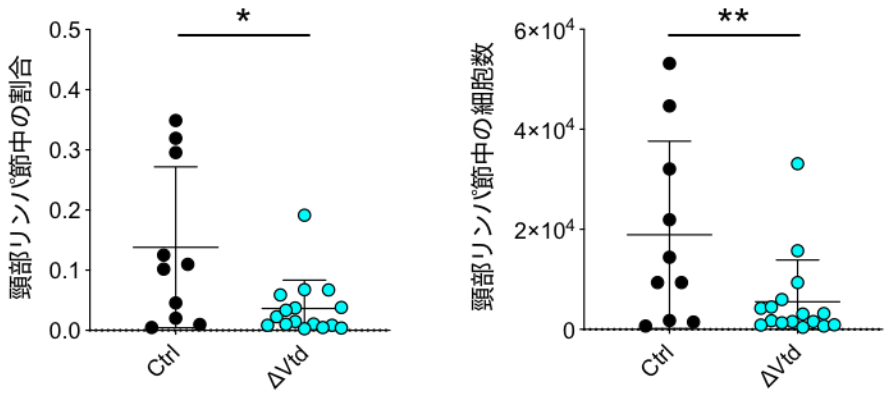
8　予防医学としてのビタミンDの免疫及び感染防御作用	金城　雄樹

【目的】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。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。とりわけビタミンD は T 細胞からの IFNγや IL-17 産生を負に制御することが報告されており、病態形成において種々の炎症性サイトカインが重要とされる様々な疾患の予防に重要であることが示唆されている。しかし、感染症を予防するワクチンの免疫応答におけるビタミンD の重要性に関しては明らかになっていない。

【方法】これまでに私たちは、生体内のナチュラルキラーT 細胞（NKT 細胞）というリンパ球の活性化を利用した新規肺炎球菌ワクチンを樹立している。そこで、当該ワクチン経鼻投与によって誘導される抗体産生応答においてビタミンD の作用を明らかにする目的で、ビタミンD 欠乏飼料を長期摂取させたマウスを用いて解析を行った。また、活性型ビタミンD であるカルシトリオールを経鼻投与することで、ワクチン効果への影響を調べた。

【結果】長期のビタミン D 欠乏飼料摂取により、当該ワクチン効果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。また、この低下は当該ワクチンの効果をもたらすキープレーヤーである濾胞性ヘルパーNKT 細胞（NKTfh 細胞）分化が損なわれていることによる可能性が示唆された。一方で、活性型ビタミン D であるカルシトリオールの過剰摂取は NKTfh 細胞分化誘導を促進することはなかった。そのことから、ビタミンD はNKTfh 細胞分化に重要な役割を担うものの、過剰量投与により 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。実際に、所属リンパ節ではビタミン D 欠乏飼料摂取により NKTfh 細胞分化の基盤となる NKT 細胞サブセットバランスが乱れており、このことが当該ワクチン効果を損なう一つの原因となっている可能性が考えられた。これらの結果は、NKT 細胞が介在する当該ワクチンの作用におけるビタミン D の重要性を示すのみならず、ビタミン D が末梢の NKT 細胞サブセットバランスに影響を及ぼすことが示唆された。今後のワクチンへの応用及び免疫学的に重要な知見に繋がる可能性が示唆される。

ビタミンD 欠乏飼料接種マウスにおける抗原特異的GC B 細胞の誘導低下



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 IFNγ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。

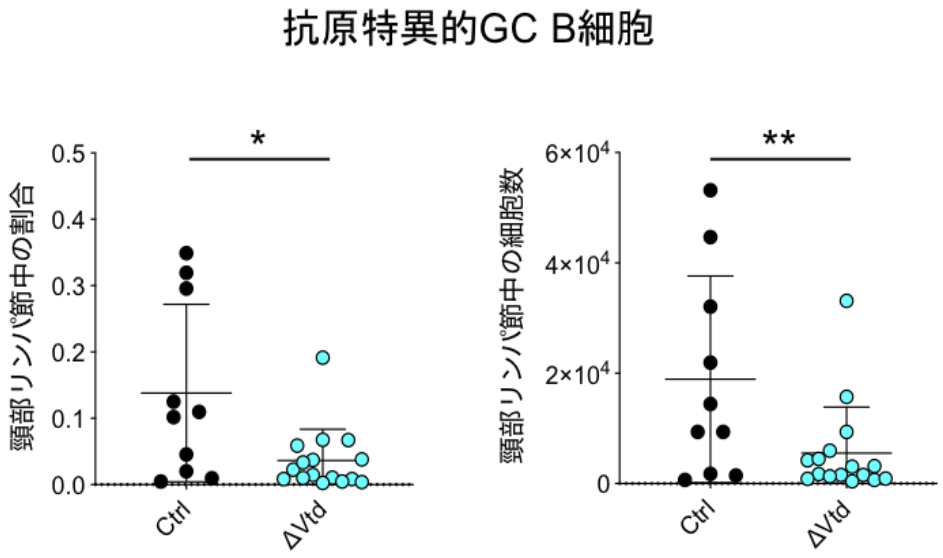


図1. ビタミンD欠乏飼料摂取マウスにおける抗原特異的GC B細胞の誘導
ビタミンD欠乏飼料を2ヶ月以上自由摂取させたマウスに新規肺炎球菌ワクチンを経鼻投与し、その13日後の頸部リンパ節におけるワクチン抗原特異的GC B細胞の割合（a）と細胞数（b）をフローサイトメーターにて解析した。Ctrl：コントロール飼料摂取群、ΔVtd：ビタミンD欠乏飼料摂取群、Student's t test *P＜0.05、**P＜0.01。

