

## 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

秋山 珠 璃, 井上 咲 季, 中 島 徹, 田 中 進

(高崎健康福祉大健康福祉学部健康栄養学科\*)

(受付 2017年8月29日, 受理 2017年9月28日)

## Basic study on the regulation of cellular immunity by lanthanum ions

Shuri AKIYAMA, Saki INOUE, Toru NAKAJIMA and Susumu TANAKA

Department of Health and Nutrition, Faculty of Health and Welfare,

Takasaki University of Health and Welfare

## Summary

Lanthanum (La), which is one of the rare earth elements, is used for industrial material such as capacitors and lenses. Furthermore, La possesses active physiological and biological properties in the human body and its compounds have been applied medicinally as an anti-hyperphosphatemia drug. In the present study, we examined the effect of lanthanum ions ( $\text{La}^{3+}$ ) *in vitro* on the phosphatase activity of calcineurin (CN), which has been recognized as a therapeutic target for the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK506. Using kinetic analysis, we found that the CN activity was inhibited by  $\text{La}^{3+}$  in mixed-type noncompetitive inhibition. For further investigations on the effect of  $\text{La}^{3+}$  on cellular immunity, we studied the effects of  $\text{La}^{3+}$  on IL-2 production induced by the mitogen, concanavalin A (ConA), in Jurkat T-cells and found that  $\text{La}^{3+}$  suppressed the ConA-induced IL-2 produced by Jurkat cells. The results showed that  $\text{La}^{3+}$  regulated cellular immunity via the transcription factor NFATc1.

タンパク質脱リン酸化酵素であるカルシニューリン (CN) は、ホスホプロテインホスファターゼ 2B (PP2B) とも言われ、カルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) /カルモジュリン (CaM) 依存性のセリン/トレオニンホスファターゼとして知られている。CN は下等から高等に至る真核生物の様々な細胞機能において重要な役割を果たしているが、ヒトでは心臓の形成<sup>1)</sup>、興奮性神経細胞死<sup>2)</sup> やアルツハイマー病で特徴的に観察される異常にリン酸化されたタウタンパク質の形成<sup>3,4)</sup> などに CN が関与している報告がある。また免疫系では CN は、T 細胞においてインターロイキン-2 (IL-2) mRNA の発現を制御する転写調節因子の一つである Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1 (NFATc1) を脱リン酸化することで IL-2 mRNA の発現を高め、細胞性免疫を上昇させることが知られている<sup>5)</sup>。さらに、臓器移植の際に免疫抑制剤として使用されているシクロスポリンや FK506 はそれぞれシクロフィリンや FK506 結合タンパク質 (FKBP) といったイムノフィリンという結合タンパク質を介して間接的に CN を阻害することから、CN は免疫抑制剤の標的酵素であることが知られている<sup>6)</sup>。細胞内の CN は、 $\text{Ca}^{2+}$  や CaM およびその他の因子によって厳密に活性が調節され

ていると考えられるが、*in vitro* では、ニッケルイオン ( $\text{Ni}^{2+}$ ) やマンガンイオン ( $\text{Mn}^{2+}$ ) のような二価重金属で活性化 (刺激) されることが判明している<sup>7-9)</sup>。その他、クロロゲン酸、ゴシポール、レチノイドなどの化合物が CN のホスファターゼ活性に影響を与えることが報告されている<sup>10-12)</sup>。また近年、我々は生理的濃度の亜鉛イオン ( $\text{Zn}^{2+}$ ) が  $\text{Ni}^{2+}$  との競合阻害により CN 活性を阻害すること<sup>13)</sup>、また  $\text{Mn}^{2+}$  が  $\text{Ni}^{2+}$  刺激した CN 活性を不競合的に阻害することを明らかとし<sup>14)</sup>、更にバナジウム (オルトバナジン酸、メタバナジン酸、バナジル) が  $\text{Ni}^{2+}$  刺激した CN 活性を二相性に阻害することを報告してきた<sup>15,16)</sup>。

一方、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。希土類元素は生体内ではほとんど存在しない 3 価の元素であり、主に機能性素材として工業的に利用されている<sup>17)</sup>。一方、一部の希土類元素は医薬品にも応用されており、La を主成分とした炭酸ランタンは、リンを吸着させる特徴を持つことから、慢性腎臓病疾患患者に見られる高リン血症の改善薬 (医薬品名: ホスレノール) として<sup>18)</sup>、また同じくセリウムはシュ

\*所在地: 群馬県高崎市中大類町37-1 (〒370-0033)

ウ酸セリウムとして制吐薬として使用されている<sup>19)</sup>。従って、希土類元素の生物学的な影響や機能性を検討することにより、人の健康維持や医療分野などに応用していくことは重要なことであると思われる。本研究では希土類元素の中でもランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) を中心として、先述したように免疫抑制剤の標的酵素である CN のホスファターゼ活性に対する影響を調べ、さらにヒト T 細胞株 Jurkat 細胞を用いて細胞が産生する IL-2 を指標に、 $\text{La}^{3+}$  の細胞性免疫に対する基礎的な検討を行ったので報告する。

