

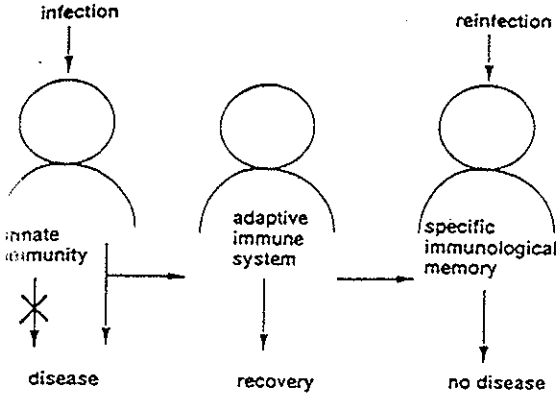
慢性炎症、アレルギー炎症に対する カカオマス抗酸化物質(CMP)の抑制作用

坂根 剛

(聖マリアンナ医科大学
難病治療研究センター教授)

はじめに

カカオ豆の抗酸化作用が種々の疾患に予防作用のあることが明らかになってきた。活性酸素は、炎症の場では体内に侵入した異物を排除するために食細胞によって産生され、リンパ球などの免疫



系細胞が刺激を受けると活性酸素が誘導され細胞内刺激伝達系に関わって細胞の活性化に一連の役割を果たしている。しかし、活性酸素の産生が過剰になるとむしろ組織障害を引き起こ

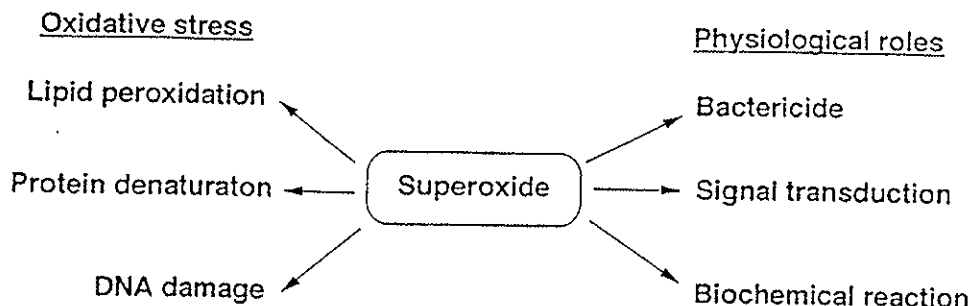
を発症させる要因にもなる。言い換えると、活性酸素はわれわれの体にとって両刃の剣という特徴をもっているわけである。

感染性微生物が、生体内に侵入すると、最初に出会うのは自然免疫系の障壁で、この段階では活性化された好中球やマクロファージが活性酸素などを放出し、感染性微生物に対処しようとする。しかし、自然免疫系で十分に対処できない場合にはリンパ球が主役を担う獲得免疫系が発動し、感染症は治癒する。ここでは自然免疫系の主役である好中球と、獲得免疫系の主役であるリンパ球に対するCMPの効果を概観し、併せてこれら免疫系の異常によって引き起こされるアレルギー炎症や慢性関節リウマチなどの慢性炎症に対するCMPの効能について述べたいと思う。

CMPが活性酸素を抑制

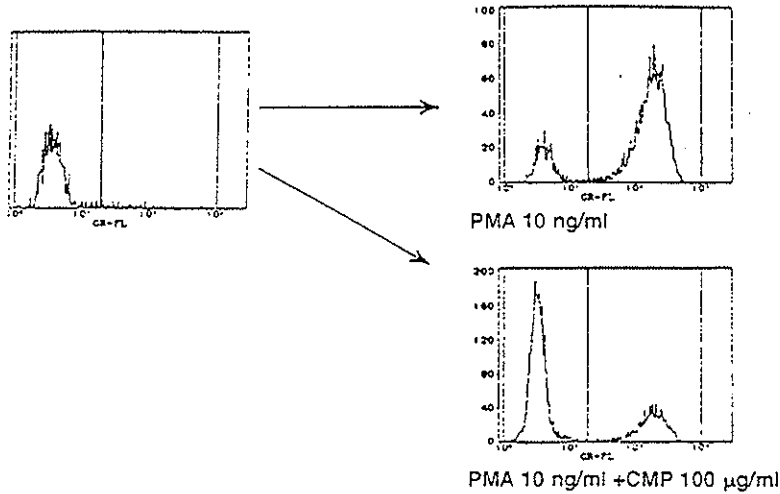
健康な人の末梢血にDCFHを加えて好中球に

Actions of superoxide



と、好中球は過酸化水素を産生し、過酸化水素と接触したDCFHはDCFに転換して蛍光を発する。この方法を使って、過酸化水素を実際に産生している好中球をフローサイトメトリーで測定

