

フラボノイドによる免疫細胞活性化

丸中良典^{*1,2}・芦原英司¹・新里直美^{1,2}・太田麻利子¹

¹京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学

²平安女学院大学日本食育・健康研究所

Flavonoid Enhances the MCP-1-Induced Monocyte Migration

Yoshinori MARUNAKA^{*1,2}, Eishi ASHIHARA¹, Naomi NIISATO^{1,2} and Mariko OHTA¹

¹Department of Molecular Cell Physiology, Graduate School of Medical Science,
Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto 602-8566

²Japan Institute for Food Education and Health,
Heian Jogakuin (St Agnes) University, Kyoto 602-8013

ABSTRACT

We have previously demonstrated that Cl⁻ regulates many cellular functions including cell cycle progression, apoptosis-related gene expression, and elongation of neurites in response to nerve growth factor. In this study, we investigated the effects of flavonoid on the monocyte migration induced by monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Transwell migration assay showed that Quercetin stimulated migration of THP-1 monocytic leukemic cells in a dose-dependent manner. This effect was partially inhibited by bumetanide, an inhibitor of Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter 1 (NKCC1). Moreover, this enhanced migration was inhibited by the low extracellular Cl⁻ concentration. Taken together with our previous findings that flavonoids stimulate transepithelial Cl⁻ transport by activating NKCC1 or Cl⁻ channel, it is suggested that flavonoids may stimulate migration of monocytes via the activation of NKCC1. The precise mechanisms of enhanced migration by flavonoids are under investigation. *Soy Protein Research, Japan* **14**, 63-67, 2011.

Key words : Cl⁻, NKCC, monocyte, migration, flavonoid

我々の免疫能発揮において重要な役割を担っている単球は、1) 感染症においては、感染巣に遊走し外来抗原の貪食処理を行い、さらにマクロファージ (Mφ) および樹状細胞 (DC) に分化後は、抗原を捕食しT細胞

の活性化やサイトカインを分泌することで感染免疫を担い、また2) 腫瘍免疫においては、分化したMφおよびDCが腫瘍組織に遊走した後、腫瘍抗原を捕食しT細胞の活性化およびサイトカインを分泌することで抗腫瘍効果を発揮することにより、生体防御機能を担っている。免疫担当細胞の賦活化は生体防御機構の

* 〒602-8566 京都市上京区河原町広小路梶井町465

最重要課題であり、ワクチン療法や免疫細胞輸注療法が数多く開発され試みられているが、未だその成果は不十分である。従来の方・観点から療法開発には限界があると言わざるを得ず、新たな観点・発想からの治療開発が迫られている。

$\gamma\delta$ 型のT細胞受容体を発現する $\gamma\delta$ T細胞は、非ペプチド性のリン酸抗原が刺激となって増殖し、主要組織適合性抗原(MHC)非拘束性に免疫活性を有する。我々は、ピロリン酸骨格に類似した構造をもつビスホスホネート (BP) 製剤で刺激・増幅した $\gamma\delta$ T細胞が、BP製剤で前処理した腫瘍細胞に向かって遊走し、腫瘍細胞に接触し抗腫瘍効果を発揮することを明らかにしてきた¹⁻⁴。

一方、多くの細胞機能は種々のイオンが細胞内外を移動することで引き起こされている。我々はその中でCl⁻の細胞機能における生理活性解明の研究をおこない⁵⁻¹⁴、細胞質内にCl⁻を取り込むNa⁺/K⁺/2Cl⁻共輸送体1 (NKCC1) が神経細胞の神経突起の伸長を制御しており、神経突起の伸長部分にはNKCC1が高発現していることを明らかにした⁵。またフラボノイド類 (Fig. 1A) の一種であるケルセチン (Fig. 1B)、大豆成分ゲニステイン (Fig. 1C) が神経突起伸長を促進することも明らかにしており^{15, 16}、さらに細胞内Cl⁻が、細胞骨格系たん白質であるチュブリン自身が有するGTPase活性を阻害することによりチュブリンの再重合を引き起こすことも明らかにしている (未発表データ)。これはNKCC1を介して細胞内に取り込まれたCl⁻が、チュブリンを重合させ神経突起伸長という一種の細胞膜移動をもたらしていることを意味している。これらのことに基づき、我々は「フラボノイドは単球細胞のNKCC1を活性化し、Cl⁻を細胞内に取り込み、単球の遊走能を高める」という仮説をたて、今回はゲニステイン同様、フラボノイドの一種であるケルセチン (Fig. 1B) による単球細胞の遊走能に対する影響について検討した。

