

## 粘膜免疫学を基盤とした、 炎症性腸疾患に対するビタミンDの制御機構の解明

大阪市立大学大学院医学研究科発達小児医学：徳原 大介

### 【要旨】

目的；炎症性腸疾患におけるビタミンDの炎症抑制効果をモデル動物を用いて検証する。

方法；ビタミンD3を含有（645 IU/100g）あるいは除去した餌を用いて、SJLマウスを6週齢から飼育した。10週齢時にトリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）と50%エタノールをビタミンD投与マウスおよび非投与マウスの両群の大腸内に投与し大腸炎を誘発した。対照として、ビタミンD投与マウスおよび非投与マウスの両群の大腸内に50%エタノールを投与した。投与後4日目まで体重増加率・生存率を経時的に評価し、2日目の大腸粘膜組織における炎症性サイトカイン（TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-12）濃度を測定した。

結果；50%エタノール投与群（ビタミンD投与／非投与含む）では、死亡率は0%であり、体重は $5.2\pm 2.1\%$ 増加した。TNBS投与群では、死亡率はビタミン含有餌飼育群が65%、ビタミン除去餌飼育群が70%であった。TNBS投与後の体重増加率はビタミン含有餌飼育群（ $-13.4\pm 4.6\%$ ）がビタミン除去餌飼育群（ $-16.7\pm 5.2\%$ ）よりも体重の減少が低い傾向にあったが、有意な差は認めなかった。大腸粘膜組織における炎症性サイトカインの濃度についてもビタミン含有餌飼育群とビタミン除去餌飼育群で有意な差は認めなかった。まとめ；ビタミンDの投与は炎症性腸疾患の増悪因子とはならないことがわかった。今後、ビタミンDならびにTNBSの投与量を調整し、ビタミンDの炎症制御効果についてさらに検証をすすめたい。

### 【緒言】

食物抗原や病原微生物が取り込まれる場所は呼吸器や消化器に代表される粘膜であるが、粘膜組織における免疫システムの研究は近年飛躍的にすすみ「粘膜免疫学」という学問体系にまで発展し、粘膜組織には全身免疫系とは別個の直接外界に曝露されている生物学的環境に適応した、腸管関連リンパ組織などのユニークな「粘膜免疫システム」が発達していることがわかった。粘膜免疫システムはアレルゲンを代表とする異種抗原に対して積極的排除、無視・無応答といった「正と負」の免疫制御を行なうことで粘膜面の恒常性を維持しているが、「正と負」の制御機構の破綻がアレルギーや炎症性腸疾患などの発症に関わる。

クローン病（CD）は粘膜免疫制御機構の破綻により生じる難治性の炎症性腸疾患であり、根本的な治療法がないため栄養療法・免疫抑制剤・抗サイトカイン療法などの治療を継続的に必要とする。疫学的には毎年1500人以上の新規登録患者数があり、10歳未満の小児期発症者も年間100人を超えることから、内科のみならず小児科においても重要な疾患であり、患者の肉体的・精神的負担と国の経済的負担が大きいことから、粘膜免疫学を基盤とした予防・治療法のさらなる進歩が必要である。特に近年は小児期発症のクローン病・潰瘍性大腸炎等の炎症性腸疾患の患者数が増加傾向にあること

から<sup>1)</sup>、身体的負担を少なく継続的に行なえる腸管粘膜の炎症予防戦略の開発が望まれる。

ビタミンDは元来、血中のカルシウムとリンの恒常性維持に寄与する必須のビタミンであるが、近年、1,25ジヒドロキシビタミンDが全身免疫系に関与し、多様な免疫調整作用を持つ事が明らかとなってきた<sup>2)</sup>。ビタミンDと炎症性腸疾患の関係については1990年代から多くの報告がなされており<sup>3-9)</sup>、ビタミンD欠乏症が成人だけでなく小児の炎症性腸疾患患者に多くみられることが知られている<sup>3-5)</sup>。また、炎症性腸疾患のモデル動物を用いた研究から、ビタミンD欠乏はIL-10欠損マウスにおける炎症性腸疾患の発症を早めることが報告された<sup>7)</sup>。ビタミンDが炎症抑制効果を発揮する上でビタミンD受容体が重要な役割を担っている事も明らかとなり<sup>8, 9)</sup>、ビタミンD受容体とIL-10の両者を欠損したマウスは、IL-10のみを欠損したマウスより劇症型の炎症性腸疾患を早期に発症することも報告されている<sup>9)</sup>。さらに、活性型ビタミンD3は自然免疫と獲得免疫のシステムを惹起する作用のあることも明らかとなり、多様な免疫制御作用を持つことが明らかとなってきた<sup>10, 11)</sup>。

