

2019年度 博士論文

ランタンイオンの細胞性免疫に対する影響の基礎的検討

Basic study on the regulation of cellular immunity by lanthanum ions

高崎健康福祉大学大学院健康福祉学研究科

食品栄養学専攻 博士後期課程

学籍番号 1710501

氏名 秋山 琉璃

指導教員 田中 進

# 目次

## 目次

緒言 .....	1
<b>第一章 カルシニューリン活性 (CN) に対するランタンイオン (<math>\text{La}^{3+}</math>) の影響</b>	
1. 緒言 .....	7
2. 試料および方法 .....	12
2-1. 試料および試薬 .....	12
2-2. 実験方法.....	12
2-2-1. ウシ脳由来カルシニューリン (bCN) 活性の測定.....	12
2-2-2. ウシ脳由来カルシニューリン (bCN) 活性阻害のキネティクス解析.....	13
2-2-3. リコンビナントヒトカルシニューリン (rhCN) 活性測定 .....	13
2-2-4. リコンビナントヒトカルシニューリン (rhCN) 活性阻害のキネティクス解析 .....	13
2-2-5. 統計処理.....	14
3. 結果.....	15
3-1. スランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) のニッケルイオン ( $\text{Ni}^{2+}$ ) 刺激したウシ脳由来カルシニューリン (bCN) 活性に対する影響.....	15
3-2. スカンジウムイオン ( $\text{Sc}^{3+}$ )、イットリウムイオン ( $\text{Y}^{3+}$ ) のニッケルイオン ( $\text{Ni}^{2+}$ ) 刺激した ウシ脳由来カルシニューリン (bCN) 活性に対する影響.....	15
3-3. ランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ )、イットリウムイオン ( $\text{Y}^{3+}$ ) のマンガンイオン ( $\text{Mn}^{2+}$ ) 刺激したウ シ脳由来カルシニューリン (bCN) 活性に対する影響 .....	16

3-4. ランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) のニッケルイオン ( $\text{Ni}^{2+}$ ) 刺激したウシ脳由来カルシニューリン活性 (bCN) 阻害のキネティクス解析.....	16
3-5. 希土類元素のリコンビナントヒトカルシニューリン (rhCN) 活性に対する影響.....	17
3-6. ランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) のリコンビナントヒトカルシニューリン (rhCN) 活性阻害のキネティクス解析.....	18
4. 考察.....	32
5. 結論.....	35

## 第二章 Jurkat 細胞の IL-2 産生に対するランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) の影響

1. 緒言.....	37
2. 試料および方法.....	38
2-1. 試料および試薬.....	38
2-2. 実験方法.....	38
2-2-1. Jurkat 細胞の培養.....	38
2-2-2. Jurkat 細胞の形態観察.....	38
2-2-3. Jurkat 細胞の生存率測定.....	39
2-2-4. Jurkat 細胞の ATP 測定.....	39
2-2-5. Jurkat 細胞が産生する IL-2 タンパク質の測定.....	39
2-2-6. 統計処理.....	40
3. 結果.....	41
3-1. ランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) の Jurkat 細胞に対する毒性作用の検討.....	41

3-1-1. Jurkat 細胞の形態観察.....	41
3-1-2. トリパンブルー染色による Jurkat 細胞の生存率測定.....	42
3-1-3. Jurkat 細胞の ATP 測定 .....	42
3-2. ランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ )、スカンジウムイオン ( $\text{Sc}^{3+}$ )、イットリウムイオン ( $\text{Y}^{3+}$ ) の ConA 刺激した Jurkat 細胞のインターロイキン-2 (IL-2) 産生に対する影響 .....	42
3-3. 希土類元素の ConA 刺激した Jurkat 細胞のインターロイキン-2 (IL-2) 産生に対する 影響.....	43
4. 考察.....	51
5. 結論.....	53

### 第三章 Jurkat 細胞の核内転写調節因子に対するランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) の影響

1. 緒言.....	55
2. 試料および方法.....	56
2-1. 試料および試薬 .....	56
2-2. 実験方法.....	56
2-2-1. Jurkat 細胞からの全 RNA 抽出.....	56
2-2-2. cDNA 合成.....	57
2-2-3. リアルタイム RT-PCR 法 .....	58
2-2-4. 核タンパク質の抽出 .....	58
2-2-5. 核タンパク質の定量 .....	59
2-2-6. 核内転写調節因子の DNA 結合活性の解析 .....	60

2-2-6-1. NFATc1 .....	60
2-2-6-2. AP-1 .....	61
2-2-6-3. NFκB .....	62
2-2-7. 統計処理 .....	62
3. 結果 .....	64
3-1. Jurkat 細胞の IL-2 mRNA 発現に対するランタンイオン (La <sup>3+</sup> ) の影響 .....	64
3-2. ランタンイオン (La <sup>3+</sup> ) の核内転写調節因子に対する影響 .....	64
3-2-1. ランタンイオン (La <sup>3+</sup> ) の NFATc1 に対する影響 .....	65
3-2-2. ランタンイオン (La <sup>3+</sup> ) の AP-1 に対する影響 .....	65
3-2-3. ランタンイオン (La <sup>3+</sup> ) の NFκB に対する影響 .....	65
4. 考察 .....	70
5. 結論 .....	72
<b>まとめ .....</b>	<b>73</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>77</b>
<b>謝辞 .....</b>	<b>86</b>

## 緒言

希土類元素は、周期表の3族に属するスカンジウム (Sc: 原子番号 21)、イットリウム (Y: 原子番号 39) およびランタン (La: 原子番号 57) からルテチウム (Lu: 原子番号 71) までの15種類のランタノイドを含む17元素からなるグループであり、レアアースとも呼ばれている。ランタノイドの中でもランタンは4f軌道に電子を持っていないため、セリウム (Ce: 原子番号 58) から Lu までをランタノイドとして区別することもある。3価イオンの希土類元素の最外殻電子配置は  $5s^2 5p^6$  であり、希土類元素は極めて似た化学的性質を示すことが知られている<sup>1)</sup>。

希土類元素の発見は、1787年、スウェーデンの化学者で鉱物学者の CA. Arrhenius がストックホルム郊外のイッテルビ村、イッテルビ採石場で発見した新しい黒石をイッテライトと名付けたのが最初と言われている。その後フィンランドの科学者 J. Gadolin が1794年、イッテライトの中に「イットリア」を発見し、これが希土類元素の歴史の始まりとなった。次いで1803年には MH. Klaproth、JJ. Berzelius、W. Hisinger が「セリア」を発見している。しかし、その後「イットリア」、「セリア」は純粋な酸化物ではないことが判明している。1843年、スイス人の CG. Mosander の Y の分離によって初めて純粋な希土類元素の分離が成功するが、希土類元素の性質は非常に似ているため、当時の技術では相対分離が難しく、すべての希土類元素が分離されたのは100年以上後の1907年である<sup>2)</sup>。

希土類元素は名前の通り、比較的希少価値、工業的価値が高く、アメリカ地質調査所の2018年に報告<sup>3)</sup>された推定では、中国、オーストラリア、アメリカ合衆国、ロシア、タイ、ベトナム、マレーシア、インド等の鉱山で生産されており、その中で中国が70%を占めるとされている。また埋蔵量も世界の1/3以上を占めると言われている。希土類元素の工業製品としての用途は幅広いものがあり<sup>4,7)</sup>、Sc が水銀灯の一種であるメタルハイドランプ、Sc とアルミニウムとの合金は航空宇宙用品から野球の金属バットにまで利用されている。また Y はレーザー媒質、赤色蛍光体の原料として使

用されている。La は高屈折ガラスとしてレンズなどに利用されており、セラミックコンデンサー、水素吸蔵合金として燃料電池にも使用されている。セリウム (Ce: 原子番号 58) はガラス研磨剤、排ガスの浄化・触媒、紫外線吸着ガラス (サングラス) として利用されているほか、ネオジウム (Nd: 原子番号 60)、サマリウム (Sm: 原子番号 62) は、ネオジウム磁石およびサマリウム・コバルト磁石としての用途がある。ユーロピウム (Eu: 原子番号 63) は赤色蛍光体として、テルビウム (Tb: 原子番号 65) は緑色蛍光体、光磁気ディスクに用いられている。ジスプロシウム (Dy: 原子番号 66) は蓄光性があり、ルミノーバとして夜光塗料として利用されている。プラセオジウム (Pr: 原子番号 59)、エルビウム (Er: 原子番号 68)、ツリウム (Tm: 原子番号 69) は光ファイバー通信に欠かせない元素である。

一方、一部の希土類元素は医薬品にも応用されており、例えば La を主成分とした炭酸ランタン ( $\text{La}_2[\text{CO}_3]_3$ ) は、リン (P) を吸着する特性を利用して、慢性腎臓病患者に見られる高リン血症の改善薬 (医薬品名: ホスレノール) として<sup>8)</sup>、セリウムはシユウ酸セリウムの形状で制吐薬として使用されている<sup>9)</sup>。またガドリニウムは磁気共鳴画像 (MRI) の血管造影剤として<sup>10,11)</sup>、放射性のイットリウム ( $^{90}\text{Y}$ ) と放射性のサマリウムは ( $^{153}\text{Sm}$ ) は放射性医薬品として使用されている<sup>12,13)</sup>。またホルミウム (Ho: 原子番号 67) は外科用のレーザーとして<sup>14)</sup>、Er は美容整形外科用のレーザーとして<sup>15)</sup>、ルテチウム (Lu: 原子番号 71) はポジトロン断層撮影法 (PET) のシンチレーターとして<sup>16)</sup> 使用されている。従って、希土類元素の生物学的な影響や機能性を検討することは、疾病の予防・診断・治療を通じた人の健康維持やあるいは新規医薬品の開発による医療分野への利用などの基礎となることが考えられ、重要なことである。

タンパク質脱リン酸化酵素であるカルシニューリン (CN) は、ホスホプロテインホスファターゼ 2B (PP2B) とも言われ、カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) /カルモジュリン (CaM) 依存性のセリン/トレオニンホスファターゼとして知られている<sup>17)</sup>。CN は下等から高等に至る真核生物の様々な細胞機能において重要な役割を果たしているが、ヒトでは心肥大の制御<sup>18)</sup>、興奮性神経細胞死<sup>19)</sup>やアルツハイマー病で特徴的に観察される異

常にリン酸化されたタウタンパク質の形成<sup>20,21)</sup>などに CN が関与している報告がある。また免疫系では CN は、T 細胞においてインターロイキン-2 (IL-2) mRNA の発現を制御する転写調節因子の一つである Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1 (NFATc1) を脱リン酸化することで IL-2 mRNA の発現を増加させ、細胞性免疫を高めることが知られている<sup>22)</sup>。さらに、臓器移植の際に免疫抑制剤として臨床で使用されているシクロスポリンやタクロリムス (FK506) はそれぞれシクロフィリンや FK506 結合タンパク質 (FKBP) といったイムノフィリンという結合タンパク質を介して間接的に CN を阻害することから、CN は免疫抑制剤の標的酵素であることが知られている (図 1)<sup>23)</sup>。

本研究では希土類元素の細胞性免疫に対する影響に着目し、希土類元素の中でもランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) を中心として CN を使用した酵素レベル、ヒト T 細胞様株 Jurkat 細胞を用いた細胞レベルで検討を行った。第一章では免疫抑制剤探索の基盤として、ウシ脳由来 CN (bcCN) とリコンビナントヒト CN (rhCN) を使用して、ホスファターゼ活性に対する影響を  $\text{La}^{3+}$  をはじめとして数種類の希土類元素を用いて調べ、酵素キネティクス解析により  $\text{La}^{3+}$  の CN に対する阻害様式を求めた。第二章では Jurkat 細胞がコンカナバリン A (ConA) 誘導性に産生する IL-2 タンパク質を指標に、 $\text{La}^{3+}$  および数種類の希土類元素の影響について検討を行った。第三章では、 $\text{La}^{3+}$  の作用機序を明らかにするために、最初に Jurkat 細胞を用いてリアルタイム RT-PCR 法により IL-2 mRNA の転写レベルでの検討を行った。T 細胞における IL-2 mRNA の発現は、CN 系を介した NFATc1 と I $\kappa$ B kinase (IKK) 系を介した nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF $\kappa$ B) および mitogen-activated protein kinase (MAPK) 系を介した activator protein-1 (AP-1) の 3 つの転写調節因子によって制御されていることが知られている (図 2)。従って、次に核内の転写調節因子 NFATc1、AP-1、NF $\kappa$ B のそれぞれの DNA 結合活性に対する  $\text{La}^{3+}$  の影響について検討を行った。

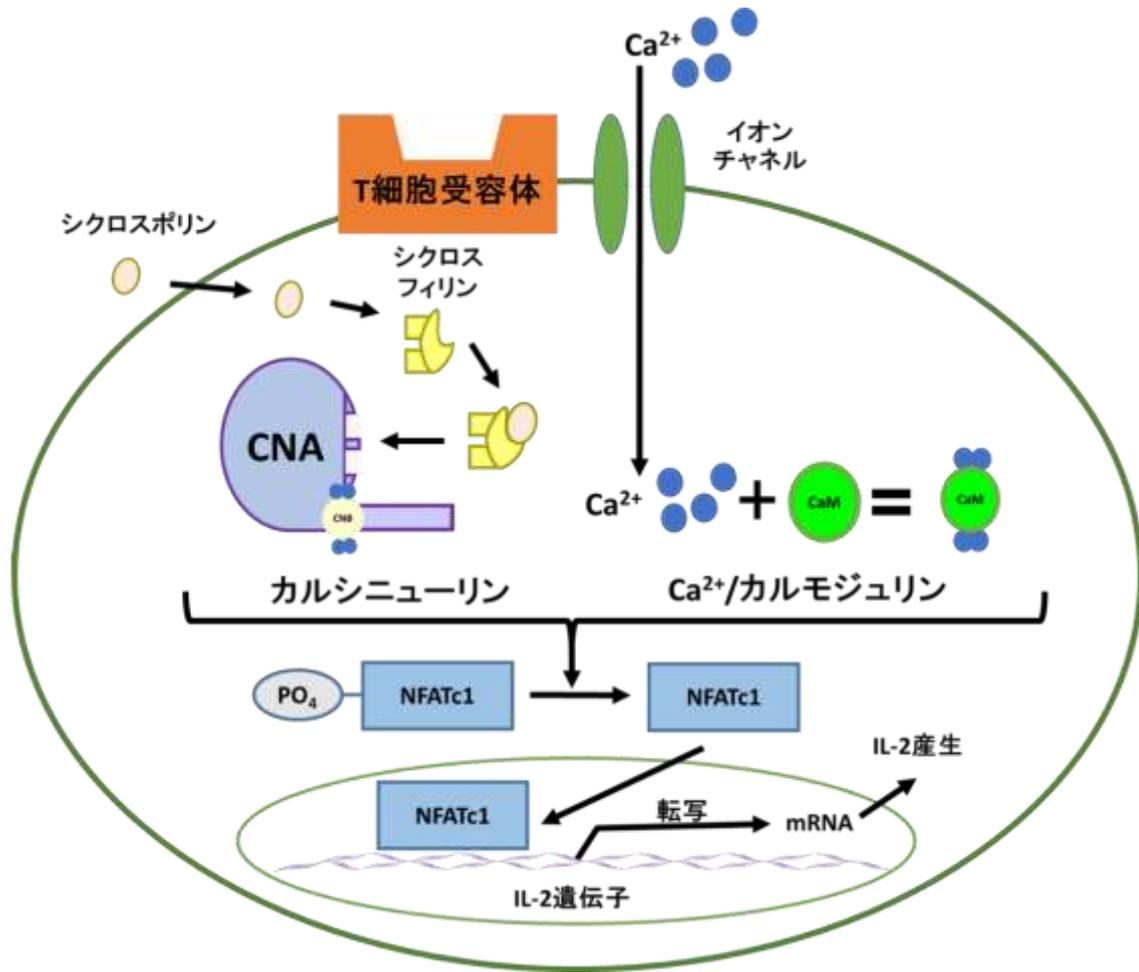


図1 カルシニューリンを介した IL-2 mRNA 発現と免疫抑制剤の作用機構（参考文献 24 を改変）

カルシニューリン（CN）はリン酸化型 NFATc1 の脱リン酸化反応を触媒する。脱リン酸化型 NFATc1 は核内に移行し、IL-2 mRNA の発現を促進する。免疫抑制剤シクロスポリンはシクロフィリンと結合し、CN 活性を阻害することにより、免疫抑制剤として機能する。

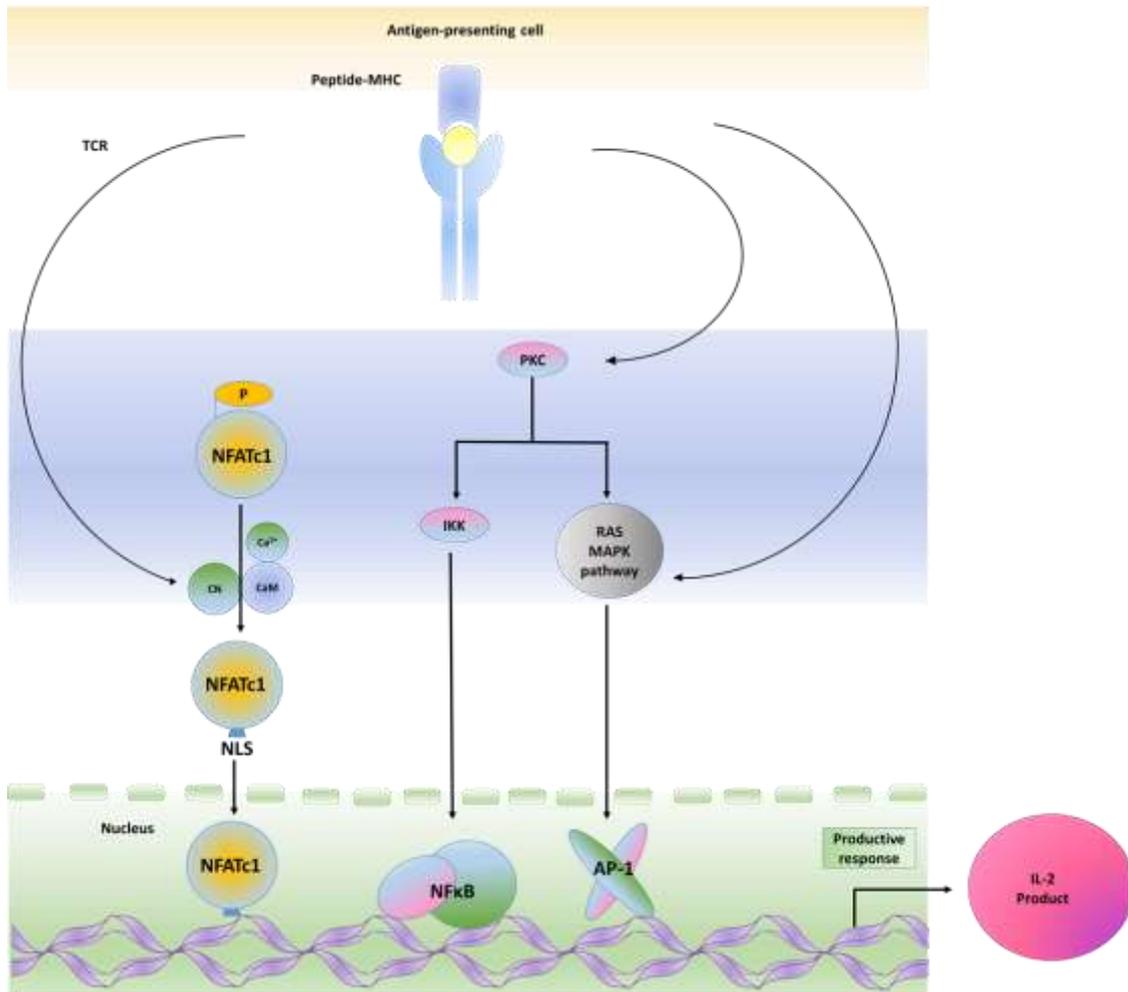


図2 T細胞における CN系、IKK系、MAPK系を介した IL-2 mRNA 発現（参考文献 25 を改変）

抗原提示を受けた T 細胞受容体により、CN、IKK、MAPK が活性化し、IL-2 mRNA 発現を制御する転写調節因子 NFATc1、NFκB、AP-1 の転写活性が促進される。

# 第一章

カルシニューリン (CN) 活性に対する  
ランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) の影響

## 1. 緒言

タンパク質脱リン酸化酵素の一種であるセリン/トレオニンホスファターゼ (PP) は PP1、PP2A、PP2B、PP2C、PP4、PP5、PP6、PP7 のサブファミリーに分類されている<sup>17)</sup>。この中でも PP2B、別名カルシニューリン (CN) は PP1、PP2A、PP4、PP5、PP6、PP7 とともにホスホプロテインホスファターゼ (PPP) ファミリーを形成し、カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) /カルモジュリン (CaM) 依存性セリン/トレオニンホスファターゼとして知られている。PPP ファミリーの構造上の特徴は、触媒サブユニットと調節サブユニットとが会合するホロ酵素であり、CN の場合、触媒サブユニット A (CNA : 分子量 61 KDa) と制御サブユニット B (CNB : 分子量 19 KDa) からなる (図 3)<sup>26,27)</sup>。また CNA には、CaM 結合ドメイン、CNB 結合ドメイン、C 末端自己活性阻害ドメインなどが存在し、鉄イオン ( $\text{Fe}^{2+}$ ) と亜鉛イオン ( $\text{Zn}^{2+}$ ) 2 個の金属イオンを活性中心に内在しており<sup>28-31)</sup>、CNB は、4 つの EF ハンドモチーフにそれぞれ 1 つずつの  $\text{Ca}^{2+}$  を結合している特徴を持つ (図 3)。

CN は酵母から高等動物までの生物の全ての細胞に存在する酵素であるが、特に高等動物では細胞性免疫に関わる細胞内情報伝達系において重要な役割を果たしている<sup>32)</sup>。T 細胞において細胞性免疫に関与するインターロイキン-2 (IL-2) mRNA の発現

は、転写調節因子の一つである Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1 (NFATc1) により制御されているが、CN はリン酸化型 NFATc1 を脱リン酸化することにより活性型に変化させ、IL-2 mRNA の発現を増加させることにより細胞性免疫を高める<sup>22)</sup>。臓器移植などの際に臨床で使用される免疫抑制剤タクロリムス (FK506) やシクロスポリンは細胞内で FK506 結合タンパク質 (FKBP) やシクロフィリンといったイムノフィリンと結合し、このタンパク質複合体が CN のホスファターゼ活性を阻害することから、CN は免疫抑制剤の標的酵素となっている<sup>23)</sup>。しかしながら、FK506 やシクロスポリンはイムノフィリンを介して間接的に CN を阻害するので、腎障害や発癌などの副作用が起こる問題がある (図 4、5)。

本章では、CN 阻害を介した免疫抑制剤探索の基盤として、ランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ )

を中心に希土類元素の CN 活性に対する影響を、ウシ脳由来の CN (bCN) とリコンビナントヒト CN (rhCN) を用いて検討した。

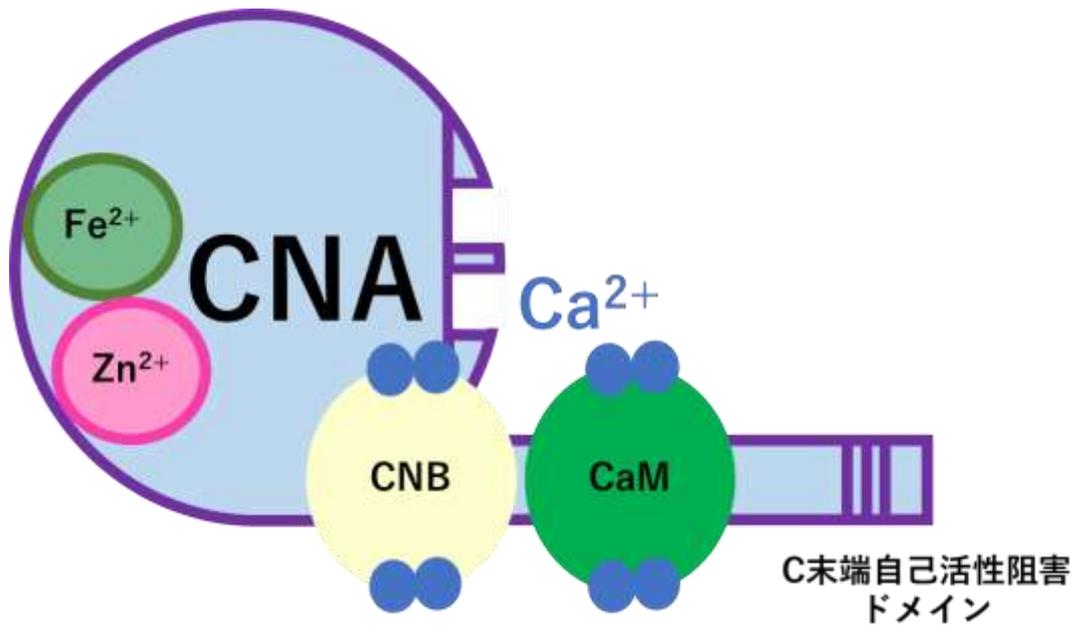


図3 カルシニューリンの構造

触媒サブユニット A (CNA : 分子量 61 KDa) と制御サブユニット B (CNB : 分子量 19 KDa) からなる。CNA には、CaM 結合ドメイン、CNB 結合ドメイン、C 末端自己活性阻害ドメインなどが存在し、鉄イオン ( $\text{Fe}^{2+}$ ) と亜鉛イオン ( $\text{Zn}^{2+}$ ) の金属イオン 2 個を活性中心に内在している。CNB は、4 つの EF ハンドモチーフにそれぞれ  $\text{Ca}^{2+}$  を結合している。

