

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24249028

研究課題名(和文)細胞内亜鉛シグナル解析と疾患との関連

研究課題名(英文)Characterization of intracellular Zn signaling and its relationship to diseases

研究代表者

平野 俊夫(Hirano, Toshio)

大阪大学・その他部局等・学長

研究者番号：40136718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,400,000円

研究成果の概要(和文)：亜鉛は必須微量元素のひとつであり、さまざまな分子の機能に不可欠であることが知られているが、細胞内外の亜鉛レベルの調節機構はあまりよく理解されていない。申請者は、インターロイキン-6およびそのシグナル伝達経路の生理機能を研究する過程で、亜鉛が細胞内のセカンドメッセンジャーとして機能することを発見し、「亜鉛シグナル」の分野を開拓した。本申請では、亜鉛シグナルを司る亜鉛結合タンパク質や亜鉛トランスポーターのノックアウトマウスを利用して亜鉛シグナルの分子機構および生理機能を包括的に解明した。

研究成果の概要(英文)：Zinc is one of the essential metal elements, which is indispensable for the functions of various molecules in the body. However, it is not well understood how zinc levels inside and/or outside cells are regulated. In the course of research about interleukin-6 and its signal transduction, we found that zinc acts as a second messenger in a cell, and established a scientific field of "zinc signaling". In this study, we revealed molecular mechanisms and physiological functions of zinc signaling using various knock-out mice related to zinc signaling such as zinc-binding molecules and zinc transporters.

研究分野：免疫学

キーワード：亜鉛シグナル 自己免疫疾患 炎症回路

1. 研究開始当初の背景

亜鉛は生体内の必須微量元素のひとつであり、さまざまな分子の機能に不可欠であることが知られていたが、細胞内外の亜鉛レベルがどのように調節されているかその機構についてはあまりよく理解されていなかった。亜鉛の免疫分野における役割の研究は、1961年に Prasad らが亜鉛欠乏と免疫不全の関係を明らかにして以来、継続的な亜鉛投与もしくは亜鉛の欠乏が免疫応答に及ぼす現象論的な研究が散在する状況であった。申請者は、インターロイキン(IL)-6 およびそのシグナル伝達経路の生理機能を研究する過程で、亜鉛が細胞の活性化などに応じてそのレベルが大きく変動することを発見し、亜鉛がカルシウムなどと同様に細胞内のセカンドメッセンジャーとして機能することを発見し、「亜鉛シグナル」の分野を世界で初めて開拓した。例えば、亜鉛の欠損が肥満細胞の脱顆粒反応とサイトカイン産生を抑制すること、そして亜鉛トランスポーターZnT5の欠損により、肥満細胞からのサイトカイン産生低下と遅延型過敏反応が抑制されることを報告している。また、肥満細胞の活性化に応じて、細胞内の亜鉛濃度が秒単位で上昇することを発見し、これを「zinc wave」と名付けた。この他、亜鉛トランスポーターZip13 および Zip14 のノックアウトマウスが、結合組織の発生に異常を来し、骨等の発生に重篤な障害を生じることなどを報告し、亜鉛シグナルの一端を明らかにして来た。

2. 研究の目的

本研究は、独自に発見した亜鉛シグナルの分子機構をさらに詳細に解明し、生体にとっての亜鉛の生物学的意義を包括的に明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

肥満細胞、好塩基球、樹状細胞、T細胞やB細胞といった免疫系の細胞はもとより、線維芽細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞を含む非免疫系の細胞における亜鉛シグナルの生物学的重要性およびその仕組みを遺伝子ノックアウトマウスの解析、細胞生物学的手法および免疫学的手法を駆使して検討し、(1)細胞内亜鉛シグナルの普遍性を確立すること、(2)細胞内亜鉛シグナルの分子機構を解明し、さらにそれぞれの結果を基盤に(3)細胞内亜鉛シグナルの病気における役割を明らかにすることを目指す。

4. 研究成果

亜鉛は生体内の必須微量元素のひとつであり、さまざまな分子の機能に不可欠であることが知られているが、細胞内外の亜鉛レベルの調節機構はよく理解されていない。申請者は、IL-6 およびそのシグナル伝達経路の生理機能を研究する過程で、亜鉛がカルシウムな

