

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460394

研究課題名(和文) ビタミンD受容体を介する腸管・肝臓の免疫と代謝の調節機構

研究課題名(英文) Regulation of intestinal and hepatic immunity and metabolism by vitamin D receptor

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンD受容体(VDR)の肝臓及び腸管の免疫・代謝における役割を解析した。野生型及びVDR欠損マウス由来単離肝臓免疫細胞及びマウスの個体に対する、リポ多糖類やコンカナバリンAなどの炎症刺激の影響を比較した。VDR欠損により、リポ多糖類誘導性のKupffer細胞とNK細胞の炎症反応の減弱、コンカナバリンA刺激誘導性肝炎の抑制が見られた。ケノデオキシコール添加食を与えたところ、VDR欠損マウスにおいて、ケノデオキシコール酸やリトコール酸の代謝障害が見られた。VDRの肝臓免疫及び胆汁酸代謝における役割を示す結果であった。また、今後の解析に有用な選択的VDRモジュレーターを合成した。

研究成果の概要(英文)：We examined the roles of vitamin D receptor (VDR) in immunity and metabolism in the liver and intestine. We compared the effects of inflammatory stimulants, such as lipopolysaccharide and concanavalin A, on hepatic immune cells isolated from wild-type mice and VDR knockout mice and their in vivo effects. VDR deletion reduced the inflammatory response of Kupffer cells and NK cells against lipopolysaccharide and alleviated concanavalin A-induced hepatitis. Experiments using a chenodeoxycholic acid-containing diet showed that metabolism of chenodeoxycholic acid and lithocholic acid is disturbed in VDR knockout mice. The results show that VDR plays a role in the hepatic immunity and bile acid metabolism. We developed selective VDR modulators, which should be useful for future studies.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：ビタミンD受容体 肝障害 クッパ-細胞 NKT細胞 肝臓 胆汁酸 サイトカイン ビタミンD誘導体

1. 研究開始当初の背景

(1) ビタミン D 受容体 (VDR) は、カルシウム代謝の重要な調節因子である活性型ビタミン 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。活性型ビタミン D₃ やその誘導体の薬理効果、そして VDR 欠損マウスの研究により、VDR リガンドには骨・カルシウム代謝調節に加え、細胞の増殖・分化、炎症・免疫、毛周期、心血管機能などを調節する作用のあることが明らかになっている。ビタミン D 欠乏症としてくる病、骨軟化症が知られているが、低 25-ヒドロキシビタミン D 血症と乳癌、前立腺癌、大腸癌などの悪性腫瘍、炎症性腸疾患や多発性硬化症などの自己免疫炎症疾患、結核などの感染症、高血圧や肥満などの生活習慣病との関連性も報告されており、これらの疾患の予防因子としてのビタミン D の重要性が注目されている (Makishima and Yamada, Expert Opin Ther Pat 15: 1133, 2005; Choi and Makishima, Expert Opin Ther Pat 19: 593, 2009)。しかし、VDR 作用とこれらの疾患の病態との関連性のメカニズムに関しては十分には解明されていない。

(2) 我々は、オーファン核内受容体 farnesoid X receptor (FXR) が胆汁酸の受容体であることを発見し (Makishima et al., Science 284: 1362, 1999)、FXR を介する胆汁酸による胆汁酸合成抑制メカニズムを明らかにした (Lu et al., Mol Cell 6: 507, 2000)。さらにコレステロール、胆汁酸、それらの代謝産物に応答する核内受容体の研究から、VDR が腸内細菌によって産生される二次胆汁酸の一つ、リトコール酸にも反応することを見出した (Makishima et al., Science 297: 1313, 2002)。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た結果、活性型ビタミン D₃ とリトコール酸とは異なる結合様式で VDR に相互作用することを明らかにした (Adachi et al., Mol Endocrinol 18: 43, 2004)。得られた知見に基づき、より VDR 活性化作用の強いリトコール酸誘導体を見出し (Adachi et al., J Lipid Res 46: 46, 2005)、マウスへのリトコール酸誘導体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)。また、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 の影響を検討した結果、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)。

(3) VDR 欠損マウスを用いたさらなる検討により、ビタミン D の作用部位は上部消化管であるが、リトコール酸は下部消化管であること、VDR 欠損マウスの下部小腸において

