

総説

創傷治癒における亜鉛： 亜鉛トランスポーターの役割

鈴鹿医療科学大学 薬学部 免疫制御学研究室 西田圭吾

要旨

亜鉛は生体にとって必要不可欠な微量必須元素のひとつである。亜鉛欠乏により、免疫反応低下、精神障害、成長遅延といった多彩な症状を呈する。これらの症状は亜鉛が300種以上の酵素活性の中心元素として機能しているためと考えられている。しかしながら、亜鉛の炎症や免疫反応における分子機序に関しては不明な点が多い。一方、組織が損傷を受けると止血と炎症から始まる極めて複雑な一連の生体反応が起こる。その治癒にいたるまでの過程を創傷治癒という。この創傷治癒に、亜鉛がポジティブに制御していることは古くから知られていた。しかしながら、亜鉛が具体的に創傷治癒のプロセスにどのような役割を担っているか未解決のままであった。今回、亜鉛が創傷治癒に関与する機序に関して、著者らの研究グループで得られた知見を中心に紹介する。

はじめに

亜鉛は必須微量元素のメンバーのうちのひとつである。体重60kgの成人生体内におよそ2gしか存在しないが、生存する上で不可欠な元素であることが知られている。生体内の総亜鉛量は一定に保たれており、この恒常性が崩れた場合は、さまざまな疾患が引き起こされることが知られている。例えば、小腸からの亜鉛の吸収障害や、偏食、あるいは食品添加物による亜鉛のキレート作用などが原因で亜鉛欠乏状態になると、軽度の場合は味覚障害・夜盲症・生殖機能の低下、重度の場合は免疫機能の低下・感染症・皮膚炎・下痢・脱毛・成長障害・精神障害が引き起こされることが示されている。一方、多量の亜鉛が混入した飲食物を介して亜鉛を過剰に摂取すると、即時的には金属中毒症状として嘔吐や下痢が引き起こされる。また、慢性的な過剰状態では鉄や銅など他の金属元素の吸収を妨げることで溶血性貧血症などを起こす事が報告されている。

亜鉛恒常性の破綻によりこのように広範囲におよぶ機能障害が引き起こされるのは、亜鉛が300種類以上におよぶ酵素の活性中心の形成や、亜鉛フィンガーなど亜鉛イオン結合モチーフを持つ転写因子やシグナル伝達分子の立体構造維持に関与していることに起因していると考えられている。さらに最近の研究によって、ヒトの全遺伝子の約1割が何らかの亜鉛結合配列をコードしていることが明らかになっている。従って、亜鉛は細胞の増殖・分化・機能発現・生存・運動性といった幅広い生物反応を司る分子群を制御することで、初期発生・免疫機能・ガン細胞の転移・創傷治癒などの局面に役割を果たしていることが考えられる。しかしながら、亜鉛がどのような機序で上述した生物現象を調節しているか不明な点が多かった。本稿では、特に創傷治癒過程における亜鉛／亜鉛トランスポーターの役割について解説する。

1. 亜鉛供給とその細胞内調節機構

微量必須元素の亜鉛は、飲食物に含まれる亜鉛が小腸から吸収され、一旦、小腸細胞に取り込まれる。そして、小腸細胞からアルブミンやトランスフェリンと結合した状態で血中を循環して各組織、各細胞へと運ばれて行く。細胞内における亜鉛量は、亜鉛の取り込み・放出・貯蔵により調節されており、亜鉛の細胞膜内外における交換は亜鉛トランスポーターにより行われていることが知られている (図1)。現在、細胞質の亜鉛を増加する方向性を有す 14 種類の Slc39/ZIP (Zrt-, Irt-like protein) ファミリー亜鉛トランスポーターと、細胞質亜鉛を減少させる 9 種類の Slc30/ZnT (Zinc transporter) ファミリー亜鉛トランスポーターが存在することが報告されている¹²⁾。亜鉛トランスポーターのこのような膜上のトランスポーターを介した取り込みと排出による亜鉛の制御に加えて、システイン残基を多く含むメタロチオネインが細胞質において過剰な金属イオンを貯蔵する役割を果たしている³⁾。細胞内亜鉛はトランスポーターとメタロチオネインの発現量を制御する事で細胞内亜鉛濃度を一定に保たれていると考えられている。

