
フラボノイドの IL-4 産生亢進メカニズム解明による 新たなアレルギー予防戦略

徳島大学大学院医歯薬学研究部実践栄養学分野 教授・酒井 徹

■ 目的

ノビレチンのヘルパー2型サイトカイン産生に対する影響を明らかにすると共に IL-4 産生亢進のメカニズムを解明する。

■ 方法

ノビレチンのサイトカイン産生に対する作用

DO11.10 マウスから採取した脾細胞とノビレチンを共培養し、卵白アルブミン (ovalbumin : OVA)³²³⁻³³⁹ ペプチドで 48 時間刺激を行いサイトカインを測定した。

IL-4 遺伝子レポーターアッセイ

C57BL/6 マウスのゲノム DNA を鋳型としてマウス IL-4 遺伝子プロモーター領域(-766 - +63)の増幅を PCR 法により行った。PCR 産物を PGV-P2 ベクターに組み換えを行い PGV-IL-4p ベクターを複製した。EL-4 細胞に PGV-IL-4p と pCMV-β-gal 遺伝子を遺伝子導入を行いルシフェラーゼ活性を測定した。

RNAseq 解析

DO11.10 マウス脾臓細胞をノビレチンと共に 24 時間培養し OVA³²³⁻³³⁹ ペプチドで刺激を行いさらに 24 時間培養を行った。CD4⁺細胞を磁気ビーズにて精製を行い、RNA 抽出を抽出した。RNA 網羅解析は、タカラバイオ株式会社遺伝子解析センターに依頼を行った。

■ 結果および考察

OVA 特異的 T 細胞レセプター遺伝子導入マウス脾臓細胞を OVA³²³⁻³³⁹ ペプチドで刺激を行いノビレチン添加の影響を観察した。ノビレチンの添加は抗原特異的増殖反応および IFN-γ 産生を著しく抑制したが、IL-4 産生を亢進させた。IL-13 は、IL-4 と同様にヘルパー2型応答に関わるサイトカインであるが、ノビレチン添加による影響は認められなかった。ノビレチンの IL-4 プロモーター活性に対する影響を観察するために IL-4 プロモーター領域の下流にルシフェラーゼが存在するレポーター遺伝子を EL-4 細胞株に遺伝子導入を行いプロモーター活性を測定した。ノビレチンの添加は IL-4 遺伝子プロモーター活性を統計学的に有意に上昇させた。

DO11.10 マウス脾臓細胞を OVA³²³⁻³³⁹ ペプチドで刺激を行いノビレチン処理を 24 時間行った。CD4⁺細胞を磁気ビーズ法にて精製を行い、RNA 抽出を抽出し mRNA の網羅解析を行った。遺伝子発現の網羅解析でもノビレチンは T 細胞活性化を負に制御していることが示された。Enriched ontology clusters 解析の結果、ノビレチン添加により特異的に発現する遺伝子群は、“processing of capped intron-containing pre-mRNA”および“coathomer complex”に分類されるものであり、主として細胞の代謝に関わるものであった。スタチンやノビレチンは動物モデルで抗肥満作用が報告されており、代謝機構への関与を示唆する結果である。KEGG パスウェイ解析で“Th1 and Th2 differentiation”に着目してみると多くの活性化遺伝子においてノビレチンで負の制御がなされていた。いくつかの遺伝子は負の制御から独立したのでこれらの遺伝子に絞り込み解析を行うことで今後ノビレチンによる IL-4 産生亢進に関わる分子が明らかになることが期待される。

■ 結語

ノビレチンはヘルパー2型免疫応答に関わるサイトカインの中で IL-4 産生を特異的に高めることが判明した。また、その産生亢進は転写レベルで行われていた。ノビレチンのヘルパー T 細胞活性化に対する影響を mRNA 発現網羅解析により検討した結果、IL-4 産生亢進はこれまで知られていた活性化と独立した機構であることが示唆された。