

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 池田 詩子

学位論文題名

1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ and all-trans retinoic acid synergistically inhibit the differentiation and expansion of Th17 cells

(活性型ビタミンD₃とオールトランスレチノイン酸は
Th17細胞の分化増殖を相乗的に抑制する)

【背景と目的】CD4⁺T 細胞は生体内の免疫機能を司る中枢的な細胞群であり、細胞性免疫に関与する 1 型ヘルパーT (Th1) 細胞と、液性免疫に関与する 2 型ヘルパーT (Th2) 細胞があることが知られていた。近年、CD25 陽性 Foxp3 陽性 CD4⁺T 細胞が自己免疫疾患を抑制する制御性 T 細胞 (Treg) として報告され、また IL-17 を産生するヘルパーT (Th17) 細胞がアレルギー応答や自己免疫などで中心的な役割を果たしていると認識されるようになり、これまで Th1 細胞による自己免疫疾患と考えられてきた疾患でも Th17 細胞の関与が重要視されている。最近の研究で IL-17 は CD8⁺T (Tc17) 細胞からも産生され、自己免疫などへの関与が指摘されている。

活性型ビタミン D₃ (1,25D3) は、骨のリモデリングやカルシウムの吸収で知られるビタミンであるが、免疫担当細胞に作用して様々な免疫調節を行っており、当教室でも Th1 細胞を抑制し Th2 細胞への分化を促進することを報告してきた。最近 Th17 細胞分化を抑制する効果も報告されその臨床応用が期待される一方で、1,25D3 は副作用として高カルシウム血症を引き起こしうるため、免疫病治療としての全身投与はあまり行なわれてこなかった。この副作用を克服するため、本研究では、①高カルシウム血症を起こしにくいビタミン D 誘導体による Th17 細胞分化抑制効果、②1,25D3 とビタミン A の誘導体であるオールトランスレチノイン酸 (ATRA) との併用による分化抑制効果を検討した。また、これらの薬剤による Tc17 細胞に対する効果も検討した。

【材料と方法】OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウス DO11.10 及び OT-II 由来のナイーブ CD4⁺細胞、OT- I マウス由来のナイーブ CD8⁺T 細胞を sorting し、OVA ペプチドと各種サイトカインを加えて培養し、これらに各種ビタミン D₃ と ATRA を添加し day 5-6 に細胞内染色を行ないその効果を検討した。また接触性過敏症のモデルでは、C57BL/6 マウス (野生型) に day -2 から暴露まで 1,25D3 と ATRA を連日投与し、DNFB を day 0, 1 に感作させ、day 5 に耳に暴露し、24 時間後に耳の厚みを計測、また所属リンパ節の細胞内染色を行い IL-17 産生細胞の数を評価した。またヒトの細胞に対する効果の評価には、健康人由来の抹消血から CD45RA⁺ (ナイーブ)、CD45RO⁺ (メモリー) CD4⁺T 細胞、CCR6⁺CD8⁺T 細胞を sorting し、Th17 条件下で培養し、1,25D3 と ATRA を添加してこれらの効果を検討した。また、ヒトの Th17 条件下で培養した細胞 (day 6) から mRNA を抽出し、1,25D3 と ATRA による Th17 関連因子の mRNA の発現変化を検討した。

【結果】DO11.10 マウス由来のナイーブ CD4⁺T 細胞を用いた実験で 1,25D3 はこれまでの報告どおりは Th1/Th2 のバランスを Th2 へシフトさせた。また、1,25D3 は、Th17 条件で、DO11.10、OT-II マウス由来のナイーブ CD4⁺T 細胞からの Th17 への分化を抑制し、この効果は用量依存的であった。活性型ではないビタミン D₃ およびビタミン D₂ は、高濃度の場合のみ Th17 細胞への分化抑制が見られた。高カルシウム血症を起こしにくいビタミン D の誘導体である 22-oxacalcitriol は 1,25D3 とほぼ同程度の Th17 細胞分化抑制効果が認められた。

次に、すでに Th17 分化抑制効果が知られている ATRA と 1,25D3 の効果を比較した。すると、1,25D3 は ATRA より Th17 分化抑制効果が強かった。また、両者を同時に投与すると、Th17 細胞の分化は強く抑制され、アイソボログラムで両者の抑制効果は相乗的であることが確認された。

IL-17KO マウスで病態が改善することが報告されているマウスの接触性過敏症モデルで、野生型のマウスに 1,25D3 と ATRA を投与すると、耳の腫脹が改善し、所属リンパ節での IL-17 産生 CD4⁺T 細胞および CD8⁺T 細胞が減少した。また、両薬剤を同時に投与するとその効果はさらに増強した。

ヒトの細胞に関しても、1,25D3 はナイーブ及びメモリー CD4⁺T 細胞で、Th17 細胞の分化・増殖を用量依存的に抑制し、ATRA との併用でさらに抑制されることが確認された。

1,25D3 と ATRA の Th17 誘導抑制の作用機序を解明するために、mRNA 発現の変化を検討した。1,25D3 及び ATRA は IL-1R1、IL-21R、IL-23R、RORC、AHR の発現を抑制した。ATRA は IL-6R を抑制したが 1,25D3 は抑制しなかった。

最後に、1,25D3 が OT-I マウス由来のナイーブ CD8⁺T 細胞からの Tc17 細胞の分化を抑制し、ヒトの CCR6⁺CD8⁺T 細胞からの Tc17 細胞の増殖も抑制することを明らかにした。

【考察】本研究では、1,25D3 が Th1 細胞のみならず Th17 細胞に対しても分化増殖を抑制する作用を持ち、この作用は高カルシウム血症を起こしにくいビタミン D の誘導体でも同程度見られることが明らかにした。また、ATRA と 1,25D3 の併用は Th17 細胞分化を相乗的に抑制することも見出した。さらに、これらの薬剤は Tc17 細胞に対しても抑制的であることを確認した。Th17 細胞及び Tc17 細胞は多発性硬化症や乾癬といった免疫病に関与しており、Th17 細胞や Tc17 細胞を制御することは IL-17 が関与する病態の改善に有効であると考えられる。しかし、これまで IL-17 産生を抑制する効果が報告されてきた ATRA や 1,25D3 は、脂溶性ビタミンで蓄積性があり、高用量の持続的投与は中毒症のリスクを伴い、免疫病などへの全身投与は困難であった。この研究では、両者の併用は Th17 細胞の分化・増殖抑制に相乗効果を持ち、それぞれの薬剤の投与量を減らしうる可能性を示した。ビタミン A やビタミン D の基礎状態およびその危険性は症例によって異なり、特にビタミン A は催奇形性から妊娠可能な女性には慎重に投与すべきであり、併用よりも高カルシウム血症をきたしにくいビタミン D 誘導体を選択が望まれる場合もある。症例の状態に合わせた薬剤の選択が重要である。また、先進国ではビタミン D 欠乏が問題となっており、ビタミン D 欠乏と多発性硬化症などの免疫病との因果関係も指摘されている。ビタミン D が Th17 細胞の分化増殖を抑制することは、これら疾患を予防する目的でのビタミン D 服用の意義も裏付けるものと考えられる。

【結語】1,25D3 は Th17 細胞が起因する病態の治療に有効であると考えられるが、高カルシウム血症という重篤な副作用のため高用量の使用が困難であった。本研究は、この副作用の克服に、①高カルシウム血症を起こしにくいビタミン D 誘導体を用いること、②Th17 細胞の分化増殖抑制に相乗効果が認められた ATRA との併用することが有効であることを提示し、1,25D3 の臨床応用への可能性を広げた。