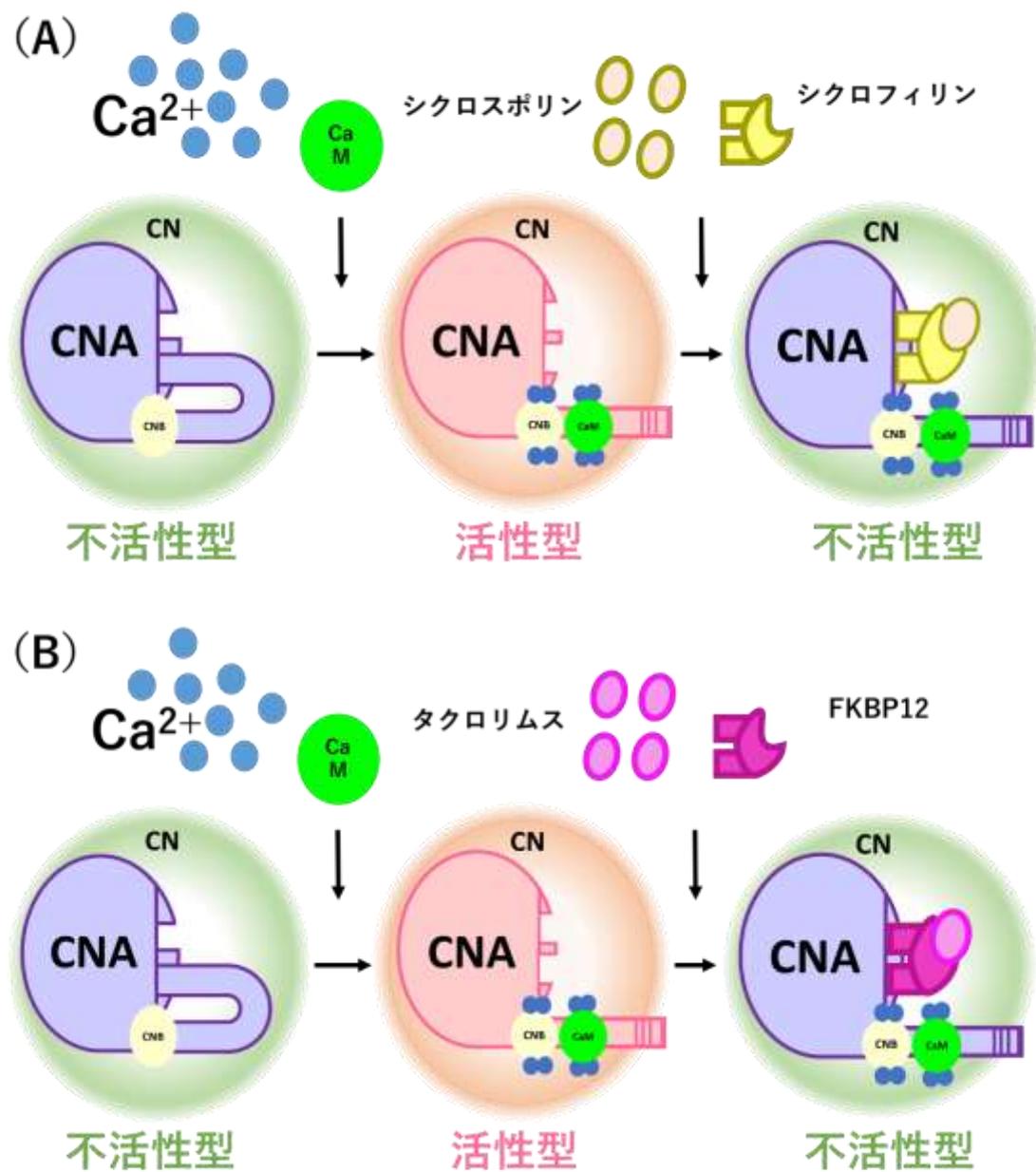


図4 免疫抑制剤のカルシニューリン活性の阻害（文献33を改変）

- (A) 免疫抑制剤シクロスポリンはシクロフィリンと結合して複合体を形成し、カルシニューリン活性を阻害する。
- (B) 免疫抑制剤タクロリムスはFKBP12と結合して複合体を形成し、カルシニューリン活性を阻害する。

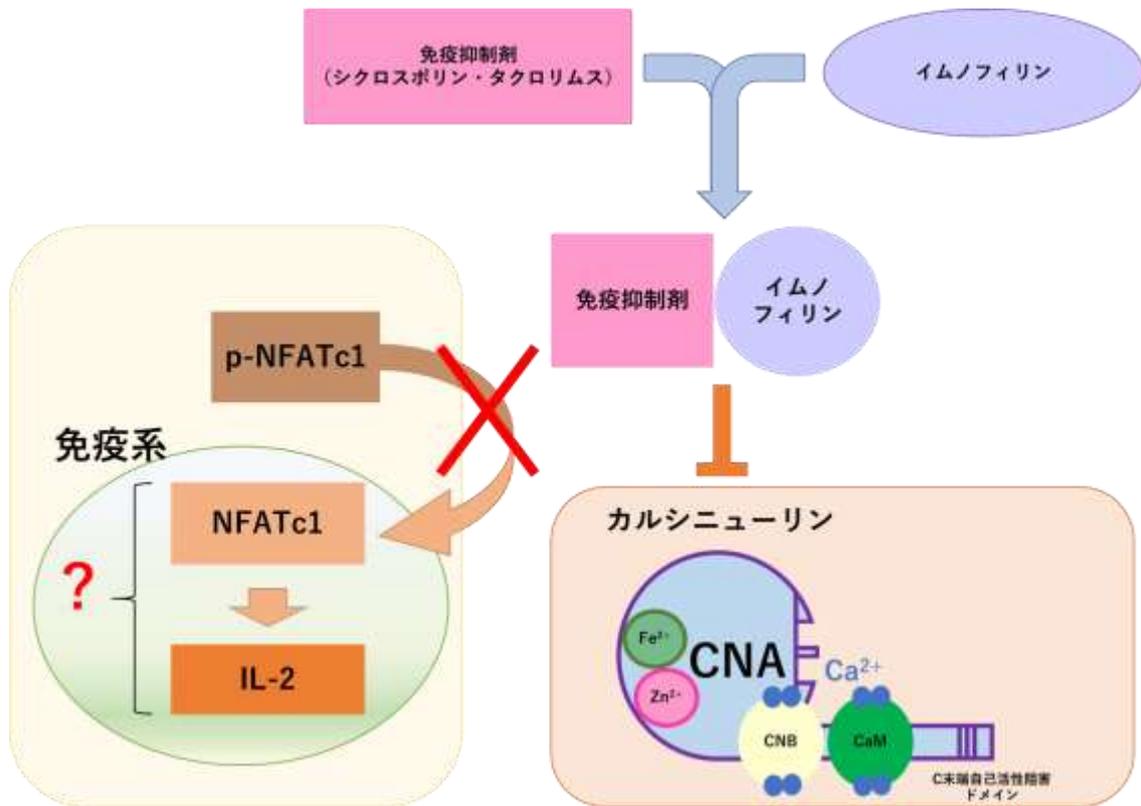


図5 カルシニューリンを介した細胞性免疫抑制の作用機序

免疫抑制剤はイムノフィリンと結合して複合体を形成し、カルシニューリン (CN) によるリン酸化型 NFATc1 の脱リン化反応を阻害する。リン酸化型 NFATc1 の脱リン酸化は IL-2mRNA の発現に必要なため、結果として細胞性免疫に関わるサイトカイン IL-2 の mRNA の発現が抑制される。

## 2. 試料および方法

### 2-1. 試料および試薬

Enzo 社からリコンビナントヒトカルシニューリン (rhCN) を含む Calcineurin Phosphatase Assay Kit、Jena Bioscience 社から 1M pH 7.5 HEPES、SIGMA 社からウシ精巢由来カルモジュリン (CaM)、ウシ脳由来カルシニューリン (bCN) を購入した。

また、富士フィルム 和光純薬社より、塩化カルシウム ( $\text{CaCl}_2$ )、炭酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )、塩化ニッケル ( $\text{NiCl}_2$ )、塩化マグネシウム ( $\text{MgCl}_2$ )、*p*-ニトロフェニルリン酸 (*p*NPP)、*p*-ニトロフェノール (*p*NP) を購入し、希土類元素として塩化スカンジウム ( $\text{ScCl}_3$ )、塩化イットリウム ( $\text{YCl}_3$ )、塩化ランタン ( $\text{LaCl}_3$ )、塩化サマリウム ( $\text{SmCl}_3$ )、塩化ユーロピウム ( $\text{EuCl}_3$ )、塩化テルビウム ( $\text{TbCl}_3$ )、塩化ホルミウム ( $\text{HoCl}_3$ )、塩化エルビウム ( $\text{ErCl}_3$ )、塩化ツリウム ( $\text{TmCl}_3$ )、塩化イッテルビウム ( $\text{YbCl}_3$ )、塩化ルテチウム ( $\text{LuCl}_3$ ) をそれぞれ購入した。

### 2-2. 実験方法

#### 2-2-1. ウシ脳由来カルシニューリン (bCN) 活性の測定

酵素反応溶液の組成は、0.1 M HEPES-NaOH (pH7.5)、1 mM  $\text{CaCl}_2$ 、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、ウシ精巢由来 CaM 2.5 U、bCN 1 U とし、ニッケル刺激については  $\text{NiCl}_2$  を終濃度で 0.2 mM、マンガン刺激では  $\text{MnCl}_2$  を終濃度で 1 mM それぞれマイクロチューブに添加した。これに任意濃度の  $\text{LaCl}_3$ 、 $\text{ScCl}_3$ 、 $\text{YCl}_3$  をそれぞれ加え、終濃度で 3 mM *p*NPP を添加することにより反応を開始し、37°C で 60 分酵素反応を行った。反応を終濃度で 0.8 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  を加えることにより停止させ、CN 活性は、生成した *p*NP を波長 410 nm の吸光度 (HITACHI U-5100) で測定することによって行った。なお、既知濃度の *p*NP を 410 nm で同様に測定し、検量線を作成することにより、酵素活性の計算を行った。

### 2-2-2. ウシ脳由来カルシニューリン (bCN) 活性阻害のキネティクス解析

bCN 活性に対する  $\text{La}^{3+}$  の阻害様式を明らかとするために行ったラインウィーバーバークの逆数プロット解析は、0.2 mM の  $\text{NiCl}_2$  を添加した酵素反応液に終濃度で  $\text{LaCl}_3$  なし (0  $\mu\text{M}$ )、7.0  $\mu\text{M}$  あるいは 10  $\mu\text{M}$  をそれぞれ添加して一定濃度で固定した。さらに、基質である pNPP を終濃度でそれぞれ 0.33 mM、0.5 mM、1 mM、3 mM、5 mM 添加して、37°C、60 分で反応させた。それぞれの基質濃度 ( $S$ ) と反応速度 ( $v$ ) の逆数、 $1/S$ 、 $1/v$  をプロットし、阻害様式を求めた。

### 2-2-3. リコンビナントヒトカルシニューリン (rhCN) 活性測定

Enzo 社の Calcineurin Phosphatase Assay Kit を用いて rhCN 活性測定を行った。測定方法は、キット付属のプロトコールに従って測定を行った。酵素反応溶液 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM NaCl、0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ 、6 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.5 mM DTT、0.025% NP-40 にそれぞれ 8 U/ $\mu\text{L}$  の rhCN<sup>34)</sup> と 0.25  $\mu\text{M}$  CaM を添加したものを標準酵素反応液とした。これに任意の濃度の  $\text{ScCl}_3$ 、 $\text{YCl}_3$ 、 $\text{LaCl}_3$ 、 $\text{SmCl}_3$ 、 $\text{EuCl}_3$ 、 $\text{TbCl}_3$ 、 $\text{HoCl}_3$ 、 $\text{ErCl}_3$ 、 $\text{TmCl}_3$ 、 $\text{YbCl}_3$ 、 $\text{LuCl}_3$  をそれぞれ加え、基質として 150  $\mu\text{M}$  の R II リン酸化ペプチド (Asp-Leu-Asp-Val-Pro-Ile-Pro-Gly-Arg-Phe-Asp-Arg-Arg-Val-pSer-Val-Ala-Ala-Glu)<sup>35,36)</sup> を加え、30°C で 60 分間酵素反応を行った。60 分後、この反応液の 2 倍量のマラカイトグリーンを添加し、酵素反応の結果、生成したリン酸を波長 620 nm の吸光度 ( $A_{620}$ ) をマイクロプレートリーダー (CORONA ELECTRIC SH-1000Lab) で測定することにより、CN の酵素活性を求めた<sup>37,38)</sup>。なお、既知濃度のリン酸を 620 nm で同様に測定し、検量線を作成することにより、酵素活性の計算を行った。

### 2-2-4. リコンビナントヒトカルシニューリン (rhCN) 活性阻害のキネティクス解析

rhCN 活性に対する  $\text{La}^{3+}$  の阻害様式を明らかとするために行った逆数プロット解析は、標準酵素反応液に終濃度で  $\text{LaCl}_3$  なし (0  $\mu\text{M}$ ) あるいは 10  $\mu\text{M}$  を添加して一定濃度で固定し、さらに、基質である R II リン酸化ペプチドをそれぞれ 10  $\mu\text{M}$ 、15  $\mu\text{M}$ 、30

$\mu\text{M}$ 、 $90 \mu\text{M}$ 、 $150 \mu\text{M}$  添加して  $30^\circ\text{C}$  で 60 分間反応させた。反応速度と基質濃度の逆数をプロットし、阻害様式を求めた。

$\text{La}^{3+}$  の阻害定数  $K_i$  を求めるために行った Quotient velocity プロット解析<sup>39,40)</sup> は、標準酵素反応液に終濃度で R II リン酸化ペプチドをそれぞれ  $75 \mu\text{M}$ 、 $150 \mu\text{M}$  添加して一定濃度で固定し、さらに任意の濃度の  $\text{LaCl}_3$  をそれぞれ加え、 $30^\circ\text{C}$  で 60 分間反応させた。 $\text{LaCl}_3$  の濃度と  $(V-v)/v$  ( $V$ : 最大反応速度、 $v$ :  $\text{LaCl}_3$  存在下でのそれぞれの反応速度) をプロットし、 $K_i$  を求めた。

#### 2-2-5. 統計処理

得られた結果は、Dunnett 検定 (Excel 2016:Microsoft Corporation) で解析を行い、酵素活性阻害実験で得られた 50% 阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}$ )、95% 信頼区間 (95% CI) は、GraphPad Prism 8 (GraphPad Software) を用いて非線形回帰による分析で求めた。

有意水準は  $p < 0.05$  または  $p < 0.01$  とした。

### 3. 結果

免疫抑制剤の標的酵素であるカルシニューリン (CN) を介した免疫抑制剤の探索の基盤として、ランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) を中心に希土類元素の CN のホスファターゼ活性に対する検討をウシ脳由来 CN (bCN) とリコンビナントヒト CN (rhCN) を使用して行った。

#### 3-1. ランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) のニッケルイオン ( $\text{Ni}^{2+}$ ) 刺激したウシ脳由来カルシニューリン (bCN) 活性に対する影響

塩化ランタン ( $\text{LaCl}_3$ ) を使用して 0.2 mM の  $\text{Ni}^{2+}$  で活性化 (刺激) した bCN 活性に対する影響を *in vitro* で検討した。その結果、図 6 に示すように  $\text{LaCl}_3$  の量を増やすと CN 活性が低下することが示され、100  $\mu\text{M}$  の  $\text{LaCl}_3$  では活性がほぼ 0 になった。従って、ランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) は bCN 活性を阻害することが明らかとなった。また 50% 阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) は、6.7  $\mu\text{M}$  (95%信頼区間 (95%CI) 4.8 - 9.4  $\mu\text{M}$ ) であった (表 1)。

#### 3-2. スカンジウムイオン ( $\text{Sc}^{3+}$ )、イットリウムイオン ( $\text{Y}^{3+}$ ) のニッケルイオン ( $\text{Ni}^{2+}$ ) 刺激したウシ脳由来カルシニューリン (bCN) 活性に対する影響

$\text{La}^{3+}$  が  $\text{Ni}^{2+}$  で活性化 (刺激) した bCN 活性を阻害することが明らかとなったため、 $\text{La}^{3+}$  よりも原子量が小さい  $\text{Sc}^{3+}$ 、 $\text{Y}^{3+}$  について  $\text{Ni}^{2+}$  刺激した CN 活性の検討を行った。図 7、8 に示すように塩化スカンジウム ( $\text{ScCl}_3$ ) と塩化イットリウム ( $\text{YCl}_3$ ) の測定系への添加量をそれぞれ増やすと CN 活性が低下することが示され、興味深いことに 2 つの希土類元素では二段階の阻害を示すことが明らかとなった。また 50% 阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) は、 $\text{Sc}^{3+}$  で 3.9  $\mu\text{M}$  (95%CI 2.9 - 5.7  $\mu\text{M}$ )、 $\text{Y}^{3+}$  で 22.7  $\mu\text{M}$  (95%CI 12.5 - 40.9  $\mu\text{M}$ ) であった (表 1)。

### 3-3. ランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ )、イットリウムイオン ( $\text{Y}^{3+}$ ) のマンガンイオン ( $\text{Mn}^{2+}$ ) 刺激したウシ脳由来カルシニューリン (bCN) 活性に対する影響

$\text{Ni}^{2+}$  刺激した bCN について、 $\text{La}^{3+}$ 、 $\text{Sc}^{3+}$ 、 $\text{Y}^{3+}$  がそれぞれ CN のホスファターゼ活性を阻害することが明らかとなったため、 $\text{Mn}^{2+}$  で活性化(刺激)した bCN について  $\text{LaCl}_3$ 、 $\text{YCl}_3$  を用いて同様の検討を試みた。図 9 で示すように  $\text{LaCl}_3$  を増やすと  $\text{Ni}^{2+}$  刺激した bCN と同様に CN 活性の低下が観察され、 $30 \mu\text{M}$  の  $\text{LaCl}_3$  では活性がほぼ 0 になった。一方、 $\text{YCl}_3$  では、一旦活性化した後に阻害が観察された(図 10)。50% 阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) は、 $\text{La}^{3+}$  で  $1.7 \mu\text{M}$  (95% CI 1.1 - 2.5  $\mu\text{M}$ )、 $\text{Y}^{3+}$  で  $272.2 \mu\text{M}$  (95% CI 195.3 - 428.1  $\mu\text{M}$ ) であった。(表 1)。

### 3-4. ランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) のニッケルイオン ( $\text{Ni}^{2+}$ ) 刺激したウシ脳由来カルシニューリン活性 (bCN) 阻害のキネティクス解析

$\text{La}^{3+}$  のニッケルイオン ( $\text{Ni}^{2+}$ ) 刺激した bCN 活性阻害のメカニズムを検討するために、キネティクス解析を行った。 $\text{LaCl}_3$  なし ( $0 \mu\text{M}$ )、あるいは  $\text{LaCl}_3$  を  $7.0 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$  でそれぞれ一定の濃度にし、基質として使用した *p*NPP (*p*-ニトロフェニルリン酸) の濃度を変えて(終濃度でそれぞれ  $0.33 \text{ mM}$ 、 $0.5 \text{ mM}$ 、 $1 \text{ mM}$ 、 $3 \text{ mM}$ 、 $5 \text{ mM}$ ) CN 活性を測定した。図 11 に示すように基質濃度 ( $S$ ) と反応速度 ( $v$ ) についてラインウイバーバークの二重逆数プロットを作成し、 $\text{La}^{3+}$  の阻害様式を検討した。この結果、 $\text{LaCl}_3$  なし ( $0 \mu\text{M}$ )、 $5 \mu\text{M}$ 、 $7.5 \mu\text{M}$  のそれぞれの直線は第 2 象限で交差し、 $\text{La}^{3+}$  は混合阻害により CN 活性を阻害することが明らかとなった。これは  $\text{La}^{3+}$  は CN-*p*NPP 複合体あるいは CN 単独の双方に異なる阻害定数  $K_i$ 、 $K'_i$  で結合することを表しており、図 11 に示す直線は第 2 象限で交差していることから、 $K_i > K'_i$  であることが考えられた。また、図 11 から  $\text{LaCl}_3$  なし ( $0 \mu\text{M}$ )、 $5 \mu\text{M}$ 、 $7.5 \mu\text{M}$  のそれぞれの最大反応速度  $V_{\text{max}}$  とミカエリス定数  $K_m$  を求めたところ表 1 のようになった。 $V_{\text{max}}$  は  $33.6 \text{ nmol}/60\text{min}$  から  $\text{La}^{3+}$  の添加によって、 $22.2 \text{ nmol}/60 \text{ min}$ 、 $16.8 \text{ nmol}/60 \text{ min}$  と低下し、一方、 $K_m$  は  $0.500 \text{ mM}$ 、 $1.00 \text{ mM}$ 、 $1.25 \text{ mM}$  と増加することが示された(表 1)。

### 3-5. 希土類元素のリコンビナントヒトカルシニューリン (rhCN) 活性に対する影響

3-2、3-3、3-4、3-5 において、 $\text{La}^{3+}$ 、 $\text{Sc}^{3+}$ 、 $\text{Y}^{3+}$ が  $\text{Ni}^{2+}$ 刺激した bCN を阻害し、 $\text{La}^{3+}$ については混合型阻害により bCN を阻害することが明らかとなった。また  $\text{La}^{3+}$ 、 $\text{Y}^{3+}$ は  $\text{Mn}^{2+}$ 刺激した bCN についてもホスファターゼ活性を阻害することが示された。ここではランタンおよび希土類元素全般について、ヒトの細胞性免疫に対する影響を検討する目的で、リコンビナントヒト CN (rhCN) を用いて検討を行った。

図 12 に示すように R II リン酸化ペプチド (Asp-Leu-Asp-Val-Pro-Ile-Pro-Gly-Arg-Phe-Asp-Arg-Arg-Val-pSer-Val-Ala-Ala-Glu) を基質として使用した酵素反応系に  $\text{LaCl}_3$  を添加していくと CN のホスファターゼ活性は阻害され、 $100 \mu\text{M}$  の  $\text{LaCl}_3$  では活性がほぼ 0 になった。従って、 $\text{La}^{3+}$ は  $\text{Ni}^{2+}$ 刺激した bCN、 $\text{Mn}^{2+}$ 刺激した bCN 同様に rhCN 活性を阻害することが明らかとなった。また  $\text{IC}_{50}$  は、 $9.5 \mu\text{M}$  (95%CI 8.9 - 10.1  $\mu\text{M}$ ) であった (表 2)。

次に希土類元素で  $\text{La}^{3+}$ よりも原子量が小さい  $\text{Sc}^{3+}$ 、 $\text{Y}^{3+}$ について  $\text{ScCl}_3$ 、 $\text{YCl}_3$  を用いて同様の検討を試みた。図 13 に示すように濃度に差があるものの  $\text{Sc}^{3+}$ 、 $\text{Y}^{3+}$ ともに  $\text{La}^{3+}$ と同様に rhCN に対して阻害作用を認めた。また、はそれぞれ  $3.3 \mu\text{M}$  (95%CI 2.8 - 3.9  $\mu\text{M}$ )、 $9.4 \mu\text{M}$  (95%CI 9.0 - 9.8  $\mu\text{M}$ ) であった (表 2)。次に希土類元素の中で 8 種類のランタノイドを使用して、rhCN のホスファターゼ活性に対する阻害の影響を検討した (図 14)。 $5 \mu\text{M}$  および  $10 \mu\text{M}$  の塩化サマリウム ( $\text{SmCl}_3$ )、塩化ユーロピウム ( $\text{EuCl}_3$ )、塩化テルビウム ( $\text{TbCl}_3$ )、塩化ホルミウム ( $\text{HoCl}_3$ )、塩化エルビウム ( $\text{ErCl}_3$ )、塩化ツリウム ( $\text{TmCl}_3$ )、塩化イッテルビウム ( $\text{YbCl}_3$ )、塩化ルテチウム ( $\text{LuCl}_3$ ) をそれぞれ使用して rhCN 活性を測定したところ、作用する濃度に差があるもの rhCN を阻害することが明らかとなった。特に  $10 \mu\text{M}$  では使用した 8 種類の希土類元素の中で  $\text{SmCl}_3$  以外の 7 種類において CN 活性が有意に低下しており (図 14-B)、希土類元素は rhCN のホスファターゼ活性を阻害することが予想された。

### 3-6. ランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) のリコンビナントヒトカルシニューリン (rhCN) 活性阻害のキネティクス解析

次に希土類元素の rhCN 活性阻害のメカニズムを明らかとするために、 $\text{La}^{3+}$ に着目してキネティクス解析を行い検討した。 $\text{LaCl}_3$ なし ( $0 \mu\text{M}$ )、あるいは  $10 \mu\text{M}$  でそれぞれ一定の濃度に固定し、基質として使用した RII リン酸化ペプチドの濃度を変えて (終濃度でそれぞれ  $10 \mu\text{M}$ 、 $15 \mu\text{M}$ 、 $30 \mu\text{M}$ 、 $90 \mu\text{M}$ 、 $150 \mu\text{M}$ )、CN のホスファターゼ活性を測定した。

図 15 に示すように基質濃度 ( $S$ ) と反応速度 ( $v$ ) についてラインウイバーバークの二重逆数プロットを作成し、 $\text{La}^{3+}$ の rhCN に対する阻害様式を検討したところ、 $\text{LaCl}_3$ なし ( $0 \mu\text{M}$ ) とあり ( $10 \mu\text{M}$ ) のそれぞれの直線はグラフの第 3 象限で交差、この結果、 $\text{La}^{3+}$ は  $\text{Ni}^{2+}$ 刺激した bCN 同様に rhCN においても混合阻害により活性を阻害することが示された。これは  $\text{La}^{3+}$ は rhCN 単独あるいは rhCN-RII リン酸化ペプチド複合体の双方に異なる阻害定数  $K'i$  でそれぞれ結合することを表しており、図 15 に示す直線は第 3 象限で交差していることから、 $K_i < K'i$  であることが予想された。従って、 $K_i$ 、 $K'i$  を求めるために、Quotient velocity プロット解析<sup>34,35)</sup>を行った。実際には、基質である RII リン酸化ペプチドの濃度をそれぞれ  $75 \mu\text{M}$ 、 $150 \mu\text{M}$  で固定し、 $\text{LaCl}_3$ の濃度を変えて (終濃度でそれぞれ  $2.5 \mu\text{M}$ 、 $5.0 \mu\text{M}$ 、 $7.5 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ ) CN 活性を測定した。図 16 に示すように X 軸に  $\text{LaCl}_3$ の濃度、Y 軸に{(最大反応速度-反応速度)/反応速度}の値をとり 2 本の直線が交差する点の座標 ( $x$ ,  $y$ ) から  $K_i$  と  $K'i$  を次式①、②により、求めた。

$$K_i = -x \cdot \cdot \cdot \textcircled{1}$$

$$K_i / K'i = -y \cdot \cdot \cdot \textcircled{2}$$

結果、 $K_i$  が  $7.0 \mu\text{M}$ 、 $K'i$  が  $10.2 \mu\text{M}$  であり、予想通り、 $K'i$  が  $K_i$  よりも大きい値となった (表 2)。ただし  $K_i$ 、 $K'i$  とともに  $\text{IC}_{50}$  の  $9.5 \mu\text{M}$  と近い値を示した。また  $V_{\text{max}}$  は  $10.0 \text{ nmol}/60 \text{ min}$  から  $\text{La}^{3+}$ の添加によって、 $4.6 \text{ nmol}/60 \text{ min}$  と低下し、一方、 $K_m$  は  $55.6 \mu\text{M}$  から  $38.5 \mu\text{M}$  と減少することが示された (表 2)。

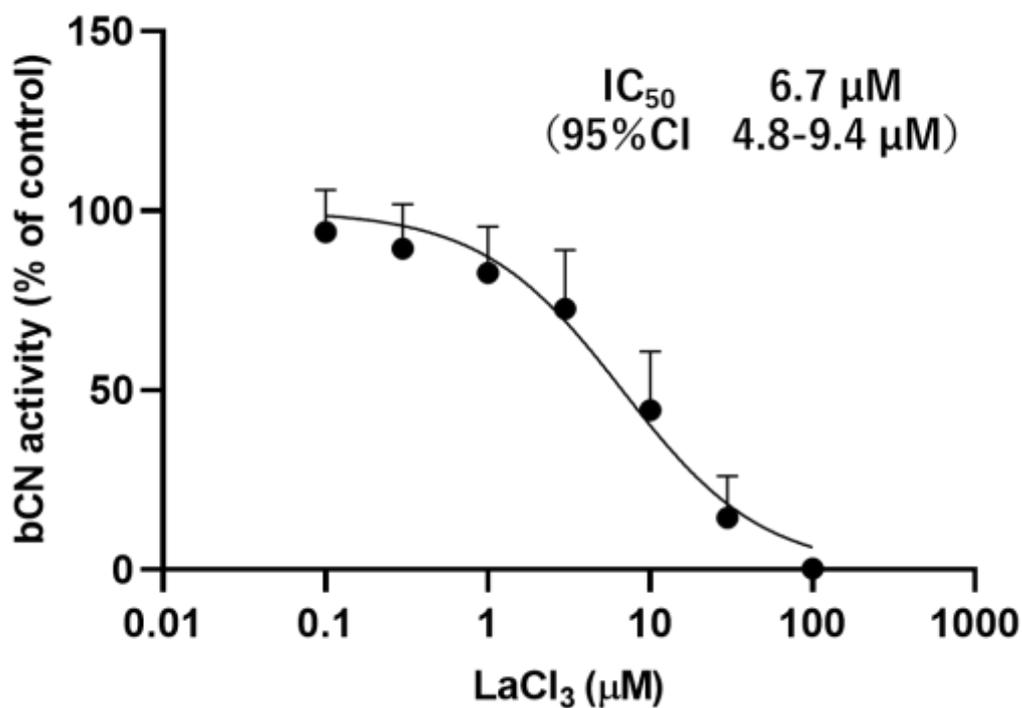


図6 ランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) によるニッケルイオン ( $\text{Ni}^{2+}$ ) 刺激したウシ脳由来カルシニューリン (bCN) のホスファターゼ活性の阻害

