

# 免疫調節作用

(聖マリアンナ医科大学・難病治療研究センター教授)

坂根 剛

## ・カカオマスポリフェノール (CMP) の効用

近年、カカオ豆にはさまざまな効用、効果のあることが明らかになりつつある。なかでもカカオマスポリフェノール (CMP) には活性酸素を消去する作用があり、たとえば、胃粘膜の過酸化脂質含有量を減少させることによって、アルコール性胃潰瘍の発生を抑制することが示されている。活性酸素は炎症細胞だけでなく、免疫担当細胞にも作用して、 $IL-1$  (IL-1 $\beta$ ) の産生を促進して、 $IL-1$  の核内移行を誘導し、免疫担当細胞の活性化の調節に結合して、これら遺伝子の活性化の調節に参与している (図1)。

口腔内のアフタ性潰瘍、結節性紅斑や毛嚢炎などの皮膚、眼のぶどう膜炎、外陰部潰瘍をはじめとし、ほとんどの全身の諸臓器に急性炎症を繰り返すベーチェット病の基本病態は好中球の機能過剰にあり、好中球による活性酸素の産生が著しく亢進していることが知られている。ベーチェット

病患者の好中球より核蛋白を抽出してゲルシフト法で  $NF-\kappa B$  の発現を調べてみると、ベーチェット病患者では採血直後の非刺激状態の好中球でも、 $NF-\kappa B$  の発現の増強が認められる。しかし、抗酸化作用をもつカカオマスポリフェノール存在下で、好中球を  $TNF-\alpha$  で刺激すると、CMP を添加する濃度に依存して  $NF-\kappa B$  の発現が抑制される。このように CMP の活性酸素消去作用によって  $NF-\kappa B$  の活性化とそれに続く核内移行が抑制されることから、先に述べたようにおそらくは CMP が非特異的な急性炎症のみならず、免疫系細胞にも作用して免疫機能を調節し、免疫担当細胞が病態形成に参与する自己免疫疾患やアレルギー性疾患に対しても、一定の効果を発揮するのではないかと考えられる。

## ・免疫系への作用機序

CMP の免疫系に対する作用とその作用機序について触れる前に、免疫系による生体防御機構について簡単に説明しておきたい。

細菌などの異物がわれわれの体の中に侵入すると、好中球やマクロファージが最初の防御にあたり、これら食細胞に病原体が取り込まれて殺菌される。たいていの病原体は感染が成立する前にこの最初の防御線で排除されるが、最初の防御線が突破されると、感染症が起こって、リンパ球系を中心とした免疫系が作動する。免疫反応はそれぞれの感染源に特異的に反応し、その感染源を排除して感染症を治癒させる。免疫系が作動すると、特異的に感染症を排除するだけでなく、のちのちまで感染源のことを記憶しており、その後同じ病原体の再感染が起こっても、今度は感染症は成立しない。このように免疫系は自己と非自己を識別して、非自己を排除し、その個体の恒常性を維持する仕組みといえる。

ここではカカオマスポリフェノールが免疫系の主役である Tリンパ球、Bリンパ球の機能に対して、どのような影響を与えるかを考えてみたい。

末梢血単核球を T細胞マイトゲンである FITC-ヘマグルチニン (PHA) で刺激して、その増殖反応に対する CMP の効果を調べてみた (図2)。方法は健康者末梢血よりフィコールハイパーク比重遠心法で単核球を採集し、これを種々の濃度の CMP 存在下あるいは非存在下で三日間 PHA 刺激を行い、トリチウムサイミジンの取り込みで増殖反応を評価した。図2に示すように PHA 刺激により明らかな T細胞の増殖が認められる