I B のタンパク発現が増加していること (Ishizawa et al. PLoS ONE 7: e51664, 2012)。肝臓免疫細胞の解析において NKT 細胞及び iNKT 細胞が増加し、NK 細胞活性化マーカーも増加していることを見出した (基盤研究 (C) 22590294)。これらの結果は、リトコール酸やビタミン D の受容体 VDR が肝臓・腸管における代謝・免疫の調節因子であることを示したが、詳細なメカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

これまでの研究により見出した「胆汁酸受容体としての VDR の新機能」及び「VDR 欠損マウスにおける肝臓・腸管免疫の変化」に着目して、(1) VDR 欠損マウスにおける肝臓及び腸管免疫細胞の変化の解析、(2) VDR リガンドの投与による免疫細胞や代謝への影響の解析、(3) VDR 活性制御による脂質糖代謝異常の治療モデルの開発によって、VDR を介する肝臓・腸管免疫調節と脂質糖代謝との関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 野生型または VDR 欠損マウスより単離した肝臓免疫細胞の分布の比較。野生型または VDR 欠損マウスの肝臓より免疫細胞を単離し、肝常在 Kupffer 細胞、骨髄由来マクロファージ、ナチュラルキラー (NK) 細胞、NKT 細胞、B 細胞などの各免疫細胞分布をフローサイトメトリーを用いて測定した。

(2) 初代培養肝臓免疫細胞における Toll 様受容体 (TLR) リガンド誘導性サイトカイン産生能に対する VDR の影響。

VDR 欠損の影響。野生型または VDR 欠損マウスより単離した肝臓免疫細胞に TLR4 リガンドであるリポ多糖 (LPS) または TLR9 リガンドである CpG-DNA を添加し、Kupffer 細胞または骨髄由来マクロファージなどの免疫細胞を刺激し、リアルタイム PCR 法を用いてサイトカイン発現量を定量した。

VDR 活性化の影響。野生型マウスの肝臓より免疫細胞を単離し、VDR の天然リガンドである活性型ビタミン D₃ を添加し一晩培養した。LPS で刺激後、と同様にサイトカイン発現量を定量した。

(3) 初代培養肝臓免疫細胞における NKT 細胞リガンド誘導性サイトカイン産生能に対する VDR 欠損の影響。野生型または VDR 欠損マウスより単離した肝臓免疫細胞に NKT 細胞特異的リガンドである α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer) で刺激し、リアルタイム PCR 法を用いてサイトカイン発現量を定量した。

(4) TLR リガンド投与による in vivo 急性炎症モデルにおける VDR 欠損の影響。野生型または VDR 欠損マウスに LPS または CpG-DNA を尾静脈投与し、経時採血を行い、ELISA を用い

た炎症性サイトカイン値の定量及びトランスアミナーゼ値の測定を行った。

(5)コンカナバリン A (Con-A) 投与による急性肝炎モデルにおける VDR 欠損の影響。野生型または VDR 欠損マウスに Con-A を尾静脈投与し経時採血を行い、血中トランスアミナーゼ値の測定及び ELISA を用いた炎症性サイトカイン値の定量を行った。また、HE 染色による肝組織の観察を行った。

(6)作用選択的 VDR 活性制御のためのリガンド化合物の創製。これまでの VDR とリガンド化合物との立体構造解析結果に基づき、パーシャルアゴニスト/アンタゴニスト活性を有する VDR リガンドを設計・合成し、VDR との相互作用、各種細胞株及びマウスへの影響を解析した。

(7)全ての動物実験は2~4ヶ月齢の雄マウスを用いて実施した。また、遺伝子組換え実験についてはカルタヘナ法及び日本大学遺伝子組換え実験実施規程に基づいて実施した。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踏まえた上で実施した。

4. 研究成果

(1)マウス肝臓より単離した初代培養免疫細胞に TLR リガンドである LPS または CpG-DNA 刺激後の炎症性サイトカイン産生能を評価した。

野生型または VDR 欠損マウス由来細胞に LPS で刺激した結果、野生型と比較し VDR 欠損細胞では Tnf、Il-6、Il-1b などの炎症性サイトカイン遺伝子の発現増加を認めた(図1)。一方、CpG-DNA で刺激を行ったところ、Il-1b または Il-12b 発現はむしろ野生型と比較して低下し(図2) TLR リガンドによって応答能が異なることが示された。

