

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月23日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590294

研究課題名（和文）肝臓免疫系細胞のビタミンD受容体による炎症及び代謝の調節機構

研究課題名（英文）Regulation of inflammation and metabolism by vitamin D receptor in hepatic immune cells

研究代表者

榎島 誠 (MAKISHIMA MAKOTO)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：70346146

研究成果の概要（和文）：ビタミンD受容体（VDR）は、活性型ビタミンD3と胆汁酸であるリトコール酸に反応する。肝臓における免疫系細胞のVDRの解析を行った。胆汁鬱滞マウスにおける肝臓の代謝・炎症関連遺伝子の発現変化に対してVDRの役割は限定的であった。興味深いことにVDR欠損マウスの小腸では炎症反応が抑制されていた。VDR欠損マウスから単離した肝臓単核球の分析において、NK細胞及びiNKT細胞の増加を認めた。VDRの小腸-肝臓経路における役割が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Vitamin D receptor (VDR) responds to the active form of vitamin D3 and the bile acid lithocholic acid. We investigated the role of VDR in hepatic immune cells. VDR played a limited role in regulation of hepatic genes involved in metabolism and immunity in mice with cholestasis. Inflammatory responses were suppressed in the intestine of VDR-null mice. Increased NK cells and iNKT cells were observed in mononuclear cells from the liver of VDR-null mice. The results show a role of VDR in the intestine-liver pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生化学・分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：ビタミンD受容体、胆汁鬱滞、炎症、インターロイキン6、マクロファージ、NKT細胞、NK細胞、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

(1) ビタミンD受容体（VDR）は、活性型ビタミンD3の受容体としてクローニングされた核内受容体である。VDR欠損マウスの解析により、VDRがビタミンDによるカルシウム代謝調節の重要なメディエーターであることが証明された。活性型ビタミンD3の受容体

としてのVDRの機能に関しては、カルシウム代謝調節の他に、細胞の増殖・分化、免疫・炎症、心血管機能などの調節など様々な生理作用が報告されている。最近の疫学的研究によって、ビタミンDの血中濃度の低下が、大腸がん、乳がん、前立腺がんなどの悪性腫瘍、結核、自己免疫疾患、心血管病変などのリス

ク増加と相関することが示され、カルシウム代謝調節作用以外の VDR 作用が再認識されている。

(2)我々は、核内受容体 farnesoid X receptor が胆汁酸の受容体であること (Makishima et al., Science 284: 1362, 1999)、VDR も胆汁酸の受容体として機能することを報告した (Makishima et al., Science 296: 1313, 2002)。さらに活性型ビタミン D3 と胆汁酸の生体内での役割が全く異なることに着目し研究を進めて、これらの化合物は異なる結合様式で VDR に相互作用すること (Adachi et al., Mol Endocrinol 18: 43, 2004)、マウスへの胆汁酸誘導体 VDR リガンドの投与はカルシウム代謝に影響を与えにくいことを報告した (Ishizawa et al., J Lipid Res., 49: 763, 2008)。

(3)我々は、VDR の胆汁酸代謝における役割を明らかにするため、各種胆汁酸付加食を与えたマウスの胆汁酸代謝に対するビタミン D の影響を検討し、ビタミン D の投与は肝臓、小腸、腎臓の胆汁酸代謝関連遺伝子の発現を変化させ、ケノデオキシコール酸などの代謝と尿中への排泄を促進することを見出した (Nishida et al., Drug Metab Disp 37: 2037, 2009)。一方、総胆管結紮 (BDL) による胆汁鬱滞マウスへのビタミン D の投与は、胆汁酸代謝関連の遺伝子変化を誘導し、炎症性サイトカインの発現を抑制することを見出した (Ogura et al., J Pharmacol Exp Ther 328: 564, 2009)。しかし、小腸粘膜や腎臓で見られる VDR 標的遺伝子の発現誘導は、肝臓においては認められなかった。

(4)以上の知見と VDR が単球やマクロファージ、Kupffer 細胞、T 細胞などに発現し免疫調節を行っているとの近年の報告から、ビタミン D シグナルが、免疫系細胞の VDR を介して、肝臓の炎症反応や代謝機能に影響を与えるとの仮説を立てた。