## 実験方法

### 1. 試薬

シグマアルドリッチからウシ脳由来カルシニューリン (CN)、ウシ精巢由来カルモジュリン (CaM)、ストレプトマイシン、ペニシリンを購入した。また、核タンパク質抽出キット、Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1 (NFATc1) タンパク質測定キットはアクティブ・モティフから購入した。ヒトインターロイキン-2 (IL-2) タンパク質測定キットは BD Biosciences、タンパク質アッセイキット (RCDC プロテインアッセイキット) はパイオ・ラッド、Jurkat 細胞は DS ファーマバイオメディカル、ウシ胎児血清 (FCS) はサーモフィッシュサイエンティフィック、1M の pH 7.5 HEPES は Jena Bioscience からそれぞれ購入した。リアルタイム PCR 用の試薬はタカラバイオの製品を使用し、和光純薬工業から、*p*-ニトロフェニルリン酸 (*p*NPP)、*p*-ニトロフェノール (*p*NP)、RPMI1640、塩化ニッケル ( $\text{NiCl}_2$ )、塩化マグネシウム ( $\text{MgCl}_2$ )、塩化ランタン ( $\text{LaCl}_3$ )、塩化イットリウム ( $\text{YCl}_3$ )、塩化スカンジウム ( $\text{ScCl}_3$ )、塩化セリウム ( $\text{CeCl}_3$ )、塩化サマリウム ( $\text{SmCl}_3$ )、塩化ユーロピウム ( $\text{EuCl}_3$ )、塩化イッテルビウム ( $\text{YbCl}_3$ )、塩化ルテチウム ( $\text{LuCl}_3$ )、コンカナバリン A (ConA)、炭酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )、塩化カルシウム ( $\text{CaCl}_2$ ) をそれぞれ購入した。

### 2. CN のホスファターゼ活性の測定方法とキネティクス解析

CN のホスファターゼ活性の測定は高橋等の方法<sup>13)</sup> に従って行った。即ち、終濃度で 100 mmol/L HEPES-NaOH (pH 7.5)、0.2 mmol/L  $\text{NiCl}_2$ 、1 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ 、5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  をそれぞれ含む溶液に 1 U の CN、2.5 U の CaM を加えたものを標準酵素反応液とし、これに任意の濃度の  $\text{LaCl}_3$  と終濃度で 3 mmol/L *p*NPP を加え、37°C、60 分間、酵素反応を行った。60 分後、終濃度で 0.8 mol/L の  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  を加え酵素反応を停止し、酵素反応で生成した *p*NP を  $A_{410}$  で測定することにより酵素活性を求めた。また CN に対する  $\text{La}^{3+}$  の阻害様式を明らかとするために行ったキネティクス解析は、標準酵素反応液に終濃度で  $\text{LaCl}_3$  なし (0  $\mu\text{mol/L}$ )、 $\text{LaCl}_3$  7  $\mu\text{mol/L}$  あるいは 10  $\mu\text{mol/L}$

をそれぞれ添加して一定濃度で固定し、さらに、基質である *p*NPP を任意の濃度でそれぞれ添加して 37°C、60 分間反応させた。酵素反応は終濃度で 0.8 mol/L の  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  を加えて停止させ、 $A_{410}$  で *p*NP を測定することにより酵素活性を求めた。なお、 $A_{410}$  と脱リン酸化型 *p*NPP との相関を求めるために、既知濃度の *p*NP を  $A_{410}$  で測定し、検量線を作成することにより酵素活性の計算を行った。

### 3. Jurkat 細胞の培養と細胞の生存率の測定

培地は、10 v/v% の FCS と 0.1 mg/mL のストレプトマイシン、100 U/mL のペニシリンを含む RPMI1640 を使用し、37°C、5%  $\text{CO}_2$  の条件下で培養を行った。FCS は 56°C、30 分で非働化したものを使用した。細胞の生存率の測定は、任意濃度の  $\text{LaCl}_3$  と刺激剤である ConA を終濃度で 25  $\mu\text{g/mL}$  となるようにそれぞれ培地に加え、Jurkat 細胞の培養を一晩行った。その後、0.4% トリパンプルーと細胞培養液を同等量で混ぜ、血球計算盤を用いてブルーに染色された死細胞と染色されなかった生細胞をカウントすることにより生存率を求めた。

### 4. IL-2 タンパク質の測定

培養上清中の IL-2 測定は、任意濃度の  $\text{LaCl}_3$  あるいはその他の希土類元素と刺激剤である ConA を終濃度で 25  $\mu\text{g/mL}$  となるようにそれぞれ培地に加え、Jurkat 細胞の培養を一晩行った。その後培養上清を回収し、測定用の試料とした。IL-2 の測定は、BD Biosciences 社の Human IL-2 ELISA KIT II を使用し、Instruction Manual に従って行った。なお、2 波長 (450 nm/570 nm) の吸光度測定は、コロナのマイクロプレートリーダー (SH-1000) を用いて行った。

