

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05893

研究課題名（和文）免疫-代謝制御を介したプロシアニジン化合物の慢性炎症に対する抑制効果の解明

研究課題名（英文）Inhibitory effect of procyanidins on chronic inflammation through immune-metabolic regulation

研究代表者

田中 沙智（Tanaka, Sachi）

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号：90633032

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ポリフェノールの1つであるプロシアニジンB2（PCB2）にガレート基を付加した化合物がT細胞の活性化を抑制するメカニズムを明らかにすることを目的とした。PCB2ガレートはT細胞の解糖系を抑制することで、mTOR/HIF-1シグナルを抑制し、炎症性サイトカインであるTNF- α の翻訳を抑制した。さらに、解糖系酵素の一つであるLDHに結合したTNF- α のmRNA量がPCB2ガレートにより増加した。以上のことから、PCB2ガレートはT細胞の解糖系シグナルを阻害することで、TNF- α の翻訳を抑制することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、PCB2ガレートが代謝を制御し、免疫反応を制御することを明らかにした。現在、免疫代謝を制御する食品成分が同定された報告はなく、世界に先駆けて明らかにしたと言える。また、PCB2ガレートはT細胞からのサイトカイン産生を抑制し、炎症を抑制する効果が示されたため、慢性炎症によって引き起こされる免疫関連疾患の予防・軽減効果を持つ可能性がある。将来的に、PCB2ガレートが免疫関連疾患の症状を軽減し、健康長寿をサポートする食品由来成分として実用化されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to clarify the mechanism by which a procyanidin B2 (PCB2) with gallate groups, which is one of the polyphenols, suppressed the T cell activation. PCB2 gallate suppressed mTOR / HIF-1 signaling by suppressing T cell glycolysis and suppressed translation of the inflammatory cytokine TNF- α . Furthermore, the amount of TNF- α mRNA bound to LDH, one of the glycolytic enzymes, was increased by PCB2 gallate. These findings suggested that PCB2 gallate suppresses the translation of TNF- α by inhibiting the glycolytic signaling pathway of mTOR / HIF-1 in T cells.

研究分野：食品免疫学

キーワード：プロシアニジン T細胞 サイトカイン 炎症 解糖系

1. 研究開始当初の背景

生体における恒常性を保つためには、細胞のエネルギー代謝調節が適切に維持されることが重要である。例えば、代謝を制御する酵素の遺伝子に異常が起こると、エネルギーの恒常性が破綻する。これによりエネルギー産生が解糖系に依存し、がんの発生につながることが報告されている[1]。免疫担当細胞における代謝の変調は、慢性炎症だけでなく、自己免疫疾患や敗血症などの様々な疾患の引き金になることが報告されている[2]。そのため、免疫細胞の代謝調節を介した免疫制御、つまり「免疫-代謝システム」の調節が疾患の予防・軽減において重要である。

プロシアニジン、リンゴ、カカオ、ブドウなどの食品に多く含まれるポリフェノールの1つである。プロシアニジンの中で、エピカテキンの二量体であるプロシアニジン B2 (PCB2) は免疫調節機能として、マクロファージに対して抗炎症効果をもつことが報告されている。研究代表者らは、これまで免疫細胞に対する効果が未知であった PCB2 にガレート基を付加した PCB2 ガレートを合成し、PCB2 ガレートによる T 細胞の機能制御について検証した。その結果、PCB2 ガレートの T 細胞で過剰に産生される IFN- γ 産生を抑えることを明らかにした[3]。加えて、解糖系最終産物である乳酸量が PCB2 ガレートの添加により有意に低下することも確認した。しかしながら、PCB2 ガレートのどのようなメカニズムで T 細胞の免疫-代謝を制御しているのか、また PCB2 ガレートの生体内でも効果を発揮するかについては不明である。

2. 研究の目的

本研究では、PCB2 ガレートによるサイトカイン産生抑制効果について代謝制御を介した作用機序を明らかにする。また、PCB2 ガレートと相互作用する細胞内のタンパク質を同定し、作用するシグナル伝達を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、PCB2 の 3 位および 3' 位にガレート基を付加した PCB2 3,3'-di-O-gallate (PCB2 ガレート) を使用した (図 1)。本化合物は、信州大学農学部真壁秀文教授によって合成された (4)。

マウスより磁気ビーズ法で単離した CD4 陽性 T 細胞に対して、抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体 (抗 CD3/CD28 抗体) 刺激下で PCB2 ガレートを添加し、24 時間の培養を行った。培養上清中の TNF- α および IFN- γ レベルを ELISA で測定した。解糖系の抑制を確認するため、培養上清中に含まれる乳酸量を Glycolysis Cell-Based Assay Kit を用いて測定した。また、蛍光標識したグルコースである 2-NBDG を用いて細胞の糖取り込みを評価した。