0.1 M HEPES-NaOH (pH7.5)、 $\text{CaCl}_2$  (1 mM)、 $\text{MgCl}_2$  (5 mM) の酵素反応溶液にウシ精巣由来 CaM (2.5 U)、bCN (1 U)、 $\text{NiCl}_2$  (0.2mM) をマイクロチューブに添加した。これに任意濃度の  $\text{LaCl}_3$  を加え、終濃度で 3 mM *p*NPP を添加することにより反応を開始し、37°C で 60 分酵素反応を行った。 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.8 M) の添加で反応停止させ、CN 活性は、生成した *p*NP を波長 410 nm の吸光度で測定することによって行った。

50%阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}$ )、95%信頼区間 (95%CI) は GraphPad Prism 8 を使用して計算した。

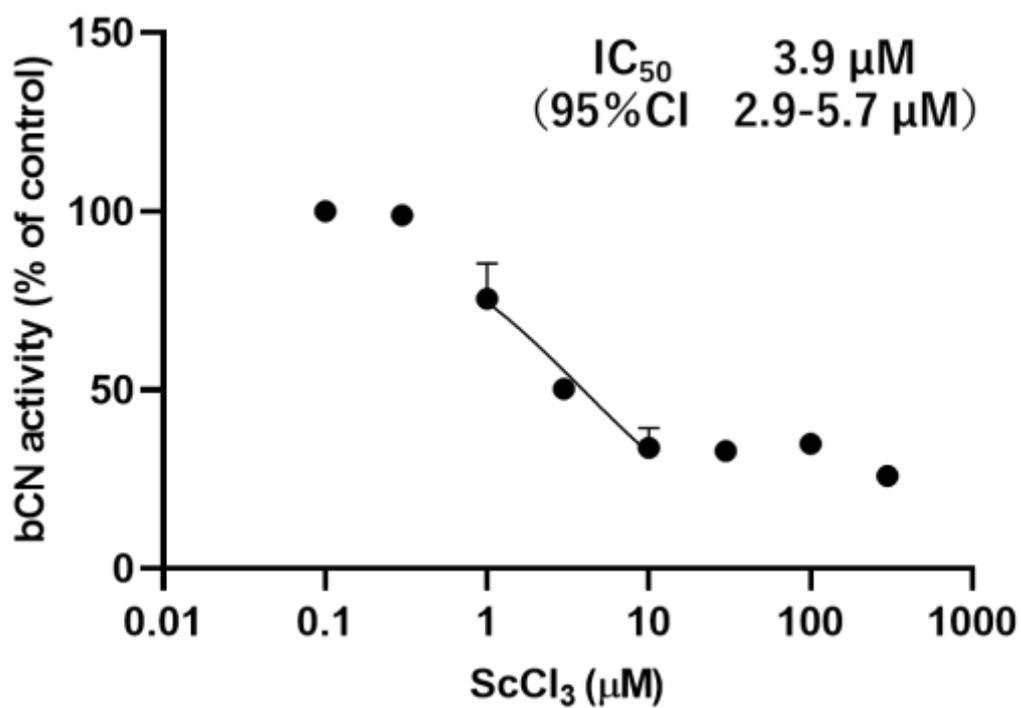


図7 スカンジウムイオン ( $\text{Sc}^{3+}$ ) によるニッケルイオン ( $\text{Ni}^{2+}$ ) 刺激したウシ脳由来カルシニューリン (bCN) のホスファターゼ活性の阻害

ScCl<sub>3</sub> を LaCl<sub>3</sub> の代わりに使い、図6と同様の方法でCN活性を測定した。

50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>)、95%信頼区間 (95%CI) は GraphPad Prism 8 を使用して計算した。

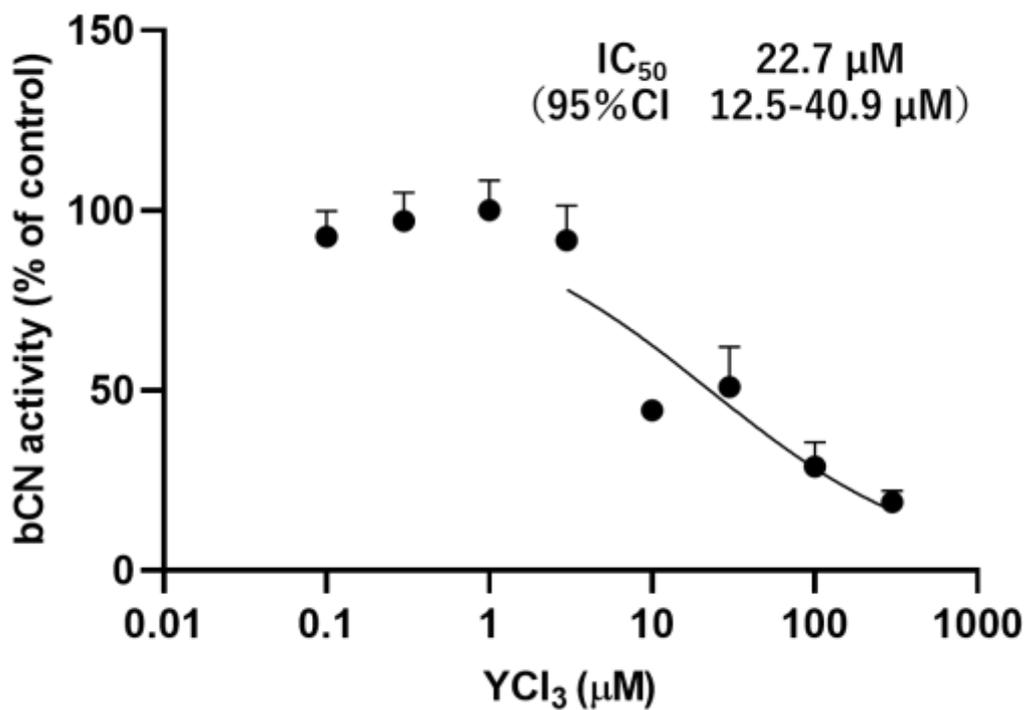


図 8 イットリウムイオン (Y<sup>3+</sup>) によるニッケルイオン (Ni<sup>2+</sup>) 刺激したウシ脳由来カルシニューリン (bCN) のホスファターゼ活性の阻害

YCl<sub>3</sub> を LaCl<sub>3</sub> の代わりに使い、図 6 と同様の方法で CN 活性を測定した。

50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>)、95%信頼区間 (95%CI) は GraphPad Prism 8 を使用して計算した。

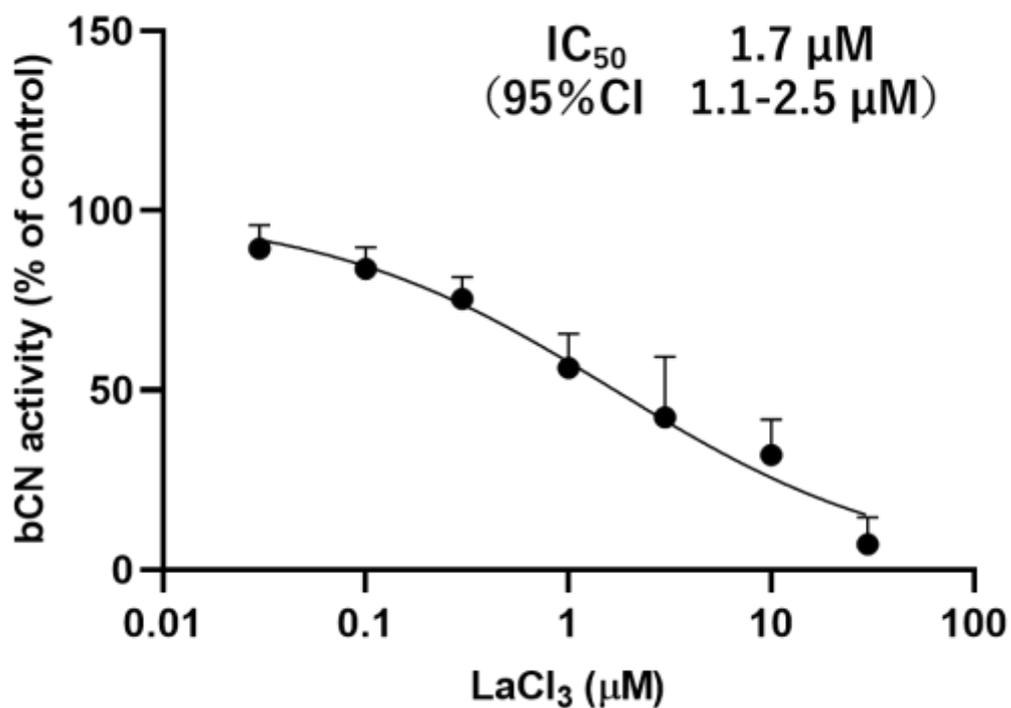


図9 ランタンイオン (La<sup>3+</sup>) によるマンガンイオン (Mn<sup>2+</sup>) 刺激したウシ脳由来カルシニューリン (bCN) のホスファターゼ活性の阻害

0.1 M HEPES-NaOH (pH7.5)、CaCl<sub>2</sub> (1 mM)、MgCl<sub>2</sub> (5 mM) の酵素反応溶液にウシ精巣由来 CaM (2.5 U)、bCN (1 U)、MnCl<sub>2</sub> (0.2mM) をマイクロチューブに添加した。これに任意濃度の LaCl<sub>3</sub> を加え、終濃度で 3 mM *p*NPP を添加することにより反応を開始し、37°C で 60 分酵素反応を行った。Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.8 M) の添加で反応停止させ、CN 活性は、生成した *p*NP を波長 410 nm の吸光度で測定することによって行った。

50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>)、95%信頼区間 (95%CI) は GraphPad Prism 8 を使用して計算した。

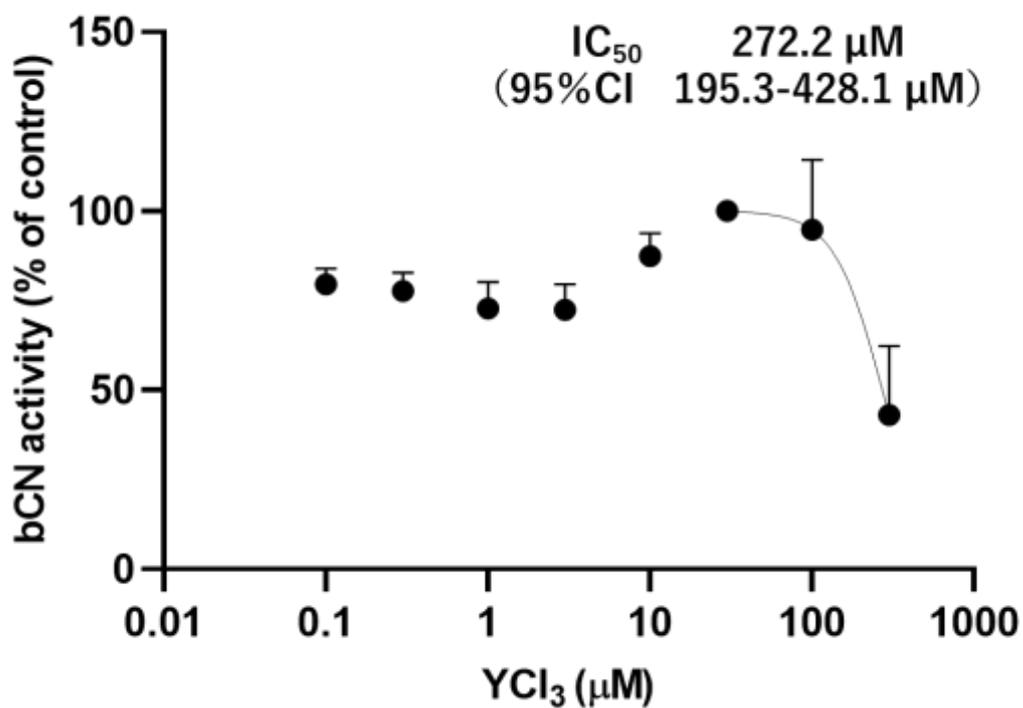


図 10 イットリウムイオン (Y<sup>3+</sup>) によるマンガンイオン (Mn<sup>2+</sup>) 刺激したウシ脳由来カルシニューリン (bCN) のホスファターゼ活性の阻害

YCl<sub>3</sub> を LaCl<sub>3</sub> の代わりに使い、図 9 と同様の方法で CN 活性を測定した。

50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>)、95%信頼区間 (95%CI) は GraphPad Prism 8 を使用して計算した。

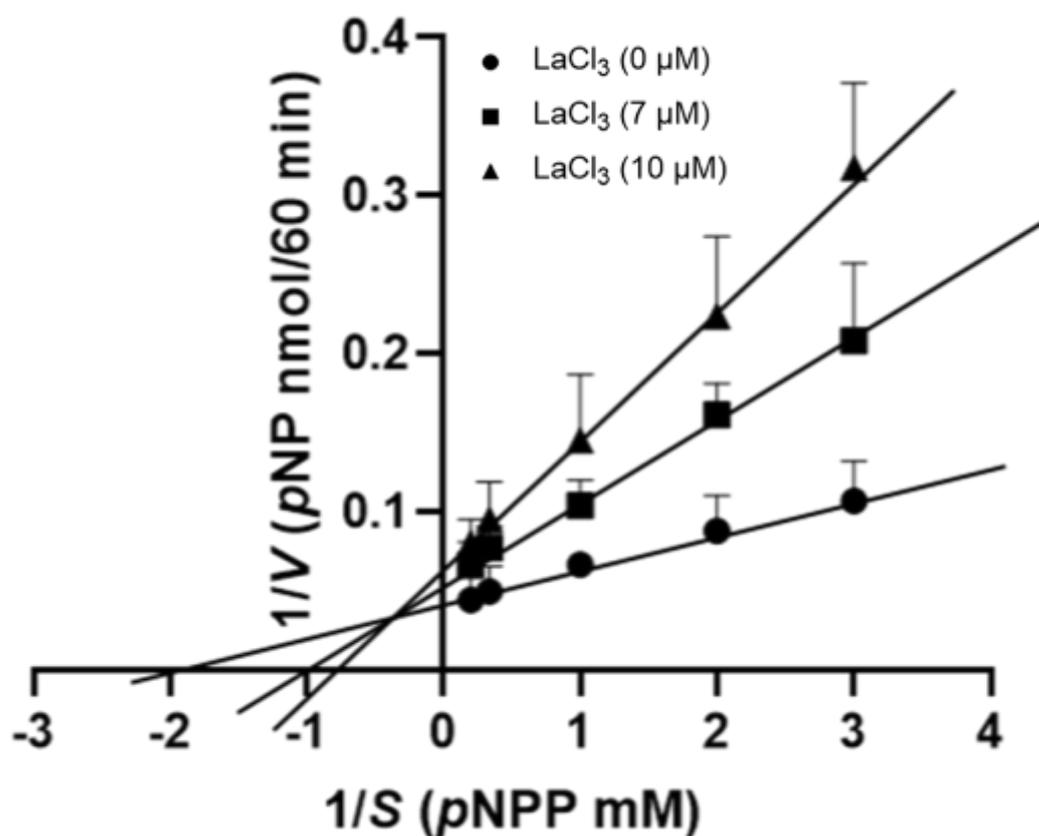


図 11 ニッケルイオン ( $\text{Ni}^{2+}$ ) 刺激したウシ脳由来カルシニューリン (bCN) 活性に対するランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) の阻害様式

酵素反応溶液 0.1 M HEPES-NaOH (pH7.5)、 $\text{CaCl}_2$  (1 mM)、 $\text{MgCl}_2$  (5 mM) の酵素反応溶液にウシ精巣由来 CaM (2.5 U)、bCN (1 U)、 $\text{NiCl}_2$  (0.2mM) を添加した。酵素反応液に終濃度で  $\text{LaCl}_3$  なし (0  $\mu\text{M}$ )、7.0  $\mu\text{M}$  あるいは 10  $\mu\text{M}$  を添加して一定濃度で固定し、基質である pNPP を終濃度でそれぞれ 0.33 mM、0.5 mM、1 mM、3 mM、5 mM 添加して、37°C、60 分で反応させた。反応速度と基質濃度の逆数をプロットし、阻害様式を求めた。

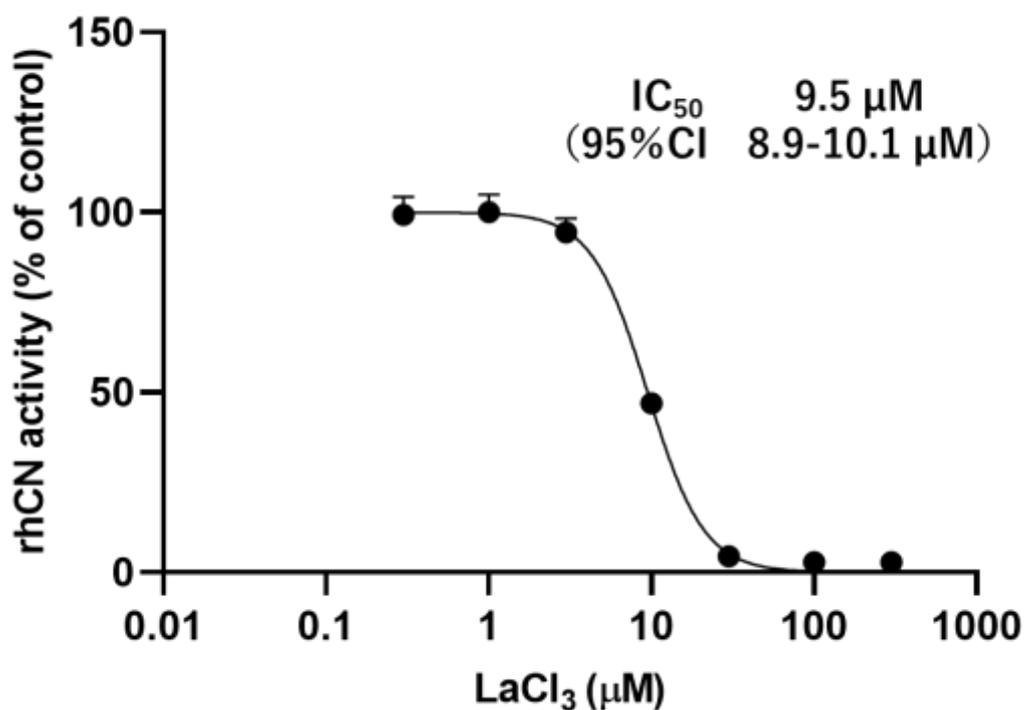


図 12 ランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) によるリコンビナントヒトカルシニューリン (rhCN) のホスファターゼ活性の阻害

酵素反応溶液 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、NaCl (100 mM)、 $\text{CaCl}_2$  (0.5 mM)、 $\text{MgCl}_2$  (6 mM)、DTT (0.5 mM)、NP-40 (0.025%) にそれぞれ rhCN (8 U/ $\mu\text{L}$ ) と CaM (0.25  $\mu\text{M}$ ) を添加したものを標準酵素反応液とした。これに任意の濃度の  $\text{LaCl}_3$  を加え、基質として RII リン酸化ペプチドを加え、30°C で 60 分間酵素反応を行った。60 分後にマラカイトグリーンを添加し、生成したリン酸を波長 620 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、CN の酵素活性を求めた。

50%阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}$ )、95%信頼区間 (95%CI) は GraphPad Prism 8 を使用して計算した。

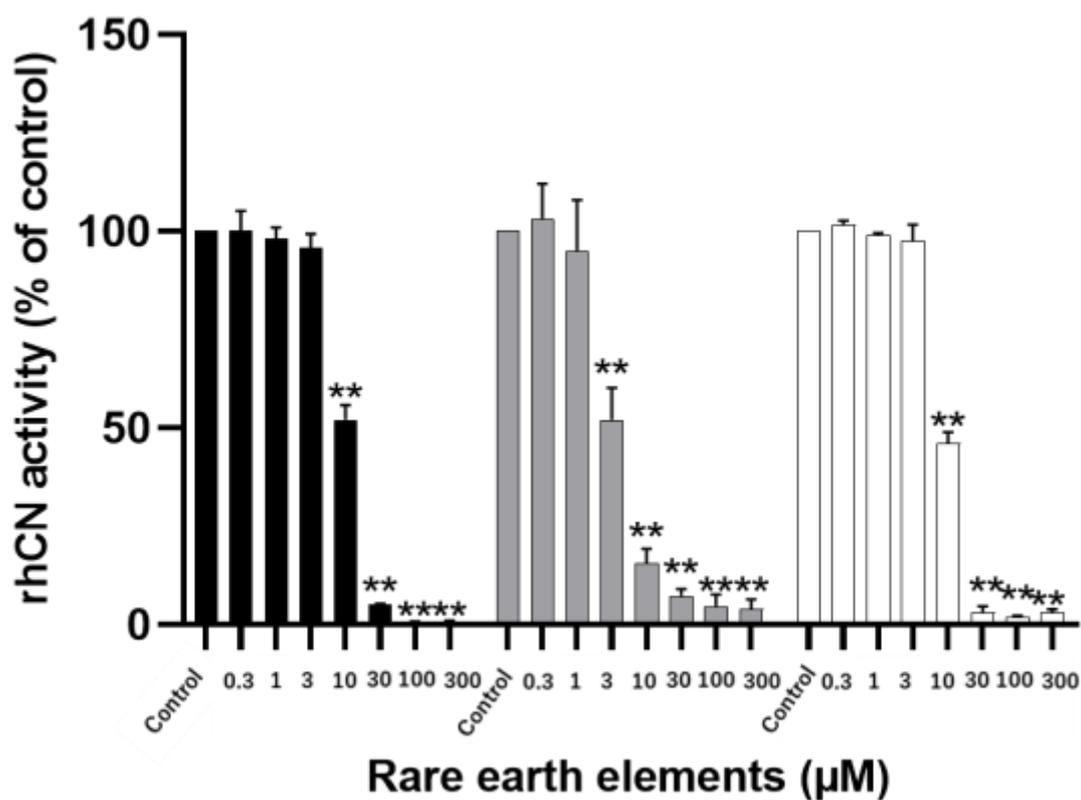


図 13 リコンビナントヒトカルシニューリン (rhCN) 活性に対するランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ )、スカンジウムイオン ( $\text{Sc}^{3+}$ )、イットリウムイオン ( $\text{Y}^{3+}$ ) の影響

酵素反応溶液 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、NaCl (100 mM)、 $\text{CaCl}_2$  (0.5 mM)、 $\text{MgCl}_2$  (6 mM)、DTT (0.5 mM)、NP-40 (0.025%) にそれぞれ rhCN (8 U/ $\mu\text{L}$ ) と CaM (0.25  $\mu\text{M}$ ) を添加したものを標準酵素反応液とした。これに任意の濃度の  $\text{LaCl}_3$ 、 $\text{ScCl}_3$ 、 $\text{YCl}_3$  を加え、基質として RII リン酸化ペプチドを加え、30°C で 60 分間酵素反応を行った。60 分後にマラカイトグリーンを添加し、生成したリン酸を波長 620 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、CN の酵素活性を求めた。

■:  $\text{LaCl}_3$ 、■:  $\text{ScCl}_3$ 、□:  $\text{YCl}_3$

Dunnett 検定 (Excel 2016) を使用してコントロールとの有意差 (\*\*  $p < 0.01$ ) を検定した。

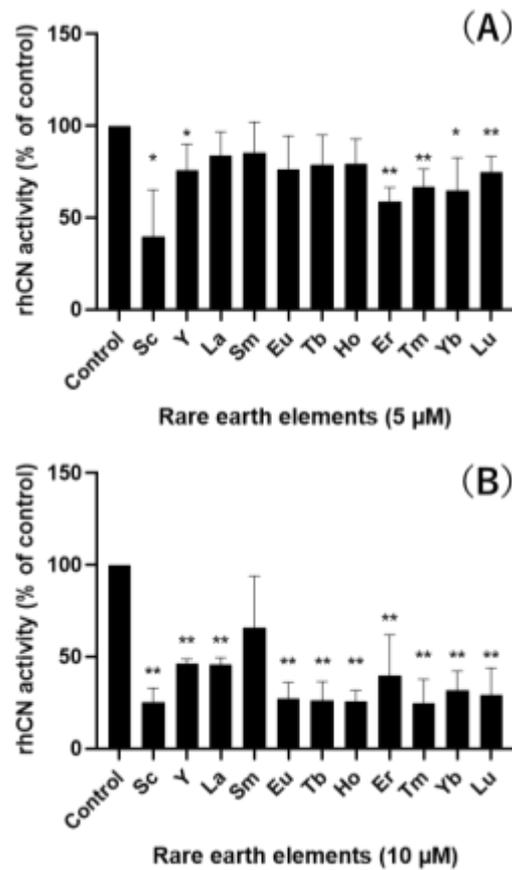


図 14 リコンビナントヒトカルシニューリン (rhCN) のホスファターゼ活性に対する希土類元素の影響 (A) 5  $\mu$ M、(B) 10  $\mu$ M

酵素反応溶液 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、NaCl (100 mM)、CaCl<sub>2</sub> (0.5 mM)、MgCl<sub>2</sub> (6 mM)、DTT (0.5 mM)、NP-40 (0.025%) にそれぞれ rhCN (8 U/ $\mu$ L) と CaM (0.25  $\mu$ M) を添加したものを標準酵素反応液とした。これに任意の濃度の ScCl<sub>3</sub>、YCl<sub>3</sub>、LaCl<sub>3</sub>、SmCl<sub>3</sub>、EuCl<sub>3</sub>、TbCl<sub>3</sub>、HoCl<sub>3</sub>、ErCl<sub>3</sub>、TmCl<sub>3</sub>、YbCl<sub>3</sub>、LuCl<sub>3</sub> を加え、基質として R II リン酸化ペプチドを加え、30°C で 60 分間酵素反応を行った。60 分後にマラカイトグリーンを添加し、生成したリン酸を波長 620 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、CN の酵素活性を求めた。

Sc:塩化スカンジウム、Y:塩化イットリウム、La:塩化ランタン、Eu:塩化ユウロピウム、Tb:塩化テルビウム、Ho:塩化ホルミウム、Er:塩化エルビウム、Tm:塩化ツリウム、Yb:塩化イッテルビウム、Lu:塩化ルテチウム