### 5. リアルタイム PCR による IL-2 mRNA の測定

任意濃度の  $\text{LaCl}_3$  と刺激剤である ConA を終濃度で 25  $\mu\text{g/mL}$  となるようにそれぞれ培地に加え、Jurkat 細胞を約 3 時間培養した。その後、細胞を回収し、全 RNA 抽出を MACHEREY NAGEL の Nucleo Spin RNA を用いて行った。また cDNA 合成は、タカラバイオの Prime Script<sup>TM</sup> Master Mix を用いて行い、同じくタカラバイオの SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II を用いてリアルタイム PCR 用の反応液の調製を行った。リアルタイム PCR はタカラバイオの Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 を使用して行い、IL-2 mRNA の発現量はグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) mRNA 量で補正し定量化した。

### 6. 転写調節因子 NFATc1 の測定

任意濃度の  $\text{LaCl}_3$  と刺激剤である ConA を終濃度で 25  $\mu\text{g/mL}$  となるようにそれぞれ培地に加え、Jurkat 細胞を約 3 時間培養した。その後細胞を回収し、アクティブ・モティフの Nuclear Extract Kit を用いて核タンパクの抽

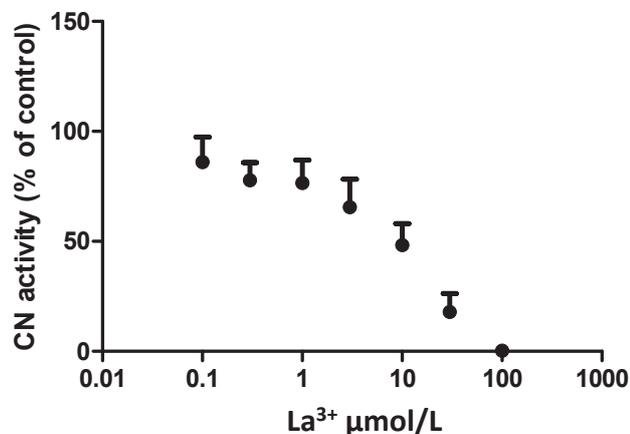
出を行った。核タンパク質の定量は、Lowry法<sup>20)</sup>を基本としたバイオ・ラッドのRCDCプロテインアッセイキットを使用し、核タンパク質中の転写調節因子NFATc1の測定は、アクティブ・モティブのTransAM™ NFATc1 Transcription Factor Assay Kitsを使用しInstruction Manualに従って行った。なお、2波長(450 nm/655 nm)の吸光度測定は、コロナのマイクロプレートリーダー(SH-1000)を用いて行い、得られた測定値を核タンパク質量で補正することにより定量化を行った。

## 7. 統計解析

得られた結果は平均値±標準偏差で表し、一元配置分散分析で解析した。統計解析は、GraphPad Prism5を用いて行った。有意水準は $p < 0.05$ または $p < 0.01$ とした。

## 結果と考察

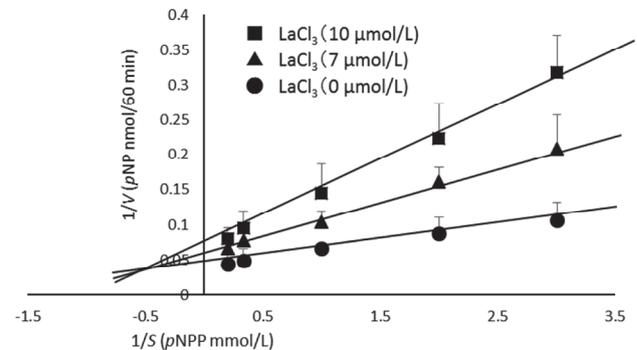
希土類元素の一つであるランタン(La)の細胞性免疫に対する影響を検討するため、最初に免疫抑制剤の標的酵素として知られているカルシニューリン(CN)のホスファターゼ活性に対するランタンイオン( $\text{La}^{3+}$ )の影響を検討した。Fig. 1に示すように $p$ -ニトロフェニルリン酸( $p$ NPP)を基質として使用した今回の我々の酵素反応系に塩化ランタン( $\text{LaCl}_3$ )を添加していくとCN活性は阻害され、50%阻害濃度( $\text{IC}_{50}$ )は5.6~16.4  $\mu\text{mol/L}$ であった。次に $\text{La}^{3+}$ のCN活性阻害のメカニズムを明らかにするために、キネティクス解析を行い検討した。すなわち $\text{LaCl}_3$ なし(0  $\mu\text{mol/L}$ )、あるいは $\text{LaCl}_3$ を7  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$ でそれぞれ一定の濃度に固定し、基質濃度を変えてCN活性を測定した。Fig. 2に示すように基質(S)と反応速度(V)について二重逆数プロットを作成し、 $\text{La}^{3+}$ のCNに対する阻害様式を検討したところ、 $\text{LaCl}_3$ なし(0  $\mu\text{mol/L}$ )とあり(7  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$ )のそれぞれの直線はグラフの第2象限で交叉し、この結果、 $\text{La}^{3+}$ は



**Fig. 1** Inhibition of the phosphatase activity of calcineurin by  $\text{La}^{3+}$ .  $\text{IC}_{50}$  values were calculated using the software GraphPad Prism5. Values are presented as mean  $\pm$  SD.

