

亜鉛シグナルはどのように表皮バリア機能を制御しているのか？ － ZIP10 を標的とするバリア機能制御物質の探索 －

徳島文理大学薬学部病態分子薬理学研究室

深田 俊幸

Zinc is an essential trace element for life, and zinc deficiency causes numbers of symptoms including dermal inflammation and immune deficiency, so that zinc homeostasis must be tightly fine-tuned via zinc transporters, however, the investigations for the involvement of zinc transporters in skin and immunological homeostasis have not been conducted in detail so far.

Previously, we have demonstrated that zinc transporter SLC39A10/ZIP10 plays important roles in early B cell development and B cell-mediated immune responses. Further, we have found that ZIP10 is highly expressed in the hair follicles, which is required for skin and hair follicles formation, however, there is limited information on ZIP10-expressing cells about their physiological roles, their fate determining, and the molecular events controlled by zinc transporter ZIP10.

To clarify the physiological functions of ZIP10 and the profiles of ZIP10 expressing cells *in vivo*, we have generated *Zip10-IRES-GFP* knock-in (*Zip10-GFP-KI*) mouse, which was further crossed with *Rosa26 Tomato*-KI mouse to generate *Zip10-GFP/Tomato*-KI mouse. The GFP expression was detected in the hematopoietic stem cell and ZIP10-expressing pre-/pro-B cell populations in the bone marrow cells from the *Zip10-GFP-KI* mice. Tomato expression was also detected in part of the ZIP10-expressing pre-/pro-B cell populations, indicating that Tomato expressing pre-/pro-B cells were derived from ZIP10-expressing progenitor cells. In skin of the mice, GFP and Tomato were detected around the lower and upper bulge regions, respectively. The hair follicle stem cell populations also contained GFP and GFP/Tomato expressing cells.

These findings indicated that both *Zip10-GFP-KI* and *Zip10-GFP/Tomato*-KI mice are valuable tools to investigate the functions of ZIP10 and the fate of the ZIP10-expressing cells *in vitro* and *in vivo*, which will bring us numbers of opportunities for better understanding of the dermatology and the cosmetology in the future.

1. 緒言

亜鉛は生命の維持に不可欠な微量元素であり、細胞内外における亜鉛の恒常性は亜鉛トランスポーターが担っている。亜鉛トランスポーターが輸送する亜鉛イオンは、カルシウムイオンのようにシグナル因子(=亜鉛シグナル)として細胞機能を制御する¹⁾。代表研究者は、亜鉛トランスポーター ZIP10 の亜鉛シグナルが表皮バリア機能に必要であることを見出し、ZIP10 が皮膚領域における重要な研究対象であることを示した²⁾。一方、ZIP10 の亜鉛シグナルが表皮バリア機能をどのように制御しているのか、その詳細な分子機序はまだ解明されていない。

本研究は、「ZIP10 の亜鉛シグナルは、表皮バリア機能にどのような役割を演じているのか」について解明し、ZIP10 を標的とする表皮バリア機能に有用な新しい素材を探索することを目標に設定した。ZIP10 は血球系細胞にも発現すること^{3,4)}、表皮バリア機能には血球系細胞の関与も示されていることから、造血幹細胞も研究対象に加えて解析した。現時点で、毛包幹細胞および造血幹細胞が

ZIP10 を発現することを見出したので、以下にその内容を報告する。

2. 方法

2.1. *Zip10-GFP-KI* マウスと *Zip10-GFP/Tomato-KI* マウスの作成

ZIP10 発現細胞の特徴を解析するために、*EGFP-IRES-CreERT2* 遺伝子カセットを *Zip10* プロモーター下流に挿入 (knock-in: KI) した *Zip10-GFP-KI* マウスを作成した (図 1: 未発表)。

ZIP10 発現細胞の子孫細胞を可視化するために、*Zip10-GFP-KI* マウスと *Rosa26* 領域に loxp 配列で挟まれた *Tomato* 遺伝子を挿入した *Tomato-KI* マウスを交配して *Zip10-GFP/Tomato-KI* マウスを作成した。

Zip10-GFP/Tomato-KI マウスの ZIP10 発現細胞は、タモキシフェン依存的に活性化される CreERT2 が発現するため、当該マウスをタモキシフェンで処理すると、ZIP10 発現細胞は Tomato を発現して赤色発光し、ZIP10 発現が消失した後も Tomato を発現する。したがって、*Zip10-GFP/*



How does zinc signaling control the skin barrier functions?