Dunnett 検定 (Excel 2016) を使用してコントロールとの有意差 (\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ ) を検定した。

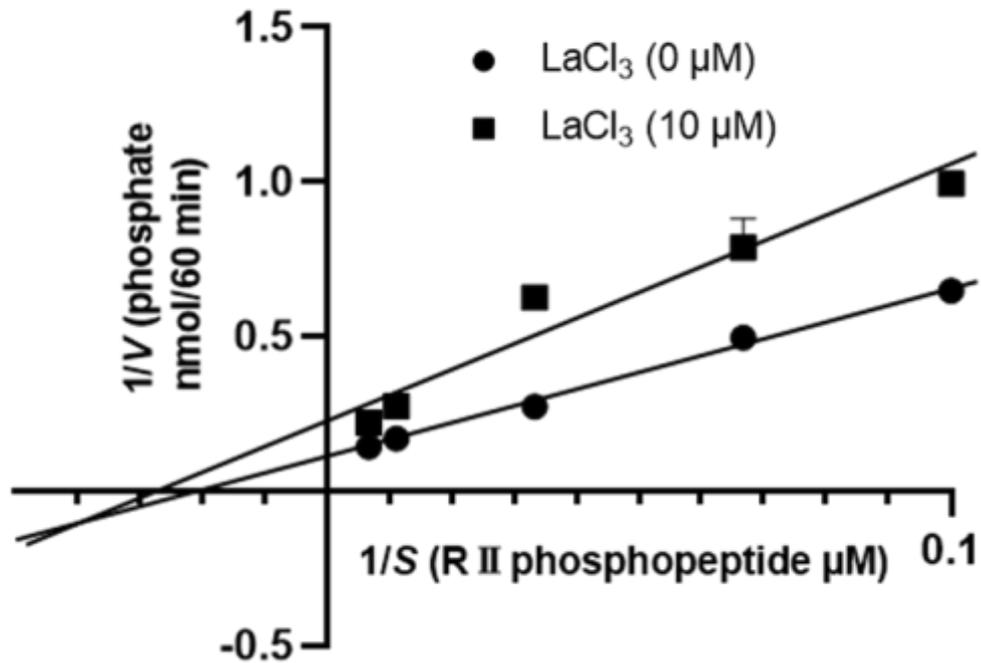


図 15 リコンビナントヒトカルシニューリン (rhCN) のホスファターゼ活性に対するランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) の阻害様式

酵素反応溶液 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、NaCl (100 mM)、 $\text{CaCl}_2$  (0.5 mM)、 $\text{MgCl}_2$  (6 mM)、DTT (0.5 mM)、NP-40 (0.025%) にそれぞれ rhCN (8 U/ $\mu\text{L}$ ) と CaM (0.25  $\mu\text{M}$ ) を添加したものを標準酵素反応液とした。標準酵素反応液に終濃度で  $\text{LaCl}_3$  なし (0  $\mu\text{M}$ ) あるいは 10  $\mu\text{M}$  を添加して一定濃度で固定し、さらに、基質である R II リン酸化ペプチドをそれぞれ 10  $\mu\text{M}$ 、15  $\mu\text{M}$ 、30  $\mu\text{M}$ 、90  $\mu\text{M}$ 、150  $\mu\text{M}$  でそれぞれ添加して 30°C で 60 分間反応させた。反応速度と基質濃度の逆数をプロットし、阻害様式を求めた。

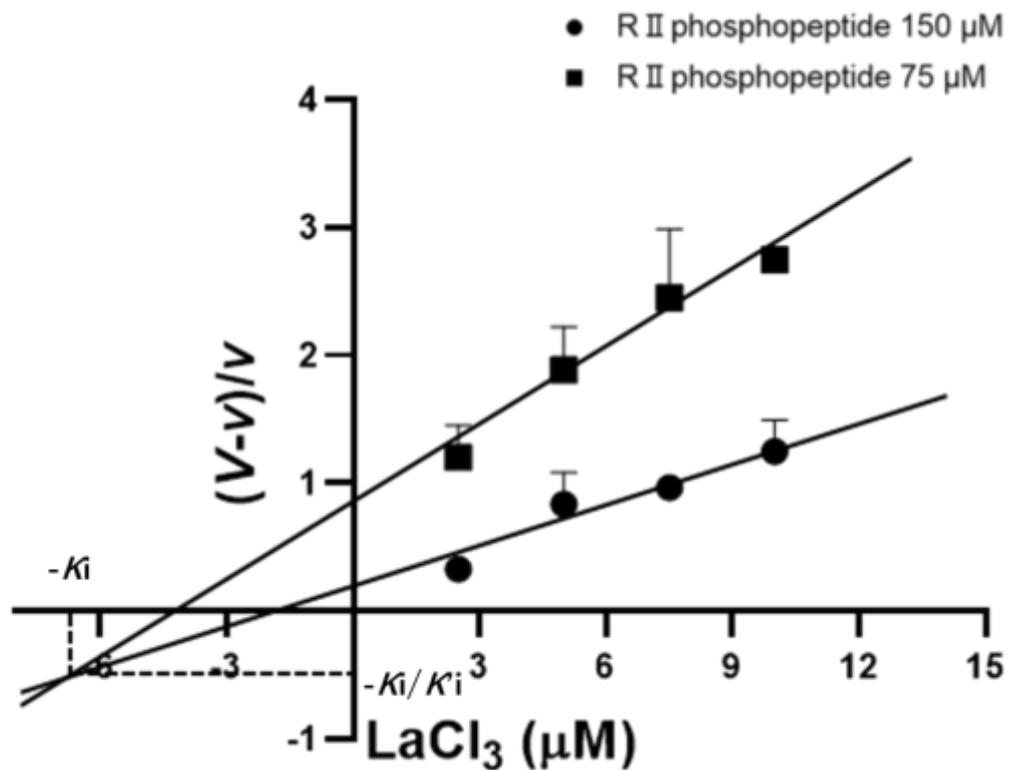


図 16 Quotient velocity プロット解析による阻害定数  $K_i$  と  $K_i'$

酵素反応溶液 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、NaCl (100 mM)、CaCl<sub>2</sub> (0.5 mM)、MgCl<sub>2</sub> (6 mM)、DTT (0.5 mM)、NP-40 (0.025%) にそれぞれ rhCN (8 U/ $\mu\text{L}$ ) と CaM (0.25  $\mu\text{M}$ ) を添加したものを標準酵素反応液とした。標準酵素反応液に終濃度で R II リン酸化ペプチドをそれぞれ 75  $\mu\text{M}$ 、150  $\mu\text{M}$  添加して一定濃度で固定し、さらに任意の濃度の LaCl<sub>3</sub> をそれぞれ加え、30°C で 60 分間反応させた。LaCl<sub>3</sub> の濃度と  $(V-v)/v$  ( $V$ : 最大反応速度、 $v$ : LaCl<sub>3</sub> 存在下でのそれぞれの反応速度) をプロットし、 $K_i$  を求めた。

2本の直線が交差する点の座標  $(x, y)$  から次式①、②により、 $K_i$  と  $K_i'$  を求めた。

$$K_i = -x \cdot \cdot \cdot \textcircled{1} \quad K_i/K_i' = -y \cdot \cdot \cdot \textcircled{2}$$

表1 *p*NPP を基質として使用したときのウシ脳由来カルシニューリン (bCN) に対する各種 50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>)、95%信頼区間 (95%CI)、最大反応速度 (V<sub>max</sub>)、ミカエリス定数 (K<sub>m</sub>) の概要

<b>Ni<sup>2+</sup>刺激によるbCN</b>		
<b>Sc<sup>3+</sup></b>	<b>IC<sub>50</sub> = 3.9 μM (95%CI 2.9 - 5.7 μM)</b>	
<b>Y<sup>3+</sup></b>	<b>IC<sub>50</sub> = 22.7 μM (95%CI 12.5 - 40.9 μM)</b>	
<b>La<sup>3+</sup></b>	<b>IC<sub>50</sub> = 6.7 μM (95%CI 4.8 - 9.4 μM)</b>	
<b>Mn<sup>2+</sup>刺激によるbCN</b>		
<b>Y<sup>3+</sup></b>	<b>IC<sub>50</sub> = 272.2 μM (95%CI 195.3 - 428.1 μM)</b>	
<b>La<sup>3+</sup></b>	<b>IC<sub>50</sub> = 1.7 μM (95%CI 1.1 - 2.5 μM)</b>	
<b>Mixed type inhibition</b>		
<b>La<sup>3+</sup> (0 μM)</b>	<b>V<sub>max</sub> = 33.6 ( nmol/60 min )</b>	<b>K<sub>m</sub> = 0.50 (mM)</b>
<b>La<sup>3+</sup> (7 μM)</b>	<b>V<sub>max</sub> = 22.2 ( nmol/60 min )</b>	<b>K<sub>m</sub> = 1.00 (mM)</b>
<b>La<sup>3+</sup> (10 μM)</b>	<b>V<sub>max</sub> = 16.8 ( nmol/60 min )</b>	<b>K<sub>m</sub> = 1.25 (mM)</b>

表 2 リン酸化ペプチドを基質として使用したときのリコンビナントヒトカルシニューリン (rhCN) に対する各種 50%阻害濃度 ( $IC_{50}$ )、95%信頼区間 (95%CI)、最大反応速度 ( $V_{max}$ )、ミカエリス定数 ( $K_m$ )、阻害定数 ( $K_i$ ) の概要

<b>rhCN</b>		
<b>Sc<sup>3+</sup></b>	<b><math>IC_{50} = 3.3 \mu\text{M}</math> (95%CI 2.8 - 3.9 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	
<b>Y<sup>3+</sup></b>	<b><math>IC_{50} = 9.4 \mu\text{M}</math> (95%CI 9.0 - 9.8 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	
<b>La<sup>3+</sup></b>	<b><math>IC_{50} = 9.5 \mu\text{M}</math> (95%CI 8.9 - 10.1 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	
<b>Mixed type inhibition</b>		
<b>La<sup>3+</sup> (0 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b><math>V_{max} = 10.0</math> (nmol/60 min)</b>	<b><math>K_m = 55.6</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
<b>La<sup>3+</sup> (10 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b><math>V_{max} = 4.6</math> (nmol/60 min)</b>	<b><math>K_m = 38.5</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
<b>Quotient velocity Plot 解析</b>		
<b><math>K_i = 7.0 \mu\text{M}</math></b>		
<b><math>K'_i = 10.2 \mu\text{M}</math></b>		

#### 4. 考察

カルシニューリン (CN) はホスホプロテインホスファターゼの一種で、プロテインホスファターゼ 2B (PP2B) とも呼ばれ、カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) /カルモジュリン (CaM) によって制御される唯一のセリン/トレオニンホスファターゼである。CN は、酵母から高等動物までの生物の全ての細胞に存在する酵素であるが、特に高等動物では細胞性免疫に関わる細胞内情報伝達系において重要な役割を果たしていることが知られている。CN は T 細胞において、転写調節因子であるリン酸化型 Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1 (リン酸化型 NFATc1) の脱リン酸化反応を触媒し、インターロイキン-2 (IL-2) mRNA の発現を制御していることから、免疫抑制剤の標的酵素となっている。免疫抑制剤として臨床で使用されているタクロリムス (FK506) やシクロスポリンはそれぞれ FK506 結合タンパク質 (FKBP) やシクロフィリンといったイムノフィリンを介して間接的に CN を阻害することにより作用を発揮する。しかしながら、FK506 やシクロスポリンはイムノフィリンを介して間接的に CN を阻害するので、腎障害や発癌などの副作用の問題が生じる (図 5)。従って、CN 活性を直接阻害する化合物は副作用の少ない免疫抑制剤として作用する可能性が期待される。細胞内の CN は、 $\text{Ca}^{2+}$  や CaM およびその他の因子によって活性が調節されていると考えられるが、*in vitro* では、ニッケルイオン ( $\text{Ni}^{2+}$ ) やマンガンイオン ( $\text{Mn}^{2+}$ ) のような二価重金属で活性化 (刺激) されることが明らかとなっている<sup>41-43)</sup>。また、先行研究では、生理的濃度の亜鉛イオン ( $\text{Zn}^{2+}$ ) が  $\text{Ni}^{2+}$  との競合阻害により CN 活性を阻害すること<sup>44)</sup>、 $\text{Mn}^{2+}$  が  $\text{Ni}^{2+}$  刺激した CN 活性を不競合的に阻害すること<sup>45)</sup>、更にバナジウム (オルトバナジン酸、メタバナジン酸、バナジル) が  $\text{Ni}^{2+}$  刺激した CN 活性を二段階に阻害することをウシ脳由来の CN (bCN) と人工基質として *p*-ニトロフェニルリン酸 (*p*NPP) を使用した研究で報告されている<sup>46,47)</sup>。またリコンビナントヒト CN (rhCN) と R II リン酸化ペプチドを基質として用いた先行研究では、 $\text{Zn}^{2+}$  はホスファターゼ活性を阻害したが、オルトバナジン酸、メタバナジン酸、バナジルでは rhCN 活性に変化を認めなかった<sup>48)</sup>。従って、由来が異なると同じ CN でも阻害剤に

対する活性変化が異なる場合があると推定された。

本研究では  $\text{La}^{3+}$  を中心として希土類元素に着目し、細胞性免疫に対する影響を検討する目的で、bCN と rhCN の 2 種類の CN を使用した酵素レベルで詳細な検討を行った。bCN について、 $\text{La}^{3+}$  は、 $\text{Ni}^{2+}$  刺激および  $\text{Mn}^{2+}$  刺激した CN 活性をそれぞれ 50% 阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 6.7  $\mu\text{M}$ 、1.7  $\mu\text{M}$  で阻害することが示された (図 6、図 9)。また  $\text{Sc}^{3+}$ 、 $\text{Y}^{3+}$  は  $\text{Ni}^{2+}$  刺激した CN 活性を二段階に阻害することが明らかとなり、 $\text{IC}_{50}$  は  $\text{Sc}^{3+}$  で 3.9  $\mu\text{M}$ 、 $\text{Y}^{3+}$  で 22.7  $\mu\text{M}$  であった (図 7、図 8)。また  $\text{Y}^{3+}$  は、 $\text{Mn}^{2+}$  刺激した bCN についても活性を一旦活性化した後に阻害し、 $\text{IC}_{50}$  は 272.2  $\mu\text{M}$  であった (図 10)。 $\text{La}^{3+}$ 、 $\text{Sc}^{3+}$ 、 $\text{Y}^{3+}$  の  $\text{IC}_{50}$  の相違や  $\text{Sc}^{3+}$  と  $\text{Y}^{3+}$  の [阻害剤濃度-反応速度] 曲線の相違については、これらの希土類元素と  $\text{La}^{3+}$  の CN への結合性や結合部位がそれぞれ異なるためと考えられる。今後、CNA や CNB についてそれぞれのタンパク質の一部のリコンビナント体を作成して希土類元素との結合実験を行い、結合部位を同定するなどの詳細な検討を行う必要があると思われる。

rhCN では  $\text{La}^{3+}$  の  $\text{IC}_{50}$  は 9.5  $\mu\text{M}$  であり、 $\text{Ni}^{2+}$  刺激した bCN の 6.7  $\mu\text{M}$  とほぼ同じ値を示した (図 12)。 $\text{Sc}^{3+}$ 、 $\text{Y}^{3+}$  も  $\text{La}^{3+}$  と同様に rhCN に対して有意な阻害作用を認めた。

(図 13) また  $\text{IC}_{50}$  は  $\text{Sc}^{3+}$  で 3.3  $\mu\text{M}$ 、 $\text{Y}^{3+}$  で 9.4  $\mu\text{M}$  であった。次に 8 種類の希土類元素 (塩化サマリウム ( $\text{SmCl}_3$ )、塩化ユーロピウム ( $\text{EuCl}_3$ )、塩化テルビウム ( $\text{TbCl}_3$ )、塩化ホルミウム ( $\text{HoCl}_3$ )、塩化エルビウム ( $\text{ErCl}_3$ )、塩化ツリウム ( $\text{TmCl}_3$ )、塩化イッテルビウム ( $\text{YbCl}_3$ )、塩化ルテチウム ( $\text{LuCl}_3$ )) 5  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$  をそれぞれ使用して rhCN に対する阻害作用を検討したところ、 $\text{SmCl}_3$  以外は 10  $\mu\text{M}$  で有意にホスファターゼ活性が阻害されることが示された (図 14)。従って、これらの結果から希土類元素全般において、程度に差があるものの rhCN を阻害することが予想された。これを確認するために、残りの 6 種類の希土類元素について阻害作用の検討を行うとともに、それぞれの希土類元素の rhCN に対する最大反応速度  $V_{\text{max}}$  やミカエリス定数  $K_m$  を求めるなどして、阻害様式の違いを検討する必要があると思われる。またキネティクス解析から  $\text{La}^{3+}$  は  $\text{Ni}^{2+}$  刺激した bCN と rhCN を混合阻害で阻害することが示された

(図 11、図 15)。Quotient velocity プロット解析<sup>39,40)</sup> から rhCN に対す  $\text{La}^{3+}$  の阻害定数を求めたところ、rhCN に対する  $K_i$  は  $7.0 \mu\text{M}$ 、rhCN-R II リン酸化ペプチド複合体に対する  $K'_i$  は  $10.2 \mu\text{M}$  であった (図 16)。 $K_i$  と  $K'_i$  は、 $\text{IC}_{50}$  の  $9.5 \mu\text{M}$  と近い値を示した。

CN は、先述したように *in vitro* において多様な金属元素において活性調節を受けることが示されているが、bCN と rhCN の結果は必ずしも一致するわけではない<sup>48)</sup>。CNA のアミノ酸配列はヒトとウシで 97.1%、CNB ではヒトとウシで 99.4% の相同性を示し<sup>49,50)</sup>、両者で非常に似た構造を示しているが、本実験で使用した bCN はウシ脳から精製されたネイティブな酵素であり、活性発現のためには、 $\text{Ni}^{2+}$  または  $\text{Mn}^{2+}$  による活性化 (刺激) が必要であり、また、人工基質である pNPP が良い基質になっている。一方、rhCN はヒト酵素であり、基質として R II リン酸化ペプチドを使用しているが、大腸菌から発現させた酵素である。ネイティブ CN はミリスチル化されている酵素であるが、大腸菌から発現させたリコンビナント CN は、ミリスチル化の有無により酵素の性状が異なるという報告もある<sup>51)</sup>。本実験で使用した rhCN はミリスチル化されている酵素であり、本研究から得られた結果はネイティブ酵素の結果を反映している可能性が高いものと考えられる。本検討から希土類元素は bCN や rhCN のホスファターゼ活性を阻害することが示され、細胞性免疫に影響を与える可能性が示唆された。第二章ではヒト T 細胞様株 Jurkat 細胞を用いて、希土類元素の細胞性免疫に対する検討を細胞レベルで行った。

## 5. 結論

免疫抑制剤探索の基盤として、免疫抑制剤の標的酵素である CN のホスファターゼ活性に対する影響を、La をはじめとする希土類元素を使用して *in vitro* で検討を行った。実験に用いた  $\text{La}^{3+}$ 、 $\text{Sc}^{3+}$ 、 $\text{Y}^{3+}$  の 3 種類の希土類元素が bCN 活性を阻害した。また、キネティクス解析より、 $\text{La}^{3+}$  は混合阻害で bCN を阻害することが明らかとなった。また、作用濃度に差があるものの  $\text{La}^{3+}$  をはじめとした  $\text{Sc}^{3+}$ 、 $\text{Y}^{3+}$ 、 $\text{Sm}^{3+}$ 、 $\text{Eu}^{3+}$ 、 $\text{Tb}^{3+}$ 、 $\text{Ho}^{3+}$ 、 $\text{Er}^{3+}$ 、 $\text{Tm}^{3+}$ 、 $\text{Yb}^{3+}$ 、 $\text{Lu}^{3+}$  の実験に用いた 11 種類の希土類元素が、rhCN 活性を阻害し、 $\text{La}^{3+}$  は、bCN の時と同様に混合阻害によりホスファターゼ活性を阻害することが示された。これらのことから、希土類元素による細胞性免疫低下作用が酵素レベルで示唆された。

## 第二章

**Jurkat 細胞の IL-2 産生に対する  
ランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) の影響**

## 1. 緒言

Jurkat 細胞は、急性リンパ芽球性白血病患者末梢血由来のヒト T 細胞株であり、インターロイキン-2 (IL-2) 産生細胞として知られている<sup>52,53)</sup>。Jurkat 細胞はレクチン (コンカナバリン A (ConA)、フィトヘマグルチニン (PHA))、抗 CD3 抗体、ホルボールエステル (PMA) とイオノマシン (IM) などの刺激によって IL-2 を産生するので、細胞性免疫における免疫応答、免疫制御などの研究において広く使用される細胞であり、特に細胞性免疫抑制効果を検討する上で用いられている。Jurkat 細胞を使用した細胞性免疫抑制に関する最近の研究では、抗不整脈薬として使用されているアミオダロン<sup>54)</sup>、ウリ科の植物に含まれるステロイドの一種であるククルビタシン E<sup>55)</sup>、ラブダンジテルペンの一つであるアンドログラホリド<sup>56)</sup>、モノテルペン誘導体のチモールとカルバクロール<sup>57)</sup> がそれぞれ PMA と IM で刺激した Jurkat 細胞の IL-2 産生を抑制することが報告されている。またイソキノリンアルカロイドの一つであるベルベリンは Jurkat 細胞が PHA 刺激によって産生した IL-2 を抑制すること<sup>58)</sup>、ガラクトースとガラクトサミンの二糖であるメルビオサミン<sup>59)</sup> が、ConA 刺激した Jurkat 細胞の IL-2 産生を抑制することが報告されている。また微量元素の一つである亜鉛イオン ( $Zn^{2+}$ ) は Jurkat 細胞が ConA 誘導性に産生する IL-2 を、抑制することが明らかとされている<sup>60)</sup>。

第一章では免疫抑制剤タクロリムス (FK506) やシクロスポリンの標的酵素であり、T 細胞の IL-2 産生を増加させ細胞性免疫を高めるカルシニューリン (CN) の活性をランタンイオン ( $La^{3+}$ ) が直接阻害することをウシ脳由来 CN (bCN)、リコンビナントヒト CN (rhCN) を使用して明らかとしてきた。またキネティクス解析により、この  $La^{3+}$  の阻害様式は混合阻害であることを示してきた。さらに rhCN を用いて、多くの希土類元素が CN のホスファターゼ活性を阻害することを明らかとしてきた。第二章では  $La^{3+}$  をはじめ希土類元素の細胞性免疫に対する影響を細胞レベルで検討するため、Jurkat 細胞が ConA 誘導性に産生する IL-2 タンパク質を指標に検討を行った。

## 2. 試料および方法

### 2-1. 試料および試薬

Human IL-2 ELISA KIT II は BD Biosciences 社から、Jurkat 細胞は DS ファーマバイオメディカル社から購入した。富士フィルム 和光純薬社から、RPMI 1640、コンカナバリン A (ConA)、塩化イットリウム ( $\text{YCl}_3$ )、塩化スカンジウム ( $\text{ScCl}_3$ )、塩化ランタン ( $\text{LaCl}_3$ )、塩化セリウム ( $\text{CeCl}_3$ )、塩化サマリウム ( $\text{SmCl}_3$ )、塩化ユーロピウム ( $\text{EuCl}_3$ )、塩化イッテルビウム ( $\text{YbCl}_3$ )、塩化ルテチウム ( $\text{LuCl}_3$ ) をそれぞれ購入し使用した。

ATP 測定用の CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay は Promega 社から、ウシ胎児血清 (FCS) は Thermo Fisher Scientific 社から、ストレプトマイシン-ペニシリン、トリパンブルーは SIGMA 社からそれぞれ購入し使用した。

### 2-2. 実験方法

#### 2-2-1. Jurkat 細胞の培養

Jurkat 細胞培養用の培地として、10 v/v% の FCS と 0.1 mg/mL のストレプトマイシン、100 U/mL のペニシリンを含む RPMI 1640 を使用した。また、FCS は 56°C、30 分で非働化したものを用いた。Jurkat 細胞の培養は、37°C、5%  $\text{CO}_2$  の条件下で培養を行った。

#### 2-2-2. Jurkat 細胞の形態観察

Jurkat 細胞を  $1 \times 10^6$  個/mL の細胞密度に調製し 37°C、30 分で前培養した。その後、 $\text{LaCl}_3$  を任意濃度で添加し、37°C、30 分で培養した後、刺激剤無添加、あるいは刺激剤として ConA を終濃度で 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加して 24 時間培養を行った<sup>53)</sup>。

細胞の形態観察は、オールインワン顕微鏡 (KEYENCE 社 BZ-X710) を用いて行った。

### 2-2-3. Jurkat 細胞の生存率測定

Jurkat 細胞を  $1 \times 10^6$  個/mL の細胞密度に調製し 37°C、30 分で前培養した。その後、 $\text{LaCl}_3$  を任意濃度で添加し、37°C、30 分で培養した後、刺激剤無添加、あるいは刺激剤として ConA を終濃度で 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加して 24 時間培養を行った。その後、0.4% トリパンブルーと細胞培養液を同等量で混ぜ、血球計算盤を用いてブルーに染色された死細胞と染色されなかった生細胞をカウントすることにより生存率を求めた。

### 2-2-4. Jurkat 細胞の ATP 測定

細胞の内在性の ATP を定量することで生存する細胞数を測定する目的で、ホテル由来のルシフェリンと組換えルシフェラーゼを用いた、Promega 社の CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay を使用した。測定は、キット付属のプロトコールに従って行った。初めに  $2 \times 10^5$  個/mL の細胞密度に調製した Jurkat 細胞を 37°C、30 分で前培養を行った後、 $\text{LaCl}_3$  を任意濃度で添加し、刺激剤無添加、あるいは刺激剤として ConA を終濃度で 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加して、更に 24 時間培養を行った。

キット粉末の Cell Titer-Glo Substrate を 10 ml の Titer-Glo Buffer で 1 分以内にボルテックスミキサーでよく攪拌をして溶解し、溶解後の試薬を細胞培養液と等量添加した。10 分間、室温でシェーカーを使用しインキュベーションした後、サンプル 160  $\mu\text{L}$  を黒色の 96 穴シャーレに移し、マイクロプレート型ルミノメータ (ATTO AB-2350PHELIOS) を用いて光量を測定した。

### 2-2-5. Jurkat 細胞が産生する IL-2 タンパク質の測定

$5 \times 10^5$  個/mL の細胞密度に調製した Jurkat 細胞を 37°C、30 分で前培養を行った後、 $\text{YCl}_3$ 、 $\text{ScCl}_3$ 、 $\text{LaCl}_3$ 、 $\text{CeCl}_3$ 、 $\text{SmCl}_3$ 、 $\text{EuCl}_3$ 、 $\text{YbCl}_3$ 、 $\text{LuCl}_3$  をそれぞれ任意濃度で添加し、刺激剤無添加、あるいは刺激剤として ConA を終濃度で 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加して、24 時間培養を行った。260 g、2 分の遠心分離によって培養上清を回収し、測定用の試料とした。回収した試料を測定まで保存しておく場合は、マイナス 30°C のフリーザーに保

