

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17359

研究課題名（和文）亜鉛欠乏症のTh2リンパ球-M2マクロファージ経路を介した炎症反応増強の機序解明

研究課題名（英文）Inflammatory response under zinc deficiency is exacerbated by dysfunction of the Th2 lymphocyte &amp;#8211; M2 macrophage pathway

研究代表者

木戸 尊将（Takamasa, Kido）

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：40633152

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：亜鉛欠乏症状の炎症反応が生じる機序として、Th2細胞の転写因子GATA-3(Znフィンガータンパク)の発現が低下し、Th2リンパ球数並びにIL-4が低下することで、抗炎症型のM2マクロファージへの分化の誘導が抑制される。その結果、細菌感染や活性酸素による炎症を抑制できず、炎症反応が生じることを見出した。

亜鉛欠乏症状の炎症反応に対して、IL-4投与または亜鉛補充を行うことで、M2マクロファージ数は増加し、炎症反応を抑制もしくは改善させることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

亜鉛欠乏は潜在的国民病として成人のみならず、高齢者に多い。そして、免疫機能が低下している高齢者では肺炎などの感染性疾患による罹患率が高値となっており、亜鉛欠乏が一要因として感染性疾患の炎症反応を悪化させていると推察できる。しかし、亜鉛欠乏と免疫機能への影響はこれまで断片的にしか明らかとできていなかった。

我々の基礎的研究において、亜鉛欠乏は免疫担当細胞に対して機能不全をもたらすことを明らかにし、亜鉛欠乏に伴う免疫機能の低下を介した炎症反応のメカニズムを解明した。

研究成果の概要（英文）：Zinc deficiency leads to immune dysfunction and aggravated inflammation, caused by an imbalance in the T-lymphocyte-macrophage pathway. In this study, the relationship between macrophage subtypes (M1 and M2) and helper T lymphocytes (Th1 and Th2) was examined using spleens from rats fed standard diet or a zinc-deficient, the latter with or without interleukin (IL)-4 injection or with return to a standard diet. The zinc-deficient diet led to significant decreases in IL-4/IL-13 mRNA expression, GATA-3 protein levels, M2 macrophages, CD3+ CD8+ cells, and IL-4/IL-13-positive cells, as well as significant increases in the inflammatory cytokine IL-1 and chemokine MIP-1, indicating that zinc deficiency-induced aggravation of inflammation is Th2-related and is associated with loss of GATA-3, IL-4, and anti-inflammatory M2 macrophages. Importantly, IL-4 injection or dietary zinc supplementation recovered the effects of zinc deficiency on immune function.

研究分野：免疫毒性学

キーワード：亜鉛 T細胞 マクロファージ 炎症反応 脾臓

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

必須微量元素—亜鉛(Zn)は免疫機能の維持に重要な働きを担っている。しかし、現在の日本人は亜鉛摂取が不足しており、亜鉛摂取不足により生じる免疫機能の低下が問題となっている(柳澤, 2017 臨床検査)。亜鉛欠乏と免疫機能に関する疫学研究では、血清中の亜鉛値が低下していることで免疫力が低下し敗血症(Besecker et al., 2011)や肺炎(Natchu et al., 2008)などの感染性疾患や炎症反応を増強させることが報告されている。また、基礎的研究では亜鉛欠乏食ラットにリポポリサッカライドを腹腔内投与した結果、炎症性サイトカインの発現が増強することが報告されている(Miyazaki et al., 2012)。しかし、これら報告は亜鉛欠乏が炎症反応を増悪させることを記述しているのみで、そのメカニズムには触れていない。

炎症応答のメカニズムとして、免疫担当細胞であるマクロファージのサブタイプ(炎症型 M1 ;抗炎症型 M2)とそれらに分化を誘導するヘルパーT細胞サブセット(Th1 ; Th2)の働きが注目されている(Tidball et al., 2010)。そして、我々の研究において、亜鉛欠乏は Th2 リンパ球に影響を及ぼすことを明らかにした。この Th2 リンパ球への分化には細胞自身が産生するインターロイキン-4(IL-4)による誘導と転写因子で Zn フィンガー構造を有する GATA-3 発現が必要不可欠である。しかし、転写因子 GATA-3 はその機能を発現するために亜鉛を必要とするため、亜鉛欠乏下では Th2 リンパ球への分化が減少し、その結果、IL-4 も低下する。

つまり、亜鉛欠乏状態でみられる炎症反応は、Th2 リンパ球(転写因子 ; GATA-3)の減少に伴い、自身から産生される IL-4 発現が低下することにより、M2 マクロファージ(抗炎症)への分化の誘導を抑制させる。その結果、M2 マクロファージによる抗炎症作用が発現しないことが示唆された。

