

研究ノート**リンゴプロシアニジン5量体がヘルパー T細胞の分化に及ぼす影響の解析**

後藤 真生, 若木 学, 石川(高野) 祐子*

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門
〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12**Effects of apple pentameric procyanidins on differentiation of helper T cells.**

Masao Goto, Manabu Wakagi and Yuko Takano-Ishikawa*

Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization
2-1-12 Kannonndai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642**Abstract**

Procyanidins, which are flavonoids that are found in a variety of plant species, reduce or prevent immune disorders, such as autoimmune diseases. We indicated that oligomeric procyanidins suppress naïve T cell activities by inhibition of aerobic-glycolysis. In this study, we investigated the effects of pentameric procyanidin derived from apple (APC-P) on the differentiation of naïve T cell. Firstly, naïve CD4⁺ T cells among splenocytes were induced to differentiate in effector cells by antigenic stimulation in the presence of APC-P and then CD4⁺ T cells were separated from cultured splenocytes. APC-P treatment strongly reduced Th1 type cytokines from CD4⁺ T cells. On the other hand, Th2 type cytokines and cell proliferation were not strongly reduced. These results suggest that APC-P inhibit the differentiation of Th1 effector cells from naïve CD4⁺ T cells.

CD4⁺ T細胞は全身、特に脾臓やリンパ節などのリンパ器官に分布して、獲得免疫系において重要な役割を果たしている。抗原提示細胞は体内に侵入した異物を抗原として取り込んだ後、それをペプチドに分解し、自らの表面に提示する。CD4⁺ T細胞はその表面に発現するT細胞レセプター (TCR) によって、抗原提示細胞

が提示した抗原因由来のペプチドを認識することで、活性化する。抗原による刺激を受けた経験のない (ナイーブ) CD4⁺ T細胞は抗原提示の活性化を受けると、Interleukin (IL)-2等さまざまなサイトカインを分泌しながら増殖し、周囲のサイトカイン環境に応じて、それぞれ機能の異なるエフェクター T細胞に分化し、より

* 連絡先 (Corresponding author), yuko@affrc.go.jp

効率的な異物の排除に働く。主なエフェクター T細胞としてTh1細胞とTh2細胞がよく知られており、IL-12とIFN- γ によって誘導されるTh1細胞はIL-2、IFN- γ などのTh1型サイトカインを産生することにより細胞性免疫を活性化し、IL-4によって誘導されるTh2細胞はIL-4、IL-10などのTh2型サイトカインを産生し、液性免疫を活性化する^{1) 2)}。

プロシアニジンフラボノイドの一種であり、多くの植物に含まれるが、特にリンゴは人間のプロシアニジンの主要な摂取源である^{3) 4)}。プロシアニジンは(+)-catechinと(-)-epicatechinの重合体であり、それぞれ化学的性質が異なる多様な構造を持ち、炎症やアレルギー、自己免疫疾患などへの効能が報告されているが^{5)~7)}、作用機序については不詳であった。我々は、リンゴ由来のプロシアニジンオリゴマーが他のフラボノイド類とは異なり、活性化したナイーブCD4⁺ T細胞の好氣的解糖を抑制することによって、IFN- γ などのサイトカインの産生と細胞増殖を抑制するという新しい免疫抑制機序を報告した⁸⁾。

しかしながら、プロシアニジンの摂取がヒトの病態を改善する機序を解明するためには、ナイーブCD4⁺ T細胞の活性化に加え、その後に起きるエフェクター細胞への分化にプロシアニジンが及ぼす影響についても解析する必要がある。我々の以前の報告で、プロシアニジンがナイーブCD4⁺ T細胞のサイトカイン環境を大きく変化させることが示唆されたことから、本研究では、ナイーブCD4⁺ T細胞の活性化を強く抑制したリンゴ由来のプロシアニジン5量体の存在下でナイーブCD4⁺ T細胞がどのようなエフェクター細胞に分化したのかを、細胞増殖能と産生するサイトカインによって評価した。その結果、プロシアニジン5量体はナイーブCD4⁺ T細胞の分化に影響することが示唆されたので報告する。

実験材料及び方法

1. 試料

リンゴプロシアニジン5量体 (Apple procyanidin pentamer以下、APC-P) は農研機構果樹茶業研究部門の庄司氏より供与された、リンゴ (*Malus pumila* cv. Fuji) 搾汁から調整⁹⁾ したものを、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (D-PBS; 和光純薬) に10 mg/mLとなるように溶解した後、実験に使用するまで遮光密閉状態で-30℃で保存した。後述する脾臓細胞を刺激する抗原として卵白アルブミン (OVA grade V, Sigma-

