

8. 予防医学としてのビタミン D の免疫及び感染防御作用

金城 雄樹

東京慈恵会医科大学 細菌学講座

Key words : ビタミン D, 新規肺炎球菌ワクチン, 特異的抗体産生, NKTfh 細胞, NKT 細胞サブセット

緒 言

ビタミン D は生体のみでは合成することができず、食事から摂取する、あるいは紫外線を介して皮膚で合成することで生体での利用が可能となる。食事や皮膚での合成で得られたビタミン D は不活性型であり、血中のカルシウム濃度に応じて腎臓で活性型ビタミン D (1,25 (OH) 2D) へと変換される。活性型ビタミン D はカルシウムの吸収を促進させることで骨の恒常性を維持しており、その欠乏は小児ではくる病、成人では骨軟化症や骨粗しょう症の原因となる [1]。一方で、活性型ビタミン D の核内受容体である vitamin D receptor (VDR) は骨組織の細胞のみならず免疫系細胞全般にもその発現が認められ、その作用を介して様々な免疫応答に関与することが知られている [2]。T 細胞ではサイトカイン産生制御に関する研究がよく知られており、特異的サイトカインである IFN γ や IL-17 の産生を負に制御することが報告されている [3]。実際に、これらのサイトカインがその病態形成に重要とされる乾癬、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症や関節リウマチなどにおいて活性化ビタミン D (1,25 (OH) 2D) による抑制効果が期待されていることから [2]、炎症性疾患の制御の観点からもビタミン D を介する免疫制御機構の解明は重要である。しかしながら、感染症予防としてのワクチン応答におけるビタミン D の役割について、詳細な解析はされていない。

これまでに私たちは糖脂質をアジュバントとして用いた新規肺炎球菌経鼻ワクチンを樹立した。当該経鼻ワクチンで用いる糖脂質はリンパ球のナチュラルキラー T 細胞 (NKT 細胞) を特異的に活性化させるものであり、その活性化を介したワクチン効果は従来のワクチンアジュバントと比較して強力且つ長期に渡って肺炎球菌感染防御効果を示すことが明らかとなってきた。NKT 細胞は胸腺における分化成熟の過程でビタミン D が重要であり、VDR 欠損マウスでは NKT 細胞分化に障害を認めることがわかっている [4]。しかし、既に分化した末梢の NKT 細胞の機能にビタミン D が関与するかどうか明らかになっていない。

本研究では新規肺炎球菌ワクチンによる免疫応答におけるビタミン D の作用に着目して解析を行った。その結果、ビタミン D 欠乏飼料を長期間摂取させたマウスでは抗体産生応答の指標であるワクチン抗原特異的な胚中心 B 細胞 (GC B 細胞) の誘導が有意に低下することがわかった。GC B 細胞の誘導低下は当該ワクチンの効果においてキープレーヤーとしての役割を果たす濾胞性ヘルパー NKT 細胞 (NKTfh 細胞) の誘導障害に起因することが示唆された。さらに、この誘導障害にはビタミン D 欠乏による末梢の NKT 細胞サブセットのバランスが乱れることが要因の一つである可能性を見出した。本研究により、新規肺炎球菌ワクチンの作用機序におけるビタミン D の重要性のみならず、末梢 NKT 細胞のサブセットバランスにおけるビタミン D の新たな作用の存在が示唆された。

方法および結果

1. ビタミン D 欠乏による抗体産生応答への影響について

ビタミン D 欠乏時のワクチン応答の変化を明らかにする目的で、ビタミン D 欠乏飼料を 2 ヶ月以上自由摂取させたマウスに対し、私たちが樹立した新規肺炎球菌ワクチンを経鼻投与し、所属リンパ節に誘導される GC B 細胞数についてフローサイトメーターを用いて解析した。その結果、コントロール飼料摂取群と比較して、ビタミン D 欠乏飼料摂取群では、免疫 13 日後の頸部リンパ節においてワクチン抗原特異的 GC B 細胞の割合と細胞数が共に有意に低下するこ

とがわかった (図 1)。コントロール飼料摂取群と比較して、ビタミン D 欠乏飼料摂取群での総 B 細胞数の減少は認められなかったことから、GC B 細胞誘導に寄与する細胞がビタミン D 欠乏によって障害をうけることが示唆された。