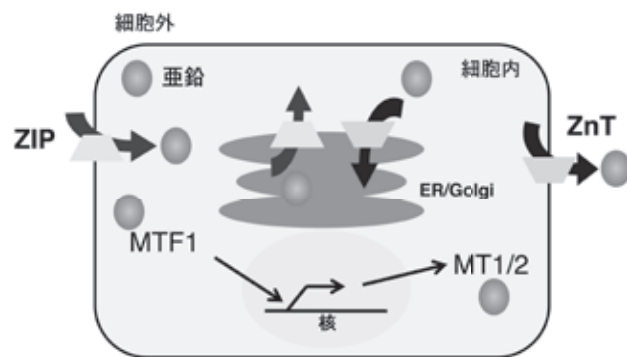


図1 細胞内亜鉛は亜鉛トランスポーターやメタロチオネインにより厳密に制御されている。細胞質における亜鉛濃度は亜鉛を増加させる方向性の輸送体として機能する ZIP ファミリータンパク質と、逆に細胞内亜鉛濃度を減少させる方向性をもつ輸送体として機能する ZnT ファミリータンパク質によって細胞内の亜鉛濃度は調節されている。また、細胞質内に発現している MTF1 (Metal-regulatory transcription factor 1) は細胞内の亜鉛上昇によってメタロチオネイン (metallothionein 1/2: MT1/2) を誘導する。MT1/2 は過剰な亜鉛イオンに対する解毒作用や反応系へ金属イオンを供給する貯蔵体としての機能を果たしている。

2. 亜鉛トランスポーターの生物学的役割

これまでに亜鉛トランスポーターの異常と疾患の関連を示した報告がなされてきている。腸性肢端皮膚炎 (acrodermatitis enteropathica: AE) は、小腸からの亜鉛吸収障害が原因で皮膚炎をはじめとする亜鉛欠乏による病態を呈する疾患で、亜鉛トランスポーター *SLC39A4/ZIP4* が AE の原因遺伝子であることが明らかになっている⁴⁾。ZIP4 は主に腸管上皮細胞に発現しており、AE が亜鉛トランスポーターによる亜鉛の取り込みの障害で起こる疾患であることが確認されている。また乳汁中の亜鉛欠乏が原因で皮膚炎・脱毛・発育不全を起こし離乳前に死亡する lethal milk マウスの原因遺伝子は、*Slc30a4/ZnT4* であることが明らかになっている⁵⁾。また、ヒトにおいても母親の *SLC30A2/ZnT2* 遺伝子の突然変異により乳児の低亜鉛症状が誘導されることが報告されており⁶⁾、乳汁中に含まれる亜鉛が乳腺上皮に発現している ZnT2 や ZnT4 を介して分泌されていることが示されている。さらに II 型糖尿病のリスク領域をゲノムワイドスクリーニングした結果、膵臓の β 細胞の分泌顆粒膜上に発現してインスリンの産生および貯蔵に関与することが知られている *ZnT8* の遺伝子をコードする領域が該当することが明らかになっている⁷⁾。さらに、最近、著者らの研究グ

ループでは *SLC39A13/ZIP13* が成長遅延をはじめ、骨・歯・眼・皮膚等の硬組織および結合組織において異常を呈する新規エーラスダンロス症候群の原因遺伝子の一つとして報告し⁸⁾、ZIP13 蛋白質がホモ 2 量体の複合体として存在することを見出した⁹⁾。また、*Slc39a14/ZIP14* 遺伝子欠損マウスの解析から、ZIP14 が G protein-coupled receptor (GPCR) のシグナル伝達に関わる全身成長の制御に重要であることを見出した¹⁰⁾。すなわち、亜鉛トランスポーターの遺伝子欠損マウスを用いて、亜鉛トランスポーターが細胞内シグナル伝達の制御を初めとする生体の様々な生物現象に関与していることが示されている¹¹⁾。

3. 創傷治癒と亜鉛

組織が損傷を受けると止血と炎症から始まる極めて複雑な一連の生体反応が起こるが、その治癒にいたるまでの過程は創傷治癒と呼ばれている¹²⁾。一般に創傷治癒過程は大きく 3 期 (炎症期 inflammatory stage, 細胞浸潤期 proliferative stage, 再形成期 remodeling stage) に分けられ、それぞれ overlap し、ヒトにおいては治癒過程終了には幾月もの歳月を要する。この過程には増殖因子をはじめとした多くのサイトカインが複雑かつ多用に関与し、いわゆるサイトカインネットワークを形成して、極めて重要な役割を果たしていると考えられている¹³⁾。