牛乳はビタミンDを豊富に含む飲料である事から、日常的に牛乳を幼少期から摂取することによって炎症性腸疾患を予防できる可能性があり、その理論基盤を強化するためにビタミンDが炎症性腸疾患モデル動物における腸炎発症にどのような効果を与えるのかを検証する事とした。

#### 【実験方法】

トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) をマウスに注腸することによってクローン病に類似した炎症性腸疾患モデルを作成できることが知られていることから<sup>12)</sup>、本研究ではその実験モデルを用いてビタミンDの効果を検証することとした (図1)。本研究は大阪市立大学動物実験施設の承認を得て行なった。

<実験動物> SJL マウス (6週齢, 雌) を日本チャールズリバーから購入し、明暗サイクル12時間および自由摂食・摂水の環境下で飼育した。

<実験試料> ビタミン D3 を含有 (645 IU/100g) あるいは除去した餌を用い、6週齢から実験終了時まで同餌を用いてマウスを飼育した。

<実験方法> 図2に示すとおり、10週齢時にトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS; Sigma) 2.5mg を50%エタノールに溶解してビタミンD投与マウスおよび非投与マウスの両群の大腸内に投与し大腸炎を誘発した。具体的には、12時間絶食させた後にマウスにケタミンを腹腔内投与することによって麻酔し、カテーテルを用いて大腸内に0.2mLに調整したTNBS液の注入を行なった。対照として、ビタミンD投与マウスおよび非投与マウスの両群の大腸内に50%エタノールを投与した。投与後4日目まで体重増加率・生存率を経時的に評価し、2日目の大腸粘膜組織における炎症性サイトカイン (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12) 濃度を測定した。大腸粘膜組織中のサイトカインを測定するために、マウスを脱血させた後に大腸粘膜を取り出し、氷上で大腸粘膜をPBSに浸漬してホモゲナイズした後に遠心分離し、回収した上清中のサイトカイン濃度を測定した。サイトカインの測定はマウスの炎症性サイトカイン測定

キット (BD Cytometric Bead Assay Mouse Inflammation Kit, Catalog No. 552364) を用いて行い、フローサイトメーターを用いてサイトカイン濃度を測定した。<統計解析>ビタミンD投与群および非投与群の体重増加率、生存率、サイトカイン濃度の差はMann-WhitneyのU検定を用いて解析した。

## 【結果】

### (1) TNBS 注腸後の生存率の経時的変化；

図1に示すとおり、TNBS投与群では大腸の著明な浮腫・発赤・出血を呈し、大腸の長さの短縮を認めた。一方、50%エタノール投与群では大腸に肉眼的な変化は認めなかった。注腸後の生存率の経時的な変化を記録したところ、50%エタノール投与群(ビタミンD投与/非投与含む)では、死亡率は0%であり、体重は $5.2 \pm 2.1\%$ 増加した。TNBS投与群では、死亡率はビタミン含有餌飼育群が65%、ビタミン除去餌飼育群が70%であり、両群に統計学的な差は認めなかった。

### (2) TNBS 注腸後の体重増加率の経時的変化

図2に示すとおり、ビタミンD含有餌飼育の有無にかかわらず50%エタノール投与群では経時的な体重の増加傾向を認め、ビタミンD含有群と非含有群で体重の増加率に差は認めなかった。TNBS投与群では、投与後の体重増加率はビタミン含有餌飼育群( $-13.4 \pm 4.6\%$ )がビタミン除去餌飼育群( $-16.7 \pm 5.2\%$ )よりも体重の減少が低い傾向にあったが、統計学的に有意な差は認めなかった。

### (3) 大腸粘膜組織中の炎症性サイトカイン濃度

TNBSの投与によって誘発した大腸炎群はビタミンD含有餌飼育の有無にかかわらずTNBS非投与の対照群と比較して有意に高い炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12)の産生を示した。ビタミン含有餌飼育群とビタミン除去餌飼育群の間で大腸粘膜組織における炎症性サイトカインの濃度について比較した場合、両群間で有意な差は認めなかった。