2. 研究の目的

先行研究によって見出した「胆汁酸受容体としての VDR の新機能」及び「胆汁鬱滞マウスにおけるビタミン D の抗炎症作用」に着目して、(1)肝障害モデルマウスにおけるビタミン D の薬理効果と VDR 欠損の影響と(2)肝臓免疫系細胞に対するビタミン D の薬理効果と VDR 欠損影響を解析することにより、肝臓における免疫系細胞を介するビタミン D 及び胆汁酸シグナルによる代謝調節機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)肝障害モデルにおけるビタミン D の投与、

VDR 欠損の影響の解析。BDL による胆汁鬱滞などの肝障害モデルを作成し、血液生化学 (血漿トランスアミナーゼ、ビリルビン、胆汁酸、ELISA による炎症性サイトカインの定量、肝臓及び VDR 発現臓器における胆汁酸代謝関連遺伝子、サイトカインなどの炎症関連遺伝子の定量的リアルタイム PCR による発現解析など)によって病態におけるビタミン D-VDR 経路の影響を評価した。

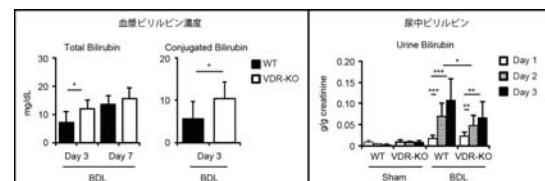
(2)肝臓免疫系細胞における VDR の機能。マウスから Kupffer 細胞、NK 細胞、NKT 細胞などの免疫系細胞を単離・分析する実験系を構築し、ビタミン D の薬理効果や VDR 欠損の影響を解析した。

(3)遺伝子組換え実験について、カルタヘナ法及び日本大学遺伝子組換え実験規程に基づく手続きをとり、動物実験については、日本大学動物実験内規に定める手続きをとった。

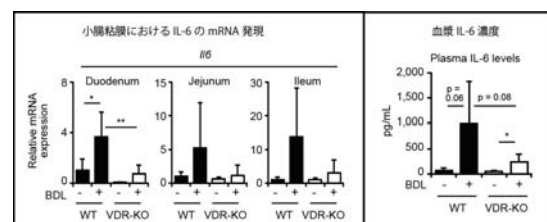
4. 研究成果

(1)野生型マウス及び VDR 欠損マウスに BDL を行い、血液生化学、炎症性サイトカインの定量、胆汁酸代謝や炎症関連遺伝子の発現変化を解析した。BDL のコントロールは、開腹手術のみとした。研究成果は、英文原著論文として報告した (Ishizawa et al., PLoS ONE 7: e51664, 2012)。

①BDL によって上昇する血漿ビリルビンは、野生型マウスよりも VDR 欠損マウスの方が高値であった。直接ビリルビンがほとんどであった。VDR 欠損マウスではビリルビンの尿中排泄が低下していた。野生型マウスと比較して、VDR 欠損マウスでは、腎臓における生体異物排泄担体 Mrp3 及び Mrp4 の遺伝子発現が低下していた。また MRP2 及び MRP4 のタンパク質発現の低下も見られた。これらの発現低下が、血液中に蓄積した直接ビリルビンの尿中排泄障害の原因と考えられた。

