



Title	亜鉛による自己免疫疾患の抑制機構の解析
Author(s)	北林, 知佳
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/58519
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

目次

要旨	2
緒言	4
結果	6
考察	10
実験材料および方法	14
図表	21
謝辞	43
参考文献	44
研究業績	50

要旨

亜鉛は、微量必須ミネラルの一つであり、さまざまな酵素や転写因子の活性や構造を維持するのに必要な金属である。亜鉛は、免疫系や神経系にとって重要な働きを担っており、亜鉛欠乏により免疫能が低下することや味覚障害が起こる。亜鉛欠乏症のマウスモデルにおいて、末梢における Th1 細胞と Th2 細胞のバランスが崩れることが報告されている。また、亜鉛は自己免疫疾患の発症に関与する。例えば、DSS 誘導性腸炎モデルや Streptozotocin 誘導性糖尿病モデルにて、亜鉛投与にて症状が軽減されることが知られている。しかし、亜鉛が自己免疫疾患を抑制するメカニズムについて、その詳細な報告はされていない。このような背景のもと、私は、亜鉛と T 細胞の関係に着目して、亜鉛が自己免疫疾患を抑制するメカニズムを解析した。

自己免疫疾患のモデルとして、コラーゲン誘導性関節炎（ CIA : collagen-induced arthritis ）と実験的脳脊髄炎（ EAE : Experimental autoimmune encephalomyelitis ）を用いて、以下の解析を行った。亜鉛を飲料水に添加したマウスに、 CIA または EAE を誘導したところ、両自己免疫疾患ともその発症が軽減した。これらの疾患は、抗原特異的な Th17 細胞に依存していることがわかっている。 Th17 細胞は、 IL-17A をはじめとするさまざまな炎症性サイトカインを産生し、自己免疫疾患の発症に関与する。 EAE を抗原特異的な Th17 細胞の移入により誘導する実験系では、亜鉛を飲料水に添加したマウスでもコントロールマウスと同様に自己免疫疾患が発症した。そのため、亜鉛依存性に自己免疫疾患が抑制されるポイントは抗原特異的 Th17 細胞が出来上がる前の段階であることが示唆された。そこで、自己免疫疾患誘導後のヘルパー T 細胞の各サブセットへの分化への亜鉛の影響を検討した。血清中のサイトカイン濃度や所属リンパ節での T 細胞の細胞内染色の結果から、亜鉛投与により Th17 細胞の分化のみが有意に減少した。これらの結果から、亜鉛はヘルパー T 細胞のサブセットのうち、 Th17 細胞の分化を抑制していることが示唆された。

Th17 細胞への分化には、 TGF β と IL-6 刺激が T 細胞受容体の刺激とともに導入される必要がある。試験管内で、ナイーブ CD4 $^+$ T 細胞を Th17 細胞に分化誘導する培養系に亜鉛を添加して検討した。その結果、亜鉛処理により、 Th17 細胞への分化が抑制された。

さらに、IL-6 刺激による STAT3 のリン酸化を検討したところ、亜鉛処理により、STAT3 のリン酸化が阻害されることが明らかになった。IL-6 が受容体に結合すると、gp130 が JAK によりリン酸化され活性化する。STAT3 は、SH2 ドメインを介して、gp130 にリクルートされ、JAK によってリン酸化される。そこで、gp130 および JAK と STAT3 の結合に対する亜鉛の影響を検討した。その結果、亜鉛処理にて STAT3 の gp130 への結合が阻害された。同様に、亜鉛処理にて、JAK2 と rSTAT3 の結合も阻害された。しかし、gp130 や JAK 自身のリン酸化は、亜鉛処理を行っても抑制されなかった。これらのことから、亜鉛により STAT3 と JAK や gp130 との相互作用が阻害されることが明らかになった。

この亜鉛による STAT3 の活性化阻害は、亜鉛が STAT3 に直接作用することを証明するために、ネイティブ PAGE と円二色性偏光（CD）スペクトルの測定を行い、STAT3 の立体構造の変化を調べた。亜鉛を処理した細胞の溶解液をネイティブ PAGE で泳動し、ウエスタンプロッティングで検出したところ、STAT3 の泳動速度が亜鉛未処理のものに比べて速くなっていた。このことから、亜鉛の直接的な結合により、STAT3 の立体構造が変化していることが示唆された。さらに、タンパク質の 2 次構造をより詳細に調べるため CD スペクトルを測定したところ、亜鉛未処理の組換え STAT3 にて α -ヘリックス構造に由来するピークが減少した。以上の実験事実から、亜鉛は STAT3 に直接作用し、その立体構造を変化させていることが示唆された。

以上の結果から、亜鉛は STAT3 に直接結合して立体構造を変化させることにより、STAT3 の活性化を阻害していることが分かった。IL-6 による STAT3 の活性化は、Th17 細胞への分化に重要なステップであるため、Th17 細胞依存的な自己免疫疾患の発症が抑制されることが明らかになった。このことから本研究により、亜鉛を介した自己免疫疾患の治療の可能性が示唆された。

緒言

亜鉛は必須微量元素の一つであり⁽¹⁻⁴⁾、さまざまな酵素や転写因子の機能や構造維持に重要な金属である。亜鉛は免疫系においても、さまざまな役割を担っている^(3,5,6)。成熟 CD4⁺T 細胞および CD8⁺T 細胞は、亜鉛欠乏状態に抵抗性であり、萎縮した胸腺内においても生存することが報告されている⁽⁷⁾。さらに、亜鉛欠乏症のマウスモデルにおいて、末梢における Th1 細胞と Th2 細胞のバランスが崩れることができていている。亜鉛欠乏症では、Th1 細胞が産生するインターフェロン γ (IFN γ) やインターロイキン-2 (IL-2) 等の産生量は減少するが、Th2 細胞が産生する IL-4 や IL-6、IL-10 の産生量は変化しないことが報告されている⁽⁸⁾。また、亜鉛が自己免疫疾患に関与することが、以前から報告されている^(9,10)。慢性の自己免疫疾患において血清亜鉛濃度が変化すること、亜鉛投与によりいくつかの自己免疫疾患が改善することが報告されている。例えば、DSS 誘導性腸炎モデルや Streptozotocin 誘導性糖尿病モデルにおいて、亜鉛投与により症状が軽減されることが明らかになっている⁽¹¹⁻¹³⁾。しかしながら、亜鉛が疾患を抑制するメカニズムについて、その詳細な報告はされていない。

サイトカインや Toll 様受容体刺激により、亜鉛トランスポーターの発現は変化する⁽¹⁴⁻¹⁶⁾ことから、炎症や自己免疫疾患に関与する分子、例えば STAT3 などが亜鉛シグナルの標的となる可能性が考えられた。IL-6 刺激による STAT3 の活性化は、Th17 細胞への分化に必要である⁽¹⁷⁻²¹⁾。STAT3 は多様な生物学的反応で重要な役割を担っており、その活性化を制御する機構は非常に複雑である^(22,23)。また、CD4⁺T 細胞を、産生するサイトカインの種類にて Th1 や Th2 に分類する考え方とは、自己免疫疾患を含む生体内の様々な疾患でのエフェクター CD4⁺T 細胞役割を解明するのに非常に有効であった⁽²⁴⁻²⁶⁾。さらに、最近の研究により、Th1 と Th2 に加えて、Th17 細胞がこれまでに未知であった T 細胞のエフェクター反応に関与するサブタイプとして同定された。Th17 細胞は、IL-17A を含むいくつかの炎症性サイトカインを産生する^(18,21,27-29)。IL-17A 欠損マウスにおいては、コラーゲン誘導性関節炎 (CIA: Collagen-induced Arthritis) や実験的脳脊髄炎 (EAE: Experimental autoimmune encephalomyelitis) など、自己免疫疾患の誘導モデルに抵抗性であることが報告されている。さらに、F759 マウスや SKG マウス、IL-1 受容体アンタゴニスト欠

損マウスにおける関節炎の発症も、IL-17A を欠損させると抑制される^(18,30-33)。しかし、亜鉛と Th17 細胞の分化との関係については、未だ報告がない。

当研究室では、細胞内の遊離亜鉛濃度がさまざまな細胞外刺激により変化し、亜鉛が細胞内シグナル伝達分子として機能することを報告してきた^(14,15,39)。例えば、樹状細胞において、LPS (Lipopolysaccharide : リポ多糖) による TLR 刺激を行うと、亜鉛トランスポーターの発現が変化し、細胞内遊離亜鉛濃度が減少すること⁽¹⁵⁾、また、肥満細胞において、FceR-1 を刺激すると直ちに、核近傍から亜鉛が放出されることを明らかにし、このプロセスを「 Zinc wave 」と名づけた⁽³⁷⁾。また、FceR-1 刺激により誘導されるプロテインキナーゼ C の細胞膜への移行や、その後に起こる NF-κB 依存的なサイトカイン産生に、亜鉛トランスポーターの一つである Znt5 / Slc30a5 が関与することを示した⁽³⁸⁾。さらに、亜鉛トランスポーターの Zip6 / Slc39a6 / Liv1 の発現は STAT3 に依存しており、Zn フィンガーをもつ転写因子である Snail の核移行に必要であり、この一連の反応が細胞運動の制御に重要であることを示した⁽¹⁴⁾。その他の亜鉛トランスポーターでは、Zip13 / Slc39a13 が、結合組織の transforming growth factor (TGF) β / BMP シグナルに重要な役割を担っていることも報告した⁽³⁹⁾。さらに、別のグループからは、線虫モデルにおいて、亜鉛トランスポーターの CDF1 (線虫における Znt1 の相同分子種) は、亜鉛の流出を促進し、細胞内亜鉛濃度を減少させることで、ERK シグナルをポジティブに制御していることが報告されている⁽⁴⁰⁾。これらの報告から、亜鉛が標的分子の構造に直接影響し、生物学的活性を変化させている “亜鉛シグナル” が様々な細胞腫にて存在することが示唆されていた。しかし、T 細胞の生体内での機能と亜鉛の効果を直接制御する “亜鉛シグナル” の標的分子は同定されていない。

本研究により、Th17 分化において重要なステップである STAT3 の活性化を、亜鉛が直接的に抑制できることが明らかになった。さらに、この Th17 細胞の分化抑制が亜鉛依存性の自己免疫疾患抑制のメカニズムであることを強く示唆した。そのことから、STAT3 は T 細胞における亜鉛のシグナルの標的分子であり、亜鉛のシグナルの標的分子が自己免疫疾患の治療起点になりうることをはじめて示唆した。

結果

生体内において、亜鉛は CIA の症状を抑制し、かつ、病原 T 細胞の Th17 への分化を阻害している

生体内における Th17 細胞の分化を誘導するため、Th17 細胞依存的な自己免疫疾患のマウスモデルであるコラーゲン誘導性関節炎（CIA : collagen-induced arthritis）を用いた。CIA モデルは、報告どおり IL-6 と IL-17A に依存した（参考データ図 S1）^(41,46)。飲料水中に亜鉛を 3000 p.p.m. 添加したマウスに CIA を誘導したところ、症状が顕著に抑制された（図 1.A）。実験的脳脊髄炎（EAE : experimental autoimmune encephalomyelitis）も Th17 細胞依存的な自己免疫疾患モデルとして知られている^(30,42)。そこで、亜鉛投与マウスに EAE を誘導したところ、CIA と同様に EAE でも症状が軽減された（図 1.B）。

マウスに 2000 - 4000 p.p.m. の亜鉛を飲料水に添加して投与する報告がいくつかある⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾。そこで、2 ヶ月間 3000 p.p.m. の亜鉛を投与したマウスの免疫系が正常であるかを確認した。マウスのリンパ節や脾臓を摘出し、免疫系細胞への亜鉛の影響を解析した。その結果、リンパ節や脾臓の大きさに変化は認められなかった。また、CD4⁺T 細胞や CD8⁺T 細胞、B 細胞、NK 細胞、CD11c⁺細胞、CD11b⁺細胞の割合や数に、変化は見られなかつた（参考データ図 S2）。また、体重についても差は見られなかつた（data not shown）。これらの結果から、3000 p.p.m. の亜鉛投与でも、免疫系は正常に機能していると考えられる。さらに、EAE を誘導したマウスからの CD4⁺T 細胞を試験管内で再刺激した後に、マウスに移入し EAE を発症させる誘導系（adoptive EAE）を実施した。3000 p.p.m. の亜鉛を 1 ヶ月間投与したマウスに、CD4⁺T 細胞を移入したところ、コントロールマウスと同様に EAE を発症した（図 1.C）。このことから、亜鉛投与マウスにおいても、Th17 細胞の活性化や炎症の誘導など Th17 細胞による免疫反応依存性の自己免疫疾患が、正常に誘導された。以上の結果から、亜鉛は Th17 細胞が分化した後の免疫反応に影響を与えていないことが強く示唆され、逆に、亜鉛はナイーブ CD4⁺T 細胞が Th17 細胞へ分化する段階を阻害している可能性が示唆された。そこで、T 細胞から産生されるサイトカインである IFN γ や IL-4、IL-17A の血清中の濃度を測定し、それぞれ Th1、Th2、Th17 サブセ

ットへの亜鉛の影響を個別に検討した。その結果、亜鉛投与マウスにおいては、血清中の IL-17A 濃度のみが減少していた（図 1.D）（data not shown）。さらに、ex vivo での実験を行った。CIA を誘導したマウスから所属リンパ節を摘出して、抗原で再刺激して T 細胞を活性化させた。この培養上清中の IL-17A 濃度を測定した。その結果、in vivo での結果と同様に、亜鉛投与マウスでは、IL-17A 産生が減少していたが、IFN γ 産生には有意な差が見られなかった（図 1.E）。さらに、所属リンパ節におけるヘルパーT 細胞のサブセプトを、フローサイトメーターを用いて解析したところ、亜鉛投与マウスでは、Th17 細胞の割合と数が共に減少していた。一方、制御性 T 細胞（Treg : regulatory T cell）と Th1 細胞の割合や数に、有意な変化は認められなかった（図 1.F,G）。また IL-6 を尾静脈から投与したときの CD4 $^+$ T 細胞における STAT3 の活性化が、亜鉛投与マウスにおいては抑制されていた（図 1.H）。これらの結果より、マウス生体への亜鉛投与はナイーブ CD4 $^+$ T 細胞から Th17 細胞への分化を抑制することが明らかになった。そして、この阻害は、亜鉛が、CD4 $^+$ T 細胞における IL-6-STAT3 シグナルを抑制するためであることが示唆された。

試験管内において、亜鉛は Th17 細胞への分化を阻害する

亜鉛が STAT3 の活性化を抑制することで、Th17 細胞への分化を抑制するという仮説を検証するため、試験管内での実験を実施した。予備検討の結果から、100 μ M 未満の硫酸亜鉛は、CD4 $^+$ T 細胞の生存率に顕著な影響を与えないことが明らかになった（参考データ図 S4）ので、50 μ M 以下の硫酸亜鉛を用いて、以下の試験管内での実験を行った。

試験管内での Th17 細胞への分化は、亜鉛処理により顕著に抑制されたが、逆に、Foxp3 $^+$ 細胞への分化は促進された（図 2A）。しかし、IL-6 非存在下で行う通常の培養系で誘導した Treg と比較して、Foxp3 の発現レベルは低下していた。この Foxp3 の発現が低いことから示唆されたとおり、亜鉛存在下で分化した Foxp3 $^+$ 細胞は、ナイーブ CD4 $^+$ T 細胞の増殖抑制活性が、通常の Treg 細胞と比較して低かった（参考データ図 S5）。つまり、亜鉛存在下で培養した Foxp3 $^+$ 細胞は、Treg として機能的に成熟していない可能性がある。これらの結果は、亜鉛が STAT3 活性化に抑制して Th17 分化から Treg 分化に変換させた可能性がある。この仮説を直接検証するために、亜鉛の存在の有無における STAT3 リン

