

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 19 年度博士課程入学
氏 名 裴 敏 貞
指導教員名 清水 誠

論文題目 Effects of phytochemicals on functional differentiation
of mouse CD4⁺ T cells
(マウス CD4⁺ T 細胞の機能分化に及ぼすフィトケミカルの影響)

ヘルパーT細胞は、獲得免疫反応と炎症性疾患の制御を担うリンパ球である。ヘルパーT細胞は、それぞれインターフェロン γ (IFN- γ)、インターロイキン 4 (IL-4)、および IL-17 を主に産生する、I型ヘルパーT細胞 (Th1)、II型ヘルパーT細胞 (Th2)、および Th17 細胞に分類される。Th1 は主に細胞性免疫や細胞内寄生体の排除、Th2 は液性免疫や細胞外病原体の排除に関与し、近年その存在が明らかにされた第 3 のエフェクターヘルパーT細胞サブセットである Th17 は炎症反応、粘膜上皮の感染防御、細胞外増殖細菌に対する感染防御を担っている。まだ抗原に感作されていない naïve CD4⁺ T 細胞が抗原刺激を受けて増殖する過程で Th1、Th2 または Th17 のいずれに機能分化するかは、免疫調節において重要な意義をもつ。

一方、果物や野菜の摂取は、がんや慢性炎症性疾患の予防に有効であることが知られている。またこれら植物に含まれる非栄養成分であるフィトケミカルが抗がん作用・抗炎症作用を有していることは多くの研究から明らかにされている。

しかしながら、フィトケミカルの機能的多様性にもかかわらず、ヘルパーT細胞の機能分化を調節する作用に関する知見は十分に得られていない。本研究ではマウス脾臓由来の naïve CD4⁺T 細胞の機能分化、すなわち Th1、Th2 および Th17 への分化に及ぼすフィトケミカル、特にイソフラボンとナリンゲニンの作用およびその作用機作について解析することを目的とした。

第 1 章 ダイゼインはエストロゲン受容体シグナル非依存的にTh1 への機能分化を促進する

大豆、葛などのマメ科の植物に多く含まれているイソフラボンは、抗酸化作用、抗ガン作用を有し、細胞シグナリング・分化・増殖などを調節することが知られている。CD4⁺T 細胞の機能分化におけるイソフラボンの影響を解析するため、卵白アルブミン(OVA)特異的 T 細胞レセプター遺伝子を導入したトランスジェニックマウスである DO11.10 マウス由来の脾臓 CD4⁺T 細胞を用いた。抗原提示細胞 (APC) としては BALB/c マウス脾臓細胞を用いた。ダイゼイン、ゲニステインあるいはグリシテインの存在下、APC および OVA323-339 ペプチドとともに CD4⁺T 細胞を 7 日間培養し分化誘導した。ダイゼイン存在下で分化誘導した T 細胞は、ダイゼインの濃度依存的に抗原再刺激後の IL-4 産生の低下および IFN- γ 産生の増強が観察された。この時、IFN- γ および Th1 特異的転写因子である T-bet の mRNA 発現の増強、IL-4 および Th2 特異的転写因子である GATA-3 の mRNA 発現の減少も観察された。さらに BALB/c マウスおよび DO11.10 マウスを用いてダイゼイン経口投与の影響を調べた。コントロール群、vehicle(0.25 mM Na₂CO₃) 群、ダイゼイン群の三群に分け、各群に vehicle またはダイゼインを胃内強制投与した。3 週間後、マウスを解剖に供し、メモリーT 細胞として CD4⁺CD62L⁺ T 細胞を精製した。BALB/c マウス由来 T 細胞は抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体で刺激し、DO11.10 マウス由来 T 細胞は APC および OVA323-339 ペプチドとともに 72 時間培養した。その結果、DO11.10 マウスのダイゼイン投与群では、抗原再刺激後の T 細胞の IFN- γ 産生の有意な増強が観察された。また BALB/c マウスのダイゼイン投与群でも IFN- γ 産生の増強傾向が認められた。

ダイゼインの作用点を調べるため、APC の非存在下、CD4⁺T 細胞のみを抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体で刺激し、ダイゼイン存在下で 7 日間培養し分化誘導したところ、この実験条件でもダイゼイン濃度依存的に IL-4 産生の低下および IFN- γ 産生の増強が観察された。ダイゼインは植物エストロゲンとしての作用を示し、エストロゲン受容体 (estrogen receptor; ER) のアゴニストとして作用することが

