

論文の内容の要旨

論文題目 緑茶カテキンのヒトリンパ球に及ぼす影響の検討

指導教官 名川弘一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程
外科学専攻
氏名 川合一茂

研究の背景と目的

緑茶の主成分であるカテキンは種々の生理活性を持つ。その一つとしてカテキンが免疫系に抑制的に作用するとの報告がいくつかなされているが、その分子レベルの作用機序の詳細は未だ明らかではない。そこで本研究ではカテキンの持つ抗炎症効果の機序の解明を目的とし、緑茶カテキンの主な成分である Epigallocatechin Gallate (EGCG) 及び Epicatechin Gallate (ECG) が T リンパ球に対して及ぼす影響を検討した。

白血球の中でも細胞性免疫を担う T リンパ球は炎症に重要な役割を果たし、CD4 陽性のヘルパー T 細胞 (以下 T_H 細胞) と CD8 陽性の細胞傷害性 T 細胞 (以下 T_C 細胞) に分類される。本研究ではまず T_H 細胞の CD4 分子に及ぼすカテキンの影響について検討した。CD4 は T_H 細胞上に発現し、T 細胞の活性化において重要な役割を果たす糖蛋白である。また Human Immunodeficiency Virus (HIV) が T_H 細胞に感染する際、ウイルスの gp120 蛋白と CD4 との結合が重要であることも知られている。本研究ではカテキンによる T_H 細胞 CD4 の発現変化、そのメカニズム、および機能への影響について検討を行った。

次にカテキンの CD11b 分子への影響を検討した。CD11b は integrin の一種であり、種々の細胞外基質や他の細胞上に発現する Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) との結合を介して白血球の血管外への遊走に参与する。 T_C 細胞遊走においても CD11b が重要な分子であると示唆されており、本研究では T_C 細胞 CD11b の発現変化、そのメカニズム、および分子機能への影響について検討した。

方法・結果

1) カテキンのヘルパーT細胞 (T_H細胞) CD4分子への影響

カテキンによる CD4 の発現変化をフローサイトメトリーにて検討したところ、EGCG は濃度依存性に CD4 の発現低下を誘導した。しかし、ECG では特に発現の変化は認められなかった。また他の表面抗原の発現は変化せず、CD4 特異的であると考えられた。この現象は数分で完了する極めて速い反応であり、T_H細胞だけでなく CD4 を発現する他の白血球細胞株 HL-60、U937 においても同様の CD4 発現低下が認められた。CD4 発現低下のメカニズムを解明するため、まず endocytosis について検討したが、細胞内に取り込まれる CD4 は EGCG によって変化せず、endocytosis は否定的であった。また shedding によって細胞表面の CD4 が失われている可能性を考え Western Blotting を用いて細胞全体の CD4 蛋白量を評価したが、EGCG 処理の有無によらず CD4 の蛋白量は不変であった。このことから shedding も機序として否定的であった。

以上の結果より細胞表面の CD4 分子の発現は実際には変化しておらず、EGCG が CD4 に結合しこれをマスクすることで抗体が CD4 を認識できなくなっている可能性が考えられた。すなわち EGCG が抗 CD4 抗体の結合を競合阻害していると考えられた。この仮説を検証するため competitive ELISA を用いて CD4 とカテキンの結合能を評価したところ、EGCG は CD4 に高結合することが確認された。しかし、ECG は CD4 に対して結合能を示さなかった。

さらに EGCG が CD4 に結合することによる CD4 の機能的変化を検討した。HIV が T_H細胞に感染する際、CD4 は gp120 のレセプターとして作用する。CD4 に結合した EGCG は濃度依存性にこの gp120 の結合を阻害し、EGCG には HIV ウイルスの感染を抑制する効果があることが示された。

2) カテキンの細胞傷害性 T 細胞 (T_C細胞) CD11b 分子への影響

次に T_C細胞 CD11b についても同様の検討を行った。フローサイトメトリーでは EGCG による CD11b の濃度依存性発現低下を認め、また ECG も弱いながら CD11b の発現低下を誘導した。この変化は CD11b に特異的であり、T_C細胞の他の integrin 分子の発現には変化は認められなかった。また CD4 と同様、この CD11b の低下も数分で完了する極めて急速な反応であり、好中球や単球などの CD11b を発現する他の細胞においても EGCG はその発現低下を誘導した。以上の結果は T_H細胞 CD4 において観察された結果と酷似しており、CD11b に対しても EGCG が直接結合し、抗 CD11b 抗体の結合を競合阻害しているのではないかと考えられた。そこで Competitive ELISA を用いて検討を行ったところ、EGCG は CD11b に対し強い結合能を有することが確認された。また ECG も弱いながら CD11b と結合した。

続いてカテキンの結合による CD11b 分子の機能変化を検討した。まず CD11b のリガンドの 1 つである Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) に対する接着力の変化を測定した。EGCG・ECG 共に濃度依存性に ICAM-1 に対する接着を抑制したが、その効果は EGCG で特に顕著であった。また CD11b は白血球の遊走に重要な分子であることから、

カテキンの T_C細胞の遊走に及ぼす影響について検討した。EGCG は濃度依存性に T_C細胞の遊走を抑制したが、これは EGCG が CD11b に結合しその機能を抑制した結果であると考えられた。また ECG は遊走に影響を与えなかった。

考察

緑茶カテキンの生理活性の一つに抗菌作用、抗ウイルス作用がある。中でも特に HIV に対して抑制的な効果を持つことが知られており、そのメカニズムについてはウイルスの直接破壊、逆転写酵素の阻害、細胞表面へのウイルスの接着の抑制などが報告されている。本研究ではカテキンが T_H細胞表面 CD4 に結合することが証明された。CD4 は HIV が T_H細胞表面へ接着する際のレセプターとしても作用することから、この CD4 への競合的結合こそが上記ウイルスの接着抑制のメカニズムであると考えられた。

CD4 に結合する物質はいくつか知られている。Li らはその中でも TJU103 という化合物が強い CD4 結合能を持ち、T_H細胞由来の自己免疫疾患に有効な治療となりうることを報告している。EGCG もまた CD4 に結合することから、EGCG が HIV ウイルスの感染抑制だけでなく、T_H細胞を介した免疫応答をも抑制するのではないかと期待される。

一方 T_C細胞に発現する CD11b に関する検討では、EGCG が CD4 と同様 CD11b にも結合し、その機能を抑制することが明らかとなった。動物実験では人為的に惹起した炎症の部位へ遊走するリンパ球が EGCG により阻害されるとの報告がなされているが、その機序は明らかにされていなかった。本研究の結果から、この遊走阻害は主に EGCG による CD11b の機能抑制によりもたらされていると考えられた。

以上緑茶カテキン、特に EGCG がリンパ球上に発現する CD4・CD11b に高い親和性を持ち、その機能を選択的に阻害することが本研究により明らかとなった。CD4・CD11b はいずれも炎症におけるリンパ球の機能に不可欠な分子であり、EGCG はこれらの阻害を通してリンパ球を介した炎症反応を抑制するものと考えられた。今後の臨床応用へ向けて、より高濃度、より効果的、かつ副作用の少ない投与方法を検討してゆくことが必要であり、抗アレルギー薬、抗炎症薬、抗ウイルス薬としての開発が期待される。