Effect of CMP on superoxide production of activated neutrophils



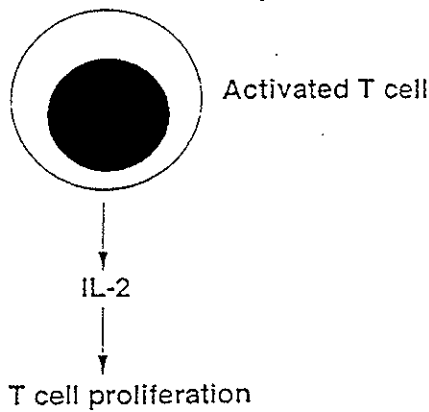
好中球をPMAで刺激するとこのように大部分の好中球は、過酸化水素を産生していることがわかる。このPMA刺激好中球の培養系にCMP 100 µg/mlを添加すると好中球による過酸化水素の産生は著しく減少する。
 NBT還元法を用いてスーパーオキシドアニオンの産生についても調べてみた。正常人末梢血好中球をNBT存在下でPMA刺激を行うと、スー

パーオキシドアニオンが産生され、NBTは濃い紫色の顆粒に染まる。非刺激好中球はスーパーオキシドアニオンを産生していないため、紫色の顆粒は認められない。PMA刺激によりスーパーオキシドを産生している好中球はNBT陽性で、紫色の顆粒があらわれる。CMPをPMA刺激好中球に加えるとスーパーオキシドアニオンの産生が抑制され、紫色の顆粒は出現せず、NBT陰性になる。これらの成績はCMPが好中球の活性酸素の産生を強く抑制できることを示している。

免疫能への作用

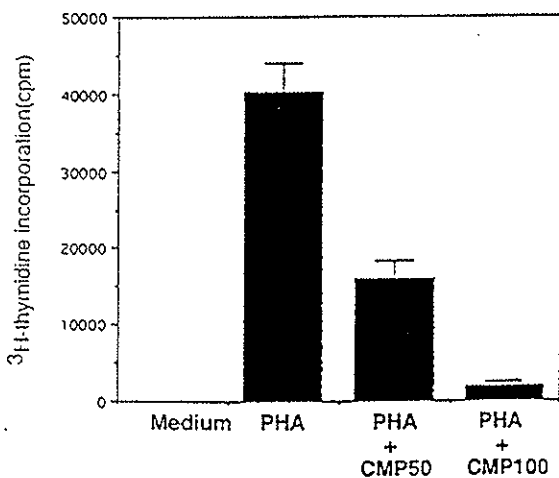
次に正常リンパ球に対するCMPの効果を検討してみた。正常者末梢血をフィコールハイバーク比重遠心法でリンパ球を分離し、T細胞を抗原類似の様式で刺激する抗CD3抗体で刺激して、T

Biological actions of IL-2



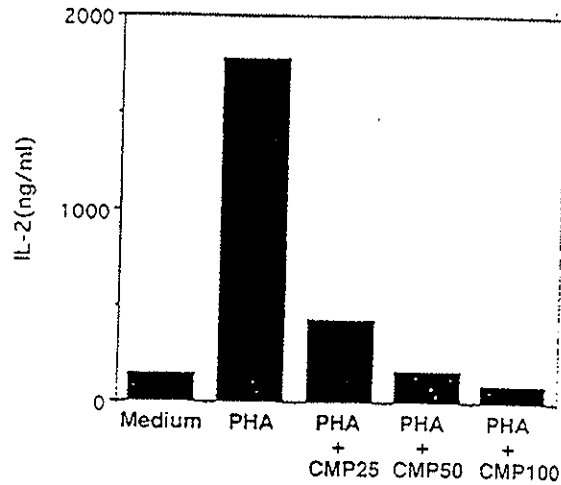
T cell proliferation

Effect of CMP on proliferative responses of human T lymphocytes



リンパ球の増殖に対するCMPの効果を検討してみた。CMPは抗CD3抗体によるTリンパ球の増殖を濃度依存性に抑制し、CMPがT細胞の増殖を抑制する方向に作用している。
 CMP非添加培養系でもCMP 100 µg/mlを加えた培養系でも、生細胞数に差異はなく、CMPによるTリンパ球の増殖抑制効果は非特異的な細胞毒性によるものではないことも併せて明らかにしている。
 インゲン豆のエキスにより抽出したT細胞マイトゲンであるPHAで刺激しても、CMPはPHAによるT細胞の増殖を強く抑制する。
 T細胞が活性化されるとT細胞自身でT細胞増

