

リグニン様酵素重合ポリフェノールの免疫賦活効果と
作用メカニズムに関する研究

山中 大輔

2014

目次

緒論	1
実験の部	7
第一章 酵素重合ポリフェノール (enzymatically polymerized polyphenols : EPP) の免疫調整効果と T 細胞への影響	21
第一節 マウス白血球に対する EPP の影響	22
1. EPP の脾臓細胞に対する毒性評価	22
2. EPP の脾臓細胞におけるサイトカイン産生誘導作用	27
第二節 EPP のサイトカイン産生作用における T 細胞の関与	29
1. EPP のサイトカイン産生作用と T 細胞群の影響	30
2. EPP のサイトカイン産生作用における CD4 の関与	32
3. EPP と CD4 分子の相互作用	34
第一章 考察	38
第二章 EPP の免疫賦活活性における異種細胞間相互作用の影響	40
第一節 種々の白血球に対する EPP の影響	41
1. CD4 陽性, CD8 陽性 T 細胞に対する EPP の影響	41
2. 各組織由来白血球に対する EPP の影響	43
3. SCID マウス由来脾臓細胞に対する EPP の影響	45
第二節 EPP のサイトカイン産生作用における抗原提示細胞の関与	47
1. EPP のサイトカイン産生作用における抗原提示細胞群の影響	47
2. EPP の BMDC におけるサイトカイン産生誘導作用	49
第三節 細胞間相互作用により制御される EPP のサイトカイン産生誘導作用	51
1. EPP の IFN- γ 産生誘導作用における抗原提示細胞と T 細胞の関与	51
2. EPP の IFN- γ 産生誘導作用における IL-12 の関与	53
3. EPP のサイトカイン産生誘導作用における種々の細胞間接着分子の影響	55
第二章 考察	57

第三章 EPP の経口投与による抗腫瘍効果および NK 細胞活性化作用	59
第一節 酵素重合前後における CA の物性変化	60
1. CA, pCA の抗酸化活性	60
2. CA, pCA の分子量分布	62
第二節 CA, pCA の安全性評価	64
1. 細菌を用いた CA, pCA の変異原性試験	64
2. 経口投与における CA, pCA の摂取量とマウスの体重変化	66
第三節 CA, pCA の経口投与による抗腫瘍効果	68
1. <i>in vivo</i> における CA, pCA の経口投与による腫瘍増殖抑制効果	68
2. <i>in vitro</i> における腫瘍細胞増殖に対する CA, pCA の影響	70
第四節 CA, pCA の経口投与による免疫系に対する影響	71
1. CA, pCA の経口投与による脾臓細胞数と T 細胞分布への影響	71
2. CA, pCA の経口投与による脾臓細胞のサイトカイン産生能への影響	73
3. CA, pCA の経口投与による NK 細胞活性への影響	75
第五節 CA, pCA の代謝, 吸収および排泄	77
1. CA, pCA の糞中への排泄率評価	77
2. pCA の経口投与後における CA への分解性評価	79
第三章 考察	81
総括	83
謝辞	86
研究結果の掲載誌	87
引用文献	88

略語一覧

本論文中に使用した略語は以下の通りである.

Ab : antibody

ABTS : 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt

APC: allophycocyanin

BM : bone marrow

BMC : bone marrow cell

BMDC : bone marrow-derived dendritic cell

BRM : biological response modifier

BSA : bovine serum albumin

CA : caffeic acid

CD : cluster of differentiation

cDNA : complementary DNA

CLEC : C-type lectin

CoA : *trans-p*-coumaric acid

ConA : concanavalin A

CTL : cytotoxic T lymphocyte

CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte antigen 4

CY : cyclophosphamide

Da : Dalton

DHP : dehydrogenation polymer

DIW : deionized water

DMSO : dimethyl sulfoxide

DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

EGCG : epigallocatechin-3-gallate

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

EPP ; enzymatically polymerized polyphenol

ESI : electrospray ionization

FA : *trans*-ferulic acid

FACS : fluorescent-activated cell sorting

FBS : fetal bovine serum

FITC : fluorescein isothiocyanate

GALT : gut-associated lymphoid tissues

GM-CSF : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

HIV : human immunodeficiency virus

HPLC : high performance liquid chromatography
HRP : horse raddish peroxidase
HSV : herpes simplex virus
i.p. : intraperitoneal
ICAM-1 : intercellular adhesion molecule-1
id : internal diameter
IFN : interferon
Ig : immunoglobulin
IL : interleukin
LAL : limulus amebocyte lysate
LC/MS : liquid chromatography-mass spectrometry
LFA-1 : lymphocyte function-associated antigen-1
mAb : monoclonal antibody
MACS : magnetic activated cell sorting
MAPK : mitogen activated protein kinase
MHC : major histocompatibility complex
mRNA : messenger RNA
MTT : 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2*H*-tetrazolium bromide
NF- κ B : nuclear factor- κ B
NK : natural killer
NLR : Nod-like receptor
OTPP : oolong tea polymerized polyphenol
p56Lck : lymphocyte-specific protein tyrosine kinase p56
pAb : polyclonal antibody
PAMP : pathogen-associated molecular pattern
PBS : phosphate-buffered saline
PC : peritoneal cavity
pCA : polymerized caffeic acid
PCC : peritoneal cavity cell
pCoA : polymerized *p*-coumaric acid
PCR : polymerase chain reaction
PE : phyco-erythrin
pFA : polymerized ferulic acid
PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate
PRR : pattern recognition receptor
rpm : round per minutes
s.c. : subcutaneous

SCID : severe combined immunodeficiency

SPF : specific pathogen free

SPL : splenocyte

TCR : T cell receptor

Th : helper T

THY : thymocyte

TLR : Toll-like receptor

TMB : 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

TNF : tumor necrosis factor

TP3 : TO-PRO-3

緒論

近年，先進諸国において高齢化は避けることのできない問題の一つとなっており，疾病の治療ならびに介護に係る社会的負担を回避するため，各国政府は様々な対策を行っている．我が国では，2000年に発足した「健康日本21」が2013年現在第2期を迎え，国民の健康の増進の総合的な推進を図るための基本的な方針とされている（健康日本21：<http://www.kenkounippon21.gr.jp/>）．具体的に，壮年期死亡の減少，健康寿命の延伸及び生活の質の向上を実現することを目指し，従来の疾病対策の中心であった健診による早期発見又は治療にとどまることなく，健康を増進し，疾病の発病を予防する「一次予防」に一層の重点を置いた対策が推進されている．国民の健康維持への関心は次第に膨れ上がり，食生活ならびに生活習慣の見直しが行われ，ジョギング，サイクリングなどの運動が積極的に取り入れられている．セルフメディケーションによる各個人の健康増進が推奨されている背景を受けて，人々に有益な薬理作用を有する様々な機能性食品に注目・期待が集まっている．とりわけ，科学的根拠に基づき，その有効性・安全性を国に承認された「特定保健用食品」は，昨今の健康意識の強さを象徴した製品である．健康増進法（栄養改善法）に基づく保健機能食品の一つとして，機能性食品市場が拡大しつつあった1991年に制度が創設され，既に1000品目を超える商品が許可されている．現在，これら既存制度の規制緩和，ならびに新たな食品機能性表示の導入に向けた動きが活発化している．

機能性食品の普及に伴い，機能性食品の生体調節作用を担う様々な機能性分子の特定および作用メカニズムの解析が分子レベルで盛んに行われている．代表的なものに，整腸作用を有する乳酸菌類（プロバイオティクス），体脂肪・コレステロールの低減効果を持つポリフェノール類が挙げられ，これらは既に国民の食生活に広く浸透している．乳酸菌類は，食生活の欧米化およびストレスにより悪化した腸内フローラ（腸内細菌叢）のバランスを改善し，腹部膨満感・下痢症状などの改善効果を示すことが報告されている¹⁾．また近年では，ポリフェノール類の様々な薬理効果・生理機能が次々に解明されている．例えば，エピガロカテキンガレート（epigallocatechin gallate：EGCG）をはじめとする緑茶葉由来ポリフェノール類は，抗肥満効果²⁾，抗ヒト免疫不全ウイルス（human immunodeficiency virus：HIV）効果^{3,4)}，抗酸化効果⁵⁾，抗腫瘍効果⁶⁾，抗変異原性効果⁷⁾，抗高コレステロール効果⁸⁾などの様々な有益な生体機能を有している．一方，カテキン類のポリマーである烏龍茶重合ポリフェノール（oolong tea polymerized polyphenols：OTPP）は膵リパーゼの阻害活性を持ち，食後の高トリグリセリド血症を抑制することが報告されている^{9,10)}．機能性食品ならびに食品由来の機能性分子の生物活性およびそのメカニズム解析により，これまで不透明だった食品の薬理効果が明確になり，

利用者に合わせたセルフメディケーションを科学的根拠に基づいて実践できるようになった。

一方で、これらプロバイオティクスならびにポリフェノール類に共通した生体調整活性として、免疫機能調整作用が着目されている。食品と免疫系の関係性は古くから指摘されてきたが、近年、腸管免疫研究が発展したことで新たな展開を迎えている。自然免疫機構が分子レベルで詳細に解析されるようになり、この過程で多くの受容体が発見された。Toll-like receptor (TLR), Nod-like receptor, C-type lectin (CLEC) などの pattern recognition receptor (PRR) の存在が明らかとなり、自然免疫研究は著しい発展を遂げた¹¹⁾。PRR を介して産生されたサイトカインならびにケモカインは、その他の免疫細胞を活性化させ、病原体の排除を促す¹²⁾。また、自然免疫に関連する受容体は重篤な感染症において機能するだけでなく、免疫機構の発達、促進、維持にも密接に関わっており、さらに粘膜免疫においても重要な役割を果たしている。腸管は多数の免疫細胞が集まる人体最大の免疫組織であり、免疫応答の主要な調節器官として注目を集めている。腸管に存在する腸内細菌は絶えず免疫細胞と接触しており、免疫系の発達と制御に重要な役割を果たしている。無菌マウスは、感染防御あるいは抗炎症といった免疫応答能力が著しく低いことから、腸内菌叢が全身の免疫応答に対して大きな影響を与えていると考えられる^{13, 14)}。腸内細菌叢による消化管免疫組織 (gut-associated lymphoid tissues : GALT) の活性化を目的として発展を遂げたものが、乳酸菌などのプロバイオティクスである。さらに、自然免疫の認識機構が急速に解明されるにつれて、マクロファージ・樹状細胞を免疫修飾する物質が微生物の有する核酸ならびに多糖類などに広く分布していたことから、これらの分子を病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns : PAMPs) と称するようになった¹⁵⁾。このように分子レベルでの解明が進んだことにより、腸内に生息する菌叢のみならず、死菌体およびその成分、さらには食品中に含まれる PAMPs によっても GALT は活性化されるという考え方が普及した。プロバイオティクスとして利用される一部の乳酸菌は、interferon (IFN)- γ 産生誘導活性などの強力な免疫賦活効果を有しており¹⁶⁾、腫瘍免疫ならびに感染時に働くナチュラルキラー (natural killer : NK) 細胞などを意図して活性化することを目標とした研究が進められている^{17, 18)}。また、Singh と Aggarwal はターメリックに含まれる curcumin が転写因子 nuclear factor- κ B (NF- κ B) を抑制することを明らかにしたことに端を発し¹⁹⁾、緑茶²⁰⁾、グレープシード²¹⁾、ザクロ²²⁾ などの機能性食品から得られたフェノール性化合物も同様に、NF- κ B および mitogen-activated protein kinases (MAPKs) を抑制することで免疫システムを制御することが報告されている。一般的に、EGCG ならびにヒドロキシ桂皮酸誘導体などの低分子フェノール性化合物は、細胞内分子を標的として抗炎症作用を示す傾向がある²³⁻²⁵⁾。これらの機能性分子は、主に炎症の緩和、アレルギー

の症状軽減を目的として研究が進められている^{26, 27)}。

免疫賦活作用を有する食品は一般的に **biological response modifier (BRM)** と称され、我が国では古くから茸などの食用真菌が使用されてきた。病原真菌に類似した細胞壁構造を持つ食用真菌を経口摂取することで、**GALT** の活性化を介して全身性の免疫システムを上昇させることが可能である。著者はこれまでにブラジル原産の薬用茸であるアガリクス (*Agaricus brasiliensis* : *A. brasiliensis*) の自然免疫調節作用についての研究を行ってきた。*A. brasiliensis* の主な薬理作用として、糖尿病抑制効果²⁸⁾、抗メタボリック症候群効果²⁹⁾、肝保護作用^{30, 31)}、などが報告されている。また、その乾燥子実体には主要な真菌細胞壁構成成分である「 β -glucan」が約 12.4% (日本食品分析センター調べ：酵素法) と豊富に含まれており、主に β -glucan による抗腫瘍効果³²⁻³⁵⁾ がこれまでに複数報告されている。さらに、helper T (Th) 1 細胞応答誘導³⁶⁾、サイトカイン産生誘導作用^{37, 38)}、抗アレルギー効果³⁹⁾、アナフィラキシー様反応抑制作用⁴⁰⁾、NK 細胞活性化作用^{41, 42)} などの報告が、*A. brasiliensis* の免疫調節作用を裏付けている。著者は研究の過程で、*A. brasiliensis* の冷水抽出物が **TLR2** を介して白血球を活性化させ、炎症性サイトカインである interleukin (IL)-6 の産生を誘導することを報告した⁴³⁾。さらに、*A. brasiliensis* から抽出された分岐 1,3- β -glucan 鎖を少量含む可溶性 1,6- β -glucan が、 β -glucan 受容体である **dectin-1** に認識され、**tumor necrosis factor (TNF)- α** などのサイトカインを誘導すること、**granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)** と抗原提示細胞の存在下で、**IFN- γ** の産生を強力に誘導することを明らかとし⁴⁴⁾、*A. brasiliensis* による免疫修飾メカニズムの一部が解明された。II 型 **IFN** として知られる **IFN- γ** は、ウイルス感染時などに、主に **Th1** 細胞から産生されるサイトカインの 1 種であり、NK 細胞ならびにキラーT 細胞 (**cytotoxic T lymphocyte : CTL**) の活性化作用を有している^{45, 46)}。従って機能性食品による **IFN- γ** の産生制御により、NK 細胞および **CTL** の活性化を介し、腫瘍免疫ならびに感染免疫における生体応答を人為的にコントロールすることが可能となる。我が国ではこれまで、食用真菌であるシイタケ (*Lentinus edodes*) ならびにスエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) 由来の β -glucan であるレンチナン、シゾフィランといった医薬品が、臨床においてその抗腫瘍効果が認められ、癌患者に対して使用されてきた経緯がある⁴⁷⁻⁵⁰⁾。従って、各種機能性食品に含まれる β -glucan にも同様な活性を期待し、**BRM** として利用されている。1,6- β -glucan 分岐鎖を持つ 1,3- β -glucan には強い **IFN- γ** 産生誘導作用があり、多くの食用真菌において経口摂取による NK 細胞活性化作用が報告されている。受容体の特定を含めた分子メカニズムの解明により、 β -glucan は機能性食品における主要な免疫調整因子として位置付けられた。

一方で、*A. brasiliensis* 乾燥子実体には、 β -glucan のみならず、「リグニン」と呼

ばれる高分子ポリフェノール類が約 3.6%含まれていることが明らかとなった（神奈川県産業技術センター調べ：硫酸法）。通常、リグニンは高等植物の細胞壁に存在しており、特殊な機能性食品のみならず、人々が消費する植物性食品にも同様に含まれている⁵¹⁾。リグニンは、シナピルアルコール、*p*-クマリルアルコール、コニフェリルアルコールなどのフェニルプロパノイドがペルオキシダーゼならびにラッカーゼといった酵素の作用を受けて、ランダムなラジカルカップリング反応により複雑に重合した生体芳香族高分子である⁵²⁾。シナピルアルコールに由来するリグニンはシリングルリグニン（S リグニン）、*p*-クマリルアルコールに由来するリグニンはヒドロキシフェニルリグニン（H リグニン）、コニフェリルアルコールに由来するリグニンはグアイアシルリグニン（G リグニン）と呼ばれ、高分子化と共にそれぞれが不均一に混合した三次元網目構造を形成し、セルロース、ヘミセルロースと共に、木化した高等植物の細胞壁を構成している（Figure 1）⁵³⁻⁵⁵⁾。これまでの研究で、松毬から抽出したリグニン類において、インフルエンザウイルス、HIV、単純ヘルペスウイルス（herpes simplex virus : HSV）などに対する増殖抑制効果が報告されている⁵⁶⁻⁵⁸⁾。さらに、胆汁酸との結合活性を示すことから^{51, 59)}、リグニンの抗コレステロール作用に注目が集まっている。また、シイタケ菌糸体培養培地抽出物（LEM）には各種酵素により分解された水溶性リグニンおよびβ-glucanが含まれており、免疫賦活活性が報告されている⁶⁰⁾。これまで、β-glucanによる免疫調節作用についての研究は飛躍的な進歩を遂げている一方、リグニン類の免疫系に対する効果についての研究はほとんど行われていないのが現状である。

前述したように、多くの低分子フェノール性化合物は強い抗酸化活性と共に、炎症ならびにアレルギーなどの免疫を抑制する機能を示すが、これらのフェノール性化合物は、植物中に存在するペルオキシターゼ、ポリフェノールオキシダーゼの作用により容易に重合する⁶¹⁾。緑茶は茶葉の摘採後、速やかに加熱することで酵素類を失活させるが、烏龍茶では酵素を失活させずに発酵させるため、OTPPのような烏龍茶特有のポリフェノール重合体を得ることができる。また、野菜・果実におけるこれらの現象は酵素的褐変として知られ、我々は日常的に重合ポリフェノールを食事として摂取している。しかしながら、高分子ポリフェノール類の免疫系に対する作用ならびにメカニズムについては詳細な解析は行われておらず、リグニン類の免疫機能への効果は、人々にほとんど知られていないのが現状である。これまでに、天然リグニン類ならびにリグニン配糖体について、*in vitro* 刺激における免疫担当細胞への効果としてリンパ球幼若化活性などの僅かな報告があるが⁶²⁾、天然物中のリグニンの多くは多糖類、タンパク質との複合体を形成しており、その完全な精製が困難であることから生物活性の活性中心の特定および分子メカニズムの解明には至っていない。リグニン類の免疫系に対する効果を

検討するためには、タンパク質ならびに多糖類，さらにはエンドトキシンなどの微生物由来 PAMPs の混入の無い，純度の高い試験検体を用いて検討を行う必要がある。

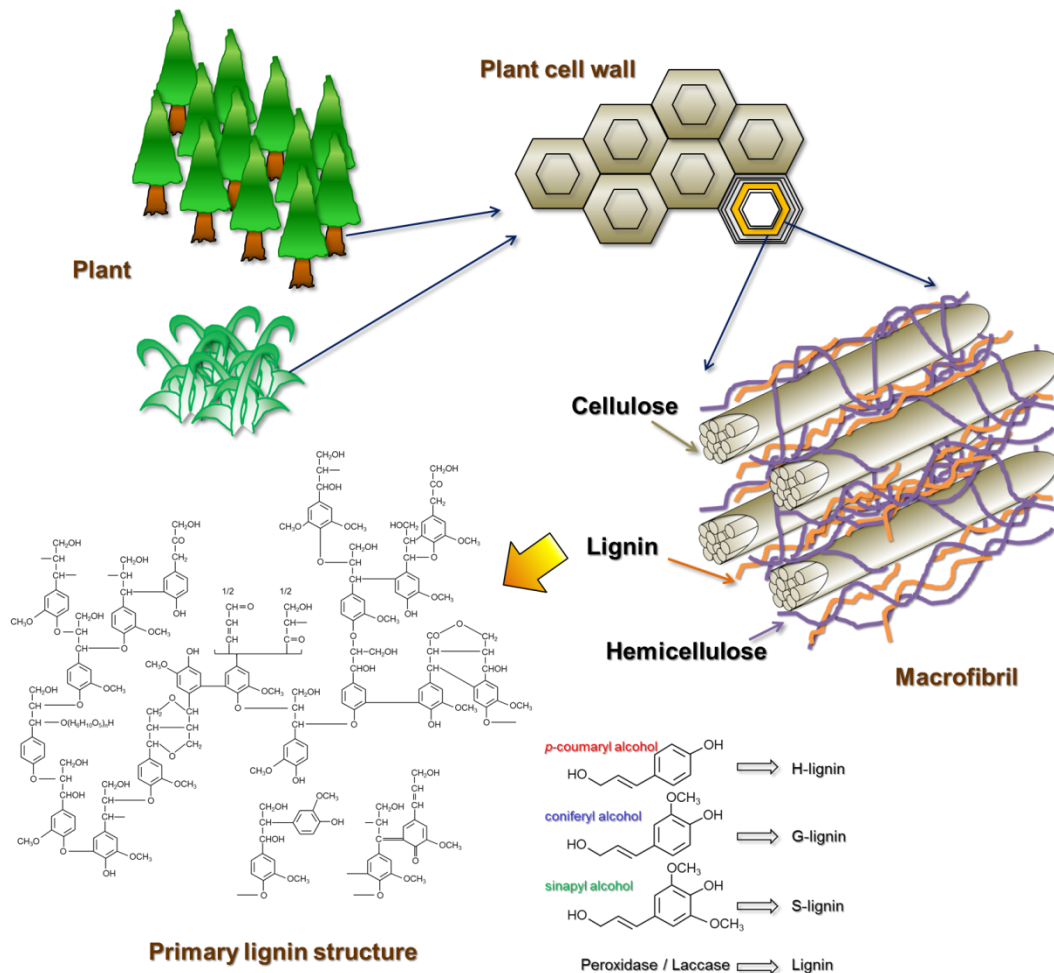


Figure 1. The proposed major structure of natural lignin.

Freudenberg らは，リグニン類の代謝研究の過程で，酵素による重合・脱重合機構を解析し，*in vitro* においてリグニンモデルポリマーを作製した⁶³⁾．脱水素重合物 (dehydrogenation polymer : DHP) と呼ばれる合成リグニンモデルポリマーを用いた解析により，これまでに HIV⁶⁴⁾，HSV⁶⁵⁾ などに対する抗ウイルス効果の分子メカニズムが解明され，リグニン類はウイルス感染に対して有効な機能性分子となる可能性が示唆されてきた．天然物から純度の高いリグニンを抽出することは困難であるが，実際のリグニン生合成と同様に，リグニンモノマーであるフェニ

ルプロパノイド類およびその誘導体にペルオキシダーゼを作用させることで、酵素的に重合させた高分子ポリフェノール (enzymatically polymerized polyphenol : EPP) を作製することが可能である⁶⁶⁾。EPP は天然由来リグニンとは異なり、セルロース、ヘミセルロースなどの多糖類、タンパク質、エンドトキシンなどの混入、ならびに抽出時に生じるスルホン化などの官能基修飾を制限できるため、リグニンによる免疫調節機能の解析に適している。さらに、前駆体 (precursor) の種類を制限することによって、モノリグニンを作製することが可能であり、本来は複雑で不均一なリグニンの化学構造をある程度制御することができる。これらの高純度な合成リグニンを用いて、免疫系に対する作用およびそのメカニズムを解明することで、免疫調節作用を目的とした新たな機能性食品として、リグニンなどの高分子ポリフェノールを利用できる可能性がある。

本研究では、高分子ポリフェノールの免疫系への作用を明らかにするため、フェニルプロパノイド類を酵素的に重合させたリグニン様可溶性 EPP を作製し、*in vitro* ならびに *in vivo* におけるマウス免疫担当細胞への作用とメカニズムを解析した。

本論文は、第一章「酵素重合ポリフェノール (enzymatically polymerized polyphenols : EPP) の免疫調整効果と T 細胞への影響」、第二章「EPP の免疫賦活活性における異種細胞間相互作用の影響」、第三章「EPP の経口投与による抗腫瘍効果および NK 細胞活性化作用」により構成されている。

実験の部

1) 実験材料

1-1) 試薬

[フェニルプロパノイド類]

- ・ 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid : CA)
- ・ *trans*-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid (*trans*-ferulic acid : FA)
- ・ *trans*-4-hydroxycinnamic acid (*trans*-*p*-coumaric acid : CoA)

東京化成工業株式会社

[培地および添加物]

- ・ RPMI 1640 medium Invitrogen 社
- ・ Gentamycin sulfate Sigma 社
- ・ Fetal Bovin Serum (FBS) Equitech-Bio 社
- ・ HygroGold (Hygromycin B) InvivoGen 社
- ・ 5-azacytidine 和光純薬工業株式会社

[各種溶液]

- ・ 非働化 FBS : FBS を 56°C の水浴中で 30 分間加温し, 非働化後, -20°C にて保存, 用時解凍して用いた.
- ・ リン酸緩衝食塩液 (phosphate-buffered saline : PBS) : NaCl (8 g), KCl (0.2 g), KH₂PO₄ (0.2 g), Na₂HPO₄-12H₂O (2.9 g) を脱イオン水 (deionized water : DIW) に溶解して 1,000 mL (pH 7.4) とした.
- ・ ACK-lysing buffer : NH₄Cl (8.29 g), KHCO₂ (1 g), EDTA/2Na (37.2 mg) を DIW に溶解し, 1,000 mL とし, フィルター滅菌したものを実験に使用した.
- ・ AC buffer : NH₄Cl (8.29 g) を Tris-HCl buffer (pH 7.5) に溶解して 1,000 mL とし, フィルター滅菌したものを実験に使用した.
- ・ MTT 溶液 : 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2*H*-tetrazolium bromide (MTT; 株式会社同人化学研究所) 25 mg を PBS 5 mL に溶解し, フィルター滅菌したものを実験に使用した.
- ・ 0.1M sodium carbonate buffer (pH 9.5) : NaHCO₃ (7.13 g), Na₂CO₃ (1.59 g) を DIW に溶解して 1,000 mL とし, NaOH で pH9.5 に調整した.
- ・ FACS 染色 Buffer : 非働化 FBS を 1% となるように PBS に加え, さらに 0.09% (w/v) のアジ化ナトリウムを加えたものをフィルター濾過し, 実験に使用した.
- ・ 尿素アセトン溶液 : アセトンと 8 M の尿素水溶液を 6:4 (v/v) となるように混合し, 実験に使用した.

- TMB microwell peroxidase substrate system KPL Inc.
- 生理食塩液 (生理食塩水) 大塚製薬株式会社

- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- Folin-Ciocalteu 試薬 Sigma 社

- 10% 中性緩衝ホルムアルデヒド溶液 (pH 7.4)
- 過酸化水素 (H₂O₂)
- Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate (Tween 20) 和光純薬工業株式会社

[リコンビナントタンパク質]

- Recombinant mouse GM-CSF
- Recombinant mouse IL-4 BD Biosciences 社
- Recombinant mouse CTLA-4-Fc chimera protein R&D Systems 社
- His-tagged recombinant mouse CD4 protein
- His-tagged recombinant mouse CD8a protein Sino Biological Inc.

[細胞刺激剤]

- Pam3Cys-SKKKKx3HCl (Pam3CSK4) InvivoGen 社
- Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)
- Ionomycin calcium salt from *Streptomyces globatus* (ionomycin) Sigma 社

[抗体各種]

- anti-mouse CD4 (GK1.5) (rat IgG2b)
- anti-mouse CD8a (53-6.7) (rat IgG2a)
- anti-mouse CD11a (LFA-1) (M17/4) (rat IgG2a)
- anti-mouse IL-12 (p40/p70) (C17.8) (rat IgG2a)
- anti-mouse CD16/CD32 (2.4G2) (Fc Block)
- rat IgG2a isotype control
- Allophycocyanin (APC)-conjugated anti-mouse CD4 (RM4-5) (rat IgG2a)
- APC-conjugated rat IgG2a isotype control
- Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-mouse CD4 (RM4-5) (rat IgG2a)
- FITC-conjugated anti-mouse CD8a (53-6.7) (rat IgG2a)

- FITC-conjugated anti-mouse CD11c (HL3) (armenian hamster IgG1)
- FITC-conjugated rat IgG2a isotype control
- Phyco-erythrin (PE)-conjugated anti-mouse CD3e (145-2C11) (armenian hamster IgG1)
- PE-conjugated hamster IgG1 isotype control BD Biosciences 社

- anti-mouse CD54 (ICAM-1) (YN1/1.7.4) (rat IgG2b)
- rat IgG2b isotype control
- APC-conjugated anti-mouse CD3e (17A2) (rat IgG2b)
- PE-conjugated anti-mouse CD8a (53-6.7) (rat IgG2a) eBioscience 社

- FITC-conjugated anti-mouse CD11b (M1/70.15) (rat IgG2b)
- FITC-conjugated hamster IgG1 isotype control
- FITC-conjugated rat IgG2b isotype control
- PE-conjugated anti-mouse CD80 (RMMP-1) (rat IgG2a) Caltag Laboratories 社

- APC-conjugated rat IgG2b isotype control
- PE-conjugated anti-mouse NKp46 (29A1.4) (rat IgG2a)
- PE-conjugated rat IgG2a isotype control BioLegend 社

- Peroxidase-conjugated anti-6-His antibody R&D Systems 社
- Peroxidase-conjugated anti-Rat IgG (H+L) goat pAb 和光純薬工業株式会社

[その他]

- Type II horse raddish peroxidase (HRP)
- PKH-26
- Bovine serum albumin (BSA) Sigma 社

- 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical 東京化成工業株式会社
- 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) Calbiochem Inc.
- 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS) 和光純薬工業株式会社
- TO-PRO-3 (TP3) Molecular Probes 社

上記以外の試薬はすべて市販の特級試薬を用いた。

[細胞株]

- ・ YAC-1 (RCB1165) (マウスリンパ腫)
- ・ RAW264 (RCB0535) (BALB/c 由来マクロファージ様細胞株)
- ・ P815 cells (RCB1167) (DBA/2 由来肥満細胞腫)

RIKEN Cell Bank

[実験動物]

- ・ 雄性 C57BL/6 マウス
- ・ 雌性 DBA/2 マウス
- ・ 雄性 C3H/HeN マウス

- ・ 雄性 C.B-17/Icr-scid/scid Jcl (SCID) マウス

日本エスエルシー株式会社

日本クレア株式会社

2) 実験方法

2-1) 第一章の実験方法

2-1-1) 酵素重合ポリフェノールの作製

リグニン様高分子ポリフェノールの酵素合成は、HRP (Sigma) と、precursor として 3 種類のフェニルプロパノイド類 (CA, FA, CoA) をそれぞれ用いて、既報の基本的な合成方法を参考に行った⁶⁶⁾。全量 10mL の PBS に precursor 200 mg を溶解し、precursor と等モルの NaOH で中和後、HRP 1 mg を添加した。H₂O₂ 溶液 (30%) を PBS で 0.1% となるように希釈し、precursor の 1.5 mol 等量分の H₂O₂ を遮光・室温条件下 1 時間かけて滴下した。滴下終了後、引き続き室温にて 2 時間攪拌を続け、沸騰水浴中で 20 分間加温して HRP を失活させた。遠心後、上清を分子量 50,000 Da の透析膜に移し、十分量の DIW で 2 日間透析を行った。透析後、得られた反応溶液を凍結乾燥し、EPP [CA, FA, CoA の重合体をそれぞれ polymerized (p) CA, pFA, pCoA とする] の粉末を得た。EPP ならびに precursor はフィルター滅菌された DMSO (Sigma 社) に溶解し (20 mg/mL)、生理食塩水で適度に希釈後、細胞培養に用いた。

2-1-2) 構成元素分析

EPP ならびに precursor 中の炭素 (carbon)、水素 (hydrogen)、窒素 (nitrogen) 含量の測定は東京薬科大学中央分析センターにおいて実施した。

2-1-3) エンドトキシンの定量

エンドトキシンによる limulus 反応性 C 因子の活性化はエンドスペシー ES-50M セット (生化学バイオビジネス株式会社) を用いて発色合成基質法により測定した。標準品として、*Escherichia coli* O113 : H10 株由来エンドトキシン (エンドトキシン標準品 CSE-L セット; 生化学バイオビジネス株式会社) を使用した。各検体は適度に蒸留水 (エンドトキシン, β -glucan フリー) で希釈した。反応は平底の 96 穴の Toxipet plate 96F (生化学バイオビジネス株式会社) 上で以下のとおりに行った。各検体 50 μ L を well に入れ、LAL 試薬を 50 μ L それぞれの well に加えた。プレートを 37°C でインキュベーションしながらマイクロプレートリーダー (Wellreader SK603; 生化学バイオビジネス株式会社) を用いて動態学的に吸光波長 405 nm, 参照波長 492 nm で測定した。器具は細胞培養、臨床的使用のための使い捨てプラスチック製品を利用し、ガラス製品は 260°C, 3 h で滅菌した。

2-1-4) マウス脾臓細胞の調整

マウスは CO₂ により屠殺し、脾臓を摘出した。RPMI 1640 medium 中でステンレ

スメッシュ (線径 0.12 mm, MESH 80) を用いて単一細胞化し, 1200 rpm × 5 min, 4°C で遠心分離した. 得られた細胞は ACK-lysing buffer により混在する赤血球を溶解し, RPMI 1640 medium で 2 回洗浄した. 顕微鏡下で細胞数を計測し, 細胞濃度を調整し, Gentamycin sulfate (50 µg/mL) と非働化 FBS を 10% 含む RPMI 1640 medium 中に懸濁した.