酸化を検討した。試験管内において、亜鉛は CD4⁺T 細胞における IL-6 による STAT3 のリン酸化を抑制した（図2B）。一方、IL-6 による JAK のリン酸化は、抑制されなかった（参考データ図 S6）。以上の結果より、亜鉛は、STAT3 の活性化を阻害することにより、Th17 細胞への分化を抑制し、逆に Treg 細胞の分化を増やしていることが明らかになった。

亜鉛は、IL-6 による STAT3 の活性化を抑制する

亜鉛が IL-6 による STAT3 の活性化をどのようにして抑制するかを詳細に調べるために、IL-6 シグナル伝達経路にある STAT3 を含むさまざまな分子に対する亜鉛の影響を検討した。細胞内亜鉛濃度が高い状態でも抵抗性があること、IL-6 応答性が良いことから、マウスの白血病細胞由来の細胞株である RAW246.7 細胞を以下の実験に使用した。亜鉛処理として、この細胞に 10 μM 硫酸亜鉛とピリジオン（Zn / Pyr）を加えた。ピリジオンは、亜鉛と複合体を形成し、細胞内に効率よく流入していくためのイオノフォアである^(15,36,37,50,51)。亜鉛処理により、IL-6 誘導性のタンパク質のリン酸化が亢進していた（図 3.A）。このことは、亜鉛はチロシン脱リン酸化酵素の阻害剤として作用するというこれまでの報告⁽⁵¹⁾ と一致する結果である。また亜鉛は、IL-6 による JAK と ERK1 / ERK2 のリン酸化も亢進した（図 3.A）。さらに、ERK1 / 2 の標的分子である EGR1 の発現も亢進していた（参考データ図 S7）。それとは対照的に、IL-6 による STAT3 のリン酸化は、亜鉛によって阻害された（図 3.A）。これらの結果は、亜鉛が IL-6 シグナル伝達系のうち、STAT3 の活性化のみを抑制することを強く示唆する。

亜鉛による STAT3 活性化の抑制効果は、IL-6 刺激ばかりではなく、IL-10 や LPS 刺激においても観察された（図 3.B）。さらに、亜鉛処理細胞では、IL-6 刺激による STAT3 の核移行が抑えられていることから、亜鉛は STAT3 を機能的にも抑制していること示唆された（図 3.C）。実際、亜鉛は STAT3 が標的DNAに結合することを抑制して（図 3.D）、STAT3 の標的遺伝子である SOCS3 の遺伝子発現を阻害した（図 3.E）。以上のことから、亜鉛は、IL-6 刺激後 JAK や ERK の活性化は抑制せず、STAT3 の活性化とそれに引き続く機能発現を特異的に阻害することが明らかになった。

亜鉛は STAT3 の立体構造を変化させる

亜鉛が STAT3 に直接結合できるか否かを調べるために、組換え STAT3 (rSTAT3) を用いて、実験を行った。その結果、亜鉛は、JAK の自己リン酸化に影響することなく、JAK による STAT3 のリン酸化を阻害していた (図.4A)。さらに、亜鉛は JAK の人工基質であるポリ-アラニン-グルタミン酸-リジン-チロシン ペプチド (poly-AEKY) の JAK によるリン酸化も阻害しなかった (図.4B)。加えて、細胞溶解液中の STAT3 も rSTAT3 もいずれも、亜鉛を固相化した IMAC ビーズに結合した (図.4C)。これらの結果から、亜鉛は STAT3 に直接結合し、STAT3 の活性化を阻害していることが強く示唆された。

次に、亜鉛の直接的な結合が STAT3 の立体構造にどのように影響するのかについて、検討を行った。亜鉛処理を行った細胞の溶解液を、ネイティブ PAGE で分画した結果、亜鉛処理した STAT3 は、未処理のものに比べて速く泳動されることが明らかになった (図.4D, 左)。しかし、このような効果は、チューブリンには見られなかった (図.4D, 右)。この結果から、亜鉛が STAT3 の立体構造を変化させていることが考えられた。そこで、このことを証明するために、亜鉛処理の有無の条件において、STAT3 タンパク質の 2 次構造を CD スペクトル解析を用いて測定した。その結果、 α -ヘリックス構造に特徴的な波長である、209 – 222 nm の吸収極大が、亜鉛の添加にて濃度依存的に減少した (図.4E)。この結果から、亜鉛は STAT3 に直接結合し、STAT3 の α -ヘリックス構造を変化させてい ることが明らかになった。

さらに、IL-6 が受容体に結合すると、gp130 のチロシンが JAK によりリン酸化され活性化する⁽¹⁷⁾。STAT3 は、SH2 ドメインを介して、gp130 の YxxQ モチーフのリン酸化チロシンにリクルートされ、JAK によってチロシンがリン酸化される。亜鉛処理にて STAT3 の gp130 の YxxQ モチーフのリン酸化チロシンへの結合が阻害された (図.4F)。同様に、亜鉛処理にて、JAK2 と rSTAT3 の結合も阻害された (図.4G)。以上の結果から、亜鉛の直接的な結合による STAT3 の立体構造の変化は、JAK や gp130 との相互作用を阻害する事が明らかになった。

考察

本研究では、はじめに、亜鉛が CIA の発症を抑制することを示した。さらに、血清中の IL-17A 濃度は減少するが、IFN γ 濃度は変化しないこと、そして、所属リンパ節中で Th17 細胞が減少するが、Th1 細胞は変化しないことを明らかにした。さらに、生体内で CD4 $^{+}$ T 細胞における IL-6 による STAT3 のリン酸化が、亜鉛投与により抑制された。加えて、試験管内においても、亜鉛は STAT3 のリン酸化を阻害し、Th17 細胞の分化を抑制していることを示した。以上の結果から、亜鉛は CIA 誘導後の Th17 細胞への分化を抑制することが示唆された。その抑制メカニズムの解析により、亜鉛は STAT3 の立体構造を変化させ、IL-6 刺激後の STAT3 の活性化を阻害することが明らかになった。つまり、亜鉛は STAT3 の活性化を直接阻害し、その結果 Th17 細胞への分化を抑制していることが分かった。

亜鉛は、生体が正常な生理的機能を維持するのに必要な栄養素である。しかし、過剰な亜鉛は、生体にとって有毒であると考えられている。しかしながら、2 ヶ月間 3000 p.p.m. の亜鉛投与においても、リンパ節や脾臓、免疫系の細胞集団に異常は見られなかった（参考データ図 S2）。亜鉛投与による血清中亜鉛濃度は約 30 μ M であり、コントロール群では約 15 μ M であった（参考データ図 S3）。試験管内の実験においても、この濃度の亜鉛は、T 細胞の細胞死を促進しない濃度であることが確認できた（参考データ図 S4）。また、亜鉛投与群においても、コントロール群と比較して、体重に差は見られなかった（data not shown）。さらに、pathogenic な T 細胞を移入して誘導する EAE モデルにおいては、亜鉛投与マウスにおいてもコントロールマウスと比較して、発症に差は見られなかった（図.1C）。これらの結果から、3000 p.p.m. の亜鉛添加飲料水の投与は、マウスの免疫応答には最小の影響しかないと考えられる。

試験管内での Th17 細胞への分化誘導系においては、50 μ M 以下の硫酸亜鉛を用いた。一般的に細胞において、細胞内亜鉛濃度は、亜鉛トランスポーターによって制御されている⁽³⁴⁾。亜鉛トランスポーターにはインポーターとして働く ZIP / SLC39 ファミリーとエクスポートとして働く ZNT / SLC30 ファミリーが存在する。哺乳類においては、ZIP ファミリーは 14 種類、ZNT ファミリーは 10 種類が報告されている。生理的な条件では、亜鉛はこのようなトランスポーターを介して細胞内に流入するため、T 細胞の初代培養系

においては、トランスポーターとは無関係に亜鉛を細胞内に強制導入する Zn / Pyr ではなく、硫酸亜鉛のみを用いて実験を行った。Th17 細胞への分化誘導系で、4 日間培養した後でも、120 μM 以下の亜鉛濃度のときは、T 細胞は生存していた。また、25 μM 以上の濃度の場合、Th17 への分化が抑制されていた（図2A）。さらに、3000 p.p.m. 亜鉛添加飲料水を投与したマウスにおける、血清中亜鉛濃度は約 30 μM であることが判った（参考データ図 S3）。正常マウスの、血清中亜鉛濃度は約 15 μM である（参考データ図 S3）、マウスは血中亜鉛に関して非常に大きな緩衝量を持つことがわかる。本研究では、細胞の生存に影響を与えるために、50 μM 以下の硫酸亜鉛を、初代培養 T 細胞を用いた実験系に使用した。

一方、シグナル伝達に関する生化学的な研究手法を用いて行われるさまざまな細胞に対する亜鉛の影響を検討した研究はこれまでに多くある。それらでは、亜鉛を細胞内に強制的に導入する Zn / Pyr が主として使用されている^(15,36,37,50,51)。それらの報告を調べたところ、4-20 μM の Zn / Pyr が用いられていた。Zn / Pyr を用いる利点は、Zn イオンが Pyr と複合体を形成し、亜鉛トランスポーターを介さずに細胞膜を直接透過できるため、非常に早く細胞内に亜鉛が流入させることができる点である。IL-6 のシグナル伝達では、シグナル伝達分子が非常に素早く活性化されるため、亜鉛が細胞内に素早く流入することが、亜鉛がシグナル伝達に与える影響を検討する際に、重要であると考えた。そこで、メカニズム解析の実験では、10 μM の Zn / Pyr を用いて細胞を処理することとした。この方法を使用して、IL-6 のシグナル伝達に関わる STAT3 の活性化を、亜鉛が抑制することを明らかにした。生体レベルの実験で、CIA 誘導時に Treg への影響は少なく、主に Th17 細胞を抑制していた。この結果は、試験管内での実験での、Th17 細胞への分化が抑制されるが、機能的な Treg の数には影響しないという結果と一致している。そして、生体内、試験管内、どちらの実験においても、IL-6 誘導性の STAT3 の活性化は顕著に抑制されていた。これらの結果から、Th17 細胞の分化で重要な STAT3 の活性化を、亜鉛が直接的に阻害していることが示唆された。

亜鉛が STAT3 の活性化を抑えることを示したが、STAT3 以外の他の STAT ファミリーに対しても、同様に抑制するのだろうか。生体内レベルの実験では、亜鉛投与により Th17 細胞が減少することが明らかになったが、Th1 細胞については顕著な差は見られなかった。

この生体内での結果と同様に、試験管内での実験においても、Th1 細胞への分化抑制よりも、Th17 細胞への分化抑制のほうが、より顕著であった（参考データ S9）。これらの結果から、亜鉛は Th1 細胞よりも Th17 細胞への分化をより効果的に抑制すると考えられる。しかし、Zn / Pyr を用いた実験では、STAT1 や STAT4 を含む他の STAT ファミリーの活性化も、STAT3 と同様に抑制された（参考データ S10）。このマウス生体内と試験管内の結果の相違は、生体内にて Th1 細胞と Th17 細胞で亜鉛トランスポーターや亜鉛結合タンパクのプロファイルが異なるためであることも理由の一つである可能性がある。生理的な条件下では、亜鉛は、その細胞内への流入効率の差異から Th17 細胞の STAT3 に対して作用するのに対し、試験管内では、亜鉛を Zn / Pyr を用い強制的に流入させて STAT3 以外の STAT ファミリー分子も抑制される可能性がある。実際に、Th1 細胞と Th17 細胞でいくつかの亜鉛トランスポーターの発現量が異なることが、確認できた（参考データ S11）。マウスの生体内では、亜鉛は STAT ファミリーの中でも STAT3 に比較的特異的に作用する。このことがヒトの系でも再現できれば、Th17 細胞が関与する自己免疫疾患などの炎症性疾患を抑制するのに、亜鉛は効果的な方法であると考えられる。

今回、私たちは、亜鉛を大量に飲料水に投与して、実験に用いた。亜鉛濃度が生理的な条件下での細胞内亜鉛の恒常性変化の範囲内でも、STAT3 の活性化を亜鉛は抑制しているのであろうか。私たちは、亜鉛による STAT3 の抑制は、STAT3 のポジティブフィードバック制御機構の一つである可能性を考えている。サイトカインなどさまざまな外部刺激により、亜鉛トランスポーターの mRNA の発現が変化する。このような細胞内亜鉛の恒常性を変化させる様な外部刺激は、T 細胞を含むさまざまな細胞や組織において、STAT3 の活性化を誘導する⁽⁵³⁻⁵⁶⁾。また、ナイーブ CD4⁺T 細胞に比べて、Th17 細胞では、亜鉛の蛍光標識剤であるニューポートグリーンの蛍光強度が減少していた（参考データ図 S12）。このことから、Th17 細胞では、その分化段階に応じ、細胞内の亜鉛濃度が低下し、T 細胞が Th17 細胞へ分化するのを亢進している可能性がある。さらに、今回の研究では、STAT3 の立体構造は、亜鉛が直接的に結合することで変化した。STAT3 の構造的な変化は、ネイティブ PAGE と CD スペクトルを用いて検出した。亜鉛によって、STAT3 の立体構造が変化すると、STAT3 の活性化など IL-6 シグナルの重要なステップが阻害された。実際、IL-6 刺激による STAT3 の核移行および転写活性は、亜鉛処理により阻害されてい

た。さらに、亜鉛が結合した STAT3 には、JAK1 や gp130 のリン酸化チロシン部位と相互作用できなかった。以上の実験データと考察から、STAT3 は、T 細胞における亜鉛シグナルの標的であることも十分考えられる。

今回の研究にて、亜鉛が直接的に STAT3 の活性化を抑制することが明らかになった。STAT3 の活性化は、自己免疫疾患に関する Th17 細胞への分化に重要なステップであり、それを抑制することは、自己免疫疾患の発症を抑制することにつながる。そのため、亜鉛を介した自己免疫疾患の治療の可能性が示唆された。

実験材料および方法

マウス

C57BL/6 は、日本 SLC およびクレアジャパンより購入した。マウスの飼育はすべて、大阪大学医学部動物実験施設および理化学研究所 RCAI の指針に従い、SPF 実験室にて行った。

亜鉛の投与

硫酸亜鉛七水和物（シグマ）を亜鉛濃度 3000 p.p.m. で DDW（double - distilled water）に溶解し、飲料水のかわりにマウスに与えた。コントロール群には DDW を投与した。5 週齢で亜鉛の投与を開始し、1 ヶ月投与しているマウスを実験に使用した。CIA 誘導後も亜鉛の投与は継続して行った。

EAE の誘導

Active EAE. 200 μ g MOG ペプチド（35-MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK-55, Sigma Genossys）と 1mg *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (DIFCO Laboratories) 入りの CFA (Freund's complete adjuvant) で w/o 型エマルジョンを調製し、尻尾のつけ根に 100 μ l 皮下注射した。200 ng の pertussis toxin (LIST Biological laboratories) を day 0, 2, 7 に尾静脈より静脈注射した。免疫後マウスの行動を観察し、神経障害の症状を次のように数値化した。0：正常、1：弛緩した尾、2：後肢の脱力あるいは歩行異常、3：完全な後肢麻痺、4：前肢および後肢の麻痺、5：瀕死あるいは死亡。