混合型非競合阻害によりCN活性を阻害することが示された。これは $\text{La}^{3+}$ はCN- $p$ NPP複合体あるいはCN単独の双方に異なる阻害定数 $K_i$ 、 $K_i'$ でそれぞれ結合することを表しており、Fig. 2に示す直線は第2象限で交叉していることから、 $K_i > K_i'$ であることが考えられた。また、Fig. 2から $\text{LaCl}_3$ なし、ありの最大反応速度 $V_{\text{max}}$ とミカエリス定数 $K_m$ をそれぞれ求めたところTable 1のようになり、 $\text{LaCl}_3$ によって $V_{\text{max}}$ は低下し $K_m$ は上昇することが示された。

$\text{LaCl}_3$ は、*in vitro*で免疫抑制剤の標的酵素であるCNを混合型非競合阻害で阻害することが明らかとなったことから、更に $\text{La}^{3+}$ の細胞性免疫に対する影響を調べるためヒトT細胞様株Jurkat細胞を用いて、細胞が産生するインターロイキン-2(IL-2)を指標に検討を行った。最初に $\text{LaCl}_3$ を使用して、Jurkat細胞に対する毒性作用をトリパンブルー染色で調べたところ、Fig. 3(A)に示すように3 mmol/Lまでの $\text{LaCl}_3$ の濃度では、毒性作用は示されなかったが、10 mmol/Lの濃度の $\text{LaCl}_3$ では細胞の生存率が約40%に低下することが示された。次に光学顕微鏡を使用して、細胞の形態に対する $\text{La}^{3+}$ の影響を観察した(Fig. 3(B))。IL-2誘導のために使用している刺激剤、コンカナバリンA(ConA)の添加により細胞は凝集する傾向を示したが、細胞は3 mmol/Lの $\text{LaCl}_3$ では、アポトーシスやネクローシスのような形態変化は認められなかった。

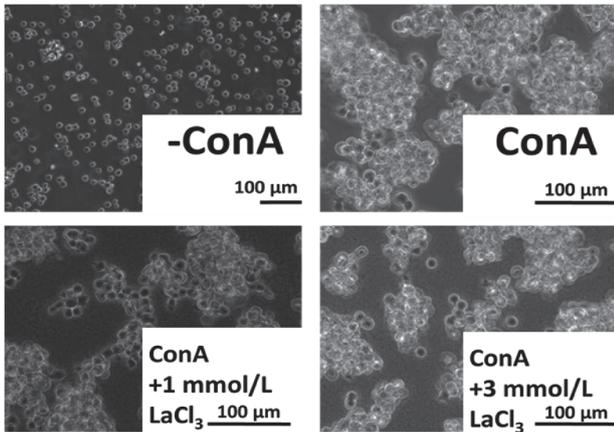
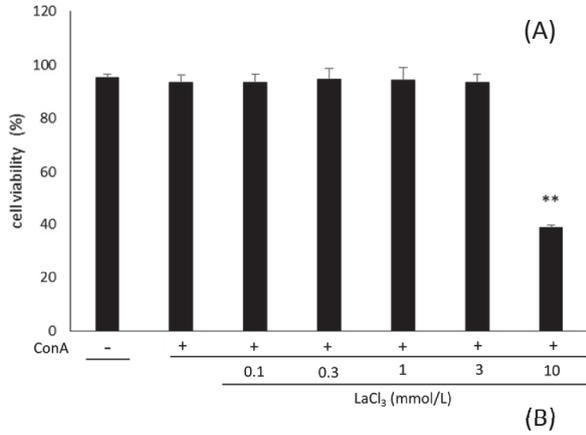


**Fig. 2** Double-reciprocal Lineweaver-Burk plot. With an increase of  $1/S$  ( $p$ NPP mmol/L),  $\text{LaCl}_3$  concentrations linearly increased and were highest at 10  $\mu\text{mol/L}$ , lower at 7  $\mu\text{mol/L}$ , and lowest at 0  $\mu\text{mol/L}$ . Values are presented as mean  $\pm$  SD.

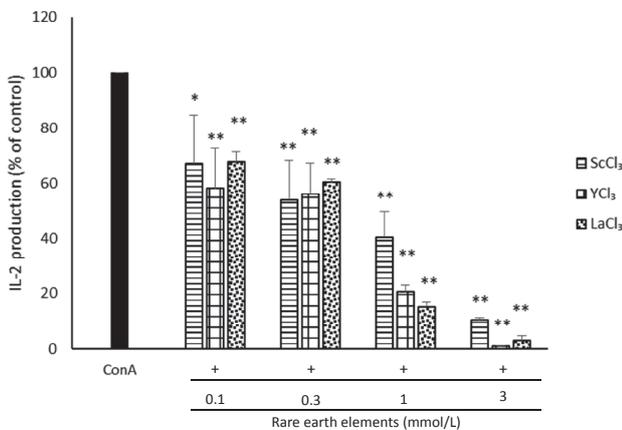
**Table 1** Summary of  $V_{\text{max}}$  and  $K_m$  values for lanthanum ions ( $\text{La}^{3+}$ ) at 0  $\mu\text{mol/L}$ , 7  $\mu\text{mol/L}$ , and 10  $\mu\text{mol/L}$ , respectively

