主論文の要約

Involvement of heme oxygenase-1 in suppression of T cell activation by quercetin

（ケルセチンによるT細胞活性化抑制作用における heme oxygenase-1の関与）

名古屋大学大学院医学系研究科　総合医学専攻
病態外科学講座　呼吸器外科学分野
（指導：芳川 豊史　教授）
杉山 燈人

【緒言】

シクロスポリンはサイトカイン interleukin (IL)-2 の産生を抑制することで、T 細胞の増殖と活性を制御する。この薬剤によって移植医療の成績は飛躍的に向上したが、生存の改善とともに様々な副作用が分かり、大きな問題となっている。

フラボノイドの一種であるケルセチンは、タマネギやリンゴなど野菜や果物に幅広く含まれ、抗酸化作用や抗炎症作用などさまざまな生理活性を有する。ケルセチンはマクロファージや肥満細胞などにおいて heme oxygenase (HO)-1 の活性および発現増強を介し、細胞保護に働くことが明らかになっている。HO-1 はヘムの代謝に関わる酵素で、ヘムの代謝産物によって酸化ストレスや炎症を抑制し、細胞を酸化ストレスから守る働きがある。

ケルセチンの作用する細胞は多岐に渡り、免疫抑制剤の標的細胞である T 細胞についても IL-2 の発現を抑制することが報告されているが、その機序については明らかにされていない。本研究ではケルセチンが T 細胞においても HO-1 を誘導して免疫抑制作用を示すと考え、解析を行った。

【対象および方法】

マウス胸腺腫瘍細胞株である EL4 細胞および wild-type C57BL/6 マウスの脾臓より単離した脾細胞と T 細胞を用いた。A23187 または concanavalin A (Con A)で細胞を刺激し、IL-2 の発現および産生を評価した。ケルセチンは刺激 1 時間前に、HO-1 阻害剤である tin protoporphyrin IX (SnPP)は、ケルセチン添加 30 分前に加え培養した。mRNA およびタンパク質の発現はそれぞれリアルタイム PCR 法および ELISA 法、ウエスタンブロット法で解析した。細胞内カルシウムイオン濃度、細胞増殖、細胞周期、アポトーシスの解析はフローサイトメトリー法にて評価した。

【結果】

ケルセチンは単離したマウス T 細胞において Con A および A23187 による刺激で誘導された IL-2 の発現および産生を抑制した (Figure 1)。次に EL4 細胞において、ケルセチンは HO-1 の発現を mRNA およびタンパク質で誘導し、A23187 によって誘導された IL-2 の発現を容量依存性に抑制した。さらに、ケルセチンは A23187 の刺激による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を抑制した。これらケルセチンの抑制作用は SnPP の添加により解除された (Figure 2)。

また、ケルセチンは EL4 細胞およびマウス T 細胞の細胞増殖を著明に抑制したが (Figure 3A D)、EL4 で解析したところ、アポトーシスの誘導はなく、G1 期から S 期への移行が抑制され G1 アレストが認められた (Figure 4A B)。SnPP の添加によりケルセチンによる細胞増殖の抑制および G1 アレストは解除された (Figure 3B 4C)。

さらに、細胞増殖の主要なシグナルである extracellular signal-regulated kinase (ERK) シグナルに対するケルセチンおよび HO-1 の関与を検討した。A23187 によって増強した ERK シグナルはケルセチンによって抑制され、SnPP の添加によって抑制が解除さ

れた (Figure 5)。

最後に単離したマウス T 細胞においても、ケルセチンは HO-1 の発現を誘導し、A23187 刺激による IL-2 の産生を抑制し、SnPP の添加によってその抑制作用が解除されることを確認した (Figure 6A-C)。さらに、Con A を用いた T cell receptor 刺激による細胞増殖および ERK シグナルの増強はケルセチンによって抑制され、SnPP によってその抑制が解除された (Figure 3D 6D)。

【考察】

本研究では、ケルセチンが T 細胞において HO-1 を誘導し、細胞刺激による IL-2 の産生および細胞増殖をケルセチンが抑制する機序に HO-1 が関与していることを示した。

T 細胞は、T cell receptor から細胞内シグナルが入り細胞内カルシウム濃度が上昇すると、シクロスポリンのターゲットであるカルシニューリンが活性化し、転写因子の核内移行が促進され、IL-2 の産生が誘導される。ケルセチンは細胞内カルシウム濃度の上昇を抑制することで、カルシニューリンの上流で IL-2 の産生を抑制することが示唆された。また、その作用に HO-1 が関与していた。

HO-1 はヘムの代謝に関わる酵素で、ヘムの代謝産物によって酸化ストレスや炎症を抑制し細胞保護作用を発揮する。特にヘムの代謝産物の一つである一酸化炭素（CO）は、T 細胞の ERK 活性化および IL-2 の産生を抑制し、T 細胞の増殖を阻害することが報告されている。また、以前の研究では、HO-1 と CO が Fas / CD95 シグナル伝達経路を介してアポトーシスを促進することにより T 細胞の増殖を抑制することが報告されている。本研究では、細胞増殖の抑制を認めたいずれの濃度においても、ケルセチンが EL4 細胞にアポトーシスを誘導することはなく、G1 アレストを誘導した。これらの結果は、HO-1 がカルシウムの流入および ERK の活性化を阻害することで T 細胞の活性化を抑制し、刺激による細胞増殖を抑制することが示唆された。

HO-1 は細胞に備わっている酸化ストレスに対する防御機構の一つと考えられている。固形臓器移植においては、虚血による組織傷害に対し、HO-1 が過剰発現して組織の保護に働くことが報告されている。ケルセチンは HO-1 を細胞に傷害を与えずに活性化することができるため、傷害や刺激に対して予防的に作用すると考えられている。本研究では細胞保護作用をもつケルセチンが T 細胞においても HO-1 を誘導し、免疫抑制作用を発揮することを明らかにした。

【結論】

ケルセチンは T 細胞において、HO-1 を誘導して IL-2 の産生および細胞増殖を抑制し、免疫抑制作用を発揮することが明らかとなった。ケルセチンおよびその誘導体は免疫抑制剤として用いられる可能性がある。