Passive EAE. 200 μ g MOG ペプチド（35-MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK-55, Sigma Genossys）と 1mg *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (DIFCO Laboratories) 入りの CFA (Freund's complete adjuvant) で w/o 型エマルジョンを調製し、尻尾のつけ根に 100 μ l 皮下注射した。200 ng の pertussis toxin (LIST Biological laboratories) を day 0, 2, 7 に尾静脈より静脈注射した。免疫後 11 日目のマウスの脾臓およびリンパ節から、MACS カラム (BD) を用いて CD4⁺T 細胞を単離した。CD4⁺T 細胞 (2×10^6) と MOG ペプチドを載せた BMDC (5×10^5)、rIL-23 (10ng / ml R&D) を 24 穴プレート

で培養した。3 日後、 5×10^6 個の CD4⁺T 細胞を 5 Gy の X 線を照射したマウスに、尾静脈より投与した。2 日後に 200 ng の pertussis toxin をマウスに尾静脈投与し、EAE の発症を誘導した。マウスの行動を観察し、神経障害の症状を次のように数値化した。0：正常、1：弛緩した尾、2：後肢の脱力あるいは歩行異常、3：完全な後肢麻痺、4：前肢および後肢の麻痺、5：瀕死あるいは死亡。

CIA の誘導

200 μg ニワトリ由来 2 型コラーゲン（Sigma）と 250 μg *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin cell wall skeleton (BCG-CWS) と 250 μg *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra 入りの CFA で w/o 型エマルジョンを調製し、背中に 200 μl 皮下投与した。初回免疫から 3 週間後に、同様のエマルジョンを尻尾の付け根に 200 μl 皮下投与した。2 次免疫後、マウスの関節炎の症状を観察し、次のように数値化した。0：正常、1：軽度の関節炎兆候、2：軽度の腫脹、3：中程度の腫脹、4：重度の腫脹。関節炎のスコアは、両手足（各 4 点満点）のスコアの合計（16 点満点）を示している。

ELISA

血清中または培養上清中の IFN γ 、IL-4 および IL-17A は、ELISA キット（BD または eBiosciences）を用いて測定した。

BMDC の調製

8 – 12 週齢の C57BL/6 の骨髓細胞を取り出しセルストレーナー（BD）に通して、0.165 M NH₄Cl で溶血し、10 % FCS とストレプトマイシン / ペニシリン G 入りの RPMI1640 培地で 2 時間培養した。培養後、軽くピペッティングして細胞を回収し、セルストレーナーに通した。1.5 $\times 10^6$ / well の細胞を 6 穴プレートを用いて、10 % FCS (Japan Bioserum) とストレプトマイシン / ペニシリン G 、0.6 % GM-CSF 培養上清 (murine GM-CSF Chinese hamster ovary cells; a gift from T. Sudo, Toray Silicon, Tokyo, Japan) 入りの RPMI1640 培地で培養した。培地は 2 日おきに交換し、浮遊した細胞を取り除いた。7 日間培養した細胞を PBS – EDTA を使って回収し、抗原提示細

胞として Th17 細胞分化の培養系に用いた。

In vitro Th17 細胞分化

ナイーブ CD4⁺T 細胞 (5×10^5 / well) を、抗 CD3 抗体 (1 μ g / ml)、IL-6 (500 ng / ml ; ヒト天然型)、TGF- β (5 ng / ml ; Pepro tech) と BMDC (2×10^5 / well) を 24 穴プレートを用いて 4 日間培養したものを解析した。亜鉛は、硫酸亜鉛 (シグマ) を培養系に添加した。

Intracellular cytokine staining

In vitro assay. 細胞培養液中に GolgiPlug (BD) を加え、PMA (500 ng/ml) とイオノマイシン (500 ng/ml) で刺激し、6 時間培養した。抗 CD4 抗体 (PE-Cy7)、抗 MHC classII 抗体 (biotin)、抗 CD19 抗体 (biotin)、抗 NK1.1 抗体 (biotin)、抗 CD44 抗体 (APC) で細胞を染色し、Streptavidin - Pacific Blue を処理した。次に、Fixation / Permeabilization solution (BD) を用いて細胞を固定し、Perm / Wash buffer (BD) を処理した。抗 IL-17A 抗体 (PE)、抗 Foxp3 抗体 (FITC) で染色し、CyAn flow cytometer (Dako Cytomation) で測定し、FlowJo ソフトウェアで解析した。

In vivo assay. 所属リンパ節から調製した細胞 (2×10^6) を、抗 CD3 抗体 (20 μ g/ml) と抗 CD28 抗体 (10 μ g/ml) で固層化したプレートで刺激し、GolgiPlug 存在下で 6 時間培養した。抗 CD4 抗体 (PE-Cy7)、抗 MHC classII 抗体 (biotin)、抗 CD19 抗体 (biotin)、抗 NK1.1 抗体 (biotin)、抗 CD44 抗体 (APC) で細胞を染色し、Streptavidin - Pacific Blue を処理した。次に、Fixation / Permeabilization solution (BD) を用いて細胞を固定し、Perm / Wash buffer (BD) を処理した。抗 IL-17A 抗体 (PE)、抗 Foxp3 抗体 (FITC) で染色し、CyAn flow cytometer (Dako Cytomation) で測定し、FlowJo ソフトウェアで解析した。

リン酸化 STAT3 の検出

In vitro assay. 野生型マウスから、リンパ節と脾臓を回収し、ナイロンウールカラムを用いて、T 細胞を濃縮した。 2×10^6 個の細胞を、100 μ M ZnSO₄ で 30 分間前処理し、

10 ng / ml IL-6 で 5 分間刺激した。Lyse / Fix buffer (BD) で、細胞を直ちに固定し、Perm Buffer III (BD) で、透過処理を行った。抗 CD19 抗体 (FITC)、抗 MHC クラス II 抗体 (FITC)、抗 CD4 抗体 (PE-Cy5)、抗 CD8 抗体 (APC)、抗 pSTAT3 (pY705) 抗体 (PE) で染色した後、FACSCalibur で測定し FlowJo ソフトウェアで解析した。

In vivo assay. 20 ng IL-6 を亜鉛投与マウスまたはコントロールマウスに、尾静脈投与した。15 分後、安樂死させ脾臓を回収した。脾臓から単細胞を調製し、直ちに Lyse / Fix buffer で固定し、Perm Buffer III で透過処理を行った。抗 CD19 抗体 (FITC)、抗 MHC クラス II 抗体 (FITC)、抗 CD4 抗体 (PE-Cy5)、抗 CD8 抗体 (APC)、抗 pSTAT3 (pY 705) 抗体 (PE) で染色した後、FACSCalibur で測定し FlowJo ソフトウェアで解析した。

ウエスタンブロッティング

RAW246.7 細胞を 12 時間スタバーション処理し、10 μ M ZnSO₄ と pyrithione (Zn / Pyr) を添加して 5 分間インキュベートした。その後、50 ng/ml IL-6 で 15 分間刺激した。細胞を 1 ml 1 % NP40 buffer (1 % NP40 , 20 mM Tris-HCl pH 7.4 , 150 mM NaCl , 5 μ g/ml aprotinin , 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF] , 1 mM Na₃VO₄) 懸濁し、SDS-PAGE で展開し、タンパク質を PVDF 膜にブロッティングした。抗体で処理し、enhanced chemiluminescence (ECL ; PerkinElmer Life Science) を用いて検出した。抗 Erk1 / 2 抗体、抗 phospho-Erk1 / 2 抗体、抗 JAK1 抗体は BD より購入した。抗 phospho-Tyr 1022 / 1023 -JAK1 抗体、抗 JAK2 抗体、抗 phospho-Tyr 1007 / 1008 -JAK 抗体、抗 STAT3 抗体、抗 phospho-Tyr 705 -STAT3 は Cell Signaling Technology より購入した。

遺伝子導入

Lipofectamine 2000 (Invitrogen) をプロトコール通りに用いて、細胞に遺伝子を導入した。10 μ g の発現プラスミド (pEFBOS および HA タグ付 JKA 1 をコードした pEFBOS) を用いた。細胞は、DNA-脂質複合体と 24 時間インキュベートした後に、生化学的解析に使用した。

免疫沈降法

1 % NP-40 緩衝液で細胞を溶解し、その溶解液 1 ml に 20 μ l のプロテイン A セファロースまたはプロテイン G セファロース、および 1 μ g 抗体を加えて、4 °C で 6 時間インキュベートした。免疫沈降物は、SDS-PAGE loading buffer で溶出し、SDS-PAGE で分離した後に、PVDF 膜上に転写した。

In vitro binding assay

ペプチド結合アッセイは、東レリサーチセンターより購入した gp130 (VVHSG-pY⁷⁶⁷RHQVPS および VVHSGY⁷⁶⁷RHQVPS) のビオチン化ペプチドを用いて行った。ペプチド (5 μ g) を 30 μ l のストレプトアビシン-セファロース (Pharmacia) と 4 °C で 2 時間インキュベートした。ビーズは 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) で 3 回洗浄した後、0.1 μ g リコンビナント STAT3 (rSTAT3) (Active Motif) と 4 °C で 3 時間インキュベートした。rSTAT3 は 4 °C で 2 時間 ZnSO₄ 処理をした。複合体は、SDS-PAGE で分離し、anti-STAT3 抗体でプロットした。JAK2-STAT3 の結合を検討するためには、GST-JAK2 (Active Motif) を使用した。GST-JAK2 (0.1 μ g) を、30 μ l グルタチオン-セファロース 4B (Pharmacia) と 4 °C で 2 時間インキュベートし、JAK2-結合ビーズは、rSTAT3 と 4 °C で 3 時間インキュベートした。

Precipitation assay using Zn immobilized on beads

Immobilized metal affinity chromatography (IMAC)-select affinity beads はシグマより購入した。IMAC-select affinity beads と ZnSO₄ (50 mM) を等量ずつ用いて、4 °C 1 時間混和し、亜鉛をビーズに固定した。ビーズを 1 % NP-40 緩衝液で 5 回洗浄した。rSTAT3 溶液または細胞溶解液にビーズ (30 μ l) を加えて、4 °C で 2 時間混和した。1 % NP-40 溶液で 4 回洗浄し、ビーズを沈降させた。ペレットを SDS-PAGE ローディングバッファーに懸濁させ、イムノプロッティングに用いた。

DNA pull-down assay

DNA pull-down assay は、以前記述した通りに実施した⁽⁴⁴⁾。

マウス *Socs3* プロモーター由来⁽⁴⁵⁾のマウス *Socs3* / STAT binding element (SBE) に対するビオチン化二本鎖 DNA プローブは、以下の通りである。mSOCS3 / SBE-F, biotin 3'-CAGTTCCAGGAATCGGGGGC-5' および mSOCS3 / SBE-R, biotin 3'-GCCCGCCGATTCTGGAACTG-5'。

In vitro kinase assay

293T-G133 細胞に pEFBOS-HA-JAK1 または空の pEFBOS を遺伝子導入し、JAK1 を活性化させるために G-CSF で刺激した。1 ml の細胞溶解液 [0.5 % NP-40, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 250 mM NaCl, 1 mM sodium vanadate, プロテアーゼ阻害剤] に細胞を懸濁した。遠心により細胞溶解液を調製し、500 μ l の細胞溶解液と 4 μ l 抗 HA 抗体 (clone 3F10, Roche)、30 μ l プロテイン G セファロースを混和した。4 °C で 4 時間インキュベートした後、ビーズを 0.5 ml の細胞溶解液 (プロテアーゼ阻害剤なし) で 3 回洗浄し、0.5 ml のキナーゼ緩衝液 [60 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 3 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂] で 3 回洗浄した。rSTAT3 または poly-AEKY (Sigma) を JAK の基質に使用した。50 μ l キナーゼ緩衝液 (1 mM ATP, 1.2 mM dithiothreitol 入り) と 50 ng rSTAT3 もしくは 1 μ g poly-AEKY を JAK と 30 °C 30 分間インキュベートして、キナーゼ反応を行った。Laemmli's SDS ローディングバッファーを加え反応を停止した後、反応生成物を SDS-PAGE で分離し、イムノブロッティングを行った。

Real-time PCR

SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) と GeneAmp 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を使用して、定量 PCR を行った。転写量は、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) を用いて補正した。プライマー配列は以下の通りである。Mouse *Socs3* — CCCAAGGCCGGAGATTTC, GGAGCCAGCGTGGATCTG, mouse *Egr1* — TAGCAGCAGCAGCACCAG, GGCTGGATAACTCGTCTCC, mouse *Gapdh* — AGCTGAACGGGAAGCTCACT, TGAAGTCGCAGGAGACAACC。

Circular dichroism spectroscopy

STAT3 の CD スペクトルの測定は、ペルチェ温度制御ユニット装備の Jasco J-820 CD スペクトルメーターを使用した。1 mm のキュベットと 1 μ M のタンパク質で、CD スペクトルを測定した。3 回の実験の平均値を求めた。組換え Flag タグ付マウス STAT3 は、カイコ-バキュロウイルスによるタンパク質発現系（Katakura Industries Co., Saitama, Japan）を用いて調製した。

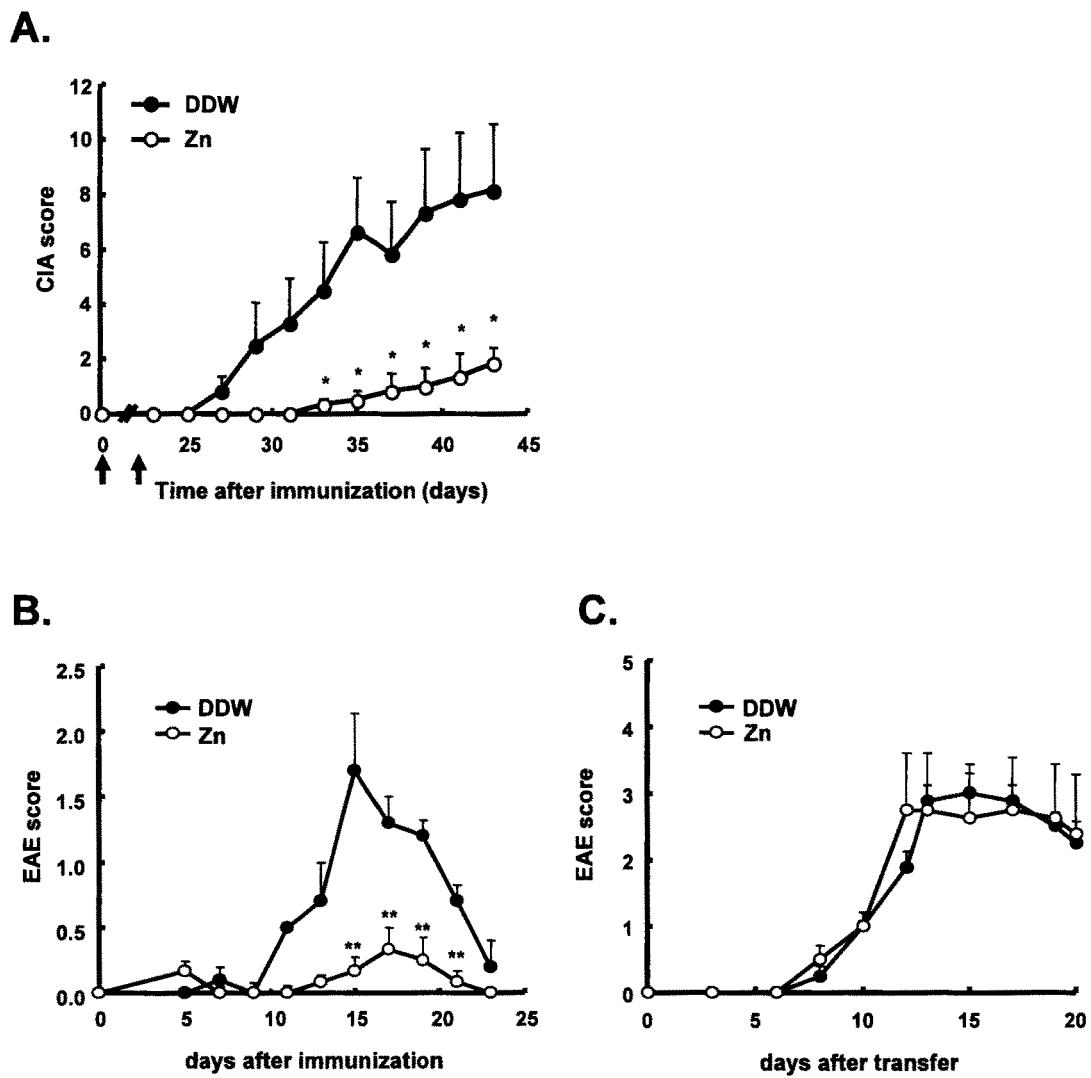


図 1. 亜鉛投与により、CIA の発症が抑制された

- (A) 3000 p.p.m.の亜鉛を飲料水中に添加し、1ヶ月間投与したマウスに CIA を誘導した。
- (B) 3000 p.p.m.の亜鉛を飲料水中に添加し、1ヶ月間投与したマウスに EAE を誘導した。
- (C) EAE を誘導したマウスから、CD4⁺T 細胞を単離し、試験管内で MOG ペプチドを載せた BMDC と共に培養した。3日間培養した後に、CD4⁺T 細胞を回収し、亜鉛投与マウスとコントロールマウスに尾静脈投与し、EAE を誘導した。

