カルシウムチャネルが亜鉛ウェーブの調節に関わっているかどうかを確かめるために、このチャネルの拮抗薬と誘導薬の効果を検討した。図 2 に示すように、抗原刺激依存的な亜鉛ウェーブは、拮抗薬

Verapamil 処理により抑制することが示された。



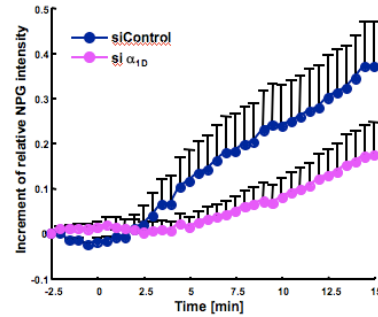
(図 2) L 型カルシウムチャネル拮抗薬 Verapamil の亜鉛ウエーブに対する効果

一方、誘導薬 BayK8644 処理により抗原刺激がなくても細胞内亜鉛濃度の上昇が見られた。この誘導薬による亜鉛の上昇は、拮抗薬前処理より消失し、また、カルシウム非含有反応液中でも見られたことから(図 3)、L 型カルシウムチャネルが、亜鉛ウエーブを発生させるタンパク質であることが示唆された。



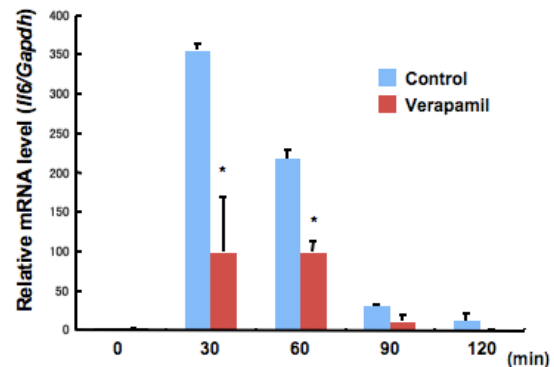
(図 3) L 型カルシウムチャネル誘導薬 BayK8644 処理による細胞内亜鉛濃度の変化

そこで、この仮説を検証する目的で、 α_{1D} サブユニットを siRNA でノックダウンした細胞で亜鉛ウエーブを検証した。二段階電気穿通法を用いてマスト細胞に siRNA を導入し、タンパク質の発現量をコントロールと比較して 70%抑制することに成功した。これらの細胞を用いて亜鉛ウエーブを測定した結果、抗原刺激依存的な亜鉛ウエーブが抑制していることが明らかになった(図 4)。

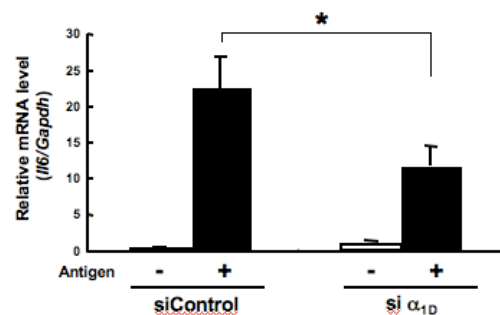


(図 4) α_{1D} サブユニット siRNA でノックダウン細胞での亜鉛ウエーブ

さらに、L 型カルシウムチャネル依存的な亜鉛ウエーブのマスト細胞活性化における役割を検討した。抗原刺激依存的なサイトカイン産生の低下が、Verapamil 処理細胞および α_{1D} サブユニットノックダウン細胞において見られた(図 5、6)。一方で、抗原刺激依存的な脱顆粒反応はどちらの細胞においてもコントロール細胞と同様の反応性を示した。このことから、亜鉛ウエーブはマスト細胞の活性化において炎症性のサイトカイン産生の制御に関わっていることが示唆された。



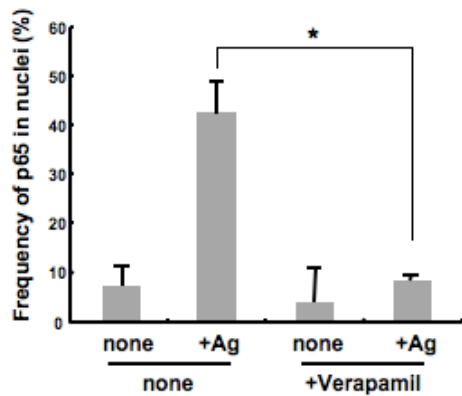
(図 5) 抗原刺激依存的な IL-6 誘導に対する Verapamil の効果



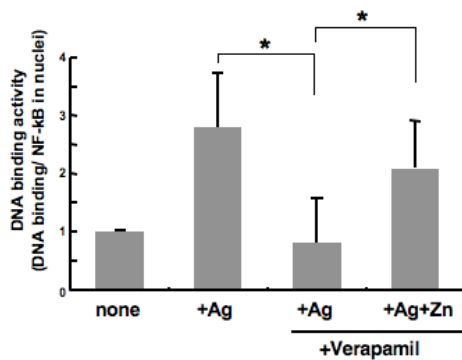
(図 6) 抗原刺激依存的な IL-6 誘導に対する α_{1D} サブユニットノックダウンの効果

