

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19500690

研究課題名（和文） 微量元素の細胞性免疫に対する影響の分子栄養学的研究

研究課題名（英文） Study of the effect of trace elements on cellular immunity by molecular nutritional procedure

研究代表者

田中 進（TANAKA SUSUMU）

高崎健康福祉大学・健康福祉学部・教授

研究者番号 70348142

研究成果の概要：細胞性免疫に関与するカルシニューリン（CN）の酵素活性に影響を与える微量元素のスクリーニングを行ったところ、3種類のバナジウムイオンがニッケル（Ni²⁺）刺激したCN活性を二相性に阻害することを見出した。またヒトT細胞様株 Jurkat 細胞を用いてマンガン（Mn²⁺）のインターロイキン-2（IL-2）（細胞性免疫の指標）産生の影響を調べたところ、ホルボールエステル存在下において、Mn²⁺がIL-2産生を相乗的に上昇させることが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生活科学

科研費の分科・細目：食生活学

キーワード：微量元素、カルシニューリン、インターロイキン-2、Jurkat細胞、転写調節因子、細胞性免疫

1. 研究開始当初の背景

近年、わが国の食生活は「飽食の時代」と形容されるまでに豊かになるとともに、その一方で欧米型のライフスタイルが加わり、がん、糖尿病、心臓病、脳卒中などの生活習慣病が国民の健康問題の大きな課題となっています。これら疾患の発症と進行を予防するためには、食生活の改善が重要であると考えられますが、国民栄養調査では、鉄、亜鉛、銅、ビタミン B₆ などの微量栄養素の摂取量は所要量を下回っており、更に世代間格差が

あるなど食生活の偏りに対する問題が多様化しています。

しかしながらその一方で高齢化社会を迎えた日本では、人々の健康への関心は年々高まる傾向を示しており、厚生労働省から認可をされた、機能性食品である「特定保健用食品」やビタミン、ミネラルをサプリメントとして活用することは、栄養バランスを整え、健康の維持・増進をはかることになり、生活習慣病の予防に大きな役割を果たすことになると考えられます。しかしながら、こうし

た機能性を持ったサプリメントの中には未だ明らかとされていない生理作用が存在する可能性や、あるいは、その機能性の作用について分子栄養学的な根拠が示されていない場合があると考えられます。そしてその結果として、予期されない過剰症などの問題が生じ、かえって健康を損ねる危険性があると思われま

す。先行研究において、私は生体に必須な微量元素である亜鉛 (Zn^{2+}) が、*in vitro* においてカルシニューリン (CN) 活性を生理的濃度の範囲で濃度依存的に抑制することを見出し、更に Zn^{2+} が mitogen (ConA) 刺激したヒト T 細胞株 Jurkat 細胞のインターロイキン-2 (IL-2) 産生を細胞毒性のない濃度で抑制することを明らかとしました。CN は、T 細胞での IL-2 産生を制御する酵素であり、免疫抑制剤 FK506 やシクロスポリン A の間接標的であることが明らかとなっています。また T 細胞の IL-2 産生能は細胞性免疫の指標の一つとして知られています。従来から亜鉛は、欠乏症と過剰症の一つとして免疫能の低下が示唆されており、例えば、40 年も前の昔から塩化亜鉛は「鼻咽腔炎」を改善する治療法として作用機序は不明ながら、専門医の間では知られていました。従って、私の Zn^{2+} における *in vitro* の CN の結果と Jurkat 細胞の IL-2 産生の結果は、このような亜鉛の生理作用の一端を示したものと考えております。

一方、マンガン (Mn^{2+}) とニッケル (Ni^{2+}) は *in vitro* で CN を活性化する 2 価重金属として良く知られています。従って、本研究では、これらの金属が Jurkat 細胞の IL-2 産生にどのような影響を与えるかを検討するとともに、更に細胞性免疫に關与する CN の酵素活性に影響を与える新規微量元素のスクリーニングを *in vitro* で行いました。

2. 研究の目的

(1) *in vitro* での CN の測定系を使用して、この酵素活性に影響を与える新規微量元素のスクリーニングを行う。

(2) (1) でスクリーニングされた微量元素や Mn^{2+} 、 Ni^{2+} について、Jurkat 細胞の IL-2 産生を調べ、新規免疫抑制あるいは免疫増強作用を有する微量元素のスクリーニングを行う。