どと同様に細胞内のセカンドメッセンジャーとして機能することを発見し、「亜鉛シグナル」の分野を世界に先駆けて開拓し、本研究において、亜鉛シグナルの分子機構を解明し、生体にとっての亜鉛の生理機能を解明することを目指した。

我々は以前に、肥満細胞を抗原刺激によって活性化させると、細胞内の亜鉛濃度が速やかに上昇することを発見し、これを「Zinc wave」と名付けた。また、亜鉛を除去すると *in vitro* において肥満細胞の機能が大きく障害されるので、この zinc wave が重要な役割を持っていることが示唆されたが、その調節機構は不明であった。本研究により、L型カルシウムチャンネルである Cav1.3 の $\alpha 1$ サブユニット(LTCC)が、肥満細胞において zinc wave を発生させる引き金となっていることを突き止めた。LTCC のアンタゴニストが抗原刺激依存的な zinc wave を抑制する一方で、LTCC アゴニストはそれ単独で zinc wave を誘導するのに十分であった。さらに、LTCC を介した zinc wave が、NF- κ B の DNA 結合活性を増強することによってサイトカイン遺伝子発現を増加させることを明らかにした。これらの知見によって、肥満細胞における LTCC を介した zinc wave が亜鉛シグナルとして活性化に伴うサイトカイン遺伝子発現制御に関与することが解明され、論文に報告した。細胞内の亜鉛レベルの調節は、上記のようにその細胞機能に重要である。亜鉛レベルの調節には、亜鉛トランスポーターや LTCC を介した亜鉛の流入や流出のほかに、分子内に亜鉛を結合することによってその量を調節する機構も存在する。その亜鉛結合タンパク質のひとつであるメタロチオネイン(MT)を欠損する好塩基球は、*in vitro* における骨髄細胞からの発生は正常であったが、Fc ϵ 受容体刺激による IL-4 産生が有意に障害されていることを発見した。その分子機構として、MT が亜鉛レベルを調節して IL-4 の転写誘導に重要であるカルシニューリンおよび NFAT の活性を調節していることを突き止め、論文に報告した。さらに、顆粒膜に存在する亜鉛トランスポーターZnT2を欠損した肥満細胞では、顆粒内亜鉛レベルが大きく減少しており、肥満細胞活性化刺激による亜鉛放出も観察されないことを発見した。また、肥満細胞から放出される亜鉛が、肥満細胞上の GRP39 受容体に結合し、細胞内シグナル伝達を変化させてサイトカインの発現を正に制御していることを明らかにし、論文投稿し、現在最終改訂中である。

近年、自己免疫疾患やアレルギー疾患ばかりではなく、アルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性性疾患、そしてメタボリック症候群においても慢性炎症がそれらの病態に関与していることが明らかになってきている。我々は、慢性炎症を誘導するきっかけとなるケモカインの大量発現機構が血管内皮細胞や線維芽細胞といった非免疫系細

胞に存在することを発見し、これを「炎症回路」と名付けた。炎症回路は、IL-6およびIL-17に代表されるSTATおよびNF-κBを活性化させる因子によって誘導され、IL-6自身および炎症性ケモカインの大量発現をもたらす。この炎症回路は、複数のマウス疾患モデルの病態発症に不可欠であること、そしてヒトの臨床サンプルにおいて炎症回路の活性化を示すSTATおよびNF-κBの活性化、そして炎症回路の標的遺伝子の発現が炎症部位に認められることから、炎症回路活性化の分子機構の解明が新たな治療法開発に繋がること期待された。このことから、炎症回路活性化に関与する遺伝子群および炎症回路の標的遺伝子群のゲノムワイドスクリーニングを行い、炎症回路関連遺伝子を同定した。これらの炎症回路関連遺伝子群にはヒトの疾患関連遺伝子が有意に濃縮されていることを示し、論文に報告した。また、炎症回路関連遺伝子には、亜鉛結合タンパク質MTや亜鉛トランスポーターが含まれていた。実際に、MTの発現制御を行い、亜鉛濃度の上昇によって細胞質から核へと移動する転写因子であるMTF1の欠損により、血管内皮細胞株においてIL-6およびIL-17刺激による炎症回路の活性化がほとんど認められないことを発見し、その分子機構について論文投稿準備中である。