一方、亜鉛が皮膚の新陳代謝に作用し、創傷の修復促進作用があることが、古くから知られている^{14,15)}。また、民間で湿疹や火傷の塗り薬として使われた歴史があり、亜鉛が皮膚の傷を治し、皮膚を正常に保つ働きがあることが経験的に知られていた。これまで、この亜鉛の創傷治癒における役割として、創傷治癒過程では蛋白合成が活性化されており、蛋白質合成が起こるさいに大量の亜鉛が消費される必要性があるという単純な解釈しなされていなかった。

4. 創傷治癒における亜鉛トランスポーターの役割

著者らの研究グループでは、これまでマスト細胞機能発現における亜鉛/亜鉛トランスポーターの役割について多数報告している¹⁶⁻²¹⁾。マスト細胞はアレルギー反応においてはアレルギー症状を増悪化する細胞として認知されている^{22,23)}。しかしながら、マスト細胞は創傷治癒において、ポジティブに制御していることが既に報告されている²⁴⁾。また、興味深いことに、マスト細胞のヒスタミン含有顆粒に、微量必須元素の亜鉛が含まれており、刺激に伴って細胞外に放出されることが知られている。この顆粒亜鉛はマスト細胞だけではなく、神経細胞のグルタミン酸含有シナプス小胞や β 細胞のインスリン含有顆粒においても観察されている。そこで、マスト細胞顆粒に含まれる亜鉛が創傷治癒に関与する可能性について検討することにした。マスト細胞では、亜鉛トランスポーター、ZnT ファミリーメンバーのなかで、*Slc30a/ZnT1, 2, 5, 6, 7* の発現が観察され、そのなかで *Slc30a2/ZnT2* が、マスト細胞において高発現していたことから、筆者らの研究グループでは ZnT2 がマスト細胞を介する創傷治癒に関与するのではないかと考え、研究を進めることにした。さらに、ZnT2 抗体を用いて免疫電顕法を実施したところ、マスト細胞の顆粒膜に ZnT2 が局在していることが明らかとなった (図2)。次に、ZnT2 がマスト細胞顆粒亜鉛の蓄積や放出亜鉛に関与しているか検討する目的で、*ZnT2* ノックアウト (*ZnT2-KO*) マウスを樹立し、*ZnT2-KO* マウスからマスト細胞を調整し、亜鉛の局在や放出亜鉛の有無を調査したところ、*ZnT2-KO* マウス由来のマスト細胞では顆粒亜鉛の蓄積 (図3)、刺激依存的な放出亜鉛が観察されなかった (図4)。以上のことから亜鉛トランスポーター *ZnT2* がマスト細胞の顆粒亜鉛蓄積の責任遺伝子であることが明らかとなった。

そこで、この *ZnT2-KO* マウスを用いて、創傷治癒と亜鉛の役割について検討していくことにした。*ZnT2-KO* マウスでは創傷治癒が野生型のマ

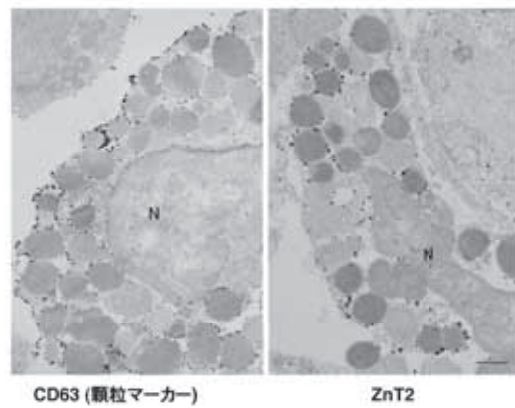


図2 亜鉛トランスポーター ZnT2 はマスト細胞顆粒膜に発現している
免疫電顕法を用いて、CD63 (顆粒マーカー) と ZnT2 の局在を観察した。CD63 と ZnT2 ともに、マスト細胞内顆粒膜周辺にシグナルが認められた。N は核。