(3) (2) でスクリーニングされた微量元素の Jurkat 細胞の IL-2 産生に対する作用機構について、転写調節因子の解析を中心に分子栄養学的に行う。

3. 研究の方法

(1) 免疫抑制、免疫増強作用を有する新規微量元素のスクリーニング

in vitro で CN 活性に影響を与える微量

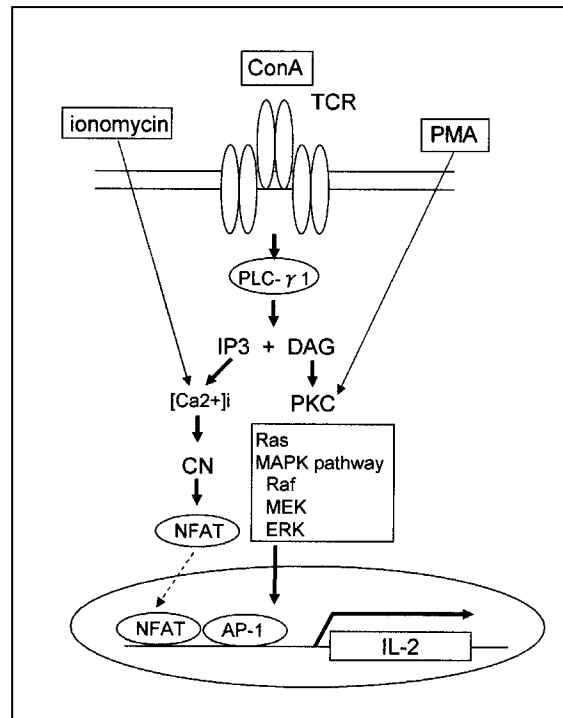
素のスクリーニング法

CN は、 Ca^{2+} /カルモジュリン (CaM) 依存性セリン/スレオニンホスファターゼの一種であり、ホスホプロテインホスファターゼ 2B として知られています。CN は T 細胞において IL-2 mRNA 発現に不可欠な転写調節因子 NFAT (nuclear factor of activated T-cell) の脱リン酸化を触媒し、NFAT の核内移行を促進することが明らかとなっています (図 1)。また、*in vitro* では Ni^{2+} が CN を最も活性化

する元素として知られています。従って測定法は、人工基質として無色のパラニトロフェニルリン酸 (pNPP) を使用し、目的の微量元素を加えた酵素反応系 (HEPES-NaOH (pH7.5)、CaM、 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 、pNPP) に CN を加え、30、1 時間の反応を行いました。酵素反応の結果、生成した黄色のパラニトロフェノールを A_{410} で比色定量することにより、酵素活性を求め、添加した微量元素の CN 活性の阻害あるいは活性化効果を判定致しました。

Jurkat 細胞の IL-2 産生に影響を与える微量元素のスクリーニング法

Jurkat 細胞は、抗 CD3 抗体、ホルボールエステル (PMA)、Phaseolus vulgaris (PHA)、コンカナバリン A (ConA) 等の刺激によって IL-2 を培養上清に産生することが知られています。従って、免疫抑制作用を有する微



【図 1】

微量元素のスクリーニングには、ConA 刺激により活性化した Jurkat 細胞の IL-2 産生の抑制を、RT-PCR (reverse transcription PCR) 法並びに、より定量性のあるリアルタイム PCR を用いた IL-2 mRNA の発現量の測定と培養上清の IL-2 タンパク質を ELISA 法で測定することにより、判定を行いました。また免疫増強作用を有する微量元素のスクリーニングには、これを単剤あるいは PMA やイオノマイシン (IM) を併用することにより、誘導される IL-2 mRNA と IL-2 タンパク質を同様な方法で測定し、解析を行いました。

(2) 微量栄養素の細胞性免疫に対する影響の分子栄養学的研究

T 細胞における IL-2 産生は、CN 系を介した NFAT と MAPK (mitogen-activated protein kinase) 系を介した AP-1 (activating protein 1) の 2 つの転写調節因子によって制御されており、CN は NFAT の脱リン酸化を触媒し、NFAT を核内に移行させることが知られています (図 1)。従って本研究では、先ず、ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイを使用して、微量元素単剤、微量元素と PMA や IM との組み合わせで転写調節因子、NFAT と AP-1 の転写活性をそれぞれ測定し、検討を行いました。