知られているが、上記の現象は ER アゴニストである ICI 182780 の存在下でも同様に認められた。さらに、BALB/c マウス由来の naïve CD4⁺ T 細胞を用いた実験では、抗 CD3/抗 CD28 抗体刺激での分化誘導時に、抗 IFN- γ 抗体の添加・非添加のいずれの場合にもダイゼインの Th1 分化誘導作用が認められた。また、CD4⁺ T 細胞をダイゼイン存在下で抗 CD3/抗 CD28 抗体で刺激し 3 日間培養したところ、Th1 誘導に重要な、IFN- γ 受容体からのシグナリングに關与する STAT1 のリン酸化がダイゼイン濃度依存的に増加した。一方、APC のみをダイゼインとともに 3 日間培養した場合には、Th1 誘導活性を有するサイトカインである IL-12 の p35 および p40、IL-18 の mRNA 発現には変化が認められなかった。

これらの結果より、ダイゼインは Th2 への分化を抑制し、Th1 への分化を促進する作用を有することが示された。ダイゼインは CD4⁺ T 細胞に直接作用することでその活性を示すこと、その活性には ER からのシグナリングは關与しないことが明らかとなった。また naïve CD4⁺ T 細胞の STAT1 の活性化がこの現象に關与している可能性が示唆された。

第 2 章 ナリングeninは抗原提示細胞のIL-6 およびTGF- β 産生増強と CD4⁺ T 細胞のAhR発現増強を介してTh17 への機能分化を誘導する

CD4⁺ T 細胞の機能分化に影響を与えるフィトケミカルの検索過程で、柑橘系に多く含まれる色素成分で、フラボノイド系フラバノン類として分類されるナリングeninが Th17 への分化を誘導することを見いだした。Th17 への分化は、TGF- β と IL-6 により誘導されること、アリル炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor; AhR) が關与することが知られている。ナリングeninは比較的少量に摂取されるフラボノイドであり、抗酸化、抗炎症、抗がん作用などの生理活性が認められているにも関わらず、T 細胞の機能分化に及ぼす影響について明らかにされていない。本章では、ナリングeninがマウス脾臓由来の naïve CD4⁺ T 細胞の Th17 への機能分化に及ぼす影響およびその作用機構について解析を行った。

DO11.10 マウス脾臓 CD4⁺ T 細胞をナリングeninの存在下、APC と OVA323-339 ペプチドとともに 7 日間培養し分化誘導した。回収した T 細胞を抗原で再刺激したところ、対照群と比較して IL-17 の産生増強および Th17 特異的転写因子である ROR γ t、Th17 分化マーカーである IL-23R、Th17 分化調節因子として知られている AhR の mRNA 発現増加が認められた。CD4⁺ T 細胞のみを抗 CD3/抗 CD28 抗体刺激して分化誘導した場合には、ナリングenin添加による IL-17 と ROR γ t の発現増強は観察されなかったが、分化誘導時にさらに TGF-

β と IL-6 を添加したところ、IL-17 および ROR γ t の発現増強が認められた。ナリングニンの添加による AhR の mRNA 発現増強は TGF- β および IL-6 非添加時にも観察された。一方、BALB/c マウス脾臓由来 APC、さらに脾臓から精製した樹状細胞 (DC)、マクロファージおよび B 細胞を抗 CD40 抗体で刺激したところ、特に DC においてナリングニン添加で TGF- β および IL-6 mRNA の顕著な発現増強が認められた。さらに、NIH3T3 細胞を用いて AP-1 および NF- κ B 応答領域を含むマウス IL-6 遺伝子プロモーターおよび AhR 応答領域である XRE 配列をもつプロモーターの転写活性に与える影響を調べたところ、両者ともにナリングニン処理により転写活性が増強されることが示された。

これらの結果より、ナリングニンは APC、特に DC に作用し TGF- β や IL-6 の発現を増強するとともに、CD4⁺ T 細胞に対して AhR の mRNA 発現を増強させることにより、両者への作用の相乗効果で Th17 への分化を促進することが示唆された。

本研究の結果から、フィトケミカルがヘルパーT 細胞の機能分化に大きな影響を与えることが示された。これらのフィトケミカルのヒト免疫系における作用については未知であるが、アレルギーや感染症など免疫関連疾患の予防・治療に寄与する可能性がある。また、Th17 は感染防御に重要な役割を果たす一方、炎症反応に深く関わる T 細胞でもあり、消化管等で炎症がある場合にそれを増悪する可能性のある食品成分の存在は、食品の安全性についての新たな視点を提供するものと考えられる。今後の研究により、フィトケミカルが免疫系細胞に影響を及ぼす分子メカニズムの解明、さらに免疫関連疾患の予防・治療効果の検証が行われることに期待したい。