野生型マウス由来マスト細胞 ZnT2-KOマウス由来マスト細胞

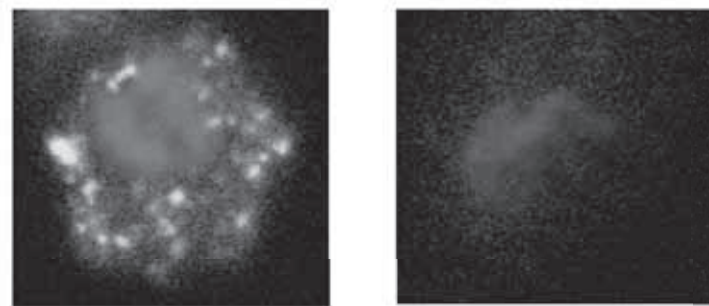


図3 亜鉛トランスポーター ZnT2 はマスト細胞顆粒内亜鉛の蓄積に関与している
ZnT2-KO マウスと野生型マウスからマスト細胞を調整し、亜鉛検出プローブ FluoZin-3 を用いて、細胞内顆粒亜鉛を観察。野生型マウス由来マスト細胞では細胞質に顆粒構造様のシグナルが観察されたが、ZnT2-KO マウス由来マスト細胞では FluoZin-3 のシグナルが検出できなかった。

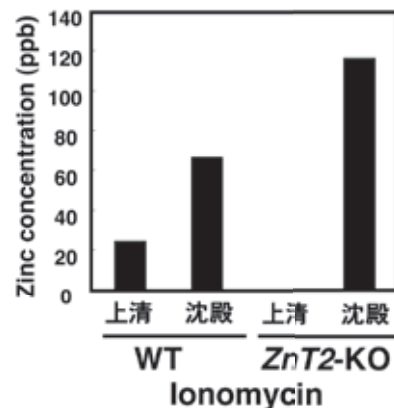


図4 亜鉛トランスポーター ZnT2 はマスト細胞からの亜鉛放出に関与している
ZnT2-KO マウスと野生型マウスからマスト細胞を調整し、イオノマイシンで刺激後、上清中の亜鉛濃度を ICP-AES で測定。上清中の亜鉛が野生型マウス由来マスト細胞で検出されたが、ZnT2-KO マウス由来マスト細胞の上清では検出限界以下であった。

ウスに比べ優位に遅延することが判明した (図5)。この結果は初めて、創傷治癒にかかわる亜鉛トランスポーターを同定できたことを意味する。さらにマスト細胞からの放出亜鉛が創傷治癒に関与するかどうか検討することにした。方法としてはマスト細胞欠損マウスである *Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh}* マウスを用いて、放出亜鉛が観察されない *ZnT2-KO* マウス由来マスト細胞とコントロールのマスト細胞をそれぞれ *Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh}* マウスに移植し、創傷治癒を観察した。コントロールのマスト細胞を移植した *Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh}* マウスでは正常な創傷治癒が観察されたが、*ZnT2-KO* マウス由来マスト細胞を移植した *Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh}* マウスでは優位な創傷治癒の遅延が認められた (図6)。

さらに、*ZnT2-KO* マウスで観察された創傷治癒の遅延が炎症期にかかわっているか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。著者はマウスに受傷後、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-KO* マウスにおいて、優位に低下していることが示された。

以上の結果はマスト細胞の放出亜鉛が創傷治癒の炎症期 IL-6 の産生に関与していることを示唆したものである。このように、マスト細胞から放出される亜鉛が創傷治癒をポジティブに制御していることを初めて明らかにした (図7)。

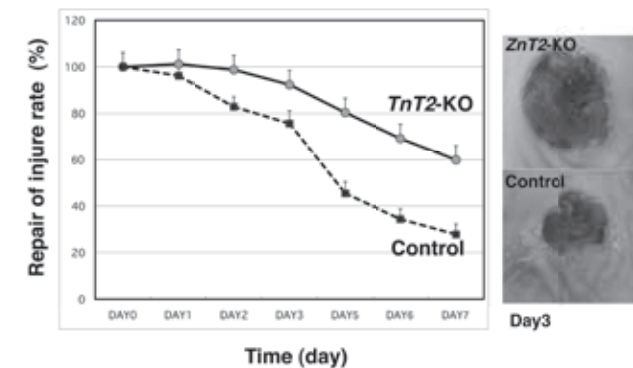


図5 亜鉛トランスポーター ZnT2 はマウスの創傷治癒に関与している
ZnT2-KO マウスと野生型マウスを用いて、創傷治癒アッセイを実施した。ZnT2-KO マウスにおいて、創傷治癒の遅延が観察された。

