

主論文の要旨

**The Suppressive Effect of Quercetin on  
Toll-Like Receptor 7-Mediated Activation  
in Alveolar Macrophages**

Toll-Like Receptor 7 刺激による  
肺胞マクロファージ活性化に対するケルセチンの抑制効果

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻  
発育・加齢医学講座 小児科学分野

(指導：小島 勢二 教授)

安井 正宏

## 【緒言】

ウイルスの気道感染は、喘息のような慢性肺疾患や肺炎の原因となる。気道上皮細胞や肺胞マクロファージ、樹状細胞はパターン認識受容体を介してウイルスを認識し、免疫反応をおこす。肺胞マクロファージは肺において免疫反応を起こす重要な細胞である。 Toll-like receptor(TLR)3 はダブルストランド RNA を、TLR7 と人間の TLR8 はウイルスのシングルストランド RNA を、TLR9 はウイルスの DNA を認識し、NF- $\kappa$ B を活性化して免疫反応を引き起こす。

フラボノイドは果物や野菜などの植物に広く存在する低分子化合物で、抗ウイルス作用、抗酸化作用、抗アレルギー作用、抗炎症作用を示す。我々はこれまでの研究において、フラボノイドとしては最も一般的な物であるケルセチンがマスト細胞、線維芽細胞、肺胞上皮細胞において heme oxygenase(HO)-1 依存経路を介して細胞保護作用を示す事を明らかにしてきた。ケルセチンが TLR の刺激によるマクロファージと樹状細胞の活性化を抑える効果がある事が報告されているが、TLR7 による反応への効果に関しては明らかにされていない。

そこで本研究では、TLR7 のリガンドである imiquimod による刺激をシングルストランド RNA ウイルス感染のモデルとして用いて、imiquimod 刺激によるマクロファージ活性化におけるケルセチンの効果と、ケルセチンにより誘導された HO-1 の関与について検討を行った

## 【方法】

肺胞マクロファージとしてマウス肺胞マクロファージ株 AMJ2-C11 細胞を、肺胞洗浄液細胞としては wild-type C57BL/6 マウスより採取したものを使用した。また、フラボノイドとしてケルセチンを、TLR7 のリガンドには imiquimod を用いた。また、HO-1 の阻害剤として、Tin protoporphyrin IX(SnPP)を使用した。

Cell viability assay はケルセチン添加後 24 時間培養した後、tetrazolium 塩を用いた比色分析法にて行った。

肺胞マクロファージにおける TLR7 刺激とケルセチンの効果については、AMJ2-C11 細胞をケルセチン存在下で 1 時間培養した後、imiquimod にて刺激を行い、IL-6・TNF- $\alpha$  の産生やその抑制について、細胞内シグナル伝達経路に及ぼす影響について PCR 法、Real-Time PCR 法、ウエスタンブロット法、ELISA 法、フローサイトメトリー法、免疫蛍光染色法を用いて評価した。

## 【結果】

ケルセチン添加による細胞の viability はケルセチン濃度が 20 $\mu$ mol/l までは変わらない事を確認し (Figure 1a)、またマウスのマクロファージセルラインである RAW254.7 細胞と AMJ2-C11 細胞において TLR7 が発現している事を確認した。(Figure 1b) imiquimod 刺激により TNF- $\alpha$ 、IL-6 は著名に産生され、またその過剰発現はケルセチン添加にて抑制された。TNF- $\alpha$  はケルセチン濃度が 20 $\mu$ mol/l で抑制され、IL-6 は濃度

依存性に抑制した。(Figure 1c)次に、ウエスタンブロット法を用いてケルセチンが TLR7 のシグナル伝達経路として知られている NF- $\kappa$ B のサブユニットである p65 の核移行を減少させる事を確認した。(Figure 1d)

フローサイトメトリーにて、CD40 の発現は imiquimod 刺激においてわずかに増加したが、ケルセチン添加で抑制されなかった。CD80、CD86、CD23、MHC classII は imiquimod 刺激、ケルセチン添加にて変化しなかった。(Figure 2)

AMJ-C11 細胞において、HO-1 及び HO-1 同様に転写因子である NF-E2-related factor 2(Nrf2)にて誘導される NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1(NQO1)がケルセチン添加にて発現増強する事が示された。(Figure 3a, b) また、ケルセチン添加にて Nrf2 が核内移行する事をウエスタンブロット法と免疫蛍光染色法にて確認した。(Figure 3c) TNF- $\alpha$ ・IL-6 とも imiquimod 刺激にて産生増強し、ケルセチン添加にて抑制され、HO-1 の阻害剤である SnPP にてその抑制が解除された。(Figure 4)

