

論文の内容の要旨および論文審査の結果の要旨

学位申請者氏名：秋山 珠璃

学位の種類：博士（食品栄養学）

学位記番号：博（健）甲第23号

学位授与年月日：令和2年3月4日

指導教員：高崎健康福祉大学教授

田中 進



審査委員：主査 高崎健康福祉大学 教授

岡村 信一



副査 高崎健康福祉大学 教授

下川 哲昭



副査 高崎健康福祉大学 教授

松岡 寛樹



【論文題目】

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

【論文の内容の要旨】

1. はじめに

希土類元素は、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り、レアアースとも呼ばれている。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・素材として原子力、工業方面で広く利用されている。一方、希土類元素は臨床分野でも広く利用されており、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) を吸着させる特性を持つことから、慢性腎臓病疾患患者に見られる高リン血症の改善薬として、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。医薬品としての応用の幅をさらに広げるために、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うことは、人の健康維持・疾病予防等に貢献可能である。そこで、本研究では免疫に着目し、ランタンイオン (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、免疫抑制剤探索の基盤となるよう検討を試みた。

2. 方法

1) カルシニューリン (CN) 活性の測定

酵素として、ウシ脳由来の CN (bCN) とリコンビナントヒト CN (rhCN) を用いた。bCN 活性の測定には基質として *p*-ニトロフェニルリン酸 (*p*NPP)、rhCN 活性の測定には RII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) を使用した。

2) カルシニューリン (CN) 活性阻害のキネティクス解析

La³⁺の濃度を固定し、基質濃度を変えて酵素反応速度の測定を行った。基質と酵素反応速度のそれぞれの逆数をプロットして、La³⁺のCNに対する阻害様式を検討した。

3) Jurkat 細胞が産生するインターロイキン-2 (IL-2) の測定

ヒト T 細胞様株 Jurkat 細胞がコンカナバリン A (ConA) 誘導性に産生する IL-2 を ELISA 法で測定した。

4) リアルタイム RT-PCR による IL-2 mRNA の測定

Jurkat 細胞からの全 RNA の抽出は MACHEREY NAGEL 社の NucleoSpin RNA を使用し、TAKARA 社の cDNA 合成試薬 (Prime Script™ Master Mix)、リアルタイム PCR 用試薬 (SYBR Premix Ex Taq™ II)、PCR 用プライマーを用いてグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ mRNA、IL-2 mRNA について測定を行った。

5) 転写調節因子 NFATc1、NFκB、AP-1 の DNA 結合活性の解析

ACTIVE MOTIF 社の Nuclear Extract kit を使用して Jurkat 細胞の核タンパク質の抽出を行った。Lowry 法により核タンパク質の定量を行うとともに ELISA 法により転写調節因子 NFATc1、NFκB、AP-1 の DNA 結合活性の解析を行った。

6) 統計解析

得られた結果は、Dunnett 検定 (Excel 2016 : Microsoft Corporation) で解析を行い、酵素の 50%阻害濃度 (IC₅₀) は、GraphPad Prism 8 (GraphPad Software) を用いて非線形回帰分析で求めた。

3. 結果及び考察

最初に LaCl₃を使用して bCN と rhCN のホスファターゼ活性に対する酵素レベルでの作用を検討したところ、それぞれに対して阻害作用を示した。その際の、La³⁺の bCN に対する IC₅₀は6.7 μM、rhCN に対する IC₅₀は9.5 μM であった。また、希土類元素の多くが rhCN 活性を阻害すること、酵素キネティクス解析より La³⁺は bCN と rhCN を混合阻害することを見出した。次に、Jurkat 細胞が ConA 誘導性に産生する IL-2タンパク質を指標に細胞レベルで検討を行ったところ、La³⁺をはじめ希土類元素の多くが作用濃度に差があるものの Jurkat 細胞の IL-2産生を抑制することを明らかにした。また、La³⁺は Jurkat 細胞の IL-2 mRNA の発現レベルに影響を与えることを示した。これらの酵素レベル、細胞レベルの検討結果から、La³⁺をはじめとした希土類元素は、細胞性免疫を低下させる作用を持つと考えられた。T 細胞における IL-2 mRNA の発現は、CN 系を介した NFATc1、IκB kinase (IKK) 系を介した NFκB および MAPK 系を介した AP-1の3つの転写調節因子によって制御されている。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。そこで、La³⁺の作用機序を明らかとするために、核内転写調節因子

NFATc1、NFκB、AP-1のそれぞれの DNA 結合活性を解析したところ、La³⁺は NFATc1だけではなく、NFκB と AP-1の DNA 結合活性も有意に低下させることが判明した。

本研究により、La³⁺をはじめとする希土類元素は、細胞性免疫を制御・調節する機能を持つことが酵素レベル、細胞レベルで示すことができた。今後は、その詳細な作用点を明らかにするために、3つの転写調節因子上流域を中心に解析を行い、検討を進めていく必要がある。

【論文審査の結果の要旨】

希土類元素は臨床分野でも応用が進みつつあるが、本論文は免疫抑制剤の開発につながる基礎的検討を念頭に置き、ランタンイオンが細胞性免疫に及ぼす効果を解析している。本論文は、「緒言」、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 (La³⁺) の影響」、第二章「Jurkat 細胞の IL-2 産生に対するランタンイオン (La³⁺) の影響」、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 (La³⁺) の影響」、「まとめ」からなる。

第一章では、免疫抑制剤の標的酵素として知られるカルシニューリン (CN) に対する効果を、牛脳由来 CN およびリコンビナントヒト CN を用いて検討し、ランタンイオンをはじめとした希土類元素がこれらの酵素活性を阻害し、その様式は混合阻害であることを明らかにした。

第二章では、ヒト T 細胞株 Jurkat 細胞がコンカナバリン A 誘導性にインターロイキン 2 (IL-2) を産生するが、ランタンイオンをはじめとした希土類元素が阻害することをタンパク質レベルおよび mRNA レベルで示すとともに、その阻害濃度では細胞毒性がないことも確認した。

第三章では、IL-2 産生を制御する核内転写調節因子について検討したところ、NFATc1 だけではなく、NFκB および AP-1 の DNA 結合活性がランタンイオンにより抑制されることを示した。NFκB および AP-1 の上流域に対するランタンイオンの作用機序の解明が今後の検討課題として見出された。

論文審査は、主査と副査 2 名による審査 (2020 年 1 月 23 日午前 9 時 30 分から 2 時間) と公開發表の場における最終試験 (2020 年 2 月 13 日) により行われた。本研究を臨床応用へと繋げるためには、希土類元素とカルシウムイオンとの関係などさらに解明すべき点が多く残されているが、本研究はその端緒となる基礎的検討として十分な価値を有するものと判断した。

なお、第一章の要旨 (秋山珠璃、田中佑季、田中進. 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. Trace Nutrients Research 35:78 - 82, 2018)、第二章・第三章の要旨 (秋山

珠璃、井上咲季、中島徹、田中進. 希土類元素のカルシニューリン活性に対する影響. Trace Nutrients Research 34:52 - 58, 2017) は査読のある学会誌に原著としてすでに掲載されている。

以上により、論文審査および最終試験の結果に基づき、審査委員会において慎重に審査した結果、本論文が博士（食品栄養学）の学位に十分値するものであると判断した。