2-1-5) MTT 法による細胞毒性の測定

EPP ならびに precursor のマウス脾臓細胞に対する細胞毒性については, 既報の基本的な方法の細部に変更を加えて実行した⁶⁷⁾. 細胞毒性の検討には C57BL/6 マウスの脾臓細胞を使用し, 前述の方法によりマウス脾臓細胞を調整した. 4×10^5 cells/100 µL の脾臓細胞を 96 well 平底プレート (住友ベークライト株式会社) に播種し, EPP ならびに precursor (0–100 µg/mL) で刺激し, 37°C・5% CO₂ 環境下にて培養した. 44 時間後に上清を除去し, 37°C で加温した RPMI 1640 medium で 1 回洗浄後, MTT 溶液 (0.5 mg/mL), Gentamycin sulfate (50 µg/mL), 非働化 FBS を 10% 含む RPMI 1640 medium に培地交換し, 37°C・5% CO₂ 環境下にて 4 時間培養した. 上清を除去し, DMSO 100 µL で細胞を溶解させ, 550 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (MTP450; コロナ電気株式会社) を用いて測定した. 無刺激のコントロール細胞が示す吸光度を 100% として, 各細胞増殖率を縦軸に示した.

2-1-6) 細胞培養

前述の方法により C57BL/6 マウス脾臓細胞を調整した. 4×10^5 cells/500 µL の脾臓細胞を 48 well 平底プレート (住友ベークライト株式会社) に播種し, EPP ならびに precursor (0–100 µg/mL) で刺激し, 37°C・5% CO₂ 環境下にて培養した. 48 時間後に 1200 rpm × 5 min, 4°C で遠心分離後, 培養上清を回収した.

2-1-7) 細胞分離

C57BL/6 マウス脾臓細胞を前述の方法により調整し, magnetic-activated cell sorting (MACS) により T 細胞の分離を行った. 脾臓細胞を anti-CD3e microbeads (Miltenyi Biotec 社) で処理し, MACS LD カラム (Miltenyi Biotec 社) を用いて CD3e 陽性細胞を除去した.

2-1-8) フローサイトメトリー解析

C57BL/6 マウス脾臓細胞ならびに細胞分離後に得られた細胞は, FACS 染色 Buffer に懸濁し, Fc Block 処理後に PE 標識 anti-mouse CD3e (145-2C11) あるいは対応するアイソタイプ IgG で染色した. 10% 中性緩衝ホルムアルデヒド溶液 (pH 7.4) で固定後, FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences 社) を用いてデータを回

収し，FACSDiva (BD Biosciences 社) と FlowJo ソフトウェア (Tree Star Inc.) を用いてデータを解析した。

2-1-9) サイトカイン測定

細胞培養上清中の IL-1 β ，IL-4，IL-6，IFN- γ ，GM-CSF 濃度は OptEIA kit (BD Biosciences 社) を用いて sandwich ELISA 法により測定した。

2-1-10) 可溶性 CD4 結合実験

EPPとマウスCD4の直接的な結合性はELISA様試験により評価した。96 well ELISA プレート (Greiner Bio-one社) を0.1 M sodium carbonate buffer (pH 9.5) に溶解したEPPならびにprecursor (0-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) でコーティングし，4°Cにて一晩放置した。0.05% Tween 20を含むPBS (PBST) で洗浄し，1% (w/v) BSAを含むPBST (BPBST) により室温にて1時間ブロッキングを行った。PBSTでプレートを洗浄後，Hisタグ標識されたりコンビナントマウスCD4またはCD8aタンパク質 (Sino Biological Inc.) (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加え37°Cにて1時間インキュベーションした。再度PBSTでプレートを洗浄後，ペルオキシダーゼ標識anti-6-His antibody (R&D Systems 社) を加えインキュベーションし，十分に洗浄を行った。固相化したEPPならびにprecursorへの可溶性CD4またはCD8aタンパク質の結合性は，ペルオキシダーゼ基質 (TMB microwell peroxidase substrate system) (KPL Inc.)を用いて観測した。1Nのリン酸で反応を停止した後，450 nmにおける吸光度を測定した。

また，得られた結果がEPPならびにprecursorのELISA プレートへの固層化効率の違いに影響されていないことを確認するため，可溶性CD4タンパク質をプレートに固層化し，anti-mouse CD4 mAbと各試験検体を共存させることで，競合的ELISA様試験を実施した。ELISAプレートを0.1 M sodium carbonate buffer (pH 9.5) に溶解したHisタグ標識リコンビナントマウスCD4またはCD8aタンパク質 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で固層化した。PBSTでの洗浄後，BPBSTでブロッキングし，再度洗浄した。プレートにBPBSTに溶解したEPPならびにprecursor (0-250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加え30分間インキュベーションし，洗浄後にBPBSTに溶解したanti-mouse CD4 mAb (GK1.5) またはanti-mouse CD8a mAb (53-6.7) (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加えて室温にて1時間インキュベーションした。PBSTで洗浄後，ペルオキシダーゼ標識anti-Rat IgG (H+L) goat pAb (和光純薬工業株式会社) を加えインキュベーションし，十分に洗浄を行った。各mAbの固層化CD4またはCD8aへの結合はペルオキシダーゼ基質 (TMB microwell peroxidase substrate system) を用いて観測した。1Nのリン酸で反応を停止した後，450 nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダー (MTP450; コロナ電気株式会社) を用いて測定した。

2-1-10) 細胞膜上 CD4 結合実験

C57BL/6 マウス脾臓細胞 (4×10^6 cells/mL) を前述の方法により調整し、Gentamycin sulfate (50 μ g/mL) と非働化 FBS を 10% 含む RPMI 1640 medium 中に懸濁した。EPP ならびに precursor (100 μ g/mL) を加え 37°C にて 1 時間インキュベーションした後、FACS 染色 Buffer で洗浄後、Fc Block を含む FACS 染色 Buffer に懸濁し、氷上で 20 分間インキュベーションした。細胞染色のため、PE 標識 anti-mouse CD3e (145-2C11), FITC 標識 anti-mouse CD8a (53-6.7), APC 標識 anti-mouse CD4 (RM4-5) または対応するアイソタイプ IgG を加え、遮光し氷上でさらに 30 分間インキュベーションした。細胞は洗浄後に 10% 中性緩衝ホルムアルデヒド溶液 (pH 7.4) で固定後、FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences 社) を用いてデータを回収し、FACSDiva (BD Biosciences 社) と FlowJo ソフトウェア (Tree Star Inc.) を用いてデータを解析した。

2-2) 第二章の実験方法

2-2-1) マウス腹腔常在性細胞，脾臓細胞，胸腺細胞，骨髄細胞の調整

C57BL/6 マウスまたは SCID マウスを CO₂ により屠殺し、腹腔を 5 mL の生理食塩水で 2 回洗浄し、洗浄液を回収した。1200 rpm \times 5 min, 4°C で遠心分離した後、細胞数を顕微鏡下で計測した。細胞濃度を調整し、Gentamycin sulfate (50 μ g/mL) と非働化 FBS を 10% 含む RPMI 1640 medium 中に懸濁し、腹腔常在性細胞とした。

脾臓ならびに胸腺を摘出し、RPMI 1640 medium 中でステンレスメッシュを用いて単一細胞化し、1200 rpm \times 5 min, 4°C で遠心分離した。得られた細胞は ACK-lysing buffer により混在する赤血球を溶解し、RPMI 1640 medium で 2 回洗浄した。顕微鏡下で細胞数を計測し、細胞濃度を調整し、Gentamycin sulfate (50 μ g/mL) と非働化 FBS を 10% 含む RPMI 1640 medium 中に懸濁し、それぞれ脾臓細胞、胸腺細胞とした。

大腿骨と脛骨を摘出後、骨髄に注射針を挿入し、骨髄内の細胞を RPMI 1640 medium で押し流し、ピペッティングにより単一細胞化した。1200 rpm \times 5 min, 4°C で遠心分離した後、ACK-lysing buffer により混在する赤血球を溶解し、RPMI 1640 medium で 2 回洗浄した。顕微鏡下で細胞数を計測し、細胞濃度を調整し、Gentamycin sulfate (50 μ g/mL) と非働化 FBS を 10% 含む RPMI 1640 medium 中に懸濁し、骨髄細胞とした。

2-2-2) マウス腹腔常在性細胞，脾臓細胞，胸腺細胞，骨髄細胞の培養

前述の方法により調整した C57BL/6 マウスまたは SCID マウス由来脾臓細胞は 48 well または 96 well 平底プレート (住友ベークライト株式会社) に播種し、C57BL/6 マウス由来胸腺細胞、腹腔常在性細胞ならびに骨髄細胞は 96 well 平底プレートにまいた後、EPP (0–100 μ g/mL) または Pam3CSK4 (0–0.5 μ g/mL) で刺激し、

37°C・5% CO₂ 環境下にて培養した。48 時間後に 1200 rpm × 5 min, 4°C で遠心分離後、培養上清を回収した。

2-2-3) マウス BMDC の調整ならびに細胞培養

BMDC は、既報を参考に誘導した⁶⁸⁾。前述の方法により調整した C57BL/6 マウス骨髄細胞に GM-CSF (10 ng/mL) と IL-4 (10 ng/mL) を加え、96 well 平底プレートに 250 μL ずつ播種し (5 × 10⁵ cells/well), 37°C・5% CO₂ 環境下にて培養した。3 日目にピペッティングにより非付着性細胞を取り除き, GM-CSF と IL-4 を含む新たな培地に交換後、さらに培養を続けた。5 日目に EPP (100 μg/mL) または Pam3CSK4 (0.02 μg/mL) で刺激し、7 日目に培養上清を回収した。

2-2-4) 細胞分離

C57BL/6 マウス脾臓細胞を前述の方法により調整し、MACS により CD4 陽性 T 細胞ならびに CD8 陽性 T 細胞の分離を行った。脾臓細胞は CD4⁺ T Cell Isolation Kit II または CD8⁺ T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec 社) で処理し、MACS LS カラム (Miltenyi Biotec 社) を用いて CD4 陽性 T 細胞ならびに CD8 陽性 T 細胞を精製した。

C57BL/6 マウス脾臓細胞を前述の方法により調整し、MACS により CD11b 陽性細胞ならびに CD11c 陽性細胞の分離を行った。脾臓細胞は anti-CD11b または anti-CD11c microbeads (Miltenyi Biotec 社) で処理し、MACS LD カラム (Miltenyi Biotec 社) を用いて CD11b 陽性細胞ならびに CD11c 陽性細胞を除去した。

C57BL/6 マウス脾臓細胞を前述の方法により調整し、mouse T cell enrichment columns (R&D Systems 社) を用いて T 細胞を濃縮した。

2-2-5) フローサイトメトリー解析

C57BL/6 マウス脾臓細胞ならびに細胞分離後に得られた細胞は、FACS 染色 Buffer に懸濁し、Fc Block 処理後に各種蛍光標識抗体あるいは対応するアイソタイプ IgG で染色した。また、マウス腹腔常在性細胞も同様に染色した。10% 中性緩衝ホルムアルデヒド溶液 (pH 7.4) で固定後、FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences 社) を用いてデータを回収し、FACSDiva (BD Biosciences 社) と FlowJo ソフトウェア (Tree Star Inc.) を用いてデータを解析した。

T 細胞の精製後、細胞分離前後の各細胞は APC 標識 anti-mouse CD4 (RM4-5) または FITC 標識 anti-mouse CD8a (53-6.7) で染色し、FACS 解析した。

CD11b 陽性細胞ならびに CD11c 陽性細胞の除去後、細胞分離前後の各細胞は FITC 標識 anti-mouse CD11b (M1/70.15) または FITC 標識 anti-mouse CD11c (HL3) で染色し、FACS 解析した。

T 細胞の濃縮後、細胞分離前後の各細胞ならびに腹腔常在性細胞は APC 標識

anti-mouse CD3e mAb (17A2) で染色し、FACS 解析した。

2-2-6) サイトカイン測定

細胞培養上清中の GM-CSF 濃度は OptEIA kit (BD Biosciences 社) を用いて sandwich ELISA 法により測定した。

IL-12p70 ならびに TNF- α 濃度は ELISA MAX set (BioLegend 社) を用いて測定した。

IFN- γ 濃度は OptEIA kit ならびに ELISA MAX set を用いて測定した。

2-3) 第三章の実験方法

2-3-1) ゲル濾過クロマトグラフィー

CAまたはpCAを尿素アセトン溶液に溶解し (5 mg/mL), 200 μ Lを尿素アセトン溶液で平衡化したToyopearl HW-60F column (東ソー株式会社) (1 \times 45 cm) にアプライ後, 同溶液を溶出液としてオープンカラムクロマトグラフィーを行った。溶出画分 (500 μ L/tube) を回収し, Folin-Ciocalteu試薬⁶⁹⁾ を用いてフェノール性水酸基を検出した。具体的に, 等量の溶出画分とFolin-Ciocalteu試薬を室温で3分間混合した後, 等量の10% (w/v) 炭酸水素ナトリウムを加えた。60分間室温でインキュベーションした後, マイクロプレートに移し, 700 nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダー (Safire; TECAN社) を用いて測定した。

2-3-2) 変異原性試験

細菌に対する CA および pCA の変異原活性は, ウムラック AT キット (株式会社 蛋白精製工業) を用いて *umu* 試験により測定した。CA および pCA は 15 ng/mL から 1 mg/mL の濃度までは水に溶解させ, 2 mg/mL を超える濃度では 10% DMSO に溶解・懸濁させた。またバックグラウンド用のコントロールとして 10% DMSO を使用した。これらの試験検体 10 μ L とサルモネラ菌 NM2009 株 100 μ L を S9 Mix の存在・非存在下にて混合した。37°C に設定した振盪培養器にて 2 時間インキュベート後, 100 μ L の X-gal を加え, DNA の損傷に応答して誘導された *umu* 遺伝子のレベルを β -galactosidase 活性として観察した。発色後, 100 μ L の反応停止液を加え, 630 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (MTP450; コロナ電気株式会社) を用いて測定した。 β -galactosidase 活性がバックグラウンドの 2 倍を超える場合を陽性結果として判定した。また EPP ならびに precursor 自身が吸光度に及ぼす影響は, ブランクテストを行い補正した。

2-3-3) 腫瘍細胞株の調整

YAC-1 細胞株は Gentamycin sulfate (50 μ g/mL) と非働化 FBS を 10% 含む RPMI

1640 medium を用いて継代培養した。

CD80 低発現 P815 細胞株 (B7-P815) は, 既報⁷⁰⁾ に従い作成した。CD80 の cDNA はマクロファージ様細胞株である RAW264 から精製した mRNA より PCR にてクローニングした。CD80 遺伝子フラグメントは pcDNA3.1/Hygro (+) プラスミドベクター (Invitrogen 社) に挿入し, 15 μ g の直鎖状プラスミドを P815 細胞株 (1×10^6 cells) に Gene Pulser II (Bio-Rad 社) を用いて 250 V の条件でエレクトロポレーションした。mock-P815 細胞はコントロールプラスミドベクターを同条件にて導入し, コントロール細胞株として作成した。遺伝子導入後の P815 細胞は Gentamycin sulfate (50 μ g/mL), Hygromycin B (50 μ g/mL) ならびに 5-azacytidine (10 μ M) と非働化 FBS を 10% 含む RPMI 1640 medium を用いて継代培養した。

2-3-4) フローサイトメトリー解析

遺伝子導入後の P815 細胞ならびに C3H/HeN マウス脾臓細胞は, FACS 染色 Buffer に懸濁し, Fc Block 処理後に各種蛍光標識抗体あるいは対応するアイソタイプ IgG で染色した。また, マウス腹腔常在性細胞も同様に染色後, 10% 中性緩衝ホルムアルデヒド溶液 (pH 7.4) で固定した。NK 細胞活性の測定の際には, 染色後に固定せずフローサイトメーターにアプライした。FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences 社) を用いてデータを回収し, FACSDiva (BD Biosciences 社) と FlowJo ソフトウェア (Tree Star Inc.) を用いてデータを解析した。

mock-P815 細胞, B7-P815 細胞は PE 標識 anti-mouse CD80 (RMMP-1) で染色し, FACS 解析した。

T 細胞群の割合を確認するため, マウス脾臓細胞は APC 標識 anti-mouse CD3e (17A2), FITC 標識 anti-mouse CD4 (RM4-5), PE 標識 anti-mouse CD8a (53-6.7) で染色し, FACS 解析した。

NK 細胞数の変化を確認するため, マウス脾臓細胞は PE 標識 anti-mouse NKp46 (29A1.4) で染色し, FACS 解析した。

2-3-5 腫瘍移植マウスを用いた腫瘍細胞増殖抑制試験

腫瘍接種 9 日前より, DBA/2 マウスに自由飲水の形式で連日 500 μ g/mL の CA ならびに pCA を経口投与した。継代培養を続けた B7-P815 細胞は PBS で 2 回洗浄し, 細胞懸濁液 50 μ L (5×10^5 cells) をマウス右鼠蹊部皮下に注射した (Day 0)。CA ならびに pCA は実験最終日まで経口投与を続けた。Day 7 に, 腫瘍抑制の陽性コントロールとして Cyclophosphamide (塩野義製薬株式会社) (100 mg/kg) を腹腔内に投与した。腫瘍接種後 21 日目まで腫瘍サイズをノギスで測定し, 腫瘍面積 (mm^2) を算出した。また Day 21 にマウスを CO_2 により屠殺し, 腫瘍を摘出後, 重量を測定した。

2-3-5) MTT 法による直接的な腫瘍細胞増殖抑制試験

EPP ならびに precursor の B7-P815 肥満細胞腫に対する細胞毒性は、既報⁶⁷⁾を参考に解析した。試験開始 2 日前、継代培養を続けた B7-P815 細胞は RPMI 1640 medium で 2 度洗浄し、Gentamycin sulfate (50 µg/mL) と非働化 FBS を 10% 含む RPMI 1640 medium 中に懸濁し、引き続き維持培養を続けた。

1×10^4 cells/100 µL の B7-P815 細胞を 96 well 平底プレート (住友ベークライト株式会社) に播種し、CA ならびに pCA (0–100 µg/mL) で刺激し、37°C・5% CO₂ 環境下にて培養した。24 時間後に上清を除去し、37°C で加温した RPMI 1640 medium で 2 回洗浄後、MTT 溶液 (0.5 mg/mL)、Gentamycin sulfate (50 µg/mL)、非働化 FBS を 10% 含む RPMI 1640 medium に培地交換し、37°C・5% CO₂ 環境下にて 1 時間培養した。上清を除去し、DMSO 100 µL で細胞を溶解させ、550 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (MTP450; コロナ電気株式会社) を用いて測定した。無刺激のコントロール細胞が示す吸光度を 100% として、各細胞増殖率を縦軸に示した。

2-3-6) マウス脾臓細胞の調整

C3H/HeN マウスに自由飲水の形式で 10 日間あるいは 14 日間、500 µg/mL の CA ならびに pCA を経口投与した。マウスは CO₂ により屠殺し、脾臓を摘出した。RPMI 1640 medium 中でステンレスメッシュを用いて単一細胞化し、1200 rpm × 5 min、4°C で遠心分離した。得られた細胞は ACK-lysing buffer により混在する赤血球を溶解し、RPMI 1640 medium で 2 回洗浄した。NK 細胞活性を測定する際は、ACK-lysing buffer の代わりに AC buffer を使用した。顕微鏡下で細胞数を計測し、細胞濃度を調整し、Gentamycin sulfate (50 µg/mL) と非働化 FBS を 10% 含む RPMI 1640 medium 中に懸濁した。

2-3-7) マウス脾臓細胞の培養とサイトカイン測定

500 µg/mL の CA ならびに pCA を 10 日間経口投与した C3H/HeN マウス脾臓細胞 (4×10^6 cells/mL) を前述の方法により調整し、Gentamycin sulfate (50 µg/mL) と非働化 FBS を 10% 含む RPMI 1640 medium 中に懸濁した。脾臓細胞を 96 well 平底プレート (住友ベークライト株式会社) に播種し (250 µL/well)、生理食塩水 (コントロール)、あるいは PMA (20 ng/mL) と ionomycin (1 µM) で刺激し、37°C・5% CO₂ 環境下にて培養した。48 時間後に 1200 rpm × 5 min、4°C で遠心分離後、培養上清を回収した。細胞培養上清中の IL-6 濃度は OptEIA kit (BD Biosciences 社) を用いて sandwich ELISA 法により測定した。IFN-γ ならびに TNF-α 濃度は ELISA MAX set (BioLegend 社) を用いて測定した。IL-17A 濃度は ELISA Ready-SET-Go! reagent set (eBioscience 社) を用いて測定した。

2-3-8) 脾臓 NK 細胞活性の測定

フローサイトメトリーを用いた NK 細胞活性の測定は既報⁷¹⁾を参考に行った。YAC-1 細胞は PKH-26 (Sigma 社) で染色し, NK 細胞特異的ターゲット細胞として用いた。500 µg/mL の CA ならびに pCA を 14 日間経口投与した C3H/HeN マウス脾臓細胞を前述の方法により調整し, Gentamycin sulfate (50 µg/mL) と非働化 FBS を 10% 含む RPMI 1640 medium 中に懸濁した。脾臓細胞 (2 or 4 × 10⁶ cells/mL) と PKH-26 標識 YAC-1 細胞 (4 × 10⁴ cells/mL) を 24 well 平底プレート (住友ベークライト株式会社) に播種し, 37°C・5% CO₂ 環境下にて共培養した。24 時間後, TO-PRO-3 (TP3) (Molecular Probes 社) を加えて室温で 1 時間放置し, 死細胞を染色した。フローサイトメトリーによる生細胞ならびに死細胞の解析は, 上述の方法により行った。細胞傷害性は PKH-26 陽性細胞中の死細胞の割合として%で示した [(ターゲット死細胞/ターゲット死細胞 + ターゲット生細胞) × 100]。YAC-1 の死細胞は, PKH-26 標識 YAC-1 細胞のみを培養した際に得られる恒常的な細胞死 (バックグラウンド) のレベルで補正した。

2-3-9) 抗酸化活性測定

CA ならびに pCA の抗酸化活性は, 一般的な手法である DPPH 法⁷²⁾ ならびに ABTS 法⁷³⁾ に基づき評価した。

DPPH 法 : 50% の ethanol に溶解した各試験検体および陽性コントロールである trolox 20 µL (0–500 µg/mL) に対して 200 µL の DPPH 150 µmol/L (50% ethanol 溶液) 200 µL を加え, 遮光して室温で 30 分反応させた後, 517 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (Safire; TECAN 社) を用いて測定した。

ABTS 法 : ABTS 水溶液 (7 mmol/L) 5 mL に対し, 140 mmol/L の過硫酸カリウム溶液を 88 µL 添加し, 遮光して 16 時間反応させ ABTS ラジカルカチオン溶液を調製した。ABTS 反応液を 50% の ethanol で 20 倍に希釈したものを ABTS 溶液とした。各試験検体および trolox 60 µL (0–250 µg/mL) に対して 140 µL の ABTS 溶液を加え, 遮光して室温で 10 分反応させた後, 517 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (Safire; TECAN 社) を用いて測定した。

EPP ならびに precursor 自身が吸光度に及ぼす影響は, ブランクテストを行い補正した。

2-3-10) マウス糞中および尿中の CA ならびに pCA の検出

床敷きを取り除き, 断食させた DBA/2 マウスに自由飲水の形式で 2 日間, 500 µg/mL の CA ならびに pCA を経口投与した後, 糞と尿を回収した。十分に乾燥させた糞はすり潰し, PBS に懸濁し (0.5 g/mL), 超音波処理後に煮沸して, 遠心分離後に上清を回収した。飲料水と糞抽出液中の総ポリフェノール量は Folin-Ciocalteu 法⁷⁴⁾ を用いて測定し, 没食子酸量換算にて示した。具体的に, 各試験検体と等量の Folin-Ciocalteu 試薬を室温で 3 分間混合した後, 等量の 10% (w/v) 炭酸水素ナトリウ

ムを加えた。60分間室温でインキュベーションした後、マイクロプレートに移し、700 nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダー (Safire; TECAN社) を用いて測定した。またEPPならびにprecursor自身が吸光度に及ぼす影響は、ブランクテストを行い補正した。

尿中に排泄された単量体 CA の検出は liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) を用いて、既報⁷⁵⁾ を参考に実行した。尿検体は必要に応じて希釈し、HPLC システム (Waters Alliance 2695 separations module; Waters 社) と 28°C に維持した Inertsil ODS-3 column (150 mm × 1.5 mm id, 5 μm) (ジーエルサイエンス株式会社) を用いて解析した。10 μL の尿検体ならびに CA 標準品 (0.5 μg/mL) をオートサンプラーよりインジェクションし、流速 0.1 mL/min にて 0.1% の蟻酸存在下 acetonitrile 10–40% のグラジエント条件 (60 分間) で溶出した。カラム溶出液は ESI 法を用いてイオン化し、ネガティブイオン化モードに設定した Micromass LCT time-of-flight mass spectrometer (Micromass 社) を用いて観測した。またチューニングには Leucine-Enkephalin 標準品を用いた。データは MassLynx software program version 4.0 (Micromass 社) を用いて m/z 50 から 1000 までをスキャンし、 m/z 179.035 (CA = m/z : 179.0345) に設定してターゲットイオンをモニターした。

2-4) 動物倫理

本研究の動物実験プロトコールは東京薬科大学動物実験委員会の承認を受け (P11-49, P12-42, P13-45, P13-46), すべての動物実験は「東京薬科大学動物実験規程」に則り行われた。また、すべての動物は Specific pathogen free (SPF) 環境下で飼育し、4–10 週齢で実験に使用した。

2-5) 有意差検定

本研究における有意差検定は、すべて Student's *t*-test によって行い、 $p < 0.05$ のものを「有意差あり」と判定した。

第一章 酵素重合ポリフェノール (enzymatically polymerized polyphenols : EPP) の免疫調整効果と T 細胞への影響

リグニン類は特殊な機能性食品に限らず，一般的に流通している食品にも含有されており⁵¹⁾，我々の生活において日常的に食事として体内に取り込まれている．これまでの研究でリグニンによる抗ウイルス効果が報告されており⁶⁵⁾，ウイルス感染に対する機能性分子としてリグニンは認識されていた．合成リグニン類による抗 HIV 効果は，HIV と感染ターゲット細胞との結合を抑制する効果と，HIV プロテアーゼの阻害効果との 2 種類の作用機序によって成り立っていることが報告されている^{64, 76)}．HIV は主に CD4 を高発現しているヘルパー T 細胞に感染することが知られており⁷⁷⁾，リグニン類には T 細胞をはじめとする免疫担当細胞に対して何らかの干渉作用があることが予想される．また，Kurakata らによってリグニン類によるマウスリンパ球に対する DNA 合成促進活性が報告されているが，その中でモノクローナル抗体とウサギ補体を用いて T 細胞群を破壊することで，リグニン類の白血球の DNA 合成促進活性が減少するという実験結果が示されている⁶²⁾．これらの報告は，リグニン類が T 細胞に何らかの影響を与えている可能性を強く示唆している．しかしながら，現在に至るまでリグニン類の免疫系への作用についてはほとんど解明されていない．また少数報告があるにもかかわらず^{78, 79)}，そのほとんどが純粋なリグニン類によるものではなく，リグニン多糖複合体および天然リグニンを用いた研究であり，いずれも活性中心を断定することは困難である．

そこで本章では，precursor として CA，FA，あるいは CoA を用いて，糖ならびにタンパク質，さらにはエンドトキシンをほとんど含まない純度の高いリグニン様 EPP を作製し，活性評価に用いた．リグニン様高分子ポリフェノールの BRM としての機能を解明するために，EPP が免疫担当細胞に対してどのような効果を示すのか，とりわけ T 細胞に着目し，マウス脾臓細胞を用いて *in vitro* における種々の試験を行い，EPP の機能性分子としての可能性を探索した．

