

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590576

研究課題名(和文)アレルギー応答における亜鉛トランスポーターの役割解明

研究課題名(英文)Role of zinc transporter in allergic reaction

研究代表者

西田 圭吾(NISHIDA, KEIGO)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：80360618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：亜鉛は微量必須元素であり、その欠乏により免疫不全が引き起こされる。また、マスト細胞の顆粒に亜鉛が蓄積されていることが報告されていたが、その生理的意義は不明であった。本研究では、細胞内分泌顆粒亜鉛を調節する亜鉛トランスポーターZnT2/Slc30a2に焦点をあて、それら遺伝子欠損マウスの樹立、及びアレルギー•炎症反応における役割の解析を行った。生体内でのZnT2の役割を検討したところ、マスト細胞依存性の腹膜炎モデルにおいて、ZnT2-KOマウスはコントロールマウスに比べ生存率が優位に低下していた。以上の結果よりマスト細胞内分泌顆粒亜鉛が腹膜炎発症に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Zinc (Zn) is an essential nutrient and its deficiency causes immunodeficiency. Electron microscopic studies demonstrated that mast cell granules are rich in Zn. However, the precise roles and molecular mechanism(s) of Zn's function in mast cells have not been clarified. It has been considered that Zn is supplied to granule by Zn transporter. We identified that Zn transporter ZnT2/Slc30a2 was localized at granule membrane in mast cell. To understand role of granule's Zn in mast cell, we generated ZnT2-KO mice. We found that survival rate in cecal ligation and puncture was diminished in ZnT2-KO mice. It has reported Zn is required for activity of CPA3 (carboxypeptidase3) in mast cell and loss of CPA3 activity causes endothelin-induced sepsis shock. Consistent with this report, CPA3 activity was decreased in ZnT2-KO mast cell. In this study, we showed that ZnT2 is important for survival from sepsis and required for Zn-dependent CPA3 activity.

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学 免疫学

キーワード：亜鉛トランスポーター マスト細胞 好塩基球 サイトカイン アレルギー 腹膜炎

1. 研究開始当初の背景

マスト細胞／好塩基球は、IgE の高親和性 Fc 受容体である Fc ϵ RI を発現しており、多価抗原により受容体の架橋反応が促進されることにより活性化する。活性化されたマスト細胞は初期反応として、顆粒に蓄えられたヒスタミンなどのケミカルメディエーターを分泌し、その後、遅延反応として IL-6, TNF- α などの炎症性サイトカインの産生によりアレルギー反応を誘発するエフェクター細胞である。特に、好塩基球は強力な IL-4 産生能を有し、Th2 への分化誘導に大きく貢献していることが示されつつあり、さらに慢性アレルギー疾患の誘発に必須であることが分かり、これまで、マスト細胞だけでは説明できなかったアレルギー発症の制御機構を解明していくうえでも重要な細胞として認識されつつある。一方で、微量必須元素である亜鉛は欠乏することにより、成長障害に代表される小人症や、性的発育障害、免疫不全などの症状を現す。先天性の亜鉛欠乏症として有名なのが、腸性肢端皮膚炎であり、毛髪の脱落や皮膚障害を発症する。また亜鉛は生体内で300種類以上の酵素の構成成分となっており、細胞の増殖・分化・機能発現・生存・運動性といった幅広い生物反応を制御することで、初期発生・免疫反応機能・癌細胞の転移・創傷治癒などの局面に役割を果たしている。従って、細胞内の亜鉛濃度は厳密に制御されており、亜鉛恒常性を制御していると考えられている分子が亜鉛トランスポーターである。しかしながら亜鉛恒常性とアレルギー・炎症反応との関係については十分には理解されていない。そこで、本研究ではマスト細胞／好塩基球での亜鉛トランスポーターの役割を分子レベルで解析し、さらには遺伝子欠損マウスを用いて、マスト細胞／好塩基球依存性なアレルギー・炎症発症機構の解明を目指す。

