

コンカナバリン A 誘導性急性肝炎マウスにおける
VDR の肝免疫調節作用（要約）

日本大学大学院医学研究科博士課程
病理系病態代謝学専攻

梅田 直

修了年 2018 年

指導教員 榎島 誠

1. 概 要

ビタミン D 受容体 (vitamin D receptor, VDR) は、活性型ビタミン D₃ の受容体として骨・カルシウム代謝、細胞の増殖・分化、心血管機能、毛周期など多岐にわたる作用を有している。肝臓における VDR の機能については、VDR の発現量が低いことから十分な解析がなされていなかった。本研究では肝臓免疫細胞における VDR の機能を解明するため、野生型または VDR 欠損マウスを用いてコンカナバリン A 誘導性肝炎の病態を比較した。その結果、野生型と比較して VDR 欠損における肝障害は軽微であること、サイトカイン発現は変化を認めないこと、一方、肝常在 Kupffer 細胞による活性酸素種産生能が低下することが明らかとなった。本研究により、Kupffer 細胞における VDR の役割が明らかとなり、治療法の開発への応用が期待できる。

2. 緒 言

2-1. VDR の機能

VDR は活性化ビタミン D₃ (1,25(OH)₂D₃) の受容体として単離された核内受容体である[1]。核内受容体は DNA 結合ドメインとリガンド結合ドメインを有する転写因子であり、ヒトでは 48 種類存在することが確認されている。VDR の生体内リガンドは 1,25(OH)₂D₃ であるが、二次胆汁酸であるリトコール酸もリガンドとして作用することが明らかとなった。VDR リガンドは細胞膜を通過し VDR のリガンド結合ドメインに結合する。VDR はコンホメーションを変化させ核内へと移行し、同じく核内受容体であるレチノイド X 受容体とヘテロ二量体を形成する。転写共役因子群との転写複合体を形成後、標的遺伝子の

DNA 上の規則的な応答配列に結合し標的遺伝子群の発現を制御する[2]。

ビタミン D の最も重要な生理作用は骨・カルシウム代謝調節である。日照不足などによるビタミン D 欠乏は小児ではくる病を、成人では骨軟化症を惹起する。VDR 欠損 (VDR-KO) マウスにおいて、低カルシウム血症、骨形成障害、成長障害、脱毛などが観察された[3]。これらの表現型はヒト遺伝性くる病の症状と類似しており、VDR によるカルシウム代謝調節の重要性を示している。VDR はそれ以外に細胞増殖・分化、心血管作用、毛周期の調節、抗菌、抗炎症作用など多岐にわたる機能を有しており、骨粗鬆症、悪性腫瘍、動脈硬化、乾癬、自己免疫疾患など様々な疾患の治療における有望な分子標的とされている。

2-2. 肝臓における免疫細胞の機能

肝臓は栄養成分や薬物などの代謝臓器として機能するが、同時に主要な免疫臓器でもある。肝臓を構成する細胞は約 6-7 割は肝実質細胞であるが、残りの約 3 割は非実質細胞である。非実質細胞には肝特異的マクロファージである Kupffer 細胞やナチュラルキラー (natural killer, NK) 細胞、NKT 細胞、T 細胞、B 細胞などのリンパ球や間葉系星細胞、類洞内皮細胞などが含まれる。これらの細胞群は、肝細胞と協調しながら外来異物に対する生体防御、炎症、抗腫瘍活性などを担う監視役 (ゲートキーパー) として機能している。近年、肝臓には 2 種類の Kupffer 細胞が存在し、それぞれ卵黄嚢または胎生期肝臓にて産生される肝常在 Kupffer 細胞と骨髄由来マクロファージ (bone marrow derived macrophages, BMDM) であること、前者は食食能や活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) 産生に特化するのに対し、後者は高い炎症性サイトカイン産生能を有することが明らかとなった[4]。