第一節 マウス白血球に対する EPP の影響

食品に含まれる機能性分子は、腸管粘膜に存在する様々な免疫担当細胞と接触する。免疫調整作用を持つ様々な機能性食品は、経口摂取による疾病の予防ならびに治療への効果を期待して積極的に利用されている。例えば、免疫賦活作用を持つ高分子多糖類である 1,3-/1,6- β -glucan は、経口摂取により全身性の NK 細胞活性を上昇させる効果を示すことで知られており⁴²⁾、これらの β -glucan は *in vitro* においても免疫担当細胞を活性化し、様々なサイトカイン産生を誘導することで、NK 細胞活性化を含めた免疫賦活効果を示す⁴¹⁾。

一方、積極的な *in vitro* 研究によって、多くの低分子ポリフェノール類、とりわけ EGCG, ならびに curcumin には、MAPKs および NF- κ B に対する強力な活性化抑制作用があることが報告され、多くの研究者がその考え方を支持している^{23, 80)}。これらの特徴は、経口摂取による効果発現に応用されており、食事ならびにサプリメントによるこれらの機能性分子の取り込みによって、炎症性疾患の抑制効果が期待される⁸⁰⁾。

免疫調節作用を持つ多くの機能性分子において、*in vitro* 研究で得られた特徴と、*in vivo* 研究で得られる結果に関連性を示すケースが認められる。そこで本節では、リグニン様 EPP が十分な免疫調整作用を持つ機能性分子となり得るかどうか、純度評価および正常白血球への細胞毒性の有無を検討した後、*in vitro* 刺激によって誘導されるサイトカイン産生量を指標としてマウス脾臓由来白血球に対する免疫学的活性を評価した。

1. EPP の脾臓細胞に対する毒性評価

EPP は、precursor として CA, FA, あるいは CoA を用いて、 H_2O_2 の存在下、HRP によるランダムカップリング重合によって作製した。反応溶液を加熱処理後に遠心分離することで熱安定性画分を回収し、さらにカットオフ値が分子量 50,000 Da の再生セルロース透析膜を用いて DIW に対して透析した。2 日間の十分な透析処理により、脱塩および高分子画分の回収を行い、凍結乾燥後、水溶性 EPP パウダーを得た (Figure 2)。EPP およびその precursor の主要な基本構造骨格について Figure 3 に示した^{52, 81)}。また、乾燥重量収率、構成元素分析結果、エンドトキシン含量について、Table 1 に示した。分子量 50,000 Da を超える EPP の乾燥重量収率はおよそ 35 から 40% 前後であった。また EPP 中の窒素含量が重合前後において大きな変化が見られず、極めて低値を示していることから、アミノ酸、タンパク質

の混入がほとんどないことが確認された。さらに，リムルス C 因子応答性を利用して測定したエンドトキシン含量は，3 種類の EPP 間で差が見られたものの，いずれの EPP においても極めて微量であった。グラム陰性菌細胞壁を構成するエンドトキシンは，しばしば天然物中に混在し，動物細胞を用いた生物学的活性評価の際に，抗原提示細胞に発現する TLR4/MD2 を介して細胞を活性化させ，様々なサイトカイン産生を誘導する⁸²⁾。EPP 中のエンドトキシン含量が極めて低値であったことから，作製した 3 種類の EPP が *in vitro* における免疫評価実験に適したリグニンポリマーであることが確認された。

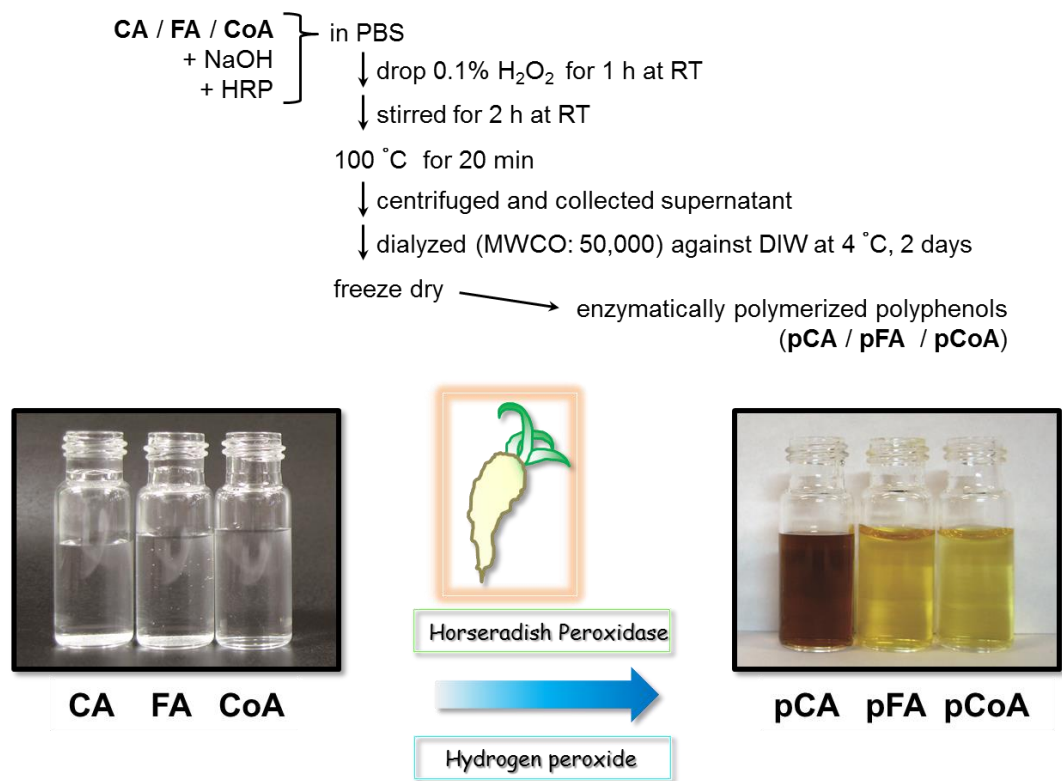


Figure 2. Preparation of enzymatically polymerized polyphenols.

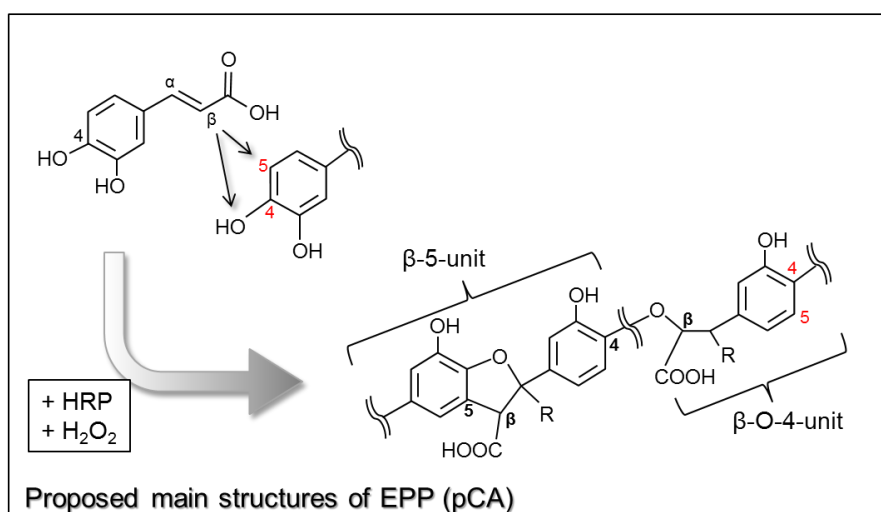
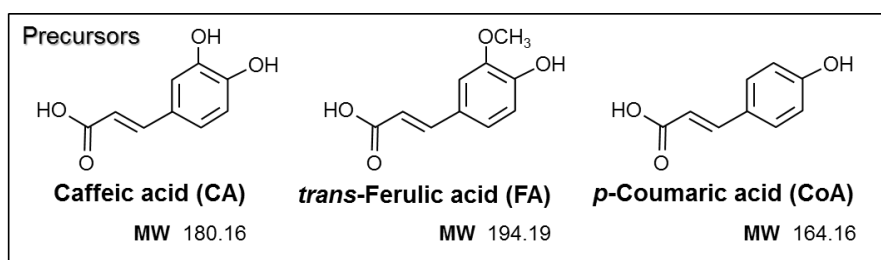


Figure 3. The structure of precursors and the proposed major structure of EPPs.
R can be either H or OH.

Table 1. Yield, elemental analysis, and endotoxin content of samples.

	Yield (%)	Elemental analysis (%)			Endotoxin (pg/mg)
		Carbon	Hydrogen	Nitrogen	
CA	-	59.91	4.59	0.01	-
FA	-	61.80	5.20	0.01	-
CoA	-	65.91	4.91	0.01	-
pCA	40.0	46.45	4.15	0.02	231.5
pFA	35.2	53.75	5.01	0.00	93.7
pCoA	40.0	57.62	4.67	0.00	N.D.

- ; not done

N.D. ; not detected

Yields based on precursor weights

続いて、EPP の正常白血球に対する細胞毒性について、C57BL/6 マウス由来脾臓細胞を用い、MTT 法を用いて評価した。Precursor である 3 種類のフェニルプロパノイド類は、EPP との比較対象として試験に使用した。MTT 法は、細胞膜透過性の MTT 試薬が生細胞内のミトコンドリアによって還元され、細胞内でホルマザン色素の結晶を生じることを利用した生細胞測定法である⁶⁷⁾。色素量は代謝活性のある細胞数と相関性を示すことから、生細胞に対する毒性ならびに増殖活性評価に利用される。添加した EPP ならびに precursor と培養液中の MTT 試薬との直接的な反応を避けるため、脾臓細胞は EPP およびその precursor と共に 48 時間培養した後、遠心後に上清を除き、細胞を十分に洗浄した後に MTT 試薬を添加した。

作製した 3 種類の EPP およびその precursor はマウス脾臓細胞に対して、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度まで顕著な細胞毒性を示さなかった (Figure 4)。また、EPP 添加群ではホルマザン色素に由来する吸光度の上昇が認められたことから、生細胞数が増加していることが示唆された。一方、precursor 添加群では生細胞数の大幅な変化は観察されなかった。

これらの結果より、フェニルプロパノイド類が重合し、高分子化することによってはじめて、免疫担当細胞の増殖誘導効果を生じることが強く示唆された。すべての EPP ならびに precursor において正常白血球に対する顕著な毒性が認められなかったことから、3 種類の EPP およびその precursor は *in vitro* における免疫調節機能の解析に適していることが示された。

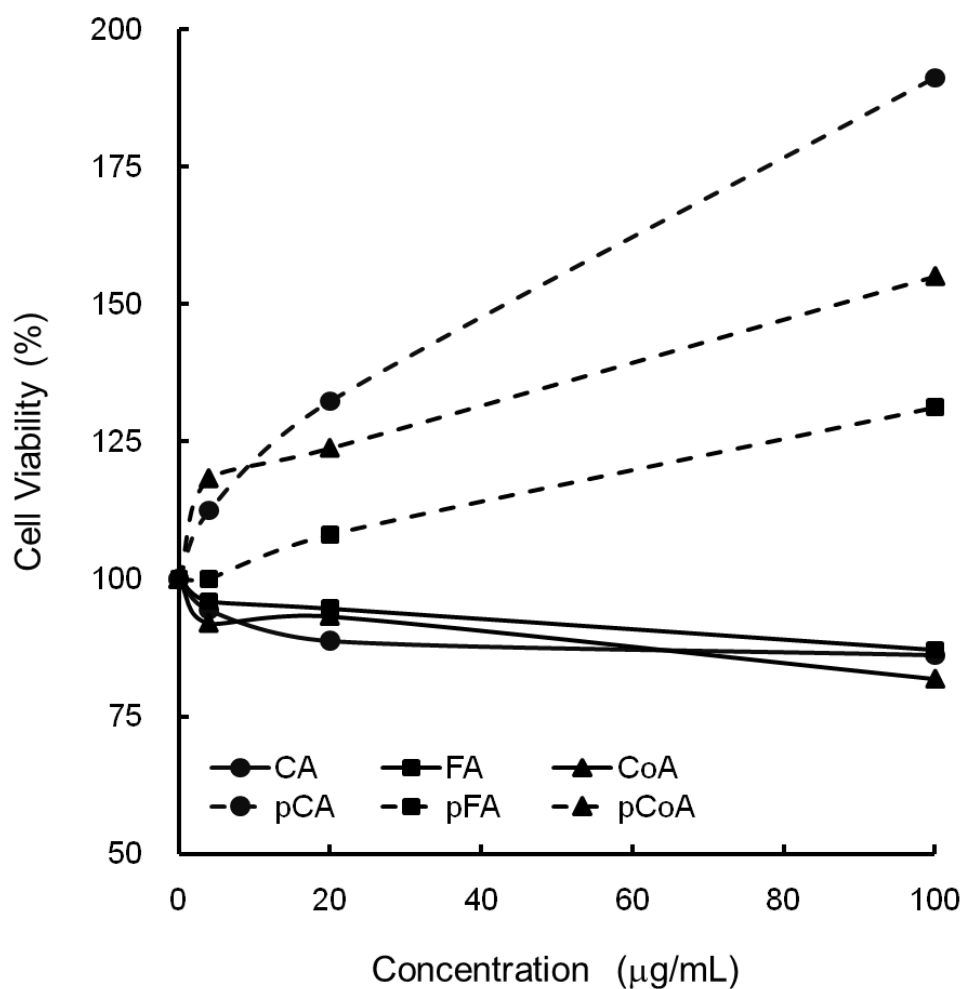


Figure 4. Effect of various polyphenols on cell viability in murine splenocytes.

C57BL/6 splenocytes were stimulated with various polyphenols (0–100 µg/mL). After 48 h, relative living cell numbers were assessed by the MTT method. The vertical axis represents the percentage living cell numbers of the splenocytes, and was obtained on the basis of the ratio to the control cells. The values represent the mean ± standard deviation, n = 3.

2. EPP の脾臓細胞におけるサイトカイン産生誘導作用

EPP の免疫学的活性について、C57BL/6 マウス由来脾臓細胞から誘導される種々のサイトカイン産生量を指標として評価した。また、precursor であるフェニルプロパノイド類を、比較対象として用いた。脾臓白血球は EPP およびその precursor と共に 48 時間培養した後、遠心分離後に上清を回収した。評価項目として、炎症性サイトカインである IL-1 β ならびに IL-6、ヘルパー T 細胞の分化に関与する IL-4 および IFN- γ 、さらに抗原提示細胞の活性化に関与する GM-CSF を選択し、それぞれ ELISA 法にて定量した。

Precursor である CA, FA, CoA は脾臓細胞からのサイトカイン産生を誘導しなかったが、各々が酵素重合した EPP は添加濃度依存的に IL-1 β , IL-6, IFN- γ ならびに GM-CSF 産生を誘導した (Figure 5)。この傾向は脾臓細胞増殖促進作用の場合と類似しており、免疫担当細胞からのサイトカイン産生誘導作用が発揮されるためには、フェニルプロパノイド類の高分子化が重要であると考えられる。また、IFN- γ , GM-CSF の産生は高度に誘導されたが、IL-1 β および IL-6 の産生は低かった。

IL-1 β , IL-6 などの炎症性サイトカインが低値であったことから、EPP が急性炎症を引き起こすリスクを回避しつつ、NK 細胞ならびに T 細胞を活性化し得る可能性が示唆された。また IL-4 に比べて IFN- γ の産生量が極めて高かったことから、EPP は T 細胞の Th1 への分化を優先的に誘導すると考えられる。作製したすべての EPP に、類似した傾向の免疫賦活活性が認められたことから、可溶性リグニン類の共通した構造が、免疫担当細胞を強力に活性化し得ることが示唆された。

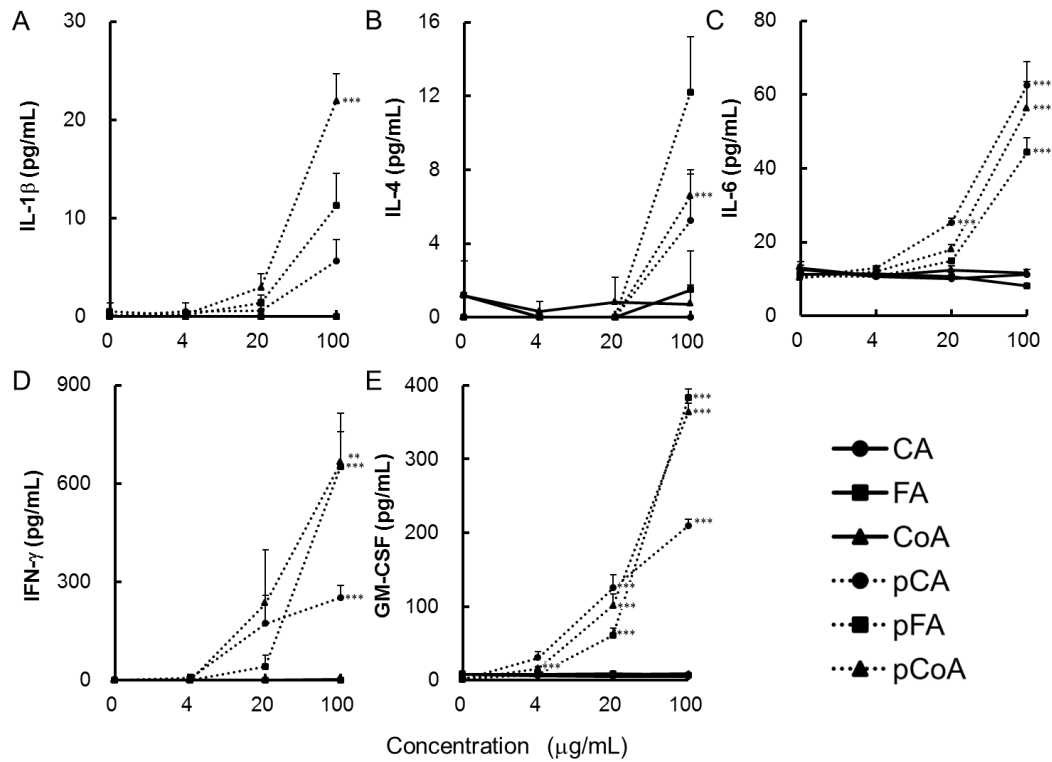


Figure 5. Effect of various polyphenols on cytokine production in murine splenocytes.

C57BL/6 splenocytes were stimulated with various polyphenols (0–100 $\mu\text{g/mL}$). After 48 h, supernatants were collected and concentrations of cytokines; (A) IL-1 β , (B) IL-4, (C) IL-6, (D) IFN- γ , and (E) GM-CSF were measured by ELISA. The values represent the mean \pm standard deviation, $n = 3$. Significant difference from untreated splenocytes: *** $p < 0.001$.

第二節 EPP のサイトカイン産生作用における T 細胞の関与

前節の検討により、3種類のEPPが脾臓細胞活性化作用を有し、GM-CSFおよびIFN- γ の産生を強く誘導することが明らかとなった。しかし、脾臓には様々な免疫担当細胞が存在しており、EPPが作用した細胞種、ならびにそのメカニズムについては不明である。免疫賦活作用を持つ機能性分子は多数存在し、サイトカインの産生誘導メカニズムも様々である。例えば、前述したエンドトキシンは、マクロファージなどの抗原提示細胞をTLR4シグナル経路で活性化させ、IL-6ならびにTNF- α などのサイトカイン産生を促す⁸³⁾。また、エンドトキシンは古くからB細胞マイトジェンとしても知られており、B細胞表面に存在するTLR4/MD-2ならびにRP105/MD-1複合体を介して、B細胞分裂を誘導する⁸⁴⁾。また、免疫担当細胞の活性化の陽性対象として汎用されるphorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)はプロテインキナーゼCに由来するシグナル伝達経路を活性化する⁸⁵⁾。この経路はT cell receptor (TCR)/CD3複合体下流のシグナル伝達経路に相当することから、細胞内カルシウム濃度を上昇させる作用を持つionomycinなどのカルシウムイオノフォアと併用することでT細胞分裂を誘導し、IFN- γ などのサイトカイン産生を強力に誘導する⁸⁶⁾。一方、T細胞マイトジェンとして知られるコンカナバリンA (concanavalin A : ConA)はマメ科の植物に由来するレクチンであり、T細胞表面の糖鎖修飾受容体を介して細胞増殖を誘導していると考えられている⁸⁷⁾。いずれも免疫担当細胞から多量の炎症性サイトカイン産生を誘導するが、それぞれ細胞に対する活性化メカニズムは異なっている。

リグニン類には、上述した代表的な免疫賦活剤と類似した構造ならびに特徴は見られず、EPPによるサイトカイン産生誘導の作用機序は不明である。しかし、合成リグニンおよび松茸抽出リグニンに抗HIV効果があることが報告されていることから⁵⁷⁾、リグニン類にはT細胞への何らかの干渉作用があることが予想されている。さらに、リグニン類の持つ白血球のDNA合成促進活性が、T細胞により制御されているとの報告もあることから⁶²⁾、前節で示したEPPによる脾臓細胞からのサイトカイン産生誘導作用に関してもT細胞が重要な役割を担っている可能性がある。実際、3種類のEPPは、それぞれ単独刺激によってマウス脾臓細胞から多量のIFN- γ およびGM-CSF産生を誘導したが、それらのサイトカインは共通して、主に活性化したT細胞から産生されることが知られている。⁸⁸⁻⁹⁰⁾

そこで本節では、EPPのマウス脾臓細胞からのサイトカイン産生誘導作用におけるT細胞の関与に焦点を当て、作用メカニズムを解析することとした。

1. EPP のサイトカイン産生作用と T 細胞群の影響

マウス脾臓細胞には様々な細胞種が混在しているが、著者はまず、脾臓細胞における EPP のサイトカイン産生誘導作用と T 細胞群の関係について明らかにするため、マウス脾臓細胞から T 細胞を除去し、EPP により誘導される IFN- γ および GM-CSF の産生量を指標に検討した。

C57BL/6 マウス脾臓細胞を anti-CD3e microbeads で処理し、MACS を用いて CD3e 陽性細胞を除去した。FACS 解析により、MACS 処理前の脾臓細胞中の T 細胞群の割合が 25%以上であったのに対し、MACS 処理後の T 細胞群の割合は 1%以下であることを確認した。CD3e 陽性細胞を除去した結果、EPP により誘導される IFN- γ ならびに GM-CSF の産生量は有意に減少した (Figure 6)。作製したすべての EPP に、類似した傾向が認められたことから、マウス脾臓細胞における可溶性リグニン類の IFN- γ ならびに GM-CSF 産生誘導作用には、脾臓細胞中の T 細胞群が極めて重要な役割を果たすことが明らかとなった。しかし、T 細胞の大部分を除去したにもかかわらず、サイトカインの産生が完全には抑制されていなかったことから、EPP による脾臓細胞からのサイトカイン産生誘導作用は、T 細胞以外の細胞群によっても制御されていることが示唆された。

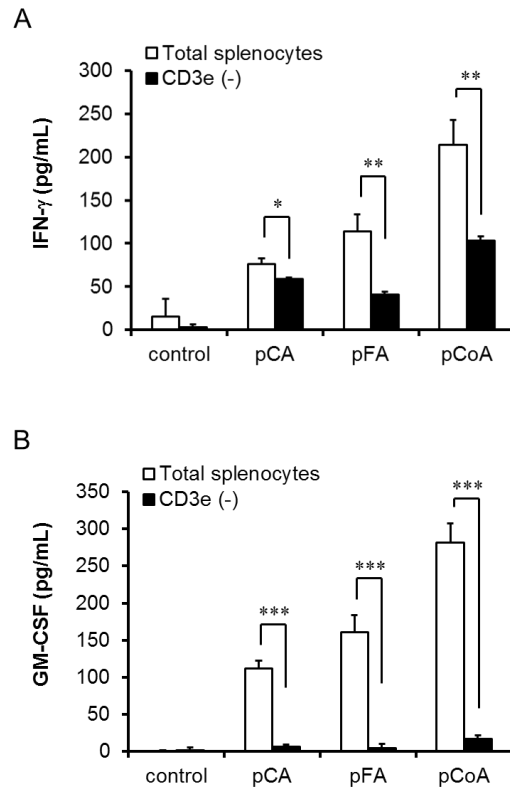


Figure 6. Contribution of T cell population to the EPP-induced cytokine production from murine splenocytes.

Total splenocytes and CD3e⁺ cell-eliminated splenocytes were stimulated with various polymerized polyphenols (100 μ g/mL). After 48 h, the supernatants were collected, and the concentrations of (A) IFN- γ and (B) GM-CSF were measured by ELISA. The values represent the mean \pm standard deviation, n = 3. Significant difference from untreated splenocytes: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

2. EPP のサイトカイン産生作用における CD4 の関与

EPP によるマウス脾臓細胞からのサイトカイン産生誘導作用に CD3e 陽性細胞が密接に関係していることが明らかとなったが、CD3e はヘルパーT細胞および CTL のいずれの T 細胞種にも高度に発現している⁹¹⁾。リグニン類による抗 HIV 効果が多数報告されていること、HIV の主要なターゲット細胞が CD4 陽性 T 細胞であることから⁷⁷⁾、EPP のマウス脾臓細胞からのサイトカイン産生誘導作用に、とりわけヘルパーT細胞が重要な役割を果たしている可能性が予想された。そこで著者は T 細胞表面上の主要な受容体である CD4 ならびに CD8 に着目し、これらの受容体が EPP のサイトカイン産生誘導能にどのような影響を及ぼしているか確認するため、それぞれの受容体に対する中和抗体を用いて解析した。

C57BL/6 マウス脾臓細胞を anti-CD4 mAb、または anti-CD8a mAb で処理し、EPP により脾臓細胞から誘導される IFN- γ ならびに GM-CSF の産生量を ELISA 法にて測定した。またコントロールとして、それぞれの中和抗体に対応するアイソタイプ IgG を添加し、抗体の特異的な作用について観察した。

anti-CD4 mAb を用いた CD4 の中和処理により、EPP により誘導される IFN- γ ならびに GM-CSF の産生量は、部分的ではあるが有意に減少した (Figure 7A)。一方、anti-CD8a mAb による CD8a の中和処理では、IFN- γ ならびに GM-CSF の産生量に有意な変化は見られなかった (Figure 7B)。さらに、すべての EPP に同様の傾向が認められたことから、可溶性リグニン類の IFN- γ ならびに GM-CSF 産生誘導作用に、ヘルパーT細胞に発現する CD4 が関与していることが明らかとなった。

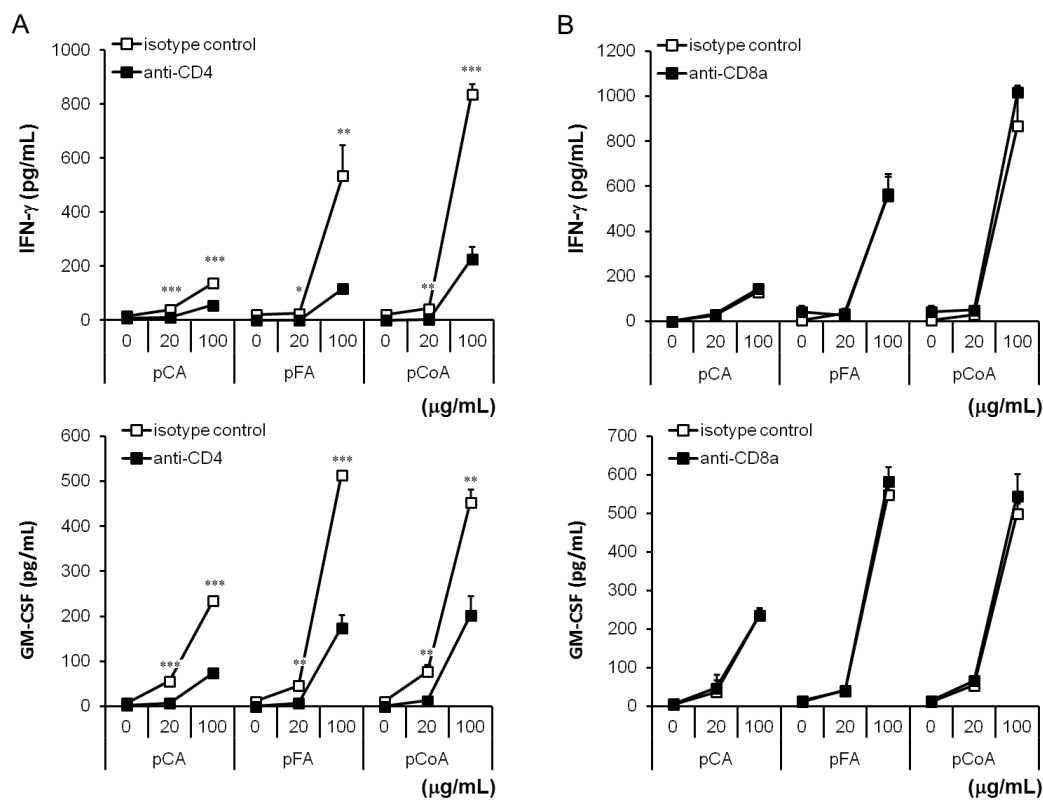


Figure 7. Involvement of CD4 in cytokine production induced by EPP from splenocytes.