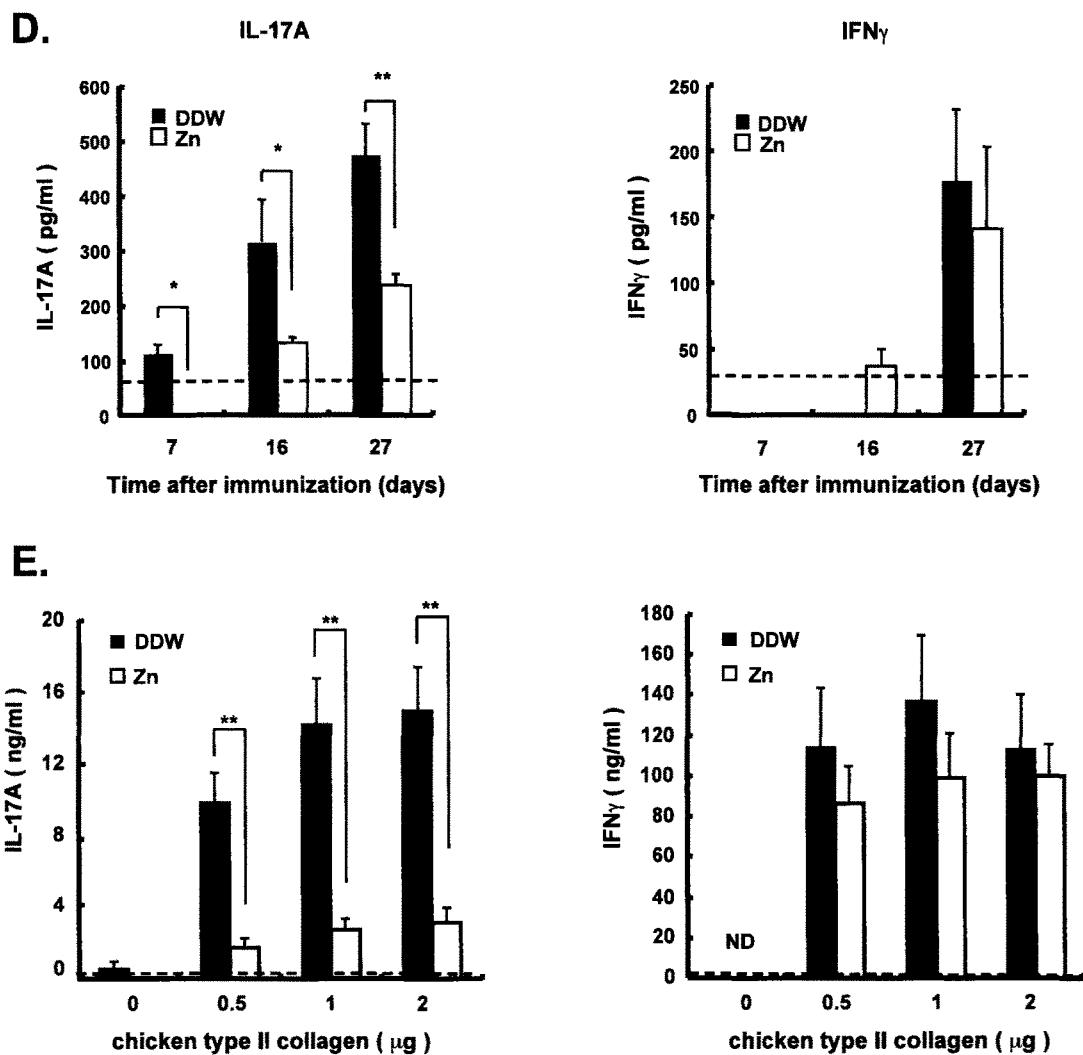


図 1. 亜鉛投与マウスは、CIA 誘導後の IL-17A 産生が減少した

(D) 亜鉛投与マウスとコントロールマウスに CIA を誘導し、1 回目の免疫後 7・16・27 日後の血清中 IL-17A および IFN γ 濃度を ELISA で測定した。

(E) 亜鉛投与マウスとコントロールマウスに CIA を誘導した。2 回目の免疫後 6 日目に所属リンパ節を回収した。単細胞に調製し、コラーゲンで再刺激して培養した。3 日後に培養上清を回収し、培養上清中の IL-17A および IFN γ 濃度を ELISA で測定した。

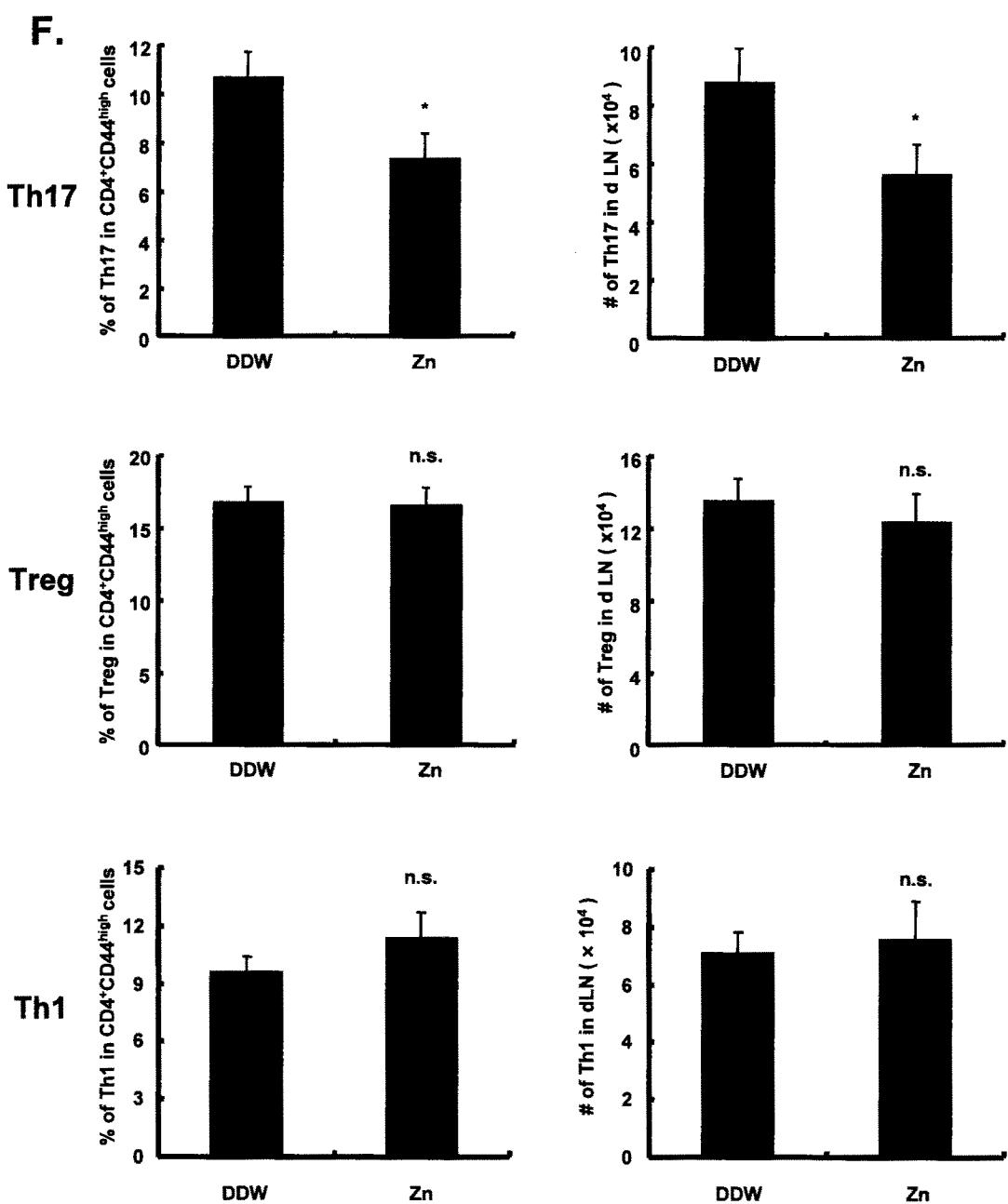


図 1. 亜鉛投与マウスの所属リンパ節中の Th17 細胞の数と割合が減少していた

(F) 亜鉛投与マウスとコントロールマウスに CIA を誘導した。2 回目の免疫後 6 日目に所属リンパ節を回収し、抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体で再刺激し、Golgi plug 存在下 6 時間培養した後に、細胞内染色を行い、Th17、Treg、Th1 細胞を検出した。

G.

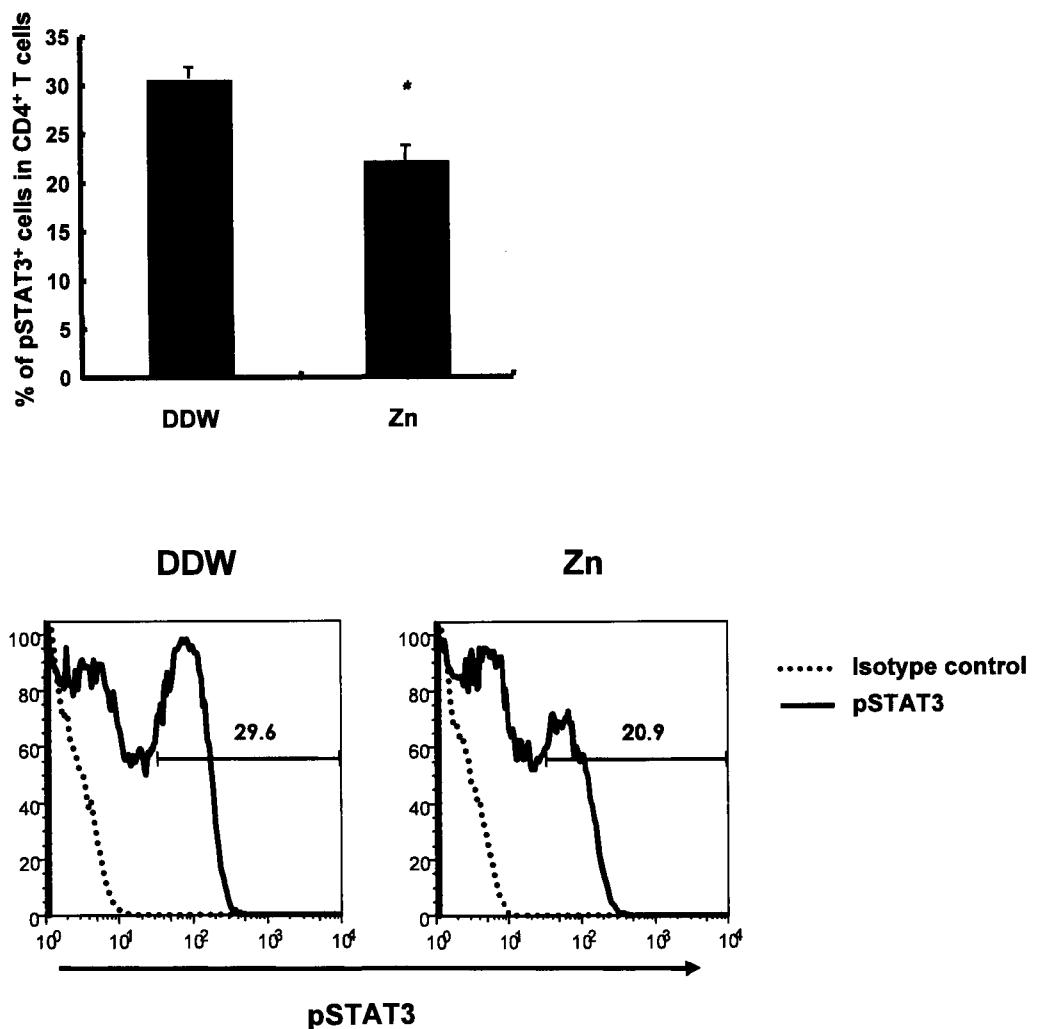


図 1. 亜鉛投与マウスでは、IL-6 投与による CD4+T 細胞の STAT3 の活性化が抑制された

(G) 亜鉛投与マウスとコントロールマウスに 20 ng IL-6 を尾静脈投与した。15 分後、脾臓を回収し、直ちに固定した後に、細胞内染色を行い、pSTAT3 を検出した。