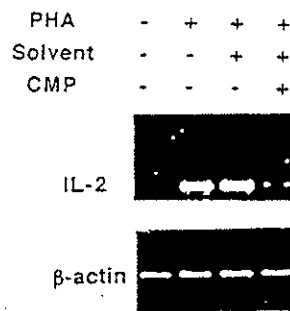
Effect of CMP on IL-2 production of human lymphocytes



殖因子であるIL-2を産生する。したがってCMPによるT細胞の増殖抑制はIL-2の産生の抑制を介して起こっている可能性は十分にある。実際、種々の濃度のCMP存在下でリンパ球を二四時間PHA刺激を行い、培養上清中のIL-2蛋白を測定してみると、CMPは濃度依存性にT細胞によるIL-2産生を強く抑制していることがわかる。

このCMPによるIL-2産生の抑制は遺伝子の転写レベルで起こっているようである。すなわちリンパ球をPHAで刺激して一六時間後に細胞を回収しIL-2 mRNAの発現を調べてみると、PHA刺激ではIL-2 mRNAの強い誘導が起こる。しかし、この培養系にCMPを加えるとI

Effect of CMP on IL-2 mRNA expression of human lymphocytes



IL-2 mRNAの発現は強く抑制される。

CMPがTリンパ球の活性化を遺伝子レベルで制御し、その機能を抑制する作用のあることはわかった。次にTリンパ球とともに免疫系の主役を担い抗体産生にあずかるBリンパ球に対してCMPはどのように働いているのかを考えてみたいと思う。

PWM (Pokeweed mitogen) はT細胞依存性にB細胞の抗体産生を誘導するアメリカヤマゴボウから抽出したマイトゲンである。このPWMをCMP存在下で末梢血リンパ球に加え、B細胞による抗体産生に対するCMPの効果を検討した。PWMはB細胞によるIgG産生を強く誘導するが、CMPはこのIgG産生を濃度依存性に抑制する。ここで注意すべきは、CMPはたしかにPWMによる抗体産生を抑制した、しかし、これは

CMPが抗体を産生するBリンパ球に直接に作用して低下したとも考えられるし、B細胞の抗体産生を補助するヘルパーT細胞の働きをCMPが抑制したために抗体産生が低下したとも考えられることである。

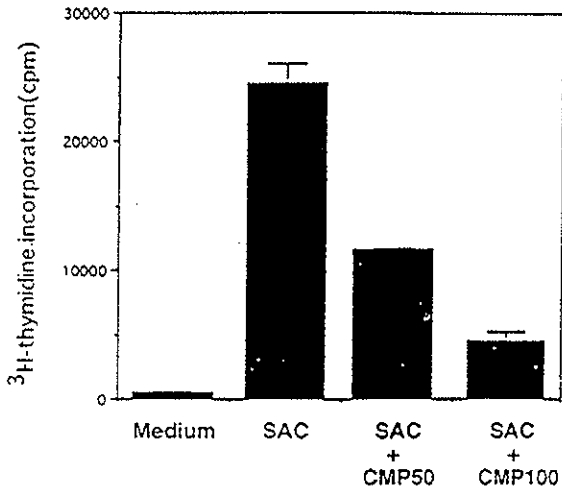
この点を明らかにする目的でB細胞を精製し、B細胞に対する特異的マイトゲンである黄色ブドウ球菌 (Cowan I株 (SAC)) でB細胞を刺激し、B細胞の増殖反応に対するCMPの効果を検討してみた。すると、SACはB細胞に対して強い増殖を誘導するが、CMPはB細胞に直接に作用してその増殖を著しく抑制することができる。このようにCMPはTリンパ球、Bリンパ球いずれに対しても直接に抑制効果を示すことが明らかになった。

リウマチやアレルギーへの効果

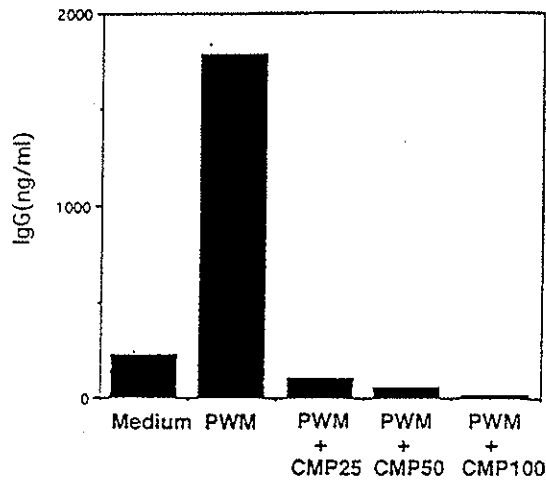
CMPは免疫系の異常が病態を形成する慢性関節リウマチやアレルギー炎症症に対してもこれら疾患に関与する種々の細胞の過剰な活性化を抑制し、病気を鎮静化させる方向に働くこともつぎとめた。