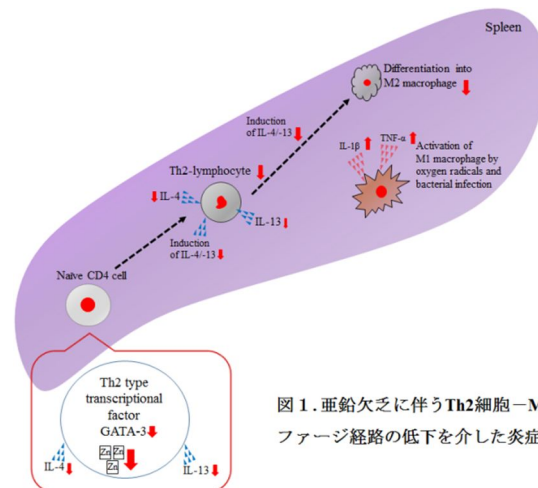


図1. 亜鉛欠乏に伴うTh2細胞-M2マクロファージ経路の低下を介した炎症反応の機序。

## 2. 研究の目的

先行研究で明らかにした炎症反応のメカニズムの起点は、M2 マクロファージの分化誘導因子である IL-4 発現減少と Th2 リンパ球転写因子 GATA-3 の機能不全に起因する。

研究の目的 ; 提示する炎症メカニズムを確立させ、治療へ直結させるために下記の研究を実施した。

亜鉛欠乏ラットに IL-4 を腹腔内投与し、M2 マクロファージへ分化誘導することで、自己の抗炎症反応を誘導させる。

亜鉛欠乏飼育後に亜鉛標準食を与え、転写因子 GATA-3 の発現を回復させることで Th2 細

胞数を増やし、自己の抗炎症反応を誘導させる。

### 3 . 研究の方法

本研究は、Sprague-Dawley ラット(5 週令;雄)を 4 群に分けて、亜鉛標準食(standard)または亜鉛欠乏食(zinc deficiency)を毎日 17g ずつ 6 週間与えた。また、亜鉛欠乏食+IL-4 投与群(zinc deficiency/IL-4 i.p.)については、IL-4 タンパク(和光純薬;ラット, リコンビナント IL-4)を腹腔内投与を施す。亜鉛補充群は、6 週目まで亜鉛欠乏食で飼育を行い、6 週目から 10 週目まで亜鉛標準食を与える(zinc deficiency/standard)。各飼育期間終了後、麻酔下で採血による安楽死を行い、脾臓を採取した。

免疫組織化学染色; M1 マクロファージ, M2 マクロファージ, IFN- $\gamma$ (Th1-リンパ球マーカー), IL-4 (Th2-リンパ球マーカー)、 mRNA 発現; マクロファージについては、炎症性サイトカイン(IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12)/ケモカイン(MIP-1 $\alpha$ , MCP-1)、 T リンパ球については、Th2-リンパ球が産生する IL-4、 Th1-リンパ球が産生する IFN- $\gamma$ 、 フローサイトメトリー; 脾臓中のヘルパーT 細胞(CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>)、 キラーT 細胞 (CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>)、 ウエスタンブロッティング法; Th2-リンパ球の転写因子である GATA-3 の発現を用いて検討を行った。

### 4 . 研究成果

#### *亜鉛欠乏ラットに IL-4 腹腔内投与または亜鉛補充を施した後の生理学的変化*

最終体重は standard 群において zinc deficiency 群、 zinc deficiency/IL-4 i.p.群、 zinc deficiency/standard 群より有意に高値を示した。また、zinc deficiency/standard 群は zinc deficiency 群、 zinc deficiency/IL-4 i.p.群よりも有意に高値であった。相対脾臓重量では、zinc deficiency 群のみ有意に高値を示したが、zinc deficiency/IL-4 i.p.群及び zinc deficiency/standard 群については、standard 群に対して有意な差は示さなかった。血清中の亜鉛値、Total SOD 及び Cu/Zn-SOD 活性については、zinc deficiency 群と zinc deficiency/IL-4 i.p.群で standard 群及び zinc deficiency/standard 群よりも有意に低下し、Cu/Zn ratio、MDA 濃度では、zinc deficiency 群と zinc deficiency/IL-4 i.p.群が有意に上昇した。血清中の銅値については、zinc deficiency 群のみ有意に上昇した。