Toshiyuki Fukada

Molecular and Cellular Physiology,
Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Tokushima Bunri University



図 1 *Zip10-GFP-IRES-CreERT2-KI* (*Zip10-GFP-KI*) マウスのゲノムマップ

Tomato-KIマウスを用いることにより、ZIP10を発現する細胞とその子孫細胞を可視化することができる。

2.2. 毛包に関する解析

Zip10-GFP-KIマウスの背部皮膚試料を蛍光顕微鏡で観察し、毛包におけるGFPの発現を精査した。ZIP10発現細胞の子孫細胞を可視化するために、*Zip10-GFP*-KIマウスと*Tomato*-KIマウスを交配した*Zip10-GFP/Tomato*-KIマウスにタモキシフェンを腹腔内投与し、皮膚の毛包幹細胞におけるGFPとTomatoの発現をFACSで解析した。

2.3. 血球系細胞に関する解析

Zip10-GFP-KIマウスの骨髄由来細胞を用いて、造血幹細胞およびB前駆細胞画分におけるGFPの発現をFACSで解析した。

3. 結果

3.1. 毛包に関する解析

Zip10-GFP-KIマウスの皮膚毛包に、GFPの発現を確認した(図2:未発表)。さらに、タモキシフェン処理した*Zip10-GFP/Tomato*-KIマウスの毛包および上部バルジ領域にTomatoの発色を確認した(図3:未発表)。加えて、FACSによる毛包幹細胞分画の解析により、GFPおよびTomatoの発現を確認した(図4:未発表)。すなわち、ZIP10発現細胞およびZIP10発現細胞の子孫細胞が、毛包幹細胞分画に存在することが示唆された。

3.2. 血球系細胞に関する解析

Zip10-GFP-KIマウスの造血幹細胞に、GFPの発現を

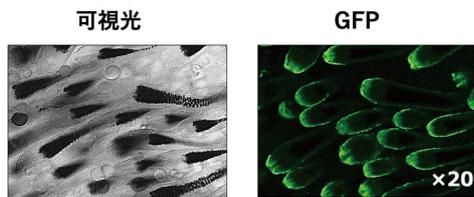


図2 *Zip10-GFP*-KIマウスの皮膚組織における毛包周囲のGFPの検出

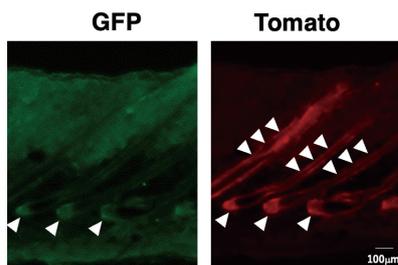


図3 タモキシフェン処理した*Zip10-GFP/Tomato*-KIマウスの毛包周囲組織におけるGFPとTomatoの検出

確認した(図5:未発表)。さらに、タモキシフェン処理した*Zip10-GFP/Tomato*-KIマウスのB前駆細胞には、GFP陽性細胞とGFP/Tomato共陽性細胞が存在することを確認した(図6:未発表)。

これらの結果は、造血幹細胞群またはその亜集団にZIP10発現細胞が存在すること、B前駆細胞がZIP10を発現することを示すとともに、B前駆細胞がZIP10を発現していた細胞から分化した可能性を示唆するものとする。