慢性関節リウマチは原因不明の多関節炎を主徴とする全身性慢性炎症性疾患である。RAでは関節局所におけるT細胞の免疫応答にはじまり、滑膜細胞の活性化と増殖、滑膜細胞や炎症細胞、免疫細胞を軸にした滑膜の肉芽組織であるパンヌス

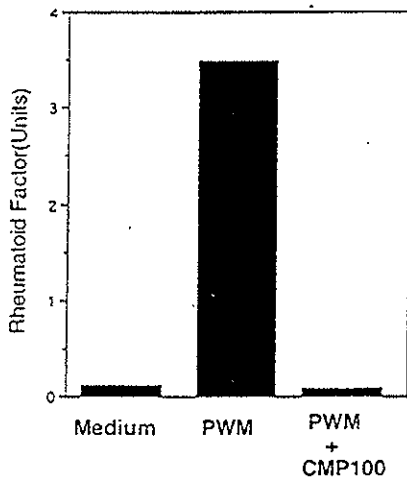
Effect of CMP on proliferative responses of human B lymphocytes



Effect of CMP on IgG production of human lymphocytes



Effect of CMP on rheumatoid factor production in patients with rheumatoid arthritis



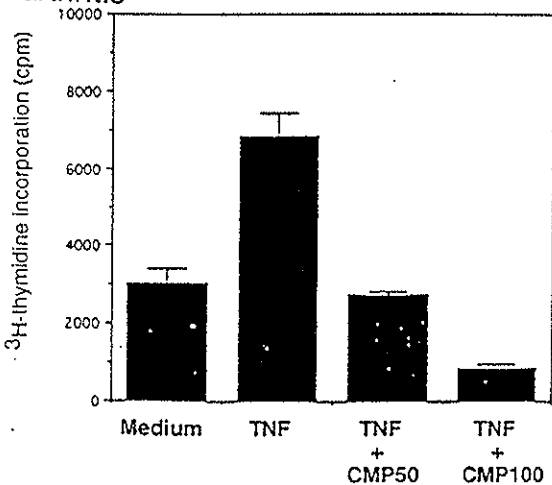
が形成され、関節軟骨、骨の破壊が生じる。リウマチに特徴的な自己抗体であるリウマチ因子は免疫複合体を形成して炎症細胞を活性化し、RAの病態形成に重要に参与している。

そこでRA患者リンパ球をCMP存在下、あるいは非存在下で一〇日間PWM刺激を行い培養上清中のリウマチ因子を測定してみた。PWM添加によりリウマチ患者Bリンパ球はこのようにリウマチ因子を大量に産生するが、CMPはこのリウマチ因子の産生を強く抑制した。

リウマチでは滑膜細胞、とくに線維芽細胞様のB型滑膜細胞の過剰な増殖がパンプス形成や関節破壊につながると考えられている。そこで今度は滑膜細胞の増殖に対するCMPの効果を検討してみた。

方法はリウマチ患者関節置換術の手術時に採取

Effect of CMP on proliferative responses of synovial cells in patients with rheumatoid arthritis

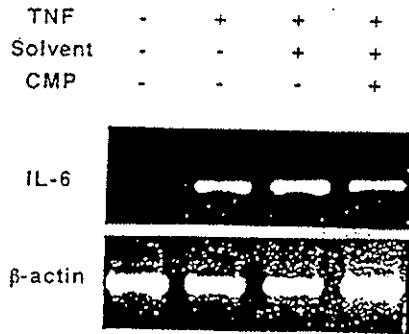


した関節滑膜組織より線維芽細胞様のB型滑膜細胞株を樹立した。この細胞株はTNF刺激で強い増殖を示すが、CMPを添加すると滑膜細胞のTNFによる増殖は著しく抑制される。

増殖した滑膜細胞やパンプスからは炎症性サイトカインが産生され病態の維持、増悪、関節破壊に深く関わっている。たとえば滑膜細胞によるIL-6の産生に対するCMPの抑制効果を調べてみると、TNF刺激を行った滑膜細胞株ではIL-6 mRNAの発現を誘導できるがCMPはこのIL-6 mRNAの発現量を減少させ、実際IL-6蛋白の産生も強く抑制される。

