

令和元年6月17日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09231

研究課題名(和文) 肺の炎症や老化肺に対するビタミンDの抗炎症・組織保護効果の解明

研究課題名(英文) The anti-inflammatory effects of vitamin D in lung tissues

研究代表者

石井 正紀 (Ishii, Masaki)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20724438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：慢性閉塞性肺疾患(COPD)は、加齢に伴い進行し高齢者で多発する老年呼吸疾患である。肺の老化とも関連するCOPDでは、ビタミンD血中濃度低下が、肺機能低下や重症度と相関することが分かっている。しかし、ビタミンDの補充がCOPDの進行を抑制するかは明らかになっておらず、今回、われわれは、肺特異的ビタミンD受容体過剰発現トランスジェニックマウスを作製し、ビタミンD受容体は、肺組織局所において、抗炎症効果の観点から、COPD増悪の抑制に寄与する可能性が示唆された。また喫煙は、肺胞上皮細胞におけるビタミンD受容体発現に対する負の制御因子としてその発現量の低下を誘導する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本には、500万人以上の慢性閉塞性肺疾患(COPD)の患者がいると推定され、超高齢社会を迎えた現状で、今後とも増え続けると予測されているが、その多くは未診断の状態、十分な治療が受けられていないのが現状である。これまで、多くの気管支拡張薬の効果が大規模な臨床試験で実証されているが、いまだCOPDの進行とその慢性炎症を根本的に治癒させる方策はない。本研究では、ビタミンD受容体に焦点をあて、ビタミンD受容体過剰発現マウス作成により、ビタミンDによる肺組織の抗炎症効果を実証できた初めての成果であり、高齢者COPD患者におけるビタミンDの有益性が示唆されると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Vitamin D insufficiency is increasingly recognized as a prevalent problem worldwide, especially in patients with COPD. Previous studies have shown that COPD leads to low vitamin D levels, which further increase the severity of COPD. Vitamin D homeostasis represents one of the most important factors that potentially determine the severity of COPD. Nonetheless, the mechanisms underlying the anti-inflammatory effects of vitamin D receptor (VDR) in lung tissues are still unclear. To investigate the anti-inflammatory effects of VDR, we generated transgenic mice that show lung-specific VDR overexpression (TG mice). The TG mice were used to study the expression patterns of proinflammatory cytokines using real-time polymerase chain reaction and immunohistochemistry. The TG mice had lower levels of T helper 1-related cytokines than wild-type mice did. VDR expression is an important factor that influences anti-inflammatory responses in lung tissues and is down-regulated by cigarette smoke.

研究分野：老年医学、呼吸器内科学

キーワード：ビタミンD COPD 炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 日本には、500 万人以上の慢性閉塞性肺疾患 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease: COPD) の患者がいると推定され、超高齢社会を迎えた現状で、今後も増え続けると予測されているが、その多くは、未診断の状態、十分な治療が受けられていないのが現状であり、世界的に、COPD に対する取り組みが急務となっている。多くの気管支拡張薬の効果が大規模な臨床試験で実証されているが、いまだ COPD の進行とその慢性炎症を根本的に治癒させる方策はない。

