

氏名（本籍）	はたなか ひろしげ 畑中 浩成（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 271 号
学位授与の日付	平成 28 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	ヒト末梢血単核細胞の増殖、サイトカイン産生、および制御性 T 細胞に及ぼすビタミン K 類の効果に関する研究
論文審査委員	（主査） 教授 平野 俊彦 教授 畝崎 榮 教授 大野 尚仁

## 論文内容の要旨

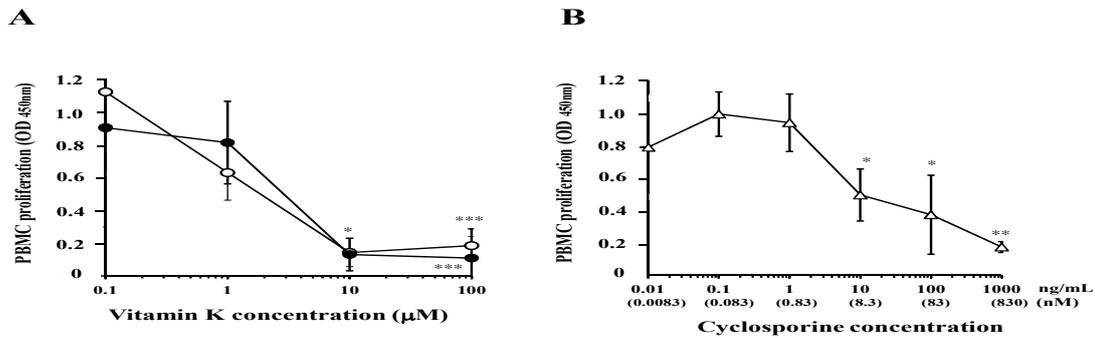
脂溶性ビタミンには、生物活性があることが報告されている。例えばトレチノインは、前骨髄球性白血病に対して分化誘導効果が知られている。またトコフェロールには、乳癌や大腸癌に対する増殖抑制効果、あるいは膀胱癌に対するアポトーシス誘導作用や化学療法感受性増強作用が報告されている。メナキノンやメナジオンなどのビタミン K 類にも、ヒト悪性黒色腫に対する腫瘍増殖抑制やアポトーシス誘導作用があることが示されている。さらには、ビタミン K<sub>2</sub>、K<sub>3</sub>、および K<sub>5</sub> の大腸癌や肝癌モデルに対する抗腫瘍効果も報告されている。ビタミン K 類には、フィロキノン（またはフィトナジオン；K<sub>1</sub>）、メナキノン（またはメナテトレノン；K<sub>2</sub>）、メナジオン（K<sub>3</sub>）、メナジオール（K<sub>4</sub>）および 4-アミノ-2-メチル-1-ナフトール（K<sub>5</sub>）が知られている。このうち臨床で用いられているのは、血液凝固促進薬のフィロキノンと骨粗鬆治療薬のメナキノンであるが、その他のビタミン K は臨床に使われていない。

以上の背景を踏まえ、ビタミン K の免疫抑制作用を、臨床に応用することを目標とした。ヒト末梢血単核細胞（PBMC）を用いて検討した。本研究で検討した項目は、T 細胞マイトゲンで刺激した PBMC の 1) 増殖に対する作用、2) アポトーシス誘導作用、3) 各種サイトカイン産生に対する作用、4) および制御性 T 細胞に対する作用、の 4 点である。これらの検討結果からビタミン K 類の免疫系に及ぼす作用機序を考察した。

### 1 マイトゲンで刺激した末梢血単核細胞の増殖に及ぼすビタミン K 類の効果

T 細胞マイトゲンであるコンカナバリン A で刺激した PBMC の *in vitro* での増殖に対するビタミン K 類（ビタミン K<sub>1</sub> ~ K<sub>3</sub>、および K<sub>5</sub>）の効果を検討した（Fig.1）。コンカナバリン A および種々の濃度の各種ビタミン K 類存在下に、健常者由来の PBMC を 96 時間培養し、増殖した細胞を WST アッセイ法により解析した。ビタミン K<sub>1</sub> には、PBMC 増殖に対する抑制作用はなかった。ビタミン K<sub>2</sub> は、用量依存的に PBMC 増殖を抑制し、その IC<sub>50</sub> 値（SD）は 20.7（25.9） $\mu$ M であった（n=6）。一方ビタミン K<sub>3</sub> と K<sub>5</sub> は用量依存的に、より強く PBMC の T 細胞マイトゲン応