慢性関節リウマチの骨軟骨破壊には局所で産生される蛋白分解酵素であるMMP (matrix meta-

Effect of CMP on IL-6 mRNA expression of synovial cells in patients with rheumatoid arthritis



トプロテナーゼ)が重要なカギを握っている。MMPのひとつであるMMP-1のmRNA発現を調べてみても、滑膜細胞株をTNFで刺激するとMMP-1 mRNAの発現が増強するが、CMP存在下ではMMP-1 mRNAの発現はベースラインのレベルにまで減少する。

このように、CMPは病態形成の維持、増悪のプロセスに関与するあらゆる要因を是正し、RAの病態を改善する方向に作用することがわかった。

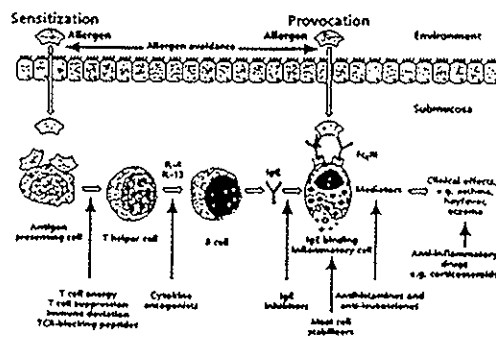
近年、アレルギー疾患の急増を認め、アトピー性皮膚炎が全人口の三〇%、アレルギー性鼻炎が一〇%、気管支喘息が五%ともいわれている。そ

ここで、CMPが、リウマチのみならずアレルギー炎症に対しても是正する方向に働くかどうかについても検討してみたいと思う。

まず、アレルギー発症のメカニズムについて簡単に述べると、最初にアレルギーに接したときに、アレルギーに対するIgE抗体がつくられる。これが感作の成立で、IgE抗体は、アレルギーの素因を有する患者に、T細胞、B細胞の共同作用のもとにつくられるわけである。肥満細胞上にアレルギー特異的IgE抗体が結合し、再びアレルギーが生体内にはいりこむと、肥満細胞に結合したIgEが架橋され、脱顆粒が起こってヒスタミン等が遊離され、気道収縮、発赤、浮腫などの症状が出現する。さらに、T細胞、好酸球などの炎症細胞が浸潤し、遅発反応を引き起こす。とくに好酸球性アレルギー炎症は、慢性アレルギー疾患の本体であると考えられている。

アレルギー反応を制御する方法として、感作を制御する、つまりIgE産生を抑制する方法、エフェクター相に下がって、肥満細胞の脱顆粒、つまり、ヒスタミンなどの化学伝達物質の遊離の抑制、好酸球の脱顆粒の抑制などが挙げられる。感作を制御する方法、すなわちIgE抗体の産生を抑制する方法は、根本治療としてきわめて魅力的である。

そこでアレルギー患者リンパ球のIgE産生に対するCMPの効果を検討してみた。アトピー生

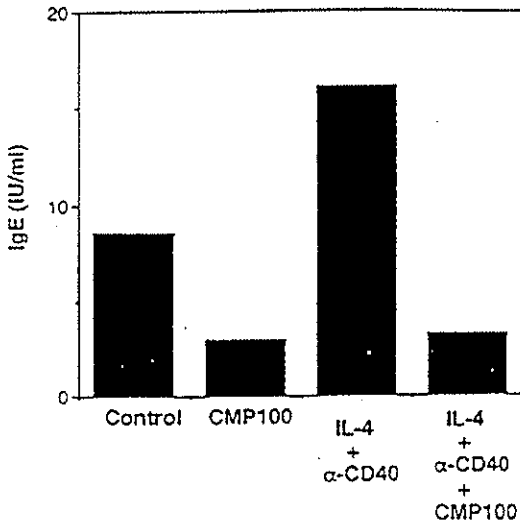


皮膚炎または気管支喘息患者の末梢血リンパ球をCMP存在下で七日間培養し、培養上清中のIgEを測定してみると、自発的なIgE産生に対しても、リンパ球をIL-4プラス抗CD40抗体で刺激して誘導されるIgE産生に対しても、CMPは強い抑制効果を示す。

アレルギー症状がすでに進行している場合には、肥満細胞や好酸球の脱顆粒を抑制して、アレルギー炎症カスケードを断ち切ることも効率の良い方法である。

そこで、好塩基球をin vitroで抗IgE抗体で処理して脱顆粒を引き起こし、この脱顆粒反応に

Effect of CMP on IgE production of lymphocytes in patients with atopic dermatitis