抗原特異的GC B細胞

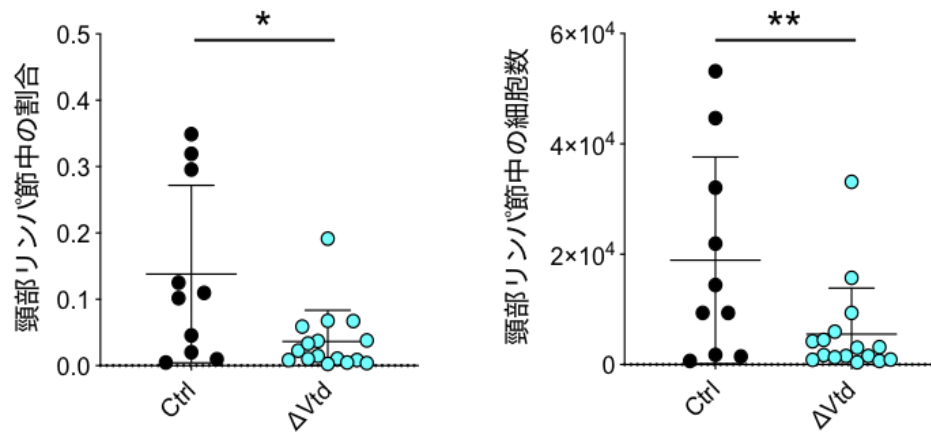


図1. ビタミンD欠乏飼料摂取マウスにおける抗原特異的GC B細胞の誘導

ビタミンD欠乏飼料を2ヶ月以上自由摂取させたマウスに新規肺炎球菌ワクチンを経鼻投与し、その13日後の頸部リンパ節におけるワクチン抗原特異的GC B細胞の割合 (a) と細胞数 (b) をフローサイトメーターにて解析した。Ctrl: コントロール飼料摂取群、ΔVtd: ビタミンD欠乏飼料摂取群、Student's t test * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2. ビタミンD欠乏によるNKTfh細胞誘導への影響について

私たちのこれまでの解析により、当該ワクチンによって誘導される特異的抗体産生誘導には所属リンパ節に誘導されるNKTfh細胞が必要不可欠であることを明らかにしている。そこでビタミンD欠乏飼料摂取により低下したGC B細胞誘導がNKTfh細胞分化誘導障害に起因するか解析した。NKTfh細胞誘導のピークとなる経鼻ワクチン投与5日後の頸部リンパ節を解析したところNKTfh細胞数に顕著な低下が認められた (図 2a)。次いで、NKTfh細胞の機能へのビタミンD欠乏の影響を明らかにするために、経鼻ワクチン投与5日後の頸部リンパ節よりセルソーターを用いてNKTfh細胞を単離し、サイトカイン産生能を解析した。しかし、GC B細胞誘導に重要なサイトカインであるIL-4の産生能には変化が認められなかった (図 2b)。このことから、ビタミンD欠乏によるGC B細胞誘導の低下は、NKTfh細胞のIL-4産生への影響ではなく、NKTfh細胞の誘導の障害によってもたらされた可能性が示唆された。

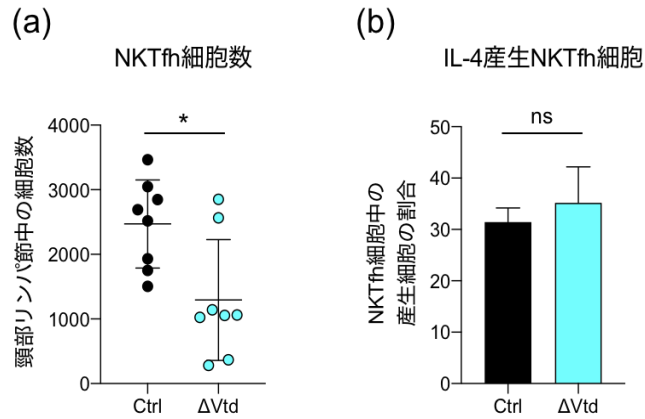


図2. ビタミンD欠乏飼料摂取マウスにおけるNKTfh細胞の誘導とサイトカイン産生
 ビタミンD欠乏飼料を2ヶ月以上自由摂取させたマウスに新規肺炎球菌ワクチンを経鼻投与し、その5日後の頸部リンパ節におけるNKTfh細胞数 (a) とIL-4の産生 (b) を、フローサイトメーターを用いて解析した。Ctrl: コントロール飼料摂取群、ΔVtd: ビタミンD欠乏飼料摂取群、Student's t test * $P < 0.05$ 、ns: not significant。