## Activation of NF- $\kappa$ B by TNF- $\alpha$ and PMA

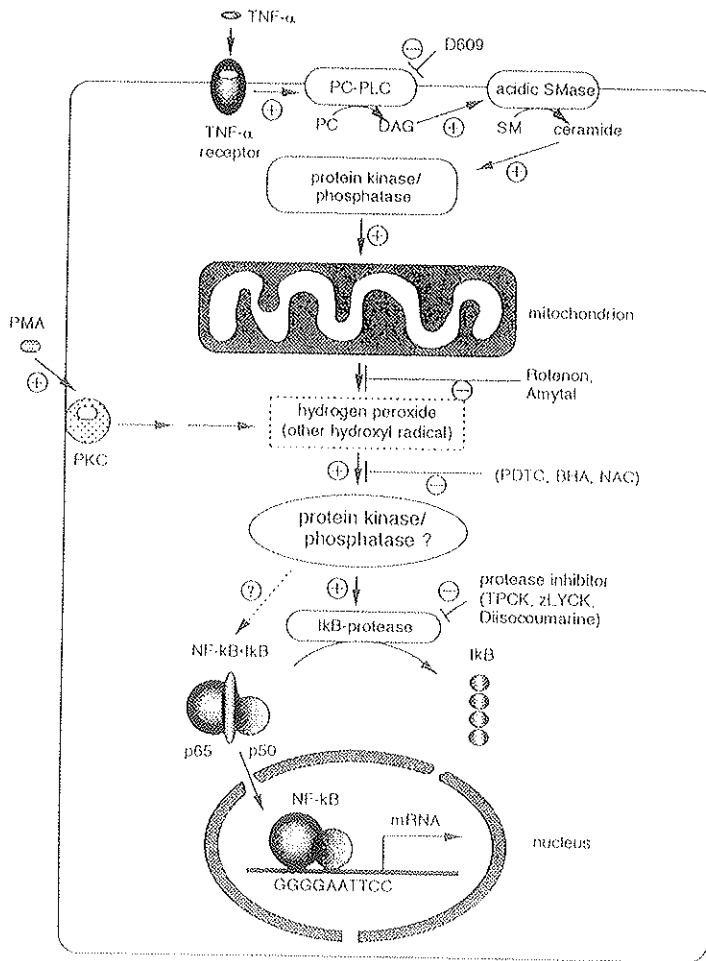


図1 NF- $\kappa$ Bの活性化経路

が、この培養系にCMPを加えると、PHAによる増殖反応は濃度依存性に抑制され、とくに五〇マイクログラム、一〇〇マイクログラム/ミリの濃度ではPHAによる増殖が著しく抑制される。この顕著な抑制がCMPの細胞毒性によるものではなく、CMPによる免疫抑制作用であることは、培養終了時における生細胞数をトリパンブルー排液試験で調べてみると、生細胞が九五%以上を占めたことからわかる。

CMPによるPHAに対する増殖反応の抑制は、普遍的に認められる現象で、他の健常者についても同じことがあてはまり、検索し得たすべての健常者のPHA刺激末梢単核細胞培養系にCMPを加えると、CMPによる顕著な増殖の抑制がみられた。

T細胞が病原体を認識するときのレセプターであるT細胞レセプターにはCD3分子が関連しているが、このCD3分子に対するモノクローナル抗体でT細胞を刺激したときのT細胞増殖に対するCMPの効果についても検討した。CMPは抗CD3抗体で誘導されるT細胞の増殖反応に対しても、とくに一〇〇マイクログラム/ミリの濃度で強い抑制

## Effects of CMP on lymphocyte proliferation induced by PHA

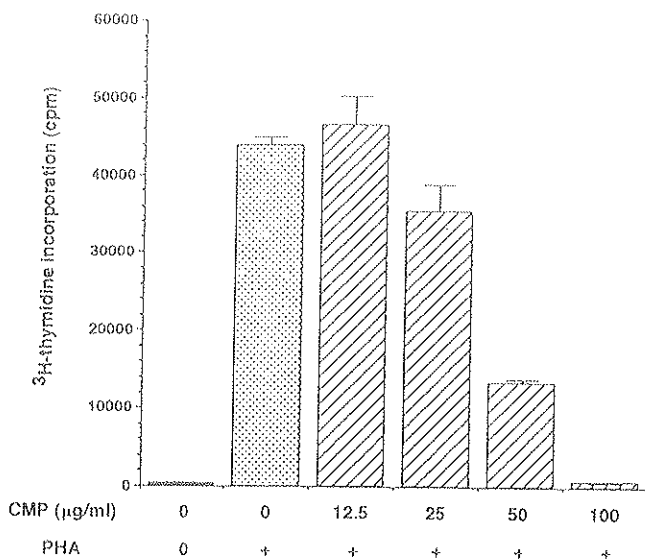


図2 PHAによるヒトTリンパ球の増殖に対するCMPの抑制効果

効果を示した。

T細胞はいったん活性化されると、それに続くT細胞の増殖は増殖因子、とくにT細胞増殖因子であるインターロイキン2 (IL-2) に依存している。このことは、PHAや抗CD3抗体刺激で認められたCMPによるT細胞増殖の抑制に、T細胞が産生するIL-2の減少が関与している可能性を示している。実際種々の濃度のCMP存在下で単核細胞をPHAで二日間刺激し、その培

表 PHA 刺激ヒト T リンパ球による IL-2 産生に対する CMP の抑制効果

Effects of CMP on IL-2 Production by PHA-stimulated Peripheral Blood Lymphocytes

CMP (μg/ml)	IL-2 (ng/ml)	Inhibition (%)
0	67.4	0
1	52.0	22.9
10	56.4	16.4
100	<11.7	82.6<