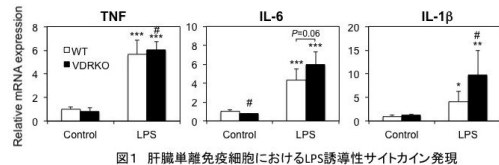


図1 肝臓単離免疫細胞におけるLPS誘導性サイトカイン発現

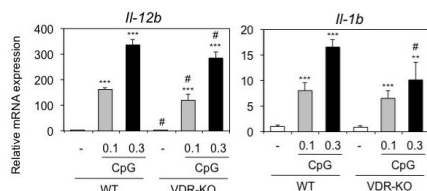


図2 肝臓単離免疫細胞におけるCpG-DNA誘導性サイトカイン発現

野生型マウスの肝臓より単離した免疫細胞に活性型ビタミン D3 を用いて前刺激を行い、VDR 活性化の影響を検討したが、LPS 誘導性の Tnf、Il-12b、Il-1b、Nos2 などの炎症性サイトカイン遺伝子の発現に変化は見られなかった。

(2)野生型または VDR 欠損マウス由来細胞に α-GalCer で刺激し、Il-4 及び Ifn-g 遺伝子の発現を定量した結果、VDR 欠損細胞においてこれらの遺伝子発現は増加した(図3)。過去の報告(Yu and Cantorna, Proc Natl Acad Sci USA 105: 5207, 2008)とは異なる結果であった。

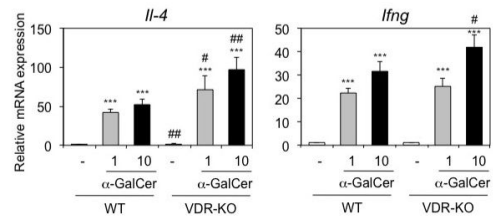


図3 肝臓単離免疫細胞におけるα-GalCer誘導性サイトカイン発現

(3)肝臓免疫細胞における VDR の影響を個体レベルで検討するため、LPS または CpG-DNA 投与による急性炎症モデルを作製した。まず、野生型または VDR 欠損マウスに LPS を投与し投与 72 時間後までの血漿を用いて炎症性サイトカイン値を定量したところ、LPS 投与後初期に骨髄由来マクロファージによって誘導される TNF- α 産生については両者で変化を認めなかったが、その後肝常在 Kupffer 細胞と NK 細胞によりそれぞれ誘導される IFN- γ 及び CCL2 産生は VDR 欠損において有意に減少した(図4)。次に、野生型または VDR 欠損マウスに CpG-DNA を同様に投与した結果、VDR 欠損において血中トランスアミナーゼ値及び投与 1 時間後の血中 TNF- α 濃度が減少傾向を示し、(1)の in vitro で得られた知見と同様に、LPS と CpG-DNA では VDR 欠損に対する応答性が異なることが明らかとなった。

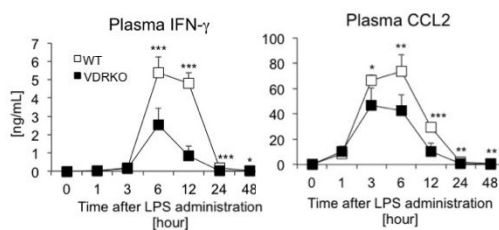


図4 マウスへのLPS投与による血漿サイトカイン

(4)野生型または VDR 欠損マウスに Con-A を尾静脈投与し、自己免疫性肝炎モデルを作製した。血中トランスアミナーゼ値を測定したところ、野生型と比較し VDR 欠損マウスでは顕著な減少が認められた(図5)。Con-A 誘導性肝炎には NKT 細胞活性化が必要であることから、血中 Il-4 または IFN- γ 値を定量した結果、これらのサイトカイン濃度に変化は認められなかった。肝組織の観察を行った結果、野生型で認められた顕著な肝細胞死の領域が VDR 欠損では減少していた。Con-A 誘導性肝炎による肝細胞死には肝常在 Kupffer 細胞による活性酸素産生が関与すると報告されている(Nakashima et al., Hepatology 48: 1979, 2008)。VDR 欠損による Con-A 誘導性肝