マウスの肺泡洗浄液細胞にても、AMJ2-C11 細胞同様に TNF- $\alpha$ ・IL-6 とも imiquimod 刺激にて産生増強し、ケルセチン添加にて抑制され、HO-1 の阻害剤である SnPP にてその抑制が解除されることが ELISA 法にて確認された。また HO-1 がケルセチン添加にて発現増強する事も real-time PCR にて確認された。(Figure 5)

## 【考察】

肺泡マクロファージは肺泡や気道中に多く含まれており、先天性免疫反応において重要や役割を果たしている。私たちは、本研究にて imiquimod 刺激にて活性化した肺泡マクロファージにおけるフラボノイドであるケルセチンの効果を明らかにした。

結果より、ケルセチンは imiquimod 刺激による TNF- $\alpha$ ・IL-6 の発現を HO-1 発現と Nrf2 の核内移行を介して抑制し、SnPP の添加でその効果が阻害される事が明らかになった。この事より、TLR7 による肺泡マクロファージ活性化におけるケルセチンの抗炎症効果は Nrf2-HO-1 経路を介する事が示された。

TLR7 はウイルスのシングルストランド RNA のレセプターであり、MyD88 を介し NF- $\kappa$ B の活性化し炎症性サイトカインを産生する。本研究にてケルセチンは AMJ2-C11 細胞における imiquimod が誘導する p65 の核内移動を抑えることが明らかになった。HO-1 によって産生されるビリルビンと、ビリベルジンは NF- $\kappa$ B の活性を抑制するなどの免疫調整効果を持っていると報告されている。私たちもケルセチン刺激にてマスト細胞でビリルビン濃度が上昇しており、NF- $\kappa$ B の活性が抑制された事を示唆していると報告している。しかし内皮細胞では核転座の調節無しで NF- $\kappa$ B 活性を抑制すると報告されている。この違いは使用した化合物やセルラインの違いによる物かもしれないが、研究においてはケルセチンの抑制メカニズムを十分に理解する必要がある。

肺泡マクロファージは補助刺激分子である CD40、CD80、CD86 と共に MHCclassII のアップレギュレーションにて T 細胞に抗原提示する抗原提示細胞である。本研究では、imiquimod 刺激にて CD40 の発現がわずかに増加したのみで、その発現増強もケルセチン添加にて抑制されなかった。この結果は、ケルセチンが肺泡マクロファージ

において TLR7 刺激による CD40 の発現が関与するシグナル経路には影響しない事を示している。

Nrf2 は HO-1 と NQO1 等の発現を調整する事による細胞防御機構において重要な役割を果たしている転写因子である。この研究において、ケルセチンは Nrf2 の核内移行を誘導した。この事より、AMJ2-C11 細胞及び C57BL/6 マウスの肺胞洗浄液細胞においてケルセチンは Nrf2 の核内移行を介して HO-1 を誘導している事が推察される。

HO-1 は感染において誘導され、免疫反応の過剰な活性化を防ぐ生体防御システムの一つを担っており、HO-1 の過剰発現はインフルエンザウイルスによる肺障害を軽減させることが報告されている。本研究にて、我々は AMJ2-C11 細胞における imiquimod 刺激をウイルス感染のモデルとして用いて TLR7 シグナルを活性化させた。ケルセチンは imiquimod 刺激による TNF- $\alpha$ ・IL-6 の発現を HO-1 依存性に減少させた。

ケルセチンの経口摂取はウイルス感染したマウスの肺において炎症やウイルスの増殖を減少させると報告されている。人間においてもケルセチンの肺における効果の検証がされており、Heinz らはケルセチンの経口摂取が罹病期間の短縮や上気道炎の重症度を改善させると報告している。ケルセチンは吸収されにくいため、28 日間毎日 1g 経口摂取しても血中濃度は 1.5 $\mu$ mol/l までしか上昇しない。そのため我々は最近、マウスにおいてケルセチンの気管内投与が LPS 刺激による肺障害を軽減させる事を報告した。

#### 【結語】

今回の研究により、フラボノイドであるケルセチンがウイルス感染による炎症の悪化防ぐのに役立つ可能性が示唆された。ケルセチンの効果のメカニズムを解析する事は、HO-1 誘導においてより効果があるケルセチン類似物質の開発に役立つ可能性があり、また炎症性疾患の新しい治療方法の開発に役立つかもしれない。