

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 王 璽凱

食品中に多く含まれる植物ポリフェノールであるフラボノイドには、肥満細胞の脱顆粒阻害作用を介した抗アレルギー作用があることが知られている。一方、フラボノイドには、解毒代謝の調節に関わる重要な転写因子である aryl hydrocarbon receptor (AhR) のリガンド活性があることも知られている。最近になって、リガンドによる AhR の活性化が、アレルギーなどの免疫応答を抑制的に制御する制御性 T 細胞 (Treg) を誘導することが報告された。これらの知見を総合すると、食品中のフラボノイドが AhR の活性化を介して Treg を誘導し、その結果アレルギーを抑制している可能性も考えられる。本研究は、AhR アゴニスト活性をもつ植物由来食品成分の Treg 誘導について *in vitro*、*in vivo* の両面から詳細に検討したもので、3 章からなる。

第 1 章では、Treg 誘導活性を示す成分の探索を行っている。AhR 依存的な異物応答配列 (XRE) の下流にルシフェラーゼ遺伝子を結合したレポータープラスミドをトランスフェクトした細胞を用いて 25 種類の植物由来食品成分から AhR アゴニスト活性をもつものをスクリーニングした結果、アピゲニン、カテキン、ナリンゲニンなど 8 種類が選抜された。次に、これらをマウス脾臓 CD4⁺T 細胞に作用させ、Treg を誘導するかどうかを調べたところ、ナリンゲニンだけがその活性を有すること、この Treg 誘導活性は TGF- β 非依存的に起こることが示された。次に、ナリンゲニンによる Treg 誘導が AhR を介した反応であるかどうかを確認するため、AhR アンタゴニストの存在下でナリンゲニンの Treg 誘導活性を調べた。その結果、AhR アンタゴニストはナリンゲニンによって誘導される T 細胞増殖抑制効果を解除することが明らかとなり、この Treg 誘導活性は AhR 分子のリガンド結合部位との直接の相互作用を介したものであることが示唆された。

第 2 章では、ナリンゲニンにより誘導された Treg の免疫調節機能を *in vitro* で解析している。抗 CD3 および抗 CD28 抗体による刺激下、ナリンゲニンとともに培養したマウス脾臓 CD4⁺T 細胞を解析した結果、CD4⁺Foxp3⁺T 細胞および CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 細胞の集団が増加することが明らかとなった。また、CTLA4 などの分子を発現する CD4⁺T 細胞集団も増加していたことから、ナリンゲニンが典型的な Treg を誘導していることが示唆された。Foxp3 遺伝子の mRNA 発現もナリンゲニンにより増加し、Foxp3 遺伝子プロモーターに存在する非進化保存的な AhR 結合部位である NCABS を用いたレポーターアッセイから、ナリンゲニンは

Foxp3 遺伝子の転写活性化を介して Treg の分化を誘導することが示唆された。さらにナリングゲニンは *AhR* 遺伝子の mRNA 発現も亢進した。サイトカイン量の測定から、低濃度のナリングゲニンによる Treg の誘導には IL-10 が関わること、高濃度のナリングゲニンによる誘導には膜結合型 TGF- β が関わっていることが示唆された。以上の結果から、ナリングゲニンは AhR の発現を増強するとともに AhR を活性化し、それが *Foxp3* 遺伝子の発現を上昇させ Foxp3⁺Treg を誘導した可能性が示唆された。

第 3 章ではナリングゲニンの *in vivo* における効果について評価している。卵白アルブミン (OVA) 特異的 T 細胞レセプター遺伝子のトランスジェニックマウスである DO11.10 を用いたマウス経口免疫寛容誘導モデルでは、OVA 経口投与で誘導される経口免疫寛容をナリングゲニンがさらに促進する効果は観察されなかったが、BALB/c マウスにナリングゲニンを 2 週間経口投与することにより、脾臓 (SPL) と腸間膜リンパ節 (MLN) において有意に CD4⁺Foxp3⁺T 細胞と CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 細胞の集団が増加した。また、SPL、MLN およびパイエル板 (PP) の CD4⁺T 細胞において Treg 関連分子マーカーを発現する細胞の割合がナリングゲニンの投与によって増加する現象が認められた。PP における CD4⁺IL-10⁺T 細胞と CD4⁺TGF- β ⁺T 細胞の割合もナリングゲニンの経口投与によって増加したことから、BALB/c マウスにおいてナリングゲニンの経口投与は CD4⁺Foxp3⁺Treg の集団を拡大することが示唆された。

以上、本研究は、日常食品から摂取しているフラボノイドの中に、アレルギー等の抑制にかかわる制御性 T 細胞を誘導する活性を持つものがあることを見出し、その誘導が、本来は解毒代謝の調節に関わると考えられてきた転写因子 AhR を介して起こっていることを *in vitro* および *in vivo* の実験を用いて明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。