障害減弱効果にはサイトカイン発現は関与しないことから、肝常在Kupffer細胞による活性酸素産生能が影響していることが示唆された。

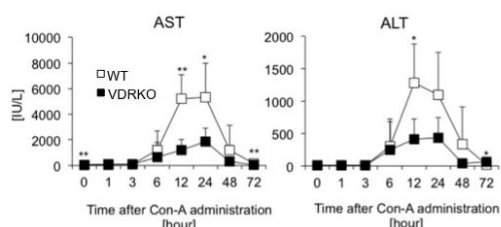


図5 マウスへのCon-A投与による肝障害

(5)以上、(1)から(4)の検討により、VDRは肝常在免疫細胞の分布及び炎症反応を制御することを明らかにした。しかし、本研究にて得られた知見は必ずしもこれまで報告されている現象とは一致しなかった。NKT細胞については食餌誘導性肥満モデルについて、インスリン抵抗性や慢性炎症を促進するという報告(Wu et al., Proc Natl Acad Sci USA 109: E1143, 2012)やむしろ抑制する(Lynch et al., Immunity 37: 574, 2012)という報告があり、傾向が一貫していない事象が存在する。これらの原因として、マウスの飼育環境や食餌や飲用水の違いによる腸内細菌のバランス変化などが複雑な免疫細胞間コミュニケーションに影響を及ぼすことで実験結果に相違が生じることが示唆される。今後はVDRシグナルにおける肝臓免疫調節機構について腸内細菌の役割も含め検討する予定である。

(6)ケノデオキシコール酸-リトコール酸-VDR経路の役割を明らかにするため、ケノデオキシコール酸添加食の影響を解析した。VDRリガンド化合物であるリトコール酸は、肝臓で合成され胆汁の成分として分泌されるケノデオキシコール酸を腸内細菌が代謝することによって産生される。VDR欠損マウスにおいて、ケノデオキシコール酸及びリトコール酸の代謝・排泄障害が認められた。

(7)作用選択的VDRモジュレーターを開発するため、VDRの立体構造解析結果に基づき、側鎖にアダマンタン環を有するビタミンD誘導体を設計・合成した。側鎖にアダマンタン環や多重結合を導入することで、VDRのコンフォメーションを活性型と不活性型の平衡状態に誘導できるように設計した。合成した化合物のVDR結合能を評価し、各種細胞株におけるVDR標的遺伝子発現変化を解析した。細胞選択的に作用する化合物を見出した(図6)(Kudo et al., J Med Chem 57: 4073, 2014; Watarai et al., J Med Chem 58: 9510, 2015)。腸管粘膜細胞に選択的な化合物もあり、肝臓・腸管の免疫・代謝の解析に有用と考えられる。

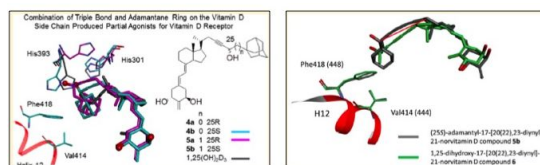


図6 アダマンチルビタミンD誘導体

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3件)

- Watarai Y, Ishizawa M, Ikura T, Zacconi F, Uno S, Ito N, Mourino A, Tokiwa H, Makishima M, Yamada S. Synthesis, biological activities and X-ray crystal structural analysis of 25-hydroxy-25(or 26)-adamantyl-17-[20(22),23-diynyl]-21-norvitamin D compounds. J Med Chem 58: 9510-9521, 2015、査読有 DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00792
- Takada I, Makishima M. Therapeutic application of vitamin D receptor ligands: an updated patent review. Expert Opin Ther Pat 25: 1373-1383, 2015、査読有 DOI: 10.1517/13543776.2015.1093113
- Kudo T, Ishizawa M, Maekawa K, Nakabayashi M, Watarai Y, Uchida H, Tokiwa H, Ikura T, Ito N, Makishima M, Yamada S. Combination of triple bond and adamantane ring on the vitamin D side chain produced partial agonists for vitamin D receptor. J Med Chem 57: 4073-4087, 2014、査読有 DOI: 10.1021/jm401989c

〔学会発表〕(計11件)

