

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500789

研究課題名（和文）レアメタルの iNKT 細胞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 rare metals on iNKT cells 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（和文）：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レアメタル、微量元素のスクリーニングを *in vitro* で行った。マンガン（ $Mn^{2+}$ ）はニッケル（ $Ni^{2+}$ ）刺激した CN 活性を不競合的に阻害すること、また希土類のランタン（ $La^{3+}$ ）は CN 活性を上昇させることを見出した。次にヒト T 細胞株 Jurkat 細胞を用いてバナジウムイオン（ $VO_4^{3-}$ ）のインターロイキン-2（細胞性免疫の指標）産生を調べたところ、NADPH オキシダーゼを介して  $VO_4^{3-}$  は IL-2 産生を誘導することが示された。

研究成果の概要（英文）：*In vitro* screening was performed for trace elements and rare metals that influence the enzyme activity of calcineurin (CN), which is involved in cellular immunity. Manganese ( $Mn^{2+}$ ) noncompetitively inhibited nickel ( $Ni^{2+}$ )-stimulated CN activity, and the rare earth lanthanum ( $La^{3+}$ ) increased CN activity. Next, the influence of vanadium ion ( $VO_4^{3-}$ ) on the production of interleukin-2 (IL-2) (an indicator of cellular immunity) was investigated using the human T-cell line Jurkat cells. This showed that NADPH oxidase-mediated  $VO_4^{3-}$  induced IL-2 production in Jurkat T-cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：レアメタル、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

カルシニューリン（CN）は、 $Ca^{2+}$ /カルモジュリン（CaM）依存性セリン/スレオニン

プロテインホスファターゼの一種であり、PP2B として知られている。CN は生体内において、細胞の増殖、分化、アポトーシスな

多くの生命機能において重要な役割を果たしているが、特に CN は T 細胞において、転写調節因子である nuclear factor of activated T-cell (NFAT) の脱リン酸化を触媒し、細胞性免疫に関するインターロイキン-2 (IL-2) mRNA の発現を制御していることから、イムノフィリンを介した免疫抑制剤 FK506 ならびにシクロスポリン A の標的分子となっていることが知られている。

一方 *in vitro* では、CN は、ニッケル ( $\text{Ni}^{2+}$ ) やマンガン ( $\text{Mn}^{2+}$ ) のような二価金属で活性化 (刺激) されることが明らかとなっており、先行研究では、ウシ脳組織から精製された CN を使用して、生理的濃度の亜鉛 ( $\text{Zn}^{2+}$ ) が  $\text{Ni}^{2+}$  との競合阻害により CN 活性を阻害すること、また 3 つのパナジウムイオン (オルトパナジン酸 ;  $\text{VO}_4^{3-}$ 、メタパナジン酸 ;  $\text{VO}_3^-$ 、パナジル ;  $\text{VO}^{2+}$ ) が  $\text{Ni}^{2+}$  刺激した CN のホスファターゼ活性を二相性に阻害することを明らかとしてきた。更に CN 活性に影響を与える生体内微量元素について、ヒト T 細胞用株 Jurkat 細胞を用いて、細胞が産生する IL-2 を指標に細胞性免疫に対する影響の検討を試みた。その結果、 $\text{Zn}^{2+}$  が mitogen であるコンカナバリン A (ConA) 刺激した Jurkat 細胞の 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、更に、 $\text{Mn}^{2+}$  がホルボールエステル (PMA) で刺激した Jurkat 細胞において、IL-2 産生を相乗的に増加させることを見出してきた。

一方レアメタルは電子材料、磁性材料、機能性材料といった工業製品の一部として使用され、工業的価値が上昇するのに伴い、工業製品の製造者や我々使用者には比較的身近な元素となってきた。従って、本研究では微量元素とともにレアメタルも含めた金属元素と免疫との関連を更に検討することを目的とした。特に細胞性免疫に関する CN の酵素活性に影響を与える新規なレアメタルおよび微量元素のスクリーニングを *in vitro* で行うとともに、パナジウムイオンが Jurkat 細胞の IL-2 産生を上昇させることを見出したので、その作用機序について分子栄養学的な解析を行った。

## 2. 研究の目的

(1) *In vitro* で CN の測定系を使用して、CN のホスファターゼ活性に影響を与える新規レアメタルと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レアメタルや微量元素について、Jurkat 細胞の IL-2 産生を調べ、免疫抑制あるいは免疫増強作用を有する金属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レアメタル、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、転写調節因子を中心

とした分子栄養学的な解析を行う

## 3. 研究の方法

(1) *In vitro* で CN 活性に影響を与える新規レアメタル、微量元素のスクリーニング法

CN はホスホプロテインホスファターゼ 2B として知られているので、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、目的のレアメタルまたは微量元素を加えた酵素反応系 (HEPES-NaOH (pH7.5)、CaM、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、pNPP) にウシ脳から精製された CN を加え、30、1 時間の反応を行った。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、添加したレアメタルや微量元素の CN 活性に対する阻害作用あるいは活性化作用を判定した。