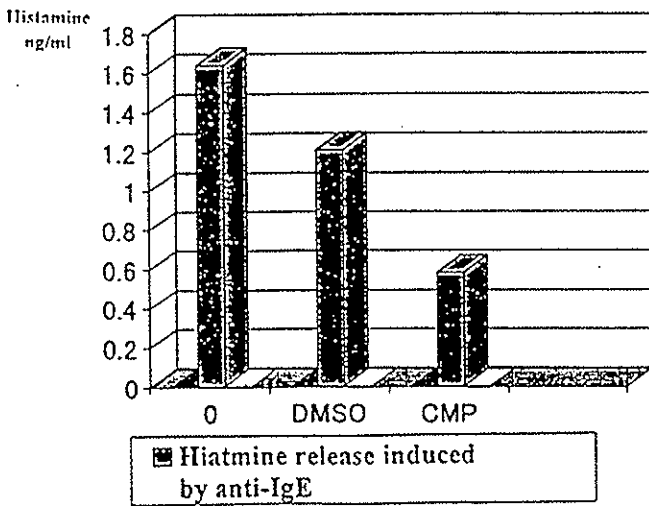


ムに示す溶媒のDMSOのみの場合と比較して、CMP添加群では有意にヒスタミンの遊離を抑制する。

好酸球の脱顆粒は、特殊顆粒であるEPPX量を指標にして検討した。この場合もCMPは有意にEPPXの放出を抑制する。これらの成績は、アレルギーの重要なエフェクター細胞である、好塩基球および好酸球の脱顆粒に対してもCMPは有効に抑制できることを示している。

このようにCMPは好中球、好酸球、好塩基球、免疫担当細胞、滑膜細胞などに作用して、これらの細胞の過剰な活性を是正できることが試験

Suppressive Effect of CMP on Histamine Release by Basophils



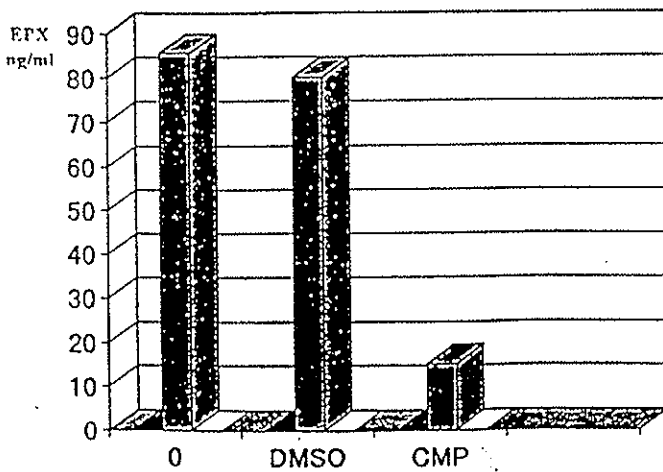
管レベルで明らかにになったわけである。

CMPの経口投与

In vitroで明らかにになったCMPの抗酸化作用、免疫調節作用、抗リウマチ作用、抗アレルギー作用が実際にCMPを経口投与することでin vivoでもその効能が認められるかどうかをモデル動物を用いて検討した。

まず、マウスにCMPを経口摂取させin vitroの場合と同様に好中球の活性酸素の産生抑制が認められるかどうかを検討した。CMP非投与マウスの好中球をPMAで活性化すると、過酸化水素

Suppressive Effect of CMP on Eosinophil Degranulation



の産生を認めるが、CMP経口投与マウスではPMA刺激を行うと、好中球の過酸化水素の産生は明らかに低下する。すなわち、CMPはin vivoにおいても好中球の活性酸素の産生を抑制しているということになる。

次に重症免疫不全マウス、SCIDマウスにヒトリンパ球を腹腔内に移入してヒトリンパ球を生着させたあと、CMPの摂取を開始し、定期的に採血を行い、血清中のヒト免疫グロブリン量をELISA法により測定した。

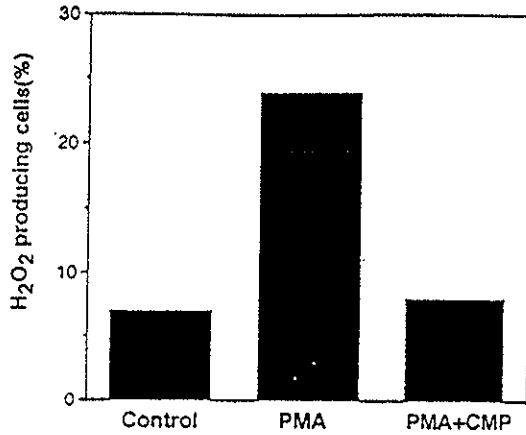
慢性関節リウマチ患者のリンパ球を移入したSCIDマウスを使ってヒト型リウマチ因子産生に