(2) COPD は、加齢に伴う疾患であると同時に、全身性炎症や低栄養などの多因子に関連したサルコペニアとも関連している。サルコペニアは加齢に伴って筋肉が減少する病態であり、筋肉量の低下とともに握力や歩行速度の低下など機能的な側面を含む概念である。ビタミン D は骨代謝に関わる液性因子の 1 つであるが、近年、ビタミン D 濃度の低下と筋肉量減少との関連 (Visser M. et al: J Clin Endocrinol Metab 88: 5766 - 5772, 2003) や、運動機能低下との関連 (Suzuki T. et al: J Bone Miner Res 23: 1309 - 1317, 2008) が近年報告されている。さらに、ビタミン D 血中濃度低下は、COPD 患者における肺機能低下や重症度と有意な相関を示す (Janssens W. et al. Thorax. 65: 215-20, 2010) ことが分かっていることから、ビタミン D の摂取低下は、高齢 COPD 患者におけるサルコペニアに伴う呼吸筋力の低下や炎症を増悪させる可能性も考えられる。また、ビタミン D は様々な免疫調整作用を持ち、特に、Th1 サイトカインを減少させ、Th2 サイトカインを GATA-3 などの転写因子を介して、増加させることが分かっている (Mahon BD. et al. J Cell Biochem. 89: 922-32, 2003)。COPD における肺気腫形成のメカニズムの一部としては、Th1 サイトカインを中心とした炎症増悪や Matrix metalloproteinases (MMPs) の亢進に伴う組織構造破壊が関与しているといわれているが、ビタミン D は、このような肺組織における炎症や組織破壊に対し、抗炎症効果や肺組織保護効果を持つのではないかと示唆されている。しかし、ヒトにおいて、ビタミン D の補充が COPD の進行を抑制するかどうかは、いまだ明らかでない。そのため、私は、動物モデルを用いて、個体レベルで、ビタミン D シグナルの増強が、肺気腫に関わる炎症や組織破壊に対して、抑制的に働くことを検証したいと考えている。これまで、動物モデルでビタミン D と炎症との関連をみたものにビタミン D 受容体 (Vitamin D Receptor: VDR) ノックアウトマウスの報告がある (Sundar IK. et al. Biochem Biophys Res Commun. 406: 127-33, 2011)。本報告でも、ビタミン D による MMPs 抑制効果が認められているが、全身のビタミン D 受容体の欠損下では、Ca 代謝やそれに関わる多くのホルモンが変動していると予想され、その表現型がビタミン D とビタミン D 受容体を介した直接の作用であるかは明確でない。いうまでもなくビタミン D 受容体は腎に大量に発現しているが、肺組織においても、ビタミン D 受容体が存在している (Gensure RC. et al. J Bone Miner Res. 13: 454-63, 1998)。しかし、肺組織におけるビタミン D 受容体の機能については不明な点も多く、肺のビタミン D 受容体における MMPs 抑制や炎症性サイトカイン抑制効果に関する知見はこれまで報告されていない。

## 2. 研究の目的

肺組織におけるビタミン D 受容体の機能については不明な点も多く、肺組織におけるビタミン D 受容体における MMPs 抑制や炎症性サイトカイン抑制効果に関する知見はこれまで報告されていない。肺におけるビタミン D 受容体の発現量の差異が、肺の慢性炎症に影響することが明らかになれば、今後、肺のビタミン D 受容体の増減に関わる有害因子の発見や薬物の開発につながりうる。そこで、申請者は、SP-C プロモーター下にビタミン D 受容体 (VDR) を発現させ、肺特異的にビタミン D 受容体を過剰発現するマウスをすでに作製し、肺組織におけるビタミン D 受容体による抗炎症効果を検証した。さらに、本研究により、喫煙刺激が *in vivo* において、肺のビタミン D 受容体の発現にどのように影響するか明らかにすることができると考えた。

## 3. 研究の方法

(1) SP-C プロモーター下にビタミン D 受容体を過剰発現させ、肺特異的ビタミン D 受容体過剰発現トランスジェニックマウスを作製した。

(2) 野生型同腹仔マウスと比較して、Th1 サイトカイン系 (MIP-1、IP-10、MCP-1、MIP-2 など) や Th2 サイトカイン系 (IL-4、IL-5、IL-13 など) の動態や MMPs (MMP-1、MMP-2、TIMP-1 など) の発現が、mRNA やタンパクレベルで抑制できているのか検証した。