#### *亜鉛欠乏ラットに IL-4 腹腔内投与または亜鉛補充を施した後の炎症性サイトカインの発現 (図 2A)*

脾臓中マクロファージの IL-1 $\beta$  と MIP-1 $\alpha$  の mRNA 発現において zinc deficiency 群のみ有意に上昇し、zinc deficiency/IL-4 i.p.群及び zinc deficiency/standard 群については、standard 群と同等であった。脾臓 T リンパ球の IL-4 の mRNA 発現については、zinc deficiency 群のみ有意に低下し、zinc deficiency/IL-4 i.p.群及び zinc deficiency/standard 群は、standard 群と同等であった。また、IFN- $\gamma$  の mRNA 発現については Experiment I と同様に全ての群において有意な変化は観察されなかった。

亜鉛欠乏ラットにIL-4 腹腔内投与または亜鉛補充を施した後の脾臓中Th2 サイトカインとM2 マクロファージへの影響(図 2B)

H-E 染色において、脾臓の構造に変化は観察されなかった。免疫組織化学染色については、CD163, IL-4, IL-13, GATA-3, IFN- $\gamma$ , T-bet の陽性細胞の多くは赤脾髄で観察された。その陽性細胞数の結果については、CD163(M2 マクロファージマーカー)、Th2 リンパ球関連因子(IL-4, IL-13, GATA-3)の陽性細胞数が zinc deficiency 群のみ有意な減少を示し、zinc deficiency/IL-4 i.p.群及び zinc deficiency/standard 群においては、standard 群よりわずかに増加した。Th1 リンパ球関連因子(IFN- $\gamma$ , T-bet)の陽性細胞数については、全ての群間において有意な変化は観察されなかった。

亜鉛欠乏ラットにIL-4 腹腔内投与または亜鉛補充を施した後の脾臓におけるCD8<sup>+</sup> T細胞とCD4<sup>+</sup> T細胞への影響

CD8<sup>+</sup> T細胞数については、zinc deficiency 群のみ有意に減少し、zinc deficiency/IL-4 i.p.群及び zinc deficiency/standard 群については、standard 群と同等であった。CD4<sup>+</sup> T細胞数については、群間で有意な変化は観察されなかった。

亜鉛欠乏ラットにIL-4 腹腔内投与または亜鉛補充を施した後のGATA-3 のタンパク発現(図 2C)

脾臓の GATA-3 タンパク発現において、zinc deficiency 群で有意に低下し、zinc deficiency/IL-4 i.p.群も低値であった。zinc deficiency/standard 群の GATA-3 タンパク発現については、standard 群と同等であった。