Splenocytes were pre-incubated with 1 $\mu\text{g/mL}$ of (A) anti-CD4 mAb or (B) anti-CD8a mAb, and each control isotype (rat IgG2b and rat IgG2a; respectively) for 1 h, and then exposed to various polymerized polyphenols (0–100 $\mu\text{g/mL}$). After 48 h of incubation, the supernatant was collected, and the concentrations of IFN- γ and GM-CSF were determined by ELISA. The values shown represent the mean \pm standard deviation, $n = 3$. Significant difference from isotype control: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

3. EPP と CD4 分子の相互作用

マウス脾臓細胞を anti-CD4 mAb で処理することにより，EPP により誘導される IFN- γ ならびに GM-CSF の産生量は有意に減少したが，この結果は EPP のサイトカイン産生誘導作用の分子メカニズムにおける 2 つの可能性を示唆している．一方は，EPP が CD4 に直接作用し，CD4 の下流シグナルを活性化させることでサイトカインの産生量を増強させている可能性が挙げられる．もう一方は，ヘルパー T 細胞と抗原提示細胞の CD4 を介した細胞間相互作用によって，EPP によるサイトカイン産生を制御している可能性である．

いくつかのポリフェノール類，例えば EGCG には抗 HIV 活性があることが知られており，その作用メカニズムとして T 細胞表面上の CD4 に EGCG が結合することで，HIV 表面のエンベロープタンパク質である gp120 と CD4 との結合を阻害することが報告された⁹²⁾．さらに，リグニン類による抗 HIV 効果の作用メカニズムの一部として，HIV の T 細胞への侵入を阻害することが報告されている⁷⁶⁾．そこで，リコンビナント CD4 を用いて ELISA 様試験を行い，EPP と CD4 分子の直接的な相互作用について検討した．さらに特異性を追求するため，リコンビナント CD8a，また，重合前の precursor である 3 種類のフェニルプロパノイド類を比較対象として用いた．

ELISA プレートに固層化した 3 種類の EPP は，いずれも固層化に使用した濃度に依存して可溶性リコンビナント CD4 との結合性を示した (Figure 8A)．一方，precursor である CA，FA，CoA は EPP と同濃度で固層化したにもかかわらず，リコンビナント CD4 との結合性を示さなかった．また，ELISA プレートに固層化した 3 種類の EPP およびその precursor は，可溶性リコンビナント CD8a との結合性を示さず (Figure 8B)，EPP と CD4 との結合が特異的であることが示唆された．しかし，上記の結果が EPP ならびに precursor の ELISA プレートへの結合性の違いにより生じたものである可能性が残されているため，ELISA プレートをリコンビナント CD4 あるいは CD8a で固層化し，anti-CD4 mAb，または anti-CD8a mAb を用いて競合的 ELISA 様試験を行った．添加した 3 種類の EPP は，それぞれ固層化した CD4 分子に対する anti-CD4 mAb の結合を，添加濃度依存的に抑制した (Figure 8C)．また，precursor はいずれも CD4 分子と anti-CD4 mAb の結合を抑制しなかった．さらに，3 種類の EPP およびその precursor は，固層化した CD8a 分子と anti-CD8a mAb の結合に影響を与えなかった (Figure 8D)．

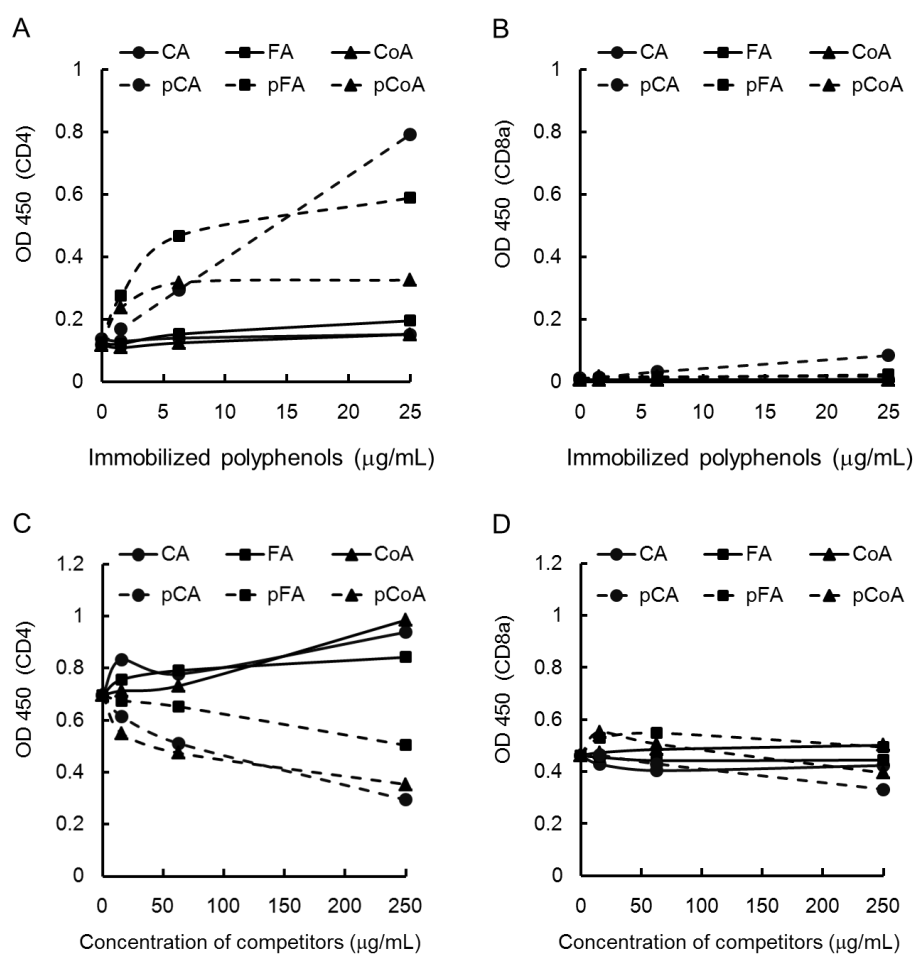


Figure 8. Binding capacity of the EPPs to CD4 molecules.

Each well of the ELISA plate was coated with various polyphenols (0–25 μg/mL) and blocked. Polyphenols bound to the wells were incubated with His-tagged (A) CD4 or (B) CD8a protein, washed, and probed with peroxidase-conjugated anti-6-His antibody. The binding affinity of the CD4 or CD8a molecule for the polyphenols was assessed using a colorimetric assay with the peroxidase substrate TMB and phosphate. The absorbance was measured at 450 nm. Reverse ELISA experiment was performed by coating the ELISA plate with (C) His-tagged CD4 or (D) CD8a protein and blocking. The plate was incubated with various polyphenols diluted to achieve concentrations of 0–250 μg/mL, washed, and further treated with anti-CD4 or CD8a mAb. The plate was probed with peroxidase-conjugated anti-Rat IgG antibody; the binding of anti-CD4 or CD8a mAb to solid-phase CD4 or CD8a protein was monitored using TMB, and the absorbance was measured as mentioned above.

ELISA プレート上での結果を踏まえて、正常細胞表面に発現する CD4 受容体に対する EPP の影響に着目した。C57BL/6 マウス脾臓細胞を 3 種類の EPP で処理し、洗浄後に APC 標識 anti-CD4 mAb と脾臓細胞との結合性を FACS により解析し、細胞表面上での EPP の作用について検討した。また、EPP と細胞膜上 CD4 との結合の特異性を評価するため、比較対象として PE 標識 anti-CD3e mAb ならびに FITC 標識 anti-CD8a mAb、さらに重合前の precursor を用いて実験を行った。

EPP は細胞膜上の CD3e, CD8a に対するそれぞれの mAb の結合を阻害することには無かったが、CD4 に対する anti-CD4 mAb の結合を阻害した (Figure 9)。さらに CD4 に対する anti-CD4 mAb の結合性は、pCoA が最も強く阻害し、次いで pCA, pFA の順に結合を阻害した。また、precursor である 3 種類のフェニルプロパノイド類はいずれも mAb と細胞膜上の受容体との結合を阻害しなかった。これらの結果より、可溶性リグニン類が細胞膜上に発現する CD4 に結合できることが明らかとなった。

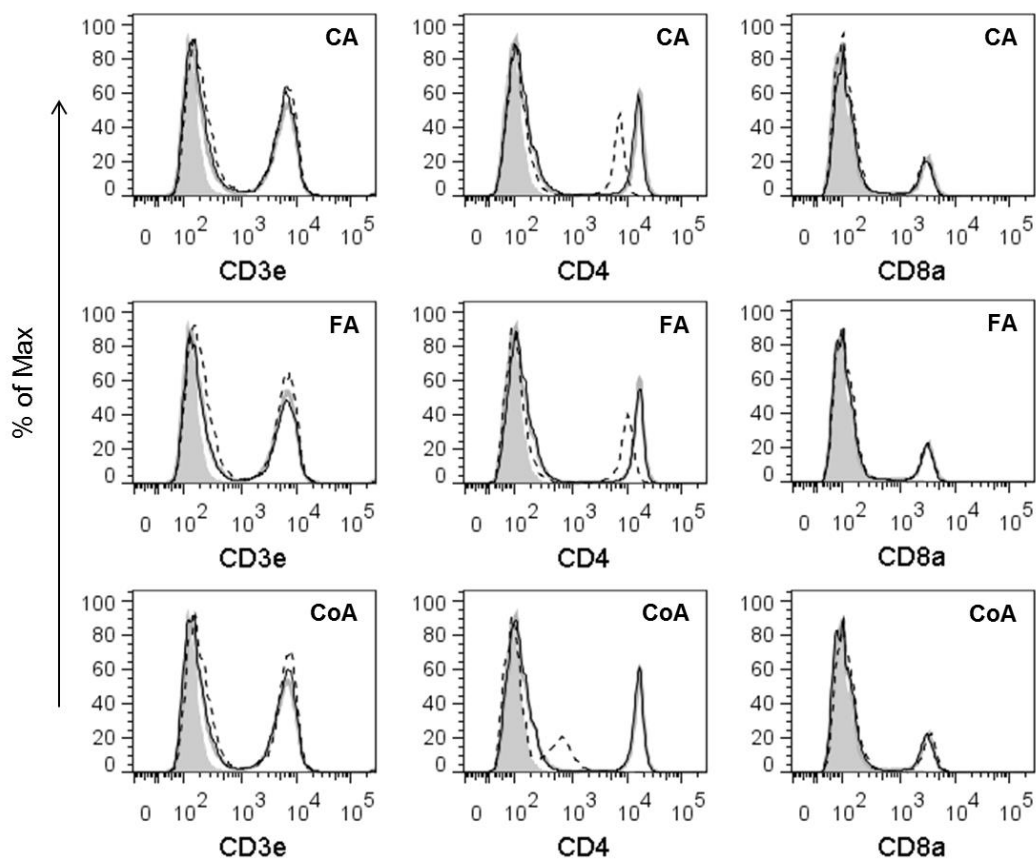


Figure 9. The competitive binding of polyphenols and anti-CD4 antibody to cell-surface CD4.

Fresh splenocytes were pre-incubated with various polyphenols (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). After blocking the Fc receptors, splenocytes were incubated with anti-CD3e-PE, anti-CD4-APC, anti-CD8a-FITC, or isotype-matched control mAbs. The interaction between cell-surface receptors and monoclonal antibodies was examined using FACS. Grey shading represents the control cells with control antibody; grey lines represent the control cells with functional antibody; black continuous lines represent the monomer phenylpropanoic acids-treated cells with functional antibody; and black dashed lines represent the polymerised polyphenols-treated cells with functional antibody. The data shown are representative of 3 independent experiments.

第一章 考察

本章では、EPPの免疫賦活活性について検討し、(i) EPPがマウス脾臓細胞からIFN- γ ならびにGM-CSFなどのサイトカイン産生を誘導すること、(ii) EPPのサイトカイン産生誘導作用においてT細胞群が重要な役割を果たすこと、(iii) EPPがCD4分子への結合能を有すること、(iv) CD4分子の機能がIFN- γ およびGM-CSFの産生誘導に深く関与していることを明らかとした。

近年、ヒドロキシ桂皮酸誘導体がNF- κ Bの活性化を抑制し、抗炎症効果を発揮することが報告された^{24, 93, 94}。抗炎症効果を持つ低分子フェノール性化合物は炎症性疾患の治療のために注目されているが、ポリフェノールオキシダーゼおよびペルオキシダーゼは多くの食品に含まれるため、フェノール性化合物に干渉して容易に重合を促す⁹⁵。高分子化したフェノール性化合物は、生物活性が著しく変化する可能性があるため、利用するには注意が必要な機能性食品も考えられる。高分子化したフェニルプロパノイド類はマウス脾臓細胞からサイトカイン産生を誘導したが、EPP中にエンドトキシンなどの混入がほとんど認められないことから、EPPの免疫賦活活性はリグニン類に特徴的な構造に依存していると考えられる。また、EPPに認められた脾臓細胞増殖誘導効果ならびにサイトカイン産生誘導作用が、precursorには認められなかったことから、ポリフェノール類の分子サイズと免疫調整作用には深い関係があると言える。分子量の変化が機能性分子の持つ免疫調節活性に影響を与える例はいくつか知られており、例えば海藻由来の可溶性 β -glucanであるLaminarinは低分子量であるため、他の高分子 β -glucanの様な強いサイトカイン産生誘導作用は認められず、逆に β -glucan受容体のアンタゴニストとして作用することが知られている⁹⁶。従って低分子量のEPPは十分な活性化シグナルを細胞内に伝達することができない可能性も考えられるが、本検討により少なくとも分子量50,000 Daを超えるEPPでは、IFN- γ ならびにGM-CSF産生をマウス脾臓細胞から強力に誘導できることが示された。

IFN- γ ならびにGM-CSFは自然免疫において重要な役割を果たしている。IFN- γ はNK細胞によって制御される抗腫瘍活性に親密に関わっている^{45, 97, 98}。一方、GM-CSFはウイルス、細菌、真菌などに対する生体防御に重要なサイトカインである^{99, 100}。機能性食品により誘導されるIFN- γ ならびにGM-CSF産生は、感染防御および癌治療における重要な指標となる。癌治療のために補完代替療法として使用されている多くの機能性食品は、宿主の免疫システムを活性化させる能力を有している。我が国では、 β -glucanの薬理作用を期待して種々の食用茸が機能性食品として広く利用されているが^{43, 101}、食用茸由来の β -glucanはIFN- γ 依存的にNK細胞を活性化させることが知られている^{29, 42}。また、GM-CSFは食用真菌に由来

する β -glucan の免疫賦活活性を増強する作用があることから^{44, 102, 103)}, GM-CSF 産生誘導能を有するリグニン類を食用真菌と共に摂取することで, β -glucan の免疫賦活効果をより強く誘導できる可能性がある.

本章での検討により EPP が CD4 に結合することが確認されたが, いくつかのフェノール性化合物は CD4 結合能を有していることが知られている. 例えば EGCG は CD4 に結合することで, エンベロープタンパク質である gp120 との結合を阻害し, 抗 HIV 活性を示すことが報告されている⁹²⁾. 従って, 以前から知られているリグニン類の抗 HIV 活性は^{57, 76)}, CD4 結合性によって部分的に制御されていると考えられる. また, CD4 はマウスにおいてヘルパーT 細胞のみならず^{104, 105)}, 骨髄細胞¹⁰⁶⁾, 脾臓樹状細胞¹⁰⁷⁾ に発現が認められている. さらに, ヒトの単球に発現する CD4 はシグナル分子として働き, ホスホリパーゼ C の活性化および細胞内カルシウムの上昇を誘導することが報告されている¹⁰⁸⁾. 従って, EPP の CD4 への結合が, 様々な細胞の応答性を高めていた可能性が考えられる. しかしながら, 通常 CD4 は補助受容体として知られており¹⁰⁹⁾, T 細胞上の CD4 の単独刺激のみでサイトカインの産生が誘導されるほどのシグナルが生じるとは考えにくいので, EPP の免疫賦活活性において CD4 以外の受容体の関与が予想される. また, EPP に誘導されるサイトカイン産生量が T 細胞の除去によって完全には消失しなかったことから, EPP のサイトカイン産生誘導作用には T 細胞依存性の経路と非依存性の経路が関与していると考えられる.

CD4 の機能抑制により EPP のマウス脾臓細胞におけるサイトカイン産生誘導量を低下させたが, 抗 CD4 抗体はヘルパーT 細胞と抗原提示細胞の細胞間接着を抑制する働きを持つ. 従って, EPP の作用メカニズムを明確にするためには, (i) CD4 陽性 T 細胞に対する EPP の直接的な作用, (ii) 抗原提示細胞と T 細胞との細胞間相互作用の関与について, それぞれ検討する必要がある. これらの項目は第二章にて追求し, EPP のサイトカイン産生誘導作用における, より詳細なメカニズムの解明を目指した.

第二章 EPP の免疫賦活活性における異種細胞間相互作用の影響

リグニン類を免疫賦活性機能性分子として安全に食品応用するためには、EPP の免疫賦活メカニズムをさらに明確にする必要がある。前章では、MACS による CD3e 陽性細胞の除去によりサイトカイン産生量が減少したが、完全には抑制されなかった。従って、EPP のサイトカイン産生誘導作用が、T 細胞依存性の経路ならびに非依存性の経路による制御を受けていた可能性が示唆された。また、EPP が CD4 への結合能を有すること、EPP の免疫賦活作用において CD4 分子が重要な役割を果たすことを明らかにした。しかし、CD4 は抗原提示細胞膜上の MHC-classII と結合し、抗原提示細胞からヘルパーT 細胞への情報伝達に関わる補助受容体として知られているため¹⁰⁹⁾、この過程で用いた anti-CD4 mAb は、EPP と CD4 の結合を阻害したのみならず、抗原提示細胞とヘルパーT 細胞間の接触を同時に抑制していた可能性がある。従って、EPP が CD4 に結合したことによるサイトカイン産生への影響、ならびに抗原提示細胞と T 細胞との細胞間相互作用が EPP によるサイトカイン産生誘導作用に与える影響についてそれぞれ詳細に解析する必要がある。

本章では、EPP のサイトカイン産生メカニズムを明らかにするため、EPP が T 細胞群に与える直接的な作用、各種細胞群への影響、ならびに異種細胞間における相互作用に着目し、様々な組織から得た免疫担当細胞を用いて *in vitro* の評価系で検討した。

第一節 種々の白血球に対する EPP の影響

本節では、EPP のサイトカイン産生誘導作用における T 細胞依存性経路、ならびに非依存性経路について解析するため、(i) 脾臓に存在する CD4 陽性細胞を精製後、EPP が直接 T 細胞に与える影響について検討し、(ii) 腹腔内、胸腺、骨髄など種々の組織に由来する白血球の EPP 応答性について比較を行い、(iii) さらに機能性 T 細胞および B 細胞が欠損した C.B-17/Icr-scid/scid (SCID) マウスの脾臓細胞と正常マウスの脾臓細胞を用いて、EPP に対する免疫応答性を比較検討した

1. CD4 陽性、CD8 陽性 T 細胞に対する EPP の影響

EPP の T 細胞に対する直接的な作用について解析するため、マウス脾臓細胞から T 細胞群を精製し、EPP によって誘導されるサイトカイン濃度を指標に検討した。

C57BL/6 マウス脾臓細胞から、CD4 陽性 T 細胞あるいは CD8 陽性 T 細胞を MACS により精製し、3 種類の EPP で刺激した後に産生される IFN- γ 、GM-CSF ならびに TNF- α の産生量を ELISA により測定した。MACS 処理前の脾臓細胞、ならびに CD8 陽性 T 細胞は、CD4 陽性 T 細胞との比較対象として実験に用いた。FACS 解析により、MACS 処理前の脾臓細胞中の CD4 陽性 T 細胞群、CD8 陽性 T 細胞群の割合がそれぞれ 26.9%、17.1%であったのに対し、MACS 処理後の CD4 陽性 T 細胞群、CD8 陽性 T 細胞群の割合はそれぞれ 90%以上であることを確認した。

3 種類の EPP は精製前の脾臓細胞 (total spleen) から IFN- γ 、GM-CSF ならびに TNF- α の産生を有意に誘導したが、精製された T 細胞群からは、いずれのサイトカインについてもほとんど誘導しなかった (Figure 10)。CD8 陽性 T 細胞のみならず、CD4 陽性 T 細胞においてもサイトカインの産生を確認することができなかったことから、T 細胞単独では EPP によるサイトカイン産生誘導が生じないことが明らかとなった。

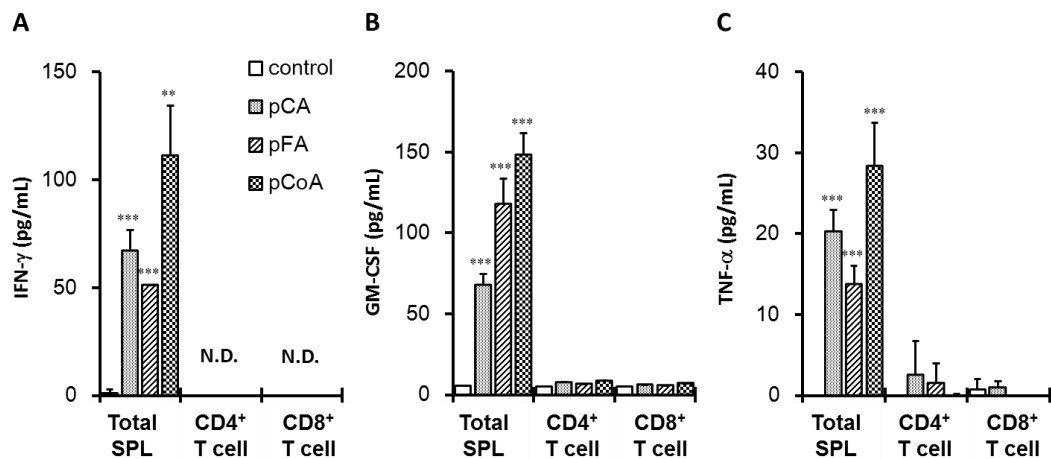


Figure 10. Effects of EPPs on purified CD4⁺ or CD8⁺ T cells isolated from splenocytes.

Total splenocytes (SPL) (4×10^6 cells/mL) and CD4⁺ or CD8⁺ T cells (2×10^6 cells/mL) isolated from C57BL/6 mice splenocytes in 48-well culture plates (500 μ L/well) were stimulated with various polymerized polyphenols (100 μ g/mL). After 48 h, the supernatants were collected, and the concentrations of (A) IFN- γ , (B) GM-CSF, and (C) TNF- α were measured by ELISA. The values represent the mean \pm standard deviation, $n = 3$. Significant difference from untreated cells: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. N.D.: not detected.

2. 各組織由来白血球に対する EPP の影響

EPP の免疫賦活メカニズムにおける T 細胞依存性の経路が, T 細胞単独では機能しないことが確認されたため, マウス腹腔内, 胸腺, ならびに骨髄など, 脾臓以外の組織に由来する白血球における EPP 応答性を, サイトカイン濃度を指標に検討した.

C57BL/6 マウスの腹腔 (peritoneal cavity : PC) より, 常在性細胞を回収した後, 脾臓 (spleen : SPL), 胸腺 (thymus : THY), 大腿骨と脛骨より骨髄 (bone marrow : BM) を回収し, 各々の組織に由来する白血球を調整した. 各種組織由来白血球を 3 種類の EPP で刺激後, 48 時間後に培養上清中の IFN- γ , GM-CSF, TNF- α 濃度を ELISA 法により測定した. TLR2 アゴニストである Pam3CSK4 を, 陽性コントロールとして使用した.

Pam3CSK4 により刺激された胸腺細胞および骨髄細胞は TNF- α を産生したが, どの EPP においても強い応答性を示さなかった (Figure 11). 一方, 腹腔常在性細胞 (peritoneal cavity cell: PCC) は EPP 刺激により顕著な TNF- α 産生能を示した. この TNF- α 産生量は, 脾臓細胞より高応答性を示したが, IFN- γ および GM-CSF の十分な産生は認められなかった.

これらのことから, EPP と Pam3CSK4 が異なるメカニズムでサイトカイン産生を誘導していることが示唆された. さらに, IFN- γ の産生が脾臓細胞においてのみ認められることが明らかとなった. また, 腹腔常在性細胞における EPP の高応答性が確認されたが, 腹腔内にはマクロファージおよび B 細胞が豊富に存在することが知られているため^{110, 111}), EPP がそれらの細胞に対して影響を与えている可能性が示唆された. 使用した 3 種類の EPP において同様の傾向が見られたことから, これらの作用がリグニン類の特徴的な生物活性であることが示された.

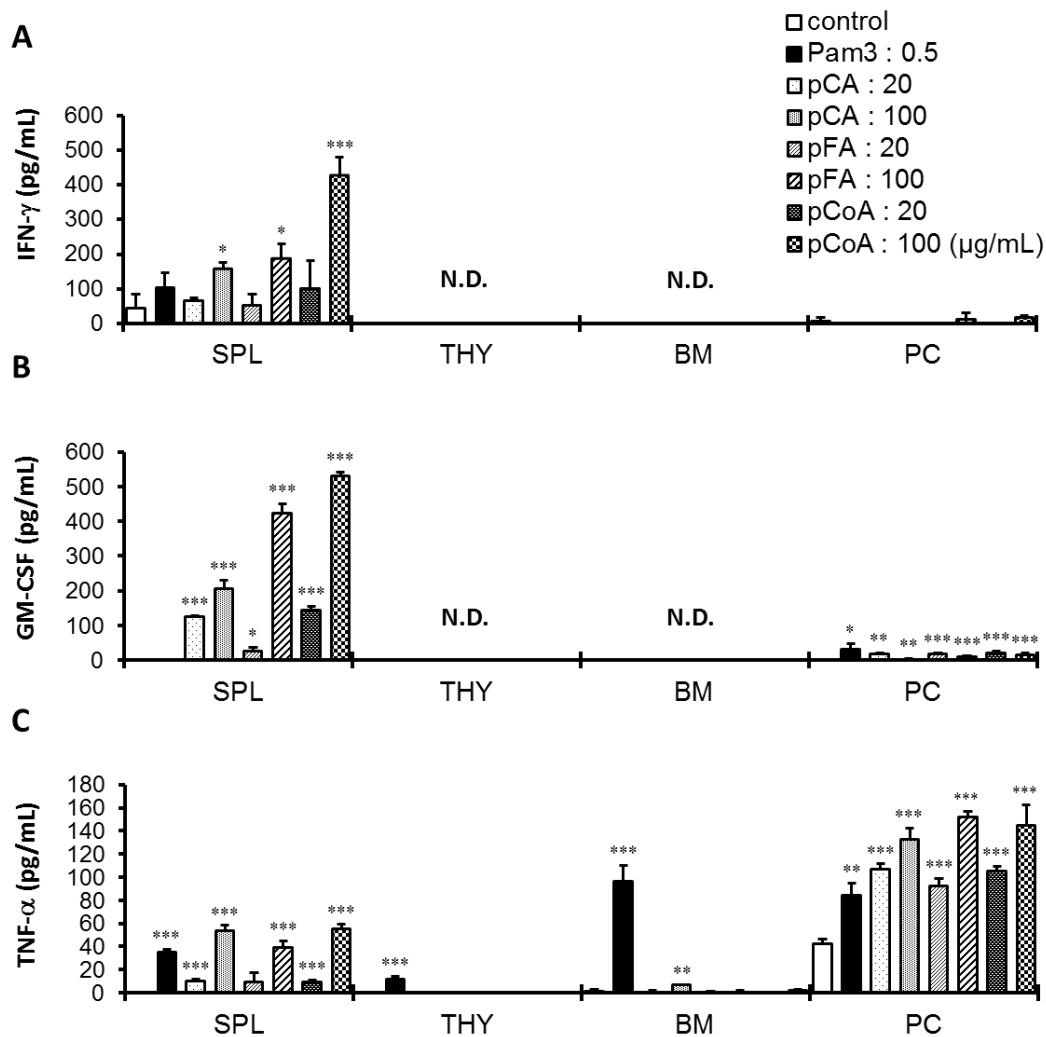


Figure 11. Different reactivity of leukocytes derived from various organs of C57BL/6 mice to EPPs on cytokine production.

Leukocytes derived from the spleen (SPL), thymus (THY), bone marrow (BM), and peritoneal cavity (PC) of C57BL/6 mice were isolated, and cell suspensions were adjusted to 4×10^6 , 4×10^6 , 1×10^6 , or 4×10^5 cells/mL in 96-well culture plates (250 μL /well) and incubated for 48 h with polymerized polyphenols (0–100 $\mu\text{g/mL}$) or Pam3CSK4 (Pam3) (0.5 $\mu\text{g/mL}$). After incubation, the supernatant was collected, and the concentrations of (A) IFN- γ , (B) GM-CSF, and (C) TNF- α were measured by ELISA. The values represent the mean \pm standard deviation, $n = 3$. Significant difference from control: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. N.D.: not detected.

3. SCID マウス由来脾臓細胞に対する EPP の影響

C.B-17 系統マウスで発見された SCID マウスは，DNA 修復機構の欠損により機能性 T 細胞および B 細胞が欠損しており，重度の免疫不全状態に陥る^{112, 113)}．主に移植研究のために利用されてきたが，T 細胞および B 細胞が存在しないことから，獲得免疫系が発展しないため，異種組織・異種細胞に対する強い拒絶を示さない．一方で，NK 細胞およびマクロファージなどの自然免疫系に関わる機能は正常に残されていることが知られている¹¹⁴⁻¹¹⁷⁾．EPP による免疫調節作用に，マクロファージあるいは B 細胞が重要な役割を果たしている可能性が示唆されたため，著者は続いて，B 細胞の欠損した SCID マウスを用いて，EPP の免疫賦活作用の評価を試みた．

SCID マウス由来脾臓細胞を 3 種類の EPP で刺激し，上清中に放出される IFN- γ ，GM-CSF，ならびに TNF- α 量を ELISA 法にて測定した．Pam3CSK4 は陽性コントロールとして，また C57BL/6 マウス脾臓細胞は各サイトカインの産生レベル比較のため，実験に使用した．

C57BL/6 マウスにおける EPP の応答性と比べ，SCID マウス由来脾臓細胞における EPP 応答性は低かったが，3 種類の EPP および Pam3CSK4 は，SCID マウス由来脾臓細胞からの IFN- γ ，GM-CSF，ならびに TNF- α の産生を有意に誘導した (Figure 12)．

SCID マウスを用いた検討により，EPP の免疫賦活効果における T 細胞非依存性の経路の存在が再度確認され，明確なものとなった．また，B 細胞が欠損していても，EPP 応答性を示すことが確認された．さらに，SCID マウスにおける GM-CSF 産生量は C57BL/6 マウスと比べて低値であったのに対し，TNF- α の産生量は比較的高い値を示した．これらの結果から，EPP が自然免疫系を活性化する作用を有している可能性が示唆された．

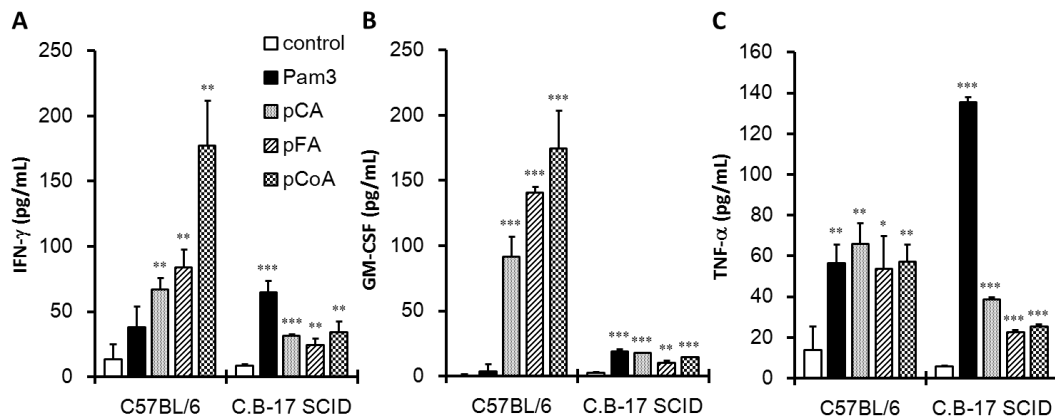


Figure 12. Cytokine induction by EPPs from C.B-17 SCID mice-derived splenocytes. Splenocytes (4×10^6 cells/mL) from C57BL/6 or C.B-17 SCID mice in 96-well culture plates (200 μ L/well) were stimulated with various polyphenols (100 μ g/mL) or Pam3CSK4 (Pam3) (0.1 μ g/mL). After 48 h, supernatants were collected and the concentrations of (A) IFN- γ , (B) GM-CSF, and (C) TNF- α were measured by ELISA. The values represent the mean \pm standard deviation, n = 3. Significant difference from control: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

第二節 EPP のサイトカイン産生作用における抗原提示細胞の関与

抗原提示細胞の細胞膜上には TLR2, 4, 5 などの TLRs, ならびに Dectin-1 などの CLEC など, 様々な自然免疫受容体が発現しており, それぞれ特異的な PAMPs を認識することで免疫系を活性化させ, 感染時には病原体の排除を促す¹¹⁾. 前節の検討において EPP がマウス腹腔常在性細胞から強い TNF- α 産生を誘導したこと, また, SCID マウス由来脾臓細胞よりサイトカイン産生を誘導したことから, EPP の免疫調節活性にマクロファージならびに樹状細胞などの抗原提示細胞が深く関与している可能性が示唆された.