Effect of CMP on rheumatoid factor(RF) production in SCID mice engrafted with lymphocytes of a patient with rheumatoid arthritis

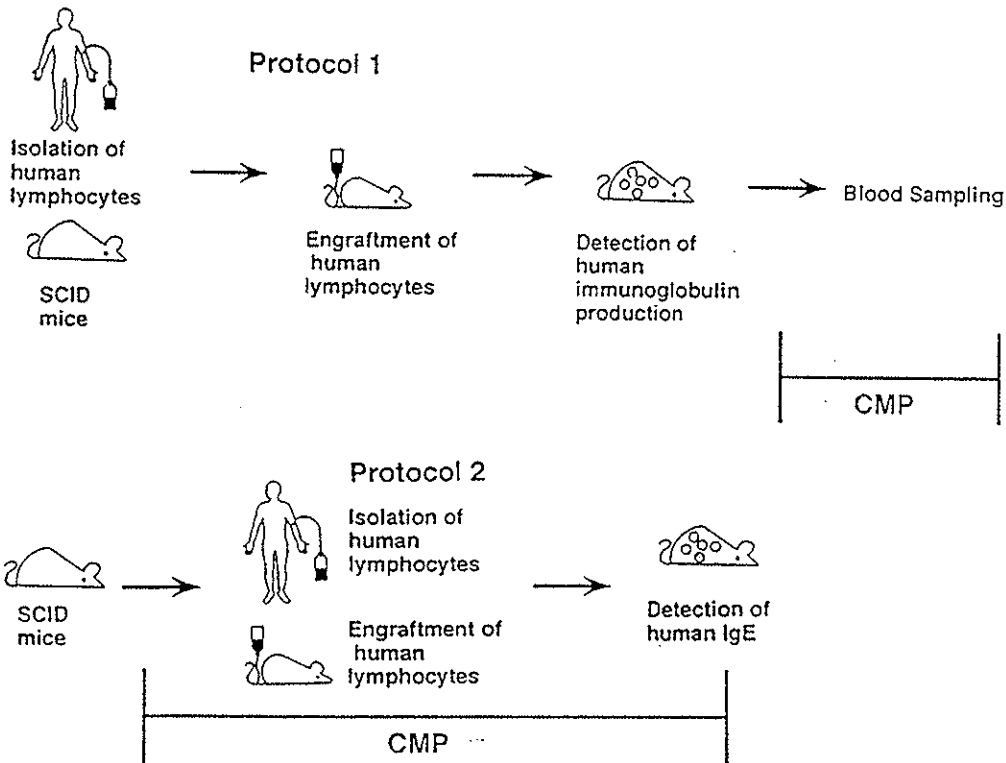
Mice	Serum RF*(Unit)
Control	0.64
CMP	Not detected

*at 54 days after engraftment of lymphocytes

Effect of CMP on superoxide generation by PMA activated neutrophils of SCID mice



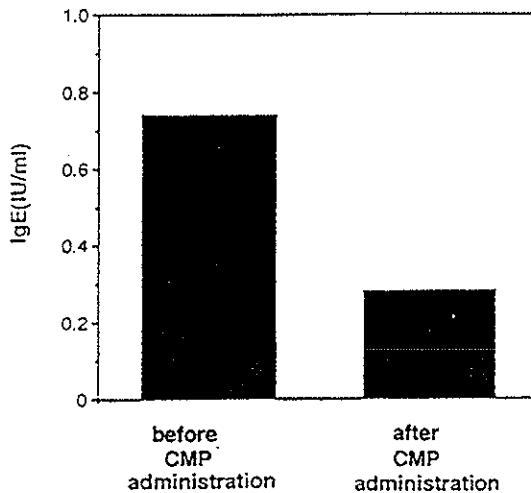
対するCMPの効果を観察してみた。リンパ球をSCIDマウスに移入して一四日後にヒト型IgG抗体が出現する。このIgG抗体が出現した時