(3) ラット 型肺胞上皮細胞を用いて、タバコ煙水抽出液 (CSE: cigarette smoke extra) を負荷し、VDR の発現量に関して、RT-PCR を施行した。なお、CSE は PBS を市販タバコ及び 50ml シリンジを用いて bubbling し、その後 0.22  $\mu$ m pore filter にてフィルタをかけ、末梢気道に到達し得ないと考えられる粗大粒子を除外、この液体を 100% CSE と定義した。

さらに、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 (A549) を用いて、VDR siRNA による VDR 遺伝子の抑制を行い、MIP-1、IP10、MMP12 の発現量について RT-PCR を施行し、細胞死についても評価した。

## 4. 研究成果

肺特異的 VDR 過剰発現トランスジェニック (TG) マウスにおける肺組織では、野生型 (WT) マウスと比較し、RT-PCR、免疫組織染色にて、MIP-1、IP10、MCP-1、MIP-2 などの Th1 サイトカイン抑制が有意に認められた一方、IL-4、IL-10、IL-13 などの Th2 サイトカインには有意な

差は認められなかった。TG マウスにおける肺組織では、RT-PCR や免疫組織染色にて、WT マウスと比較し、MMP1 や MMP12 などの proteinase の低下が認められた (図 1、図 2)。さらに、肺胞上皮細胞では、濃度依存的に CSE 負荷により VDR の発現量の低下が認められた。また、VDR 遺伝子の抑制により、MIP-1、IP10、MMP12 などの炎症性サイトカインおよび proteinase が増加した。また、VDR 遺伝子抑制により、細胞死の増加傾向が認められた。VDR を介したビタミン D シグナリングは、肺組織局所において、抗炎症効果の観点から高齢者 COPD の肺機能改善に寄与する可能性が期待されると考えられた。