存した。

IL-2 の測定は、BD Biosciences 社の Human IL-2 ELISA KIT II を使用し、キット付属のプロトコールに従って行った。実際には抗ヒト IL-2 モノクローナル抗体でプレコートされた 96 穴シャーレの各ウェルに ELISA 溶液を添加した。さらにサンプルあるいは IL-2 タンパク質標準液 (500 pg/mL、250 pg/mL、125 pg/mL、62.5 pg/mL、31.3 pg/mL、15.6 pg/mL、7.8 pg/mL) 100  $\mu$ L をウェルに加え、2 時間インキュベーションを行った。その後、ヒト IL-2 に対するビオチン化抗体とホースラディッシュペルオキシダーゼを結合したストレプトアビジンを添加し、1 時間インキュベーションを行った。基質である 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB) を添加して発色を行い、IL-2 タンパク質を 2 波長 450 nm/570 nm の吸光度測定 (CORONA ELECTRIC SH-1000Lab) を行うことにより定量化した。

#### 2-2-6. 統計処理

得られた結果は、Dunnett 検定 (Excel 2016:Microsoft Corporation) で解析を行い、酵素活性阻害実験で得られた 50% 阻害濃度 ( $IC_{50}$ )、95% 信頼区間 (95%CI) は、GraphPad Prism 8 (GraphPad Software) を用いて非線形回帰による分析で求めた。

有意水準は  $p < 0.05$  または  $p < 0.01$  とした。

### 3. 結果

第一章では、免疫抑制剤の標的酵素であり、細胞性免疫を高める効果のあるカルシニューリン (CN) をランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) が混合阻害することを示した。さらに希土類元素全般においてリコンビナントヒト CN (rhCN) 活性を阻害することを明らかとした。第二章では  $\text{La}^{3+}$  をはじめ希土類元素の細胞性免疫に対する影響を検討するため、コンカナバリン A (ConA) 誘導性にヒト T 細胞様株 Jurkat 細胞が産生するインターロイキン-2 (IL-2) タンパク質を指標に検討を行った。

#### 3-1. ランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) の Jurkat 細胞に対する毒性作用の検討

最初に  $\text{La}^{3+}$  の Jurkat 細胞に対する毒性作用をトリパンブルー染色、細胞内の ATP 測定により検討し、オールインワン顕微鏡 (KEYENCE 社 BZ-X710) で細胞の形態観察を行った。

##### 3-1-1. Jurkat 細胞の形態観察

Jurkat 細胞に対し、塩化ランタン ( $\text{LaCl}_3$ ) をそれぞれ 0 mM、0.1 mM、0.3 mM、1.0 mM、3.0 mM、10 mM 培地に添加し、インターロイキン-2 (IL-2) 誘導試薬 ConA を無添加あるいは添加し 24 時間培養を行った後、光学顕微鏡で細胞の形態観察を行った (図 17、18)。その結果、ConA 無添加では、3 mM までの  $\text{LaCl}_3$  では、アポトーシスやネクロシスのような形態変化を認めなかった。しかし、10 mM の  $\text{LaCl}_3$  では、細胞が破壊されている様子が観察された (図 17)。ConA 添加では細胞が凝集する傾向を示したが、ConA 無添加と同様に細胞は 3 mM までの  $\text{LaCl}_3$  では、アポトーシスやネクロシスのような形態変化は認めなかった。しかし 10 mM の  $\text{LaCl}_3$  では、細胞が破壊されている様子が観察された (図 18)。従って、10 mM の  $\text{LaCl}_3$  では毒性作用を示すことが示された。

### 3-1-2. トリパンプルー染色による Jurkat 細胞の生存率測定

ConA (25 µg/mL) を無添加あるいは添加した Jurkat 細胞に対し、LaCl<sub>3</sub> をそれぞれ 0 mM、0.1 mM、0.3 mM、1.0 mM、3.0 mM、10 mM 培地に添加し、24 時間培養を行った後、トリパンプルー染色を行い細胞の生存率を検討した (図 19)。その結果、ConA の添加、無添加に関わらず、3 mM の LaCl<sub>3</sub> で細胞の生存率はほぼ 100%であった。一方 10 mM の LaCl<sub>3</sub> では、細胞の生存率が 40%前後に低下し、この濃度では毒性作用を示すことが判明した。

### 3-1-3. Jurkat 細胞内の ATP 測定

ATP は微生物、植物、動物すべての生物の細胞内に存在する高エネルギー物質である。そのため、T 細胞が産生する ATP は細胞数を表す指標となる。ConA (25 µg/mL) を無添加あるいは添加した Jurkat 細胞に対し、LaCl<sub>3</sub> をそれぞれ 0 mM、0.1 mM、0.3 mM、1.0 mM、3.0 mM、10 mM 培地に添加し、24 時間培養を行った後、細胞内の ATP を Promega 社の CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay を使用して測定した。その結果、ConA の添加、無添加に関わらず、細胞は 3 mM の LaCl<sub>3</sub> でも ATP 産生に影響をあたえなかった。しかし、10 mM の LaCl<sub>3</sub> では、細胞内の ATP が 10 数%に低下し、細胞数に影響を与えることが判明した (図 20)。

## 3-2. ランタンイオン (La<sup>3+</sup>)、スカンジウムイオン (Sc<sup>3+</sup>)、イットリウムイオン (Y<sup>3+</sup>) の ConA 刺激した Jurkat 細胞のインターロイキン-2 (IL-2) 産生に対する影響

毒性のない濃度の範囲 (3 mM) で LaCl<sub>3</sub> による Jurkat 細胞の IL-2 タンパク質 産生に対する影響を検討した (図 21)。培地にマイトジェンとして使用した ConA を添加しないと Jurkat 細胞から IL-2 産生は認めず、また LaCl<sub>3</sub> を加えても IL-2 産生を認めなかった。しかし、LaCl<sub>3</sub> を加えても IL-2 産生を認めなかった。しかし、培地に ConA を添加すると IL-2 産生を認め、これに LaCl<sub>3</sub> を添加していくと 0.1 mM の LaCl<sub>3</sub> から細胞が産生する IL-2 の有意な低下が認められ、3 mM の LaCl<sub>3</sub> では IL-2 産生をほぼ抑

制することが示された (図 21)。従って、 $\text{LaCl}_3$  には毒性のない濃度で Jurkat 細胞が ConA 誘導性に産生する IL-2 を抑制する働きがあることが示された。これは  $\text{La}^{3+}$  が細胞レベルで細胞性免疫を低下させる可能性があることを示唆する結果であると考えられる。次に  $\text{La}^{3+}$  よりも原子量が小さい希土類元素であるスカンジウムイオン ( $\text{Sc}^{3+}$ )、イットリウムイオン ( $\text{Y}^{3+}$ ) について同様の検討を試みた (図 22)。 $\text{Sc}^{3+}$ 、 $\text{Y}^{3+}$  も単独で培地に添加しても Jurkat 細胞からの IL-2 産生を認めず、ConA 誘導性の IL-2 を抑制することが明らかとなった。また  $\text{La}^{3+}$ 、 $\text{Sc}^{3+}$ 、 $\text{Y}^{3+}$  の 50% 阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) はそれぞれ 0.30 mM (95% 信頼区間 (95%CI) 0.21–0.40 mM)、0.36 mM (95%CI 0.18–0.62 mM)、0.23 mM (95%CI 0.12–0.37 mM) であった。

### 3-3. 希土類元素の ConA 刺激した Jurkat 細胞のインターロイキン-2 (IL-2) 産生に対する影響

図 22、表 1 に示すように作用する濃度に差があるものの  $\text{La}^{3+}$ 、 $\text{Sc}^{3+}$ 、 $\text{Y}^{3+}$  ともに Jurkat 細胞の IL-2 産生の低下を認めた。この結果から希土類元素全般において、Jurkat 細胞の IL-2 産生を抑制する働きがあることが推測された。従って、5 種類のランタノイド (塩化セリウム ( $\text{CeCl}_3$ )、塩化サマリウム ( $\text{SmCl}_3$ )、塩化ユーロピウム ( $\text{EuCl}_3$ )、塩化イッテルビウム ( $\text{YbCl}_3$ )、塩化ルテチウム ( $\text{LuCl}_3$ )) を使用して Jurkat 細胞の IL-2 産生への影響を検討した。図 23A は各ランタノイドの添加量 0.5 mM、図 23B は 1 mM における結果をそれぞれ示す。0.5 mM および 1 mM とともに今回検討したランタノイド全てにおいて ConA 添加のコントロールと比較して、有意に IL-2 産生が低下することが示された。

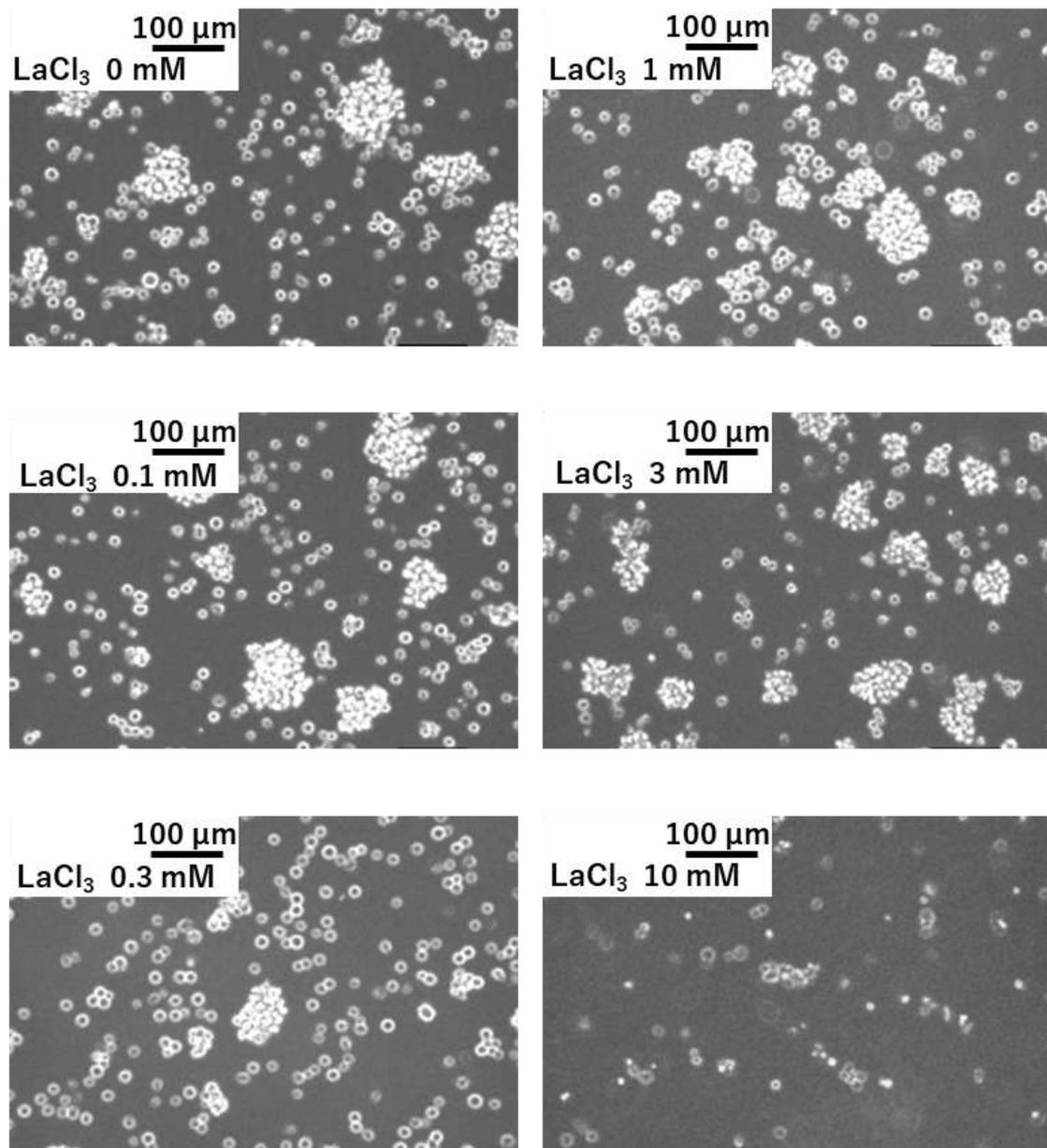


図 17 Jurkat 細胞の細胞形態に対するランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) の影響

塩化ランタン ( $\text{LaCl}_3$ ) をそれぞれ 0 mM、0.1 mM、0.3 mM、1.0 mM、3.0 mM、10 mM 培地に添加し、ConA を無添加で 24 時間培養を行った後、光学顕微鏡で細胞の形態観察を行った。

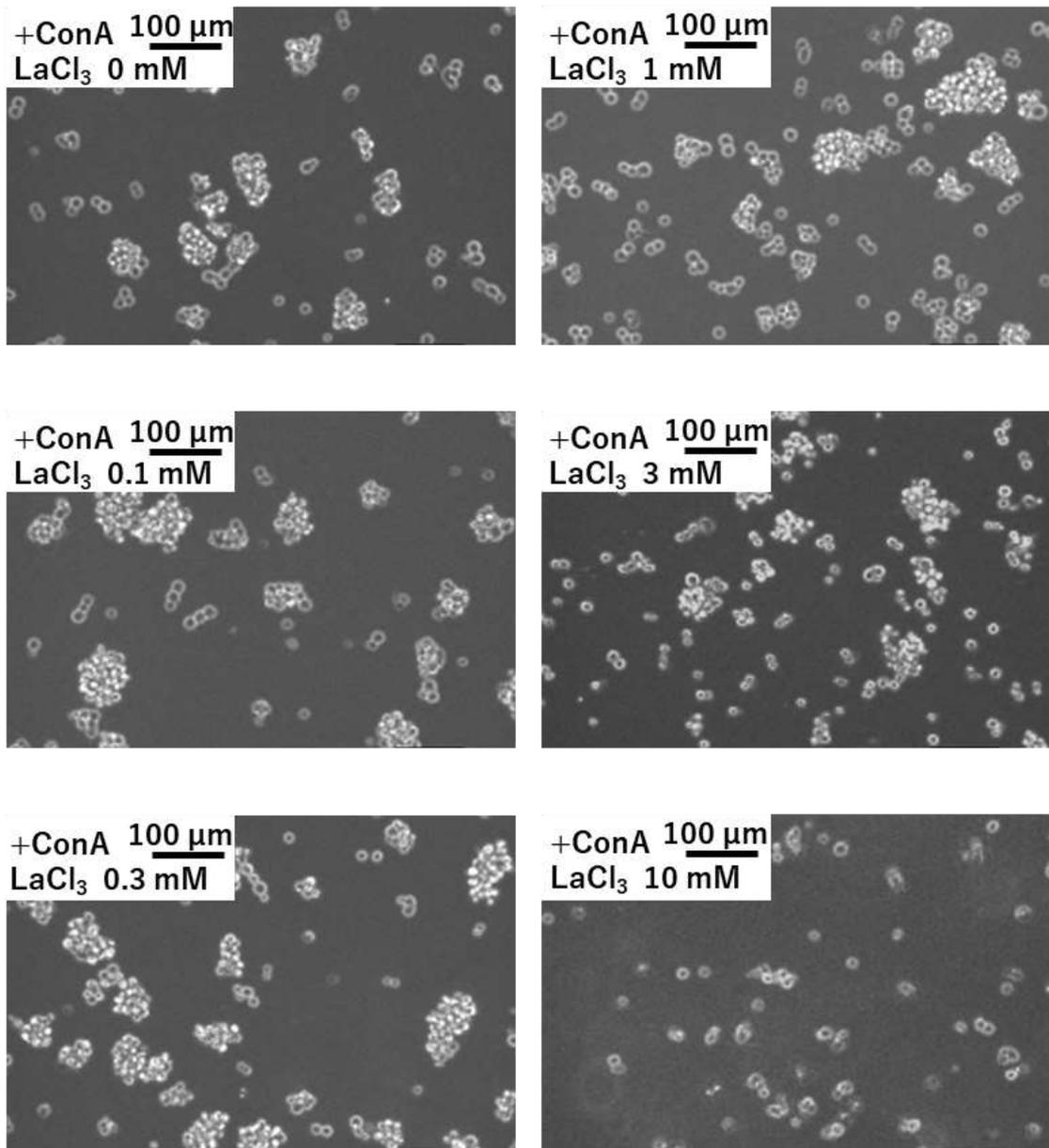


図 18 コンカナバリン A (ConA) (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 添加時における Jurkat 細胞の細胞形態に対するランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) の影響

塩化ランタン ( $\text{LaCl}_3$ ) をそれぞれ 0 mM、0.1 mM、0.3 mM、1.0 mM、3.0 mM、10 mM 培地に添加した後、ConA を 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  加え、24 時間培養を行った。培養後、光学顕微鏡で細胞の形態観察を行った。

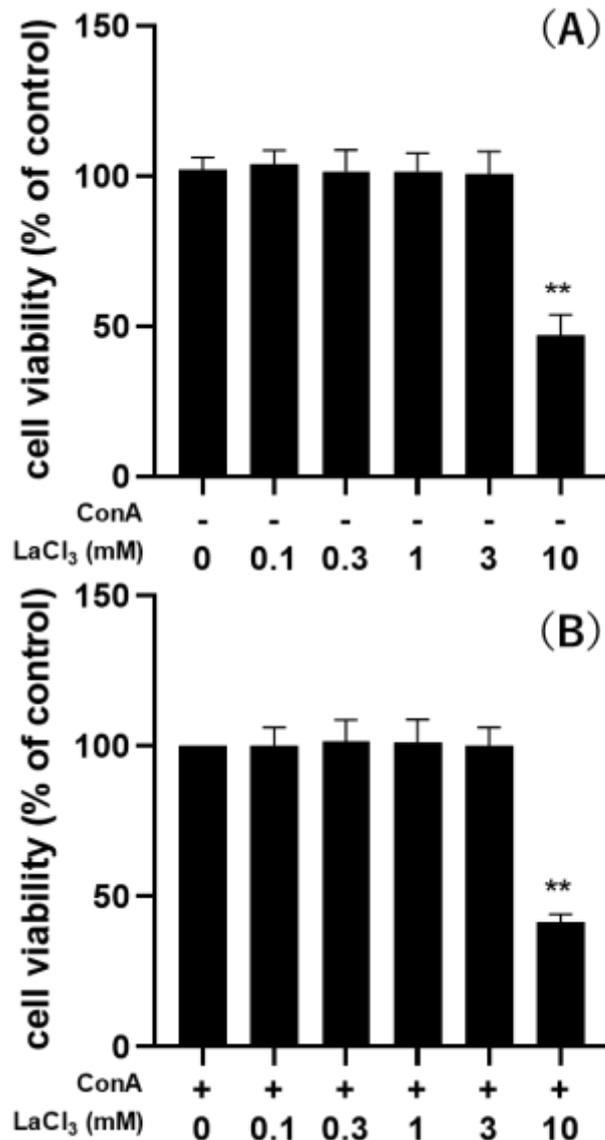


図 19 トリパンプルー染色による Jurkat 細胞の細胞生存率に対するランタンイオン (La<sup>3+</sup>) の影響

Jurkat 細胞を  $1 \times 10^6$  個/mL の細胞密度に調製し 37°C、30 分で前培養した。その後、LaCl<sub>3</sub> を任意濃度で添加し、37°C、30 分で培養した後、刺激剤無添加 (A)、あるいは刺激剤として ConA を終濃度で 25  $\mu$ g/mL 添加 (B) して 24 時間培養を行った。0.4% トリパンプルーで染色を行い、血球計算盤を用いてブルーに染色された死細胞と染色されなかった生細胞をカウントすることにより細胞の生存率を求めた。

Dunnett 検定 (Excel 2016) を使用してコントロールとの有意差 (\*\*  $p < 0.01$ ) を検定した。

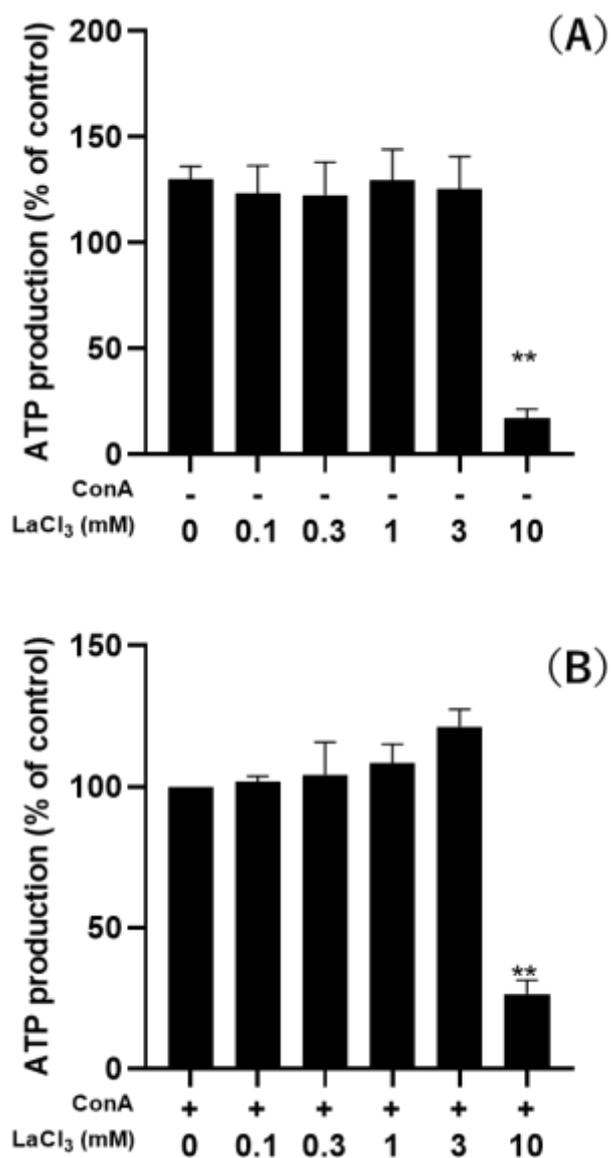


図 20 ATP 測定による Jurkat 細胞の細胞生存率に対するランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) の影響

$2 \times 10^5$  個/mL の細胞密度に調製した Jurkat 細胞を  $37^\circ\text{C}$ 、30 分で前培養を行った後、 $\text{LaCl}_3$  を任意濃度で添加し、刺激剤無添加 (A)、あるいは刺激剤として ConA を終濃度で  $25 \mu\text{g/mL}$  添加 (B) して、更に 24 時間培養を行った。細胞内の ATP 測定は、Promega 社の CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay を使用し、キット付属のプロトコールに従って行った。

Dunnett 検定 (Excel 2016) を使用してコントロールとの有意差 (\*\*  $p < 0.01$ ) を検定した。

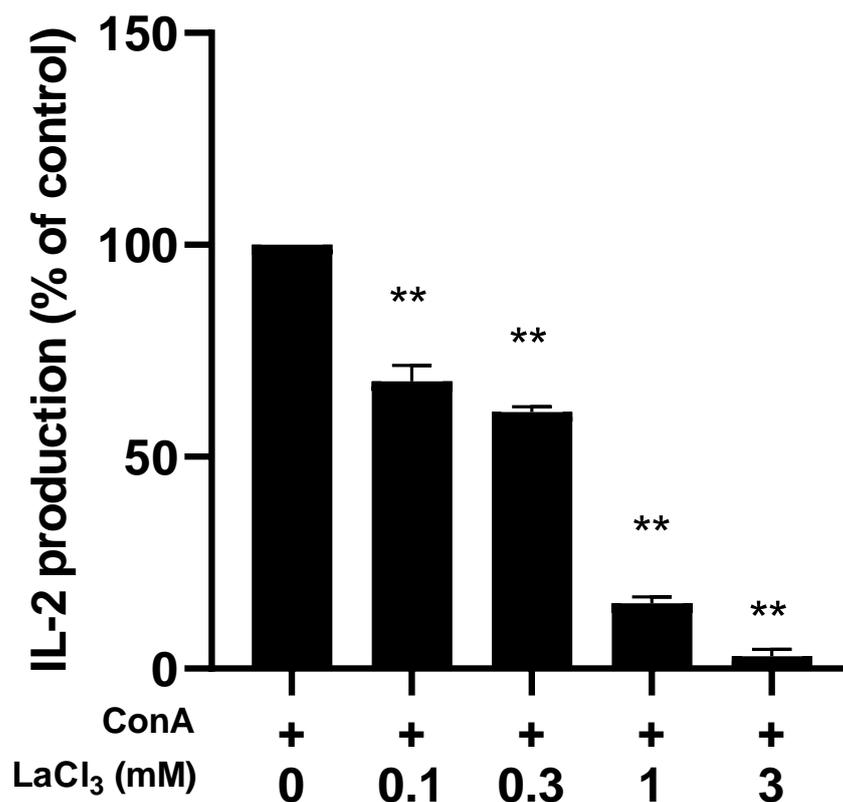


図 21 Jurkat 細胞のコンカナバリン A (ConA) 誘導性の IL-2 産生に対するランタンイオン (La<sup>3+</sup>) の影響

5×10<sup>5</sup> 個/mL の細胞密度に調製した Jurkat 細胞を 37°C、30 分で前培養を行った後、LaCl<sub>3</sub> をそれぞれ 0 mM、0.1 mM、0.3 mM、1 mM、3 mM の濃度になるように添加し、刺激剤として ConA を終濃度で 25 μg/mL 添加して、24 時間培養を行った。培養上清の IL-2 の測定は、BD Biosciences 社の Human IL-2 ELISA KIT II を使用し、キット付属のプロトコールに従って行った。

Dunnett 検定 (Excel 2016) を使用してコントロールとの有意差 (\*\**p* < 0.01) を検定した。

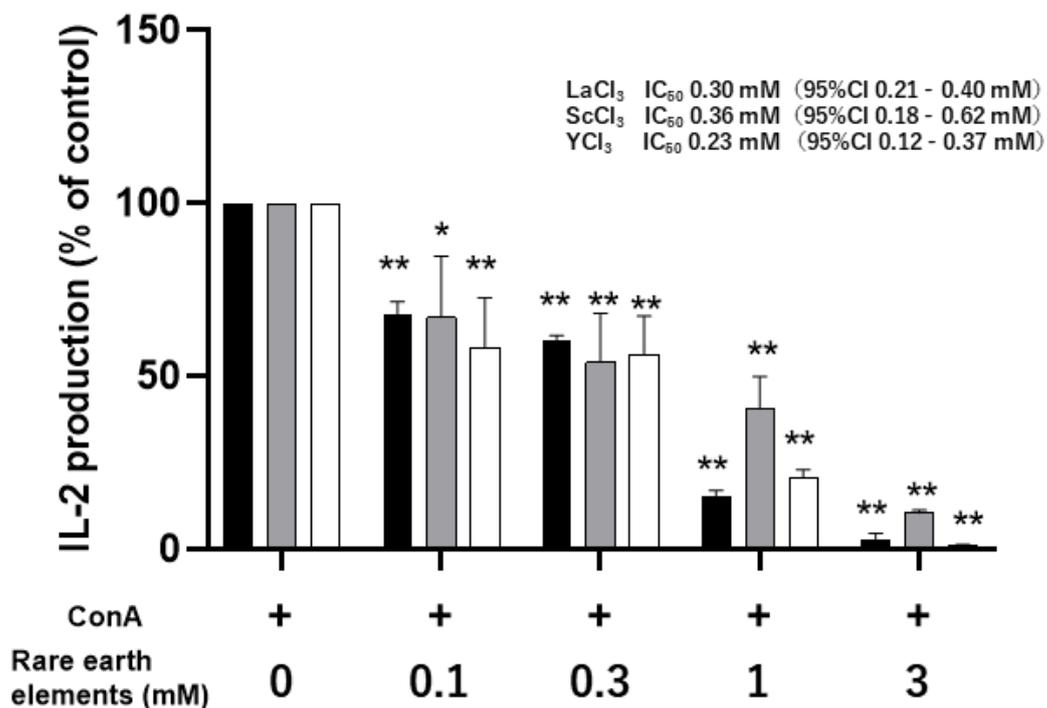


図 22 Jurkat 細胞の IL-2 産生に対するランタンイオン (La<sup>3+</sup>)、スカンジウムイオン (Sc<sup>3+</sup>)、イットリウムイオン (Y<sup>3+</sup>) の影響