Mixed-type noncompetitive inhibition		
$\text{La}^{3+}$ (0 $\mu\text{mol/L}$ )	$V_{\text{max}}=0.40$ (nmol/min)	$K_m=0.52$ (mmol/L)
$\text{La}^{3+}$ (7 $\mu\text{mol/L}$ )	$V_{\text{max}}=0.29$ (nmol/min)	$K_m=0.88$ (mmol/L)
$\text{La}^{3+}$ (10 $\mu\text{mol/L}$ )	$V_{\text{max}}=0.26$ (nmol/min)	$K_m=1.30$ (mmol/L)

従って、毒性作用のない濃度の範囲（3 mmol/L）で  $\text{LaCl}_3$  による Jurkat 細胞の IL-2 産生に対する影響を検討した。その結果、Fig. 4 に示すように、約 0.1 mmol/L の  $\text{LaCl}_3$  から細胞が産生する IL-2 の低下が認められ、3 mmol/L の  $\text{LaCl}_3$  では IL-2 産生をほぼ抑制することが示された。従っ

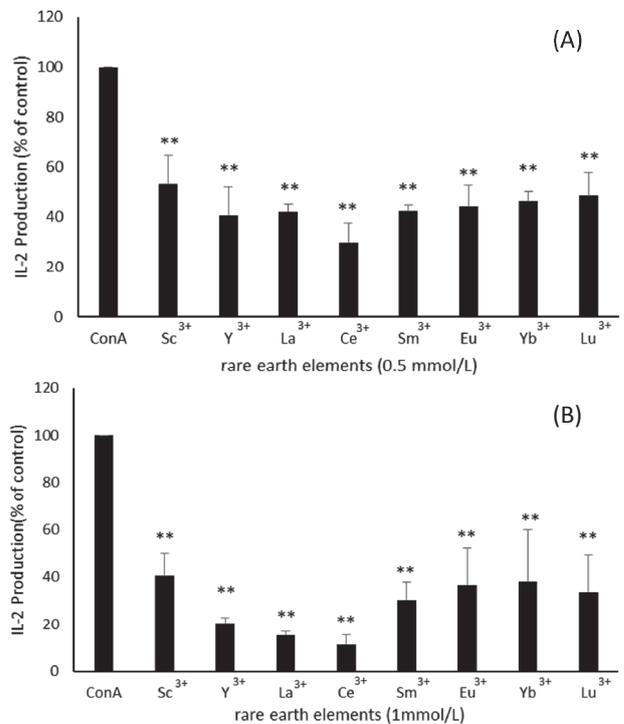


**Fig. 3** Effects of  $\text{La}^{3+}$  on cell viability (A) and cell morphology (B) in Jurkat cells. Values are presented as mean  $\pm$  SD. \*\* $p < 0.01$  compared with ConA.



**Fig. 4** Effects of  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Sc}^{3+}$ , and  $\text{Y}^{3+}$  on IL-2 production in Jurkat cells. With increased rare earth element concentrations, IL-2 production reduced. Values are presented as mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with ConA.

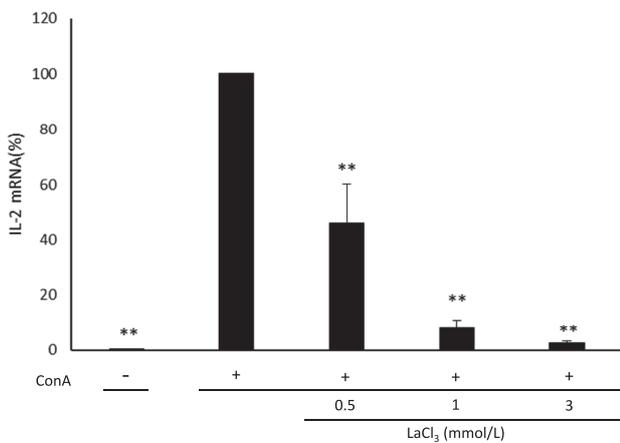
て、 $\text{LaCl}_3$  には毒性のない濃度で、Jurkat 細胞が産生する ConA 誘導性の IL-2 を抑制する働きがあることが示され、 $\text{La}^{3+}$  は細胞レベルで細胞性免疫を低下させることが明らかとなった。次に希土類元素で La よりも原子量が小さいスカンジウムイオン ( $\text{Sc}^{3+}$ )、イットリウムイオン ( $\text{Y}^{3+}$ ) について同様の検討を試みた。Fig. 4 に示すように作用する濃度に差があるものの  $\text{Sc}^{3+}$ ,  $\text{Y}^{3+}$  ともに  $\text{La}^{3+}$  と同様に Jurkat 細胞の IL-2 産生の低下を認めた。この結果から希土類元素には、Jurkat 細胞が産生する IL-2 を抑制する働きがあることが推測されたため、他の 5 種類のランタノイド（セリウムイオン： $\text{Ce}^{3+}$ 、サマリウムイオン： $\text{Sm}^{3+}$ 、ユーロピウムイオン： $\text{Eu}^{3+}$ 、イッテルビウムイオン： $\text{Yb}^{3+}$ 、ルテチウム： $\text{Lu}^{3+}$ ）を使用して Jurkat 細胞の IL-2 産生への影響を検討した。Fig. 5 (A) は、それぞれのランタノイドの添加量 0.5 mmol/L、Fig. 5 (B) は 1 mmol/L における結果を示す。0.5 mmol/L および 1 mmol/L とともに今回検討したランタノイド全てにおいて ConA 刺激のみのコントロールと比較して、有意に IL-2 産生が低下することが示された。また重希土類元素である  $\text{Yb}^{3+}$ ,  $\text{Lu}^{3+}$  よりも軽希土類元素の  $\text{Ce}^{3+}$ ,  $\text{Sm}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$  のほうが IL-2 産生をより低下させる傾向が観察された。以上のように Fig. 4 と Fig. 5 の結果から希土類元素全般として Jurkat 細胞が産生する IL-2 を抑制させる機能があることが推定され、希土類元素は細胞レベルで細胞性免疫を低下させることが考えられた。