(2) Jurkat 細胞の IL-2 産生に影響を与えるレアメタル、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) とイオノマイシン (IM)、Phaseolus vulgaris (PHA) または 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る。従って、免疫抑制作用を有するレアメタル、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、判定を行った。また免疫増強作用を有するレアメタル、微量元素のスクリーニングには、これらの金属元素で誘導される IL-2

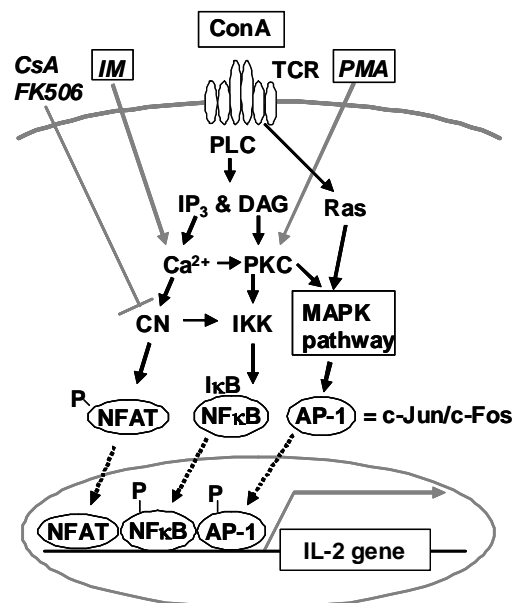


図 1. NFAT、NFκB、AP-1 による IL-2mRNA 発現の制御

mRNA と IL-2 タンパク質を同様な方法で測定し、解析を行った。

### (3) 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

T 細胞における IL-2 産生は、CN 系を介した NFAT と mitogen-activated protein kinase (MAPK) 系を介した activating protein 1 (AP-1) および I B kinase (IKK) 系を介した nuclear factor kappa B (NF B) の3つの転写調節因子によって制御されており(図1) CN は NFAT の脱リン酸化反応を触媒することにより、NFAT を核内に移行させることが知られている。本研究では、バナジウムイオンが IL-2 産生を誘導することを見出したので、Jurkat 細胞をバナジウムイオンで刺激を行った後、核内タンパク質を抽出して ELISA 法により各転写調節因子の測定を行った。またバナジウムイオンは NADPH オキシダーゼを介して IL-2 産生を誘導することが予想されたため、NADPH との相乗効果の検討、NADPH オキシダーゼの阻害剤を用いた検討を行い、その作用機序の解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) *In vitro* で CN 活性に影響を与えるレア

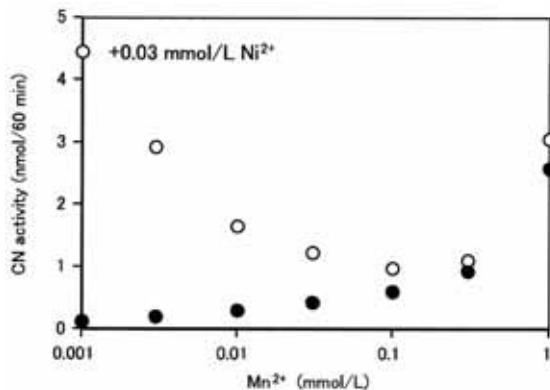


図2. 0.03mmol/L の  $\text{Ni}^{2+}$  で刺激した CN 活性における  $\text{Mn}^{2+}$  の効果

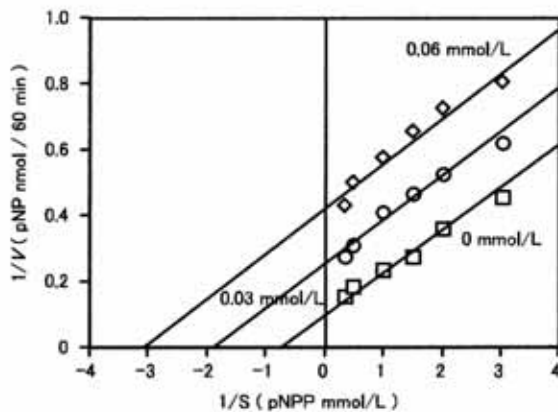


図3.  $\text{Ni}^{2+}$  刺激した CN 活性の 0.03mmol/L および 0.06mmol/L の  $\text{Mn}^{2+}$  による阻害効果

### メタル、微量元素のスクリーニング

CN は *in vitro* では、ニッケル ( $\text{Ni}^{2+}$ ) やマンガン ( $\text{Mn}^{2+}$ ) で活性化することが示されているが、本研究では、 $\text{Ni}^{2+}$  刺激した CN 活性に対する  $\text{Mn}^{2+}$  の相乗効果について検討を行った。その結果、予想に反して  $\text{Mn}^{2+}$  がこの活性を阻害することを見出した(図2)。また、この阻害をキネティック解析を行い(図3) 検討したところ、 $\text{Mn}^{2+}$  は、 $\text{Ni}^{2+}$  刺激した CN 活性を不競合的に阻害することが予想された。