Aldrich) およびCD4⁺ T細胞の刺激にはDynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28 (以下、Dynabeads; ベリタス) を用いた。

2. 細胞および培地

OVAに特異的なT細胞受容体を発現するDO11.10マウス (16週齢, 雄性) から採取した脾臓の初代細胞を用い、牛胎児血清 (PAA laboratories) 10%, 2-メルカプトエタノール (50 μ M), ペニシリン (100 U/mL), ストレプトマイシン (100 μ g/mL) を含むRPMI-1640培地 (Sigma-Aldrich) を培養培地として、炭酸ガスインキュベータ中 (5%炭酸ガス, 37℃) で培養した。DO11.10マウス (Jackson laboratories) は(株)チャールズリバーから購入し、当部門のバリアシステムの動物飼育室において、市販標準飼料で繁殖・維持した。本動物実験は食品研究部門動物実験委員会の承認を得て、同部門規定の動物実験ガイドラインに従い実施した。

3. 細胞培養

細胞培養用6ウェルプレート (Nunc) に、マウスから得られた脾臓細胞 (2 \times 10⁷ cells/well), APC-P (25 μ M), OVA (7.5 μ M) を計15 mL/wellとなるように培養した。6日後、培養した脾臓細胞を回収し、3回洗浄してAPC-Pを除去した後、CD4 (L3T4) MicroBeads, mouse (Miltenyi Biotec) を用いてCD4⁺ T細胞を分離した。一方、APC-P処理を行わず上述と同様の操作を行った細胞を対照とした。細胞培養用96ウェルプレート (Nunc) に、CD4⁺ T細胞 (8 \times 10⁴ cells/well) とDynabeads (2 μ L) を計300 μ L/wellとなるよう、24~72時間培養し、細胞増殖および培養上清中のサイトカインの測定を行った。

4. 各種測定

T細胞増殖は、Dynabeadsによる刺激から70時間後にBrdU chemiluminescent cell-proliferation ELISA kit (Roche Molecular Biochemicals) を用いて、指定された手順に従って測定した。T細胞産生サイトカインは、Dynabeadsによる刺激から、IL-2とIL-4については24時間後、IL-10とIFN- γ については72時間後に回収した培養上清をMouse Cytokine ELISA Ready-SET-Go! kits (eBioscience) を用いて、指定された手順に従って測定した。培養上清は測定に供するまで遮光密閉状態で-30℃で保存した。

5. 統計処理

統計処理にはMicrosoft excel 2013を用い、4回反復行った結果を平均値±標準偏差 (SD) で表し、スチューデントのt検定により、危険率5%以下を有意差ありと判定した (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

実験結果および考察

抗原刺激されたナイーブT細胞は自ら産生したサイトカインなどに依存して、Th1細胞、Th2細胞等のエフェクターT細胞に分化する。我々は、抗原刺激されたナイーブT細胞が産生するIFN- γ がAPC-P処理によって、Th2型サイトカインに比べて著しく減少することを明らかにしており⁸⁾、このことはAPC-PはナイーブT細胞がエフェクターT細胞に分化するためのサイトカイン環境をTh2型に偏らせたことを示唆する。そこでAPC-PがナイーブT細胞のエフェクターT細胞への分化に与える影響を明らかにするために、APC-P存

在下で抗原刺激によって分化を誘導したCD4⁺T細胞を刺激し、免疫応答を評価した。実験は、APC-P存在下で抗原刺激して培養した脾臓細胞からCD4⁺T細胞を単離し、Dynabeadsによって刺激し、IL-2産生能と細胞増殖能を評価した。その結果、APC-P処理由来のCD4⁺T細胞は対照に比べて細胞増殖能に有意な差は見られなかった(図1A)が、IL-2の産生は1/20程度であった(図1B)。IL-2はナイーブT細胞およびTh1細胞が主に産生するサイトカインであることから、この細胞は少ないと考えられた。

APC-P存在下でOVAによりDO11.10由来脾臓細胞を刺激し、6日後にCD4⁺T細胞を回収した。回収した細胞をDynabeadsで刺激し、細胞増殖能 (A)、及びIL-2の産生 (B)をAPC-Pを添加しない対照と比較した。4反復行った結果を平均値±SDで表し、有意差検定を実施し、危険率5%以下を有意差ありと判定した (**: $p < 0.01$).