方 法

実験材料

単球細胞としてヒト単球性白血病細胞株であるTHP-1細胞を用いた。THP-1細胞は10% FCS (胎仔血清) 加RPMI1640培地を培養液とし、37°C、5% CO₂存在下で培養し用いた。

単球細胞の遊走能に対するケルセチンの影響

ケモカインMCP-1 (monocyte chemoattractant

protein-1) によるTHP-1細胞の遊走能をトランスウェルチャンバー (pore size; 8.0 μ m, インサート: ポリカーボネート膜) を用いて検討した。チャンバー下層にはMCP-1 (10 ng/mL) を添加し、最終細胞密度 5×10^6 cells/mLで細胞を上層に入れ、各種濃度のケルセチンを添加し2.5時間後に下層に遊走したTHP-1細胞数を算出した。なお、FCS (胎仔血清) による遊走能亢進を除外するため、1%となるようにFCSを加えた培養液を用いた。次に、NKCC1阻害剤であるブメタニド (BMT; 200 μ M) をケルセチン (10 μ M) とともにトランスウェル上層に添加し、同様にTHP-1細胞の下層への遊走細胞数を算出した。

単球細胞の遊走に対するCl⁻の影響

培養液中のKClのCl⁻をNO₃⁻に置換した培養液に変更し、下層へのTHP-1細胞の遊走能の変化を検討した。

結果と考察

まず、MCP-1によるTHP-1細胞の遊走能をトランスウェルチャンバーを用いて検討した。THP-1細胞の下層への遊走細胞数は、ケルセチンの濃度依存性に増加し、遊走能は12.5 μ M以上でほぼ定常状態に達した (Fig. 2A)。次に、NKCC1阻害剤であるBMTをケルセチンとともにトランスウェルチャンバー上層に添加したところ、ケルセチンにより促進されたTHP-1細胞の遊走能は、BMTの添加により軽度抑制された (Fig. 2B)。これらのことより、フラボノイドの一種でNKCC1の活性作用を有するケルセチンは、THP-1単球細胞の遊走能を亢進し、この効果はBMTにより軽度抑制されることが明らかとなった。

上記のことから、単球細胞の遊走にCl⁻が影響を与え

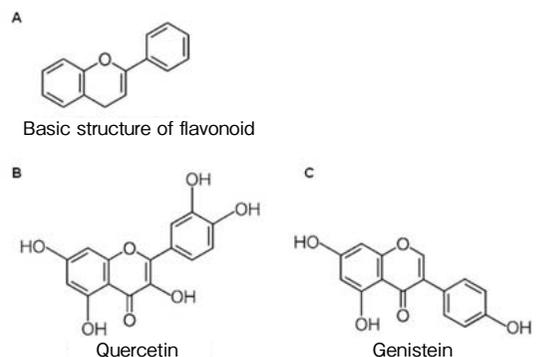


Fig. 1. Structure of flavonoids. (A) Basic of structure, (B) Quercetin, (C) Genistein.

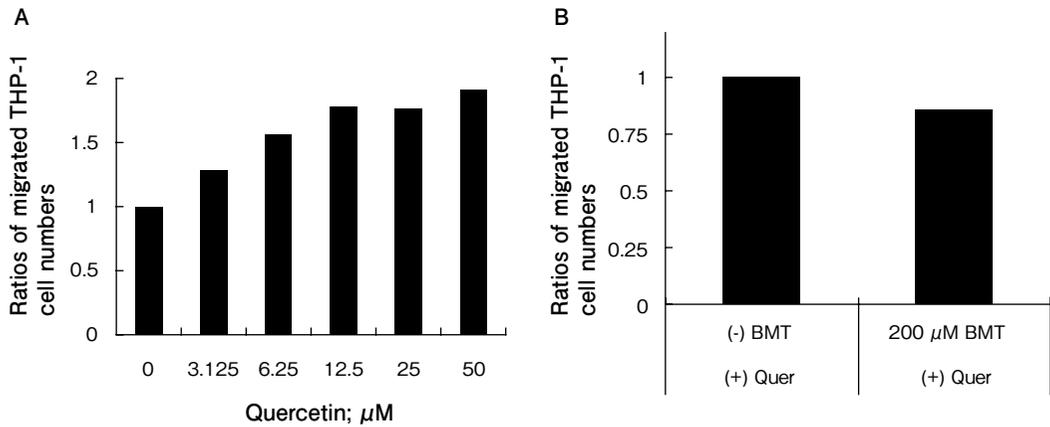


Fig. 2. The effects of Quercetin on the migration of THP-1 cells. (A) Quercetin enhances migration of THP-1 cells in a dose-dependent manner. (B) Bumetanide (BMT) partially inhibited Quercetin-enhanced THP-1 migration.