2. 研究の目的

マスト細胞や好塩基球はアレルギーの病態と密接に関与している免疫担当細胞である。マスト細胞／好塩基球は外来刺激をうけて、ヒスタミンなどのケミカルメディエーター、転写を介したサイトカイン産生、脂質代謝によるロイコトリエン等を分泌する。西田らは亜鉛キレーターを用いて微量必須元素の亜鉛が、上述したマスト細胞／好塩基球の機能発現に関与していることを示してきた。本研究では、細胞内亜鉛を調節する亜鉛トランスポーターに焦点をあて、それら遺伝子欠損マウスの樹立、及びマスト細胞や好塩基球における役割の解析を行うことにより、亜鉛とアレルギー・炎症反応制御機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、亜鉛トランスポーター遺伝子欠損マウスを用いて、培養マスト細胞／好塩基球を樹立し、それらの細胞の機能発現（脱顆粒、サイトカイン産生、脂質メディエーター分泌）を網羅的に解析する。発現パターンが重複しているケースにおいて、亜鉛トランスポーター多重遺伝子欠損マウスの樹立を実施する。他のgeneticアプローチとしてsiRNAを用いた実験も併用する。得られた表現系に対して、生化学的手法を駆使して、その分子メカニズムを解析する。最終的に、遺伝子欠損マウスを用いて、マスト細胞／好塩基球依存性なアレルギー・炎症反応に影響があるかどうかマウスモデル実験にて確認する。また、各トランスポーター遺伝子欠損細胞を用いて、細胞内亜鉛の動態や各小器官の亜鉛量をICP-AESにて測定し、亜鉛の恒常性維持と機能発現の関係も明確にする。

4. 研究成果

マスト細胞／好塩基球はアレルギー／炎症病態に関与している免疫担当細胞である。マスト細胞／好塩基球は外来刺激をうけて、ヒスタミンなどのケミカルメディエーターやサイトカインを分泌する。本研究では、細胞内分泌顆粒亜鉛を調節する亜鉛トランスポーター

一ZnT2/S1c30a2及び、細胞質亜鉛濃度調節に寄与しているメタロチオネインに焦点をあて、それら遺伝子欠損マウスの樹立、及びマスト細胞や好塩基球における役割の解析を行った。蛋白・RNA解析を遂行し、ZnT2ノックアウトマウス (ZnT2-K0マウス) が樹立できたことを確認した。ZnT2-K0マウス由来のマスト細胞では抗原刺激依存的な脱顆粒・サイトカイン産生に異常が観察されなかったが、放出された亜鉛が優位に低下していた。この結果と一致して細胞内分泌顆粒亜鉛を亜鉛蛍光指示薬で調べたところZnT2-K0マスト細胞では蛍光シグナルが観察できなかった。これらの結果よりZnT2はマスト細胞顆粒内亜鉛を調節する重要な亜鉛トランスポーターであることが判明した。さらに、生体内でのZnT2の役割を検討したところ腹膜炎モデル (CLP: 腸結紮穿孔法) において、ZnT2-K0マウスはコントロールマウスに比べ生存率が優位に低下していた。以上の結果よりマスト細胞内分泌顆粒亜鉛が腹膜炎発症に関与している可能性が示唆された。

一方、メタロチオネインノックアウトマウス (MT1/2-K0マウス) より培養好塩基球を調整し、抗原刺激依存的なサイトカイン産生を調べたところTh2型サイトカインIL-4が転写レベルで障害されていることを見出した。また、MT1/2-K0マウスにおいても好塩基球由来のIL-4の産生が減少していた。以上の結果より細胞内亜鉛恒常性維持とアレルギー関連細胞機能発現との密接な関係が示された。

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9件)

- 1、Sekine Y*, Nishida K*, Yamasaki S, Muromoto R, Kon S, Kashiwakura J, Saitoh K, Togi S, Yoshimura A, Oritani K, and Matsuda T. Signal-transducing adaptor protein-2 controls the IgE-mediated, mast cell-mediated anaphylactic responses. *J Immunol.* 192:3488-3495, 2014. *, equal contribution、10.1371/journal.pone.0039654