そこで、Th1あるいはTh2細胞の指標であるTh1型・

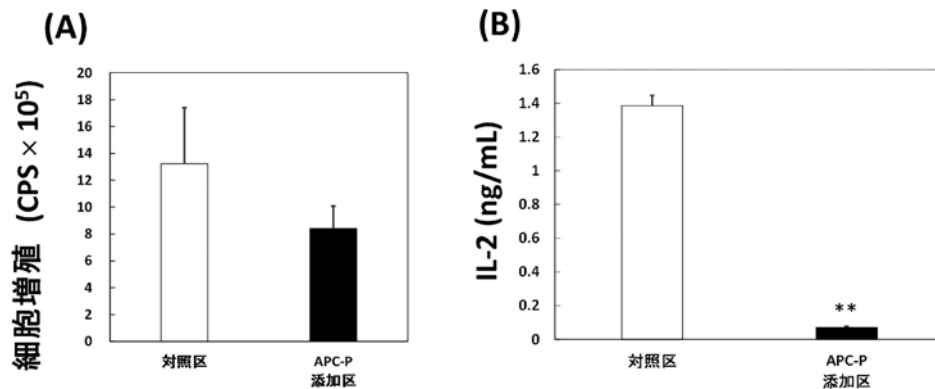


図1 APC-P存在下で分化させたCD4⁺T細胞のIL-2産生と細胞増殖クロマトグラム

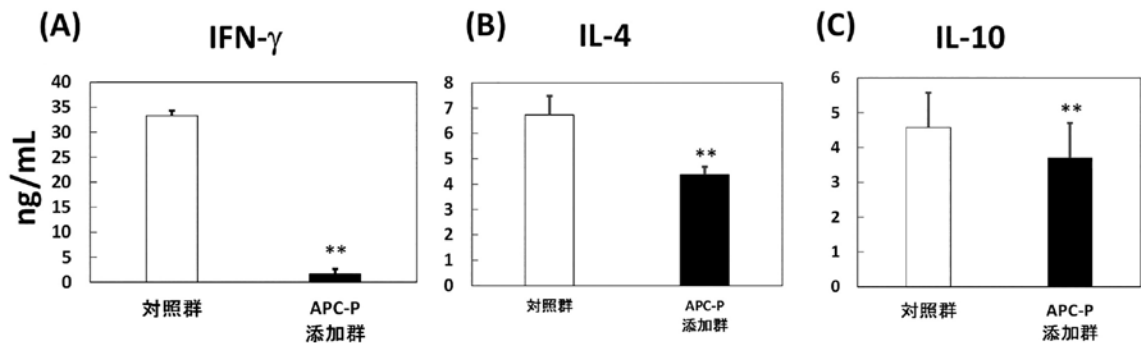


図2 APC-P存在下で分化させたCD4⁺T細胞のIFN- γ 、IL-4、IL-10産生

Th2型サイトカインの産生について検討したところ、Th1細胞に特徴的なサイトカインであるIFN- γ ¹⁰⁾は対照に比べて約1/20の産生量であったが、Th2細胞に特徴的なIL-4およびIL-10^{10) 11)}は対照に比べて、それぞれ約2/3, 4/5の産生量であった(図2)。

APC-P存在下でOVAによりDO11.10由来脾臓細胞を刺激し、6日後にCD4⁺T細胞を回収した。回収した細胞をDynabeadsで刺激し、IFN- γ (A)、IL-4(B)、IL-10(C)の産生についてAPC-Pを添加しない対照と比較した。4反復行った結果を平均値 \pm SDで表し、有意差検定を実施し、危険率5%以下を有意差ありと判定した(**: $p < 0.01$)。

以上の結果より、APC-P存在下で分化したT細胞においては対照に比べてTh1細胞や未分化なナイーブCD4⁺T細胞の占める割合が大きく減少する一方で、Th2細胞は比較的維持されていることが示唆された。またAPC-P存在下ではナイーブT細胞はTh1細胞に分化しにくいことが推測された。今後さらに、細胞表面マーカーなども活用し、Th1/Th2細胞について確認する予定である。