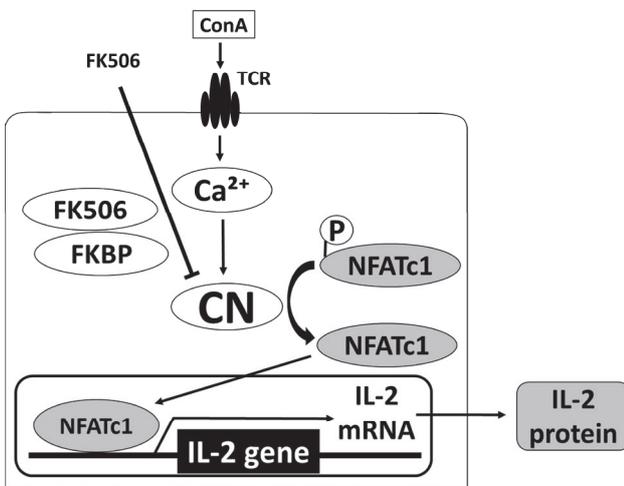
**Fig. 5** Effects of rare earth elements in the presence of 0.5 mM (A) and 1 mM (B) on IL-2 production in Jurkat cells. Higher concentrations of rare earth elements resulted in lower IL-2 production. Values are presented as mean  $\pm$  SD. \*\* $p < 0.01$  compared with ConA.

La<sup>3+</sup>をはじめ希土類元素は、ConAで誘導したJurkat細胞のIL-2産生を抑制することがタンパク質レベルで明らかとなったので、次にリアルタイムPCRにおいてIL-2 mRNAの発現レベルでこれを検討した。Fig. 6はLaCl<sub>3</sub>を用いてJurkat細胞のConA誘導性のIL-2 mRNA発現量をリアルタイムPCRにより測定し、同時にハウスキープ遺伝子であるグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) を用いて定量した結果である。ConA刺激のみのコントロールと比較して0.5 mmol/LのLaCl<sub>3</sub>添加でIL-2 mRNA発現は有意に低下し、この結果からLa<sup>3+</sup>はmRNAの発現レベルでIL-2産生を低下させる作用があることが明らかとなった。

Fig. 7に示すようにIL-2 mRNA発現に関する転写調

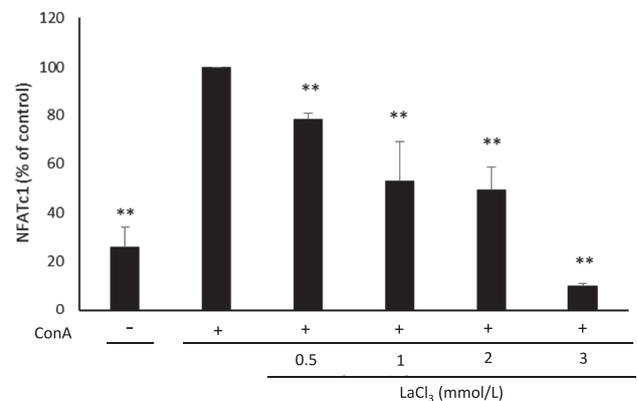


**Fig. 6** IL-2 mRNA levels of Jurkat cells stimulated with La<sup>3+</sup>. IL-2 mRNA levels fell with increased LaCl<sub>3</sub> concentrations. Values are presented as mean ± SD. \*\**p* < 0.01 compared with ConA.



**Fig. 7** Schema of T-cell receptor (TCR)-mediated IL-2 production in T-lymphocytes. The mitogen, ConA, is thought to stimulate IL-2 production via a TCR and subsequently activate the CN/NFATc1 pathway in T-lymphocytes. The immunosuppressive drug, FK506, has been shown to inhibit CN via the FK506-binding protein 12 (FKBP).