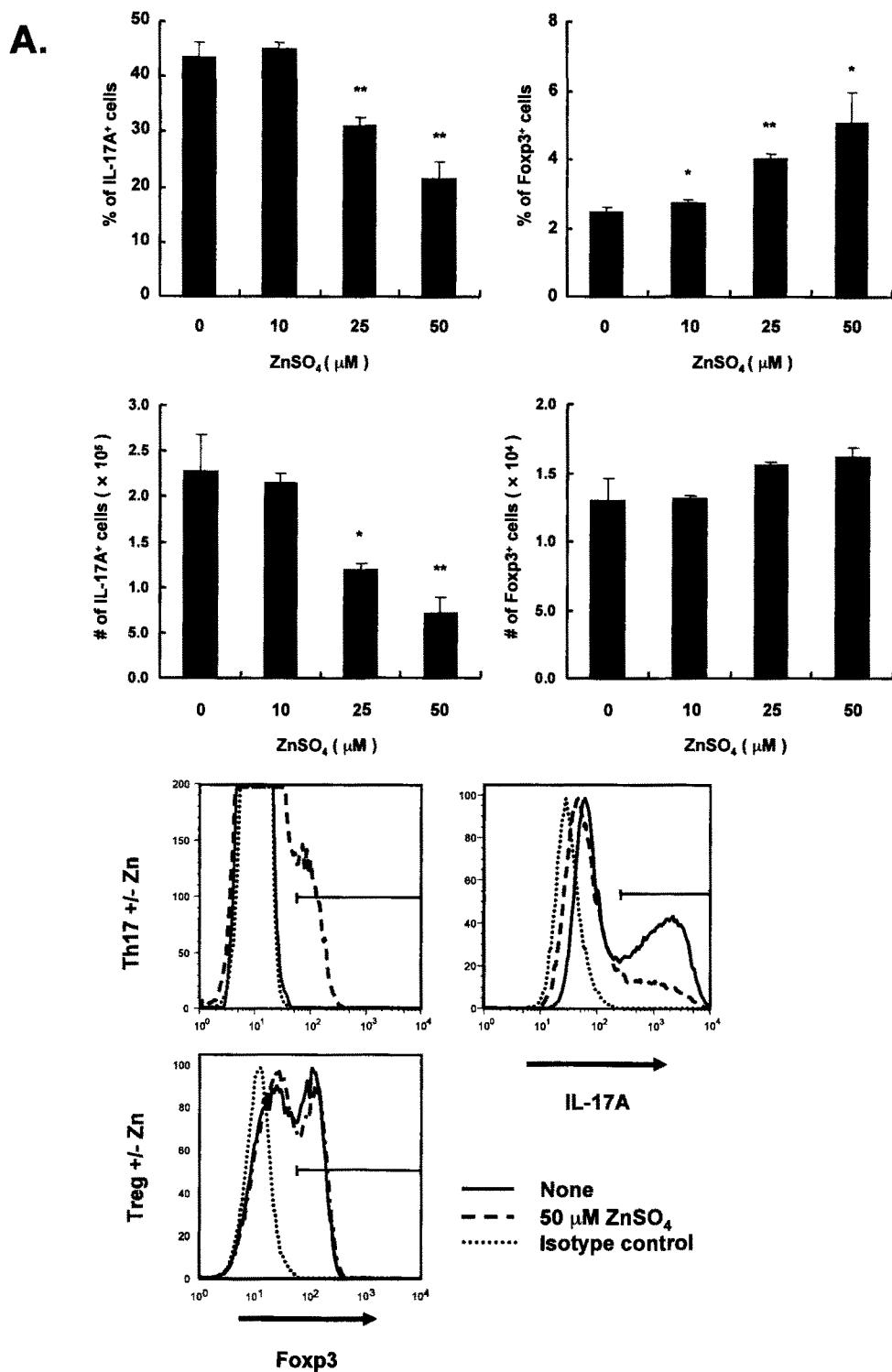


図 2. 亜鉛処理により、試験管内での Th17 細胞への分化が抑制された

(A) ナイーブ CD4⁺T 細胞を単離し、IL-6 と TGF β 存在下、BMDC と共に培養を行い、Th17 細胞への分化を誘導した。PMA / イオノマイシンで刺激し、golgi plug 存在下 6 時間培養した後、細胞内染色を行い、Th17 細胞と Treg 細胞を検出した。

B.

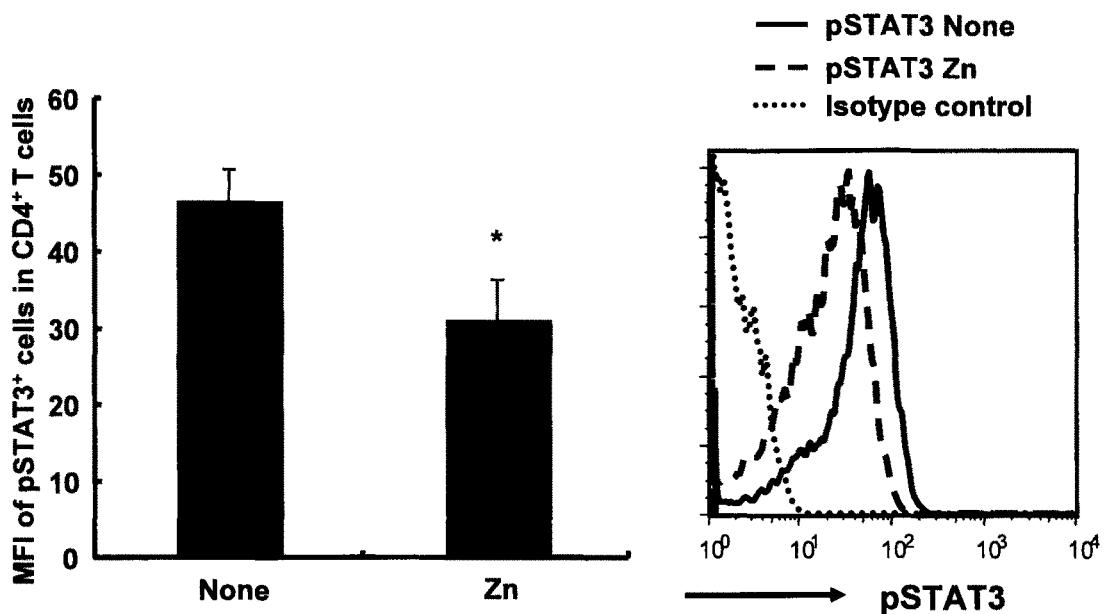
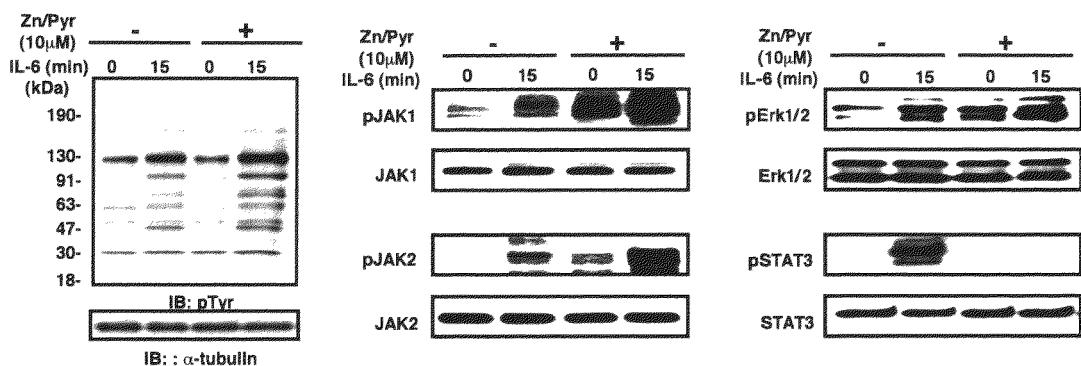


図 2. 亜鉛処理により試験管内での IL-6 刺激による STAT3 の活性化が抑制された

(B) C57BL/6 マウスの脾臓を摘出し、単細胞を調製した。脾臓細胞に亜鉛を 30 分間前処理し、IL-6 で刺激した。5 分後に直ちに細胞を固定して、細胞内染色を行い、CD4+T 細胞における pSTAT3 を FACS で検出した。

A.



B.

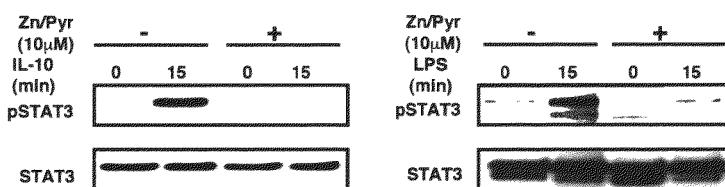


図 3. 亜鉛により IL-6 刺激による STAT3 の活性化が抑制された

(A) RAW246.7 細胞を 12 時間スタバーションした後に、Zn/Pyr で 5 分間前処理を行つた。その後、IL-6 で刺激し、15 分後に細胞溶解液を調製し、抗リン酸化チロシン抗体、抗 α -チューブリン抗体、抗 pJAK1 抗体、抗 JAK1、抗 pJAK2 抗体、抗 JAK2、抗 pERK1/2 抗体、抗 ERK1/2、抗 pSTAT3 抗体、抗 STAT3 抗体を用いてウエスタンプロッティングを行つた。

(B) RAW246.7 細胞を 12 時間スタバーションした後に、Zn/Pyr で 5 分間前処理を行つた。その後、IL-10 または LPS で刺激し、15 分後に細胞溶解液を調製し、抗 pSTAT3 抗体、抗 STAT3 抗体を用いてウエスタンプロッティングを行つた。

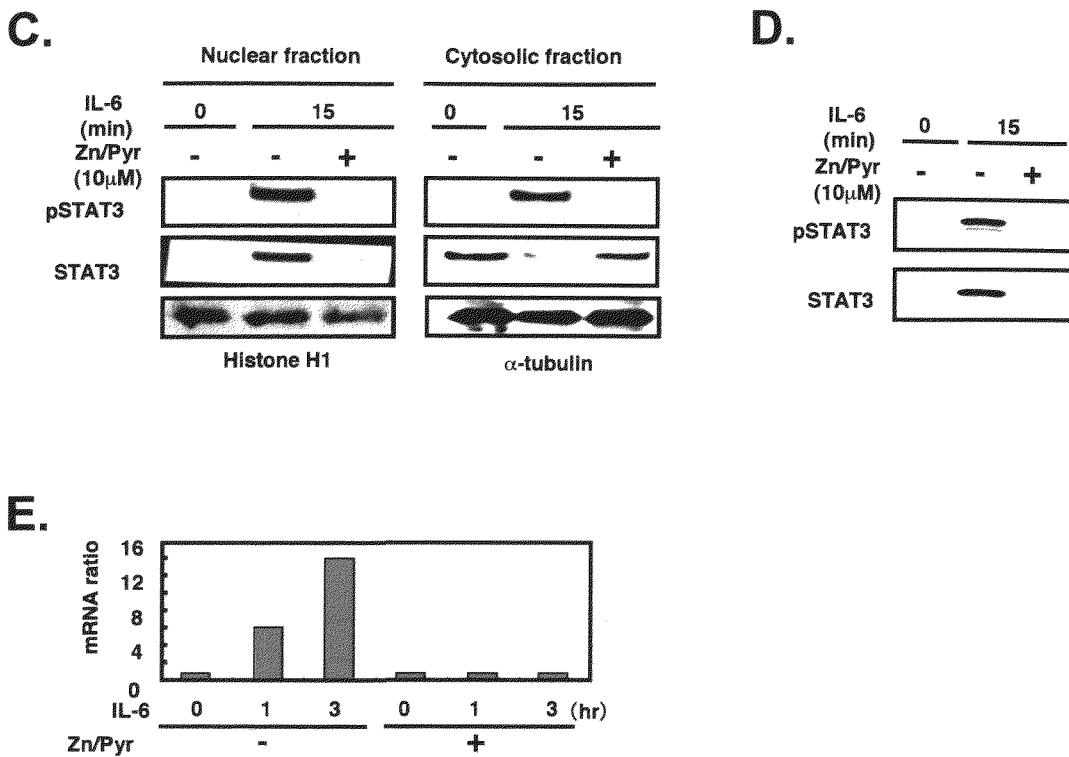


図 3. 亜鉛により IL-6 刺激による STAT3 の活性化が抑制された

(C) RAW246.7 細胞を 12 時間スタベーションした後に、Zn/Pyr で 5 分間前処理を行った。その後、IL-6 で刺激し、15 分後に細胞を回収し、細胞質画分と核画分に分け、ウエスタンブロッティングで検出した。

(D) RAW246.7 細胞を 12 時間スタベーションした後に、Zn/Pyr で 5 分間前処理を行った。その後、IL-6 で刺激し、15 分後に細胞を回収し、核画分を分離した。核画分とビオチン化 dsDNA プローブおよびストレプトアビジン-セファロースビーズをインキュベートした。タンパク質-DNA 複合体は SDS-PAGE で分離し、ウエスタンブロッティングで検出した。プローブは、マウス *SOCS3* 遺伝子の SBE を含む配列を用いた。

(E) Zn/Pyr 処理および IL-6 刺激を行った RAW246.7 細胞から、total RNA を抽出し、*SoCs3* および *Gapdh* 特異的なプライマーを用いて、定量 PCR を行った。

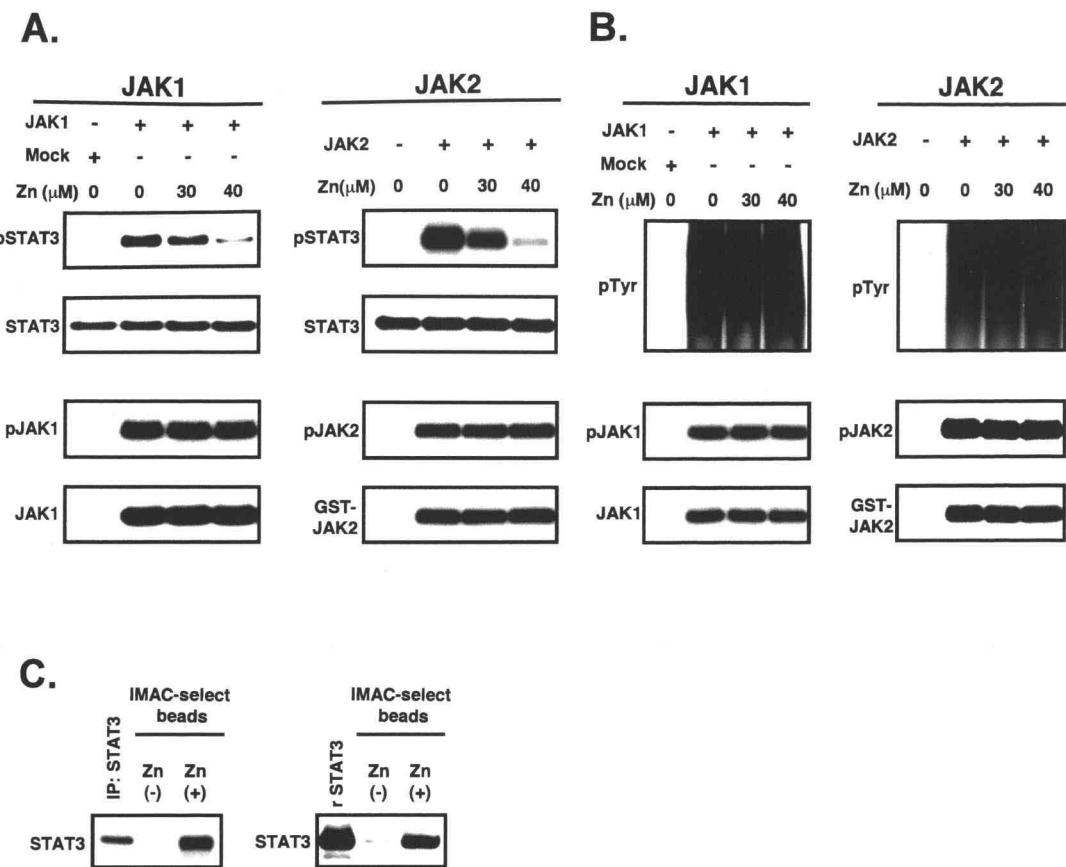


図 4. 亜鉛は STAT3 の立体構造を変化させた

(A) 左図: 試験管内での反応に、活性化 JAK1 を STAT3 のキナーゼとして用いた。反応性生物は、SDS-PAGE で分離し、抗 pSTAT3 抗体、抗 STAT3 抗体、抗 pJAK1 抗体、抗 JAK1 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。右図: GST-JAK2 を STAT3 のキナーゼとして用いた。反応生成物は、SDS-PAGE で分離し、抗 pSTAT3 抗体、抗 STAT3 抗体、抗 pJAK2 抗体、抗 GST 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