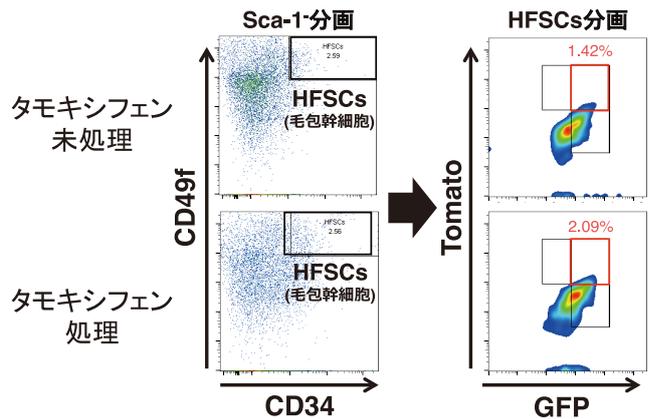


図4 タモキシフェン処理した*Zip10-GFP*-KIマウスの毛包幹細胞(HFSCs)におけるGFPとTomatoの検出

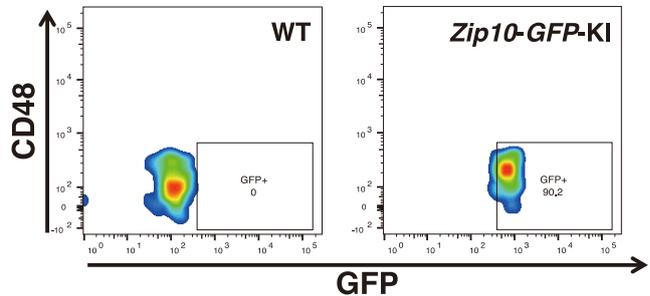


図5 *Zip10-GFP*-KIマウスの造血幹細胞におけるGFPの検出

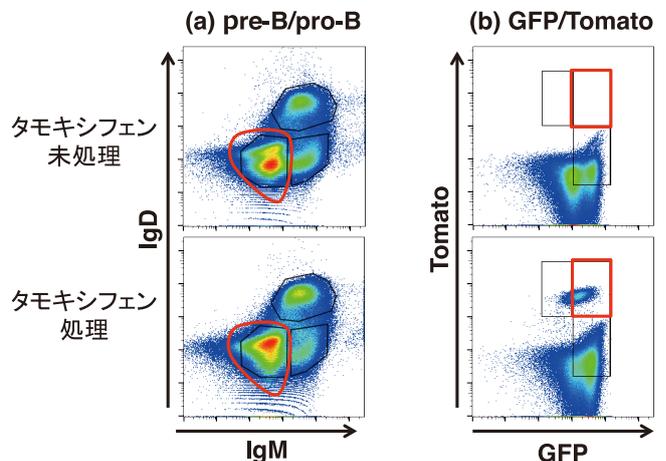


図6 *Zip10-GFP/Tomato*-KIマウスにおける(a) B前駆細胞(preB/proB分画)と(b) GFP/Tomato共陽性細胞の検出

4. 考 察

毛包幹細胞分画にZIP10発現細胞の子孫細胞が存在することから、ZIP10が毛包幹細胞の分化や維持に関与する可能性が示された。一方、ZIP10が造血幹細胞に発現することから、ZIP10が造血幹細胞の細胞増殖や維持等に関与することが示唆された。

今後は、毛包幹細胞や造血幹細胞におけるZIP10の役割を解明するために、*Zip10-GFP/ Tomato*-KIマウスからZIP10を発現する毛包幹細胞および造血幹細胞をGFPとTomatoを指標にしてソーティングし、RNA-sequenceやsingle cell analysisによって遺伝子発現様式を精査して、これらの細胞の特徴を解析する。さらに、ZIP10の亜鉛シグナルを制御する化合物を探索して、毛包と表皮の形成に係る創薬研究のための実験を実施する。

5. 総 括

我々が開発したZIP10発現細胞とその子孫細胞を可視化することができる*Zip10-GFP*-KIマウスと*Zip10-GFP/ Tomato*-KIマウスは、「亜鉛トランスポーターZIP10の亜鉛シグナルは、表皮バリア機能にどのような役割を演じているのか」を究明する上で極めて有用なツールであり、本研究ではこれらのマウスに由来する細胞の解析を進めることにより、ZIP10を発現する毛包幹細胞等の特徴と役割の解析を実施した。

本研究期間には、アトピー性皮膚炎患者の皮膚ではZIP10の発現が減少していること⁵⁾、亜鉛シグナルは表皮におけるエピジェネティックな遺伝子発現の制御に関与することを見出している⁶⁾。今後の研究において、*Zip10-GFP*-KIマウスと*Zip10-GFP/ Tomato*-KIマウスを様々な実験に適用することにより、亜鉛トランスポーターZIP10が関わる皮膚科学の理解と、亜鉛が関与する健康的

な皮膚の形成と維持を科学する Cosmetology の発展に貢献したいと考えている。

謝 辞

コロナ禍の影響を多大に受けた研究期間でありましたが、貴財団のご援助により、本研究を大きく進展させることができました。得られた研究成果を基盤にして、本研究をさらに発展させるべく邁進する所存です。貴財団の御高配に心よりお礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) Fukada T. and Kambe T. *Zinc Signaling* (editor), Springer Nature Singapore Pte Ltd.2019
- 2) Bin BH, et al. Requirement of zinc transporter ZIP10 for epidermal development: Implication of the ZIP10-p63 axis in epithelial homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114: 12243-12248, 2017
- 3) Miyai T, et al. Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 facilitates antiapoptotic signaling during early B-cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 11780-85, 2014
- 4) Hojyo S, et al. Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 controls humoral immunity by modulating B cell receptor signal strength. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 11786-11791, 2014
- 5) K.Nakajima, et al. Possible involvement of zinc transporter ZIP10 in atopic dermatitis. *J.Dermatol.* 47:e51-e53, 2020
- 6) Lee MG, et al. Implication of the zinc-epigenetic axis in epidermal homeostasis *J.Dermatol. Sci.* 98: 203-206, 2020