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。

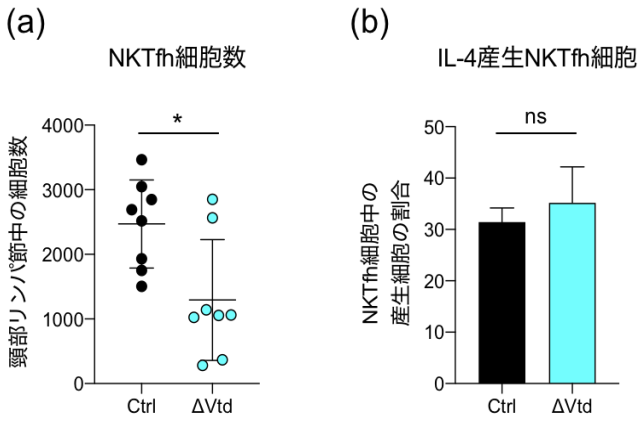


図2. ビタミンD欠乏飼料摂取マウスにおけるNKTfh細胞の誘導とサイトカイン産生
ビタミンD欠乏飼料を2ヶ月以上自由摂取させたマウスに新規肺炎球菌ワクチンを経鼻投与し、その5日後の頸部リンパ節におけるNKTfh細胞数（a）とIL-4の産生（b）を、フローサイトメーターを用いて解析した。Ctrl：コントロール飼料摂取群、ΔVtd：ビタミンD欠乏飼料摂取群、Student's t test *P＜0.05、ns：not significant。

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。

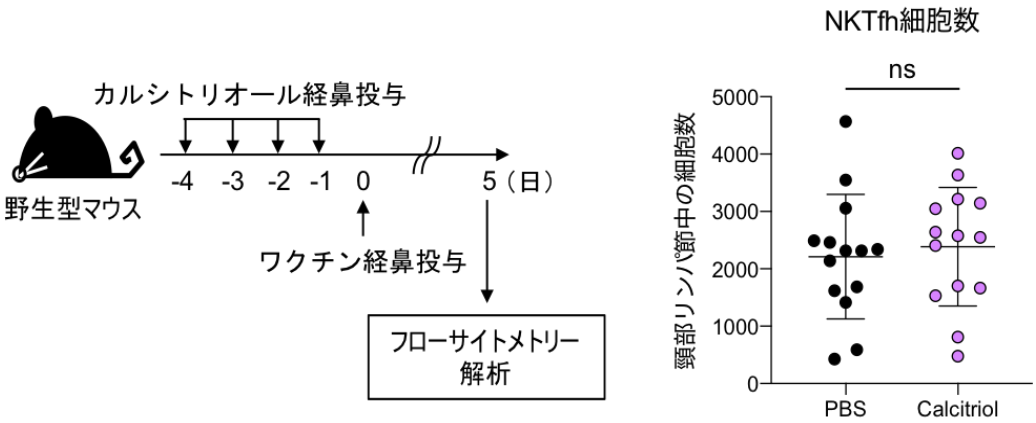


図3. NKTfh細胞誘導における活性化ビタミンD投与の影響
カルシトリオールを過剰量、4日間連日経鼻投与したマウスに新規肺炎球菌ワクチンを経鼻投与し、その5日後の頸部リンパ節におけるNKTfh細胞数をフローサイトメーターにて解析した。
Student's t test、ns：not significant。

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（IFNγ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。

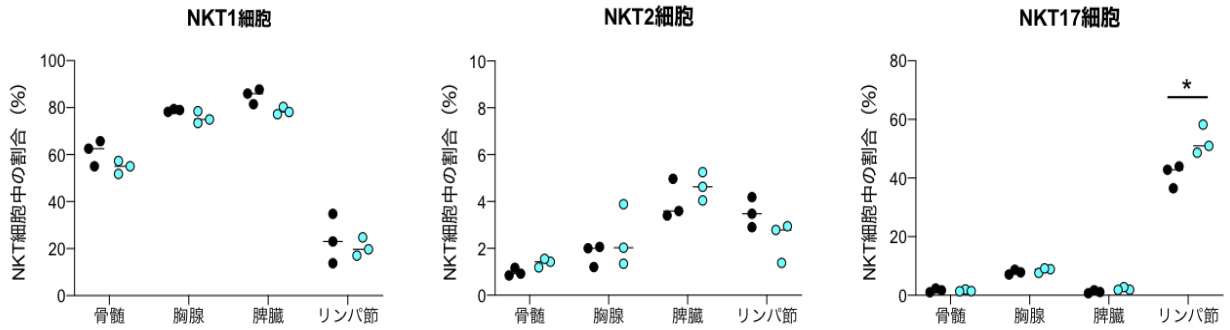


図4. ビタミンDの有無によるNKT細胞サブセットバランスの変化
ビタミンD欠乏飼料を2ヶ月以上自由摂取させたマウスの骨髄、胸腺、脾臓、リンパ節を単離し、各NKTサブセットをフローサイトメーターにて解析した。黒：コントロール飼料摂取群、水色：ビタミンD欠乏飼料摂取群、Student's t test、*P＜0.05。

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/NEJMra070553
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 Scie 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.