また希土類であるランタン ( $\text{La}^{3+}$ )、スカンジウム ( $\text{Sc}^{3+}$ )、イットリウム ( $\text{Yt}^{3+}$ ) について CN 活性の影響を検討したところ、これらの元素では、CN 活性を上昇させることが示された。

### (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

先行研究において3つのバナジウムイオン ( $\text{VO}_4^{3-}$ 、 $\text{VO}_3^-$ 、 $\text{VO}^{2+}$ ) が  $\text{Ni}^{2+}$  刺激した CN 活性を二相性に阻害することを見出していたので、この中の  $\text{VO}_4^{3-}$ 、 $\text{VO}^{2+}$  について着目し、これら2つのバナジウムイオンの Jurkat 細胞における IL-2 産生の影響について検討を行った。その結果、2つのバナジウムイオンでは IL-2 産生を認め、 $\text{VO}_4^{3-}$  のほうがその作用が大きい傾向があることが示された(図4)。

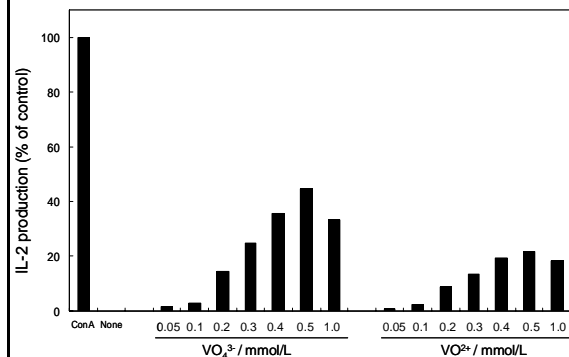


図4.  $\text{VO}_4^{3-}$ 、 $\text{VO}^{2+}$  による Jurkat 細胞の IL-2 産生の誘導

### (3) Jurkat 細胞におけるバナジウムイオンの IL-2 産生誘導の作用機序に関する検討

2つのバナジウムイオン ( $\text{VO}_4^{3-}$ 、 $\text{VO}^{2+}$ ) が Jurkat 細胞の IL-2 産生を誘導することを示したが、ここでは  $\text{VO}_4^{3-}$  に焦点をあて、その作用機序の検討を試みた。

最初に IL-2 mRNA 発現に関わる3つの転写調節因子(図1)を ELISA 法で測定したところ、何れも  $\text{VO}_4^{3-}$  で上昇していることが示された。更にこの作用機序について、NADPH オキシダーゼの関与を検討したところ、 $\text{VO}_4^{3-}$  は NADPH の添加により相乗的に IL-2 産生

を上昇させること、また NADPH オキシダーゼの阻害剤は、IL-2 産生を抑制させることを見出した。従って、VO<sub>4</sub><sup>3-</sup>は NADPH オキシダーゼを介した活性酸素種の影響により、IL-2 産生を誘導させることが示唆された。

#### 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3件)

Tanaka S, Masuda Y, Honma C, Hosaka K, Takahashi K, and Kubohara Y : Manganese promotes phorbol ester-induced interleukin-2 production via AP-1 activation in Jurkat T-cells. *Toxicol. Lett.* 211 : 312-318, 2012 査読有

田中 進、田中佑季、伊藤 昇、保坂公平：リコンビナントヒトカルシニューリン活性に対する金属イオンの効果。医学と生物学 155(8): 483-488, 2011、査読有

<http://ci.nii.ac.jp/naid/40018949822>

田中佑季、大塚恵美子、保坂公平、田中進：マンガンはニッケル刺激したカルシニューリン活性を不競合的に阻害する。微量栄養素研究 26: 70-73, 2009、査読有

[http://www.jtnrs.com/sym26/26\\_070.pdf](http://www.jtnrs.com/sym26/26_070.pdf)

[学会発表](計3件)

田中 進、田中佑季：バナジウムは NADPH オキシダーゼを介して Jurkat T 細胞の IL-2 産生を誘導する。日本生化学会、2011/9/20、国立京都国際会館(京都市)

田中 進、増田泰紀、田中佑季、本間千裕、高橋克典、保坂公平、久保原 禅：マンガンは AP-1 を介してホルボールエステルで誘導された Jurkat T 細胞の IL-2 産生を促進する。日本生化学会、2010/12/7、神戸国際会議所(神戸市)

田中佑季、大塚恵美子、保坂公平、田中進：マンガンはニッケル刺激したカルシニューリン活性を阻害する。日本微量栄養素学会、2009/6/5、京都リサーチパーク(京都市)

[その他]

#### 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