NF- κ B 経路はマスト細胞のサイトカイン産

生に関わる主要な転写調節因子であることから、亜鉛ウエーブの標的が NF- κ B 経路に有ると仮説を立てた。NF- κ B の上流の因子 IKK および I κ B の活性化に差は見られなかった。しかしながら、Verapamil 処理細胞では NF- κ B の核内移行が減少していた(図 7)。さらに、NF- κ B の DNA 結合能を測定した結果、抗原刺激依存的に上昇した DNA 結合能が、Verapamil 処理細胞においては低下していた。この低下した DNA 結合能は亜鉛を追加すると回復することが明らかになった(図 8)。

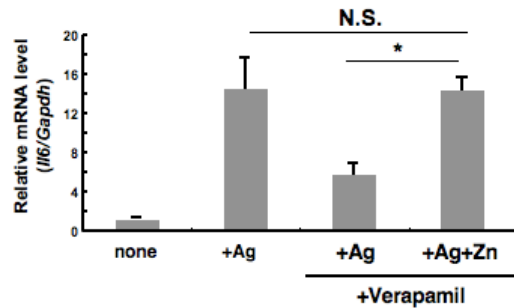


(図 7)抗原刺激依存的な NF- κ B の核以降に対する Verapamil の効果



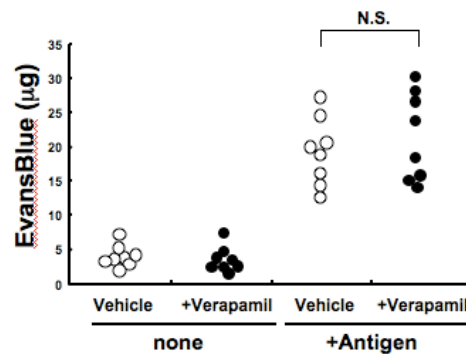
(図 8)核内 NF- κ B の DNA 結合能

この結果と一致して、Verapamil 処理によるサイトカイン産生が、亜鉛の添加により回復していることを確認した(図 9)。これらの結果は、L 型カルシウムチャネル依存的な亜鉛ウエーブがマスト細胞の炎症性サイトカイン産生の調節していることを示唆していた。



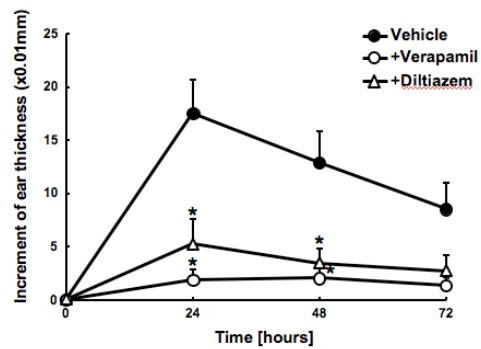
(図 9)抗原刺激依存的なサイトカイン産生

そこで、L 型カルシウムチャネル拮抗薬のアレルギ反応における効果を確認した。脱顆粒反応のマウス実験モデルであるアナフィラキシー反応は、Verapamil 塗布でも変化が見られなかった(図 10)。



(図 10)アナフィラキシー反応における Verapamil の効果

一方で炎症性サイトカインによる炎症反応のマウスモデルである接触性皮膚炎のモデルにおいては、Verapamil 塗布により炎症の抑制が見られた。同様の結果は他のカルシウム拮抗薬 Diltiazem を塗布した場合においても見られた。



(図 11)接触性過敏症における L 型カルシウムチャネル拮抗薬の効果

このように、L型カルシウムチャンネルが亜鉛ウェーブを調節しており、マスト細胞のサイトカイン産生で誘導されるアレルギー性炎症反応を惹起することを解明した。本研究で得られた成果により、従来とは異なるアレルギー治療法の開発が期待できると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① Yamasaki S et al., A novel role of the L-type calcium channel α_{1D} subunit as a gatekeeper for intracellular zinc signaling: Zinc wave., PLoS ONE, 2012 in Press. 10.1371/journal.pone.0039654 (査読あり)

[学会発表] (計3件)

① Yamasaki S, Nishida K, and Hirano T International Society for Zinc Biology 2012 Conference, 19 January 2012, Melbourne Australia. Zn signal in mast cell-mediated allergic inflammation

② 山崎 哲、西田圭吾、平野俊夫 第84回日本生化学会大会(招待講演), Sep 21 2011, 京都. マスト細胞活性化における細胞内亜鉛シグナルの役割

③ Yamasaki S, Nishida K, and Hirano T 14th International Congress of Immunology, 23 August 2010, Kobe, Japan. Zinc transporter Znt5/Slc30a5 is required for the mast cell-mediated delayed-type allergic reaction.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 哲 (YAMASAKI SATORU)

独立行政法人理化学研究所・サイトカイン制御研究グループ・研究員

研究者番号：30392161