ビタミン D と肝疾患については、ビタミン D 欠乏が C 型肝炎に対するインターフェロン療法の感受性低下に関与すること、非アルコール性脂肪性肝疾患の病態を増悪させることなど多数の疫学的な報告がある[5]。これらの作用は VDR を介していると考えられるが、肝細胞における発現が非

常に低いことから、肝臓 VDR の機能はまだ十分に解明されていない。近年、VDR の発現は肝常在 Kupffer 細胞などの非実質細胞において認めること、マウスにおける胆管結紮による胆汁鬱滞の病態においてビタミン D 投与が炎症性サイトカイン産生を抑制すること、間葉系星細胞の VDR が肝線維化を抑制することなどが報告されたが、肝自然免疫における VDR の機能解析は不十分である。そこで本研究では、野生型 (wild-type, WT) および VDR-KO マウスにおける急性肝炎の病態の比較を行い肝臓免疫細胞の機能を解析した。

3. 実験方法

3-1. マウス

WT (C57BL/6J) マウスは日本クレアより購入した。VDR-KO マウスは加藤茂明博士の承諾を得て中外製薬株式会社より供与を受けた。実験には 8-12 週齢の雄マウスを用いた。

3-2. 肝単核球における VDR の発現機能、および細胞分布解析

肝臓免疫細胞を含む単核球 (mononuclear cells, MNC) はコラゲナーゼ処理及び Percoll 密度勾配遠心分離法を用いて単離した。1,25(OH)₂D₃ は 10 nmol/kg 体重で腹腔内投与した。リアルタイム PCR 法を用いて肝 MNC における遺伝子発現解析を行った。

免疫細胞組成を評価するため、肝 MNC を単離し、肝常在 Kupffer 細胞、BMDM、NK 細胞、NKT 細胞および B 細胞の分布についてフローサイトメトリーを用いて測定した。

3-3. コンカナバリン A (concanavalin A, Con-A) 誘導性肝障害の比較

Con-A は 12.5 mg/kg 体重で尾静脈投与した。投与後 72 時間までに経時採血を行い血中トランスアミナーゼ値の測定および ELISA 法によるサイトカイン濃度の測定を行った。投与 6 時間の検体を用いてリアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析を行った。さらに、投与 24 時間後の検体を用いて肝組織の観察および ROS 産生能を評価した。

4. 実験結果

4-1. 肝単核球における VDR の発現と機能

肝 MNC における VDR の発現を検討した。WT または VDR-KO マウスの肝臓より肝 MNC を単離し、総肝臓または肝 MNC における *Vdr* の mRNA 量を定量したところ、肝 MNC における発現は総肝臓と比較して約 36 倍高いことが示された。次に、WT マウスに $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を投与し肝 MNC における VDR 標的遺伝子 *Cyp24a1* 発現を解析したところ、有意な増加を認めた。VDR-KO では誘導されないことから VDR 依存的であることが示された。

以上の結果より、肝 MNC において VDR は発現し、転写因子としての機能を保持することが示された。

4-2. VDR-KO マウスの肝臓表現型

WT または VDR-KO マウスを比較し、VDR-KO は加齢とともに脱毛し体重が減少することを確認した。肝重量は差を認めず、肝組織も正常であった。総肝 MNC の細胞数の比較したところ、VDR-KO マウスにおいて増加が認められたため、フローサイトメトリーを用いて肝 MNC に含まれる免疫細胞 (肝常在 Kupffer 細胞、BMDM、NK 細胞、NKT 細胞および B 細胞) の分布を評価した。その結果、全ての細胞群で同程度の分布を認め、差を認めなかった。肝組織は正常であったことから、肝 MNC の分布は WT と同様に正常であると判断した。

4-3. Con-A 誘導性肝障害の比較

WT または VDR-KO マウスに Con-A を投与後、経時採血を行い、血中トランスアミナーゼ値を測定したところ、WT において投与後から一過性に顕著な増加を認め、12 時間後に最大となり、その後減少した。一方、VDR-KO マウスにおいても増加を認めたが、その増加は WT と比較し軽微であった。肝組織を比較した結果、WT の肝臓において多数の肝細胞死が観察されたが、VDR-KO マウスにおいては減少した。