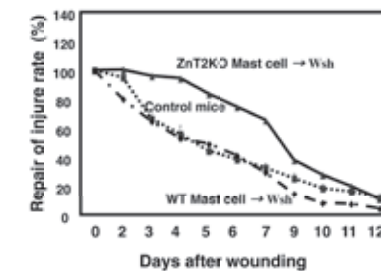
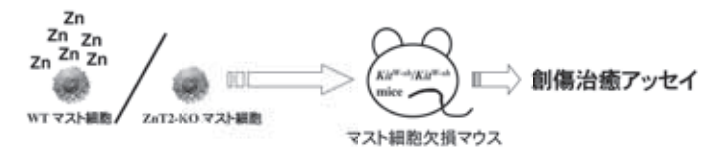


図6 マスト細胞からの放出亜鉛が創傷治癒に関与している
ZnT2-KO マウスと野生型マウスからそれぞれマスト細胞を調整し、マスト欠損マウス (*Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh}*) に移植した。移植後、創傷治癒アッセイを実施した。野生型マウス由来マスト細胞を移植した *Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh}* マウスではコントロールと同程度の創傷治癒が観察されたが、ZnT2-KO マウス由来マスト細胞を移植した *Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh}* マウスでは創傷治癒が遅延していた。

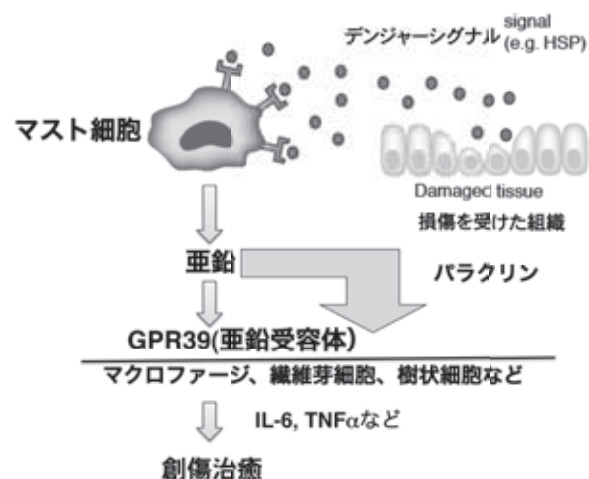


図7 亜鉛が創傷治癒に機能する作用機序 (モデル)

損傷を受けた組織からデンジャーシグナルが発生する。デンジャーシグナルは皮膚マスト細胞を活性化し、活性化されたマスト細胞は亜鉛を放出する。放出された亜鉛はマクロファージ、繊維芽細胞、樹状細胞に発現している亜鉛受容体 GPR39 を介して、サイトカイン産生を調節する。炎症性サイトカイン IL-6 は創傷治癒の炎症期を制御する。

おわりに

亜鉛は 1960 年代のプラサドのヒトの亜鉛欠乏症を示唆する報告がなされてから²⁵⁾、栄養素として位置付けられ、栄養学を中心とした解析がなされてきた。これらヒトの亜鉛欠乏症と一致して、亜鉛欠乏餌を与えたマウスやラットを用いて、胸腺の萎縮やヘルパー T 細胞の分化異常、ナチュラルキラー細胞依存的な細胞障害活性の低下など様々な免疫系の異常が報告されている^{26,27)}。今回、炎症反応のモデルの一つとして、創傷治癒と亜鉛に関する作用機序についての解説を行った。上述

したように生体内亜鉛動態は 23 種類ある亜鉛トランスporter やメタロチオネイン、MTF1 などの細胞質内亜鉛センサーによって精密に制御されている。今後は亜鉛トランスporter 欠損マウスやそのマウス由来の免疫担当細胞を用いて解析を遂行していくことにより、単純に、亜鉛欠乏により生じる炎症・免疫反応や分化異常といった現象論から、分子機構を中心とした研究にシフトしていくことにより、亜鉛と炎症・免疫・アレルギー反応の役割解明がさらに深まっていくものと思われる。

◆文献

- 1) Fukada, T. & Kambe, T. Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis. *Metallomics* 3, 662-674. 2011.
- 2) Kambe, T. An overview of a wide range of functions of ZnT and Zip zinc transporters in the secretory pathway. *Biosci Biotechnol Biochem* 75,1036-1043. 2011.
- 3) Andrews, G.K. Cellular zinc sensors : MTF-1 regulation of gene expression. *Biometals* 14, 223-237. 2001.
- 4) Wang, K., Zhou, B., Kuo, Y.M., Zemansky, J. & Gitschier, J. A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. *Am J Hum Genet* 71, 66-73. 2002.
- 5) Huang, L. & Gitschier, J. A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse. *Nat Genet* 17, 292-297. 1997.
- 6) Chohanadisai, W., Lonnerdal, B. & Kelleher, S.L.