## 【考察】

ビタミンDの投与は炎症性腸疾患の増悪因子とはならないことがわかった。ビタミンD欠乏はIL-10欠損マウスにおける緩徐な炎症性腸疾患の自然発症を促進することが報告されているが、今回我々が用いた炎症性腸疾患モデルは急性発症型であると同時にTNBS投与量に応じて腸炎の重症度が増悪することから、ビタミンD含有餌の十分な効果が得られない程度の重症度の高い腸炎であった可能性は考えられる。一方、Danielら(J Pharmacol Exp Ther. 2006;319:622-31)はTNBS腸炎に対してビタミンDをTNBS投与時から3日間腹腔内投与することによって腸炎の重症度を下げる事ができたと報告しており<sup>13)</sup>、今後ビタミンDならびにTNBSの投与量の調整ならびにIL-10欠損マウスの使用を検討することによって、ビタミンDの炎症制御効果についてさらに検証をすすめる必要がある。さらに、今回研究に用いたマウスは12時間サイクルで室内灯に照射される環境で飼育されており、光照射により皮膚で産生された内因性のビタミンDが一定の作用を及ぼしていた可能性も

否定できず、今後、暗室下での長期飼育等マウスの飼育面での改良を検討していく必要があると考えられた。

#### 【文献】

- 1) 友政剛. 小児の潰瘍性大腸炎・クローン病の診療. 診断と治療. 96 : 2527-2534. 2008.
- 2) 遠藤逸朗. Vitamin D の骨と免疫への作用. 医学のあゆみ. 242 : 751-757. 2012.
- 3) Andreassen H, Rix M, Brot C, Eskildsen P. Regulators of calcium homeostasis and bone mineral density in patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol.* 1998;33:1087-93.
- 4) Andreassen H, Rungby J, Dahlerup JF, Mosekilde L. Inflammatory bowel disease and osteoporosis. *Scand J Gastroenterol.* 1997;32:1247-55.
- 5) Cantorna MT, Zhu Y, Froicu M, Wittke A. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D3, and the immune system. *Am J Clin Nutr.* 2004;80:1717S-20S.
- 6) Sentongo TA, Semaio EJ, Stettler N, Piccoli DA, Stallings VA, Zemel BS. Vitamin D status in children, adolescents, and young adults with Crohn disease. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:1077-81.
- 7) Cantorna MT, Munsick C, Bemiss C, Mahon BD. 1,25-Dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease. *J Nutr.* 2000;130:2648-52.
- 8) Froicu M, Zhu Y, Cantorna MT. Vitamin D receptor is required to control gastrointestinal immunity in IL-10 knockout mice. *Immunology.* 2006;117:310-8.
- 9) Froicu M, Weaver V, Wynn TA, McDowell MA, Welsh JE, Cantorna MT. A crucial role for the vitamin D receptor in experimental inflammatory bowel diseases. *Mol Endocrinol.* 2003;17:2386-92.
- 10) Adams JS, Hewison M. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008;4:80-90.
- 11) Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, Ochoa MT, Schaubert J, Wu K, Meinken C, Kamen DL, Wagner M, Bals R, Steinmeyer A, Zügel U, Gallo RL, Eisenberg D, Hewison M, Hollis BW, Adams JS, Bloom BR, Modlin RL. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science.* 2006;311:1770-3.
- 12) Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 1995;109:1344-67.

1 3) Daniel C, Radeke HH, Sartory NA, Zahn N, Zuegel U, Steinmeyer A, Stein J. The new low calcemic vitamin D analog 22-ene-25-oxa-vitamin D prominently ameliorates T helper cell type 1-mediated colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;319:622-31.