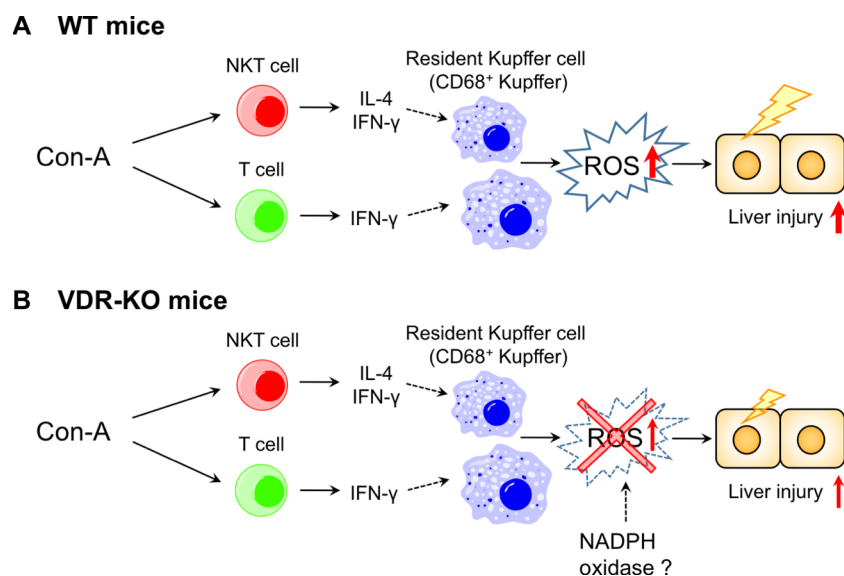


図1 WT (A) および VDR-KO (B) マウスにおける Con-A 肝炎の比較

VDR-KO における肝障害軽減の原因を明らかにするため、血中サイトカイン濃度を測定した。その結果、両マウスにおいて interleukin-4 (IL-4)、interferon- γ (IFN- γ) とともに増加の程度に変化を認めなかった。次に、投与後の肝 MNC における遺伝子発現を評価した。VDR-KO マウスにおいて肝障害は軽減したにも関わらず、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、IFN- γ および inducible nitric oxide synthase (iNOS) の発現はむしろ増加した。以上の結果から、VDR-KO マウスにおいてもサイトカイン産生能は有することが示された。

最後に ROS 産生能を評価したところ、VDR-KO マウスの血中または肝臓において Con-A 誘導性 ROS 量が有意に減少した。

5. 結 語

本研究において、VDR は免疫細胞を含む肝 MNC において発現、機能すること、VDR-KO マウスにおいて無刺激の状態では肝組織は正常であること、Con-A 肝炎の解析により肝障害が軽減していること、サイトカイン産生は刺激される一方で ROS 産生が減少することを見出した (図 1)。Con-A 肝炎の発症には、少なくとも NKT 細胞の活性化、IFN- γ などのサイトカイン産生および肝常在 Kupffer 細胞による ROS 産生が必要である。VDR-KO において肝常在 Kupffer 細胞の機能低下が起こり、十分な ROS 産生ができないことが示唆された。本研究により肝臓免疫細胞における VDR の標的は肝常在 Kupffer 細胞であり、VDR の肝臓

でゲートキーパーとして作用する新規機能が見出された。

今後は非アルコール性肝炎などの肝疾患における VDR の関与の検討及び VDR 調節薬の治療への応用が期待される。

引用文献

1. McDonnell DP et al., (1987) *Science*. 235(4793):1214-1217.
2. Makishima M. (2005) *J Pharmacol Sci*. 97(2):177-183.
3. Yoshizawa T et al., (1997) *Nat Genet*. 16(4):391-396.
4. Kinoshita M et al., (2010) *J Hepatol*. 53(5):903-910.
5. Kitson MT, Roberts SK. (2012) *J Hepatol*. 57(4):897-909.