そこで本節では EPP のサイトカイン産生誘導作用における抗原提示細胞の役割ならびに抗原提示細胞に対する直接的な作用について検討した.

1. EPP のサイトカイン産生作用における抗原提示細胞群の影響

抗原提示細胞は外来抗原に対して即時に反応し, その後に生じる様々な免疫応答のトリガーとなる. EPP のサイトカイン産生誘導作用における抗原提示細胞の役割を検討するため, 脾臓細胞からマクロファージならびに樹状細胞などの抗原提示細胞を特異的に取り除き, EPP により誘導されるサイトカインの産生量を比較した. また, CD11b はマクロファージのマーカーとして¹¹⁸⁾, CD11c は樹状細胞のマーカーとして用いた¹¹⁹⁾.

C57BL/6 マウス脾臓細胞を anti-CD11b または anti-CD11c microbeads で処理し, MACS を用いて CD11b 陽性細胞, CD11c 陽性細胞を除去した. FACS 解析により, MACS 処理前の脾臓細胞中の CD11b 陽性細胞, CD11c 陽性細胞群の割合が 3% 以上であったのに対し, MACS 処理後の CD11b 陽性細胞, CD11c 陽性細胞群の割合は 1% 以下であることを確認した. MACS 処理前後の細胞を 3 種類の EPP で刺激し, 誘導される IFN- γ , GM-CSF および TNF- α の産生量を ELISA 法にて測定した. また陽性コントロールとして Pam3CSK4 を実験に用いた.

CD11b 陽性細胞, CD11c 陽性細胞を除去した結果, EPP により誘導される IFN- γ , GM-CSF ならびに TNF- α の産生量は, いずれも顕著に減少した (Figure 13). また, Pam3CSK4 刺激においても類似した傾向が見られたが, CD11c 陽性細胞の除去による TNF- α 産生量に変化が見られなかった.

作製したすべての EPP に類似した傾向が認められ, 可溶性リグニン類のサイト

カイン産生誘導作用にマクロファージならびに樹状細胞などの抗原提示細胞群が、T細胞と同様に重要な役割を果たすことが明らかとなった。さらに、リグニン類とTLR2アゴニストは免疫賦活剤として異なる特徴を有していることが再度確認された。

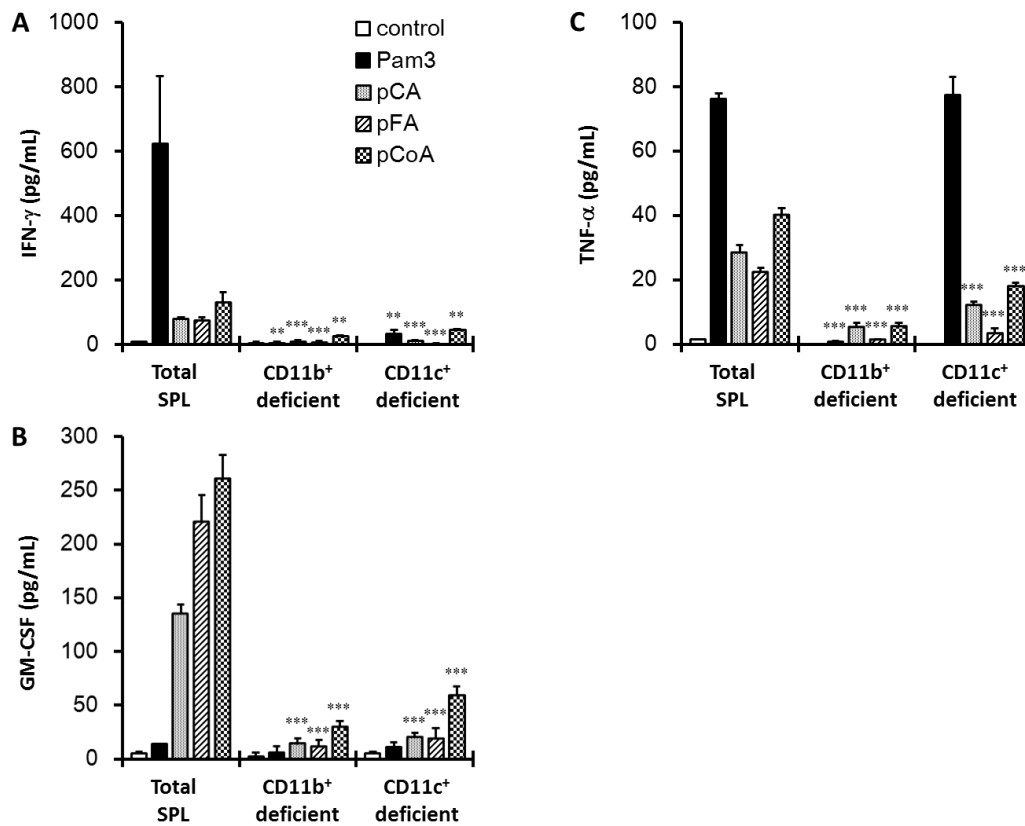


Figure 13. Contribution of antigen presenting cells to the EPP-induced cytokine production from murine splenocytes.

Total splenocytes (SPL) (4×10^6 cells/mL) and splenocytes deficient in CD11b⁺ or CD11c⁺ (CD11b⁺ deficient or CD11c⁺ deficient, respectively) derived from C57BL/6 mice in 48-well culture plates (500 μ L/well) were stimulated with various polymerized polyphenols (100 μ g/mL) or Pam3CSK4 (Pam3) (0.5 μ g/mL). After 48 h, the supernatants were collected, and the concentrations of (A) IFN- γ , (B) GM-CSF, and (C) TNF- α were measured by ELISA. The values represent the mean \pm standard deviation, n = 3. Significant difference from total splenocytes: ***p* < 0.01; ****p* < 0.001.

2. EPP の BMDC におけるサイトカイン産生誘導作用

EPP のサイトカイン産生誘導作用に、T 細胞のみならず抗原提示細胞が重要な役割を果たすことが明らかとなった。抗原提示細胞の EPP に対する直接的な応答性を検討するため、マウス骨髄細胞を樹状細胞へと分化誘導し、EPP で刺激した際に産生誘導されるサイトカイン量を評価した。

C57BL/6 マウス由来骨髄細胞を IL-4 と GM-CSF 共存化で培養し、骨髄由来樹状細胞 (bone marrow-derived dendritic cell : BMDC) を作製した。BMDC は 3 種類の EPP で刺激し、産生された IFN- γ ならびに TNF- α 量を ELISA 法により測定した。TLR2 アゴニストである Pam3CSK4 を陽性コントロールとして用いた。

3 種類の EPP ならびに Pam3CSK4 は BMDC から TNF- α の産生を有意に誘導したが、IFN- γ 産生は誘導しなかった (Figure 14)。

いずれの EPP によっても TNF- α の産生が誘導されたことから、樹状細胞からの直接的なサイトカイン産生誘導は、可溶性リグニン類に共通する免疫学的作用であることが示された。また、第 2 章第一節の検討において BMDC の前駆細胞である BMC が EPP に対し強い応答性を示さなかったことから、樹状細胞へと分化することで応答性が増強したものと考えられる。これらのことから可溶性リグニン類が他の様々な PAMPs と同様に、自然免疫活性化能を有していることが明らかとなった。

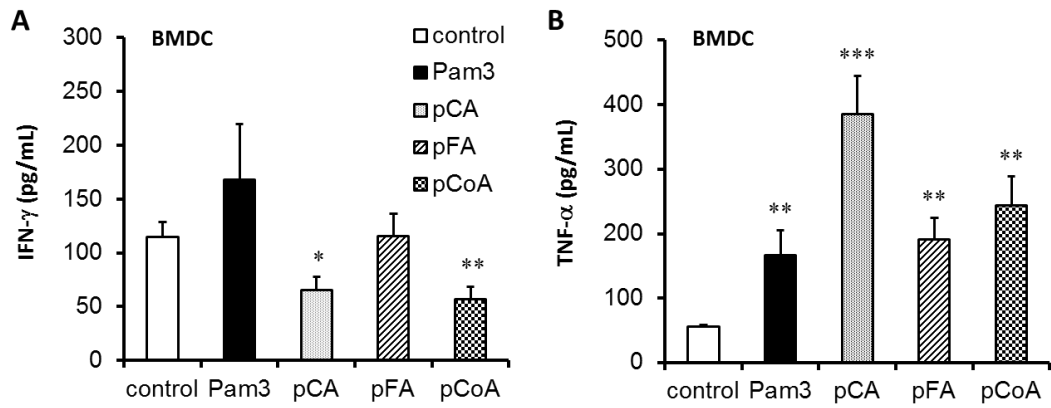


Figure 14. Effect of EPPs on cytokine production in murine BMDCs.

BMDCs from C57BL/6 mice were stimulated with various polymerized polyphenols (100 $\mu\text{g/mL}$) or Pam3CSK4 (Pam3) (0.02 $\mu\text{g/mL}$). After 48 h, the concentration of released (A) IFN- γ and (B) TNF- α was determined by ELISA. The values represent the mean \pm standard deviation, $n = 3$. Significant difference from control: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

第三節 細胞間相互作用により制御される EPP のサイトカイン産生誘導作用

第一章ならびに前節までの検討により、EPP のサイトカイン産生誘導作用には抗原提示細胞群および T 細胞群が密接に関わっていることが明らかとなった。CD4 はヘルパー T 細胞が抗原提示細胞から抗原情報を受け取る際に、免疫シナプス形成のために CD28 ならびに LFA-1 などと共に補助的な役割を果たしていることから^{120, 121)}、EPP の作用発現に抗原提示細胞と T 細胞の相互作用が関与していることが予想された。

そこで本節では、抗原提示細胞と T 細胞群における細胞間相互作用に関与する液性因子ならびに細胞接着因子に対する中和抗体を用いて、EPP のサイトカイン産生誘導作用に与える影響について検討した。

1. EPP の IFN- γ 産生誘導作用における抗原提示細胞と T 細胞の関与

免疫賦活活性を持つ機能性食品において、食品に由来する機能性分子により誘導される IFN- γ は極めて重要な因子の一つである。EPP は IFN- γ の産生をマウス脾臓細胞から強く誘導したが、他の組織に由来する白血球ならびに BMDC からは IFN- γ の産生は認められなかった。そこで、EPP により活性化された抗原提示細胞と、十分な量の T 細胞が存在することで IFN- γ の産生が誘導できると考え、EPP 応答性を示した腹腔内常在性細胞に精製した T 細胞を添加し、IFN- γ 産生量を評価した。また、IFN- γ 産生に関わる代表的な液性因子である IL-12 の産生量についても同様に検討した。

C57BL/6 マウスの腹腔より PCC を回収した後、脾臓細胞を調整した。脾臓細胞由来 T 細胞は、市販のマウス T 細胞濃縮カラムを用いて精製した。FACS 解析により、PCC 中の T 細胞群の割合が 6.9%であること、またカラム処理前後の T 細胞群の割合が 85.3%であることを確認した。PCC と脾臓由来 T 細胞は 1:1 で混合し、3 種類の EPP で刺激後、48 時間後に培養上清中の IFN- γ ならびに IL-12p70 濃度を ELISA 法により測定した。

PCC、あるいは脾臓由来 T 細胞のみを EPP で刺激した場合、IFN- γ はほとんど産生されなかったが、PCC と脾臓由来 T 細胞を混合した場合、EPP に応答して多量の IFN- γ が産生誘導された (Figure 15)。一方、IL-12p70 の産生はどの環境においても認められなかった。

本検討により，EPPによるIFN- γ の産生が，活性化した抗原提示細胞とT細胞によって制御されていることが確認できた．また，すべてのウェルの細胞数は同一であるため，T細胞と抗原提示細胞の存在比によって，IFN- γ の産生量に違いが生じたと考えられる．

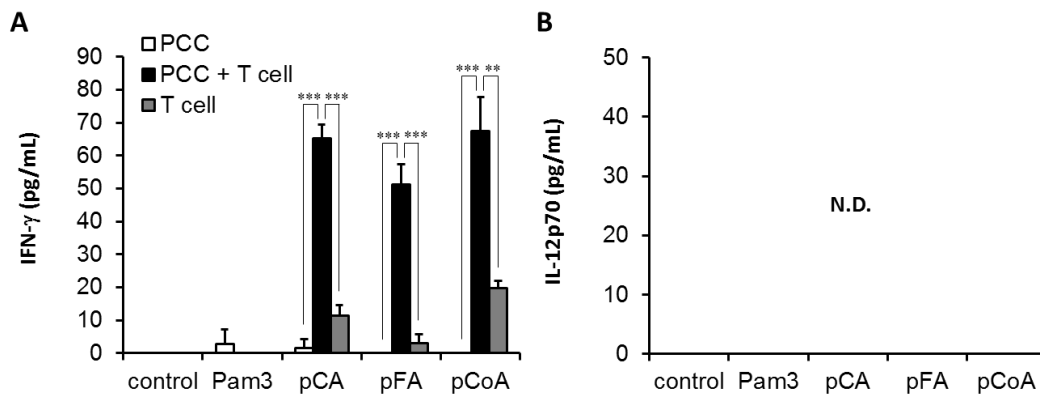


Figure 15. IFN- γ synthesis induced by EPPs was mediated by both antigen presenting cells and T cells.

C57BL/6-derived resident peritoneal cavity cells (PCCs) (4×10^5 cells/mL), purified T cells (4×10^5 cells/mL) isolated from splenocytes, and an equal volume mixture of PCCs and T cells in 96-well culture plates (250 μ L/well) were stimulated with various polyphenols (100 μ g/mL) or Pam3CSK4 (Pam3) (0.5 μ g/mL). After 48 h, the supernatants were collected, and the concentrations of (A) IFN- γ and (B) IL-12p70 were measured by ELISA. The values represent the mean \pm standard deviation, $n = 3$. Significant difference between PCCs or T cells and the mixture of these cells: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. N.D.: not detected.

2. EPP の IFN- γ 産生誘導作用における IL-12 の関与

EPP は、十分な T 細胞と抗原提示細胞が同時に存在する環境において多量の IFN- γ の産生を誘導することが明らかとなったが、IFN- γ の産生環境において、IFN- γ 産生誘導因子である IL-12 の存在は認められなかった。これまでの研究により、いくつかの PAMPs、例えば機能性食品に由来する β -glucan の IFN- γ 産生誘導には、液性因子である IL-12 が重要な役割を果たすことが報告されている⁴²⁾。そこで、EPP のサイトカイン産生誘導能に IL-12 がどのような影響を及ぼしているか、IL-12 に対する中和抗体を用いて検討した。

C57BL/6 マウス脾臓細胞を anti-IL-12p70 mAb で処理し、EPP により脾臓細胞から誘導される IFN- γ の産生量を ELISA 法にて測定した。また、それぞれの中和抗体に対応するアイソタイプ IgG を添加し、抗体の特異的な作用について観察した。さらに TLR2 リガンドである Pam3CSK4 をコントロールとして使用した。

IL-12 の中和処理により、Pam3CSK4 により誘導される IFN- γ の産生量は有意に減少したが、EPP により誘導される IFN- γ の産生量に変化は認められなかった (Figure 16)。

これらのことから、可溶性リグニン類のマウス脾臓細胞における IFN- γ 産生誘導作用が、IL-12 非依存的に引き起こされていることが確認された。また、EPP の IFN- γ 産生誘導効果が、 β -glucan および TLR2 リガンドとは異なるメカニズムで引き起こされている可能性が強く示唆された。

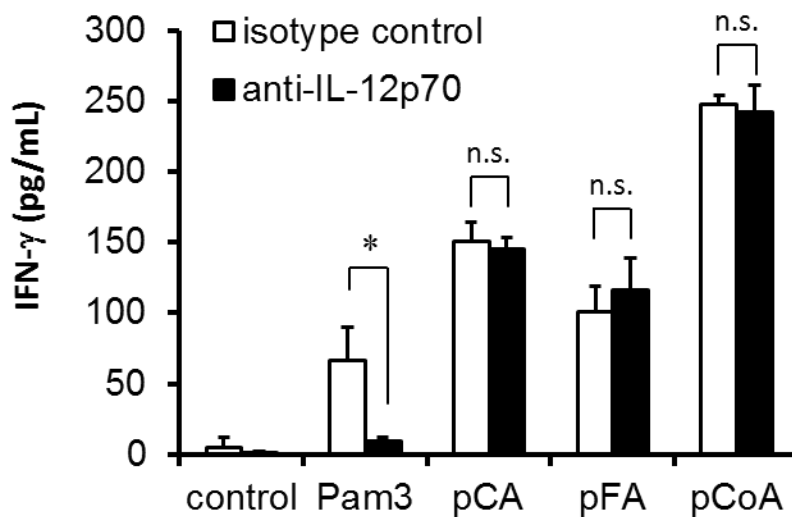


Figure 16. Involvement of IL-12 on IFN- γ synthesis induced by EPPs.

Splenocytes (4×10^6 cells/mL) from C57BL/6 mice in 96-well culture plates (250 μ L/well) were pre-incubated with 1 μ g/mL of anti-IL-12p70 mAb or control isotype (rat IgG2a) for 30 min, and then exposed to various polymerized polyphenols (100 μ g/mL) or Pam3CSK4 (Pam3) (0.5 μ g/mL). After 48 h, the concentration of released IFN- γ was determined by ELISA. The values represent the mean \pm standard deviation, $n = 3$. Significant difference between isotype control and functional antibody: * $p < 0.05$. n.s.: not significant.

3. EPP のサイトカイン産生誘導作用における種々の細胞間接着分子の影響

抗原刺激を受けた抗原提示細胞は、T 細胞と接着して免疫シナプスを形成する。活性化した抗原提示細胞側の MHC-classII- β 2-domain, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), CD80/CD86 (B7) はそれぞれ T 細胞側の CD4, lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1), CD28 と結合し、抗原提示細胞側の情報を T 細胞へと伝達する^{109, 120, 121)}。マウス脾臓細胞において EPP のサイトカイン産生誘導作用における CD4 の関与が認められているため、本検討ではさらに LFA-1, ICAM-1, ならびに B7 の機能を抑制し、抗原提示細胞と T 細胞との物理的な接触がサイトカイン産生に与える影響を調査した。

C57BL/6 マウス脾臓細胞を anti-LFA-1 mAb, anti-ICAM-1 mAb あるいは cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4)-Fc キメラタンパク質で処理し、EPP により脾臓細胞から誘導される IFN- γ , GM-CSF および TNF- α の産生量を ELISA 法にて測定した。anti-LFA-1 mAb, anti-ICAM-1 mAb については、それぞれ対応するアイソタイプ IgG を添加し、抗体の特異的な中和作用について検討した。なお、CD28 アナログである CTLA-4 は B7 への結合能を持つことが知られており^{122, 123)}、CTLA-4-Fc は抗原提示細胞上の B7 と T 細胞上の CD28 との結合を競合的に阻害し、T 細胞の活性化を抑制するために使用した。また、TLR2 リガンドである Pam3CSK4 を使用し、活性を比較した。

LFA-1, ICAM-1 に対する中和抗体を用いた接着分子の抑制により、EPP により誘導される IFN- γ , GM-CSF および TNF- α の産生量は有意に減少した (Figure 17)。また、CTLA-4-Fc による CD28-B7 相互作用の抑制によっても、IFN- γ , GM-CSF の産生量が顕著に低下した。また、CTLA-4-Fc 処理により TNF- α の産生量が僅かに減少した。一方、Pam3CSK4 では、LFA-1 ならびに ICAM-1 の中和処理、あるいは CTLA-4-Fc の添加によって IFN- γ 産生が有意に減少したが、TNF- α の産生量に変化は認められなかった。

これらの結果より、可溶性リグニン類による IFN- γ , GM-CSF ならびに TNF- α の産生誘導作用は、抗原提示細胞と T 細胞との物理的な相互作用によって調整されていることが明らかとなった。また TLR2 リガンドでは TNF- α 産生が細胞間接触による影響を受けないことが確認され、EPP と Pam3CSK4 の生物活性が様々な点において相違することが示された。

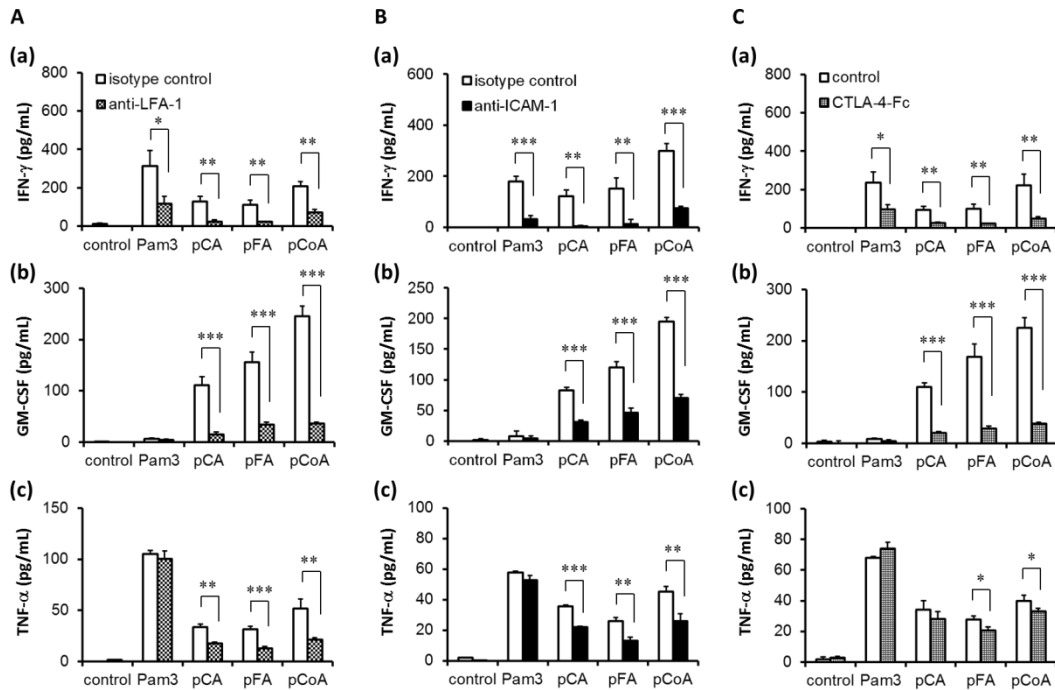


Figure 17. Direct cell-to-cell interactions enhance cytokine release induced by EPPs. Splenocytes (4×10^6 cells/mL) from C57BL/6 mice in 48-well culture plates (500 μ L/well) were pre-incubated with 2 μ g/mL of (A) anti-LFA-1 mAb or (B) anti-ICAM-1 mAb, and each control isotype (rat IgG2a and rat IgG2b, respectively) for 30 min. (C) Splenocytes (4×10^6 cells/mL) in 48-well culture plates (500 μ L/well) were pre-incubated with CTLA-4-Fc chimera protein (4 μ g/mL) for 1 h. After pre-incubation, cells were stimulated with various polymerized polyphenols (100 μ g/mL) or Pam3CSK4 (Pam3) (0.5 μ g/mL) for 48 h. Then, supernatants were collected and the concentrations of (a) IFN- γ , (b) GM-CSF, and (c) TNF- α were measured by ELISA. The values represent the mean \pm standard deviation, $n = 3$. Significant difference from control splenocytes: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

第二章 考察

本章では EPP による T 細胞群への直接的な影響について検討したが、CD8 陽性 T 細胞のみならず、CD4 陽性 T 細胞からのサイトカイン産生誘導作用を示さなかった。EPP には CD4 との結合能があるが、CD4 シグナルのみでは T 細胞の十分な活性化が誘導できなかつたと考えられる¹²⁴⁾。一方で、ポリクローナルマイトジェンである ConA は抗原提示細胞非依存的に T 細胞を活性化し得ることが知られていることから^{87, 125)}、EPP は ConA などのレクチンとは異なるメカニズムで免疫賦活性を示していると言える。また、種々の白血球を用いた検討の結果から、EPP 応答性の細胞ならびに非応答性の細胞が存在することが示され、PMA などの非特異的な白血球活性化剤とは異なることが確認された。

次に、EPP が正常マウスのみならず T 細胞ならびに B 細胞の欠損した SCID マウス由来脾臓細胞も同様に活性化したことから、T 細胞非依存性の経路が明確となり、さらに樹状細胞ならびにマクロファージなどの抗原提示細胞が EPP の免疫賦活活性に必要であることを明らかとした。また、BMC が EPP 応答性を示さなかつた一方で、BMDC から TNF- α 産生を誘導したことから、樹状細胞に発現する何らかの受容体が EPP の認識に関与する可能性が示唆され、同時に EPP が自然免疫活性化能を有する機能性分子であることが明らかとなった。

さらに、EPP により産生誘導される IFN- γ の産生メカニズムについて検討した。IFN- γ は NK 細胞ならびに CTL の活性化作用を持つため^{45, 46, 97, 98)}、機能性食品による腫瘍の治療および感染制御において重要な因子の一つである。IFN- γ は主に活性化された Th1 細胞から産生されるが、IFN- α および IFN- β などの I 型 IFN と共に働き、宿主のウイルス抵抗性を上昇させる¹²⁶⁾。また感染初期には抗原提示細胞、さらに NK 細胞も IFN- γ を産生し、自身および付近の細胞を活性化させる。また、マクロファージならびに樹状細胞から産生される IL-12 などの液性因子によっても IFN- γ 産生が誘導されることが知られている¹²⁷⁾。本章の検討で得られた結果から、活性化した抗原提示細胞と T 細胞との細胞間接着が、EPP による IFN- γ 産生を制御していることが明らかとなった。この際、強力な IFN- γ 誘導因子として知られる IL-12 が、EPP による IFN- γ 産生誘導に大きな影響を与えなかつた。他の様々な IFN- γ インデューサーが IL-12 の影響を受けていることが報告されていることから^{128, 129)}、IL-12 の影響を受けにくい IFN- γ 産生誘導効果は、EPP の免疫賦活剤としての特徴であると考えられる。

EPP によるサイトカイン産生誘導作用は、T 細胞と抗原提示細胞表面における相互作用により制御されていたが、GM-CSF と IFN- γ 産生については CTLA-4-Fc を

用いた実験結果より、抗原提示細胞の活性化に続いて生じる CD28 を介した T 細胞の活性化が得に重要であると考えられる。また、産生された IFN- γ は抗原提示細胞のさらなる活性化を誘導し、MHC 分子などの発現上昇を促すことが予想されるため¹³⁰⁾、リグニン類がワクチンアジュバントのような役割を果たす可能性も十分に考えられる。今後さらなる検討を続け、新たな機能性素材としての有効的な利用法の開発を期待したい。

本章の検討により、EPP がマクロファージならびに樹状細胞などの抗原提示細胞に対する強力な免疫刺激剤であることが示された。これまで、リグニンが抗ウイルス活性を示す機能性分子であることは知られていたが^{64, 65)}、さらに宿主の生体防御能の活性化作用も認められたため、直接ならびに間接的にウイルスに対して有効効果を示す可能性が示唆された。また、生体防御能の上昇はウイルス感染細胞のみならず、腫瘍細胞に対する応答性も上昇させると考えられ、抗腫瘍効果を期待した機能性分子としてリグニンを応用できる可能性が示された。第一章ならびに本章の検討により、(i) EPP はマクロファージならびに樹状細胞を直接活性化させ、(ii) 引き続きそれらの細胞が T 細胞を活性化させることで、さらに強力なサイトカイン産生を誘導する一連のメカニズムが明らかとなった (Figure 18)。

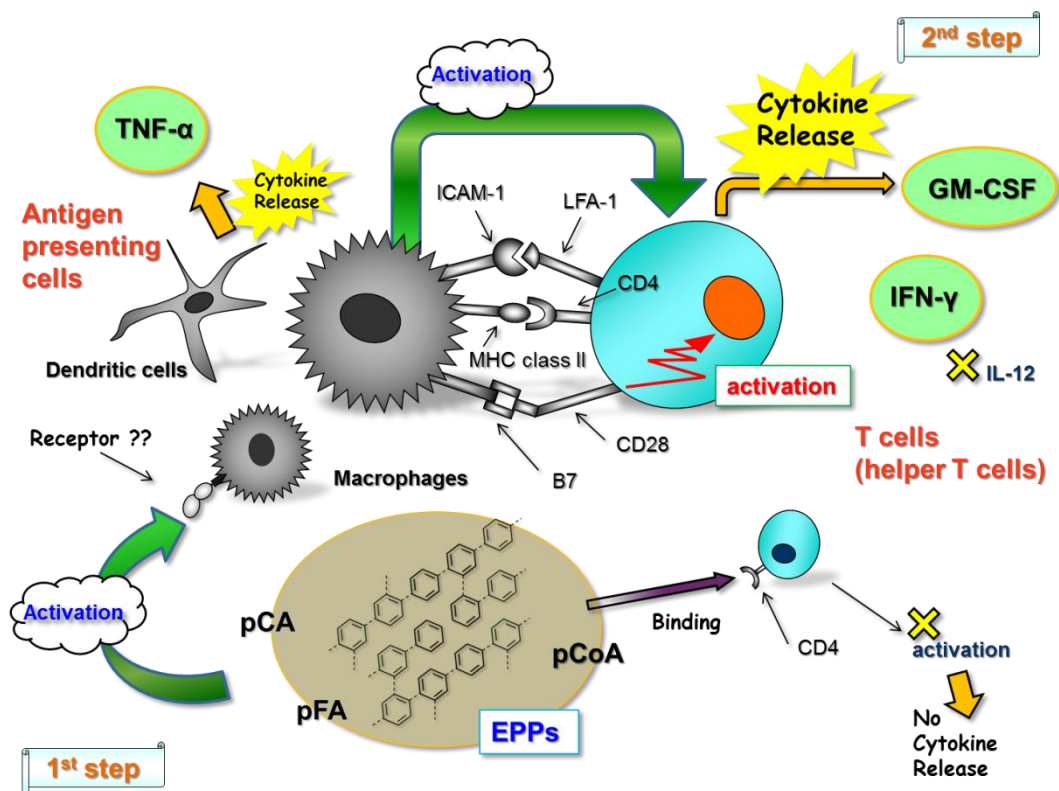


Figure 18. Proposed mechanisms of cytokine-inducing effect of EPP.