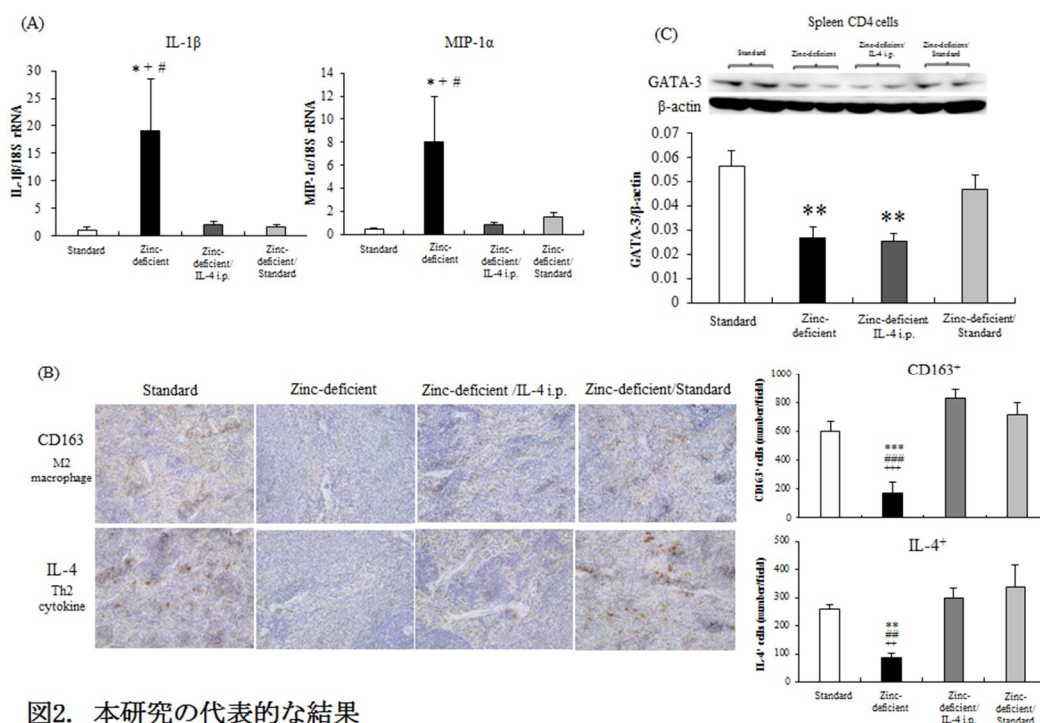


図2. 本研究の代表的な結果

## 研究成果の論文

- **Kido T.**, Ishiwata K., Suka M., Yanagisawa H. Inflammatory response under zinc deficiency is exacerbated by dysfunction of the Th2 lymphocyte – M2 macrophage pathway. Immunology. 査読有、156(4): 356-72, 2019.
- **Kido T.**, Hachisuka E., Suka M., Yanagisawa H. Interleukin-4 administration or zinc supplementation is effective in preventing zinc deficiency-induced hemolytic anemia and splenomegaly. Biol Trace Elem Res. 査読有、199(2):668-681. 2021
- **Kido T.**, Suka M., Miyazaki T., Yanagisawa H. Inflammatory response to zinc deficiency may be related to the number of white blood cells and platelets. J Nutr Res, 査読有、35, 6-10, 2018.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kido T., Hachisuka E., Suka M., Yanagisawa H.	4. 巻 199
2. 論文標題 Interleukin-4 administration or zinc supplementation is effective in preventing zinc deficiency-induced hemolytic anemia and splenomegaly.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological Trace Element Research	6. 最初と最後の頁 668-681
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12011-020-02172-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takamasa Kido, Machi Suka, Takashi Miyazaki, Hiroyuki Yanagisawa	4. 巻 35
2. 論文標題 Inflammatory response to zinc deficiency may be related to the number of white blood cells and platelets	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Trace Nutrients Research	6. 最初と最後の頁 6-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takamasa Kido, Kenji Ishiwata, Machi Suka, Hiroyuki Yanagisawa	4. 巻 156
2. 論文標題 Inflammatory response under zinc deficiency is exacerbated by dysfunction of the Th2 lymphocyte - M2 macrophage pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunology	6. 最初と最後の頁 356-372
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/imm.13033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 木戸尊将
2. 発表標題 亜鉛過剰摂取による尿管閉塞性腎症進展の機序に対するPDGFR阻害剤の効果.
3. 学会等名 第89回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木戸尊將
2. 発表標題 亜鉛欠乏または亜鉛過剰摂取の精巣における経時的影響
3. 学会等名 第92回日本産業衛生学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木戸尊將
2. 発表標題 亜鉛欠乏症による好中球数増加に対するIL-4投与及び亜鉛補充の効果
3. 学会等名 第30回日本微量元素学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木戸尊將
2. 発表標題 亜鉛欠乏症における胸腺萎縮に関する機序 - IL-4投与と亜鉛補充の効果 -
3. 学会等名 第26回日本免疫毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉井ひなの、木戸尊將、石渡賢治、柳澤裕之
2. 発表標題 亜鉛欠乏ラットの胸腺における制御性T細胞への影響とIL-4の投与及び亜鉛補充の効果
3. 学会等名 第136回成医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kido, T., Hachisuka, E., Suka, M., Tsunoda, M., Yanagisawa, H.
2. 発表標題 Effects of IL-4 administration or zinc supplementation on thymic fat in zinc-deficient rats.
3. 学会等名 59th Annual Meeting and ToxExpo (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木戸 尊將、柳澤 裕之
2. 発表標題 亜鉛欠乏症における血球指標に対する影響とIL-4投与及び亜鉛補充の効果
3. 学会等名 第35回日本微量元素学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木戸 尊將、柳澤 裕之
2. 発表標題 亜鉛欠乏症におけるインフラマソーム関連遺伝子の関与とIL-4投与の効果
3. 学会等名 第29回日本微量元素学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木戸 尊將、柳澤 裕之
2. 発表標題 亜鉛欠乏症における胸腺萎縮に対するマクロファージの関与とIL-4投与の効果
3. 学会等名 第25回日本免疫毒性学会学術年会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 木戸 尊將、柳澤 裕之
2. 発表標題 亜鉛欠乏の脾臓Th2リンパ球-M2マクロファージ経路を介した炎症反応増悪の機序とIL-4投与または亜鉛補充の効果
3. 学会等名 日本毒性学会生体金属部会主催 メタルバイオサイエンス研究会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kido, T., Suka, M., Tsunoda, M., Yanagisawa, H
2. 発表標題 IL-4 administration or zinc supplementation mitigates aggravated thymus atrophy in zinc-deficient rats
3. 学会等名 58th Annual Meeting and ToxExpoTM (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 木戸尊將、石渡賢治、須賀万智、柳澤裕之	4. 発行年 2019年
2. 出版社 消化器病サイエンス	5. 総ページ数 4
3. 書名 亜鉛欠乏ラットの脾臓におけるTh2細胞 - M2マクロファージ経路を介した炎症反応増強の機序	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------