(B) JAK1 と GST-JAK2 のキナーゼアッセイの基質には、poly-AEKY を用いた。反応生成物は、SDS-PAGE で分離し、表記の抗体でブロッティングした。

(C) 亜鉛を固相化した IMAC-ビーズと 100μg RAW246.7 細胞溶解液または 0.1 μg rSTAT3 とインキュベートした。ビーズは洗浄後、SDS-PAGE を行い、ウエスタンブロッティングで STAT3 を検出した。

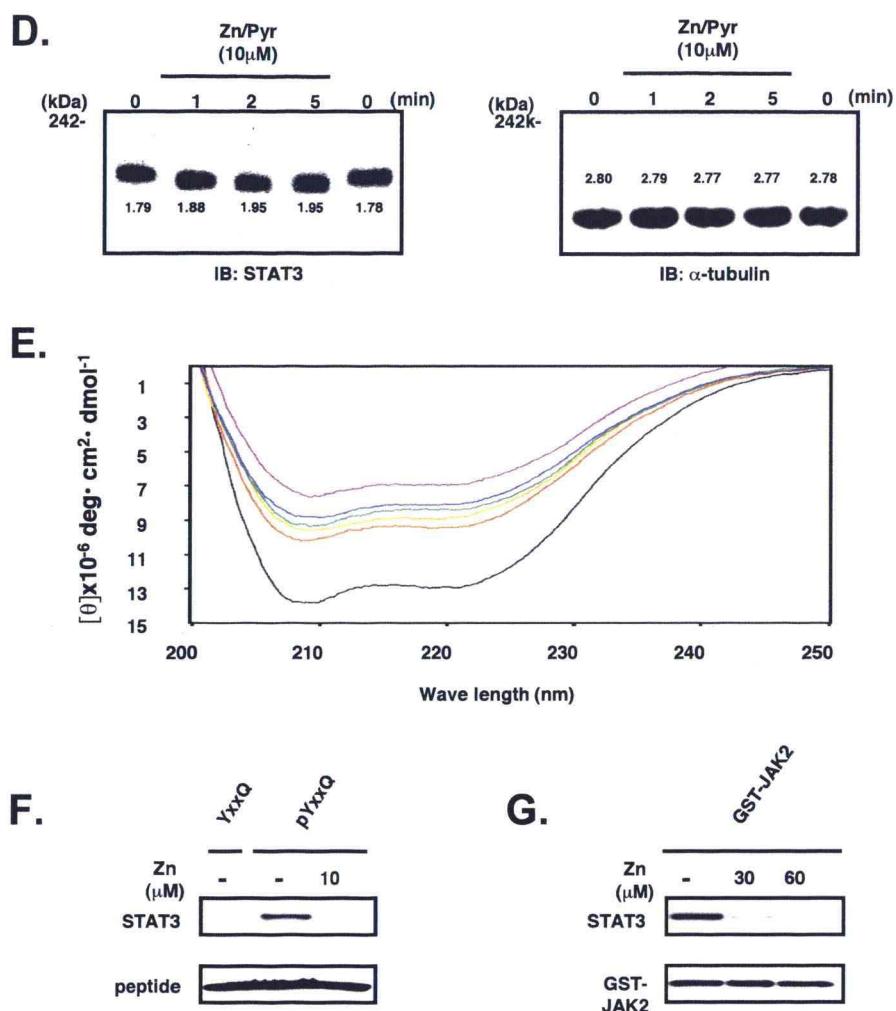


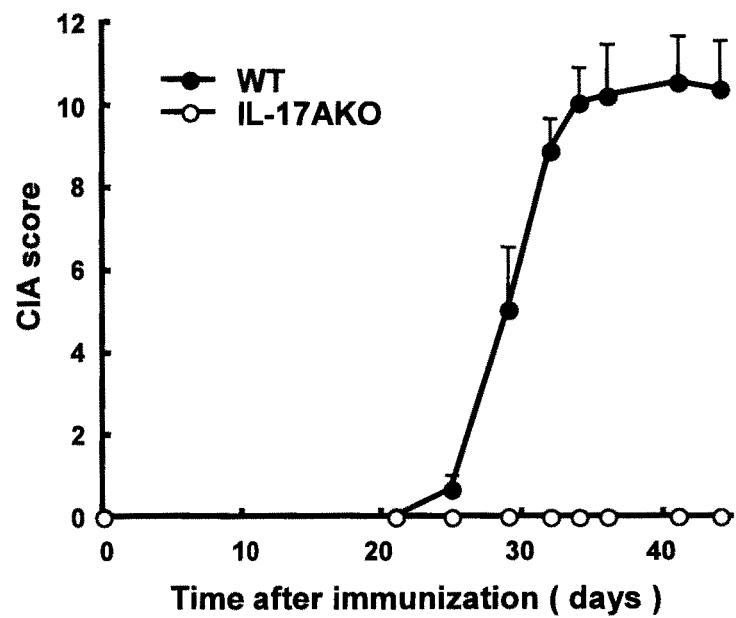
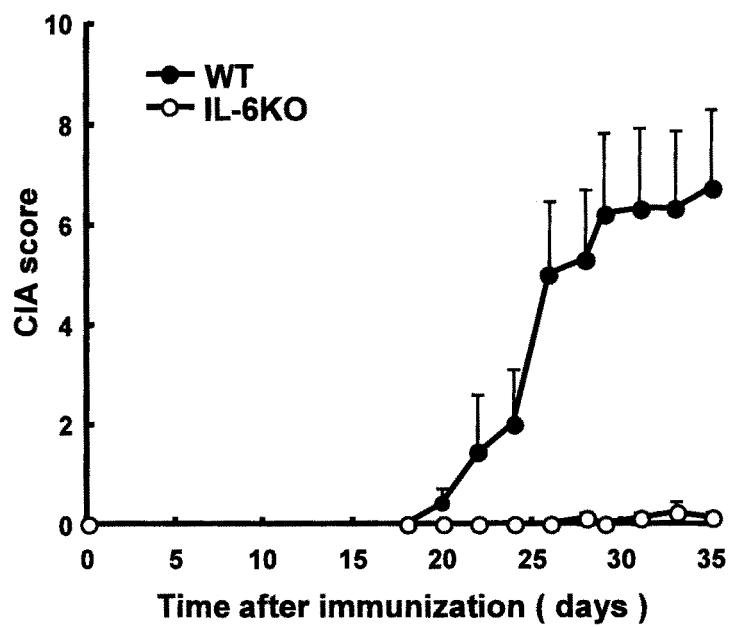
図 4. 亜鉛は STAT3 の立体構造を変化させた

(D) RAW246.7 細胞に表記の時間で Zn / Pyr 処理を行った。細胞溶解液を調製した後、ネイティブ PAGE を行い、タンパク質を分離し、抗 STAT3 抗体または抗 α -tubulin 抗体でウエスタンブロッティングを行った。242 kDa のサイズマーカーを基準にした泳動距離を (cm) をバンドの下に表記した。

(E) STAT3 の CD スペクトルを示した。亜鉛添加量は以下の通りである。黒: 0 μ M、赤: 1 μ M、黄: 5 μ M、緑: 10 μ M、青: 50 μ M、紫: 150 μ M。

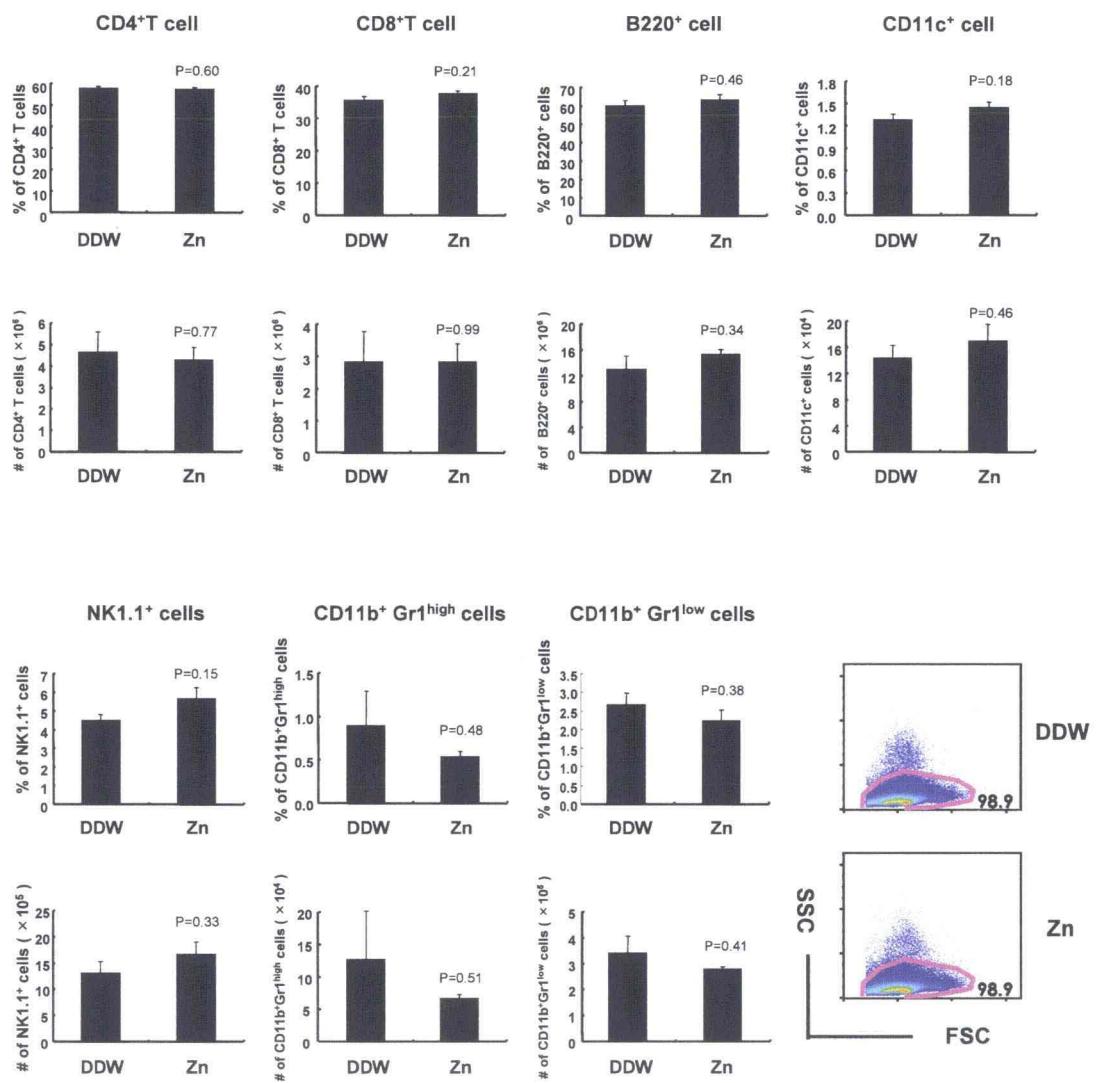
(F) 組換え STAT3 に亜鉛処理を行い、gp130 ペプチドへの結合アッセイを実施した。

(G) 組換え STAT3 を用いて、GST-JAK2 に対する結合アッセイを行った。



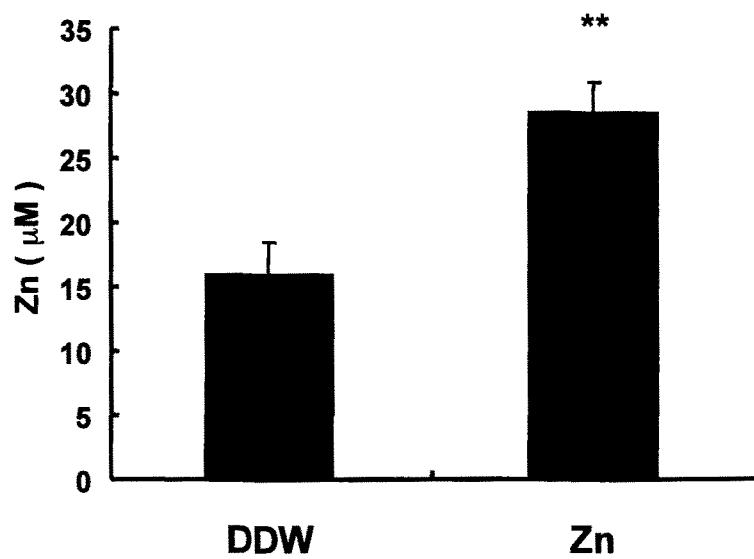
参考データ 図 S1. CIA は IL-6 および IL-17A に依存する

IL-6KO マウスと IL-17AKO マウスおよび野生型マウスに CIA を誘導し、症状のスコアリングを行った。



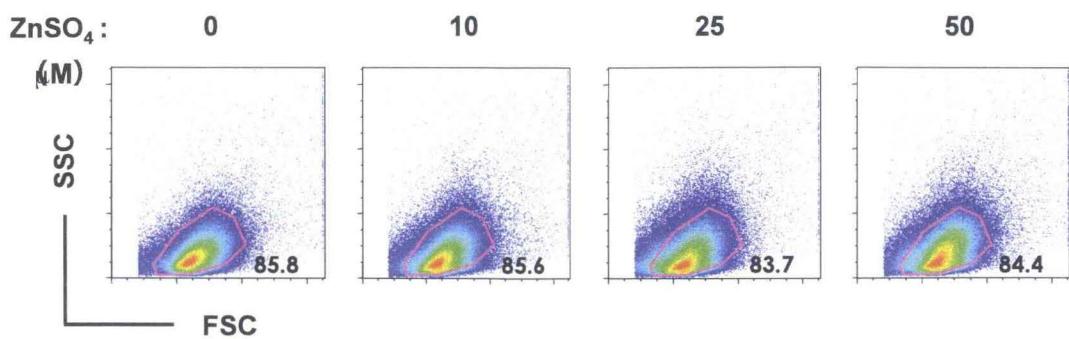
参考データ 図 S2. 亜鉛投与マウスの免疫系に異常はみられない

3000 p.p.m の亜鉛を飲料水中に添加して、2 ヶ月間投与したマウスから、脾臓を摘出し、フローサイトメーターを用いて、免疫系の細胞を検出した。



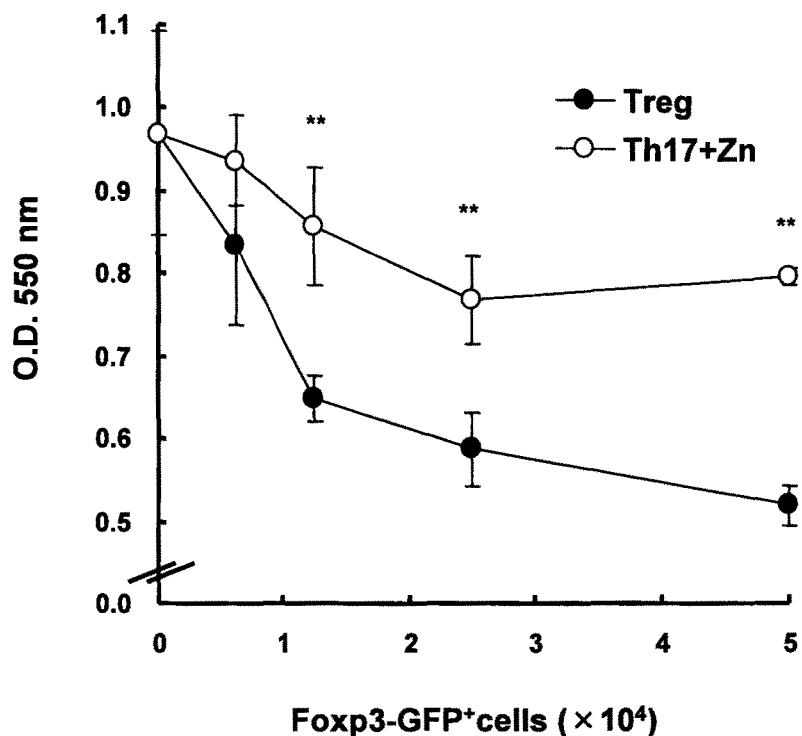
参考データ 図 S3. 亜鉛投与マウスの血清中亜鉛濃度は上昇した

3000 p.p.m の亜鉛を飲料水中に添加して、1 ヶ月間投与したマウスから血清を採取し、原子吸光光度計を用いて、亜鉛濃度を測定した。



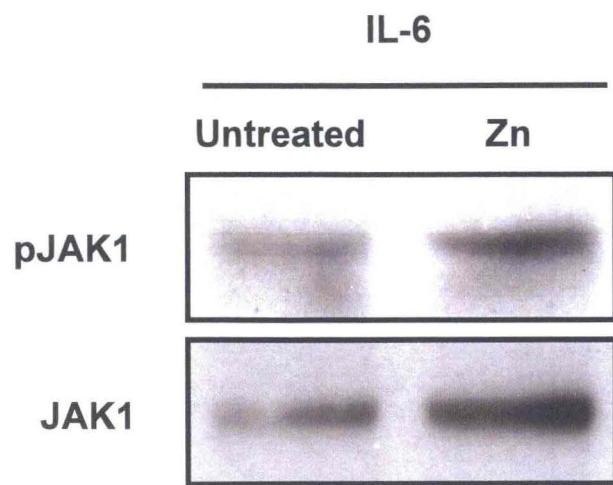
参考データ 図 S4. 亜鉛添加培地において、T 細胞の生存率は変化しなかった

ナイーブ $\text{CD4}^+ \text{T}$ 細胞を単離して、表記の濃度の硫酸亜鉛を培地に添加し、 Th17 細胞へ分化する条件 (IL-6 および $\text{TGF}\beta$ 刺激) で、培養した。4 日後に、細胞を回収し、細胞内染色を行い、フローサイトメーターで解析した。