5×10<sup>5</sup> 個/mL の細胞密度に調製した Jurkat 細胞を 37°C、30 分で前培養を行った後、LaCl<sub>3</sub>、ScCl<sub>3</sub>、YCl<sub>3</sub> をそれぞれ 0 mM、0.1 mM、0.3 mM、1 mM、3 mM の濃度になるように添加し、刺激剤として ConA を終濃度で 25 μg/mL 添加して、24 時間培養を行った。培養上清の IL-2 の測定は、BD Biosciences 社の Human IL-2 ELISA KIT II を使用し、キット付属のプロトコールに従って行った。

■:LaCl<sub>3</sub>、■:ScCl<sub>3</sub>、□:YCl<sub>3</sub>

Dunnett 検定 (Excel 2016) を使用してコントロールとの有意差 (\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01) を検定し、50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>)、95%信頼区間 (95%CI) は GraphPad Prism 8 を使用して計算した。

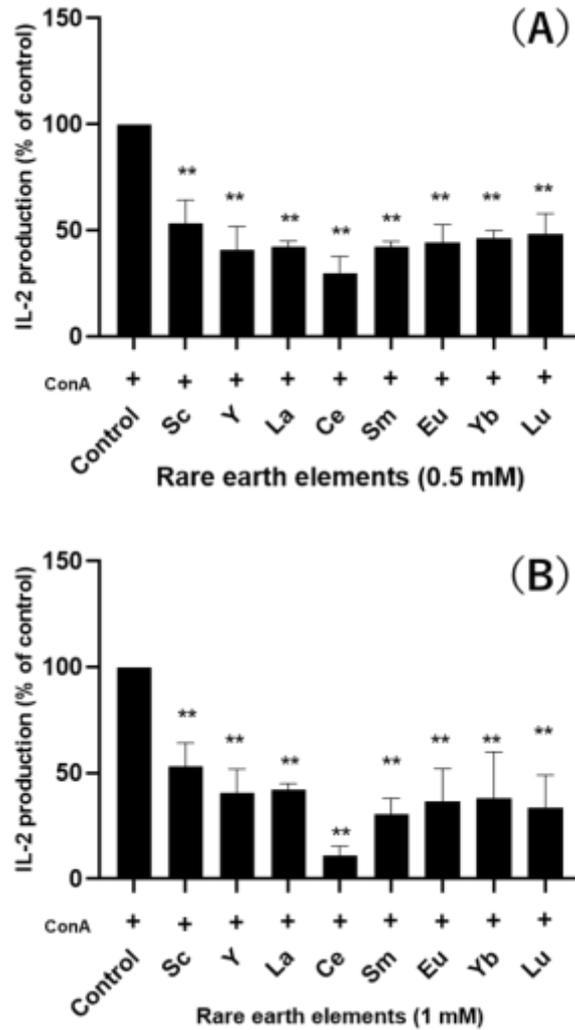


図 23 Jurkat 細胞の IL-2 産生に対する希土類元素の影響 (A) 0.5 mM、(B) 1 mM

$5 \times 10^5$  個/mL の細胞密度に調製した Jurkat 細胞を 37°C、30 分で前培養を行った後、 $\text{YCl}_3$ 、 $\text{ScCl}_3$ 、 $\text{LaCl}_3$ 、 $\text{CeCl}_3$ 、 $\text{SmCl}_3$ 、 $\text{EuCl}_3$ 、 $\text{YbCl}_3$ 、 $\text{LuCl}_3$  をそれぞれ 0.5 mM、1.0 mM の濃度になるように添加し、刺激剤として ConA を終濃度で 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加して、24 時間培養を行った。培養上清の IL-2 の測定は、BD Biosciences 社の Human IL-2 ELISA KIT II を使用し、キット付属のプロトコールに従って行った。

Sc:塩化スカンジウム、Y:塩化イットリウム、La:塩化ランタン、Ce:セ塩化セリウム、Sm:塩化サマリウム、Eu:塩化ユウロピウム、Yb: 塩化イッテルビウム、Lu: 塩化ルテチウム

Dunnett 検定 (Excel 2016) を使用してコントロールとの有意差 (\*\* $p < 0.01$ ) を検定した。

#### 4. 考察

インターロイキン-2 (IL-2) は、ヘルパーT 細胞である Th1 細胞から産生されるサイトカインの一つであり、キラーT 細胞を分化・増殖させる働きを持つことから、細胞性免疫の免疫応答の指標となっている<sup>61)</sup>。Jurkat 細胞、MOLT-4 細胞、Hut-78 細胞は急性リンパ芽球性白血病患者末梢血由来のヒト T 細胞株であり<sup>52,53,62,63)</sup>、コンカナバリン A (ConA)、フィトヘマグルチニン (PHA) などのマイトジェンによる刺激によって IL-2 を産生するので、細胞性免疫における免疫応答、免疫制御などの研究において広く使用されている<sup>64,65,66)</sup>。従って、本章では Jurkat 細胞を使用し、細胞が ConA 誘導性に産生する IL-2 に対する影響について、種々の希土類元素を用いて検討を行った。

細胞毒性を認めないランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) の濃度で Jurkat 細胞の IL-2 産生低下を認め (図 21)、 $\text{La}^{3+}$  よりも原子量が小さいスカンジウムイオン ( $\text{Sc}^{3+}$ )、イットリウムイオン ( $\text{Y}^{3+}$ ) においても同様の結果が得られた (図 22)。また 50% 阻害濃度は  $\text{La}^{3+}$  で 0.30 mM (95% 信頼区間 (95%CI) 0.21-0.40 mM)、 $\text{Sc}^{3+}$  で 0.36 mM (95%CI 0.18-0.62 mM)、 $\text{Y}^{3+}$  で 0.23 mM (95%CI 0.12-0.37 mM) であり、希土類元素の種類によって IL-2 産生抑制への影響が異なることが示唆された。これを確認するため、希土類元素 5 種類 (セリウムイオン:  $\text{Ce}^{3+}$ 、サマリウムイオン:  $\text{Sm}^{3+}$ 、ユーロピウムイオン:  $\text{Eu}^{3+}$ 、イッテルビウムイオン:  $\text{Yb}^{3+}$ 、ルテチウムイオン:  $\text{Lu}^{3+}$ ) を用いて、0.5 mM、1 mM でそれぞれ検討を行ったところ、作用する濃度に差があるものの細胞が ConA 誘導性に産生する IL-2 を抑制することが明らかとなった (図 23)。また今回、実験で使用した希土類元素の中で  $\text{Ce}^{3+}$  の抑制効果が大きいことが判明した。以上のように図 22 と図 23 の結果から希土類元素全般において、Jurkat 細胞が産生する IL-2 を抑制させる作用があることが推定されたが、これを確認するために、安定同位体として存在する残りの希土類元素を使用して検討を行う必要があると思われる。

本章では、希土類元素が細胞レベルで細胞性免疫を抑制させる可能性があることを示した。緒言において述べたように、T 細胞における IL-2 mRNA の発現は 3 つの転写

調節因子 (NFATc1、NF $\kappa$ B、AP-1) によって規定されているが<sup>25)</sup>、Jurkat 細胞を使用した先行研究では、細胞の IL-2 産生を抑制させる作用のある化合物は、そのメカニズムとして NFATc1、NF $\kappa$ B、AP-1 の何れかの転写活性を抑制することにより、IL-2 mRNA の発現を抑制すると報告している<sup>55-60)</sup>。これら先行研究と第一章、第二章の結果から希土類元素は、CN を阻害することにより NFATc1 の転写活性を抑え、IL-2 mRNA の発現を抑制し、細胞の IL-2 タンパク質産生を抑制すると推測できる。これを検討するため、第三章では Jurkat 細胞の IL-2 mRNA の発現と NFATc1、NF $\kappa$ B、AP-1 の転写活性に対する検討を、希土類元素の中でも La<sup>3+</sup>に焦点を絞って行った。

## 5. 結論

ヒト T 細胞様株 Jurkat 細胞が産生する IL-2 を指標に細胞レベルで細胞性免疫に対する希土類元素の影響について検討を行った。その結果、作用濃度に差があるものの  $\text{La}^{3+}$  をはじめとした  $\text{Sc}^{3+}$ 、 $\text{Y}^{3+}$ 、 $\text{Ce}^{3+}$ 、 $\text{Sm}^{3+}$ 、 $\text{Em}^{3+}$ 、 $\text{Yb}^{3+}$ 、 $\text{Lu}^{3+}$  の実験に用いた含む 8 種類の希土類元素は、細胞が ConA 誘導性に産生する IL-2 を減少させることが明らかとなった。従って、希土類元素の細胞性免疫を低下作用が細胞レベルで示唆された。

## 第三章

**Jurkat 細胞の核内転写調節因子に対する  
ランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) の影響**

## 1. 緒言

第一章ではランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) をはじめ数種類の希土類元素が *in vitro* において免疫抑制剤タクロリムス (FK506) やシクロスポリンの標的酵素であるカルシニューリン (CN) のホスファターゼ活性を阻害することを明らかとし、キネティクス解析によりその阻害様式が混合阻害であることを示してきた。また第二章では、これらの希土類元素はヒト T 細胞様株 Jurkat 細胞が ConA 誘導性に産生するインターロイキン-2 (IL-2) タンパク質の発現を抑制することを明らかとしてきた。T 細胞における IL-2 mRNA の発現は、CN 系を介した Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1 (NFATc1) と I $\kappa$ B kinase (IKK) 系を介した nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF $\kappa$ B) および mitogen-activated protein kinase (MAPK) 系を介した activator protein-1 (AP-1) の 3 つの転写調節因子が関与することが知られている (図 2)<sup>59,64</sup>)。この中で CN はリン酸化型 NFATc1 の脱リン酸化反応を触媒することにより細胞質内の NFATc1 を核内に移行させ、IL-2 mRNA の発現量を増加させることにより細胞性免疫を高めることが知られている (図 1)。第三章では、細胞性免疫に対する  $\text{La}^{3+}$  の作用機序を明らかとするために、最初に Jurkat 細胞を用いてリアルタイム RT-PCR により IL-2 mRNA レベルでの検討を行い、次いで核内の 3 つの転写調節因子 NFATc1、AP-1、NF $\kappa$ B のそれぞれの DNA 結合活性に対する  $\text{La}^{3+}$  の影響を検討した。

## 2. 試料および方法

### 2-1. 試料および試薬

ACTIVE MOTIF 社からは、AP-1 (activator protein 1) タンパク質測定のため TransAM AP-1 c-Jun Activation Assay、NFATc1 (nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1) タンパク質測定のため TransAM NFATc1 Activation Assay、NFκB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) タンパク質測定のため TransAM NFκB p65 Activation Assay を購入し、Jurkat 細胞の核タンパク質を抽出するため、Nuclear Extract Kit を購入し使用した。

Bio-Rad 社からは RC DC プロテインアッセイキット II、DS ファーマバイオメディカル社からは Jurkat 細胞、富士フィルム 和光純薬社からは RPMI 1640、コンカナバリン A (ConA)、塩化ランタン ( $\text{LaCl}_3$ )、メルカプトエタノール、99.5%エタノールをそれぞれ購入し使用した。また Nucleo Spin RNA は、MACHEREY NAGEL 社から購入した。Roche 社からウシ血清アルブミン (BSA)、SIGMA 社からストレプトマイシン-ペニシリン、Thermo Fisher Scientific 社からウシ胎児血清 (FCS)、TAKARA 社からは cDNA 合成試薬 (Prime Script™ Master Mix)、リアルタイム PCR 用試薬 (SYBR Premix Ex Taq™ II)、リアルタイム PCR 用プライマーを購入した。

### 2-2. 実験方法

#### 2-2-1. Jurkat 細胞からの全 RNA 抽出

Jurkat 細胞を  $5 \times 10^5$  個/mL の細胞密度に調製し 30 分、37°C で前培養した。その後  $\text{LaCl}_3$  を任意濃度で添加し、30 分、37°C で培養した後、刺激剤無添加、あるいは刺激剤として ConA (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を添加して 3 時間培養を行った。全 RNA は NucleoSpin® RNA を用いてキット付属のプロトコールに従って行った。実際には、細胞を含む培養液を培養シャーレから 15 mL 遠沈管へ移し、20°C、260 g、2 分間の遠心分離を行った。次に、遠心分離で得られた沈査のみを、タッピングによりほぐし Lysis Buffer RA1 を 350  $\mu\text{L}$  とメルカプトエタノール 3.5  $\mu\text{L}$  を添加し細胞をホモジナイズした。さらに、

NuceoSpin® Filter を Collection Tube にセットしホモジナイズした細胞ライセートを添加し、20℃、11,000 g、1 分間の遠心分離を行った。

遠心分離終了後、NuceoSpin® Filter を取り除き、濾過した細胞ライセートに 70%エタノールを加えよく混和した。また、新しく用意した NucleoSpin® RNA Column に、サンプルを添加し、20℃、11,000 g、30 秒間の遠心分離を行った。次に、再度用意した Collection Tube にカラムをセットし、Membrane Desalting Buffer (MDB) を 350 µL 添加し 20℃、11,000 g、1 分間の遠心分離を行い、DNase reaction mixture を調製した。

DNase reaction mixture は、rDNase 溶液 10 µL と Reaction Buffer for rDNase 90 µL を混和し調製した。DNase reaction mixture は、Collection Tube に 95 µL を添加して室温で 15 分間インキュベートし、Wash Buffer RAW2 200 µL をカラムに添加後 20℃、11,000 g、30 秒間にて遠心分離を行った。その後、新しい Collection Tube にカラムをセットして Wash Buffer RAW3 700 µL を添加して 20℃、11,000 g、30 秒間にて遠心分離を行った後、濾液を取り除いた。さらに、Wash Buffer RAW3 250 µL を添加して 20℃、11,000 g、2 分間の遠心分離を行った。また、Collection Tube (1.5 mL 用) に遠心分離後のカラムをセットし、RNase-free H<sub>2</sub>O を 60 µL 加えて 20℃、11,000 g、1 分間の遠心分離を行った。ここで溶出した溶液を RNA 溶液とし、分光光度計を用い 260 nm の吸光度測定により定量測定した。また、RNA は cDNA に使用するまで、マイナス 80℃のフリーザーにて保管した。

### 2-2-2. cDNA 合成

TAKARA 社の Prime Script™ Master Mix のプロトコールに従って cDNA を合成した。2-2-1 で抽出した全 RNA を 500 ng/µL の濃度に調製し、マイクロチューブに 1 µL 添加した。さらに 5×Prime Script RT Master Mix を 2 µL 添加した後、全量が 10 µL になるように RNase Free dH<sub>2</sub>O を添加した。反応は、37℃、15 分間行い、5 秒間 85℃で加熱することにより反応を停止した。合成した cDNA は使用するまでマイナス 30℃のフリーザーに保存した。

### 2-2-3. リアルタイム RT-PCR 法

TAKARA 社の SYBR Premix Ex Taq™ II のプロトコールに従って、測定を行った。

1 サンプルあたりマイクロチューブに SYBR Premix Ex Taq™ II を 12.5  $\mu$ L、センスプライマーとアンチセンスプライマーを最終濃度 0.4  $\mu$ M になるように入れ、dH<sub>2</sub>O を添加し全体量が 23  $\mu$ L になるように mixture を調製した。

PCR 測定用プレートに mixture を 23  $\mu$ L、2-2-2 で合成した cDNA サンプルを 2  $\mu$ L 添加し、リアルタイム PCR 装置 (TAKARA Thermal Cycler Dice Real Time System TP800) で測定を行った。PCR 反応は、95°C で 30 秒の初期変性の後、95°C で 5 秒間、60°C で 30 秒間を 40 サイクルとし反応させた。

IL-2 mRNA の発現量測定のために使用した、リアルタイム RT-PCR のセンスプライマーの配列は 5' -ACCCAGGGACTTAATCAGCAATA-3'、アンチセンスプライマーの配列は 5' -GAAATTCTACAATGGTTGCTGTC-3 である<sup>67)</sup>。また、ハウスキーピング遺伝子として用いたグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) mRNA の発現量測定のために行ったセンスプライマーの配列は 5' -GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'、アンチセンスプライマーの配列は 5' -TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3' である<sup>68)</sup>。

### 2-2-4. 核タンパク質の抽出

ACTIVE MOTIF 社の Nuclear Extract Kit のプロトコールに従って、Jurkat 細胞中の核タンパク質の抽出を行った。

Jurkat 細胞を  $5 \times 10^5$  個/mL の細胞密度に調製し 30 分、37°C で前培養を行った。さらに、LaCl<sub>3</sub> を任意濃度で添加し、30 分、37°C で培養した後、刺激剤無添加、あるいは刺激剤として ConA (25  $\mu$ g/mL) を添加して 3 時間培養を行った。

3 時間培養後、細胞を含む培養液を培養シャーレから 15 mL 遠沈管へ移し、20°C、260 g、2 分間の遠心分離を行った。遠心分離で得られた沈査のみを、タッピングによりほぐし PBS/Phosphatase Inhibitors を 5 mL 添加し、20°C、260 g、2 分間の遠心分離

を行った。さらに、遠心分離で得られた沈査のみを、タッピングによりほぐした後に 1×Hypotonic Buffer を 500  $\mu$ L 加え再懸濁させて 1.5 mL のマイクロチューブへと移して氷上で 15 分間インキュベーションした。その後キット付属の Detergent を 25  $\mu$ L 添加して 10 秒間ボルテックスミキサーで混和し、微量遠心機で 4°C、21,600 g、30 秒間の遠心操作を行い、上清（細胞質分画）をマイクロチューブに分注しマイナス 80°C のフリーザーに保管した。

核分画を含む沈査については Complete Lysis Buffer（10 mM DTT 5  $\mu$ L、Lysis Buffer AM1 44.5  $\mu$ L、Protease Inhibitor Cocktail 0.5  $\mu$ L）を 50  $\mu$ L 加え再懸濁し、10 秒間ボルテックスにより混和した。マイクロチューブをシェーカーに載せ、4°C で 30 分間の混和を行った。さらにボルテックスにて混和し微量遠心機で 4°C、21,600 g、10 分間遠心分離を行い、核分画である上清をマイクロチューブに分注した。抽出した核タンパク質は、マイナス 80°C でフリーザーにて保管した。

#### 2-2-5. 核タンパク質の定量

Lowry 法を基準とした Bio-Rad 社の RC DC プロテインアッセイキット II を使用し、2-2-4 で抽出した核タンパク質の測定を行った。

標準タンパク質としてウシ血清アルブミン（BSA）を使用して、1.5 mg/mL の標準液を作成し、さらにこれを用いて 1.0 mg/mL、0.5 mg/mL のタンパク質用液をそれぞれ 25  $\mu$ L 調製した。

BSA の標準液または、サンプルに RC I 試薬を、125  $\mu$ L 加えてボルテックスミキサーにより混和し室温で 1 分間インキュベーションを行った。さらに、RC II 試薬 125  $\mu$ L 加えてボルテックスミキサーにてよく混和後、微量遠心機で 21,600 g、5 分間遠心分離をし、上清を廃棄し水分がなくなるまで乾燥させた。その後 A 試薬に 1/50 容量の S 試薬を加えた A' 試薬を 127  $\mu$ L 加えて室温で 5 分間インキュベーションし、B 試薬を 1 mL 加えボルテックスミキサーにて混和させた。室温で 15 分間インキュベーションし、分光光度計（AS ONE 社 ASV11D）を用いて 750 nm で吸光度を測定した。同時

に、測定した BSA の標準液を元に検量線を作成し、タンパク質の定量を行った。

#### 2-2-6. 核内転写調節因子の DNA 結合活性の解析

ACTIVE MOTIF 社の TransAM 転写因子活性測定 ELISA を使用して、核内の NFATc1、AP-1、NFκB をそれぞれ測定した。キットの特徴として 96 穴プレートにはそれぞれの転写調節因子結合領域コンセンサス配列が固相化されており、ELISA 法での簡便な測定が可能である (図 24)。

##### 2-2-6-1. NFATc1

ACTIVE MOTIF 社の TransAM NFATc1 Activation Assay を用いて NFATc1 の DNA 結合活性の定量を行った。測定方法は、キット付属のプロトコールに従って行った。

核タンパク質は 2-2-4 の方法で抽出したタンパク質を使用した。検量線作成のための Positive Control は Jurkat + PHA nuclear extract を Complete Lysis Buffer で希釈し、NFATc1 を 0.5 μg/μL に調製した。これを更に 2 倍、4 倍に希釈し調製し検量線作成に使用した。

測定は、まず初めに、NFATc1 結合領域に対するコンセンサス配列 (5'-AGGAAA-3') が固相化された 96 穴プレートの各ウェルに Binding Buffer AM1 を 40 μL ずつ添加した。次に、サンプル、Positive Control、ブランクとして Complete Lysis Buffer をそれぞれ 10 μL 添加した。プレートにシートカバーをしてシェーカーの上で攪拌しながら室温で 1 時間反応させた。1 時間後に各ウェルを 200 μL の Washing Buffer で 3 回洗浄し、Antibody Binding Buffer で 500 倍希釈した抗 NFATc1 抗体を 100 μL ずつ添加し 1 時間反応させた。1 時間後に各ウェルを 200 μL の Washing Buffer で 3 回洗浄し、Antibody Binding Buffer で 1,000 倍希釈した HRP で標識した抗マウス IgG 抗体を 100 μL ずつ添加し 1 時間反応させた。1 時間後に各ウェルを 200 μL の Washing Buffer で 4 回洗浄し、室温に戻しておいた Developing Solution を 100 μL ずつ添加し 5 分から 10 分間反応させた。反応後、Stop Solution を 100 μL 添加しマイクロプレートリー

ダー (CORONA ELECTRIC SH-1000Lab) を用いて 2 波長 450 nm/655 nm での吸光度測定を行い、検量線から核タンパク質中の NFATc1 量を求めた。これを 2-2-5 の方法で測定した全核タンパク質量で補正することにより定量化を行った。

#### 2-2-6-2. AP-1

ACTIVE MOTIF 社の TransAM AP-1 c-Jun Activation Assay を用いて AP-1 の DNA 結合活性の定量を行った。測定方法は、キット付属のプロトコールに従って行った。

核タンパク質は 2-2-4 の方法で抽出したタンパク質を使用した。検量線作成のための Positive Control は K-562 nuclear Extract (TPA) を Complete Lysis Buffer で希釈し、NFATc1 を 0.25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  に調製した。これを更に 2 倍、4 倍に希釈し調製し検量線作成に使用した。

測定は、まず初めに、AP-1 結合領域に対するコンセンサス配列 (5'-TGAGTCA-3') が固相化された 96 穴プレートの各ウェルに Binding Buffer AM1 を 30  $\mu\text{L}$  ずつ添加した。次に、サンプル、Positive Control、ブランクとして Complete Lysis Buffer をそれぞれ 20  $\mu\text{L}$  添加した。プレートにシートカバーをしてシェーカーの上で攪拌しながら室温で 1 時間反応させた。1 時間後に各ウェルを 200  $\mu\text{L}$  の Washing Buffer で 3 回洗浄し、Antibody Binding Buffer で 1,000 倍希釈した抗リン酸化 c-Jun 抗体を 100  $\mu\text{L}$  ずつ添加し 1 時間反応させた。1 時間後に各ウェルを 200  $\mu\text{L}$  の Washing Buffer で 3 回洗浄し、Antibody Binding Buffer で 1,000 倍希釈した HRP で標識した抗マウス IgG 抗体を 100  $\mu\text{L}$  ずつ添加し 1 時間反応させた。1 時間後に各ウェルを 200  $\mu\text{L}$  の Washing Buffer で 4 回洗浄し、室温に戻しておいた Developing Solution を 100  $\mu\text{L}$  ずつ添加し 2 分間から 20 分間反応させた。反応後、Stop Solution を 100  $\mu\text{L}$  添加しマイクロプレートリーダー (CORONA ELECTRIC SH-1000Lab) を用いて 2 波長 450 nm/655 nm での吸光度測定を行い、検量線から核タンパク質中の AP-1 (c-Jun) 量を求めた。これを 2-2-5 の方法で測定した全核タンパク質量で補正することにより定量化を行った。

### 2-2-6-3. NFκB

ACTIVE MOTIF 社の TransAM NFκB p65 Activation Assay を用いて NFκB の DNA 結合活性の定量を行った。測定方法は、キット付属のプロトコールに従って行った。

核タンパク質は 2-2-4 の方法で抽出したタンパク質を使用した。検量線作成のための Positive Control は Jurkat Nuclear Extract (TPA+Cl) を Complete Lysis Buffer で希釈し、NFκB を 0.125 μg/μL に調製した。これを更に 2 倍、4 倍に希釈し調製し検量線作成に使用した。

測定は、まず初めに、NFκB 結合領域に対するコンセンサス配列 (5'-GGGACTTCC-3') が固相化された 96 穴プレートの各ウェルに Binding Buffer AM1 を 30 μL ずつ添加した。次に、サンプル、Positive Control、ブランクとして Complete Lysis Buffer をそれぞれ 20 μL 添加した。プレートにシートカバーをしてシェーカーの上で攪拌しながら室温で 1 時間反応させた。1 時間後に各ウェルを 200 μL の Washing Buffer で 3 回洗浄し、Antibody Binding Buffer で 1,000 倍希釈した抗 NFκB 抗体を 100 μL ずつ添加し 1 時間反応させた。1 時間後に各ウェルを 200 μL の Washing Buffer で 3 回洗浄し、Antibody Binding Buffer で 1,000 倍希釈した HRP で標識した抗マウス IgG 抗体を 100 μL ずつ添加し 1 時間反応させた。1 時間後に各ウェルを 200 μL の Washing Buffer で 4 回洗浄し、室温に戻しておいた Developing Solution を 100 μL ずつ添加し 1 分から 5 分間反応させた。反応後、Stop Solution を 100 μL 添加しマイクロプレートリーダー (CORONA ELECTRIC SH-1000Lab) を用いて 2 波長 450 nm/655 nm での吸光度測定を行い、検量線から核タンパク質中の NFκB 量を求めた。これを 2-2-5 の方法で測定した全核タンパク質量で補正することにより定量化を行った。

### 2-2-7. 統計処理

得られた結果は、Dunnett 検定 (Excel 2016:Microsoft Corporation) で解析を行った。有意水準は  $p < 0.05$  または  $p < 0.01$  とした。