- 榎島誠、山田幸子、常盤広明・組織および遺伝子選択的作用を持つ新規ビタミンD受容体モジュレーター(SVDRM)の開発～骨粗しょう症治療に期待できる作用選択的アダマンチルビタミンD化合物～. 第13回アカデミックフォーラム、東京ビッグサイト(東京都江東区)、2016.5.11-13
- 榎島誠、石澤通康、西田滋・ビタミンDと消化管. 第1回 Neo Vitamin D Workshop 学術集会、大津プリンスホテル(滋賀県大津市)、2015.8.28-29
- 石澤通康、渡會友祐、伊倉貞吉、Flavia C. M. Zacconi、Antonio Mourino、常盤広明、伊藤暢聡、山田幸子、榎島誠・共役三重結合とアダマンチル基を導入したビタミンD誘導体の生物活性及びユニークな受容体結合様式. 第1回 Neo Vitamin D Workshop 学術集会、大津プリンスホテル(滋賀県大津市)、

2015.8.28-29

石澤通康、高野真史、橘高敦史、坂根里枝、須原義智、山田幸子、榎島誠 . 細胞選択的及び遺伝子選択的活性を有するビタミン D 誘導体の生物活性評価 . 第 344 回脂溶性ビタミン総合研究委員会、東京農業大学 (東京都世田谷区)、2014.9.26

石澤通康、前川和樹、工藤健、中林誠、内田光、伊藤暢聡、常盤広明、山田幸子、榎島誠 . Activation function 2 構造修飾型ビタミン D 受容体パーシャルアゴニストのユニークな遺伝子発現誘導 . 日本ビタミン学会第 66 会大会、姫路商工会議所 (兵庫県姫路市)、2014.6.13-14

石澤通康、前川和樹、工藤健、中林誠、内田光、伊藤暢聡、常盤広明、山田幸子、榎島誠 . ビタミン D 受容体パーシャルアゴニストの開発と組織選択的機能発現の可能性 . 第 524 回日大医学会例会、日本大学医学部 (東京都板橋区)、2014.3.22

石澤通康、渡會友祐、前川和樹、工藤健、内田光、伊藤暢聡、常盤広明、山田幸子、榎島誠 . AF2 構造修飾型の新規 VDR 選択的モジュレーター合成と生物活性 . 第 8 回日本大学先端バイオフォーラム、日本大学会館 (東京都千代田区)、2013.11.27

渡會友祐、前川和樹、石澤通康、宇野茂之、Antonio Mourino、榎島誠、常盤広明、山田幸子 . 共役 diyne とアダマンチル基を側鎖に有する 19- ノルビタミン D 誘導体の立体選択的合成と生物活性評価 . 第 31 回メディシナルケミストリーシンポジウム、アステールプラザ (広島県広島市)、2013.11.20-22

前川和樹、工藤健、渡會友祐、石澤通康、内田光、中林誠、伊藤暢聡、常盤広明、榎島誠、山田幸子 . 新規 VDR パーシャルアゴニストの立体選択的合成、X 線結晶構造解析、および生物活性 . 第 31 回メディシナルケミストリーシンポジウム、アステールプラザ (広島県広島市)、2013.11.20-22

西田滋、石澤通康、榎島誠 . ビタミン D 受容体欠損マウスにおける胆汁酸代謝 . 第 35 回胆汁酸研究会、北海道医療大学札幌サテライトキャンパス (北海道札幌市)、2013.10.19

渡會友祐、前川和樹、石澤通康、内田光、Flavia Zacconi、宇野茂之、常盤広明、Antonio Mourino、榎島誠、山田幸子 . VDR パーシャルアゴニスト活性を示す新規ビタミン D 誘導体の合成・生物活性 . 日本レチノイド研究会第 24 回学術集会、星薬科大学百年記念館 (東京都品川区)、2013.8.30-31

(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 : 7 0 3 4 6 1 4 6

(2) 連携研究者

関 修司 (SEKI, Shuji)
防衛医科大学校・医学教育部医学科進学課程・教授
研究者番号 : 8 0 5 3 1 3 9 2

梅田 香織 (UMEDA, Kaori)
日本大学・医学部・助手
研究者番号 : 1 0 4 4 5 7 4 4

石澤 通康 (ISHIZAWA, Michiyasu)
日本大学・医学部・助手
研究者番号 : 3 0 6 4 6 5 4 2

(3) 研究協力者

山田 幸子 (YAMADA, Sachiko)
西田 滋 (NISHIDA, Shigeru)
梅田 直 (UMEDA, Naoki)