第三章 EPP の経口投与による抗腫瘍効果および NK 細胞活性化作用

EPP が抗原提示細胞と T 細胞の活性化を介して IFN- γ 産生を強力に誘導することが、第二章の検討により明らかとなった。IFN- γ の産生誘導能を持つ機能性食品由来分子、例えば fucose をベースとした硫酸多糖である fucoidan, あるいは β -glucan は経口投与により免疫賦活化ならびに抗腫瘍効果を示すことが知られている^{34, 131)}。これまで、純粋なリグニン類の経口投与による免疫賦活効果はほとんど報告が無く、科学的根拠は認められていなかった。しかし、EPP に IFN- γ 産生誘導能が認められたことから、著者は EPP の経口投与によっても全身性の免疫力を向上することで抗腫瘍効果を発揮できると考えた。

本章では、経口投与による EPP の免疫賦活効果の有無を明確にするため、CA ならびに pCA を用いて評価した。重合前後における CA の安全性を評価した後、担癌マウスへの経口投与による抗腫瘍効果、脾臓における免疫応答性について *in vivo* にて検討した。

第一節 酵素重合前後における CA の物性変化

食品由来の低分子フェノール性化合物の多くは強い抗酸化活性を有しており、抗酸化性はポリフェノールの重要な特徴の一つである。抗酸化物質の積極的な摂取により、循環器系疾患の予防効果が期待できることから¹³²⁾、抗酸化作用を有する機能性食品は応用価値が高いと考えられる。本研究で precursor として使用しているフェニルプロパノイド類も、他のポリフェノール性化合物と同様に抗酸化作用を有しており、過酸化脂質の生成防止作用、活性酸素による細胞膜酸化防止作用などが報告されている¹³³⁻¹³⁵⁾。しかし、酵素的脱水素重合による分子量ならびに構造の変化によって、抗酸化活性がどのように変化しているかは明確ではない。抗酸化物質の経口投与が、全身性の免疫システム¹³⁶⁾ ならびに担癌マウスにおける抗腫瘍効果¹³⁷⁾ に影響を与える可能性が報告されているため、CA ならびに pCA の抗酸化力を明確にしておく必要がある。そこで、本節では重合前後における CA の抗酸化活性を測定し、さらに pCA 中に CA が混在していないか、ゲル濾過クロマトグラフィーにより分子量分布を評価した。

1. CA, pCA の抗酸化活性

重合前後の CA の持つ抗酸化活性は、一般的な抗酸化能測定試験である DPPH 法⁷²⁾ と ABTS 法⁷³⁾ を用いて評価した。いずれも人工的な安定ラジカルに起因する色素を持つが、試験検体を加えた際に見られる退色のレベルを、ラジカル補足能として抗酸化活性評価に用いられている。また陽性コントロールとして Trolox を使用した。

DPPH 法において Trolox, CA, pCA はそれぞれ DPPH ラジカルを補足し、添加量の増加に伴い吸光度を減少させた (Figure 19A)。CA と pCA の抗酸化能には顕著な差が見られ、CA は 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度において吸光度のほとんど完全な消失が認められたが、pCA は 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においても完全には消失しなかった。また、ABTS 法を用いた評価においても同様の結果が得られ、CA は 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度において、pCA は 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度において吸光度の完全な消失が認められた (Figure 19B)。どちらの測定法においても、CA の抗酸化活性が Trolox よりも強力であるのに対し、pCA では Trolox より弱い抗酸化活性を示した。

本検討により、pCA の抗酸化作用は重合前の CA と比べて減少することが明らかとなった。しかし、pCA の抗酸化活性は完全には消失せず、一部保持されていることが確認された。

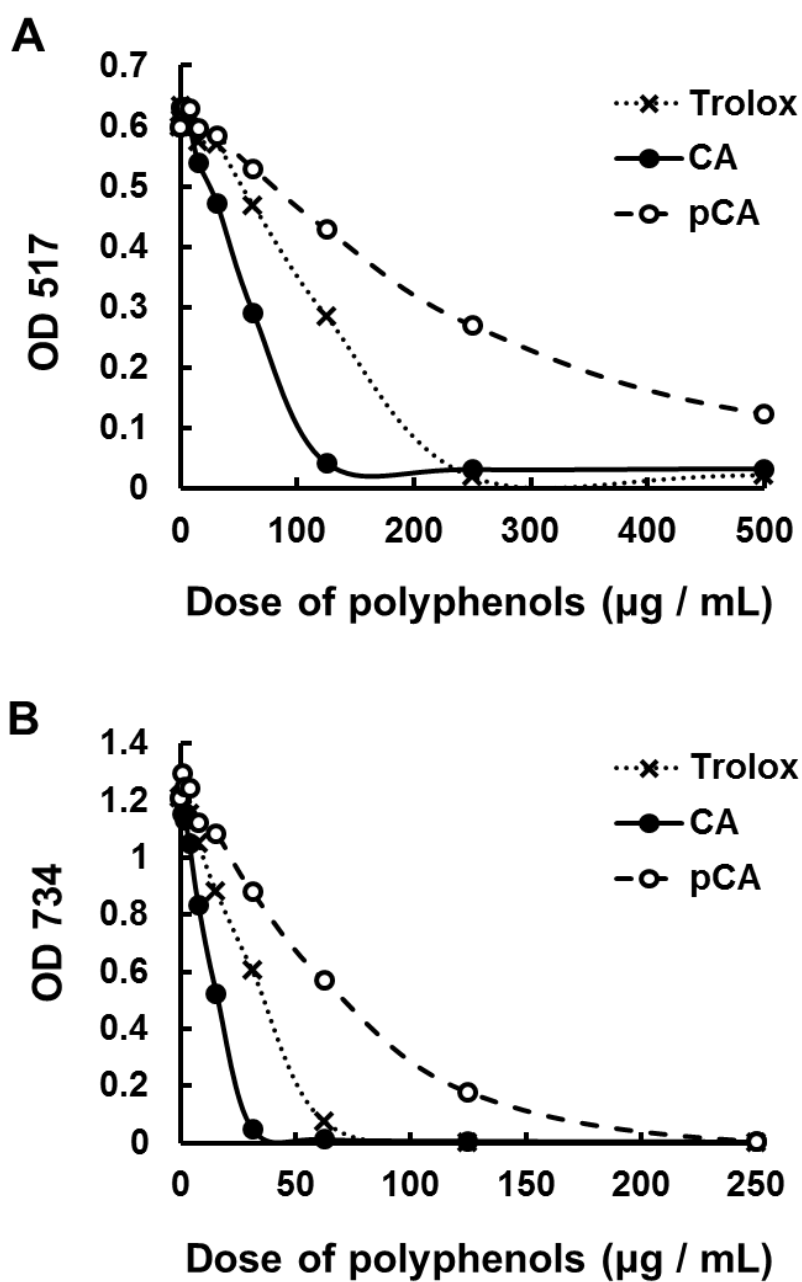


Figure 19. Antioxidative capacity of monomers and polymers of polyphenols.

The effect of polymerization on the antioxidative capacity of CA was measured by (A) DPPH radical-scavenging assay and (B) ABTS radical cation-decolorization assay. Solid line represents CA and the dashed line represents the pCA. Trolox was used as a control for antioxidative activity (dotted line).

2. CA, pCA の分子量分布

pCA と CA の経口投与による生物活性を評価するにあたり, 何らかの原因で pCA 中に CA が混在していた場合, 正確な評価を行うことは困難となる. そこで, 重合前後の CA の分子量分布について, ゲルろ過クロマトグラフィーを利用して評価した.

CA または pCA を尿素アセトン溶液に溶解し (5 mg/mL), 200 μ L を尿素アセトン溶液で平衡化した Toyopearl HW-60F column にアプライ後, 同溶液を溶出液としてオープンカラムクロマトグラフィーを行った. 各フラクションに 500 μ L ずつ溶出液を回収し, フェノール性水酸基を Folin-Ciocalteu 法⁷⁴⁾ を用いて検出した.

CA は 46 本目のフラクションにおいてピークが確認されたのに対し, pCA は 33 本目のフラクションがピークを示した (Figure 20). また, pCA が 29–41 本目のフラクションに検出されたのに対し, CA は 41–54 本目のフラクションに検出された.

尿素アセトン溶液に適した分子量スタンダードが得られなかったため, 具体的な推定分子量は不明であるが, pCA はある程度集束された分子量分布を示した. また, CA ならびに pCA は明瞭に分離されたことから, pCA 作製中における単量体 CA の残存, あるいは保存段階における CA への分解が生じていないことが確認された.

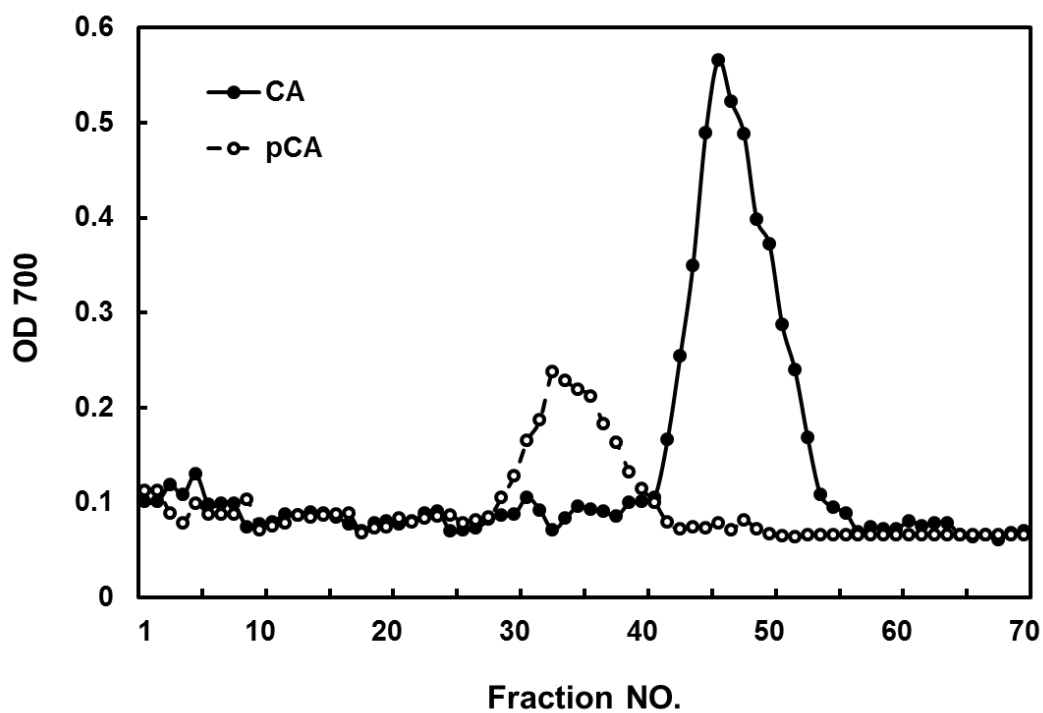


Figure 20. Molecular weight distribution of caffeic acid monomers and polymers. Molecular weight distributions were determined by gel-filtration chromatography using Toyopearl HW-60F column. Solid lines represent CA and dashed lines represent pCA. Eluted phenolic compounds were measured using the Folin-Ciocalteu method.

第二節 CA, pCA の安全性評価

機能性食品としてリグニン類を応用するために、リグニン類の安全性について確認する必要がある。我々が普段摂取している植物性食品には、一定量リグニン類が含まれているため、基本的には安全であると考えられるが、純粋な合成リグニン類の経口投与における安全性についても実証すべきである。そこで本節では重合前後における CA の変異原性の有無、またマウスに経口投与した際の早期急性毒性について検討した。

1. 細菌を用いた CA, pCA の変異原性試験

CA ならびに pCA が変異原性を示すか否か、細菌を用いた DNA 修復試験である *umu* 試験を利用して評価した。*umu* 試験は DNA の損傷に応じて誘導される *umu* 遺伝子の発現を、人工的に融合された β -galactosidase 発現遺伝子により産生される β -galactosidase 活性を、酵素発色基質でモニターする試験である¹³⁸⁾。肝代謝後における変異原性についても同様に評価するため、肝臓の抽出物に補酵素を加えた S9 Mix の存在・非存在下にて試験を実施した。

CA および pCA は 15.3 ng/mL から 64 mg/mL までの濃度で水あるいは 10% DMSO に溶解・懸濁し、S9 Mix の存在・非存在下にてそれぞれサルモネラ菌 NM2009 株と混合・振盪培養後に誘導された β -galactosidase の活性を、DNA 損傷レベルの指標として評価した。また、 β -galactosidase 活性がバックグラウンドの 2 倍を超える場合を陽性結果として判定した。

S9 Mix の非存在下において、CA ならびに pCA はいずれの濃度においても β -galactosidase 活性の強い増強を誘導しなかった (Figure 21)。一方、S9 Mix の存在下において、CA は 250 μ g/mL の濃度から β -galactosidase 活性を緩やかに増強させ、2000 μ g/mL の濃度で β -galactosidase 活性がバックグラウンドの 2 倍を僅かに超えたため、陽性結果を示した。pCA も S9 Mix の存在下において同様に、1000 μ g/mL の濃度から β -galactosidase 活性を緩やかに上昇させたが、4000 μ g/mL の濃度においてピークを示し、その後減少した。ピークにおける β -galactosidase 活性は、バックグラウンドの 2 倍に満たないため、pCA は変異原性を示さないことが明らかとなった。

本検討により、pCA の変異原性は S9 Mix の存在・非存在下において認められず、CA と比較して安全性が高いことが示唆された。

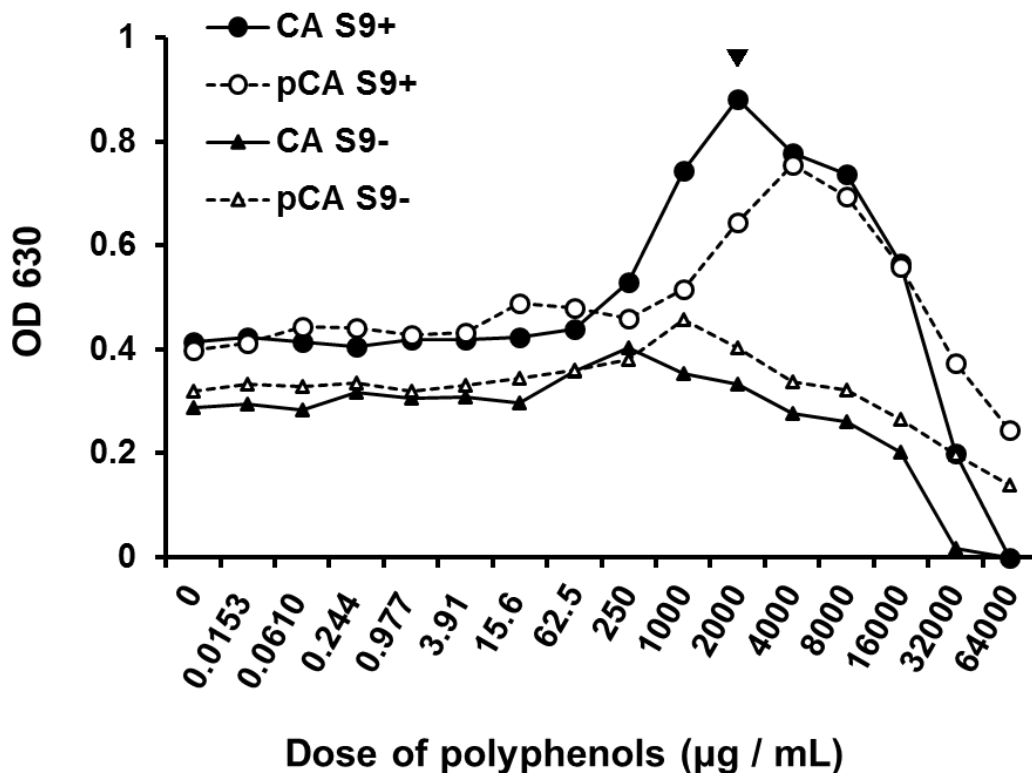


Figure 21. Mutagenic activity of caffeic acid monomers and polymers.

The mutagenic activity of caffeic acid monomers and polymers was determined by *umu* assay. Various concentrations of CA or pCA were mixed with *Salmonella* Typhimurium in the presence or absence of S9mix. The vertical axis represents cellular β -galactosidase activity as an indicator of DNA damage during incubation (with shaking) at 37°C for 2 h. Solid lines represent monomeric CA and dashed lines represent pCA. ▼: The minimal concentration for a positive result.

2. 経口投与における CA, pCA の摂取量とマウスの体重変化

CA ならびに pCA の水溶液を実際にマウスに経口投与し, 摂取量ならびに投与初期段階におけるマウスの体重変化を調査した.

重合前後の CA は DIW に溶解し (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 高圧蒸気滅菌後に逆流防止弁の付いた給水パックに充填した. 飼育ケージにセットし, 自由飲水の形式で DBA/2 マウスに経口摂取させた. コントロールとして, DIW を同様に処理したものを使用した.

マウス 1 匹あたりの飲料水摂取量を算出したところ, 1 日およそ 3-4 g 摂取していることが確認された. また, 14 日間における水, CA, pCA の総摂取量に大きな差は認められなかった (Figure 22A and B). さらに, 重合前後の CA の経口投与期間中に急激な体重減少は認められず, 短期投与における重篤な有害作用は確認されなかった (Figure 22C).

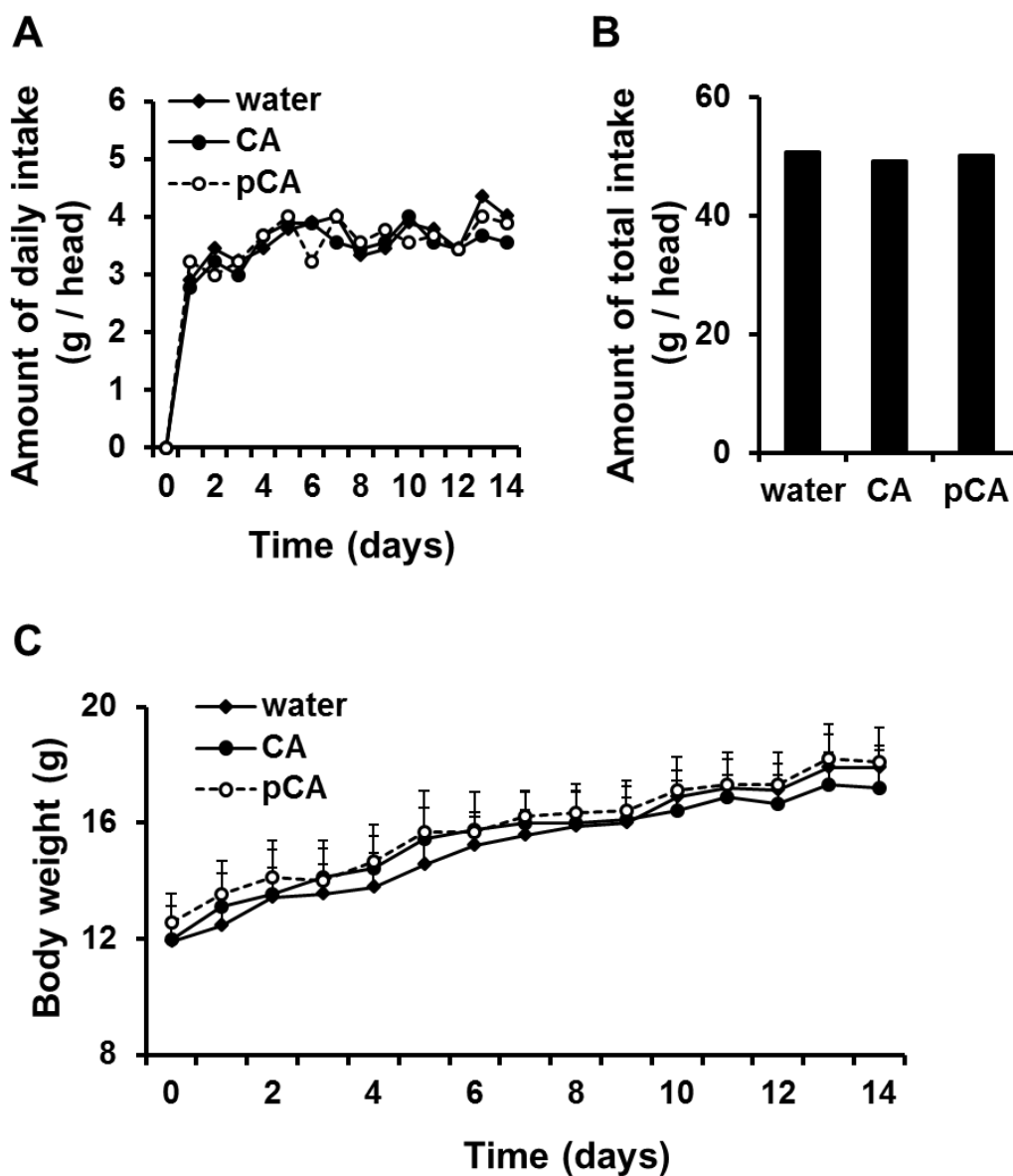


Figure 22. Safety studies for oral administration of caffeic acid monomers and polymers.

CA or pCA dissolved in distilled water (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were administered *ad libitum* daily with drinking water to 4-week-old DBA/2 mice for 14 d. The amount of (A) daily and (B) total polyphenol intake and (C) changes in body weight of mice were measured every 24 h. The values represent the mean \pm standard deviation, $n = 9$.

第三節 CA, pCA の経口投与による抗腫瘍効果

免疫賦活活性を持つ機能性食品の生体評価として、マウスに腫瘍細胞を移植した際の腫瘍の増殖レベルを指標とした試験が汎用されている³⁴⁾。また、天然物由来低分子化合物による抗腫瘍効果の評価としては、*in vitro*における細胞への直接的な傷害性の評価方法が汎用されている¹³⁹⁾。本節ではCAならびにpCAの経口投与による抗腫瘍効果、および*in vitro*における腫瘍細胞の増殖抑制効果について評価した。

1. *in vivo*におけるCA, pCAの経口投与による腫瘍増殖抑制効果

本検討には、移植用の腫瘍細胞としてDBA/2マウスに由来する肥満細胞腫であるP815細胞を使用した。P815は同系マウスに移植すると致死的に増殖してしまうため¹⁴⁰⁾、今回は接着分子の1種であるCD80(B7-1)の遺伝子をトランスジェニックしたB7-P815を用いた。B7-P815はハイグロマイシンを加えた選択培地で維持培養し、B7-1の発現はPE標識anti-CD80 mAbを用いてFACS解析により確認した(Figure 23A)。

CAおよびpCAを500 µg/mLの濃度でDIWに溶解し、高圧蒸気滅菌後、DBA/2マウスに自由飲水の形式で、試験終了日まで連日経口摂取させた。経口摂取から9日後、B7-P815細胞をマウス右側の鼠蹊部に皮下移植法により投与した(Day 0)。腫瘍サイズはノギスを用いて3日ごとに計測を行い、腫瘍移植日から21日後にマウスを屠殺し、腫瘍重量を測定した。陽性抗腫瘍コントロール群にはDay 7にcyclophosphamide (CY)を腹腔内に単回投与した。

CA, pCA, ならびにCY投与群は、コントロール群と比較して有意な腫瘍サイズの減少が認められた(Figure 23B)。またpCAおよびCY投与群では、マウスから摘出した腫瘍の重量においても同様に有意な減少を示した。これらの結果により、CAならびにpCAの経口摂取によってマウス生体内でのB7-P815細胞の増殖を抑制できることが明らかとなった。

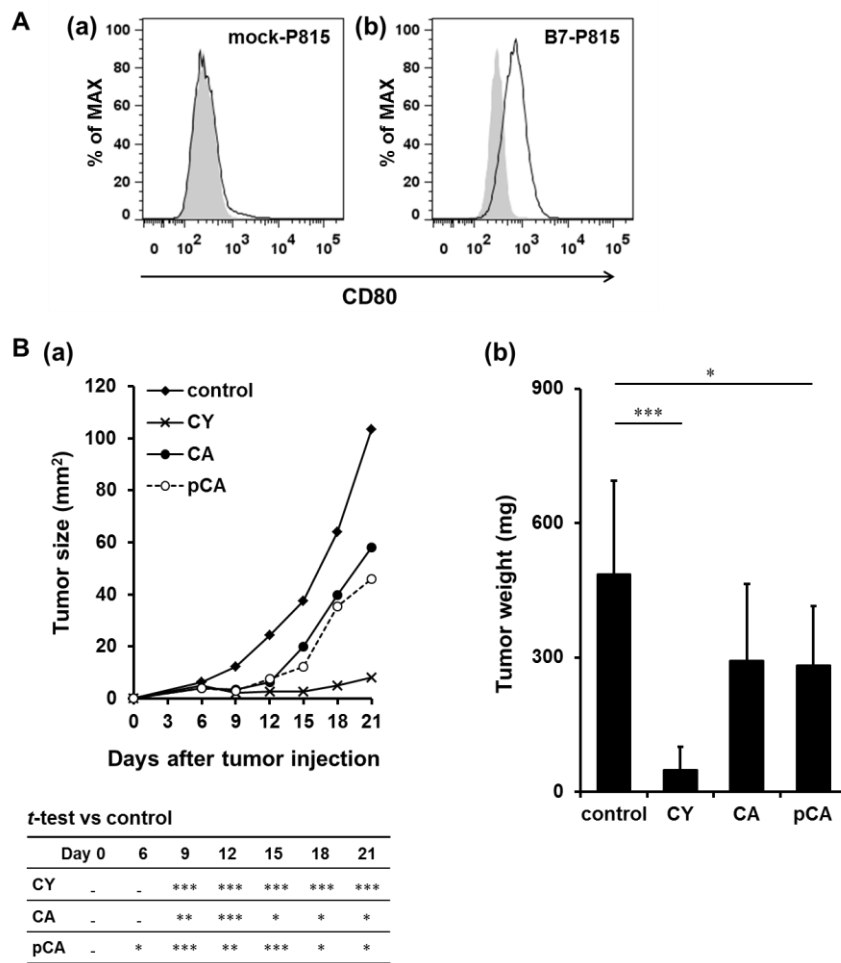


Figure 23. Tumor inhibitory effect of orally administered caffeic acids.

(A) Transfected P815 cells were pre-treated with Fc block and incubated with anti-CD80-PE or isotype-matched IgG. Cell surface expression of B7-1 (CD80) on (a) mock-P815 and (b) CD80-transfected P815 was confirmed by FACS. Grey shading represents cells with the control antibody; black lines represent cells with the functional antibody. The data shown are representative of 3 independent experiments. (B) CA or pCA dissolved in distilled water (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were administered *ad libitum* daily with drinking water to 4-week-old DBA/2 mice from 9 d before tumor inoculation. B7-P815 cells (5×10^5 cells/50 μL) were s.c. inoculated into the right groin of DBA/2 mice on d 0. CAs were further administered *ad libitum* till d 21. Cyclophosphamide (CY) was administered i.p. on d 7 as a positive control for tumor growth inhibition. (a) Tumor sizes estimated once every 3 d are shown in mm^2 . (b) Tumor weight (mg) estimated on d 21. The values shown are the mean \pm standard deviation, $n = 8$. Significant differences from control mice: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

2. *in vitro* における腫瘍細胞増殖に対する CA, pCA の影響

CA および pCA の *in vivo* における腫瘍細胞増殖抑制効果のメカニズムを検討するため、B7-P815 の *in vitro* における細胞増殖に対する直接的な作用を評価した。B7-P815 に重合前後の CA を添加し、24 時間後の細胞数を MTT 法により測定した。

pCA は 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度まで B7-P815 の増殖に影響を与えなかった (Figure 24)。一方、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度の CA の添加により細胞増殖の有意な抑制効果が認められた。

この結果から、CA には B7-P815 に対する直接的な細胞傷害性があるが、酵素的脱水素反応を起こすことによって直接的な増殖抑制作用が著しく減弱することが明らかとなった。

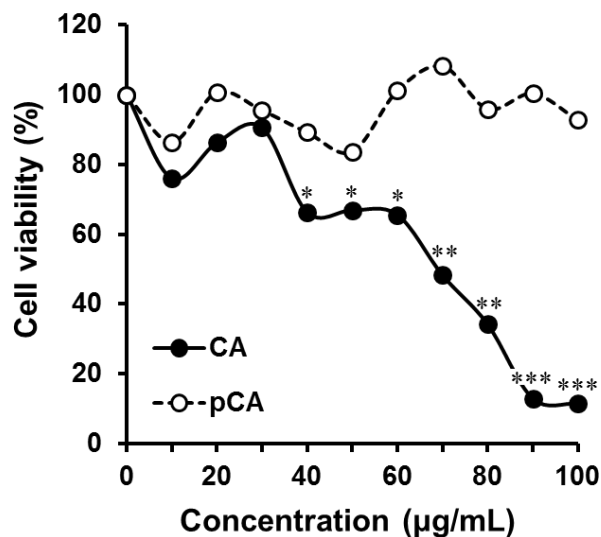


Figure 24. Effect of caffeic acids on B7-P815 cell growth *in vitro*.

Direct effect of CAs on the growth of B7-P815 cells was examined *in vitro*. B7-P815 cells were stimulated with monomers (CA) or polymers (pCA) of CA (0–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$); triplicate samples were used. After 24 h, relative numbers of living cells were estimated using the MTT assay. The vertical axis shows the percentage of living B7-P815 cells, calculated as a ratio of the untreated cells ($n = 3$). The data shown are representative of 3 independent experiments. Significant differences from untreated cells (absorbance): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

第四節 CA, pCA の経口投与による免疫系に対する影響

pCA は腫瘍に対する直接毒性を示さなかったことから, 経口投与による pCA の自然免疫増強作用について検討することとした. 本節では重合前後の CA の経口投与が免疫応答性に与える影響について, 脾臓における IFN- γ 産生能ならびに NK 細胞活性を指標として評価した.