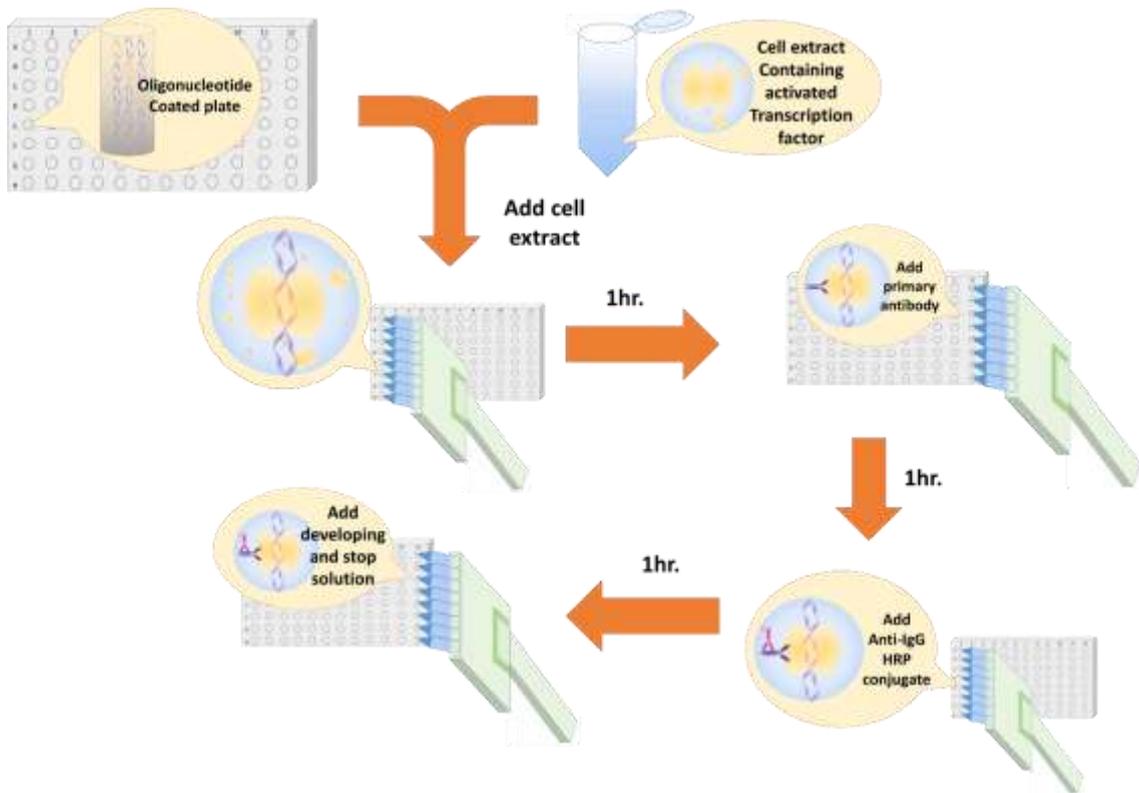


図 24 TransAM による NFATc1 の DNA 結合活性測定 の原理

(ACTIVE MOTIF INSTRUCTION MANUAL TransAM NFATc1 を一部改変)

96 穴プレートには NFATc1 結合領域コンセンサス配列 (5'-AGGAAA-3') が固相化されている。核タンパク質をプレートに添加後 1 時間反応させてから、NFATc1 に対する抗体を 1 時間反応させた。さらに二次抗体を反応させた後、発色反応を行い、測定を行った。

### 3. 結果

#### 3-1. Jurkat 細胞の IL-2 mRNA 発現に対するランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) の影響

$\text{La}^{3+}$ は、コンカナバリン A (ConA) で誘導した Jurkat 細胞の IL-2 産生を抑制することがタンパク質レベルで明らかとなった。次に RT-リアルタイム PCR を用いて IL-2 mRNA の発現レベルで検討した。

ConA (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 刺激した Jurkat 細胞に対し、 $\text{LaCl}_3$  をそれぞれ 0 mM、0.1 mM、0.3 mM、1.0 mM、3.0 mM 培地に添加し、ハウスキーピング遺伝子であるグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) mRNA と IL-2 mRNA をリアルタイム PCR でそれぞれ測定した。IL-2 mRNA 量を GAPDH mRNA 量で補正した結果を図 25 に示す。ConA 刺激のみのコントロールに対して 0.1 mM の  $\text{LaCl}_3$  添加で IL-2 mRNA 発現は有意に低下し 3.0 mM の  $\text{La}^{3+}$ では、IL-2 mRNA 量がほぼ消失することが明らかとなった。この結果から  $\text{La}^{3+}$ は mRNA の発現レベルで Jurkat 細胞の IL-2 産生を低下させる作用があることが明らかとなった。

#### 3-2. ランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) の核内転写調節因子に対する影響

これまでの結果から  $\text{La}^{3+}$ は *in vitro* において CN 活性を混合阻害することが示され、また  $\text{La}^{3+}$ は Jurkat 細胞が ConA 誘導性に産生する IL-2 の産生を mRNA のレベルで抑制することが明らかとなった。CN は IL-2 mRNA 発現に必要な Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1 (NFATc1) の脱リン酸化反応を触媒し、細胞性免疫に関与する。IL-2 mRNA の発現は NFATc1、AP-1 (activator protein 1)、NF $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) の 3 つの転写調節因子によって制御されているが、 $\text{La}^{3+}$ の影響についてこれらの核内転写調節因子レベルで検討を行った。

### 3-2-1. ランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) の NFATc1 に対する影響

ConA (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 刺激した Jurkat 細胞に対し、 $\text{LaCl}_3$  をそれぞれ 1.0 mM、2.0 mM 培地に添加し、3 時間培養を行った後、核タンパク質を抽出した。NFATc1 結合領域のコンセンサス配列 5'-AGGAAA-3' が固相化されている TransAM NFATc1 Activation Assay (ACTIVE MOTIF 社) を使用した ELISA 法により、核内の NFATc1 の DNA 結合活性を測定した。図 26 に示すように、ConA 刺激を行うと、無刺激と比較して有意に核内の NFATc1 量は増加した。一方、1 mM の  $\text{LaCl}_3$  は核内の NFATc1 量を有意に低下させることが明らかとなり、2 mM では無刺激のレベルにまで低下させた。

### 3-2-2. ランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) の AP-1 に対する影響

ConA (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 刺激した Jurkat 細胞に対し、 $\text{LaCl}_3$  をそれぞれ 1.0 mM、2.0 mM 培地に添加し、3 時間培養を行った後、核タンパク質を抽出した。AP-1 結合領域のコンセンサス配列 5'-TGAGTCA-3' が固相化されている TransAM AP-1 Activation Assay (ACTIVE MOTIF 社) を使用した ELISA 法により、核内の AP-1 の DNA 結合活性を測定した。図 27 に示すように、ConA 刺激を行うと、無刺激と比較して有意に核内の AP-1 量は増加した。一方、1 mM の  $\text{LaCl}_3$  は核内の AP-1 量を有意に低下させることが明らかとなった。

### 3-2-3. ランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) の NF $\kappa$ B に対する影響

ConA (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 刺激した Jurkat 細胞に対し、 $\text{LaCl}_3$  をそれぞれ 1.0 mM、2.0 mM 培地に添加し、3 時間培養を行った後、核タンパク質を抽出した。NF $\kappa$ B 結合領域のコンセンサス配列 5'-GGGACTTCC-3' が固相化されている TransAM NF $\kappa$ B Activation Assay (ACTIVE MOTIF 社) を使用した ELISA 法により、核内の NF $\kappa$ B の DNA 結合活性を測定した。図 28 に示すように、ConA 刺激を行うと、無刺激と比較して有意に核内の NF $\kappa$ B 量は増加した。一方、1 mM の  $\text{LaCl}_3$  は核内の NF $\kappa$ B 量を有意に低下させ、2 mM では無刺激のレベルにまで低下させた。

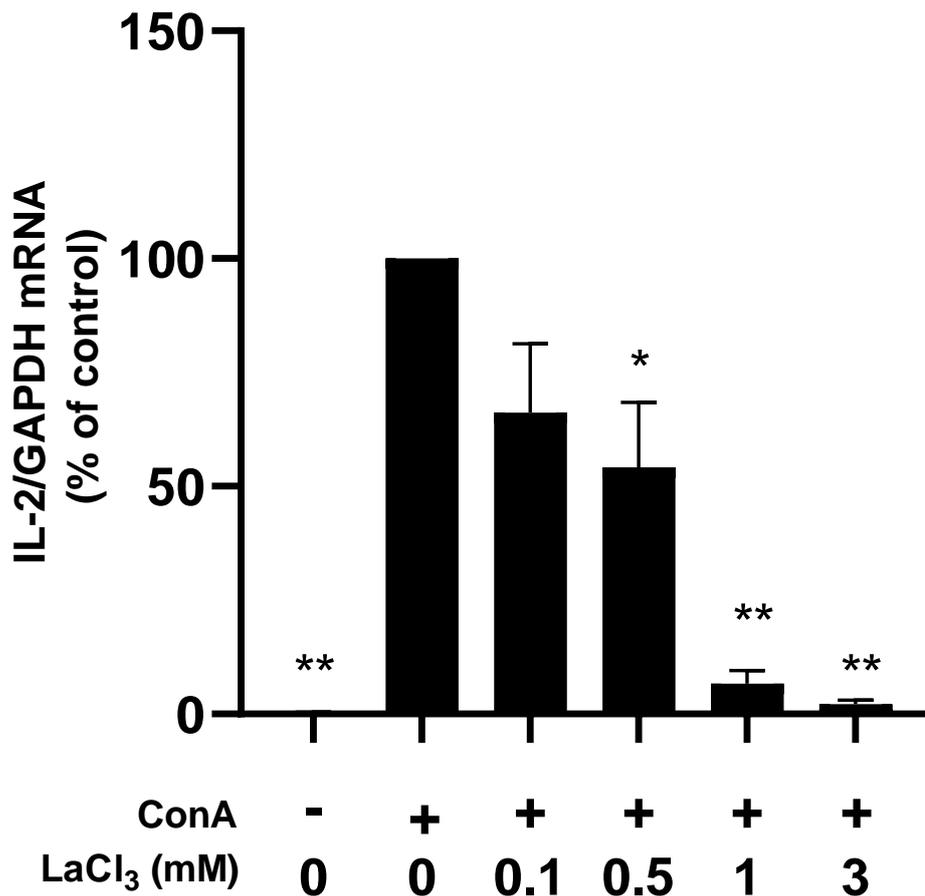


図 25 Jurkat 細胞の IL-2 mRNA 発現に対するランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) の影響

Jurkat 細胞を  $5 \times 10^5$  個/mL の細胞密度に調製し 30 分、 $37^\circ\text{C}$  で前培養した。その後  $\text{LaCl}_3$  を任意濃度で添加し、30 分、 $37^\circ\text{C}$  で培養した後、刺激剤無添加、あるいは刺激剤として ConA ( $25 \mu\text{g/mL}$ ) を添加して 3 時間培養を行った。全 RNA の抽出は NuceoSpin® RNA を用いてプロトコールに従って行い、cDNA 合成は TAKARA 社の Prime Script™ Master Mix のプロトコールに従って行った。PCR 反応液は、TAKARA 社の SYBR Premix Ex Taq™ II のプロトコールに従って調製し、リアルタイム PCR 装置 (TAKARA Thermal Cycler Dice Real Time System TP800) を使用して、PCR 測定を行った。

Dunnett 検定 (Excel 2016) を使用してコントロールとの有意差 (\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ ) を検定した。

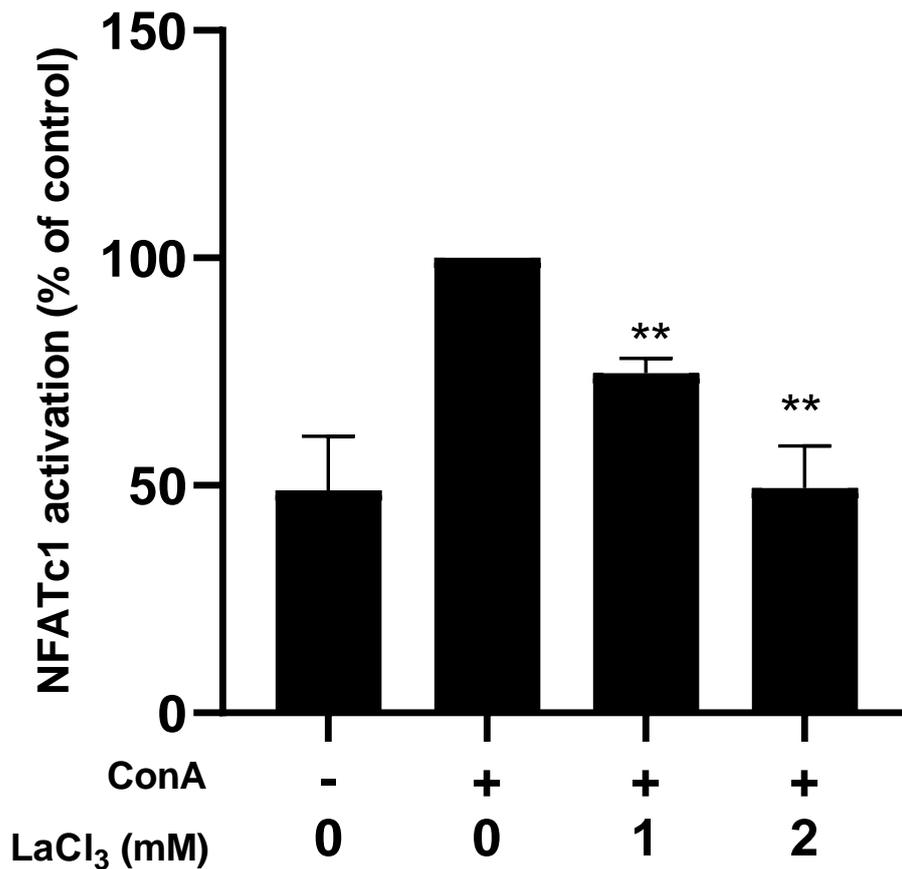


図 26 Jurkat 細胞の NFATc1 の DNA 結合活性に対するランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) の影響

Jurkat 細胞を  $5 \times 10^5$  個/mL の細胞密度に調製し 30 分、 $37^\circ\text{C}$  で前培養を行った。さらに、 $\text{LaCl}_3$  を任意濃度で添加し、30 分、 $37^\circ\text{C}$  で培養した後、刺激剤無添加、あるいは刺激剤として ConA ( $25 \mu\text{g/mL}$ ) を添加して 3 時間培養を行った。核タンパク質の抽出は、ACTIVE MOTIF 社の Nuclear Extract Kit のプロトコールに従って行い、NFATc1 の測定は、ACTIVE MOTIF 社の TransAM NFATc1 Activation Assay を使用した。測定方法はキット付属のプロトコールに従い、96 穴プレートに固相化された NFATc1 結合領域コンセン配列サス ( $5'\text{-AGGAAA-3}'$ ) に結合した核タンパク質を一次抗体と反応させた後、二次抗体を用いた発色反応を行った。

Dunnett 検定 (Excel 2016) を使用してコントロールとの有意差 (\*\* $p < 0.01$ ) を検定した。

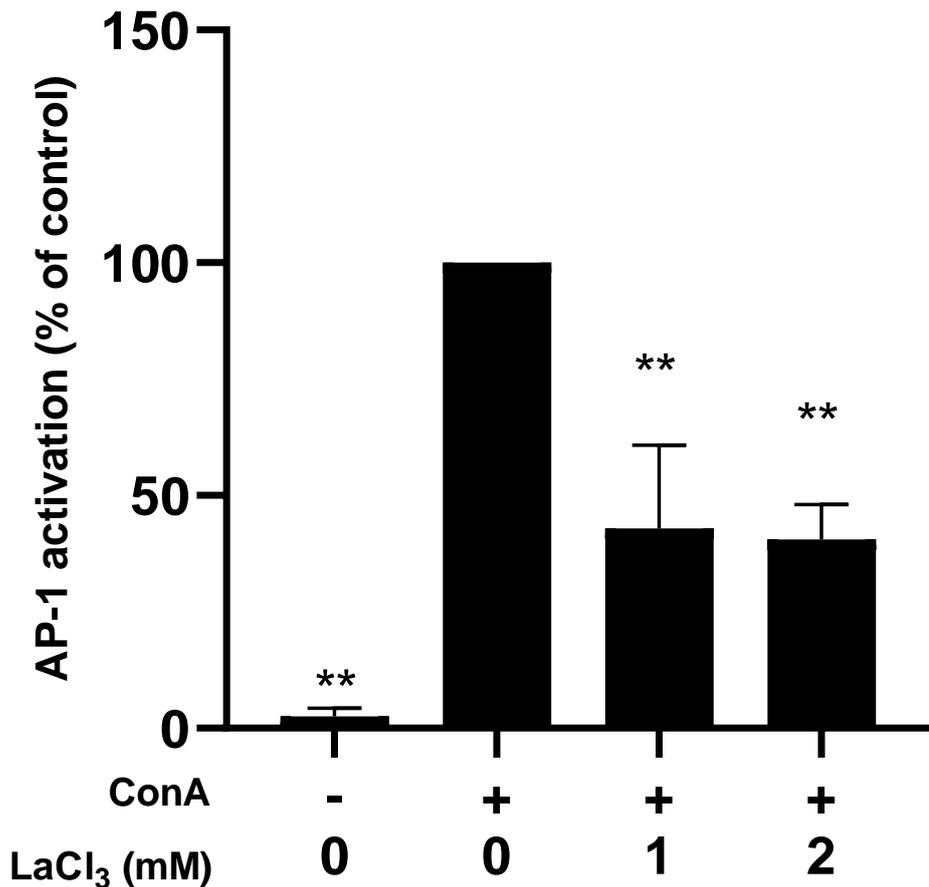


図 27 Jurkat 細胞の AP-1 の DNA 結合活性に対するランタンイオン (La<sup>3+</sup>) の影響

Jurkat 細胞を  $5 \times 10^5$  個/mL の細胞密度に調製し 30 分、37°C で前培養を行った。さらに、LaCl<sub>3</sub> を任意濃度で添加し、30 分、37°C で培養した後、刺激剤無添加、あるいは刺激剤として ConA (25 μg/mL) を添加して 3 時間培養を行った。核タンパク質の抽出は、ACTIVE MOTIF 社の Nuclear Extract Kit のプロトコールに従って行い、AP-1 の測定は、ACTIVE MOTIF 社の TransAM AP-1 Activation Assay を使用した。測定方法はキット付属のプロトコールに従い、96 穴プレートに固相化された AP-1 結合領域コンセン配列サス (5'-TGAGTCA-3') に結合した核タンパク質を一次抗体と反応させた後、二次抗体を用いた。

Dunnett 検定 (Excel 2016) を使用してコントロールとの有意差 (\*\* $p < 0.01$ ) を検定した。

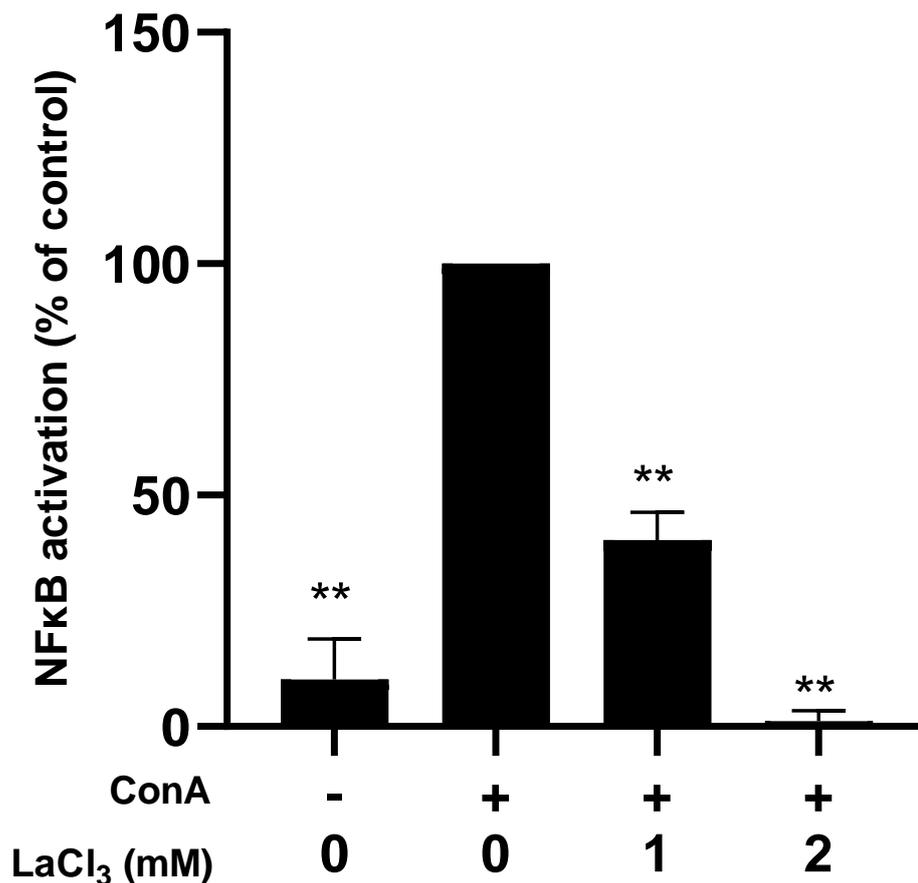


図 28 Jurkat 細胞の NFκB の DNA 結合活性に対するランタンイオン (La<sup>3+</sup>) の影響

Jurkat 細胞を  $5 \times 10^5$  個/mL の細胞密度に調製し 30 分、37°C で前培養を行った。さらに、LaCl<sub>3</sub> を任意濃度で添加し、30 分、37°C で培養した後、刺激剤無添加、あるいは刺激剤として ConA (25 μg/mL) を添加して 3 時間培養を行った。核タンパク質の抽出は、ACTIVE MOTIF 社の Nuclear Extract Kit のプロトコールに従って行い、NFκB の測定は、ACTIVE MOTIF 社の TransAM NFκB p65 Activation Assay を使用した。測定方法はキット付属のプロトコールに従い、96 穴プレートに固相化された NFκB 結合領域コンセン配列サス (5'-GGGACTTCC-3') に結合した核タンパク質を一次抗体と反応させた後、二次抗体を用いた。

Dunnett 検定 (Excel 2016) を使用してコントロールとの有意差 (\*\* $p < 0.01$ ) を検定した。

#### 4. 考察

T細胞における IL-2 mRNA の発現は、カルシニューリン (CN) 系を介した Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1 (NFATc1)、I $\kappa$ B kinase (IKK) 系を介した nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF $\kappa$ B) および mitogen-activated protein kinase (MAPK) 系を介した activator protein-1 (AP-1) の3つの転写調節因子によって制御されている (図 2)<sup>59,64</sup>)。この中でリン酸化型 NFATc1 は CN の脱リン酸化反応の基質となっており、リン酸化型 NFATc1 は脱リン酸化型 NFATc1 に変化をすることにより核内に移行し、IL-2 mRNA の発現量を増加させることが知られている (図 1)。従って、ランタンイオン (La<sup>3+</sup>) の作用機序を明らかにするために、核内の転写調節因子 NFATc1、AP-1、NF $\kappa$ B のそれぞれの DNA 結合活性について検討を行った。その結果、予想通り La<sup>3+</sup>により、核内の NFATc1 量は有意に低下することを認めたが、興味深いことに NF $\kappa$ B、AP-1 量についても有意に低下することが明らかとなった (図 26、27、28)。

先行研究では La<sup>3+</sup>は非選択的カルシウム拮抗剤としての機能を持つことが知られている<sup>69-72</sup>)。従って、LaCl<sub>3</sub> は細胞内の Ca<sup>2+</sup>濃度を調節することにより CN 活性に影響を与え、NFATc1 の DNA 結合活性を抑制し IL-2 mRNA 発現を抑制する可能性も考えられる。実際に Liu 等は LaCl<sub>3</sub> がオキシステロールで誘導した ECV-304 細胞の細胞内 Ca<sup>2+</sup>の上昇や Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) および NF $\kappa$ B のシグナル経路の活性化を抑制することを報告している<sup>73</sup>)。また、Guo らは RAW264.7 細胞を用いて LaCl<sub>3</sub> がリポポリサッカライド (LPS) で誘導した一酸化窒素 (NO) や腫瘍壊死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) の産生を抑制すること、またそのメカニズムとして LaCl<sub>3</sub> がカルシウム拮抗剤として機能することによりプロテインキナーゼ C (PKC) と NF $\kappa$ B のシグナル経路を抑制することを報告している<sup>74</sup>)。その一方で、LaCl<sub>3</sub> の新規な作用として、Chen 等は LPS 刺激した HUVEC 細胞を用いて LaCl<sub>3</sub> が炎症性サイトカイン産生を抑制し、このメカニズムとして LaCl<sub>3</sub> が核内の NF $\kappa$ B を低下させるだけでなく、ヒストン脱メチル化酵素である Jmjd3 をタンパク質レベルで低下させることにより NF $\kappa$ B と DNA

の結合を抑制することを示している<sup>75)</sup>。また、Jiang 等は  $\text{LaCl}_3$  が Rankl で誘導した破骨細胞の形成と機能を低下させることを明らかとしており、そのメカニズムとして  $\text{LaCl}_3$  が NFATc1 と NF $\kappa$ B をタンパク質レベルでダウンレギュレーションすることを報告している<sup>76)</sup>。従って、 $\text{LaCl}_3$  は、骨形成や炎症反応など様々な細胞の高次機能に対して多様なメカニズムにより作用を発揮するものと考えられる。本研究においても  $\text{La}^{3+}$  は、NFATc1 だけではなく、NF $\kappa$ B と AP-1 の DNA 結合活性を有意に低下させることにより Jurkat 細胞の ConA 誘導性に産生される IL-2 産生を抑制することが明らかとなった (図 29)。今後は、これらの作用機序の詳細について検討を行う必要がある。

## 5. 結論

第一章、第二章で  $\text{La}^{3+}$  は *in vitro* で CN 活性を混合阻害すること、Jurkat 細胞が ConA 誘導性に産生する IL-2 タンパク質産生を抑制することを明らかとしてきた。さらに本章においてリアルタイム RT-PCR 法により、IL-2 mRNA の発現レベルで検討を行ったところ、 $\text{La}^{3+}$  は転写レベルで作用することが示された。IL-2 mRNA 発現に関与する 3 つの転写調節因子 NFATc1、AP-1、NF $\kappa$ B について核内のタンパク量を測定して検討したところ、 $\text{La}^{3+}$  により NFATc1 の DNA 結合活性は有意に抑制されていることが明らかとなった。また、興味深いことに AP-1、NF $\kappa$ B の DNA 結合活性も有意に低下していることが示された。これらの結果から  $\text{La}^{3+}$  は IL-2 mRNA 発現に関わる 3 つの転写調節因子の DNA 結合活性を低下させることにより、Jurkat 細胞がコンカナバリン A (ConA) 誘導性に産生する IL-2 タンパク質産生を抑制することが明らかとなった。

## まとめ

レアアースとも呼ばれている希土類元素は、周期表の 3 族に属するスカンジウム (Sc)、イットリウム (Y) およびランタン (La) からルテチウム (Lu) までの 15 種類のランタノイドを含む 17 元素からなるグループである。希土類元素は 3 価で安定しており生体内ではほとんど存在しない元素であるが、蛍光体、高屈折ガラス、燃料電池、ガラス研磨剤、磁石、夜光塗料などの原料・素材として工業方面で広く利用されている<sup>77)</sup>。

また、希土類元素は臨床分野でも多く利用されており、例えば La を主成分とした炭酸ランタン ( $\text{La}_2[\text{CO}_3]_3$ ) はリン (P) を吸着する特性を利用して、慢性腎臓病患者に見られる高リン血症の改善薬として<sup>8)</sup>、セリウムはシュウ酸セリウムの形状で制吐薬として使用されている<sup>9)</sup>。また、ガドリニウムは磁気共鳴画像 (MRI) の血管造影剤として<sup>10,11)</sup>、放射性のイットリウム ( $^{90}\text{Y}$ ) と放射性のサマリウム ( $^{153}\text{Sm}$ ) は放射性医薬品として使用されている<sup>12,13)</sup>。従って、希土類元素の新規な生物学的影響や機能性