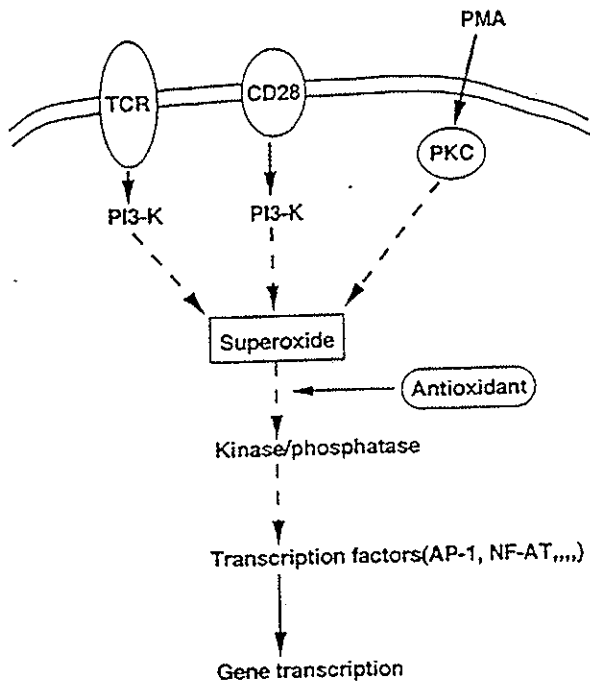
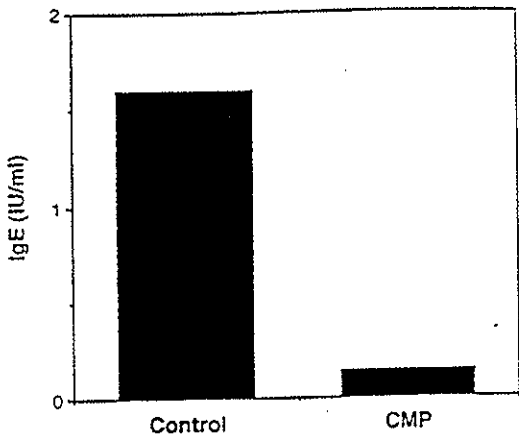
次にアトピー性皮膚炎患者のリンパ球をSCIDマウスに移入し、患者リンパ球がSCIDマウスに生着したことを確認したあと、CMPの投与を開始してヒト型IgE産生に対するCMPの効果を評価した。SCIDマウスにおけるIgEの産生はCMPの経口投与により明らかに抑制されている。この成績はすでにアレルギーを発症しているIgE高値の患者に対してもCMPが治療効

期に一群にはCMPの投与を開始し、他の群にはコントロールとしてCMPを投与せずに飼育してみると、五四日目にSCIDマウスの血中にはヒト型のリウマチ因子が認められた。しかし、CMPを経口摂取させたマウスではリウマチ因子の出現はまったく認められない。

Effect of CMP on IgE production in SCID mice engrafted with lymphocytes of a patient with atopic dermatitis



Effect of CMP on human IgE production in SCID mice engrafted with lymphocytes of a patient with atopic dermatitis



果をもつ可能性を示している。
次にあらかじめCMPを摂取することがアレルギー発症の予防に役立つかどうかを検討してみた。方法はCMPをあらかじめ投与したマウスにアトピー性皮膚炎患者のリンパ球を移入し経時的にヒト型IgE量を測定してみた。
CMPを摂取していないマウスでは強いIgE産生を認めるが、CMP摂取マウスではヒト型IgEの産生が強く抑制されていることがわかる。この成績はCMPがアレルギー発症の初期のプロセスである感作の成立に対しても、阻止する効果のあることを示している。このようにCMPは試

験管の中だけでなく生体内でもその作用を発揮することがわかった。
CMPの作用機序
CMPの作用機序については現在検討中であるが、ひとつの仮説として免疫系に対して次のようなスキームを考えている。
リンパ球の活性化や増殖は細胞表面の刺激受容体によるシグナル伝達にはじまり、細胞質内のリン酸化酵素や脱リン酸化酵素の活性化、それに続く、転写因子の活性化、核内移行、核内移行した転写因子による遺伝子の活性化と、一連のシグナ

ル伝達系のカスケードが作用する。この複雑な経路の中間に位置してセカンドメッセンジャーとして働くのが活性酸素である。通常はこの活性酸素は細胞内の防御系により適切に制御されているが、活性酸素の防御系に異常が生じ、結果として免疫異常があらわれることになる。

CMPは抗酸化作用によって、こうした過剰な活性酸素を消去し、シグナル伝達系のカスケードを是正して免疫調節作用を発揮しているであろうと考えている。このことは好中球、好酸球、好塩基球にもあてはまり、シグナル伝達系のカスケードを是正してこれら炎症細胞のバーストを阻止することによって、炎症を鎮静化する方向に作用しているのではないかと考えている。

今後、CMPのもつ個々の作用がどのような機序で成立しているのかをさらに解析することが私たちに与えられた課題となる。さらに一歩進めてCMPのなかのどの成分が個々の作用に関与しているかを明らかにしていく必要があると思っ