【図】

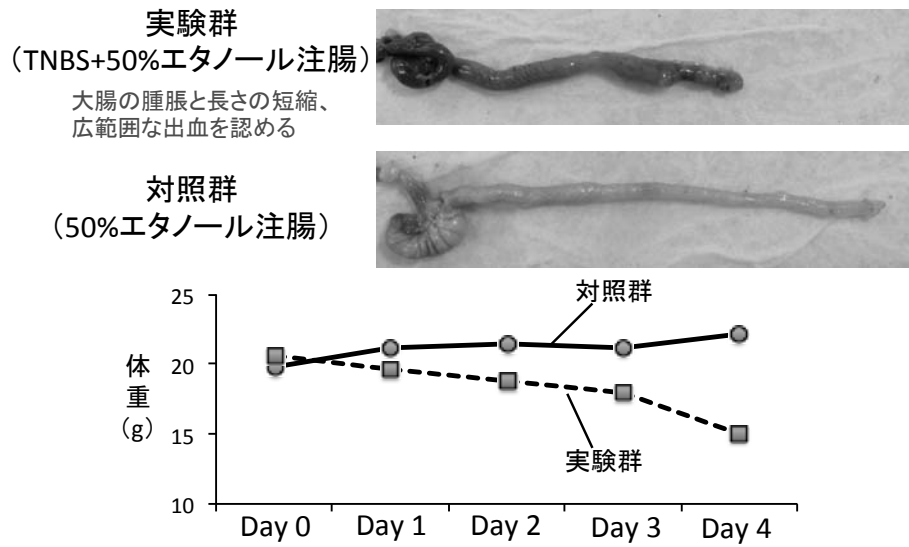


図1. トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) をマウスに注腸することによって誘発したクローン病モデル