ていることが推察されたので、次に細胞外液（培養液）中のCl濃度が、THP-1細胞の遊走能に影響を与えるかを検討した。MCP-1を入れた上層の培養液中のCl濃度を下げること（Fig. 3 ② vs ③）で、下層へのTHP-1の遊走は約82.3%に減少した。このことからTHP-1の遊走という一種の細胞膜移動にはClが必要であることが示唆される。また、遊走先のチャンパー下層のCl濃度を下げること（Fig. 3 ② vs ④, Fig. 3 ③ vs ⑤）で、THP-1細胞の遊走はそれぞれ36.9%, 48.8%に減少した。このことから、THP-1細胞の遊走という現象は、Cl指向性であると考えられる。

我々が行ってきたPC12細胞を用いた神経突起伸長の検討から、神経突起が伸長する細胞の先端部分にはNKCC1が局在しており⁵⁾、Clを細胞内に取り込みチューブリンの重合をもたらしていることが推察されている。この現象と同様、単球細胞がケモカインの濃度勾配に従って遊走する際には、遊走方向の細胞膜部分よりClを取り込み細胞骨格に変化をもたらしていると推察され、細胞骨格が変化しやすいようにCl濃度の高い方向（Cl指向性）に遊走すると予想される。また、ケルセチンなどのフラボノイド類はClを細胞内に取りこむNKCC1を活性化することにより、単球の遊走を促進すると推察される。現在、ゲニステインを含む他のフラボノイドによる遊走能の変化を確認するとともに、このメカニズムを明らかにするためタイムラプス顕微鏡下で単球細胞の遊走、および膜変形を観察し、かつNKCC1やClを細胞外に放出するKCC (K^+/Cl^- cotransporter) 1の局在を確認し、それらのノックダウンの遊走能への影響を調べている。

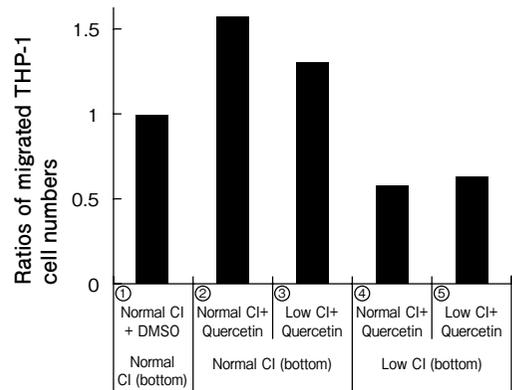


Fig. 3. The effects of extra cellum Cl on THP-1 migration. The low concentrations of Cl in the upper chambers reduced THP-1 migration (② vs ③). Moreover, the low concentrations of Cl in the lower chambers also reduced the migration (② vs ④, ③ vs ⑤).

要 約

免疫能発揮において重要な役割を担っている単球は、感染巣、および腫瘍組織に遊走し、外来抗原や腫瘍抗原を貪食し、サイトカインの分泌や抗原提示後T細胞を活性化することで、その免疫機能を発揮する。近年の我々はCl⁻が多くの細胞機能に関与し、フラボノイドがNa⁺/K⁺/2Cl⁻共輸送体1 (NKCC1) などのイオン輸送体の発現や活性を制御することを明らかにしてきた。本研究は、免疫担当細胞である単球の遊走に対するフラボノイドの作用に着目して行った。ヒト単球性白血病細胞株THP-1細胞にフラボノイドの一種であるケルセチンを作用させると、ケモカインであるMCP-1に対する遊走能がケルセチン濃度依存性に亢進し、その効果はブメタニドにより部分的に抑制された。また、細胞外Cl⁻を減少させると、ケルセチンによる遊走能の亢進は抑制された。これらの結果より、ケルセチンはNKCCを介してCl⁻を取り込むことにより単球の遊走を増強していることが示唆され、現在詳細なメカニズムの解明に取り組んでいる。本研究から得られた知見をもとに、NKCCの活性化剤を探索することで、免疫担当細胞機能が増強され、新たな免疫療法の開発が可能となると期待される。