<査読あり>

- 2、Shimizu K., Mizuno T, Shinga J, Asakura M, Kakimi K, Ishii Y, Masuda K, Maeda T, Sugahara H, Sato Y, Matsushita H, Nishida K., Hanada K, Dorrie J, Schaft N, Bickham K, Koike H, Ando T, Nagai R and Fujii S. Vaccination with antigen mRNA-transfected, NKT cell ligand-loaded, human vector cells elicits robust in situ immune responses by dendritic cells. *Cancer Res.* 73:62-73, 2012. 10.1158/0008-5472.CAN-12-0759 <査読あり>
- 3、Mukai K., BenBarak M, Tachibana M, Nishida K., Karasuyama H, Taniuchi I, and Galli SJ. Critical role of P1-Runx1 in mouse basophil development. *BLOOD.* 120:76-85, 2012. 10.1182/blood-2011-12-399113 <査読あり>
- 4、Yamasaki S., Hasegawa A, Hojyo S, Ohashi W, Fukada T, Nishida K., and 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.* 7: e39654, 2012. 10.1371/journal.pone.0039654 <査読あり>
- 5、Higuchi K., Nakaoka Y, Shioyama W, Arita Y, Hashimoto T, Yasui T, Ikeoka K, Kuroda T, Minami T, Nishida K., Fujio Y, Yamauchi-Takahara K, Shirai M, Mochizuki N, Komuro I. Endothelial Gab1 Deletion Accelerates Angiotensin II-Dependent Vascular Inflammation and Atherosclerosis in Apolipoprotein E Knockout Mice. *Circulation Journal.* 76:2031-2040, 2012. 10.1253/circj.CJ-11-1507 <査読あり>
- 6、Bin BH, Fukada T, Hosaka T, Yamasaki S, Ohashi W, Hojyo S, Miyai T, Nishida K., Yokoyama S, Hirano T. Biochemical characterization of human ZIP13 protein: a homo-dimerized zinc transporter involved in the Spondylocheiro dysplastic Ehlers-Danlos syndrome. *J Biol Chem.* 286:40255-40265, 2011. 10.1074/jbc.M111.256784 <査読あり>
- 7、Nishida K., S. Yamasaki, A. Hasegawa, A. Iwamatsu, H. Koseki, and T. Hirano. Gab2, via PI-3K, Regulates ARF1 in FcεRI-Mediated Granule Translocation and Mast Cell Degranulation. *J Immunol.* 187:932-941, 2011. 10.4049/jimmunol.1100360 <査読あり>

- 8、 Ushio H, Ueno T, Kojima Y, Komatsu M, Tanaka S, Yamamoto A, Ichimura Y, Ezaki J, **Nishida K**, Komazawa-Sakon S, Niyonsaba F, Ishii T, Yanagawa T, Kominami E, Ogawa H, Okumura K, Nakano H. Crucial role for autophagy in degranulation of mast cells. *J Allergy Clin Immunol.* 127:1267-1276, 2011.
10.1016/j.jaci.2010.12.1078 <査読あり>
- 9、 Fukada, T., S. Yamasaki, **K. Nishida**, M, Murakami, and Hirano, T. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling. *J Biol Inorg Chem.* 16:1123-1134, 2011.
10.1007/s00775-011-0797-4 <査読あり>
- [学会発表] (計 1 1 件)
- 1、 **西田圭吾**, (シンポジウム、口頭)、第91回生理学会大会 (鹿児島)、亜鉛トランスポーターSlc30a2/ZnT2は皮膚創傷治癒過程に關与する、2014年3月16日
- 2、 **西田圭吾**, (特別講演、口頭)、第8回近畿亜鉛栄養治療研究会 (大阪)、創傷治癒における亜鉛 -亜鉛トランスポーターの役割-, 2014年2月1日
- 3、 **K. Nishida**, Hasegawa A, Yamasaki S, Ohashi W, Ogura H, Murakami M, and Hirano T (Workshop, Oral/ Poster)、Zinc released from mast cell plays a role in wound healing through GPR39/IL-6 axis、第42回日本免疫学会総会 (大阪)、2013年12月11日
- 4、 **西田圭吾**, 宇賀神つかさ、山崎哲、鈴木純子、三田征治、久保允人、横関博雄、平野俊夫 (シンポジウム、口頭)、メタロチオネインは好塩基球のサイトカイン産生を調節する、メタロバイオサイエンス研究会2013 (静岡)、2013年9月27日
- 5、 **K. Nishida**, Hasegawa A, Yamasaki S, Hirano T (Symposium, Oral)、Role of zinc transporter Slc30a2/ZnT2 in normal wound healing、第86回 日本生化学会大会 インターナルセッション (横浜)、2013年9月11日
- 6、 **西田圭吾**, (シンポジウム、口頭)、アレルギー疾患における戦略的な治療法及び創薬開発を目指して。-新適塾-「未来創薬の誘い」第19回会合 (大阪)、2012年7月23日