1. CA, pCA の経口投与による脾臓細胞数と T 細胞分布への影響

初めに, CA ならびに pCA の経口投与による脾臓細胞数の変化, ならびに T 細胞ポピュレーションの変化について解析した.

CA および pCA を 500 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で DIW に溶解し, 高圧蒸気滅菌後, C3H/HeN マウスに自由飲水の形式で 10 日間連続経口摂取させた. 各マウスから脾臓細胞を調整後, トリパンブルー染色し, 生細胞数を顕微鏡下でカウントした. また, CD3e 陽性細胞, CD4 陽性 T 細胞, CD8a 陽性 T 細胞の割合を FACS 解析により算出した.

コントロール水投与群における脾臓細胞総数は $28.8 (\pm 13.2) \times 10^6$ cells/head, CA 群では $32.5 (\pm 10.4) \times 10^6$ cells/head, pCA 群では $29.6 (\pm 9.1) \times 10^6$ cells/head であり, 各群間で有意な差は認められなかった (Figure 25A). また, 各群の T 細胞の割合について FACS で解析したところ, 差は認められなかった (Figure 25B). また T 細胞のうち, CD4 陽性細胞と CD8a 陽性細胞の割合についても差は認められなかった.

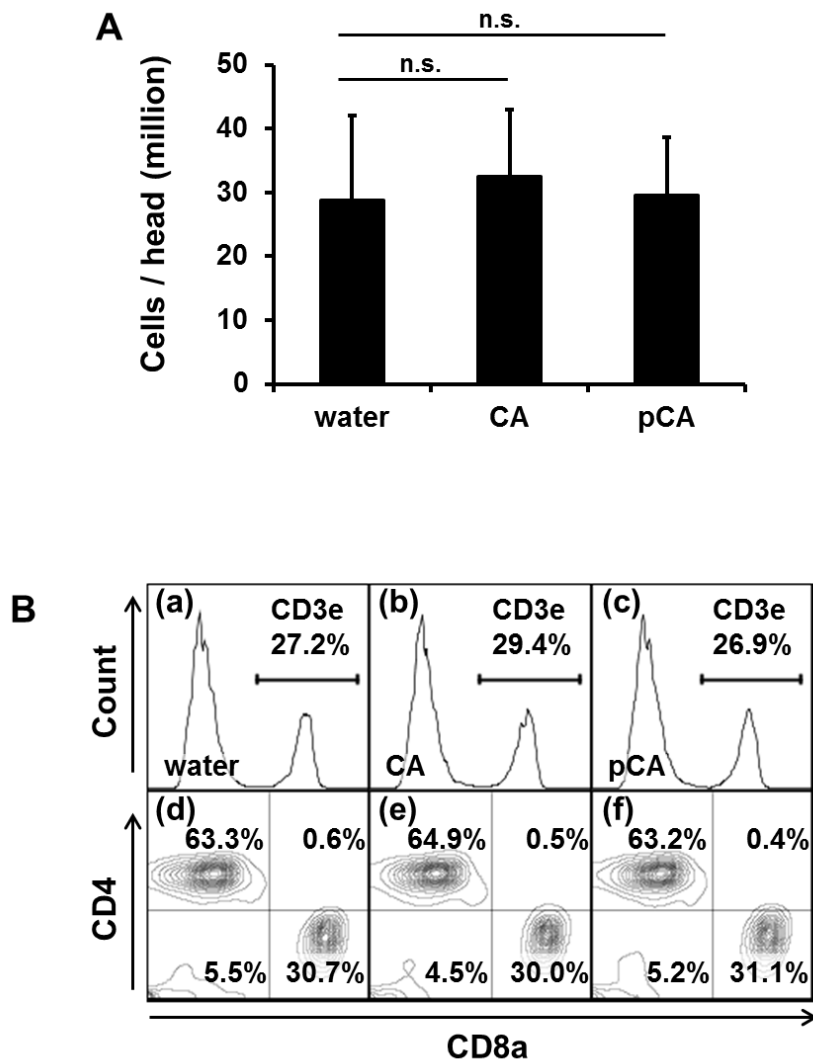


Figure 25. T cell populations in splenocytes from mice administered CA and pCA.

Splenocytes were isolated from 6-week-old C3H/HeN mice administered CA or pCA in drinking water (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) *ad libitum* for 10 d. (A) Total numbers of viable cells in the splenocytes cultures were determined using trypan blue and a cell-counting kit. (B) Fresh splenocytes from mice that had ingested (a, d) water, (b, e) CA, or (c, f) pCA were pre-treated with Fc block and incubated with a mixture of anti-CD3e-APC, anti-CD4-FITC, and anti-CD8a-PE, and T cell populations were estimated by FACS. CD3e-positive cells in splenocytes were gated (a to c) and further analyzed for CD4-positive and CD8a-positive cells (d to f). The data shown are representative of 3 independent experiments.

2. CA, pCA の経口投与による脾臓細胞のサイトカイン産生能への影響

CA ならびに pCA を経口摂取させたマウス脾臓細胞を PMA と ionomycin で刺激し、産生されるサイトカイン量を指標に検討した。

CA および pCA 溶解液 (500 µg/mL) を 10 日間連続経口摂取させた C3H/HeN マウスの脾臓細胞を、生理食塩水あるいは PMA と ionomycin で刺激し、48 時間後に産生される IFN- γ , TNF- α , IL-6, ならびに IL-17A の濃度を ELISA 法にて測定した。

コントロール水, CA, pCA 投与群の脾臓細胞は、生理食塩水添加時にはサイトカインがほとんど産生されなかった (Figure 26)。一方、PMA と ionomycin で刺激した場合、IFN- γ 産生において、pCA の摂取により IFN- γ 産生能が有意に上昇することが明らかとなった。他のサイトカインでも、同様の上昇傾向が見られた。一方、CA 投与群では、PMA と ionomycin 刺激により誘導されるサイトカイン産生量に有意な差は認められなかった。

これらの結果から、pCA の経口摂取によってマウス脾臓細胞における IFN- γ 産生能を増強できることが明らかとなった。

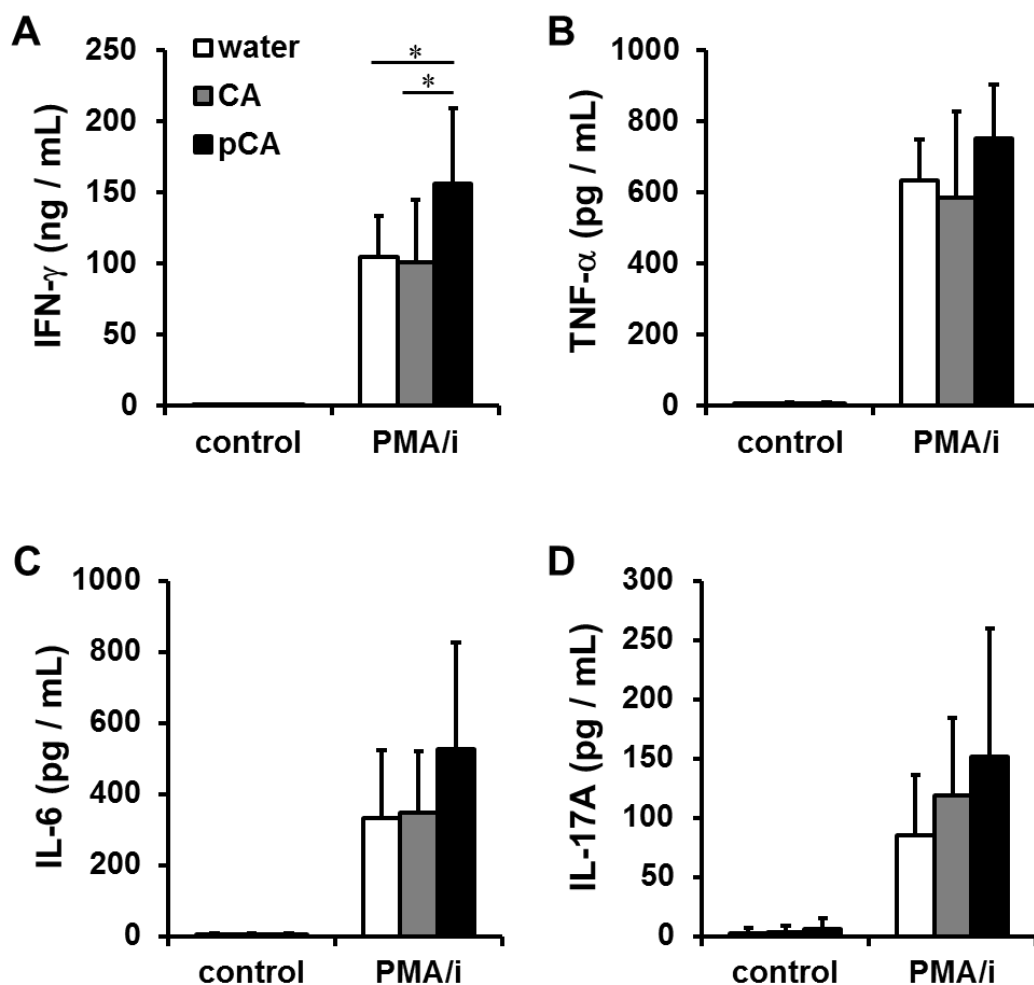


Figure 26. Immunomodulating effect of caffeic acid polymers.

Splenocytes were isolated from 6-week-old C3H/HeN mice administered CA or pCA in drinking water (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) *ad libitum* for 10 d. Cells (4×10^6 cells/mL) in 96-well culture plates (250 $\mu\text{L}/\text{well}$) were treated with saline (control) or a combination of PMA (20 ng/mL) and ionomycin (1 μM) (PMA/i). After 48 h, supernatants were collected to measure the concentrations of cytokines using ELISA; (A) IFN- γ , (B) TNF- α , (C) IL-6, and (D) IL-17A. The values represent the mean \pm standard deviation, $n = 9$. Significantly different from water-administered mice: * $p < 0.05$; n.s.: not significant.

3. CA, pCA の経口投与による NK 細胞活性への影響

NK 細胞は多くの腫瘍細胞ならびにウイルス感染細胞を攻撃することから、腫瘍細胞増殖抑制に関わる重要な生体機能の一つとして知られている¹⁴⁾。C3H/HeN マウスに CA および pCA 溶解液 (500 µg/mL) を 14 日間連続経口摂取させ、脾臓細胞を NK 細胞特異的なターゲット細胞である YAC-1 と共培養することで、脾臓における NK 細胞活性を測定した。

脾臓細胞 (2 or 4×10^6 cells/mL) と PKH-26 で生細胞染色した YAC-1 細胞を (4×10^4 cells/mL) を共培養し、24 時間後、TP3 を加えて死細胞を染色し、フローサイトメトリーによる生細胞ならびに死細胞の解析を行った。細胞傷害性は PKH-26 陽性細胞 (YAC-1 細胞) 中の死細胞の割合として%で示した。

コントロール水投与群と比較し、CA 投与群では NK 細胞活性の変動は見られなかった (Figure 27)。一方、pCA 投与群では NK 細胞活性が上昇した。また、いずれの投与でも NK 細胞の割合に差は認められなかった (data not shown)。

これらの結果から、pCA の経口摂取によりマウス脾臓細胞における NK 細胞の活性化を誘導できることが明らかとなった。

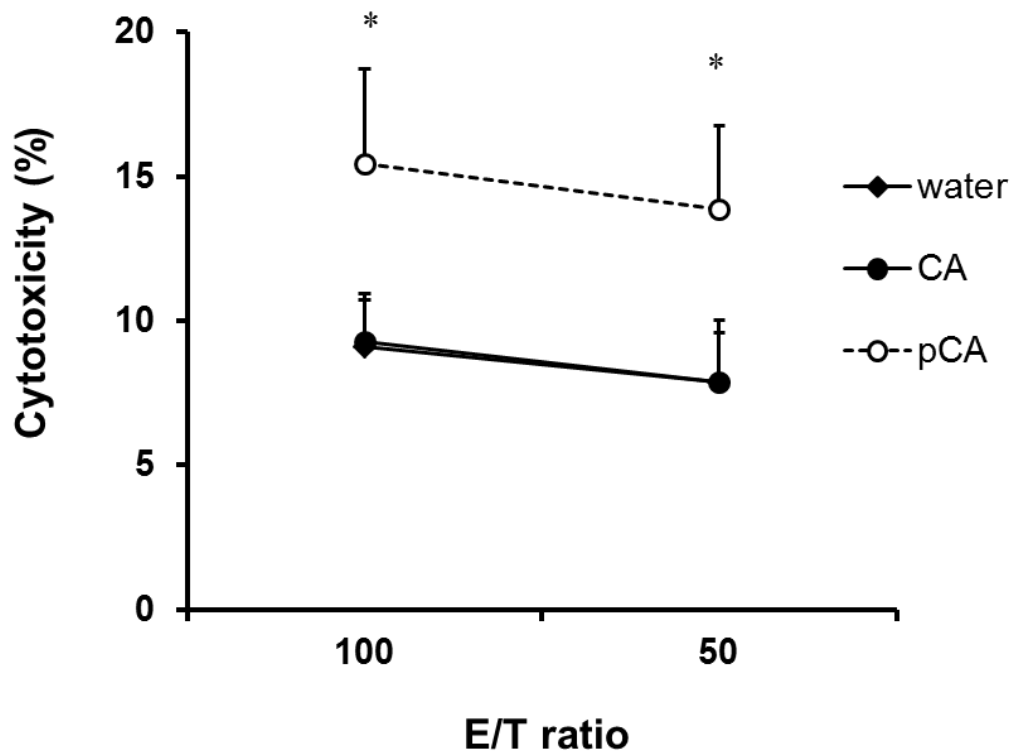


Figure 27. Enhancement of NK activity by polymerized caffeic acid.

Splenocytes were isolated from 7-week-old C3H/HeN mice administered CA or pCA in drinking water (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) *ad libitum* for 14 d. PKH-26-labeled YAC-1 targets and splenocytes as effector cells were co-incubated in 24-well culture plates (1 mL/well) for 24 h (effector cell to target cell ratio = 100 : 1 or 50 : 1). Viability of the target cells was assessed based on TP3 uptake by using FACS. Columns represent the specific percentages of cell death. The data shown are representative of 3 independent experiments. The values shown are mean \pm standard deviation, n = 3. Significantly different from water-administered mice: * $p < 0.05$.

第五節 CA, pCA の代謝, 吸収および排泄

pCA の経口摂取後に消化酵素の影響を受けて, 単体の CA が産生されている可能性について検討するため, 本節では CA ならびに pCA の吸収, 分解および代謝について追及した.

1. CA, pCA の糞中への排泄率評価

CA はコーヒーをはじめ様々な食品に含まれていることから, その吸収および代謝について詳しく解析されている. Omar らは, Sprague-Dawley ラットに CA を経口摂取させると, 約 1 時間後には血中に移行し, その後多くが尿中に排泄されることを報告している⁷⁵⁾. CA ならびに pCA の経口摂取後にそれぞれ糞中に排泄される量を確認するために, 断食させた DBA/2 マウスにコントロール水, CA, pCA をそれぞれ自由飲水の形式で摂取させ, 糞中に残存するポリフェノール量を Folin-Ciocalteu 法⁷⁴⁾ を用いて測定した.

飲料水としてセットした CA (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ならびに pCA (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に含まれる総ポリフェノール量は, pCA と比較して CA が約 5.8 倍多く示された (Figure 28A). 一方, 糞中に含まれる総ポリフェノール量は CA, pCA 共にコントロール水投与群と比べて有意に増加した (Figure 28B). また, 糞中に排泄されたポリフェノール量を飲料水中のポリフェノール量で除して重量換算すると, 糞中排泄量は CA と比較して pCA は約 6.2 倍多く糞中に排泄されていた (Figure 28C). 以上の結果から, pCA は CA と比べて吸収レベルが低いことが示された.

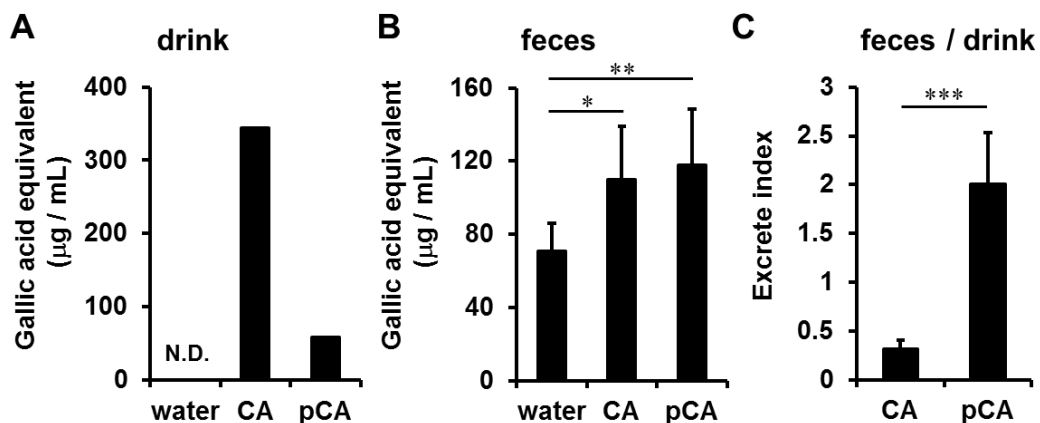


Figure 28. Measurement of excreted monomers and polymers of caffeic acid in feces. Total phenolic content in (A) drinking water containing CA monomers (CA) or polymers (pCA) and (B) extracts of feces collected from water-, CA- or pCA-administered DBA/2 mice was determined using Folin-Ciocalteu method and is shown in gallic-acid equivalents; (C) the excretion index calculated as the phenolic content in feces/drinking water. The values represent mean \pm standard deviation, n = 6. Significant difference (B) between CA or pCA and water or (C) between CA and pCA: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. N.D.: not detected.

2. pCA の経口投与後における CA への分解性評価

経口投与した pCA が CA まで分解された後に生体内に吸収されているかどうか、尿中に排出される CA 単量体を検出することで評価した。

CA および pCA を 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で DIW に溶解し、高圧蒸気滅菌後、断食させた DBA/2 マウスに自由飲水の形式で 2 日間連続経口摂取させた。各マウスから尿を採取し、尿中に存在する CA 単量体を LC/MS を用いて検出した。

CA 標準品は、インジェクションから約 17.5 分後にピークとして検出された (Figure 29A)。このピークは CA 投与群では認められたが、コントロール水投与群および pCA 投与群の尿中からは検出されなかった (Figure 29B–C)。また、サンプルインジェクションから 17.5 分後の CA 標準品ならびに CA 投与群の尿中には、それぞれイオン化した CA を示す m/z 179 のスペクトルと、そのプロダクトイオンである m/z 135 のスペクトルが確認された (Figure 29E and F)。

これらの結果から、pCA は体内で単量体 CA に分解される可能性は低いことが示唆された。

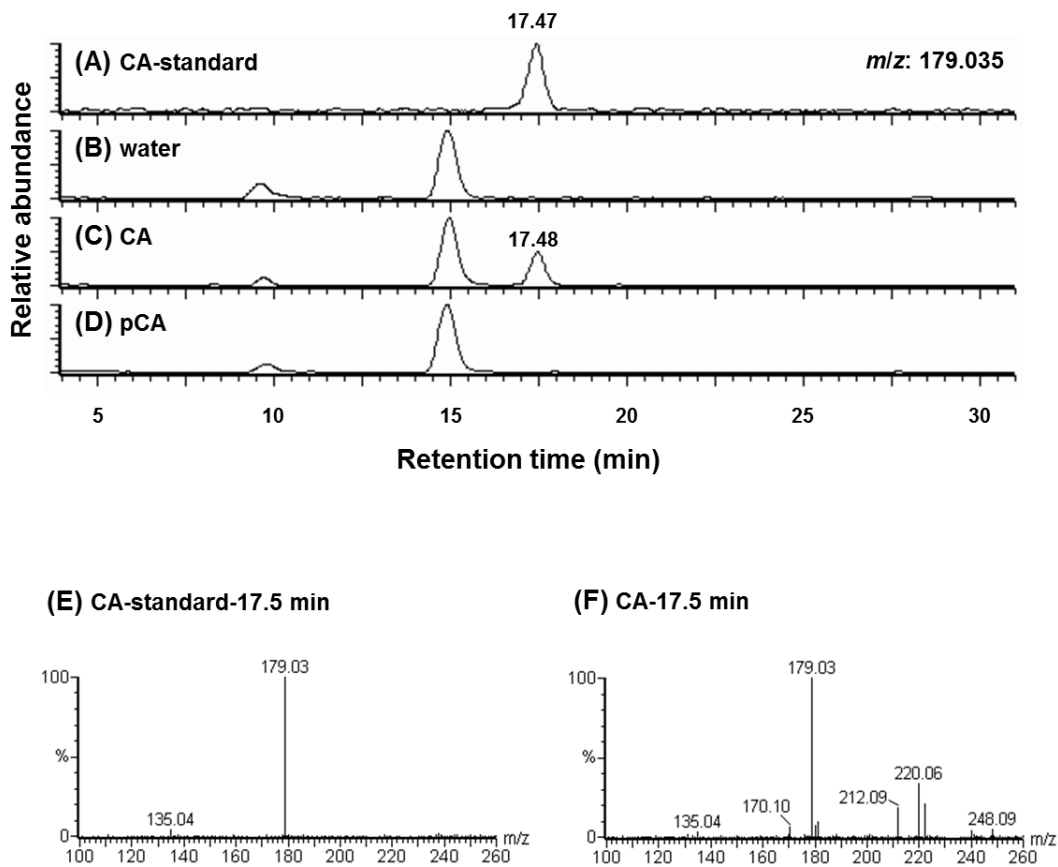


Figure 29. Detection of urinary excreted monomeric caffeic acid.

LC/MS chromatograms showing the peaks from m/z 179.0345 (179.035) in (A) standard CA solution or urine samples obtained from (B) water-, (C) CA-, or (D) pCA-administered DBA/2 mice. Molecular ion $[M-H]^-$ peaks detected at approximately 17.5 min at m/z 179.03 were identified as monomeric CA. Ion-fragmentation patterns of these peaks from (E) standard CA solution and (F) urine from CA-administered mice are displayed and represent the corresponding mass numbers of CA (precursor ion by MS spectra: 179; product ion by MS spectra: 135).

第三章 考察

本章では, EPP が経口投与によって担癌マウスにおける腫瘍の増殖を抑制できることを示した. さらに pCA の免疫賦活活性について検討し, マウス脾臓細胞における IFN- γ 産生能ならびに NK 細胞活性を上昇させることを証明した. 脾臓の総細胞数および T 細胞, NK 細胞のポピュレーションに変化が認められなかったことから, pCA はリンパ球の機能に対して影響を及ぼしたと考えられる. また, pCA に抗酸化活性が認められたことから, 免疫賦活効果のみならず, 抗酸化作用も同様に EPP の有益な薬理効果の一つと言える.

安全性試験において単量体 CA はサルモネラ菌に対して弱いながらも変異原性を示したが, 重合することによりその変異原性は減少した. pCA は S9 Mix で処理した場合のみ β -galactosidase 活性を僅かに上昇させたが, 経口摂取した pCA の吸収効率は単量体 CA よりも低いことが示されているため, CA に比べて肝臓での代謝は受けにくいと言える. 従って, pCA の経口摂取が示す変異原性は CA の経口摂取に比べて大幅に低下するものと考えられる.

T 細胞における CD28 シグナルは腫瘍の排除に重要な役割を果たし, 腫瘍細胞に発現する B7 分子は, 腫瘍免疫の形成を促進することが知られている¹⁴²⁾. 本研究では pCA の経口投与により宿主の IFN- γ 産生能ならびに NK 細胞活性と言った免疫システムを上昇させ, さらに担癌マウスにおける B7-P815 肥満細胞腫の進行を抑制することができた. pCA は CA と比較して, 糞中への排泄率が高かったことから, 腸管における GALT との接触により白血球を活性化させることで全身性の免疫システムを上昇させ, 抗腫瘍効果を誘導した可能性が考えられる. また, P815 表面の B7 の発現は T 細胞応答性の抗腫瘍効果を増強させること¹⁴³⁾, リグニン様ポリフェノールが IFN- γ 産生を誘導し, T 細胞を活性化できることから⁶²⁾, pCA の経口摂取による抗腫瘍効果は NK 細胞のみならず, T 細胞によっても同様に制御されていた可能性がある. さらに, 本章における検討では pCA のみを使用した, IFN- γ 産生誘導能は他の EPP においても同様に認められていることから, それぞれの EPP も同様に経口投与によって全身性の免疫システムの活性化を誘導できると考えられる. 一方, CA は宿主の免疫システムに顕著な影響を与えなかったが, *in vivo* ならびに *in vitro* において腫瘍細胞の増殖抑制効果を示した. 経口投与において単量体 CA は血中移行性を示したことから, 担癌マウスにおける腫瘍細胞と CA の接触が生じていた可能性は十分に考えられる. CA が B7-P815 に対して直接の細胞毒性を示したことから, 少なくとも部分的には, 直接毒性による腫瘍の抑制効果が誘導されたと考えられる. さらに, pCA と比べて CA の抗酸化活性が高いこと, 血中を移行して腫瘍細胞と接触できる可能性から, CA の抗酸化性に依存する抗腫

瘍効果も同様に関与していたことが考えられる^{137, 144)}. さらに, ゲル濾過クロマトグラフィーの結果, pCA 中には単量体 CA が混在せず, さらに LC/MS の結果 pCA 経口投与後のマウス尿中に CA が検出されなかったことから, pCA が CA まで分解された可能性は低い. 従って, CA と pCA が示す抗腫瘍効果は異なったメカニズムによってそれぞれ誘導されていると考えられる (Figure 30).

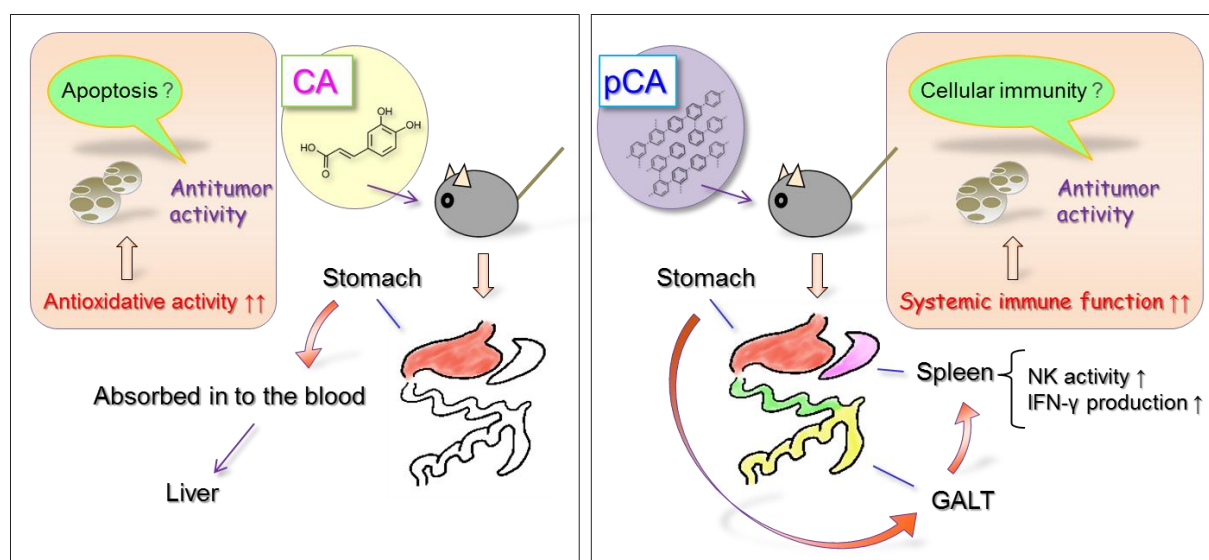


Figure 30. Hypothesized mechanisms of antitumor effect of orally administered caffeic acids.

Bernardshaw ならびに Iwabuchi は, 免疫刺激活性を有する機能性食品が, 感染症の症状改善効果があることを報告している^{145, 146)}. 本研究において, pCA の経口投与後の脾臓における IL-6, TNF- α , ならびに IL-17A の産生能は上昇傾向を示した. これらのサイトカインはいずれも感染症において重要な役割を示すことから¹⁴⁷⁻¹⁴⁹⁾, リグニン類は腫瘍免疫のみならず, 感染感染防御機能も向上させている可能性が高い.

単量体 CA の生物活性研究は古くから行われているため, 現在では様々な薬理効果について解明されている¹⁵⁰⁾. 一方, 重合した CA の生物活性については, 未だ不明な点が多いため, 今後もさらなる検討が必要である. 本研究により, pCA の経口投与による免疫賦活効果の一端を示すことが出来た. 単量体, 重合体共に, 人々に有益な生物活性を有しているため, 利用目的に合った使用方法を選択することで, 健康維持に有用であると考えられる.