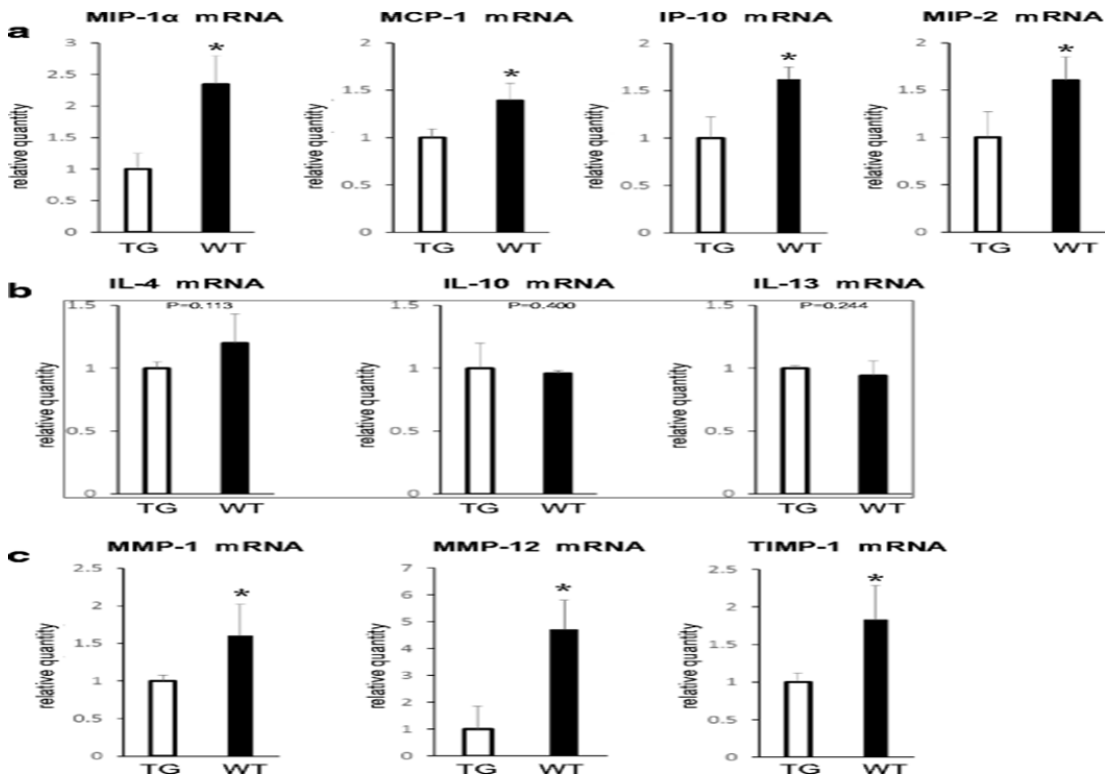


図 1

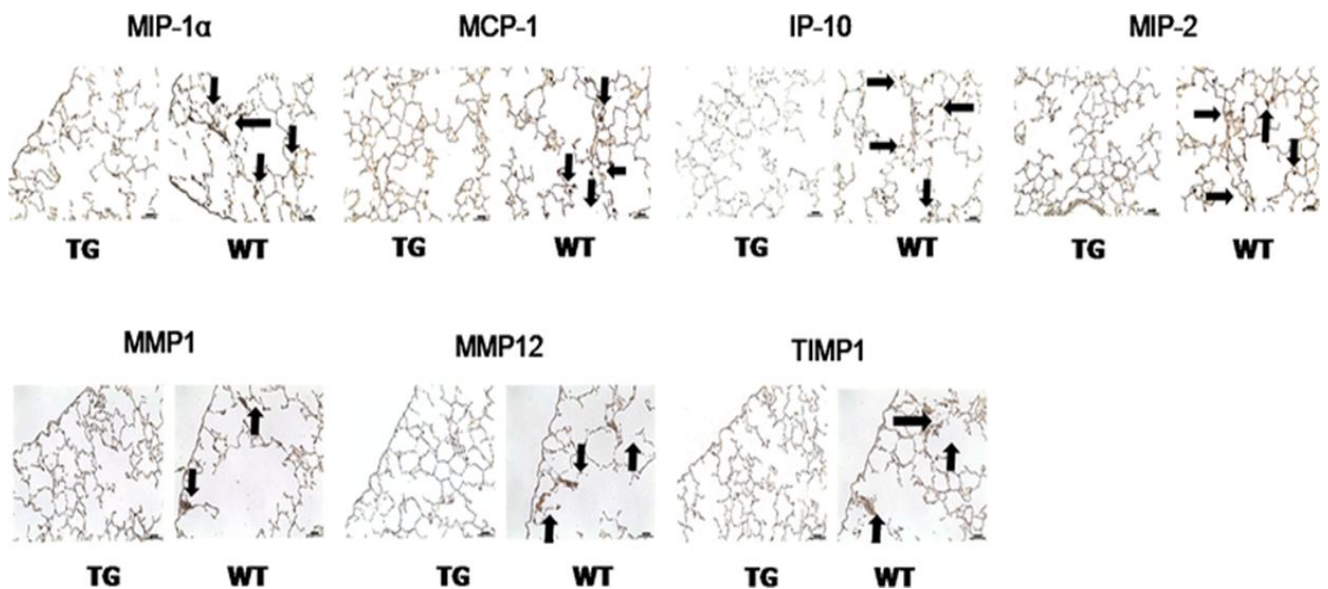


図 2

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Ishii M, Yamaguchi Y, Isumi K, Ogawa S, Akishita M. Inflammation. Transgenic Mice Overexpressing Vitamin D Receptor (VDR) Show Anti-Inflammatory Effects in Lung Tissues. 2017 Dec;40(6):2012-2019. doi: 10.1007/s10753-017-0641-2.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：山口 泰弘

ローマ字氏名： Yamaguchi, Yasuhiro

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号(8桁): 60376473

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：井角 香子

ローマ字氏名： Isumi Kyoko

研究協力者氏名：中村 友美

ローマ字氏名： Nakamura Tomomi

研究協力者氏名：金井 淳子

ローマ字氏名： Kanai Junko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。