節因子 Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1 (NFATc1) はCNの基質となっており、NFATc1はリン酸化型から脱リン酸化型に変化をすることにより核内に移行することが知られている。従って、La<sup>3+</sup>によるIL-2 mRNA発現抑制の作用機序を検討するため、LaCl<sub>3</sub>による核内のNFATc1量の変化をELISA法で検討した。Fig. 8に示すように、ConA刺激を行うと、無刺激と比較して有意に核内のNFATc1量は増加した。一方、0.5 mmol/LのLaCl<sub>3</sub>からConA刺激と比較して核内のNFATc1量は有意に低下することが明らかとなった。従ってLaCl<sub>3</sub>のCNのホスファターゼ活性に対する阻害作用 (Fig. 1, Fig. 2) と、Jurkat細胞のIL-2産生に対する結果 (Fig. 5, Fig. 7, Fig. 8) から、La<sup>3+</sup>は細胞内においてCNを混合型非競合阻害により阻害することによりNFATc1の脱リン酸化を抑制し、転写活性を低下させIL-2 mRNA発現量とIL-2タンパク質産生を抑制することが考えられた。しかしながら、Laはカルシウム (Ca) と拮抗作用があることは以前から知られており、先行研究ではLaCl<sub>3</sub>は非選択的カルシウム拮抗剤<sup>21-24)</sup>としての機能を持つことが知られている。従って、LaCl<sub>3</sub>は細胞内のCa濃度を調節することによりCN活性に影響を与え、NFATc1の転写活性を抑制しIL-2 mRNA発現を抑制する可能性も考えられる。実際にLiu等はLaCl<sub>3</sub>がオキシステロールで誘導したECV-304細胞の細胞内Ca<sup>2+</sup>の上昇やERKおよび転写調節因子Nuclear factor kappa B (NFκB)のシグナル経路の活性化を抑制することを報告している<sup>25)</sup>。また、GuoらはRAW264.7細胞を用いてLaCl<sub>3</sub>がLPSで誘導したNOやTNF-αを抑制させること、またそのメカニズムとしてLaCl<sub>3</sub>がカルシウム拮抗剤として機能することによりPKCとNFκBのシグナル経路を抑制することを報告している<sup>26)</sup>。一方、LaCl<sub>3</sub>の新規な作用として、Chen等はLPS刺激したHUVEC細胞を用いてLaCl<sub>3</sub>が炎症性サイトカイン産生を抑制し、このメカニズムとしてLaCl<sub>3</sub>が核内のNFκBを低下させるだけではなく、



**Fig. 8** Effects of La<sup>3+</sup> on the activity of NFATc1 in Jurkat cells. NFATc1 levels decreased with increased LaCl<sub>3</sub> concentrations. Values are presented as mean ± SD. \*\**p* < 0.01 compared with ConA.

ヒストン脱メチル化酵素である Jmjd3 をタンパク質レベルで低下させることにより NFκB と DNA の結合を抑制させることを示している<sup>27)</sup>。また, Jiang 等は LaCl<sub>3</sub> が Rankl で誘導した破骨細胞の形成と機能を低下させることを明かしており, そのメカニズムとして LaCl<sub>3</sub> が NFATc1 と NFκB をタンパク質レベルでダウンレギュレーションすることを報告している<sup>28)</sup>。従って, LaCl<sub>3</sub> は様々な細胞の高次機能に対して多様なメカニズムにより作用を発揮するものと考えられる。本研究で我々は, LaCl<sub>3</sub> をはじめとして希土類元素の細胞性免疫に対する影響の基礎的検討を行い, La<sup>3+</sup> が CN のホスファターゼ活性を非混合型競合阻害により阻害することを明かとし, ヒト T 細胞株 Jurkat 細胞を用いて La<sup>3+</sup> をはじめ希土類元素が細胞性免疫を低下させる可能性があることを細胞レベルで示してきた。実際に La<sup>3+</sup> が細胞内で直接 CN に作用するかは今後の課題であると思われるが, さらに Jurkat 細胞の IL-2 産生に対する La<sup>3+</sup> や他の希土類元素の作用点の解析については詳細な検討が必要であると考えられる。特に Jurkat 細胞の IL-2 mRNA 発現は NFATc1, NFκB および Activator protein-1 (AP-1) の 3 つの転写調節因子によって制御されており<sup>29)</sup>, 今後は残り 2 つの転写活性の検討を中心に進めていきたいと考える。