本研究ではAPC-P処理によりCD4⁺T細胞群はTh2細胞が主体となっていることが示唆された。近年、Th2細胞の即時型アレルギーへの関与が注目されているが、APC-P処理下では炎症を誘導するIFN- γ ¹²⁾の産生が顕著に抑制され、T細胞の機能を抑制するIL-10産生¹¹⁾が8割程度は維持されていることから、Th2細胞がCD4⁺T細胞の主体であったとしても、免疫抑制的に働くと予想される。このことはナイーブT細胞の活性化抑制とともに、5量体などのオリゴマーを含むプロシアニジンの自己免疫疾患や各種炎症疾患への効能に寄与すると考えられるため、プロシアニジン5量体存在下で誘導されたエフェクター細胞の機能や分化機序の詳細などについて今後検討を進める予定である。

要 約

リンゴを初め様々な植物・農産物に含まれるプロシアニジンには様々な免疫疾患への効能が報告されている。我々はリンゴ由来のプロシアニジンが好氣的解糖の抑制を介してナイーブCD4⁺T細胞の抗原特異的免疫応答を抑制することを明らかにした。そこで、本研究は、プロシアニジンによって免疫応答を抑制されたT細胞が、その後どのようなエフェクターT細胞に分化するかについて行った。その結果、プロシアニジン5量体存在下ではナイーブCD4⁺T細胞のTh1細胞への分

化が強く阻害されることが示唆された。

本研究の遂行にあたりサイトカインや細胞増殖の測定などの技術的協力を頂いた山本充子氏、プロシアニジン5量体を供与して下さった農研機構果樹茶業研究部門庄司俊彦氏に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Yang, J., Murphy, T.L., Ouyang, W. and Murphy, K.M. Induction of interferon-gamma production in Th1 CD4⁺T cells: evidence for two distinct pathways for promoter activation. *Eur. J. Immunol.*, **29**, 548-555 (1999).
- 2) Murphy, K.M., Ouyang, W., Farrar, J.D., Yang, J., Ranganath, S., Asnagli, H., Afkarian, M. and Murphy, T.L. Signaling and transcription in T helper development. *Annu. Rev. Immunol.*, **18**, 451-494 (2000).
- 3) Hammerstone, J.F., Lazarus, S.A. and Schmitz, H.H. Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *J. Nutr.* **130**, 2086-2092 (2000).
- 4) Gu, L., Kelm, M.A., Hammerstone, J.F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S. and Prior, R.L. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J. Nutr.*, **134**, 613-617 (2004).
- 5) Shoji, T., Mutsuga, M., Nakamura, T., Kanda, T., Akiyama, H. and Goda, Y. Isolation and structural elucidation of some procyanidins from apple by low-temperature nuclear magnetic resonance. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 3806-3813 (2003).
- 6) Lotito, S.B., Actis-Goretta, L., Renart, M.L., Caligiuri, M., Rein, D., Schmitz, H.H., Steinberg, F.M., Keen, C.L. and Fraga, C.G. Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **276**, 945-951 (2000).
- 7) Miyake, M., Sasaki, K., Ide, K., Matsukura, Y., Shijima, K. and Fujiwara, D. Highly oligomeric procyanidins ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis via suppression of Th1 immunity. *J. Immunol.*, **176**, 5797-5804 (2006).
- 8) Goto, M., Wakagi, M., Shoji, T. and Takano-Ishikawa Y. Oligomeric Procyanidins Interfere with Glycolysis of Activated T Cells. A Novel Mechanism for Inhibition of T Cell Function. *Molecules.*, **20**,19014-19026 (2015).

- 9) Shoji, T., Masumoto, S., Moriichi, N., Kanda, T. and Ohtake, Y. Apple (*malus pumila*) procyanidins fractionated according to the degree of polymerization using normal-phase chromatography and characterized by HPLC-ESI/MS and MALDI-TOF/MS. *J. Chromatogr.*, **1102**, 206–213 (2006).
- 10) Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. and Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.*, **136**, 2348-2357 (1986).
- 11) Mosmann, T.R., Schumacher, J.H., Fiorentino, D.F., Leverah, J., Moore, K.W. and Bond, M.W. Isolation of monoclonal antibodies specific for IL-4, IL-5, IL-6, and a new Th2-specific cytokine (IL-10), cytokine synthesis inhibitory factor, by using a solid phase radioimmunoabsorbent assay. *J. Immunol.*, **145**, 2938-2945 (1990).
- 12) Tan, Y., Wu, X., Sun, J., Guo, W., Gong, F., Shao, F., Tan, T., Cao, Y., Zheng, B., Gu, Y., Sun, Y. and Xu, Q. A fumigaclavine C isostere alleviates Th1-mediated experimental colitis via competing with IFN- γ for binding to IFN- γ receptor 1. *Biochem. Pharmacol.*, S0006-2952(16), 30349-5 (2016).