PCB2 ガレートの制御する解糖系シグナル経路を解析するために、CD4 陽性 T 細胞に抗 CD3/CD28 抗体刺激下で PCB2 ガレートを添加し、Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α)、p-mTOR、p-p70S6Kinase (p70S6K) の発現をウェスタンブロッティング法で解析した。

PCB2 ガレートの HIF-1 α および mTOR を介してサイトカイン産生を制御することを確かめるために、HIF-1 α の活性化剤である DMOG、阻害剤である PX-478、mTOR の活性化剤である Leucine、阻害剤である Rapamycin を使用した。CD4 陽性 T 細胞に対して、抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、それぞれの活性化剤および阻害剤を添加した。活性化剤については、PCB2 ガレートとの共添加も行った。培養 24 時間後の培養上清を採取し、TNF- α および IFN- γ レベルを ELISA で測定した。

PCB2 ガレートの解糖系を介したサイトカインの翻訳制御を解析するため、RNA 免疫沈降法を用いて解糖系酵素である Lactate dehydrogenase (LDH) に結合した TNF- α mRNA 量を解析した。

統計処理に関して、有意差検定は一元配置分散分析法 (One-way ANOVA) と Tukey の多重比較法を用いて行い、有意水準は P<0.05 とした。

4. 研究成果

① CD4 陽性 T 細胞のサイトカイン産生に対する PCB2 ガレートの影響

抗 CD3/CD28 抗体で CD4 陽性 T 細胞を活性化させ、産生されるサイトカインに対する PCB2 ガレートの影響を検証した。培養上清中の TNF- α および IFN- γ レベルを ELISA で測定したところ、PCB2 ガレートの添加で有意に低下した (図 2)。以上のことから、PCB2 ガレートの CD4 陽性 T 細胞のサイトカイン産生を抑制することが示された。

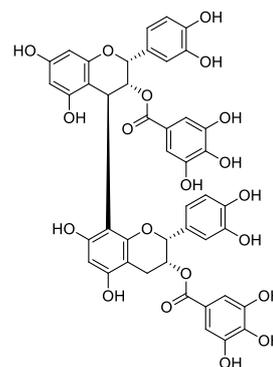


図 1. PCB2 ガレートの構造式

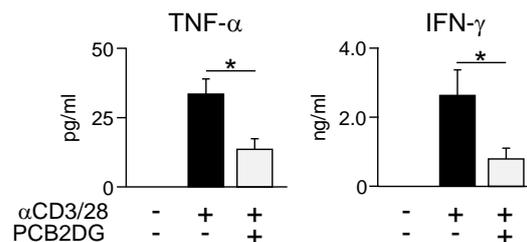


図 2. CD4 陽性 T 細胞のサイトカイン産生に対する PCB2 ガレートの影響

② CD4 陽性 T 細胞の解糖系に対する PCB2 ガレートの影響

次に、PCB2 ガレートの解糖系への影響を評価するために、解糖系の最終産物である乳酸を測定することとした。抗 CD3/CD28 抗体で CD4 陽性 T 細胞を活性化させ、PCB2 ガレートで処理した時の培養上清中の乳酸量を測定したところ、PCB2 ガレートの処理で有意に低下した (図 3A)。

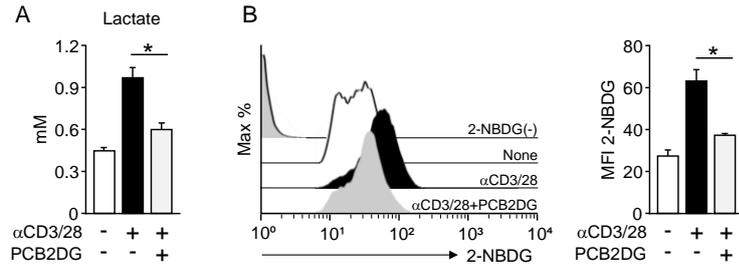


図 3. 乳酸産生および糖取り込みに対する PCB2 ガレートの影響

また、蛍光標識した 2-NBDG を用いて、糖取り込みについて検証した。その結果、抗 CD3/CD28 抗体の刺激で増加した 2-NBDG の蛍光強度が、PCB2 ガレートの処理で有意に減少した (図 3B)。以上のことから、PCB2 ガレートは糖の取り込みを阻害し、解糖系を抑制することが明らかになった。よって、PCB2 ガレートは解糖系を阻害することでサイトカイン産生を抑制する可能性が示唆された。