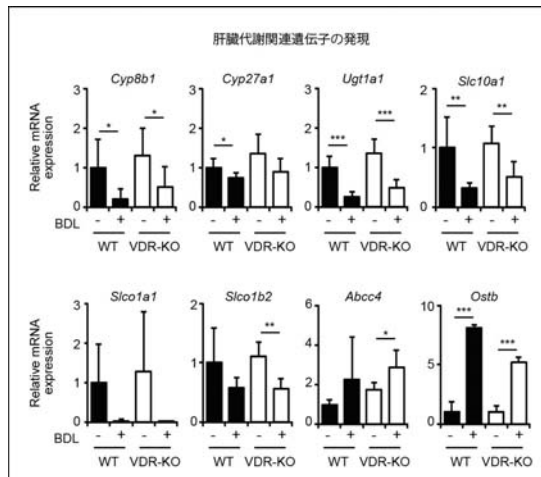


②BDL は、小腸粘膜の IL-6 の mRNA 発現を誘導した。興味深いことに、VDR 欠損マウスでは、この BDL による IL-6 発現上昇が見られ

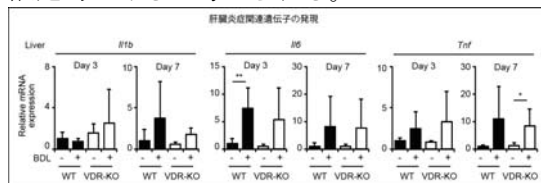


なかった。血漿 IL-6 タンパク質も同様に、野生型マウスの方が VDR 欠損マウスよりも高値であった。TNF α の mRNA は、VDR 欠損マウスで若干低下したが、IFN γ の変化は無かった。

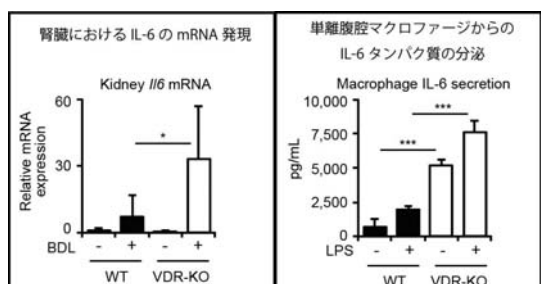
③肝臓での胆汁酸代謝関連遺伝子の発現に関して、BDL によって、Cyp8b1、Cyp27a1、Ugt1a1、Slc10a1、Slc10a1、Slc10b2 などの発現低下、Abcc4 や Ostb などの発現増加が見られたが、VDR 欠損による影響はほとんどなかった。



また、肝臓でのサイトカインの発現変化もほとんどなかった。薬理量のビタミン D の投与により、これらの遺伝子の発現は影響をうけるが、胆汁鬱滞の病態における VDR の役割は限定的であると考えられる。

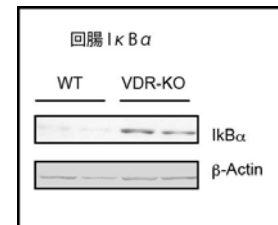


④腎臓の IL-6 の遺伝子発現は、BDL によって野生型マウスよりも VDR 欠損マウスにおいてより効果的に誘導された。小腸粘膜におけるパターンと逆であった。VDR 欠損マウスから単離した腹腔マクロファージにおける IL-6 の発現も、LPS の刺激の有無にかかわらず亢進していた。



⑤VDR 欠損マウスの小腸において、IL-6 の発現を抑制するメカニズムを探索したところ、NK- κ B シグナルを抑制する I κ B α の発現が野生型マウスよりも亢進していることを見出

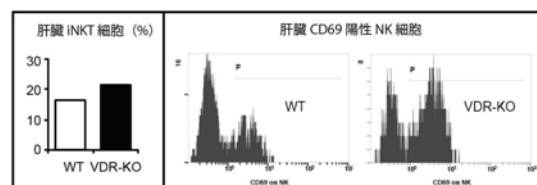
した。つまり、VDR 欠損マウスにおける IL-6 の発現は、I κ B α の発現増加などの代償的な制御機構により調節されており、BDL による影響を受けにくくなっていると考えられる。他の臓器では、この現象は見られないため、腸管-門脈-肝臓経路に特異的な VDR の役割の存在を示唆しており、現在解析を進めている。



(2)マウスの肝臓から免疫系細胞の単離を行い、解析した。

①野生型マウスの肝臓から Kupffer 細胞を含む単核球を単離した。LPS 刺激による TNF α 、IL-12p40、IL-6、IL-1 β 、Nos2 など炎症関連遺伝子の発現に対する活性型ビタミン D3 の影響を解析したが、活性型ビタミン D3 による抑制効果は見られなかった。VDR 標的遺伝子である Cyp24a1 の発現誘導は確認できた。これまでの報告とは異なる結果であり、マウスの飼育条件、薬剤の濃度や処理時間などの実験条件の影響が考えられ、さらなる検討が必要である。