3. 活性化ビタミンD投与によるNKTfh細胞誘導亢進の有無について

当該ワクチンの効果はNKTfh細胞の誘導効率に依存することから、活性化ビタミンDの摂取はワクチン効果を増幅する可能性がある。過去の研究報告では、活性化ビタミンD投与によって、活性化T細胞からのサイトカイン産生を制御することが可能であり、複数の病態モデルでの効果が示されている。そこで、活性化ビタミンDであるカルシトリオールを連日経鼻投与し、ワクチン投与によって誘導されるNKTfh細胞分化への影響を解析した。しかし、カルシトリオールの過剰量の投与にも関わらず、NKTfh細胞数の増加は認められなかった (図3)。このことから、ビタミンDはNKTfh細胞の分化に重要な役割を担うものの、過剰量の投与によりNKTfh細胞分化の増強効果をもたらすものではないことが示唆された。

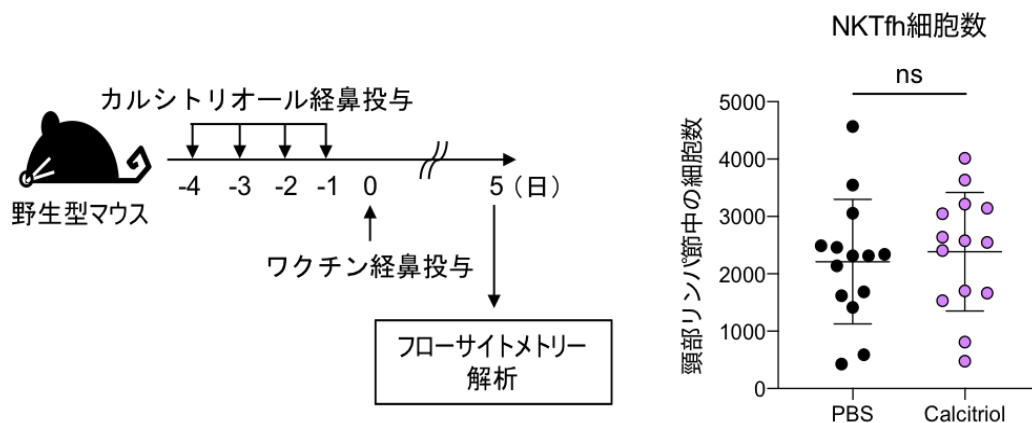


図3. NKTfh細胞誘導における活性化ビタミンD投与の影響
 カルシトリオールを過剰量、4日間連日経鼻投与したマウスに新規肺炎球菌ワクチンを経鼻投与し、その5日後の頸部リンパ節におけるNKTfh細胞数をフローサイトメーターにて解析した。
 Student's t test、ns: not significant。

4. ビタミンD投与によるリンパ節のNKT細胞サブセットバランスの変化

NKTfh細胞はワクチン投与によって頸部リンパ節に局在するNKT細胞から分化することが示唆されている。近年の報告により、NKT細胞は産生するサイトカインの特徴からTh1細胞やTh2細胞のようにNKT1細胞（IFN γ 産生）、NKT2細胞（IL-4産生）およびNKT17細胞（IL-17A産生）のサブセットに分類できることが示された[5]。現段階では、各々のNKT細胞サブセットのNKTfh細胞への分化能や効率などは明らかになっていない。しかし、脾臓とリンパ節ではNKTfh細胞分化効率に差があることより、組織におけるNKT細胞サブセットのバランスがNKTfh細胞分化に影響している可能性が示唆される。そこで私たちは、ビタミンD欠乏がNKTサブセットバランスに及ぼす影響を解析するとともに、NKTfh細胞分化に影響を与えるかどうか解析を行った。ビタミンD欠乏飼料を摂取させたマウスの一次リンパ組織（骨髄・胸腺）ならびに二次リンパ組織（脾臓・リンパ節）におけるNKTサブセットバランスを解析したところ、興味深いことに、末梢のリンパ節においてのみNKT17細胞の割合が増加していることが明らかとなった（図4）。さらに単離したリンパ節NKT細胞の*in vitro*培養においてカルシトリオール存在下ではNKT17細胞増加が抑制されることが示された（Data not shown）。以上のことから、ビタミンD欠乏によってリンパ節におけるNKT細胞サブセットバランスの恒常性が乱れることがNKTfh細胞の誘導に影響を及ぼす可能性が示唆された。