文 献

- 1) Sato K, Kimura S, Segawa H, Yokota A, Matsumoto S, Kuroda J, Nogawa M, Yuasa T, Kiyono Y, Wada H and Maekawa T (2005): Cytotoxic effects of gamma delta T cells expanded ex vivo by a third generation bisphosphonate for cancer immunotherapy. *Int J Cancer*, **116**, 94-99.
- 2) Uchida R, Ashihara E, Sato K, Kimura S, Kuroda J, Takeuchi M, Kawata E, Taniguchi K, Okamoto M, Shimura K, Kiyono Y, Shimazaki C, Taniwaki M and Maekawa T (2007): Gamma delta T cells kill myeloma cells by sensing mevalonate metabolites and ICAM-1 molecules on cell surface. *Biochem Biophys Res Commun*, **354**, 613-618.
- 3) Yuasa T, Sato K, Ashihara E, Takeuchi M, Maita S, Tsuchiya N, Habuchi T, Maekawa T and Kimura S (2009): Intravesical administration of T cells successfully prevents the growth of bladder cancer in the murine model. *Cancer Immunol Immunother*, **58**, 493-502.
- 4) 芦原英司 (2007) : $\gamma\delta$ T細胞の抗腫瘍メカニズムと臨床応用. *Bio Clinica*, **22**, 1044-1050.
- 5) Nakajima K, Miyazaki H, Niisato N and Marunaka Y (2007): Essential role of NKCC1 in NGF-induced neurite outgrowth. *Biochem Biophys Res Commun*, **359**, 604-610.
- 6) Maki M, Miyazaki H, Niisato N, Morihara T, Marunaka Y and Kubo T (2009): Blockers of K⁺/Cl⁻ transporter/channels diminish proliferation of osteoblastic cells. *Biomed Res*, **30**, 137-140.
- 7) Ohsawa R, Miyazaki H, Niisato N, Shiozaki A, Iwasaki Y, Otsuji E and Marunaka Y (2010): Intracellular chloride regulates cell proliferation through the activation of stress-activated protein kinases in MKN28 human gastric cancer cells. *J Cell Physiol*, **223**, 764-770.
- 8) Asano J, Niisato N, Nakajima K, Miyazaki H, Yasuda M, Iwasaki Y, Hama T, Dejima K, Hisa Y and Marunaka Y (2009): Quercetin stimulates Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransport via PTK-dependent mechanisms in human airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **41**, 688-695.
- 9) Miyazaki H, Shiozaki A, Niisato N, Ohsawa R, Itoi H, Ueda Y, Otsuji E, Yamagishi H, Iwasaki Y, Nakano T, Nakahari T and Marunaka Y (2008): Chloride ions control the G1/S cell-cycle checkpoint by regulating the expression of p21 through a p53-independent pathway in human gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **366**, 506-512.
- 10) Miyazaki H, Shiozaki A, Niisato N and Marunaka Y (2007): Physiological significance of hypotonicity-induced regulatory volume decrease:

reduction in intracellular Cl⁻ concentration acting as an intracellular signaling. *Am J Physiol Renal Physiol*, **292**, F1411-F1417.

- 11) Shiozaki A, Miyazaki H, Niisato N, Nakahari T, Iwasaki Y, Itoi H, Ueda Y, Yamagishi H and Marunaka Y (2006): Furosemide, a blocker of Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter, diminishes proliferation of poorly differentiated human gastric cancer cells by affecting G₀/G₁ state. *J Physiol Sci*, **56**, 401-406.
- 12) Aoi W, Niisato N, Miyazaki H and Marunaka Y (2004): Flavonoid-induced reduction of ENaC expression in the kidney of Dahl salt-sensitive hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun*, **315**, 892-896.
- 13) Niisato N, Nishino H, Nishio K and Marunaka Y (2004): Cross talk of cAMP and flavone in regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Cl⁻ channel and Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter in renal epithelial A6 cells. *Biochem Pharmacol*, **67**, 795-801.
- 14) Niisato N, Ito Y and Marunaka Y (1999): Activation of Cl⁻ channel and Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter in renal epithelial A6 cells by flavonoids: genistein, daidzein, and apigenin. *Biochem Biophys Res Commun*, **254**, 368-371.
- 15) 丸中良典, 新里直美, 宮崎裕明, 中島謙一 (2009): フラボノイドによる神経再生の試み. 大豆たん白研究, **12**, 129-133.
- 16) Nakajima K, Niisato N, and Marunaka Y (2011): Quercetin stimulates NGF-induced neurite outgrowth in P12 cells via activation of Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter. *Cell Physiol Biochem*, **28**, 147-156.