Identification of a mutation in SLC30A2 (ZnT-2) in women with low milk zinc concentration that results in transient neonatal zinc deficiency. *J Biol Chem* 281, 39699-39707. 2006.

- 7) Sladek, R., et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445, 881-885. 2007.
- 8) Fukada, T., et al. The zinc transporter SLC39A13/ZIP13 is required for connective tissue development; its involvement in BMP/TGF-beta signaling pathways. *PLoS One* 3, e3642. 2008.
- 9) Bin, B.H., et al. Biochemical characterization of human ZIP13 protein : a homo-dimerized zinc transporter involved in the Spondylocheiro dysplastic Ehlers-Danlos syndrome. *J Biol Chem*. 2011.
- 10) Hojyo, S., et al. The zinc transporter SLC39A14/ZIP14 controls G-protein coupled receptor-mediated signaling required for systemic growth. *PLoS One* 6, e18059. 2011.
- 11) Fukada, T., Yamasaki, S., Nishida, K., Murakami, M. & Hirano, T. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases : Zinc signaling. *J Biol Inorg Chem* 16, 1123-1134. 2011.
- 12) Grose, R. & Werner, S. Wound-healing studies in transgenic and knockout mice. *Mol Biotechnol* 28, 147-166. 2004.
- 13) Schafer, M. & Werner, S. Transcriptional control of wound repair. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 69-92. 2007.
- 14) Pories, W.J., Henzel, J.H., Rob, C.G. & Strain, W.H. Acceleration of healing with zinc sulfate. *Ann Surg* 165, 432-436. 1967.
- 15) Pories, W.J., Henzel, J.H., Rob, C.G. & Strain, W.H. Acceleration of wound healing in man with zinc sulphate given by mouth. *Lancet* 1, 121-124. 1967.
- 16) Kabu, K., et al. Zinc is required for FcepsilonRI-mediated mast cell activation. *J Immunol* 177, 1296-1305. 2006.
- 17) Yamasaki, S., et al. Zinc is a novel intracellular second messenger. *J Cell Biol* 177, 637-645. 2007.
- 18) Nishida, K., et al. Zinc transporter Znt5/Slc30a5 is required for the mast cell-mediated delayed-type allergic reaction but not the immediate-type reaction. *J Exp Med* 206, 1351-1364. 2009.
- 19) Nishida, K., et al. Gab2, via PI-3K, regulates ARF1 in FcepsilonRI-mediated granule translocation and mast cell degranulation. *J Immunol* 187, 932-941. 2011.
- 20) Yamasaki, S., et al. A novel role of the L-type calcium channel alpha1D subunit as a gatekeeper for intracellular zinc signaling : zinc wave. *PLoS One* 7, e39654. 2012.
- 21) Nishida, K., Fukada, T., Yamasaki, S., Murakami, M. & Hirano, T. Zinc in allergy, autoimmune, and hard and connective tissue diseases. *IOS Press*, 2011.
- 22) Galli, S.J., Nakae, S. & Tsai, M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6, 135-142. 2005.
- 23) Kawakami, T., Ando, T., Kimura, M., Wilson, B.S. & Kawakami, Y. Mast cells in atopic dermatitis. *Curr Opin Immunol* 21, 666-678. 2009.
- 24) Weller, K., Foitzik, K., Paus, R., Syska, W. & Maurer, M. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *FASEB J* 20, 2366-2368. 2006.
- 25) Halsted, J.A. & Prasad, A.S. Zinc Deficiency in Man. *Isr Med J* 22, 307-315. 1963.
- 26) Prasad, A.S. Effects of zinc deficiency on Th1 and Th2 cytokine shifts. *J Infect Dis* 182 Suppl 1, S62-68. 2000.
- 27) Fraker, P.J. & King, L.E. Reprogramming of the immune system during zinc deficiency. *Annu Rev Nutr* 24, 277-298. 2004.