②野生型マウスと VDR 欠損マウスを比較検討した。肝臓単核球における Kupffer 細胞、T 細胞、B 細胞の数に差を認めなかった。VDR 欠損マウスにおいて、NKT 細胞、iNKT 細胞が増加していた。NK 細胞の数には差がなかったが、VDR 欠損マウスにおいて CD69 陽性の活性化 NK 細胞が増加していた。



(3) 以上の結果と、VDR が肝臓よりも腸管に多く発現していること、活性型ビタミン D3 投与による標的遺伝子変化は、肝臓よりも腸管においてより顕著に見られること、非ビタミン D 性の VDR リガンドであるリトコール酸は腸内細菌によって産生されるがほとんど吸収されないことなどの知見から VDR の腸管機能の解析へ発展させた。ビタミン D の作用部位は上部腸管であるがリトコール酸は下部腸管であることを見出した。VDR を介する腸管・肝臓の免疫と代謝調節といった今後の研究に発展させる予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Ishizawa M, Ogura M, Kato S, and Makishima M. Impairment of bilirubin clearance and intestinal interleukin-6 expression in bile duct-ligated vitamin D receptor null mice. PLoS ONE 7(12): e51664, 2012 (査読有り). DOI:10.1371/journal.pone.0051664

[学会発表] (計 8 件)

- ① 榎島誠. ビタミン D による胆汁酸代謝調節. 第 10 回日本機能性食品医用学会総会、東京慈恵会医科大学 (東京都)、2012 年 12 月 15 日
- ② 石澤通康、宇野茂之、榎島誠. リトコール酸による腸管部位選択的なビタミン D 受容体標的遺伝子転写誘導. 第 35 回日本分子生物学会年会、マリンメッセ福岡 (福岡県)、2012 年 12 月 13 日
- ③ 石澤通康、宇野茂之、榎島誠. リトコール酸は腸管部位選択的にビタミン D 受容体標的遺伝子の転写を誘導する. 第 34 回胆汁酸研究会、サンプラザシーズンズ (愛知県)、2012 年 12 月 1 日
- ④ 榎島誠. 代謝調節性核内受容体におけるリガンド選択的作用発現. 第 17 回分生研シンポジウム. アカデミア創薬-分子標的と化合物の力-、東京大学弥生講堂 (東京都)、2012 年 10 月 29 日
- ⑤ 榎島誠. Zinc finger 転写因子である核内受容体による代謝調節. 第 23 回日本微量元素学会学術集会、砂防会館 (東京都)、2012 年 7 月 5 日
- ⑥ 石澤通康、小倉道一、加藤茂明、榎島誠. 胆汁鬱滞モデルマウスにおけるビタミン D 受容体の機能解析. 日本ビタミン学会第 64 回大会、長良国際会議場 (岐阜県)、2012 年 6 月 23 日
- ⑦ 石澤通康、小倉道一、榎島誠、加藤茂明. ビタミン D 受容体欠損マウスにおける胆汁鬱滞モデルの解析. 第 333 回脂溶性ビタミン総合研究委員会、兵衛向陽閣 (兵庫県)、2011 年 12 月 9 日
- ⑧ 石澤通康、小倉道一、榎島誠. 胆汁鬱滞モデルマウスにおけるビタミン D 受容体の役割. 第 33 回胆汁酸研究会、大阪ガーデンパレス (大阪府)、2011 年 11 月 19 日

[その他]

ホームページ: 業績リストを公開

<http://www.med.nihon-u.ac.jp/~biochem/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎島 誠 (MAKISHIMA MAKOTO)
日本大学・医学部・教授
研究者番号: 70346146

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

櫻井 健一 (SAKURAI KENICHI)
日本大学・医学部・講師
研究者番号: 20366602
梅田 (旧姓 遠藤) 香織 (UMEDA KAORI)
日本大学・医学部・助手
研究者番号: 10445744

(4) 研究協力者

関 修司 (SEKI SHUJI)
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・教授
研究者番号: 80531392
石澤 通康 (ISHIZAWA MICHiyASU)
日本大学・医学部・助手
研究者番号: 30646542