- 7、 **西田圭吾**, (シンポジウム、口頭)、亜鉛トランスポーター、ZnT5/Slc39a5は遅延型アレルギー、接触性皮膚炎反応に重要である、第23回 日本微量元素学術集会 リサーチシンポジウム (東京)、2012年7月5日
- 8、 **西田圭吾**, (シンポジウム、口頭)、マスト細胞依存的なアレルギー応答におけるアダプター分子Gab2の役割、第132回 日本薬学会年会 特別シンポジウム (北海道)、2012年3月30日
- 9、 **西田圭吾**, (ワークショップ、口頭)、免疫反応における亜鉛シグナルの役割、第132回 日本薬学会年会 日本薬科機器協会ワークショップ (北海道)、2012年3月30日
- 10、 **西田圭吾**, 山崎哲、平野俊夫, (ワークショップ、口頭)、亜鉛による免疫・炎症応答制御機構、第62回 日本アレルギー学会秋季学術大会 (東京)、2011年11月11日
- 11、 **西田圭吾**, 山崎哲、長谷川藍子、平野俊夫, (シンポジウム、口頭) アナフィラキシー応答におけるアダプター分子Gab2の役割、第84回 日本生化学会大会 (京都)、2011年9月21日
- [図書] (計 1 2 件)
- 1、 **西田圭吾**, アレルギー反応における亜鉛 / 亜鉛トランスポーターの役割、**亜鉛の機能と健康**, 209-222, 建帛社、2013
- 2、 **西田圭吾**, ここまで分かった亜鉛の免疫システムにおける役割、**日本衛生学会雑誌**, 68:145-152, 2013
- 3、 **西田圭吾**, Role of adaptor molecule Gab2 in mast cell-mediated allergy response、**YAKUGAKU ZASSHI**, 133:413-418, 2013
- 4、 深田俊幸、**西田圭吾**, 山崎哲、北條慎太郎、亜鉛シグナル：新しい骨代謝と免疫・アレルギー応答の制御システム、**CLINICAL CALCIUM**, 22:77-97, 2012
- 5、 **西田圭吾**, 生体反応における亜鉛シグナルの重要性、**ファルマシア**, 48:206-210, 2012
- 6、 山崎哲、北條慎太郎、深田俊幸、**西田圭吾**, 亜鉛シグナルと免疫、**内分泌・糖尿病・代謝内科**, 34:260-268, 2012

- 7、西田圭吾、深田俊幸、平野俊夫、炎症・免疫反応における亜鉛シグナルの重要性、**炎症と免疫**、20:64-73、2012
- 8、山崎哲、西田圭吾、マスト細胞における脱顆粒のシグナル伝達、**臨床免疫・アレルギー科**、56：614-621、2011
- 9、Fukada, T., S. Yamasaki, K. Nishida, M, Murakami, and Hirano, T. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling. *J Biol Inorg Chem*. 16:1123-1134, 2011
- 10、西田圭吾、山崎哲、FcεRIを介したシグナル伝達におけるアダプター分子Gab2の役割、**臨床免疫・アレルギー科**、55：601-607、2011
- 11、西田圭吾、アレルギー応答における亜鉛トランスポーターの役割、**YAKUGAKU ZASSHI**、131:85-92、2011
- 12、Nishida K., Fukada T, Yamasaki S, Murakami M, Hirano T. **Zinc in Allergy, Autoimmune, and Hard and Connective Tissue Diseases.** in **Zinc in Human Health** edited by L. Rink., IOS Press, 268-282, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 圭吾 (NISHIDA KEIGO) 独立行政
法人理化学研究所・統合生命医科学研究セン
ター・上級研究員

研究者番号：80360618