総括

リグニン類は天然高分子ポリフェノールの 1 種であり、多くの植物性食品に含まれている。さらに、フェノール性低分子化合物はポリフェノールオキシダーゼおよびペルオキシダーゼの影響を受けて容易に重合するため、人々は食事により日常的に高分子ポリフェノールを摂取していると言える。低分子量フェノール性化合物の示す薬理効果の解明は著しい発展を遂げているが、高分子ポリフェノール類の生物活性は未だ不明な点が多数残されている。高分子フラボノイド類は肥満ならびに糖尿病などの生活習慣病に対する効果が、リグニン類においても抗ウイルス効果などの作用が明らかとされているが、免疫系への影響についてはほとんど解析されていなかった。本研究では、酵素重合したリグニン様高分子ポリフェノール類の免疫調整作用メカニズムの解明ならびに機能性食品としての新規利用法の開発を目指し、EPP を用いて *in vitro* および *in vivo* における検討を行い、以下の知見を得た。

第一章では、フェニルプロパノイド類と HRP を用いて 3 種類の EPP を作製し、マウス脾臓細胞における免疫応答性を検討し、以下の点を明らかとした。

(1) Precursor として使用した 3 種類のフェニルプロパノイド類はいずれもマウス脾臓細胞に対して免疫賦活効果を示さず、分子量 50,000 Da 以上に酵素重合した EPP でのみマウス脾臓細胞の増殖促進誘導、サイトカイン産生誘導作用が認められることを明らかとした。

(2) EPP によるマウス脾臓細胞におけるサイトカイン産生誘導は、T 細胞群の影響を強く受けていることを明らかにした。

(3) EPP によるマウス脾臓細胞におけるサイトカイン産生誘導は、CD4 分子によって部分的に制御されていること、さらに EPP が CD4 への結合能を有することが明らかとなった。

第二章では、様々な組織に由来する白血球を用いて、EPP による免疫賦活活性における詳細なメカニズムについて、*in vitro* にて検討し、以下の点を明らかとした。

(1) EPP はマウス脾臓細胞から精製した CD4 陽性ならびに CD8 陽性 T 細胞に対し、直接的なサイトカイン産生誘導効果を示さないことを明らかにした。

(2) EPP はマウス脾臓細胞のみならず、腹腔内常在細胞も活性化させ、主に TNF- α 産生を強力に誘導することが明らかとなった。

(3) EPP は機能性 T 細胞ならびに B 細胞の欠損した SCID マウス由来脾臓細胞を活性化させ、サイトカインの産生誘導を認めた。

(4) EPP により誘導されるマウス脾臓細胞のサイトカイン産生量が、マクロファージならびに樹状細胞を除去することで大幅に減少することが認められ、またマウス BMDC を直接活性化させ、TNF- α 産生を誘導したことから、EPP が自然免疫活性化作用を持つことを明らかとした。

(5) EPP による IFN- γ 産生が T 細胞と抗原提示細胞により制御されること、マウス脾臓細胞における EPP の IFN- γ 産生誘導作用に IL-12 がほとんど影響を与えていないことが明らかとなった。

(6) EPP のサイトカイン産生誘導作用、とりわけ IFN- γ ならびに GM-CSF の産生誘導において、活性化した抗原提示細胞と T 細胞の細胞間接触が重要な役割を果たしていることを明らかとした。

第三章では、EPP をマウスに経口投与し、EPP の免疫賦活効果について担癌マウスでの腫瘍増殖抑制効果ならびに脾臓細胞における NK 細胞活性を指標として *in vivo* にて検討し、以下の点を明らかとした。

(1) pCA の細菌に対する変異原性は陰性であることを確認した。また自由飲水形式によるマウスへの経口投与において、その摂取量は単量体 CA およびコントロール水と同等であり、さらに投与初期における重篤な副作用は認められず、pCA は CA と比較して安全であることを明らかとした。

(2) CA ならびに pCA の経口投与により、担癌マウスにおける B7-P815 肥満細胞腫の増殖を抑制できることを明らかとした。一方、CA において認められた *in vitro* における直接的な腫瘍細胞増殖抑制作用は、重合化により消失することを確認した。

(3) pCA の経口投与により、マウス脾臓細胞における IFN- γ 産生誘導能ならびに NK 細胞活性を増強できることを明らかとした。またこの作用は CA では認められず、重合後にはじめて発揮される生物活性であることを示した。

(4) 経口投与した pCA は CA と比べて糞中への排泄率が高く、また断食させた pCA 投与マウスの尿中に単量体 CA が検出されないことを明らかとした。

上記のとおり、本検討によってリグニン類の有する免疫賦活活性について、より具体的に解明された。これまで、多くの低分子量フェノール性化合物の免疫調節作用について研究が進行してきたが、高分子ポリフェノールが免疫系に与える影響について詳細に解析した例は少ない。数多くのポリフェノール類が人々に有益な薬理活性を示すことから、様々な低分子量フェノール性化合物が健康維持のために利用されているが、外因性の酵素による構造並びに分子量の変化には注意が必要である。CA は重合後、抗酸化作用、血中移行率、腫瘍細胞への作用、免疫賦活作用における特徴が大きく変化することから、低分子量化合物のみならず、

その高分子体についても解析を行う価値は十分にあると考えられる。リグニン類は、抗炎症作用を示す多くの低分子ポリフェノール類とは異なる生物活性を示すため、利用者への適切な情報提供ならびに個人の目的に合わせた機能性食品の選択が重要である。本研究に用いたフェニルプロパノイド類の重合体は、いずれも強力な免疫賦活活性を示した。経口投与においても IFN- γ 産生能ならびに NK 細胞活性の上昇が認められたことから、免疫賦活活性を持つ機能性食品としてセルフメディケーションに利用できる可能性が示唆された。今後さらなるエビデンスを蓄積することにより、リグニン類の新規機能性食品としての利用価値を見出し、機能性食品市場をより活性化させると共に、人々の健康寿命の延伸に貢献することが可能であると考えている。

研究の過程で、リグニン類の受容体の一つとして CD4 が特定されたが、免疫賦活活性における CD4 の寄与はあくまでも部分的である。抗原提示細胞の活性化に必要なシグナルがどのようなメカニズムで誘導されているか、おそらくは特定の受容体を介したシグナルが伝達されていることが予想されるが、詳細な分子メカニズムの解明が今後の大きな課題の一つとして残された。しかし、本検討によりリグニン類が自然免疫活性化能を有することを明らかとしたことで、今後のメカニズム解析における基盤を築くことができた。

本研究において明らかとなった EPP の免疫賦活作用は、食品中のリグニン類が人々の免疫機能の維持・増進に日常的に寄与している可能性を示唆している。これらを豊富に含む食品の積極的な摂取が、人々の免疫力向上・感染防御・健康増進へとつながることを期待する。

謝辞

本研究の推進ならびに本論文の作製に関して、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました恩師、東京薬科大学薬学部、大野尚仁教授に衷心より深甚なる誠意を示します。

本研究の推進ならびに本論文の作製に関して、数多くの御指導、御助言を賜りました東京薬科大学薬学部、安達禎之准教授に心から感謝いたします。

本研究ならびに本論文の作製の機会をいただきました、東栄新薬株式会社、元井益郎代表取締役社長に厚く御礼申し上げます。

本研究ならびに本論文の作製を遂行するにあたり、著者の学生生活および研究活動の御支援を賜りました、東栄新薬株式会社、元井章智副社長に深く感謝申し上げます。

本研究の推進ならびに本論文の作製に関して、絶えず適切な御指導、御助言を賜りました東京薬科大学薬学部、多田壘助教に心より感謝申し上げます。

本研究ならびに本論文の作製を遂行するにあたり、数々の適切な御指導、御助言を賜りました NapaJen Pharma, Inc., 樋口貞春博士に厚く御礼申し上げます。

本研究の推進ならびに本論文の作製に関して、数々の適切な御指導、御助言を賜りました東京薬科大学中央分析センター、志呂義之氏に厚く御礼申し上げます。

本研究の推進ならびに本論文の作製に関して御協力いただきました東京薬科大学薬学部、三浦典子講師、石橋健一助教に深謝致しますと共に、本研究に御協力いただきました東京薬科大学 免疫学教室、田宮優美氏、小岩井厚志氏、田島克哉氏をはじめ、同免疫学教室の皆様心から御礼申し上げます。

最後に、著者の学生生活および研究活動を温かく見守り、絶えず支援して下さった両親に感謝いたします。

研究結果の掲載誌

本博士学位申請論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

第一章

The effect of enzymatically polymerised polyphenols on CD4 binding and cytokine production in murine splenocytes

Daisuke Yamanaka, Yumi Tamiya, Masuro Motoi, Ken-ichi Ishibashi, Noriko N. Miura, Yoshiyuki Adachi, and Naohito Ohno

PLoS ONE, **7**:e36025. (2012)

第二章

Modulation of interferon- γ synthesis by the effects of lignin-like enzymatically polymerized polyphenols on antigen-presenting cell activation and the subsequent cell-to-cell interactions

Daisuke Yamanaka, Masuro Motoi, Ken-ichi Ishibashi, Noriko N. Miura, Yoshiyuki Adachi, and Naohito Ohno

Food Chemistry, **141**:4073-80. (2013)

第三章

Effect of polymeric caffeic acid on antitumour activity and natural killer cell activity in mice

Daisuke Yamanaka, Katsuya Tajima, Yoshiyuki Adachi, Ken-ichi Ishibashi, Noriko N. Miura, Masuro Motoi, and Naohito Ohno

Journal of Functional Foods, **6**:513-22. (2014)

引用文献

- 1) Sanders ME, Guarner F, Guerrant R, Holt PR, Quigley EM, Sartor RB, Sherman PM, Mayer EA. *Gut*, **62**, 787-796 (2013).
- 2) Murase T, Nagasawa A, Suzuki J, Hase T, Tokimitsu I. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **26**, 1459-1464 (2002).
- 3) Fassina G, Buffa A, Benelli R, Varnier OE, Noonan DM, Albini A. *AIDS*, **16**, 939-941 (2002).
- 4) Yamaguchi K, Honda M, Ikigai H, Hara Y, Shimamura T. *Antiviral Res*, **53**, 19-34 (2002).
- 5) Benzie IF, Szeto YT. *J Agric Food Chem*, **47**, 633-636 (1999).
- 6) Milligan SA, Burke P, Coleman DT, Bigelow RL, Steffan JJ, Carroll JL, Williams BJ, Cardelli JA. *Clin Cancer Res*, **15**, 4885-4894 (2009).
- 7) Yen GC, Chen HY. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 27-32 (1995).
- 8) Ikeda I, Kobayashi M, Hamada T, Tsuda K, Goto H, Imaizumi K, Nozawa A, Sugimoto A, Kakuda T. *J Agric Food Chem*, **51**, 7303-7307 (2003).
- 9) Nakai M, Fukui Y, Asami S, Toyoda-Ono Y, Iwashita T, Shibata H, Mitsunaga T, Hashimoto F, Kiso Y. *J Agric Food Chem*, **53**, 4593-4598 (2005).
- 10) Toyoda-Ono Y, Yoshimura M, Nakai M, Fukui Y, Asami S, Shibata H, Kiso Y, Ikeda I. *Biosci Biotechnol Biochem*, **71**, 971-976 (2007).
- 11) Kawai T, Akira S. *Int Immunol*, **21**, 317-337 (2009).
- 12) Takeuchi O, Akira S. *Cell*, **140**, 805-820 (2010).
- 13) Blumenthal A, Kobayashi T, Pierini LM, Banaei N, Ernst JD, Miyake K, Ehrt S. *Cell Host Microbe*, **5**, 35-46 (2009).
- 14) Umesaki Y, Setoyama H, Matsumoto S, Okada Y. *Immunology*, **79**, 32-37 (1993).
- 15) Akira S, Hemmi H. *Immunol Lett*, **85**, 85-95 (2003).
- 16) Makino S, Ikegami S, Kano H, Sashihara T, Sugano H, Horiuchi H, Saito T, Oda M. *J Dairy Sci*, **89**, 2873-2881 (2006).
- 17) Nagai T, Makino S, Ikegami S, Itoh H, Yamada H. *Int Immunopharmacol*, **11**, 2246-2250 (2011).
- 18) Makino S, Ikegami S, Kume A, Horiuchi H, Sasaki H, Orii N. *Br J Nutr*, **104**, 998-1006 (2010).
- 19) Singh S, Aggarwal BB. *J Biol Chem*, **270**, 24995-25000 (1995).
- 20) Hirao K, Yumoto H, Nakanishi T, Mukai K, Takahashi K, Takegawa D, Matsuo T. *Life Sci*, **86**, 654-660 (2010).
- 21) Gessner DK, Ringseis R, Siebers M, Keller J, Kloster J, Wen G, Eder K. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, (2011).

- 22) Rasheed Z, Akhtar N, Anbazhagan AN, Ramamurthy S, Shukla M, Haqqi TM. *J Inflamm (Lond)*, **6**, 1 (2009).
- 23) Singh R, Akhtar N, Haqqi TM. *Life Sci*, **86**, 907-918 (2010).
- 24) Nagasaka R, Chotimarkorn C, Shafiqul IM, Hori M, Ozaki H, Ushio H. *Biochem Biophys Res Commun*, **358**, 615-619 (2007).
- 25) Jung WK, Choi I, Lee DY, Yea SS, Choi YH, Kim MM, Park SG, Seo SK, Lee SW, Lee CM, Park YM, Choi IW. *Int J Biochem Cell Biol*, **40**, 2572-2582 (2008).
- 26) Fujimura Y, Umeda D, Yamada K, Tachibana H. *Arch Biochem Biophys*, **476**, 133-138 (2008).
- 27) Zhong Y, Chiou YS, Pan MH, Shahidi F. *Food Chem*, **134**, 742-748 (2012).
- 28) Furukawa M, Miura NN, Adachi Y, Motoi M, Ohno N. *Int J Med Mushrooms*, **8**, 115-128 (2006).
- 29) Liu Y, Fukuwatari Y, Okumura K, Takeda K, Ishibashi K, Furukawa M, Ohno N, Mori K, Gao M, Motoi M. *Evid Based Complement Alternat Med*, **5**, 205-219 (2008).
- 30) Hsu CH, Hwang KC, Chiang YH, Chou P. *J Altern Complement Med*, **14**, 299-301 (2008).
- 31) Chang JB, Wu MF, Yang YY, Leu SJ, Chen YL, Yu CS, Yu CC, Chang SJ, Lu HF, Chung JG. *In Vivo*, **25**, 971-976 (2011).
- 32) Fujimiya Y, Suzuki Y, Oshiman K, Kobori H, Moriguchi K, Nakashima H, Matumoto Y, Takahara S, Ebina T, Katakura R. *Cancer Immunol Immunother*, **46**, 147-159 (1998).
- 33) Kawagishi H, Inagaki R, Kanao T, Mizuno T, Shimura K, Ito H, Hagiwara T, Nakamura T. *Carbohydr Res*, **186**, 267-273 (1989).
- 34) Ohno N, Furukawa M, Miura NN, Adachi Y, Motoi M, Yadomae T. *Biol Pharm Bull*, **24**, 820-828 (2001).
- 35) Mizuno M, Minato K, Ito H, Kawade M, Terai H, Tsuchida H. *Biochem Mol Biol Int*, **47**, 707-714 (1999).
- 36) Bouike G, Nishitani Y, Shiomi H, Yoshida M, Azuma T, Hashimoto T, Kanazawa K, Mizuno M. *Evid Based Complement Alternat Med*, **2011**, (2011).
- 37) Sorimachi K, Akimoto K, Ikehara Y, Inafuku K, Okubo A, Yamazaki S. *Cell Struct Funct*, **26**, 103-108 (2001).
- 38) Johnson E, Forland DT, Saetre L, Bernardshaw SV, Lyberg T, Hetland G. *Scand J Immunol*, **69**, 242-250 (2009).
- 39) Ellertsen LK, Hetland G. *Clin Mol Allergy*, **7**, 6 (2009).
- 40) Choi YH, Yan GH, Chai OH, Zhang X, Lim JM, Kim JH, Lee MS, Han EH, Kim HT, Song CH. *Biol Pharm Bull*, **29**, 1366-1371 (2006).

- 41) Zhong M, Tai A, Yamamoto I. *Biosci Biotechnol Biochem*, **69**, 2466-2469 (2005).
- 42) Yuminamochi E, Koike T, Takeda K, Horiuchi I, Okumura K. *Immunology*, **121**, 197-206 (2007).
- 43) Yamanaka D, Motoi M, Ishibashi K, Miura NN, Adachi Y, Ohno N. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, **34**, 561-570 (2012).
- 44) Yamanaka D, Tada R, Adachi Y, Ishibashi K, Motoi M, Iwakura Y, Ohno N. *Int Immunopharmacol*, **14**, 311-319 (2012).
- 45) Djeu JY, Stocks N, Zoon K, Stanton GJ, Timonen T, Herberman RB. *J Exp Med*, **156**, 1222-1234 (1982).
- 46) de Graaf PW, Horak E, Bookman MA. *J Immunol*, **140**, 2853-2857 (1988).
- 47) Taguchi T. *Gan To Kagaku Ryoho*, **13**, 3294-3304 (1986).
- 48) Okamura K, Suzuki M, Chihara T, Fujiwara A, Fukuda T, Goto S, Ichinohe K, Jimi S, Kasamatsu T, Kawai N, et al., *Cancer*, **58**, 865-872 (1986).
- 49) Noda K, Takeuchi S, Yajima A, Akiya K, Kasamatsu T, Tomoda Y, Ozawa M, Sekiba K, Sugimori H, Hashimoto S, et al., *Jpn J Clin Oncol*, **22**, 17-25 (1992).
- 50) Taguchi T. *Cancer Detect Prev Suppl*, **1**, 333-349 (1987).
- 51) Sayar S, Jannink JL, White PJ. *J Agric Food Chem*, **54**, 5142-5148 (2006).
- 52) Boerjan W, Ralph J, Baucher M. *Annu Rev Plant Biol*, **54**, 519-546 (2003).
- 53) Rubin EM. *Nature*, **454**, 841-845 (2008).
- 54) Boudet AM, Kajita S, Grima-Pettenati J, Goffner D. *Trends Plant Sci*, **8**, 576-581 (2003).
- 55) Freudenberg Kb, Neish AC. *Constitution and biosynthesis of lignin*. Springer-Verlag, New York (1968).
- 56) Fukuchi K, Sakagami H, Ikeda M, Kawazoe Y, Oh-Hara T, Konno K, Ichikawa S, Hata N, Kondo H, Nonoyama M. *Anticancer Res*, **9**, 313-317 (1989).
- 57) Lai PK, Donovan J, Takayama H, Sakagami H, Tanaka A, Konno K, Nonoyama M. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **6**, 205-217 (1990).
- 58) Sakagami H, Takeda M, Kawazoe Y, Nagata K, Ishihama A, Ueda M, Yamazaki S. *In Vivo*, **6**, 491-495 (1992).
- 59) Hamauzu Y, Mizuno Y. *Plant Foods Hum Nutr*, **66**, 70-77 (2011).
- 60) Yamamoto Y, Shirono H, Kono K, Ohashi Y. *Biosci Biotechnol Biochem*, **61**, 1909-1912 (1997).
- 61) Chisari M, Barbagallo RN, Spagna G. *J Agric Food Chem*, **56**, 132-138 (2008).
- 62) Kurakata Y, Sakagami H, Oh-Hara T, Kawazoe Y, Asano K, Fujinaga S, Takeda M, Sato T. *In Vivo*, **4**, 377-380 (1990).
- 63) Freudenberg K. *Nature*, **183**, 1152-1155 (1959).
- 64) Ichimura T, Otake T, Mori H, Maruyama S. *Biosci Biotechnol Biochem*, **63**,

- 2202-2204 (1999).
- 65) Thakkar JN, Tiwari V, Desai UR. *Biomacromolecules*, **11**, 1412-1416 (2010).
 - 66) Sakagami H, Oh-hara T, Kohda K, Kawazoe Y. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **39**, 950-955 (1991).
 - 67) Denizot F, Lang R. *J Immunol Methods*, **89**, 271-277 (1986).
 - 68) Harada T, Miura NN, Adachi Y, Nakajima M, Yadomae T, Ohno N. *J Interferon Cytokine Res*, **28**, 477-486 (2008).
 - 69) Folin O, Ciocalteu V. *J Biol Chem*, **73**, 627-650 (1927).
 - 70) Tokunaka K, Ohno N, Adachi Y, Miura NN, Yadomae T. *Int Immunopharmacol*, **2**, 59-67 (2002).
 - 71) Lee-MacAry AE, Ross EL, Davies D, Laylor R, Honeychurch J, Glennie MJ, Snary D, Wilkinson RW. *J Immunol Methods*, **252**, 83-92 (2001).
 - 72) Blois MS. *Nature*, **181**, 1199-1200 (1958).
 - 73) Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. *Free Radic Biol Med*, **26**, 1231-1237 (1999).
 - 74) Singleton VL, Rossi JA. *Am. J. Enol. Vitic.*, **16**, 144-158 (1965).
 - 75) Omar MH, Mullen W, Stalmach A, Auger C, Rouanet JM, Teissedre PL, Caldwell ST, Hartley RC, Crozier A. *J Agric Food Chem*, **60**, 5205-5214 (2012).
 - 76) Nakashima H, Murakami T, Yamamoto N, Naoe T, Kawazoe Y, Konno K, Sakagami H. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **40**, 2102-2105 (1992).
 - 77) Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. *Nature*, **312**, 763-767 (1984).
 - 78) Sorimachi K, Akimoto K, Tsuru K, Nagashima S, Ieiri T, Niwa A. *Cell Biol Int*, **19**, 833-838 (1995).
 - 79) Sorimachi K, Akimoto K, Hattori Y, Ieiri T, Niwa A. *Cytokine*, **11**, 571-578 (1999).
 - 80) Kim GY, Kim KH, Lee SH, Yoon MS, Lee HJ, Moon DO, Lee CM, Ahn SC, Park YC, Park YM. *J Immunol*, **174**, 8116-8124 (2005).
 - 81) Reale S, Di Tullio A, Spreti N, De Angelis F. *Mass Spectrom Rev*, **23**, 87-126 (2004).
 - 82) Akashi S, Shimazu R, Ogata H, Nagai Y, Takeda K, Kimoto M, Miyake K. *J Immunol*, **164**, 3471-3475 (2000).
 - 83) Kumar H, Kawai T, Akira S. *Biochem Biophys Res Commun*, **388**, 621-625 (2009).
 - 84) Yazawa N, Fujimoto M, Sato S, Miyake K, Asano N, Nagai Y, Takeuchi O, Takeda K, Okochi H, Akira S, Tedder TF, Tamaki K. *Blood*, **102**, 1374-1380 (2003).
 - 85) Tanaka S, Akaishi E, Hosaka K, Okamura S, Kubohara Y. *Biochem Biophys Res Commun*, **335**, 162-167 (2005).

- 86) Cheng AS, Cheng YH, Chang TL. *Food Funct*, **3**, 886-890 (2012).
- 87) Quintans J, Yokoyama A, Evavold B, Hirsch R, Mayforth RD. *J Mol Cell Immunol*, **4**, 225-235; discussion 235-227 (1989).
- 88) Schoenborn JR, Wilson CB. *Adv Immunol*, **96**, 41-101 (2007).
- 89) Marcucci F, Waller M, Kirchner H, Krammer P. *Nature*, **291**, 79-81 (1981).
- 90) Campbell IK, van Nieuwenhuijze A, Segura E, O'Donnell K, Coghill E, Hommel M, Gerondakis S, Villadangos JA, Wicks IP. *J Immunol*, **186**, 5468-5477 (2011).
- 91) Clevers H, Alarcon B, Wileman T, Terhorst C. *Annu Rev Immunol*, **6**, 629-662 (1988).
- 92) Kawai K, Tsuno NH, Kitayama J, Okaji Y, Yazawa K, Asakage M, Hori N, Watanabe T, Takahashi K, Nagawa H. *J Allergy Clin Immunol*, **112**, 951-957 (2003).
- 93) Tucsek Z, Radnai B, Racz B, Debreceni B, Priber JK, Dolowschiak T, Palkovics T, Gallyas F, Jr., Sumegi B, Veres B. *J Leukoc Biol*, **89**, 105-111 (2011).
- 94) Moon MK, Lee YJ, Kim JS, Kang DG, Lee HS. *Biol Pharm Bull*, **32**, 1371-1377 (2009).
- 95) Nicolas JJ, Richard-Forget FC, Goupy PM, Amiot MJ, Aubert SY. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **34**, 109-157 (1994).
- 96) Yadav M, Schorey JS. *Blood*, **108**, 3168-3175 (2006).
- 97) Gidlund M, Orn A, Wigzell H, Senik A, Gresser I. *Nature*, **273**, 759-761 (1978).
- 98) Weigent DA, Stanton GJ, Johnson HM. *Infect Immun*, **41**, 992-997 (1983).
- 99) Freund M, Kleine HD. *Infection*, **20 Suppl 2**, S84-92 (1992).
- 100) Weiss M, Belohradsky BH. *Infection*, **20 Suppl 2**, S81-83 (1992).
- 101) Tada R, Adachi Y, Ishibashi K, Ohno N. *Carbohydr Res*, **344**, 400-404 (2009).
- 102) Harada T, Miura NN, Adachi Y, Nakajima M, Yadomae T, Ohno N. *J Interferon Cytokine Res*, **24**, 478-489 (2004).
- 103) Tada R, Yoshikawa M, Kuge T, Tanioka A, Ishibashi K, Adachi Y, Tsubaki K, Ohno N. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, **33**, 302-308 (2011).
- 104) Dialynas DP, Wilde DB, Marrack P, Pierres A, Wall KA, Havran W, Otten G, Loken MR, Pierres M, Kappler J, et al., *Immunol Rev*, **74**, 29-56 (1983).
- 105) Dialynas DP, Quan ZS, Wall KA, Pierres A, Quintans J, Loken MR, Pierres M, Fitch FW. *J Immunol*, **131**, 2445-2451 (1983).
- 106) Wineman JP, Gilmore GL, Gritzmacher C, Torbett BE, Muller-Sieburg CE. *Blood*, **80**, 1717-1724 (1992).
- 107) Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K. *J Immunol*, **164**, 2978-2986 (2000).
- 108) Graziani-Bowering G, Filion LG, Thibault P, Kozlowski M. *Exp Cell Res*, **279**,

- 141-152 (2002).
- 109) Bierer BE, Sleckman BP, Ratnofsky SE, Burakoff SJ. *Annu Rev Immunol*, **7**, 579-599 (1989).
- 110) Ray A, Dittel BN. *J Vis Exp*, (2010).
- 111) Kerns HM, Ryu BY, Stirling BV, Sather BD, Astrakhan A, Humblet-Baron S, Liggitt D, Rawlings DJ. *Blood*, **115**, 2146-2155 (2010).
- 112) Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. *Nature*, **301**, 527-530 (1983).
- 113) Kirchgessner CU, Patil CK, Evans JW, Cuomo CA, Fried LM, Carter T, Oettinger MA, Brown JM. *Science*, **267**, 1178-1183 (1995).
- 114) Bancroft GJ, Schreiber RD, Bosma GC, Bosma MJ, Unanue ER. *J Immunol*, **139**, 1104-1107 (1987).
- 115) Dorshkind K, Pollack SB, Bosma MJ, Phillips RA. *J Immunol*, **134**, 3798-3801 (1985).
- 116) Dorshkind K, Keller GM, Phillips RA, Miller RG, Bosma GC, O'Toole M, Bosma MJ. *J Immunol*, **132**, 1804-1808 (1984).
- 117) Bancroft GJ, Kelly JP. *Immunobiology*, **191**, 424-431 (1994).
- 118) Ho MK, Springer TA. *J Immunol*, **128**, 2281-2286 (1982).
- 119) Kruger T, Benke D, Eitner F, Lang A, Wirtz M, Hamilton-Williams EE, Engel D, Giese B, Muller-Newen G, Floege J, Kurts C. *J Am Soc Nephrol*, **15**, 613-621 (2004).
- 120) Alberola-Ila J, Takaki S, Kerner JD, Perlmutter RM. *Annu Rev Immunol*, **15**, 125-154 (1997).
- 121) Bromley SK, Burack WR, Johnson KG, Somersalo K, Sims TN, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. *Annu Rev Immunol*, **19**, 375-396 (2001).
- 122) Santoro G, Anastasi G, Saverino D, Puri C, Zarccone D, Tacchetti C, Ciccone E, Grossi CE. *Eur J Histochem*, **44**, 89-99 (2000).
- 123) Linsley PS, Wallace PM, Johnson J, Gibson MG, Greene JL, Ledbetter JA, Singh C, Tepper MA. *Science*, **257**, 792-795 (1992).
- 124) Owens T, Fazekas de St Groth B, Miller JF. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 9209-9213 (1987).
- 125) Aherne SA, O'Brien NM. *Mol Nutr Food Res*, **52**, 664-673 (2008).
- 126) Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. *J Leukoc Biol*, **75**, 163-189 (2004).
- 127) Stern AS, Magram J, Presky DH. *Life Sci*, **58**, 639-654 (1996).
- 128) Schepetkin IA, Kirpotina LN, Jakiw L, Khlebnikov AI, Blaskovich CL, Jutila MA, Quinn MT. *J Immunol*, **183**, 6754-6766 (2009).
- 129) Ramstead AG, Schepetkin IA, Quinn MT, Jutila MA. *PLoS One*, **7**, e50546 (2012).
- 130) King DP, Jones PP. *J Immunol*, **131**, 315-318 (1983).

- 131) Maruyama H, Tamauchi H, Iizuka M, Nakano T. *Planta Med*, **72**, 1415-1417 (2006).
- 132) Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, El Bedoui J, Chataigneau M, Schini-Kerth VB. *Eur J Pharmacol*, **500**, 299-313 (2004).
- 133) Zambonin L, Caliceti C, Vieceli Dalla Sega F, Fiorentini D, Hrelia S, Landi L, Prata C. *Oxid Med Cell Longev*, **2012**, 839298 (2012).
- 134) Vieira O, Escargueil-Blanc I, Meilhac O, Basile JP, Laranjinha J, Almeida L, Salvayre R, Negre-Salvayre A. *Br J Pharmacol*, **123**, 565-573 (1998).
- 135) Lafay S, Gueux E, Rayssiguier Y, Mazur A, Remesy C, Scalbert A. *Int J Vitam Nutr Res*, **75**, 119-125 (2005).
- 136) Moriguchi S. *Biofactors*, **7**, 77-86 (1998).
- 137) Feng L, Jia X, Zhu MM, Chen Y, Shi F. *Molecules*, **15**, 9145-9156 (2010).
- 138) Oda Y, Yamazaki H, Watanabe M, Nohmi T, Shimada T. *Mutat Res*, **334**, 145-156 (1995).
- 139) Kuroda M, Kubo S, Matsuo Y, Atou T, Satoh J, Fujino T, Hayakawa M, Mimaki Y. *Biosci Biotechnol Biochem*, **77**, 1186-1192 (2013).
- 140) Bear HD, Susskind BM, Close KA, Barrett SK. *Cancer Res*, **48**, 1422-1427 (1988).
- 141) Gasser S, Raulet DH. *Immunol Rev*, **214**, 130-142 (2006).
- 142) Allison JP, Hurwitz AA, Leach DR. *Curr Opin Immunol*, **7**, 682-686 (1995).
- 143) Chen L, McGowan P, Ashe S, Johnston J, Li Y, Hellstrom I, Hellstrom KE. *J Exp Med*, **179**, 523-532 (1994).
- 144) Huang WY, Cai YZ, Zhang Y. *Nutr Cancer*, **62**, 1-20 (2010).
- 145) Bernardshaw S, Johnson E, Hetland G. *Scand J Immunol*, **62**, 393-398 (2005).
- 146) Iwabuchi N, Yonezawa S, Odamaki T, Yaeshima T, Iwatsuki K, Xiao JZ. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **66**, 230-239 (2012).
- 147) Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Kohler G. *Nature*, **368**, 339-342 (1994).
- 148) Waters JP, Pober JS, Bradley JR. *J Pathol*, **230**, 132-147 (2013).
- 149) Iwakura Y, Nakae S, Saijo S, Ishigame H. *Immunol Rev*, **226**, 57-79 (2008).
- 150) Touaibia M, Jean-Francois J, Doiron J. *Mini Rev Med Chem*, **11**, 695-713 (2011).