養上清を回収して、ELISA法でIL-2蛋白量を測定してみると、表に示すように、PHAはT細胞のIL-2蛋白の産生を強く誘導するが、この培養系にCMPを添加すると、とくに100 μg/mlの濃度でIL-2産生は著しく抑制される。この成績はCMPによるT細胞増殖の抑制は、少なくとも一部はT細胞増殖因子の産生抑制を介して起こっていることを示している。

PHAがT細胞に特異的なマイトゲンであるのに対してPokeweed mitogen (PWM)はT細胞増殖とT細胞依存性のB細胞増殖を引き起こし、またT細胞依存性のB細胞による抗体産生を誘導する。末梢血単核球をPWMで刺激して、そ

の増殖に対するCMPの効果を観察すると、CMP添加群はCMP非添加のコントロールに比べて、一二・五 μg/mlの濃度ですでに強い増殖の抑制が起こる。

PWM刺激に対するB細胞による抗体産生についてもCMPは強い抑制作用を示した(図3)。方法は、末梢血単核細胞にPWMを加え、種々の濃度のCMP存在下で一四日間培養し、回収した培養上清中の免疫グロブリン(IgG)の濃度をELISA法により測定した。図3に示すように、PWMはB細胞によるIgG産生を強く誘導する。CMPはPWMによるB細胞のIgG産生を著しく抑制し、その抑制は増殖のときと同様にCMP一二・五 μg/mlの濃度ですでに強い抑制が認められた。

PWMによるT細胞依存性の抗体産生がCMPによって強く抑制された理由として、一つはCMPがT細胞を抑制してその抑制を介して抗体産生が抑制された可能性、一つはヒトBリンパ球の増殖・分化に関与するサイトカインはIL-2が主体で、他のサイトカインはむしろIL-2存在下で補助的に作用することから、T細胞によるIL-2産生の減少が原因となって抗体産生が抑制された可能性、そして他の一つは、CMPがBリン

Effects of CMP on IgG Production from Peripheral Blood Lymphocytes stimulated with PWM

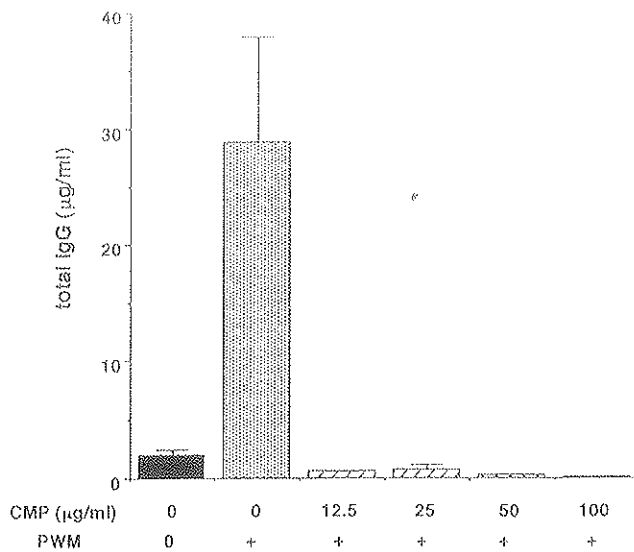


図3 PWM 刺激ヒト末梢血リンパ球による IgG 産生に対する CMP の抑制効果

パ球自体を抑制し、結果として抗体産生を抑制した可能性が考えられる。

これまでに示した成績では、一つ目のT細胞自体の機能を抑制した可能性と二つ目のIL-2産生を抑制した可能性は十分にあるが、第三のBリンパ球自体の機能をCMPが抑制できるかどうかは、いままで述べた成績からは判断することができない。そこで今度は末梢血単核細胞からB細胞のみを精製したあと二日間培養し、十分に分化して抗体産生細胞にまで分化したB細胞による自発的な抗体産生に対するCMPの効果を検討した。