③ PCB2 ガレートの解糖系シグナルに対する影響

CD4 陽性 T 細胞が活性化すると、mTOR のシグナルが亢進し、解糖系酵素を制御する HIF-1α の

発現が増加して、解糖系が促進される。これらの解糖系シグナルに対する PCB2 ガレートの影響を検証した。CD4 陽性 T 細胞を抗 CD3/CD28 抗体で活性化させ、PCB2 ガレートで処理した時の HIF-1α の発現をウェスタンブロッティングで解析した。その結果、HIF-1α の発現は PCB2 ガレートの処理で有意に低下した (図 4A)。加えて、mTOR および p70S6K のリン酸化も、PCB2 ガレートの添加で低下した (図 4B)。以上のことから、PCB2 ガレートは解糖系を制御する mTOR/HIF-1α シグナルを抑制することが示された。

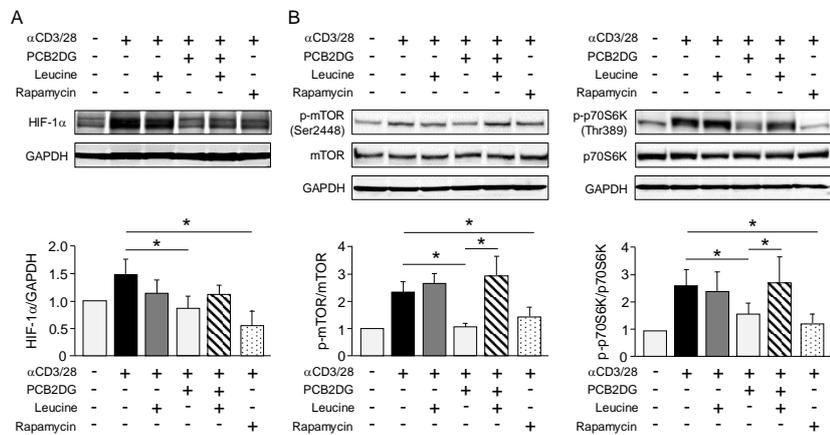


図 4. HIF-1α、p-mTOR および p-p70S6K の発現に対する PCB2 ガレートの影響

④ PCB2 ガレートのサイトカイン産生制御に対する mTOR/HIF-1α シグナルの影響

PCB2 ガレートが HIF-1α の発現を低下させることが明らかになったため、PCB2 ガレートによる HIF-1α を介したサイトカイン産生制御について検討した。HIF-1α の活性化剤である DMOG を PCB2 ガレートとともに CD4 陽性 T 細胞に添加したところ、PCB2 ガレートによる TNF-α および IFN-γ の低下が回復した (図 5A)。一方、HIF-1α の阻害剤である PX-478 で処理したところ、TNF-α および IFN-γ の産生は有意に低下した (図 5A)。

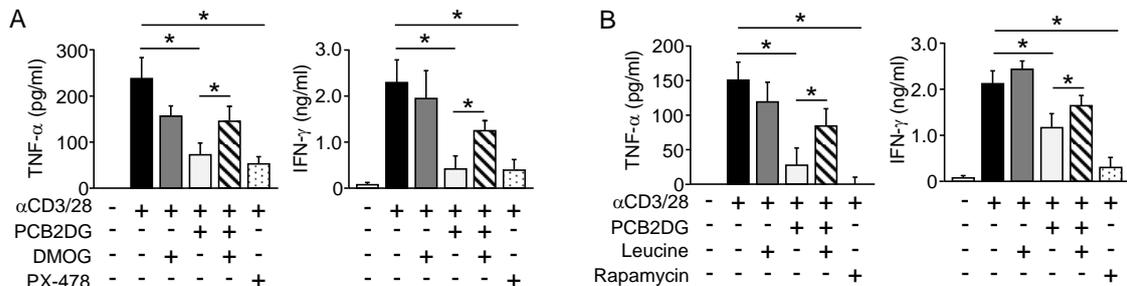


図 5. PCB2 ガレートのサイトカイン産生に対する mTOR/HIF-1αシグナルの影響

同様に、mTOR のシグナルの関与についても検討を行ったところ、mTOR の活性化剤である Leucine を PCB2 ガレートとともに添加すると、PCB2 ガレートによる TNF-α および IFN-γ の低下が回復し、mTOR の阻害剤である Rapamycin の処理で、これらのサイトカイン産生は有意に低

下した (図 5B)。以上のことから、PCB2 ガレートは解糖系を制御する mTOR/HIF-1 α シグナルを介して、サイトカイン産生を抑制することが示された。

⑤ PCB2 ガレートによる解糖系を介したサイトカイン翻訳制御の解析

PCB2 ガレートは CD4 陽性 T 細胞の mTOR/HIF-1 経路に作用することで解糖系および TNF- α 産生を抑制することが示された。また、CD4 陽性 T 細胞における TNF- α は、解糖系酵素 LDH によって翻訳が制御される報告がある [4]。そこで、LDH に結合した TNF- α の mRNA 量を解析するため、抗 CD3/28 抗体刺激で PCB2 ガレートを添加後、培養した CD4 陽性 T 細胞を回収し、抗 LDH 抗体を用いて RNA 免疫沈降を実施した。無処理のサンプル (10% Input)