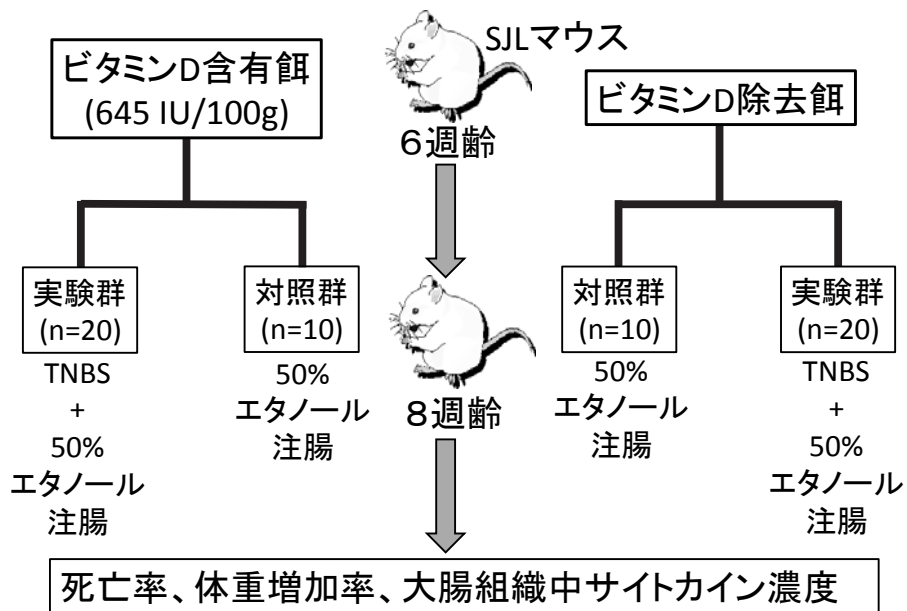


図2. ビタミンDが炎症性腸疾患の発症に与える効果の検証方法

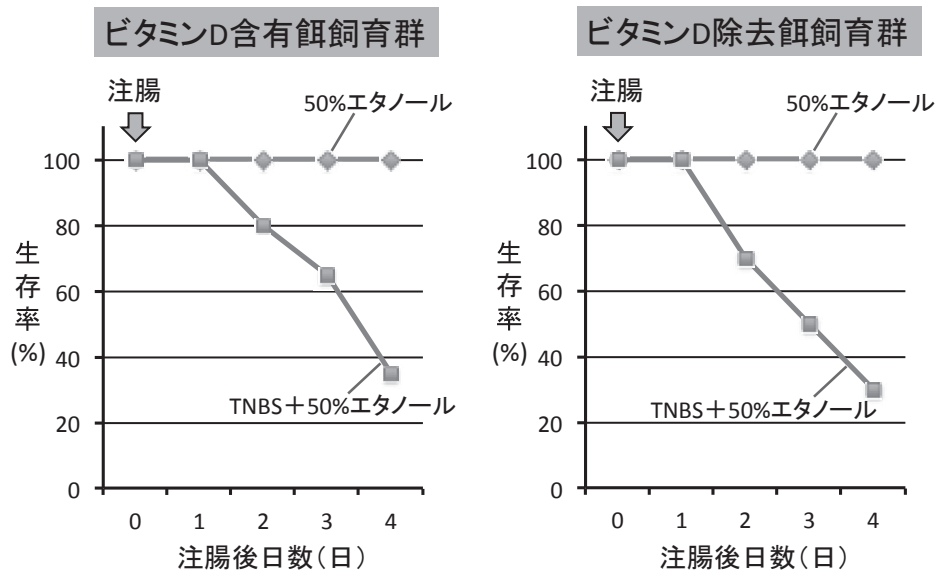


図 3. TNBS 注腸後の生存率の経時的変化

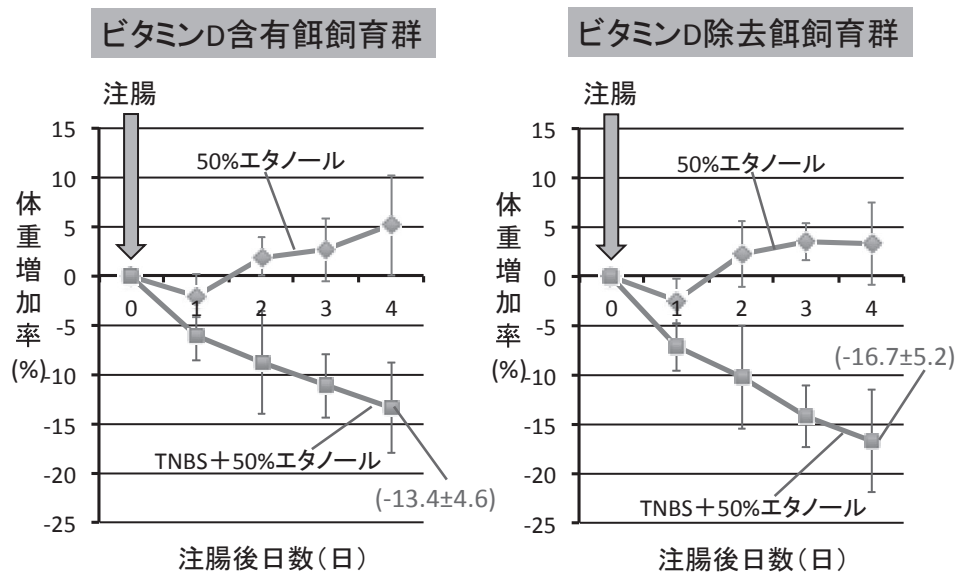


図 4. TNBS 注腸後の体重増加率の経時的変化

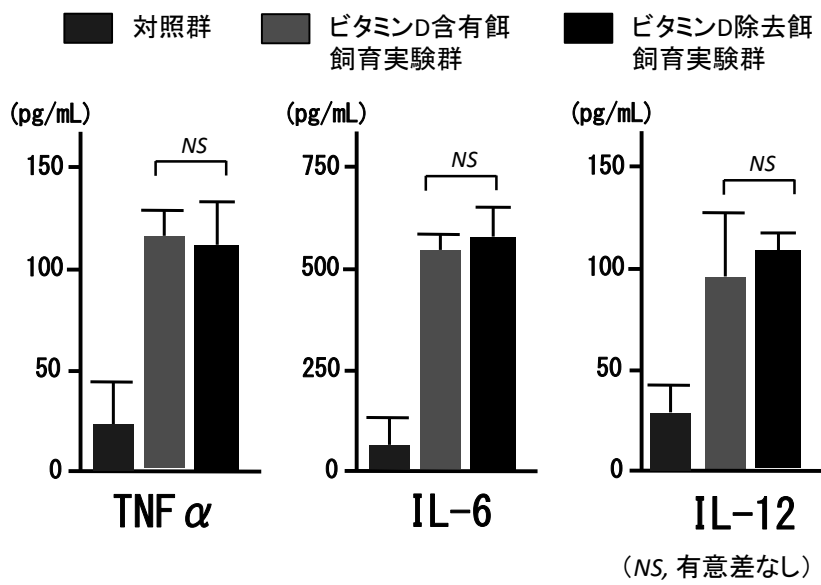


図 5. 大腸粘膜組織中の炎症性サイトカイン濃度