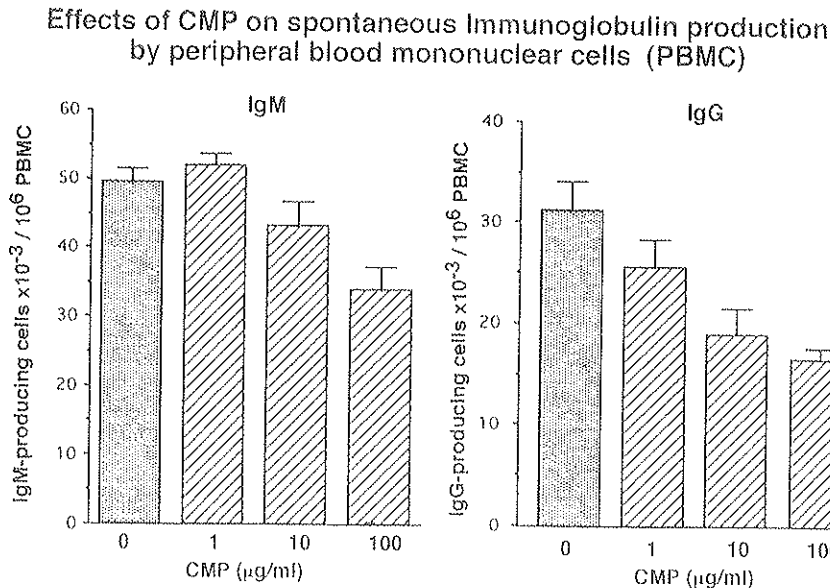


図4 ヒト末梢血リンパ球による自発的な免疫グロブリン産生に対するCMPの抑制効果

これまでの成績とは異なり、ここではCMPによる抑制効果はまったく認められなかった。この成績はCMPは、少なくとも十分に分化したB細胞自体の機能に対しては抑制できないことを示している。同じB細胞による自発的な抗体産生でもT細胞もB細胞も単球も混在する末梢血単核球を非刺激で一四日間CMP存在下で培養し、その培養

上清中に産生されるIgG濃度を測定してみる。B細胞は非刺激状態でも自発的にIgGを産生するが、この産生はCMPの添加では消失してしまう(図4)。おそらく同じ自発的な抗体産生といっても、ここで用いた抗体産生系は単核細胞を使用しているため、一四日間という長期間の培養中にB細胞あるいは単球によって自己T細胞が活性化され、いわゆる自己リンパ球混合培養反応が起こって、T・B細胞間相互作用によるB細胞の活性化が起こり、結果としてIgGが産生されたと考えるのが妥当である。したがって、この系でみられたCMPによる抗体産生抑制効果はB細胞への直接作用というよりも、むしろT細胞を介した作用であると考えられる。

このことは、B細胞を単離することなく末梢血単核細胞を二日間CMP存在下で培養した自発的なB細胞による抗体産生についても当てはまる。この場合には、おそらく末梢血中の活性化された一部のB細胞と一部の活性化T細胞との間で相互作用が起こり、増殖を伴いながら抗体産生細胞に向かうB細胞に対してCMPが抑制効果を示したと考えられる。

それでは本当にCMPはB細胞自体の機能に対してまったく修飾作用がないのかというと、必ずしもそうではなく、B細胞自身に対

しても抑制作用がある。すなわち、IgGを自発的に産生するB細胞腫瘍株、IM-9を用いて、この細胞株による抗体産生に対するCMPの抑制効果を調べてみると、自発的にIgGを産生するIM-9は、CMPによって中等度ではあるが、有意にIgG産生を抑制する作用のあることがわかった。このことはCMPがIM-9細胞に直接作用して、抗体産生を抑制していることを示している。

実際、B細胞を精製し、これをB細胞マイトゲンである黄色ブドウ球菌 Cowrie I株(SAC)およびT細胞依存性B細胞マイトゲンであるPWMで四八時間刺激した後、核蛋白を抽出し、ゲルシフト法でNF-κBの発現を調べてみると、いずれの刺激に対しても明らかにCMPによってNF-κBの発現が減弱する。これまでのB細胞の成績をまとめてみると、十分に抗体産生細胞にまで分化したBリンパ球に対しては、もはやCMPは抑制作用を示さないが、静止期にあつてこれからまさに活性化され、増殖、分化の経路を走り出そうとするBリンパ球や、細胞周期を回転しているBリンパ球に対してはCMPは抑制作用を示すということになる。

カカオマス抗酸化物質はT細胞に関しては、その増殖とIL-2産生を著しく抑制することができ、B細胞に対しても抗体産生を抑制したが、それはT細胞との相互作用に依存する抗体産生や細

胞周期にあるB細胞による抗体産生に限られ、すでに抗体産生細胞にまで分化したB細胞に対しては抑制作用はまったく認められなかった。さらに活性化素によって活性化される転写因子の一つ、NF- $\kappa$ Bの発現を解析してみると、B細胞マイトゲンであるSAC、およびT細胞依存性B細胞マイトゲンであるPWMにより誘導される転写因子活性をCMPは有意に抑制することができた。

今後の課題としては、ここで観察した抑制効果のすべてがCMPの抗酸化作用とそれに続くNF- $\kappa$ Bの発現の減弱で説明できるのか、あるいは他のメカニズムも関与しているのかどうかということを明らかにする必要がある。また、他の抗酸化作用をもつ薬剤もCMPと同じようなメカニズムで免疫抑制作用を発揮するのかどうかを突きとめることも必要な作業である。これらが明らかになれば、カカオマスポリフェノールによる免疫調節機構の理解につながり、免疫異常を伴う疾患に対するCMPの有用性につながるものと期待される。