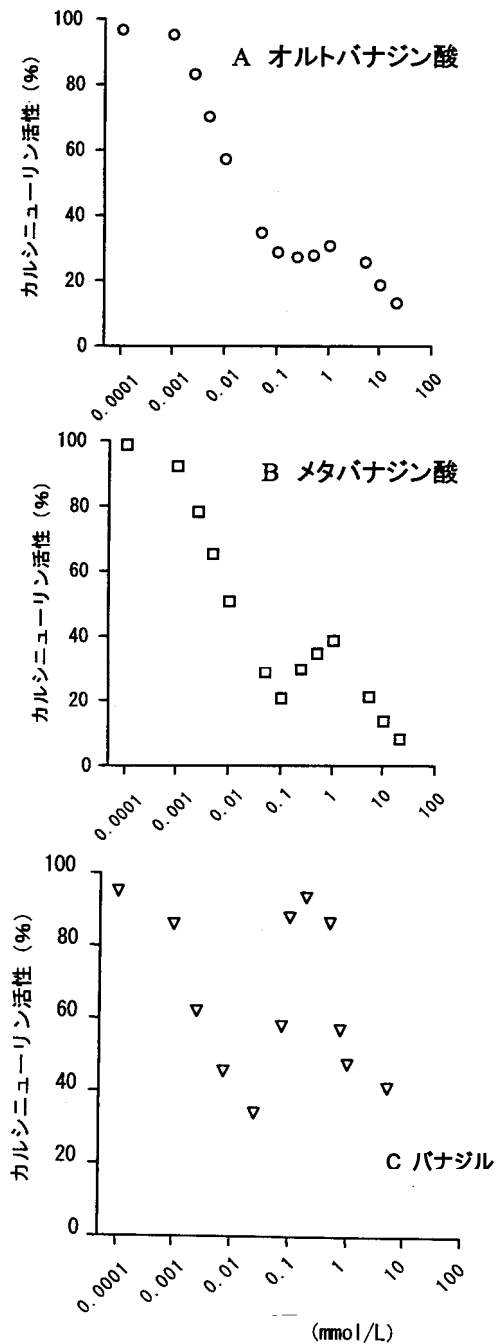
4. 研究成果

(1) *in vitro* で CN 活性に影響を与える微量元素のスクリーニング

バナジウムは本来、ホスホプロテインチロシンホスファターゼの活性を阻害する元素として知られていますので、本研究ではバナジウムに焦点を絞り、検討を行いました。その結果、Ni²⁺刺激した CN 活性を 3 種類のバナジウムイオン (VO₄³⁻、VO₃³⁻、VO²⁺) が二相性に阻害することが明らかとなりました (図 2)。またキネティック解析により、オルトバナジン酸、メタバナジン酸は、基質との競合阻害により CN 活性を阻害することが示されました。オルトバナジン酸、メタバナジン酸の阻害定数 (K_i) をそれぞれ求め、一般的なホスファターゼの阻害剤であるリン酸の K_i と比較したところ、オルトバナジン酸、メタバナジン酸ともにリン酸よりも K_i が小さいという興味深い結果が得られました (表 1)。

(2) Jurkat 細胞の IL-2 産生を指標とした細胞性免疫に影響を与える微量元素のスクリーニングと IL-2 産生の作用機序の解析

先述したように Mn²⁺ と Ni²⁺ は CN を最もよく活性化する金属ですので、Jurkat 細胞にこれらの金属を添加し、IL-2 産生の検討を行いました。これは Mn²⁺ や Ni²⁺ が細胞内で CN を活性化し、その結果リン酸化 NFAT の脱リン酸化が起こり、NFAT が核内に移行することにより、IL-2 が産生されることを期待した



【図 2】

表 1 Ni²⁺刺激したカルシニューリン活性に対するオルトバナジン酸、メタバナジン酸、リン酸の K_i 値

阻害剤なし	V _{max} =22.2 (nmol/L)	K _m =0.52 (mmol/L)
オルトバナジン酸 (30 μmol/L)	K _m あかけ=3.80 (mmol/L)	K _i =4.76 μmol/L
メタバナジン酸 (15 μmol/L)	K _m あかけ=1.61 (mmol/L)	K _i =7.16 μmol/L
リン酸 (300 μmol/L)	K _m あかけ=4.18 (mmol/L)	K _i =42.6 μmol/L

【表 1】

実験です。その結果、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} のそれぞれ単剤の添加では IL-2 産生は観察されませんでした。次に Mn^{2+} や Ni^{2+} に ConA、PMA、IMなどを添加した組み合わせで検討を行ったところ、 Ni^{2+} では IL-2 産生の変化は観察されませんでした。しかしながら、 Mn^{2+} と PMAの組み合わせは Jurkat 細胞の IL-2 産生を相乗的に上昇させることが IL-2 タンパク質の測定で示され、また IL-2 mRNA の発現レベルでもこれが確認されました。この作用機序を検討するためルシフェラーゼを使用したレポーターアッセイで検討を行ったところ、 Mn^{2+} の作用は転写調節因子 NFAT を上昇させるのではなく、予想に反して AP-1 を上昇させることにより、IL-2 産生を上昇させていることが明らかとなりました。

(2)研究分担者

(3)連携研究者

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

田中佑季、大塚恵美子、保坂公平、田中進：ニッケル刺激したカルシニューリン活性におけるバナジウム阻害のキネティック解析. 微量栄養素研究 25: 122-124, 2008、査読有り

http://www.jtnrs.com/sym25/25_122.PDF

田中進、大塚恵美子、高橋克典、増田泰紀、本間千裕、宮澤紀子、保坂公平：ニッケル刺激したカルシニューリン活性に対するバナジウムの効果. 医学と生物学 152(3): 88-93, 2008、査読有り

<http://search.jamas.or.jp/index.php?pp=30&sid=1&type=all&format=std&pf=off&sort1=1&sort2=1&delm=ret&newl=crlf&sid=1&uid=19&module=Basic&action=DetailOnline>

[学会発表](計2件)

田中佑季、大塚恵美子、保坂公平、田中進：*In vitro*におけるニッケル刺激したカルシニューリン活性に対するバナジウムの阻害効果. 日本微量栄養素学会、2008/5/30、全日空ホテル(京都市)

増田泰紀、本間千裕、高橋克典、久保原 禅、保坂公平、田中進：Jurkat T 細胞の IL-2 産生に対するマンガンの効果. 日本生化学会、2007/12/12、パシフィコ横浜(神奈川県)

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 進 (TANAKA SUSUMU)

高崎健康福祉大学・健康福祉学部・教授

研究者番号：70348142