#### 参考文献

- Molkentin JD (2004) Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc Res* 63: 467-475.
- Wu HY, Tomizawa K, Oda Y, Wei FY, Lu YF, Matsushita M, Li ST, Moriwaki A, Matsui H (2004) Critical role of calpain-mediated cleavage of calcineurin in excitotoxic neurodegeneration. *J Biol Chem* 279: 4929-4940.
- Gong CX, Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1994) Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau is dephosphorylated by protein phosphatase-2B (calcineurin). *J Neurochem* 62: 803-806.
- Garver TD, Kincaid RL, Conn RA, Billingsley ML (1999) Reduction of calcineurin activity in brain by antisense oligo-nucleotides leads to persistent phosphorylation of tau protein Thr181 and Thr231. *Mol Pharmacol* 55: 632-641.
- Crabtree GR (1999) Generic signals and specific outcomes : signaling through Ca<sup>2+</sup>, calcineurin, and NF-AT. *Cell* 96: 611-614.
- Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL (1991) Calcineurin is a common target of cyclosporine A and FKBP-PK506 complexes. *Cell* 66: 807-815.
- Li HC, Chan WW (1984) Activation of brain calcineurin towards proteins containing Thr(P) and Ser(P) by Ca<sup>2+</sup>, calmodulin, Mg<sup>2+</sup> and transition metal ions. *Eur J Biochem* 144: 447-452.
- Pallen CJ, Wang JH (1984) Regulation of calcineurin by metal ions. *J Biol Chem* 259: 6134-6141.
- Pallen CJ, Wang JH (1986) Stoichiometry and dynamic interactions of metal ion activators with calcineurin phosphatase. *J Biol Chem* 261: 16115-16120.
- Tong L, Song Y, Jia Z, Zhang W, Wei Q (2007) Calmodulin-dependent activation of calcineurin by chlorogenic acid. *IUBMB Life* 59: 402-407.
- Spannaus-Martin DJ, Martin BL (2000) In vitro effect of retinoids on calcineurin activity. *Biochem Pharmacol* 60: 803-808.
- Carruthers NJ, Dowd MK, Stemmer PM (2007) Gossypol inhibits calcineurin phosphatase activity at multiple sites. *Eur J Pharmacol* 555: 106-114.
- Takahashi K, Akaishi E, Abe Y, Ishikawa R, Tanaka S, Hosaka K, Kubohara Y (2003) Zinc inhibits calcineurin activity in vitro by competing with nickel. *Biochem Biophys Res Commun* 307: 64-68.
- 田中佑季, 大塚恵美子, 保坂公平, 田中 進 (2009) マンガンはニッケル刺激したカルシニューリン活性を不競合的に阻害する. *微量栄養素研究* 26 : 70-73.
- 田中 進, 大塚恵美子, 高橋克典, 増田泰紀, 本間千裕, 宮澤紀子, 保坂公平 (2008) ニッケル刺激したカルシニューリン活性に対するバナジウムの効果. *医学と生物学* 152 : 88-93.
- 田中佑季, 大塚恵美子, 保坂公平, 田中 進 (2008) ニッケル刺激したカルシニューリン活性におけるバナジウム阻害のキネティック解析. *微量栄養素研究* 25 : 122-124.
- Palasz A, Czekaj P (2000) Toxicological and cytophysiological aspects of lanthanides action. *Acta Biochemica Polonica* 47: 1107-1114.
- Shigematsu T, Sakai T, Kono T, Kimura Y, Takuma Y, Tsuruta Y, Mori Y, Taki M, Moriishi M, Minakuchi J, Obayashi S, Miyake S, Emoto H, Furuhashi M, Tsujimoto Y, Arisaka H, Ishizaki M, Shimoyama H, Kim S, Hirose S, Kurosawa A, Matsui N, Nakazawa R, Watanabe T, Kabaya T, Tanaka Y, Takahashi T, Ozawa T, Nakamura K, Nishioka M, Higashi H, Koga N (2008) Multicenter prospective randomized, double-blind comparative study between lanthanum carbonate and calcium carbonate as phosphate binders in Japanese hemodialysis patients with hyperphosphatemia. *Clin Nephrol* 70: 404-410.

- 19) Jakupec MA, Unfried P, Keppler BK (2005) Pharmacological properties of cerium compounds. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 153: 101-111.
- 20) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- 21) Flaim SF, Brannan MD, Swigart SC, Gleason MM, Muschek LD (1985) Neuroleptic drugs attenuate calcium influx and tension development in rabbit thoracic aorta: effects of pimozide, penfluridol, chlorpromazine, haloperidol. *Proc Natl Acad Sci* 82: 1237-1241.
- 22) Nemeth EF, Scarpa A (1987) Rapid mobilization of cellular  $Ca^{2+}$  in bovine parathyroid cells evoked by extracellular divalent cations. Evidence for a cell surface calcium receptor. *J Biol Chem* 262: 5188-5196.
- 23) Block BM, Stacey WC, Jones SW (1998) Surface charge and lanthanum block of calcium current in bullfrog sympathetic neurons. *Biophys J* 74: 2278-2284.
- 24) Fitzpatrick LA (1990) Differences in the actions of calcium versus lanthanum to influence parathyroid hormone release. *Endocrinology* 127: 711-715.
- 25) Liu H, Zhang C, Huang K (2011) Lanthanum chloride suppresses oxysterol-induced ECV-304 cell apoptosis via inhibition of intracellular  $Ca^{2+}$  concentration elevation, oxidative stress, and activation of ERK and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *J Biol Inorg Chem* 16: 671-681.
- 26) Guo F, Lou Y, Feng N, Li G, Xie A, Huang X, Wang Y (2010) Exposure to lanthanum compound diminishes LPS-induced inflammation-associated gene expression: involvements of PKC and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Biometals* 23: 669-680.
- 27) Chen X, Xiu M, Xing J, Yu S, Min D, Guo F (2017) Lanthanum chloride inhibits LPS mediated expressions of pro-inflammatory cytokines and adhesion molecules in HUVECs: Involvement of NF- $\kappa$ B-Jmjd3 signaling. *Cell Physiol Biochem* 42: 1713-1724.
- 28) Jiang C, Shang J, Li Z, Qin A, Ouyang Z, QU Z, Li H, Tian B, Wang W, Wu C, Wang J, Dai M (2015) Lanthanum chloride attenuates osteoclast formation and function via the downregulation of Rankl-Induced Nf-kb and Nfatc1 Activities. *J Cell Pys* 231: 142-151.
- 29) Tanaka S, Masuda Y, Honma C, Hosaka K, Takahashi K, Kubohara Y (2012) Manganese promotes phorbol ester-induced interleukin-2 production via AP-1 activation in Jurkat T-cells. *Toxicol Lett* 211: 312-318.