

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)

学位論文内容の要旨

【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考えられるようになり、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、健康人由来の末梢血から 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。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 西 村 孝 司
副 査 教 授 笠 原 正 典
副 査 教 授 清 野 研 一 郎
副 査 教 授 本 間 さ と

学 位 論 文 題 名

$1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D_3 and all-trans retinoic acid synergistically inhibit the differentiation and expansion of Th17 cells

(活性型ビタミン D_3 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)

活性型ビタミン D_3 ($1,25D_3$) は様々な免疫調整作用を持ち、Th1/Th2 バランスを Th2 へシフトさせることが明らかにされている。近年、IL-17 を産生する CD4T (Th17) 細胞が細菌感染などで重要な役割を果たしているサブセットであると認識され、従来 Th1 細胞が原因とされてきた自己免疫疾患にも Th17 細胞が深く関与していることが明らかとなってきた。本研究では、 $1,25D_3$ 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) の Th1 および Th17 細胞分化への抑制作用を検討した。その結果、 $1,25D_3$ におけるそれらへの抑制効果を確認した。 $1,25D_3$ は高用量で長期間投与すると高カルシウム血症をひきおこすため、そ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、高カルシウム血症を起こしにくいビタミン D 誘導体 (22-oxacalcitriol) についても検討し、 $1,25D_3$ と同程度の Th17 細胞への分化抑制効果があることを明らかにした。また、 $1,25D_3$ と ATRA との併用で Th17 細胞への分化を相乗的に抑制することも見出した。さらに、これらの薬剤はマウスのみならずヒトの Th17 細胞の分化・増殖にも抑制効果があることを示し、IL-17 を産生する CD8T (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などの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 関連疾患の治療に有効であると考えられる。しかし、ATRA や $1,25D_3$ は蓄積性があり、それらの全身投与は困難であった。本研究で、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得ることを示し、臨床応用への可能性を広げることができた。

審査では、さまざまな質問が審査員からなされた。副査本間さと教授からこの実験で用いた $1,25D_3$ と ATRA の濃度が生理学的な濃度であるかという質問があり、発表者はヒトの実験で用いた量の ATRA $1\mu M$ は急性前骨髄性白血病でベサノイドが投与された時の血

中濃度のピーク時とほぼ同じ量であるが、1,25D3 は実験では 10nM を使用しており、実際のヒトの血中濃度は 1,25D3 の薬物投与時でも 250pM 程度と低いため、臨床応用する上では 1,25D3 単独では効果が期待しにくいと回答した。また、1,25D3 も ATRA も RXR という核内受容体を共有しているが、2 剤の併用はこの受容体を取り合うことで競合する可能性がないかとの質問もあった。これに対し、発表者は、カルシウム代謝では、vitamin A 過剰で骨粗鬆症が起きる理由として RXR を共有することで vitamin D の作用と競合するためではないかと考察する報告があるものの、今回示した免疫調整作用は相乗効果を示しており、細胞によって異なる可能性があるかと回答した。次いで、副査笠原正典教授からは、両薬剤ともに Th17 細胞の増殖より分化に高い効果が認められた理由についての質問があり、発表者は両薬剤の作用として増殖に必要なシグナルよりは分化に必須のシグナルをサイトカイン受容体の発現量を低下させるなどでより強く抑えているためではないかと回答した。また、副査清野研一郎教授からは、1,25D3 も ATRA も樹状細胞への効果が知られているが、樹状細胞への作用を検討したかどうかという質問があり、発表者は共同研究者が以前 1,25D3 の Th1 抑制効果に関して樹状細胞への影響を調べており、Th17 に関しても T 細胞直接の作用と樹状細胞を介しての作用の両方が考えられると回答した。また、両薬剤ともに免疫抑制に働いているが、感染防御などで問題とならないかとの質問もあった。これに対し発表者は、Th1 や Th17 細胞に限ってみれば抑制的であるが、vitamin D はインフルエンザの予防効果も報告されており、その理由としては気道粘膜での β ディフェンシンの発現上昇によるとされていて、生体全体では両薬剤による感染防御などへの抑制効果はないと言われていることを説明した。さらに、副査西村孝司教授からは自己免疫疾患の予防の面で、特に女性は vitamin D を摂取すべきではないかと考えるがそういった報告があるかという質問があり、発表者は欧米を中心に多発性硬化症などの治療や予防といった観点で臨床試験がすでに行われており、vitamin D は治療的効果があると報告されてきていることを回答した。最後に主査今村雅寛教授からは、合成レチノイド (Am80) が APL の治療で ATRA の副作用を減らしたものとして使用されているがその効果に対する質問があり、発表者は今回は Am80 の検討をしていないが、ATRA と同様の免疫調整作用があることがすでに報告されており、ATRA の代わりに Am80 の投与も有効であると考えられると回答した。

この論文は、1,25D3 が Th1 や Th17 細胞などへの免疫調整能力を発揮する上で問題となる高カルシウム血症を ATRA との併用による相乗効果で克服し得ることを示した点で高く評価され、今後の IL-17 関連疾患の治療への応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。