に対する基礎的な検討を行い、それを医薬品に応用することは人の健康維持・予防に非常に重要なことである。本研究では免疫に着目し、ランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) を中心に希土類元素の細胞性免疫に対する影響について免疫抑制剤の標的酵素であるカルシニューリン (CN) を使用した酵素レベル、ヒト T 細胞様株 Jurkat 細胞を使用した細胞レベルで研究を行い、新規な免疫抑制剤探索の基盤となるよう検討を試みた。

最初に  $\text{LaCl}_3$  を使用してウシ脳由来 CN (bCN) とリコンビナント CN (rhCN) のホスファターゼ活性への影響について検討したところ、それぞれ阻害を認め、bCN に対する 50% 阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) は  $6.7 \mu\text{M}$ 、rhCN に対する  $\text{IC}_{50}$  は  $9.5 \mu\text{M}$  であった (図 6、12)。また多くの希土類元素が rhCN を阻害する作用があること (図 14)、 $\text{La}^{3+}$  は bCN と rhCN を混合阻害 (図 11、15) することを示した。次に、コンカナバリン A (ConA) 誘導性に Jurkat 細胞が産生するインターロイキン-2 (IL-2) タンパク質を指標に細胞レベルで検討を行った。その結果、 $\text{La}^{3+}$ をはじめ多くの希土類元素は、作用濃度に差

があるもの Jurkat 細胞の IL-2 産生を抑制することが明らかとなり (図 21、22、23)、また、La<sup>3+</sup>は Jurkat 細胞の IL-2 mRNA の発現レベルで作用することが示された (図 25)。これらの結果から、La<sup>3+</sup>を含む希土類元素は、細胞レベルで細胞性免疫を低下させる作用があると考えられた。T 細胞における IL-2 mRNA の発現は、CN 系を介した Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1 (NFATc1)、I $\kappa$ B kinase (IKK) 系を介した nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF $\kappa$ B) および mitogen-activated protein kinase (MAPK) 系を介した activator protein-1 (AP-1) の 3 つの転写調節因子によって制御されている (図 2) <sup>59,64</sup>)。この中でリン酸化型 NFATc1 は CN の脱リン酸化反応の基質となっており、リン酸化型 NFATc1 は脱リン酸化型 NFATc1 に変化をすることにより核内に移行し、IL-2 mRNA の発現量を増加させることが知られている (図 1)。従って、La<sup>3+</sup>の作用機序を明らかとするために、核内の転写調節因子 NFATc1、AP-1、NF $\kappa$ B のそれぞれの DNA 結合活性について検討を行った。その結果、予想通り La<sup>3+</sup>により、核内の NFATc1 量は有意に低下することを認めたが、興味深いことに NF $\kappa$ B、AP-1 量についても有意に低下することが明らかとなった (図 26、27、28)。

本研究により、La<sup>3+</sup>の CN のホスファターゼ活性に対する阻害作用と、Jurkat 細胞の IL-2 産生阻害様式の結果から、La<sup>3+</sup>は細胞内において CN を混合阻害により阻害することにより NFATc1 の脱リン酸化を抑制し、DNA 結合活性を低下させ IL-2 mRNA 発現量と IL-2 タンパク質産生を抑制することが示唆された。しかしながら、La<sup>3+</sup>は非選択的カルシウム拮抗剤としての機能を持つことから <sup>69-72</sup>)、La<sup>3+</sup>は細胞内の Ca<sup>2+</sup>濃度を調節することにより CN 活性に影響を与え、NFATc1 の DNA 結合活性を抑制し IL-2 mRNA 発現を抑制する可能性も考えられる。その一方で、培養細胞を用いた先行研究では、LaCl<sub>3</sub> は、NFATc1 や NF $\kappa$ B の DNA 結合活性に影響を与えることが示されており <sup>75,76</sup>)、La<sup>3+</sup>は種々の細胞応答に対して多様なメカニズムにより、その機能を発揮するものと思われる。

La<sup>3+</sup>をはじめとする希土類元素は、細胞性免疫を制御・調節する機能があることが

酵素レベル、細胞レベルで示されたが、免疫抑制剤としての実用化には更なる検討が必要と考えられる。

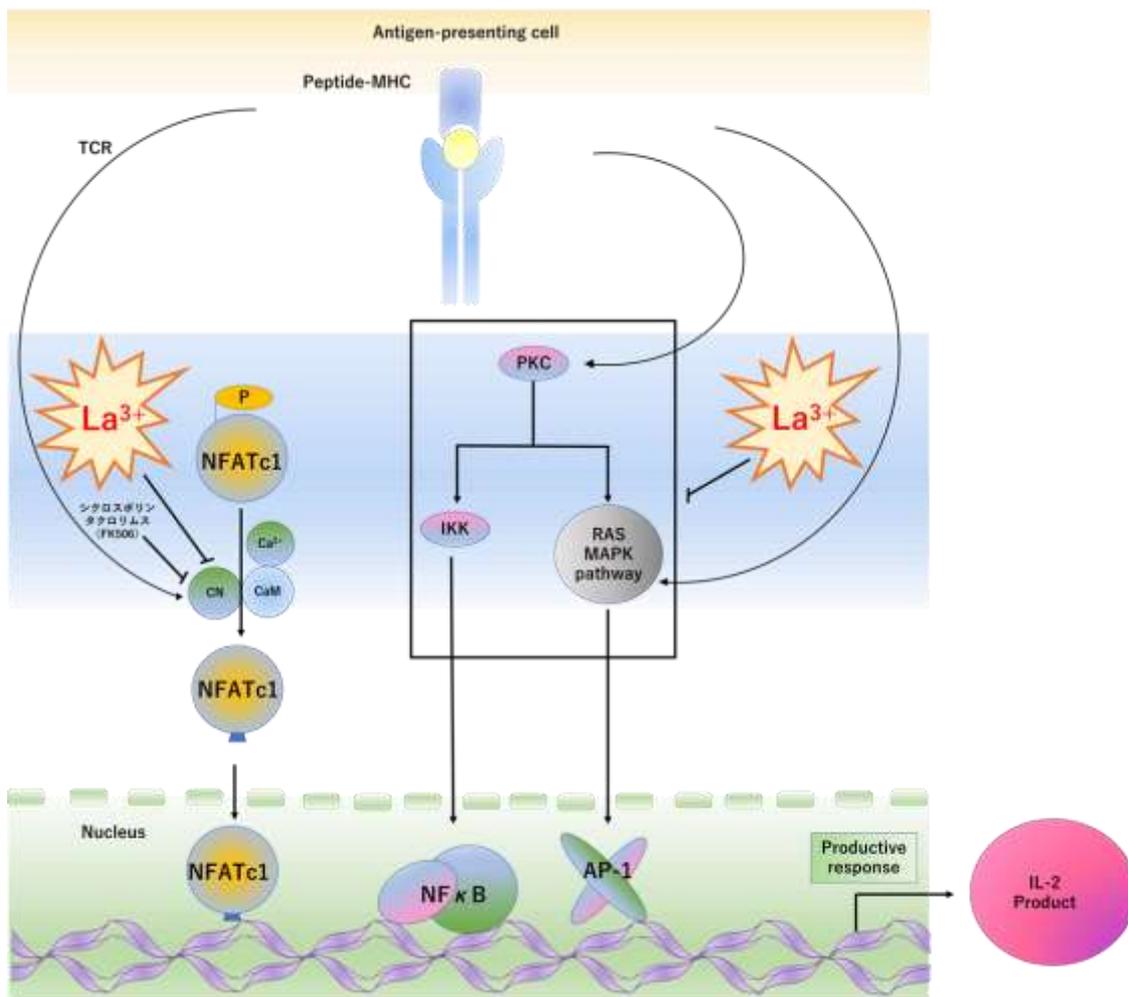


図 29 ランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) による IL-2 mRNA 発現抑制の作用機序 (参考文献 25 を改変)

$\text{La}^{3+}$ は、カルシニューリンの阻害を介して NFATc1 の核内移行を抑制し、結果として IL-2 mRNA 発現を制御する転写調節因子 NFATc1、NF $\kappa$ B、AP-1 の DNA 結合活性を抑制する。

## 参考文献

- 1) 木村優 微量栄養素の世界 ポピュラーサイエンス (1999) pp.171-178.
- 2) Weeks ME. (1958) Discovery of the Elements 6th EDITION. *J Chem Edu* 695-728.
- 3) Mineral Commodity Summaries 2019 (2019) *U.S. Geological Survey* 132-133.
- 4) 足立吟也編 希土類の化学 化学同人(1999)pp.3-4、pp.30-33、pp.184-186、pp.848-858.
- 5) 渡辺正監訳 元素大百科事典 朝倉書店(2007) pp.203-273.
- 6) 細矢治夫監修、山崎昶編著、社団法人日本化学会編集 元素の辞典 みみずく舎 (2009) pp.69-71、pp.122-123、pp.171-208.
- 7) 山本喜一監修 元素のすべてがわかる本 ナツメ社(2011) pp.98-99、pp.138-139、pp.174-203.
- 8) Shigematsu T, Sakai T, Kono T, Kimura Y, Takuma Y, Tsuruta Y, Mori Y, Taki M, Moriishi M, Minakuchi J, Obayashi S, Miyake S, Emoto H, Furuhashi M, Tsujimoto Y, Arisaka H, Ishizaki M, Shimoyama H, Kim S, Hirose S, Kurosawa A, Matsui N, Nakazawa R, Watanabe T, Kabaya T, Tanaka Y, Takahashi T, Ozawa T, Nakamura K, Nishioka M, Higashi H, Koga N. (2008) Multicenter prospective randomized, double-blind comparative study between lanthanum carbonate and calcium carbonate as phosphate binders in Japanese hemodialysis patients with hyperphosphatemia. *Clin Nephrol* 70: 404-410.
- 9) Jakupec MA, Unfried P, Keppler BK. (2005) Pharmacological properties of cerium compounds. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 153: 101-111. doi:10.1007/s10254-004-0024-6
- 10) Sherry AD, Caravan P, Lenkinski RE. (2009) Primer on gadolinium chemistry. *J Magn Reson Imaging* 30: 1240-1248. doi: 10.1002/jmri.21966
- 11) Hao D, Ai T, Goerner F, Hu X, Runge VM, Tweedle M. (2012) MRI contrast agents: basic chemistry and safety. *J Magn Reson Imaging* 36: 1060-1071. doi:

10.1002/jmri.23725

- 12) Otte A, Herrmann R, Heppeler A, Behe M, Jermann E, Powell P, Maecke HR, Muller J. (1999) Yttrium-90 DOTATOC: first clinical results. *Eur J Nucl Med* 26:1439-1447.
- 13) Baczyk M, Czepczyński R, Milecki P, Pisarek M, Oleksa R, Sowiński J. (2007) Efficacy of samarium 153 and strontium 89 treatment for bone metastases in prostate cancer patients: monotherapy vs. treatment combined with external beam radiotherapy. *Preliminary Rep* 12: 211-216. doi: 10.1016/S1507-1367(10)60059-4
- 14) Lou J, Hu Q, Ma T, Chen W, Wang J, Pankaj P. (2019) A novel approach with holmium laser ablation for endoscopic management of intrahepatic biliary stricture. *BMC Gastroenterol* 19:172. doi: 10.1186/s12876-019-1093-y.
- 15) Deeb JG, Bencharit S, Dalal N, Abdulmajeed A, Grzech-Leśniak K. (2019) Using Er: YAG laser to remove lithium disilicate crowns from zirconia implant abutments: An *in vitro* study. *PLoS One* 14: e0223924. doi: 10.1371/journal.pone.0223924.
- 16) van Eijk CWE. (2008) Radiation detector developments in medical applications: inorganic scintillators in positron emission tomography. *Radiat Prot Dosimetry* 129:13-21. doi: 10.1093/rpd/ncn043.
- 17) Shi Y. (2009) Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. *Cell* 139:468-484. doi: 10.1016/j.cell.2009.10.006
- 18) Molkenin JD. (2004) Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc Res* 63:467-475. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.01.021
- 19) Wu HY, Tomizawa K, Oda Y, Wei FY, Lu YF, Matsushita M, Li ST, Moriwaki A, Matsui H. (2004) Critical role of calpain-mediated cleavage of calcineurin in excitotoxic Neurodegeneration. *J Biol Chem* 279: 4929-4940. doi: 10.1074/jbc.M309767200
- 20) Gong CX, Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (1994) Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau is dephosphorylated by protein phosphatase-2B (calcineurin), *J*

*Neurochem* 62: 803-806.

- 21) Garver TD, Kincaid RL, Conn RA, Billingsley ML. (1999) Reduction of calcineurin activity in brain by antisense oligo-nucleotides leads to persistent phosphorylation of tau protein Thr181 and Thr231. *Mol Pharmacol* 55: 632-641.
- 22) Crabtree GR. (1999) Generic signals and specific outcomes: signaling through  $Ca^{2+}$ , calcineurin, and NF-AT. *Cell* 96: 611-614. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80571-1
- 23) Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporine A and FKBP-PK506 complexes. *Cell* 66: 807-815. doi:10.1016/0092-8674(91)90124-H
- 24) 安原真人 (2008) 血中薬物濃度モニタリングの実際. *Medical Technology* 36: 269-272.
- 25) Macian F. (2005) NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 5: 472-484.
- 26) Klee CB, Ren H, Wang X. (1998) Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem* 273:13367-13370.
- 27) Hemenway CS, Heitman J. (1999) Calcineurin: structure, function, and inhibition. *Cell Biochem Biophys* 30:115-151.
- 28) Yu L, Haddy A, Rusnak F. (1995) Evidence that calcineurin accommodates an active site binuclear center. *J Am Chem Soc* 117: 10147-10734.
- 29) Griffith JP, Kim JL, Kim EE, Sintchak MD, Thomson JA, Fitzgibbon MJ, Fleming MA, Caron PR, Hsiao K, Navia MA. (1995) X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell* 82:507-522. doi: 10.1016/0092-8674(95)90439-5
- 30) Kissinger CR, Parge HE, Knighton DR, Lewis CT, Pelletier LA, Tempczyk A, Kalish VJ, Tucker KD, Showalter RE, Moomaw EW, Gastinel LN, Habuka N, Chen X, Maldonado F, Barker JE, Bacquet R, Villafranca JE. (1995) Crystal structures of human calcineurin

and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature* 378: 641-644. doi: 10.1038/378641a0

- 31) Yu L, Golbeck J, Yao J, Rusnak F. (1997) Spectroscopic and enzymatic characterization of the active site dinuclear metal center of calcineurin: implications for a mechanistic role. *Biochemistry* 36: 10727-10734. doi: 10.1021/bi970519g
- 32) Rusnak F, Mertz P. (2000) Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* 80: 1483-1521.
- 33) 佐藤亮介, 萩原加奈子, 喜多綾子, 杉浦麗子 (2015) カルシニューリンの新たな制御機構と医療・創薬への応用. —RNA 顆粒によるカルシニューリンの空間的制御— *生化学* 87: 517-524.
- 34) Mondragon A, Griffith EC, Sun L, Xiong F, Armstrong C, Liu JO. (1997) Overexpression and purification of human calcineurin  $\alpha$  from *escherichia coli* and assessment of catalytic functions of residues surrounding the binuclear metal center. *Biochemistry* 36:4934-4942.
- 35) Enz A, Shapiro G, Chappuis A, Dattler A. (1994) Nonradioactive assay for protein phosphatase 2B (calcineurin) activity using a partial sequence of the subunit of cAMP-dependent protein kinase as substrate. *Anal Biochem* 216: 147-153. doi: 10.1006/abio.1994.1018
- 36) Donella-Deana A, Krinks MH, Ruzzene M, Klee C, Pinna LA. (1994) Dephosphorylation of phosphopeptides by calcineurin (protein phosphatase 2B). *Eur J Biochem* 219:109-117.
- 37) Martin B, Pallen CJ, Wang JH, Graves DJ. (1985) Use of fluorinated tyrosine phosphates to probe the substrate specificity of the low molecular weight phosphatase activity of calcineurin. *J Biol Chem* 260:14932-14937.
- 38) Harder KW, Owen P, Wong LK, Aebersold R, Clark-Lewis I, Jirik FR. (1994) Characterization and kinetic analysis of the intracellular domain of human protein tyrosine phosphatase beta (HPTP beta) using synthetic phosphopeptides. *Biochem J*

298:395-401. doi: 10.1042/bi2980395

- 39) Yoshino M, Murakami K. (2009) A graphical method for determining inhibition constants. *J Enzyme Inhib Med Chem* 24:1288-1290. doi: 10.1042/bj1370143
- 40) Yoshino M, Murakami K. (2015) Analysis of the substrate inhibition of complete and partial types. *Springer Plus* 4: 292. doi: 10.1186/s40064-015-1082-8
- 41) Li HC, Chan WW. (1984) Activation of brain calcineurin towards proteins containing Thr(P) and Ser(P) by  $Ca^{2+}$ , calmodulin,  $Mg^{2+}$  and transition metal ions. *Eur J Biochem* 144:447-452. doi:10.1111/j.1432-1033.1984.tb08486.x
- 42) Pallen CJ, Wang JH. (1984) Regulation of calcineurin by metal ions. Mechanism of activation by  $Ni^{2+}$  and enhanced response to  $Ca^{2+}$ /calmodulin. *J Biol Chem* 259:6134-6141.
- 43) Pallen CJ, Wang JH (1986) Stoichiometry and dynamic interactions of metal ion activators with calcineurin phosphatase. *J Biol Chem* 261: 16115-16120.
- 44) Takahashi K, Akaishi E, Abe Y, Ishikawa R, Tanaka S, Hosaka K, Kubohara Y (2003) Zinc inhibits calcineurin activity in vitro by competing with nickel. *Biochem Biophys Res Commun* 307: 64-68. doi: 10.1016/S0006-291X(03)01122-7
- 45) 田中佑季, 大塚恵美子, 保坂公平, 田中進 (2009) マンガンはニッケル刺激したカルシニューリン活性を不競合的に阻害する. *Trace Nutrients Res* 26 : 70-73.
- 46) 田中進, 大塚恵美子, 高橋克典, 増田泰紀, 本間千裕, 宮澤紀子, 保坂公平 (2008) ニッケル刺激したカルシニューリン活性に対するバナジウムの効果. *医学と生物学* 152 : 88-93.
- 47) 田中佑季, 大塚恵美子, 保坂公平, 田中進 (2008) ニッケル刺激したカルシニューリン活性におけるバナジウム阻害のキネティック解析. *Trace Nutrients Res* 25 : 122-124.
- 48) 田中進, 田中佑季, 伊藤昇, 保坂公平 (2011) リコンビナントヒトカルシニューリン活性に対する金属イオンの効果. *医学と生物学* 155 (8) : 483-488.

- 49) Nargang CE, Bottorff DA, Adachi K. (1994) Isolation and characterization of a cDNA clone coding for the calcium-binding subunit of calcineurin from bovine brain: an identical amino acid sequence to the human protein. *DNA Seq* 4:313-318.
- 50) Zuo Y, Selvakumar P, Sharma RK. (2010) Molecular cloning and biochemical characterization of bovine retina calcineurin. *Mol Cell Biochem* 333: 73-82. doi: 10.1007/s11010-009-0206-2.
- 51) Kennedy MT, Brockman H, Rusnak F. (1996) Contributions of myristoylation to calcineurin structure/ function. *J Biol Chem* 271: 26517-26521.
- 52) Weiss A, Wiskocil RL, Stobo JD. (1984) The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *J Immunol* 133:123-128.
- 53) Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G. (1977) Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 19:621-626. doi: 10.1002/ijc.2910190505
- 54) Cheng SM, Lin WH, Lin CS, Ho LJ, Tsai TN, Wu CH, Lai JH, Yang SP. (2015) Modulation of both activator protein-1 and nuclear factor-kappa B signal transduction of human T cells by amiodarone. *Exp Biol Med* 240:99-108. doi:10.1177/1535370214544263
- 55) Wang L, Li C, Lin Q, Zhang X, Pan H, Xu L, Shi Z, Ouyang D, He X. (2015) Cucurbitacin E suppresses cytokine expression in human Jurkat T cells through down-regulating the NF- $\kappa$ B signaling. *Acta Biochim Biophys Sin* 47:459-465. doi: 10.1093/abbs/gmv030
- 56) Carretta MD, Alarcón P, Jara E, Solis L, Hancke JL, Concha II, Hidalgo MA, Burgos RA. Eur J. (2009) Andrographolide reduces IL-2 production in T-cells by interfering with NFAT and MAPK activation. *Eur J Pharmacol* 602: 413-421. doi:10.1016/j.ejph

ar.2008.11.011.

- 57) Gholijani N, Gharagozloo M, Kalantar F, Ramezani A, Amirghofran Z. (2015) Modulation of Cytokine Production and Transcription Factors Activities in Human Jurkat T Cells by Thymol and Carvacrol. *Adv Pharm Bull*:653-60. doi: 10.15171/apb.2015.089
- 58) Hu S, Chen CW, Chen ST, Tsui KH, Tang TK, Cheng HT, Hwang GS, Yu JW, Li YC, Wang PS, Wang SW. (2019) Inhibitory effect of berberine on interleukin-2 secretion from PHA-treated lymphocytic Jurkat cells. *Int Immunopharmacol* 66:267-273. doi:10.1016/j.intimp.2018.11.020. Epub 2018 Nov 28.
- 59) Fujita K, Tanaka S, Iizumi K, Akiyama S, Uchida K, Ogata M, Aoki D, Hosomi O, Kubohara Y. (2019) Melibiosamine, a novel oligosaccharide, suppresses mitogen-induced IL-2 production via inactivation of NFAT and NFκB in Jurkat cells. *Biochem Biophys Rep* (19) doi : 10.1016/j.bbrep.2019.100658.
- 60) Tanaka S, Akaishi E, Hosaka K, Okamura S, Kubohara Y. (2005) Zinc ions suppress mitogen-activated interleukin-2 production in Jurkat cells. *Biochem Biophys Res Com* 335: 162-167. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.07.059
- 61) 久保充人 (2005) Th1/Th2 バランスと感染防御. 免疫と疾患 (前篇) —自然・獲得免疫と疾患 60 : 124-134
- 62) Minowada J, Onuma T, Moore GE. (1972) Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *J Natl Cancer Inst* 49: 891-895
- 63) Gazdar AF, Carney DN, Bunn PA, Russell EK, Jaffe ES, Schechter GP, Guccion JG. (1980) Mitogen requirements for the in vitro propagation of cutaneous T-cell lymphomas. *Blood* 55: 409-417
- 64) Tanaka S, Masuda Y, Honma C, Hosaka K, Takahashi K, Kubohara Y. (2012) Manganese promotes phorbol ester-induced interleukin-2 production via AP-1 activation in Jurkat T-

- cells. *Toxicol Lett* 211: 312-318. doi: 10.1016/j.toxlet.2012.04.015
- 65) Kim E, Ahn S, Rhee HI, Lee DC. (2016) Coptis chinensis Franch. extract up-regulate type I helper T-cell cytokine through MAPK activation in MOLT-4 T cell. *J Ethnopharmacol* 189: 126-131 doi: 10.1016/j.jep.2016.05.046.
- 66) Kelleher D, Pandol SJ, Kagnoff MF. (1988) Phorbol myristate acetate induces IL-2 secretion by HUT 78 cells by a mechanism independent of protein kinase C translocation. *Immunology* 65: 351-355.
- 67) Mashimo M, Yurie Y, Kawashima K, Fujii T. (2016) CRAC channels are required for  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations and c-fos gene expression after muscarinic acetylcholine receptor activation in leukemic T cells. *Life Sci* 15; 161: 45-50. doi: 10.1016/j.lfs.2016.07.014
- 68) Chang LW1, Lo WS, Lin P. (2005) Trans, trans-2,4-decadienal, a product found in cooking oil fumes, induces cell proliferation and cytokine production due to reactive oxygen species in human bronchial epithelial cells. *Toxicol Sci* 87: 337-343.
- 69) Flaim SF, Brannan MD, Swigart SC, Gleason MM, Muschek LD. (1985) Neuroleptic drugs attenuate calcium influx and tension development in rabbit thoracic aorta: effects of pimozide, penfluridol, chlorpromazine, and haloperidol. *Proc Natl Acad Sci* 82:1237-1241. doi: 10.1073/pnas.82.4.1237
- 70) Nemeth EF, Scarpa A. (1987) Rapid mobilization of cellular  $Ca^{2+}$  in bovine parathyroid cells evoked by extracellular divalent cations. Evidence for a cell surface calcium receptor. *J Biol Chem* 262: 5188-5196.
- 71) Block BM, Stacey WC, Jones SW. (1998) Surface charge and lanthanum block of calcium current in bullfrog sympathetic neurons. *Biophys J* 74: 2278-2284. doi: 10.1016/S0006-3495(95)77937-8
- 72) Fitzpatrick LA. (1990) Differences in the actions of calcium versus lanthanum to influence parathyroid hormone release. *Endocrinology* 127: 711-715. doi:10.1210/endo-127-2-711

- 73) Liu H, Zhang C, Huang K. (2011) Lanthanum chloride suppresses oxysterol-induced ECV-304 cell apoptosis via inhibition of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration elevation, oxidative stress, and activation of ERK and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *J Biol Inorg Chem* 16 : 671-681.
- 74) Guo F, Lou Y, Feng N, Li G, Xie A, Huang X, Wang Y. (2010) Exposure to lanthanum compound diminishes LPS-induced inflammation-associated gene expression: involvements of PKC and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Biometals* 23: 669-680.
- 75) Chen X, Xiu M, Xing J, Yu S, Min D, Guo F. (2017) Lanthanum chloride inhibits LPS mediated expressions of pro-inflammatory cytokines and adhesion molecules in HUVECs: involvement of NF- $\kappa$ B-Jmjd3 signaling. *Cell Physiol Biochem* 42: 1713–1724. doi: 10.1159/000479439
- 76) Jiang C, Shang J, Li Z, Qin A, Ouyang Z, QU X, Li H, Tian B, Wang W, Wu C, Wang J, Dai M. (2015) Lanthanum chloride attenuates osteoclast formation and function via the downregulation of Rankl-Induced Nf-kb and Nfatc1 Activities. *J Cell Physiol* 231: 142-151. doi: 10.1002/jcp.25065
- 77) Palasz A, Czekaj P. (2000) Toxicological and cytophysiological aspects of lanthanides action. *Acta Biochemica Polonica* 47:1107-1114.

## 謝辞

本論文は筆者が高崎健康福祉大学大学院健康福祉学研究科食品栄養学専攻に在籍中の研究成果をまとめたものです。

同専攻教授 田中 進先生には、指導教授として本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始、ご指導を戴きました。ここに深謝の意を表します。

主査として同専攻教授 岡村 信一先生、並びに、同専攻教授 下川 哲昭先生、松岡 寛樹先生には副査としてご助言を戴くとともに本論文の細部にわたりご指導を戴きました。ここに深謝の意を表します。

本専攻 田中研究室の各位には研究遂行にあたり日頃より有益なご討論ご助言を戴きました。ここに感謝の意を表します。

最後に高崎健康福祉大学・大学院の諸先生方に厚く御礼申し上げ、感謝の意を表します。