これら一連の研究によって、亜鉛シグナルが体内の複数の細胞種に存在することが明らかとなり、そしてその生理学的意義についての理解を深めることができた。

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20件)

1. Ugajin, T, K. Nishida, S. Yamasaki, J. Suzuki, M. Mita, M. Kubo, H. Yokozeki, T. Hirano. Zinc-binding metallothioneins are key modulators of IL-4 production by basophils. *Mol Immunol.* 2015 Mar 20;66(2):180-188.
2. Kamimura, D., A. Stofkova, N. Nishikawa, T. Atsumi, Y. Arima, M. Murakami. Immune Cell Gateways in the CNS Regulated by Regional Neural Stimulation. *Clin Exp Neuroimmunol.* 2015 In press.
3. Harada, M., D. Kamimura, Y. Arima, H. Kohsaka, Y. Nakatsuji, M. Nishida, T. Atsumi, J. Meng, H. Bando, R. Singh, L. Sabharwal, J-J. Jiang, N. Kumai, N. Miyasaka, S. Sakoda, K. Yamauchi-Takahara, H. Ogura, T. Hirano and M. Murakami. Temporal Expression of Growth Factors Triggered by Epiregulin Regulates Inflammation Development. *J. Immunol.* 194(3):1039-46, 2015
4. Hirano, T. Revisiting the 1986 molecular cloning of interleukin 6. *Front Immunol.* 2014 Sep 23;5:456.
5. Sabharwal, L., D. Kamimura, J. Meng, H. Bando, H. Ogura, C. Nakayama, J-J. Jiang, N. Kumai, H. Suzuki, T. Atsumi, Y. Arima and M. Murakami. The Gateway Reflex, which is mediated by the inflammation amplifier, directs pathogenic immune cells into the CNS. *J. Biochem.* 156(6):299-304, 2014
6. Atsumi, T., R. Singh, L. Sabharwal, H. Bando, J. Meng, Y. Arima, M. Yamada, M. Harada, J-J. Jiang, D. Kamimura, H. Ogura, T. Hirano, and M. Murakami. Inflammation amplifier, a new paradigm in cancer biology. *Cancer Research* 74(1): 8-14, 2014
7. H. Ogura, T. Atsumi, H. Bando, L. Sabharwal, M. Yamada, J.-J. Jiang, A. Nakamura, Y. Arima, D. Kamimura, and M. Murakami. The reverse-direction method links mass experimental data to human diseases. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 62(1): 41-45, 2014
8. Mori, Y, M. Murakami, Y. Arima, D. Zhu, Y. Terayama, Y. Komai, Y. Nakatsuji, D. Kamimura, and Y. Yoshioka. Early pathological alterations of lower lumbar cords detected by ultra-high field MRI in a mouse multiple sclerosis model. *Int Immunol.* 26(2): 93-101, 2014
9. 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 MO, Abe T, Kiyonari H, Hojyo S, Fukada T, Kawauchi T, Nagamatsu S, Hirano T, Kawamori R, Watada H. The diabetes-susceptible gene SLC30A8/ZnT8 regulates hepatic insulin clearance. *J Clin Invest.* 2013 Oct;123(10):4513-24.
10. Kamimura, D., M Yamada, M Harada, L. Sabharwal, J Meng, H Bando, H Ogura, T Atsumi, Y Arima, M. Murakami. The gateway theory: bridging neural and immune interactions in the CNS. *Front. Neurosci.* doi: 10.3389/fnins.2013.00204
11. Singh, R., T Atsumi, H Bando, M Harada, A Nakamura, M Yamada, J-J Jiang, H Suzuki, K Katsunuma, T Nodomi, D Kamimura, H Ogura, M. Murakami. Reverse direction method: A possible tool to link animal models with corresponding human diseases and disorders. *Int. J. Genomic Med.* 1:106. doi: 10.4172/ijgm.1000106, 2013
12. Kamimura, D., M Yamada, L Sabharwal, H Ogura, Y Okuyama, A Nakamura, T Atsumi, Y Arima, M. Murakami. The Gate Theory Explains Regional Neural Regulation of