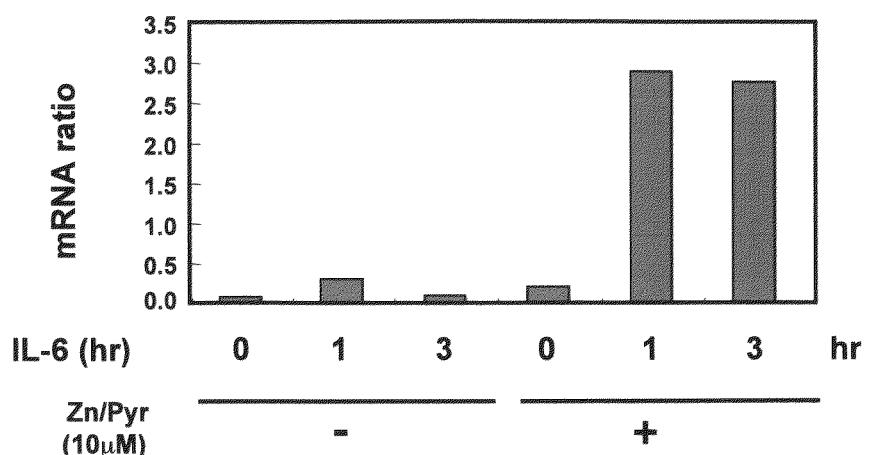
参考データ 図 S5. 亜鉛添加の培養条件で分化する Foxp3⁺細胞は、T 細胞の増殖を抑制しなかった

Foxp3-GFP マウスから、ナイーブ CD4⁺T 細胞を単離して、Treg 細胞への分化誘導系 (TGF β 刺激) および Th 17 細胞分化誘導系に亜鉛を添加した系 (IL-6, TGF β , Zn 存在下) で培養した。4 日後、GFP⁺細胞をソーティングし、ナイーブ CD4⁺T 細胞 (5×10^4)、BMDC (1×10^4) および抗 CD3 抗体 (5 μ g/ml) と表記の数の Foxp3-GFP⁺細胞を共培養した。4 日後、MTT アッセイを行い、細胞の増殖を検出した。



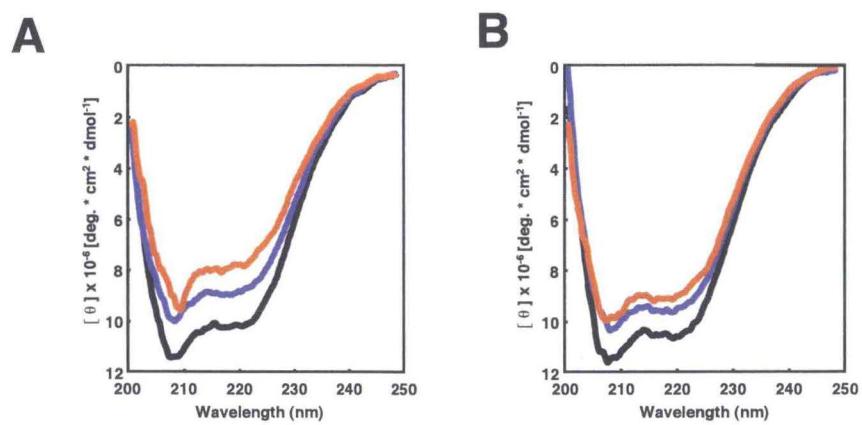
参考データ 図 S6. 亜鉛処理を行っても IL-6 による JAK1 のリン酸化は変化しなかった

CD4⁺T 細胞を MACS カラムにより単離し、亜鉛を前処理した後に IL-6 刺激を行った。刺激後 5 分で、細胞溶解液を調製し、ウエスタンブロッティングで JAK1 および pJAK1 を検出した。



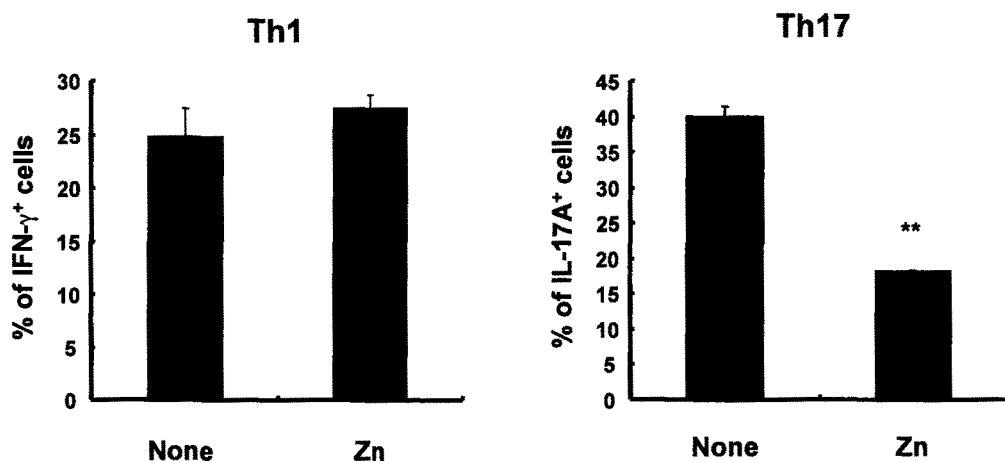
参考データ 図 S7. 亜鉛処理により、IL-6 刺激による EGR1 の発現が亢進した

Zn / Pyr 処理および IL-6 刺激を行った RAW246.7 細胞から、total RNA を抽出し、*Egr1* および *Gapdh* 特異的なプライマーを用いて、定量 PCR を行った。



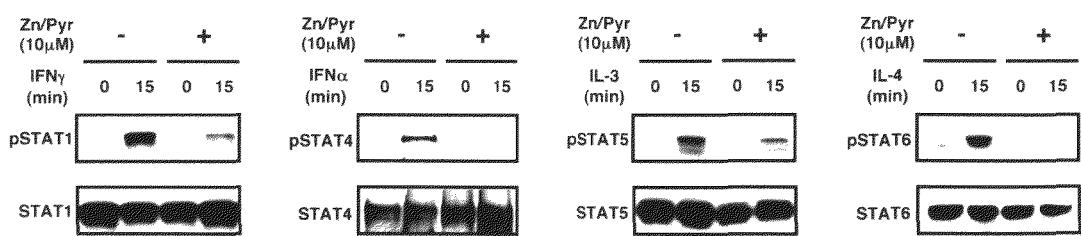
参考データ 図 S8. 亜鉛処理による CD スペクトルの変化

亜鉛処理による STAT3 の CD スペクトルの変化は、亜鉛キレーターの存在下でも変化しない (A. TPEN, B. EDTA)。黒色:硫酸亜鉛 0 μM 、青色:硫酸亜鉛 50 μM (A)、10 μM (B)、赤色:硫酸亜鉛 50 μM + TPEN 50 μM (A)、硫酸亜鉛 10 μM + EDTA 100 μM (B)。



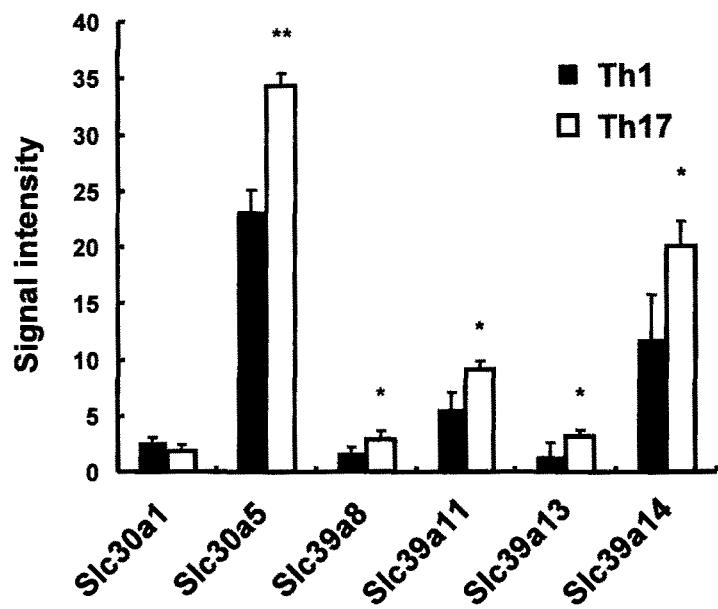
参考データ 図 S9. 亜鉛は Th1 細胞への分化は抑制しない

ナイーブ CD4⁺T 細胞を単離し、IL-12 存在下、BMDC と共に培養を行い、Th1 細胞への分化を誘導した（左図）。ナイーブ CD4⁺T 細胞を単離し、IL-6 と TGF β 存在下、BMDC と共に培養を行い、Th17 細胞への分化を誘導した（右図）。PMA / イオノマイシンで刺激し、golgi plug 存在下 6 時間培養した後、細胞内染色を行い、Th1 細胞と Th17 細胞を検出した。



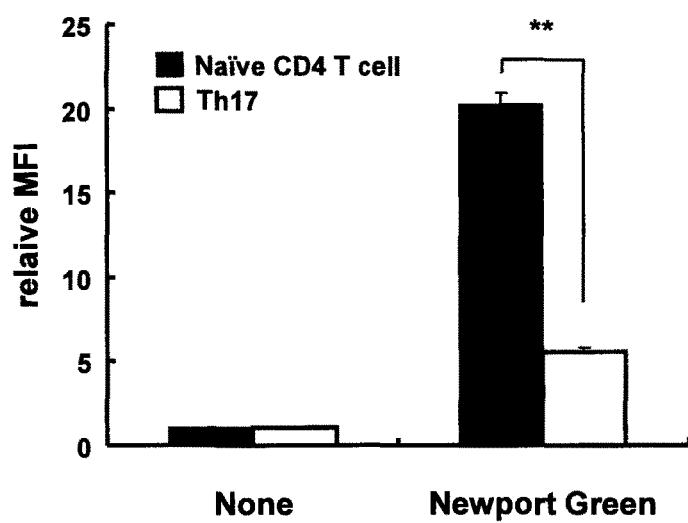
参考データ 図 S10. 亜鉛は STAT ファミリーの活性化を抑制する

細胞を Zn / Pyr 処理し、表記のサイトカインで刺激した。STAT1 は MEF を、STAT5 はプロ B 細胞の細胞株である Baf/B03 細胞を、STAT6 は Jurkat T 細胞を用い、ウエスタンブロッティングで検出した。STAT4 はヒト線維芽細胞から STAT4 の安定発現株を作製し、抗 STAT4 抗体で免疫沈降した後に、抗リン酸化チロシン抗体でウエスタンブロッティングを行った。



参考データ 図 S11. 亜鉛トランスポーターの発現は、ヘルパーT細胞のサブセントにより異なる

ナイーブ CD4⁺T細胞を単離し、それぞれ試験管内で Th1 細胞および Th17 細胞への分化を誘導した。それらの細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイを行い、亜鉛トランスポーターの発現を比較した。



参考データ 図 S12. Th17 細胞では、細胞内亜鉛濃度が低下した

ナイーブ CD4+T 細胞を単離し、Th17 細胞への分化を誘導した。ナイーブ CD4+T 細胞と、Th17 細胞を $5 \mu\text{M}$ のニューポートグリーン（亜鉛の蛍光標識剤）で染色し、フローサイトメーターを用いて検出した。

謝辞

本研究の実施にあたって、Foxp3-GFP レポーターマウス⁽⁵⁷⁾を提供していただいた Bernard Malissen 博士（ Universite de la Mediterranee, Marseille, France ）に深謝いたします。

暖かいご指導をくださった平野俊夫教授、村上正晃准教授をはじめ、生命機能研究科免疫発生学研究室の皆様、理化学研究所 免疫・アレルギー総合研究センター サイトカイン制御研究グループの皆様に深謝いたします。

参考文献

- 1 Kambe, T., Weaver, B. P. and Andrews, G. K. 2008. The genetics of essential metal homeostasis during development. *Genesis* 46:214.
- 2 Vallee, B. L. and Auld, D. S. 1993. Cocatalytic zinc motifs in enzyme catalysis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90:2715.
- 3 Prasad, A. S. 1995. Zinc: an overview. *Nutrition* 11:93.
- 4 Brown, H., Peerson, J. M., Allen, L. H. and Rivera, J. 2002. Effect of supplemental zinc on the growth and serum zinc concentrations of pre-pubertal children: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 75:1062.
- 5 Wellinghausen, N., Kirchner, H. and Rink, L. 1997. The immunobiology of zinc. *Immunol. Today* 18:519.
- 6 Ibs, K. H. and Rink, L. 2003. Zinc-altered immune function. *J. Nutr.* 133:1452S.
- 7 King, L. E., Osati-Ashtiani, F. and Fraker, P. J. 2002. Apoptosis plays a distinct role in the loss of precursor lymphocytes during zinc deficiency in mice. *J. Nutr.* 132:974.
- 8 Prasad, A. S. 2000. Effects of zinc deficiency on Th1 and Th2 cytokine shifts. *J. Infect. Dis.* 182 (Suppl. 1):S62.
- 9 Bhutta, Z. A., Bird, S. M., Black, R. E. et al. 2000. Therapeutic effects of oral zinc in acute and persistent diarrhea in children in developing countries: pooled analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 72:1516.
- 10 Fraker, P. J., King, L. E., Laakko, T. and Vollmer, T. L. 2000. The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. *J. Nutr.* 130:1399S.
- 11 Tran, C. D., Ball, J. M., Sundar, S., Coyle, P. and Howarth, G. S. 2007. The role of zinc and metallothionein in the dextran sulfate sodium-induced colitis mouse model. *Dig. Dis. Sci.* 52:2113.
- 12 Ohkawara, T., Takeda, H., Kato, K. et al. 2005. Polaprezinc (N-(3-aminopropionyl)-L-histidinato zinc) ameliorates dextran sulfate