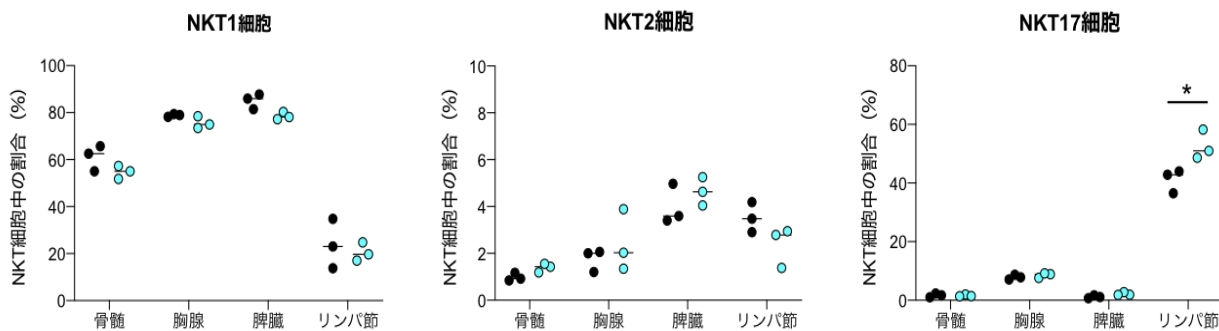


図4. ビタミンDの有無によるNKT細胞サブセットバランスの変化

ビタミンD欠乏飼料を2ヶ月以上自由摂取させたマウスの骨髄、胸腺、脾臓、リンパ節を単離し、各NKTサブセットをフローサイトメーターにて解析した。黒：コントロール飼料摂取群、水色：ビタミンD欠乏飼料摂取群、Student's t test、*P<0.05。

考 察

近年、インフルエンザウイルス感染に対する生体内の抗体産生応答においてNKT細胞が極めて重要であることが報告され、NKT細胞の生理的な重要性に注目が集まっている[6]。私たちが樹立したNKT細胞活性化を介する新規肺炎球菌ワクチンは強力な抗体産生応答を誘導して、長期に渡る抗体産生を誘導することからNKT細胞の機能を効果的に誘導した結果と考えられる。本研究によって、ビタミンDはNKT細胞介在性の抗体応答において、そのポテンシャルを最大限引き出す上で重要であることが示唆された。しかしながら、本研究での解析はすべて個体全体での変化を追ったものであり、ビタミンDの作用をNKT細胞特異的に解析したものではない。NKT細胞はその分化成熟にビタミンDを必要とすることから、末梢NKT細胞におけるビタミンDの重要性を解析する上ではNKT細胞特異的かつ時期特異的VDR欠損マウスの樹立が必要となり、現在、そのマウスの樹立を計画している。これまでのNKT細胞の研究分野では、NKT細胞は胸腺で分化成熟しており、末梢のNKT細胞の未分化性についてはアプローチされてこなかった。しかし、近年の報告ではNKT細胞は各々の組織に定着し適切なサブセットバランスを保つように分化成熟を完了するといった概念が生まれつつある。本研究ではそのようなサブセットバランスにビタミンDが影響をあたえる可能性を示唆する結果も得られており、新規肺炎球菌ワクチンの作用機序におけるビタミンDの重要性のみならず、末梢NKT細胞のサブセットバランスにおけるビタミンDの新たな作用の存在が示唆された。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、研究代表者が主宰する細菌学講座の林崎浩史助教ならびに大学院生の上井康寛氏、東京慈恵会医科大学感染制御部の李広烈助教である。本研究にご支援賜りました上原記念生命科学財団に心より御礼を申し上げます。

文 献

- 1) Holick MF. Vitamin D deficiency. N Engl J Med. 2007; 357(3):266-81. PMID: 17634462 DOI: 10.1056/NEJMr070553
- 2) Charoenngam N, Holick MF. Immunologic Effects of Vitamin D on Human Health and Disease. Nutrients. 2020; 12(7):2097. PMID: 32679784 DOI: 10.3390/nu12072097.
- 3) Cantorna MT, Snyder L, Lin YD, Yang L. Vitamin D and 1,25(OH)₂D regulation of T cells. Nutrients. 2015; 7(4):3011-21. PMID: 25912039 DOI: 10.3390/nu7043011.
- 4) Yu S, Cantorna MT. The vitamin D receptor is required for iNKT cell development. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105(13):5207-12. PMID: 18364394 DOI: 10.1073/pnas.0711558105.
- 5) Crosby CM, Kronenberg M. Tissue-specific function of invariant natural killer T cells. Nat Rev Immunol. 2018; 18(9):559-574. PMID: 29967365 DOI: 10.1038/s41577-018-0034-2.
- 6) Gaya M, Barral P, Burbage M, Aggarwal S, Montaner B, Warren Navia A, Aid M, Tsui C, Maldonado P, Nair U, Ghneim K, Fallon PG, Sekaly RP, Barouch DH, Shalek AK, Bruckbauer A, Strid J, Batista FD. Cell. 2018; 172(3):517-533.e20. PMID: 29249358 DOI: 10.1016/j.cell.2017.11.036.