- Activated T cells Entering the Central Nervous System. *Journal of Clinical & Cellular Immunology* 4:156 doi: 10.4172/2155-9899.1000156
13. Murakami M, M Harada, D Kamimura, H Ogura, Y Okuyama, N Kumai, A Okuyama, R Singh, J Jiang, T Atsumi, S Shiraya, Y Nakatsuji, M Kinoshita, H Kohsaka, M Nishida, S Sakoda, N Miyasaka, K Yamauchi-Takihara, T Hirano. Disease-Association Analysis of an Inflammation-Related Feedback Loop. *Cell Reports*. 3: 946-959, 2013
 14. Lee J, T Nakagiri, D Kamimura, M Harada, T Oto, Y Susaki, Y Shintani, M Inoue, S Miyoshi, E Morii, T Hirano, M Murakami, M Okumura. IL-6 amplifier activation in epithelial regions of bronchi after allogeneic lung transplantation. *Int Immunol*. 25: 319-332, 2013
 15. Arima Y, D. Kamimura, L. Sabharwal, M. Yamada, H. Bando, H. Ogura, T. Atsumi and M Murakami. Regulation of Immune Cell Infiltration into the CNS by Regional Neural Inputs Explained by the Gate Theory. *Mediators of Inflammation*. vol. 2013, Article ID 898165, 8 pages, 2013. doi:10.1155/2013/898165
 16. Ogura H, Y. Arima, D. Kamimura, and M Murakami. The Gate Theory: How Regional Neural Activation Creates a Gateway for Immune Cells via an Inflammation Amplifier. *Biomedical J*. 36(6): 269-273, 2013
 17. Lee J, T Nakagiri, T Oto, M Harada, E Morii, Y Shintani, M Inoue, Y Iwakura, S Miyoshi, M Okumura, T Hirano, M Murakami. IL-6 Amplifier, NF- κ B-Triggered Positive Feedback for IL-6 Signaling, in Grafts Is Involved in Allogeneic Rejection Responses. *J Immunol*. 189: 1928-1936, 2012
 18. Arima Y, M Harada, D Kamimura, J Park, F Kawano, FE Yull, T Kawamoto, Y Iwakura, UAK Betz, G Márquez, T S Blackwell, Y Ohira, T Hirano, M Murakami. Regional Neural Activation Defines a Gateway for Autoreactive T Cells to Cross the Blood-Brain Barrier. *Cell*. 148: 447-457, 2012
 19. Murakami M, T Hirano. The Molecular Mechanisms of Chronic Inflammation Development *Front. Immunol*. 07 October 2012 doi: 10.3389/fimmu.2012.00323
 20. Yamasaki S, Hasegawa A, Hojyo S, Ohashi W, Fukada T, Nishida K, Hirano T. A novel role of the L-type calcium channel α 1D subunit as a gatekeeper for intracellular zinc signaling: zinc wave. *PLoS One*. 2012;7(6):e39654.

〔学会発表〕(計 5 件)
 第 39 回日本リンパ学会総会 (招待講演)
 2015 年 3 月 27 日
 お茶の水ソラシティ・カンファレンスセンター (東京都千代田区)
 村上正晃
 炎症回路の神経制御とリンパ球に与える影響

第 120 回日本解剖学会・第 92 回日本生理学会合同大会 (招待講演)
 2015 年 3 月 22 日
 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
 村上正晃
 炎症回路と慢性炎症

Cytokines Down Under 2014: From Bench to Beyond (招待講演)
 2014 年 10 月 26 日~29 日
 Melbourne Convention & Exhibition Center (オーストラリア、メルボルン)
 村上正晃
 Regional neural regulation of inflammation amplifier

理研 IMS-日本免疫学会合同国際シンポジウム 2014 (招待講演)
 2014 年 6 月 26 日~27 日
 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
 村上正晃
 Local neural activation enhances inflammation responses

第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会シンポジウム (招待講演)
 2014 年 6 月 19 日~20 日
 北海道大学医学部フラテホール (北海道札幌市)
 村上正晃
 血液脳関門に存在する免疫細胞の侵入口の発見とその形成機構

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学分野

<http://www.igm.hokudai.ac.jp/neuroimmune/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野俊夫 (Toshio Hirano)

大阪大学・その他部局等・学長

研究者番号：40136718

(2) 研究分担者

村上正晃 (Masaaki Murakami)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号：00250514