- sodium-induced colitis in mice. *Scand. J. Gastroenterol.* 40:1321.
- 13 Ohly, P., Dohle, C., Abel, J., Seissler, J. and Gleichmann, H. 2000. Zinc sulphate induces metallothionein in pancreatic islets of mice and protects against diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin. *Diabetologia* 43:1020.
- 14 Yamashita, S., Miyagi, C., Fukada, T., Kagara, N., Che, Y. S. and Hirano, T. 2004. Zinc transporter LIVI controls epithelialmesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer. *Nature* 429:298.
- 15 Kitamura, H., Morikawa, H., Kamon, H. et al. 2006. Toll-like receptor-mediated regulation of zinc homeostasis influences dendritic cell function. *Nat. Immunol.* 7:971.
- 16 Liuzzi, J. P., Aydemir, F., Nam, H., Knutson, M. D. and Cousins, R. J. 2006. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103:13612.
- 17 Hirano, T. 1998. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int. Rev. Immunol.* 16:249.
- 18 Bettelli, E., Oukka, M. and Kuchroo, V. K. 2007. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat. Immunol.* 8:345.
- 19 Nishihara, M., Ogura, H., Ueda, N. et al. 2007. IL-6-gp130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17+ Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state. *Int. Immunol.* 19:695.
- 20 Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L. et al. 2006. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126:1121.
- 21 Veldhoen, M., Hocking, R., Atkins, C., Locksley, R. and Stockinger, B. 2006. TGF in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24:179.
- 22 Darnell, J. E., Jr. 1997. STATs and gene regulation. *Science* 277:1650.
- 23 Yasukawa, H., Sasaki, A. and Yoshimura, A. 2000. Negative regulation of

- cytokine signaling pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 18:143.
- 24 Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7:145.
 - 25 Glimcher, L. H. and Murphy, K. M. 2000. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev.* 14:1693.
 - 26 Zhu, J., Yamane, H., Cote-Sierra, J., Guo, L. and Paul, W. E. 2006. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res.* 16:3.
 - 27 Cua, D. J., Sherlock, J., Chen, Y. et al. 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421:744.
 - 28 Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R. et al. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* 6:1123.
 - 29 Park, H., Li, Z., Yang, X. O. et al. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* 6:1133.
 - 30 Ogura, H., Murakami, M., Okuyama, Y. et al. 2008. Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction. *Immunity*. 29:628.
 - 31 Afzali, B., Lombardi, G., Lechner, R. I. and Lord, G. M. 2007. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin. Exp. Immunol.* 148:32.
 - 32 Iwakura, Y. and Ishigame, H. 2006. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J. Clin. Invest.* 116:1218.
 - 33 Hirota, K., Hashimoto, M., Yoshitomi, H. et al. 2007. T cell selfreactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17+ Th cells that cause

- autoimmune arthritis. *J. Exp. Med.* 204:41.
- 34 Hirano, T., Murakami, M., Fukada, T., Nishida, K., Yamasaki, S. and Suzuki, T. 2008. Roles of zinc and zinc signaling in immunity: zinc as an intracellular signaling molecule. *Adv. Immunol.* 97:149.
- 35 Hogstrand, C., Kille, P., Nicholson, R. I. and Taylor, K. M. 2009. Zinc transporters and cancer: a potential role for ZIP7 as a hub for tyrosine kinase activation. *Trends Mol. Med.* 15:101.
- 36 Haase, H., Ober-Blobaum, J. L., Engelhardt, G. et al. 2008. Zinc signals are essential for lipopolysaccharide-induced signal transduction in monocytes. *J. Immunol.* 181:6491.
- 37 Yamasaki, S., Sakata-Sogawa, K., Hasegawa, A. et al. 2007. Zinc is a novel intracellular second messenger. *J. Cell Biol.* 177:637.
- 38 Nishida, K., Hasegawa, A., Nakae, S., Oboki, K., Saito, H. and Yamasaki, S. T. H. 2009. 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.
- 39 Fukada, T., Civic, N., Furuichi, T. et al. 2008. The zinc transporter SLC39A13/ZIP13 is required for connective tissue development; its involvement in BMP/TGF-beta signaling pathways. *PLoS ONE* 3:e3642.
- 40 Bruinsma, J. J., Jirakulaporn, T., Muslin, A. J. and Kornfeld, K. 2002. Zinc ions and cation diffusion facilitator proteins regulate Ras-mediated signaling. *Dev. Cell* 2:567.
- 41 Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K. and Iwakura, Y. 2003. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J. Immunol.* 171:6173.
- 42 Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T. et al. 2006. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 177:566.

- 43 Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, Y., Fukada, T. et al. 1998. Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell Biol.* 18:4109.
- 44 Fukada, T. and Tonks, N. K. 2001. The reciprocal role of Egr-1 and Sp family proteins in regulation of the PTP1B promoter in response to the p210 Bcr-Abl oncoprotein-tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 276:25512.
- 45 Gatto, L., Berlato, C., Poli, V. et al. 2004. Analysis of SOCS-3 promoter responses to interferon gamma. *J. Biol. Chem.* 279:13746.
- 46 Sasai, M., Saeki, Y., Ohshima, S. et al. 1999. Delayed onset and reduced severity of collagen-induced arthritis in interleukin-6-deficient mice. *Arthritis Rheum.* 42:1635.
- 47 Turgut, G., Abban, G., Turgut, S. and Take, G. 2003. Effect of overdose zinc on mouse testis and its relation with sperm count and motility. *Biol. Trace Elem. Res.* 96:271.
- 48 Groeneveld, G. J., de Leeuw van Weenen, J., van Muiswinkel, F. L. et al. 2003. Zinc amplifies mSOD1-mediated toxicity in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* 352:175.
- 49 Gaworski, C. L. and Sharma, R. P. 1978. The effects of heavy metals on [³H]thymidine uptake in lymphocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 46:305–313.
- 50 Uzzo, R. G., Leavis, P., Hatch, W. et al. 2002. Zinc inhibits nuclear factor-kappa B activation and sensitizes prostate cancer cells to cytotoxic agents. *Clin. Cancer Res.* 8:3579.
- 51 Kojima, C., Kawakami, A., Takei, T., Nitta, K. and Yoshida, M. 2007. Angiotensin-converting enzyme inhibitor attenuates monocyte adhesion to vascular endothelium through modulation of intracellular zinc. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 323:855.
- 52 Haase, H. and Maret, W. 2005. Protein tyrosine phosphatases as targets of the combined insulinomimetic effects of zinc and oxidants. *Biometals* 18:333–338.

- 53 Aydemir, T. B., Liuzzi, J. P., McClellan, S. and Cousins, R. J. 2009. Zinc transporter ZIP8 (SLC39A8) and zinc influence IFNgamma expression in activated human T cells. *J. Leukoc. Biol.* 86:337.
- 54 Lang, C., Murgia, C., Leong, M. et al. 2007. Anti-inflammatory effects of zinc and alterations in zinc transporter mRNA in mouse models of allergic inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 292:L577.
- 55 Liuzzi, J. P., Lichten, L. A., Rivera, S. et al. 2005. Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102:6843.
- 56 Bury, N. R., Chung, M. J., Sturm, A., Walker, P. A. and Hogstrand, C. 2008. Cortisol stimulates the zinc signaling pathway and expression of metallothioneins and ZnT1 in rainbow trout gill epithelial cells. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294:R623.
- 57 Wang, Y., Kissenpfennig, A., Mingueneau, M. et al. 2008. Th2 lymphoproliferative disorder of LatY136F mutant mice unfolds independently of TCR-MHC engagement and is insensitive to the action of Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 180:1565.

研究業績

学術論文

5. Kitabayashi C., T. Fukada, M. Kanamoto, W. Ohashi, S. Hojyo, T. Atsumi, N. Ueda, I. Azuma, H. Hirota, M. Murakami, and T. Hirano.

Zinc suppresses Th17 development via inhibition of STAT3 activation.

International Immunology 22(5), 375-386, 2010

4. Sawa Y., Y. Arima, H. Ogura, C. Kitabayashi, J-J Jiang, T. Fukushima, D. Kamimura, T. Hirano, and M. Murakami.

Hepatic Interleukin-7 Expression Regulates T Cell Responses.

Immunity 30, 447-457, 2009

3. Ogura, H., M. Murakami, Y. Okuyama, M. Tsuruoka, C. Kitabayashi, M. Kanamoto, M. Nishihara, Y. Iwakura and T. Hirano.

Interleukin-17 Promotes Autoimmunity by Triggering a Positive-Feedback Loop via Interleukin-6 Induction.

Immunity 29, 628-636, 2008.

2. Nishihara, M., H. Ogura, N. Ueda, M. Tsuruoka, C. Kitabayashi, F. Tuji, H. Aono, K. Ishihara, E. Huseby, U. A.K.Betz, M. Murakami and T. Hirano.

IL-6-gp130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17+T helper cells with a minimum effect on that of Treg in the steady state.

International Immunology 19, 695-702, 2007.

1. Khiong, K., M. Murakami, C. Kitabayashi, N. Ueda, S. Sawa, A. Sakamoto, B. L. Kotzin, S. J. Rozzo, K. Ishihara, M. Verella-Garcia, J. Kappler, P. Marrack, and T. Hirano.

Homeostatic proliferating CD4 T cells are involved in the pathogenesis of an Omsen syndrome murine model.

The Journal of Clinical Investigation. 117, 1270-1281, 2007

国際学会

5. Kitabayashi C., T. Fukada, M. Kanamoto, W. Ohashi, S. Hojyo, T. Atsumi, N. Ueda, I. Azuma, H. Hirota, M. Murakami, and T. Hirano.

Zinc-mediated STAT3 suppression is involved in inhibition of autoimmune disease development via regulating Th17 differentiation.

第14回国際免疫学会議

2010年8月23日 ポスター発表

4. M.Harada, M.Nishihara, H.Ogura, N.Ueda, M.Tsuruoka, C.Kitabayashi, F.Tsujii, H.Aono, K.Ishihara, E.Huseby, U.A.K.Betz, M.Murakami, T.Hirano
IL-6-mediated STAT3 signaling in T cells directs the development of Th17 with a minimum effect on that of Treg in vivo.

第14回国際免疫学会議

2010年8月23日 ポスター発表

3. H.Ogura, M.Murakami, Y.Okuyama, M.Tsuruoka, C.Kitabayashi, M.Kanamoto, M.Nishihara, Y.Iwakura, K.Takatsu, D.Kamimura, T.Hirano
IL-6 plays roles not only for developing Th17 but also for inducing an IL-6 amplifier in autoimmune diseases.

第14回国際免疫学会議

2010年8月24日 口頭発表

2. Y.Sawa, H.Suzuki, D.Kamimura, Y.Arima, H.Ogura, C.Kitabayashi, J.Jiang, T.Fukushima, T.Hirano, M.Murakami

Hepatic IL-7, which is induced by TRL-type I IFN signaling, promotes T cell responses.

第14回国際免疫学会議

2010年8月25日 口頭発表

1. D.Kamimura, K.Khiong, C.Kitabayashi, N.Ueda, S.Sawa, A.Sakamoto, B.L.Kotzin, S.J.Rozzo, K.Ishihara, M.Verella-Garcia, J.Kappler, P.Marrack, T.Hirano, M.Murakami

Homeostatic proliferation of CD4+ T cells is involved in the pathogenesis of a mouse model of Omenn syndrome.

第14回国際免疫学会議

2010年8月25日 ポスター発表

国内学会

9. Kitabayashi C., T. Fukada, M. Kanamoto, W. Ohashi, S. Hojyo, T. Atsumi, N. Ueda, I. Azuma, H. Hirota, M. Murakami, and T. Hirano.

Zinc Prevents Th17 Cell-Mediated Autoimmune Disease by Directly Inhibiting STAT3.

国際シンポジウムTCUID2011

2011年3月1日 ポスター発表

8. Kitabayashi C., T. Fukada, M. Kanamoto, W. Ohashi, S. Hojyo, T. Atsumi, N. Ueda, I. Azuma, H. Hirota, M. Murakami, and T. Hirano.

Zinc and CD4+T cell-mediated autoimmune diseases.

第60回藤原セミナー 亜鉛シグナルと細胞機能

2010年10月30日 ポスター発表

7. KITABAYASHI Chika, FUKADA Toshiyuki, KANAMOTO Minoru, UEDA Naoko, OHASHI Wakana, HOJYO Shintaro, AZUMA Ichiro, HIROTA Hiroshi, MURA

KAMI Masaaki and HIRANO Toshio

Zinc Prevents Th17 cell-Mediated Autoimmune Diseases By Directly Inhibiting STAT3.

第39回日本免疫学会学術集会

2009年12月2日 口頭発表

6. SAWA Yukihisa, ARIMA Yasunobu, OGURA Hideki, KITABAYASHI Chika, JIANG Jing-Jing, FUKUSHIMA Toru, SUZUKI Hironao, KAMIMURA Daisuke, HIRANO Toshio, MURAMAMI Masaaki

Hepatic IL-7 Regulates CD4+ T Cell-mediated Autoimmune diseases.

第39回日本免疫学会学術集会

2009年12月2日 口頭発表

5. KITABAYASHI Chika, KANAMOTO Minoru, FUKADA Toshiyuki, MURAKAMI Masaaki and HIRANO Toshio

Zinc Suppresses Th17-Mediated Autoimmune Diseases via Inhibition of STAT3 Activation.

第38回日本免疫学会学術集会

2008年12月1日 口頭発表

4. OGURA hideki, MURAKAMI masaaki, OKUYAMA Yuko, TSURUOKA Mineko, KITABAYASHI Chika, KANAMOTO Minoru, NISHIHARA Mika, IWAKURA Yoichiro, HIRANO Toshio

IL-6 as a down stream target of IL-17 developed an autoimmune arthritis.

第38回日本免疫学会学術集会

2008年12月2日 口頭発表

3. SAWA Yukihisa, KITABAYASHI Chika, KAMIMURA Daisuke, HIRANO Tos

hio, MURAKAMI Masaaki

The TLR-Type I IFN signaling cascade promotes T cell responses by inducing IL-7 expression in hepatocytes.

第38回日本免疫学会学術集会

2008年12月3日 ポスター発表

2. SAWA Yukihisa, MURAKAMI Masaaki, KITABAYASHI Chiaki, HIRANO Toshio

Liver acute-phase reactions convert immune signaling into adaptive immune responses.

第37回日本免疫学会学術集会

2007年11月21日 ポスター発表

1. KHIONG Khie, SAWA Shinichiro, SAKAMOTO Akemi, KITABAYASHI Chikako, ISHIHARA Katsuhiko, KOTZIN Brian L., ROZZO Stephen J., VERELLA-GARcia Marileila, KAPPLER John, MARRACK Philippa, HIRANO Toshio, MURAKAMI Masaaki

A mutant mouse having excess amount of memory T cell is a model mouse of Omenn syndrome.

第36回日本免疫学会学術集会

2006年12月11日 口頭発表

総説

1. 北林知佳・村上正晃

CD4⁺T細胞ホメオスタティック増殖とOmenn症候群

Annual Review 2008免疫 p12-17 中外医学社