および免疫沈降サンプル (IP) において LDH のタンパク質レベルをウェスタンブロットで解析したところ、LDH のバンドを検出することができ、LDH が免疫沈降されていることを確認した (図 6A)。免疫沈降後のサンプルを用いて、LDH に結合したサイトカイン mRNA 量を解析した結果、抗 CD3/28 抗体刺激で LDH は TNF- α mRNA から解離し、PCB2 ガレートがその解離を抑制していることが確認された (図 6B)。以上の結果から、PCB2 ガレートは LDH と TNF- α mRNA の結合を維持することで、TNF- α の翻訳を制御していることが示唆され、PCB2 ガレートによる解糖系の制御に伴う TNF- α 産生抑制のメカニズムが明らかになった。

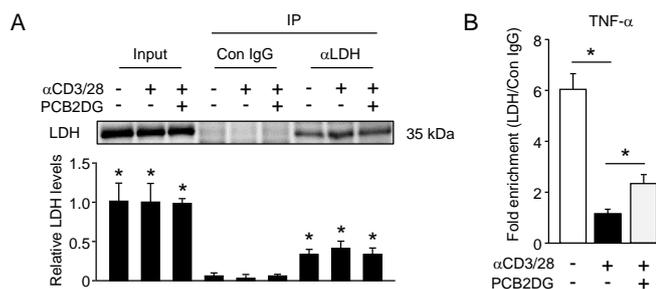


図 6. PCB2 ガレートのサイトカイン翻訳制御メカニズム

<引用文献>

- 1) Vander Heiden GM, Cantley CL, Thompson BC. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009. 324(5930):1029-33. doi: 10.1126/science.1160809.
- 2) Yang Z, Matteson EL, Goronzy JJ, Weyand CM. T-cell metabolism in autoimmune disease. *Arthritis Res Ther*. 2015. 17(1):29. doi: 10.1186/s13075-015-0542-4.
- 3) Tanaka S, Furuya K, Yamamoto K, Yamada K, Ichikawa M, Suda M, Makabe H. Procyanidin B2 gallates inhibit IFN- γ and IL-17 production in T cells by suppressing T-bet and ROR γ t expression. *Int Immunopharmacol*. 2017. 44:87-96. doi: 10.1016/j.intimp.2017.01.007.
- 4) Chang CH, Curtis JD, Maggi LB Jr, Faubert B, Villarino AV, O'Sullivan D, Huang SC, van der Windt GJ, Blagih J, Qiu J, Weber JD, Pearce EJ, Jones RG, Pearce EL. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell*. 2013. 153:1239-51. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.016.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Endo K, Matsui R, Asami T, Sawa T, Nakashima A, Tanaka Y, Makabe H, Tanaka S.	4. 巻 137
2. 論文標題 The suppression of IL-17 production from T cells by gallate-type procyanidin is mediated by selectively inhibiting cytokine production from dendritic cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedical Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 111346
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biopha.2021.111346.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Endo K, Matsui R, Sugiyama M, Asami T, Inaba C, Kobayashi S, Makabe H, Tanaka S	4. 巻 177
2. 論文標題 Procyanidin B2 gallate regulates TNF- production from T cells through inhibiting glycolytic activity via mTOR-HIF-1 pathway.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 113952
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2020.113952.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 遠藤 勝紀、澤 陶有子、真壁 秀文、田中 沙智
2. 発表標題 ガレート型プロシアニジンがT細胞のアミノ酸代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 遠藤勝紀、澤陶有子、田中佑奈、田中沙智
2. 発表標題 ガレート型プロシアニジンのCD4陽性T細胞に対する細胞代謝を介した免疫調節作用
3. 学会等名 日本食品免疫学会第17回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 遠藤 勝紀、澤 陶有子、真壁 秀文、田中 沙智
2. 発表標題 ガラート型プロシアニジンによるIL-17産生抑制メカニズムの解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 遠藤 勝紀、松井 莉奈、杉山 李奈、浅見 拓哉、稲葉 千尋、真壁 秀文、田中 沙智
2. 発表標題 Procyanidin B2 gallateのmTOR経路を介したT細胞機能制御
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠藤勝紀、松井莉奈、浅見拓哉、真壁秀文、田中沙智
2. 発表標題 PCB2DGによる解糖系を介したT細胞機能制御メカニズムの解明
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部例会第187回例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠藤 勝紀、稲葉 千尋、浅見 拓哉、松井 莉奈、田中 沙智
2. 発表標題 プロシアニジンB2ガラートのCD4陽性T細胞に対する細胞代謝を介した免疫調節作用
3. 学会等名 日本食品免疫学会第15回学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	真壁 秀文 (Makabe Hidefumi) (90313840)	信州大学・学術研究院農学系・教授 (13601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------