答性増殖を抑制した (Fig. 1A)。IC<sub>50</sub> 値はいずれも 10  $\mu$ M 未満であり、100  $\mu$ M では有意に PBMC 増殖を抑制した ( $p < 0.001$ )。ビタミン K<sub>5</sub> は、10  $\mu$ M でも PBMC 増殖を有意に抑制した ( $p < 0.05$ )。シクロスポリンは、同様に用量依存的にコンカナバリン A で刺激した PBMC の増殖を抑制し、その効果は 10 ng/mL 以上の濃度で有意であった (Fig. 1B)。



**Fig. 1B,C** B: Effects of VK3 and VK5 on proliferation of human PBMCs activated with concanavalin A in vitro. C: Cyclosporine as a positive control

## 2 末梢血単核細胞のアポトーシス細胞率に及ぼすビタミン K<sub>3</sub> と K<sub>5</sub> の効果

次に、コンカナバリン A で刺激した PBMC におけるアポトーシス細胞の割合に及ぼすビタミン K 類の効果を検討した。ビタミン K 類のうち T 細胞マイトゲン応答性の PBMC 増殖に及ぼすビタミン K 類の効果の中ではビタミン K<sub>3</sub> と K<sub>5</sub> の効果が強かったため、以降はこれら 2 つのビタミン K 類の作用をより詳細に検討することにした。ビタミン K 類存在下にコンカナバリン A で刺激した PBMC をアネキシン V と PI で染色し、アネキシン V 陽性/PI 陰性細胞をアポトーシス細胞としてフローサイトメトリーで解析した。まず PBMC 中のリンパ球分画をゲーティングし、次にこの細胞分画におけるアポトーシス細胞数を計測した。ビタミン K 類未処理のコントロール PBMC と比較し、有意差はないが高濃度 (10–100  $\mu$ M) のビタミン K<sub>3</sub> あるいは K<sub>5</sub> で処理した PBMC では、アポトーシス細胞率が高い傾向にあった (Fig. 2B)。

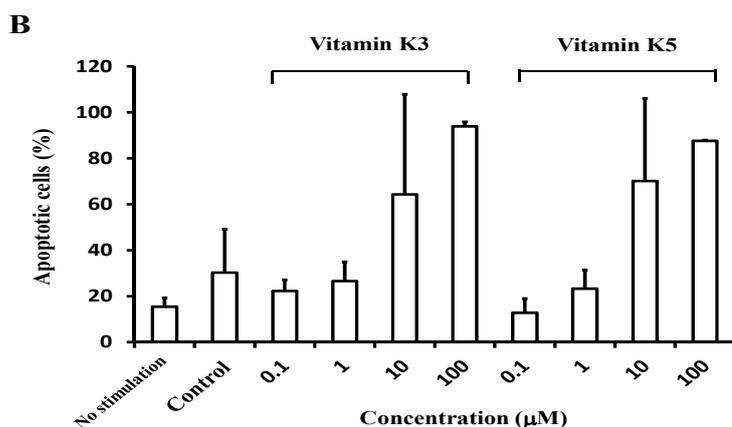
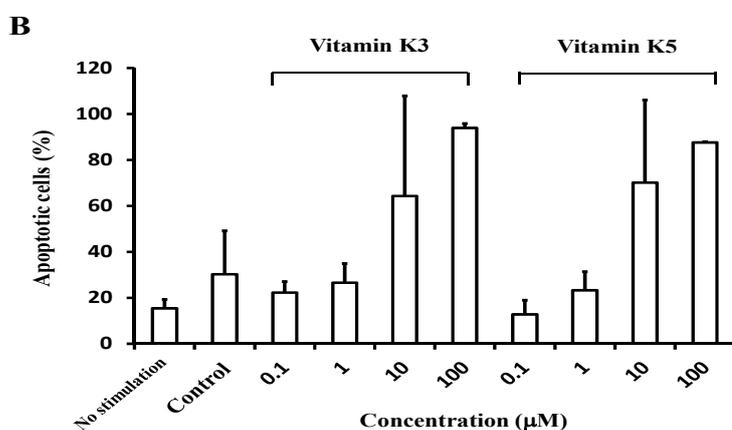


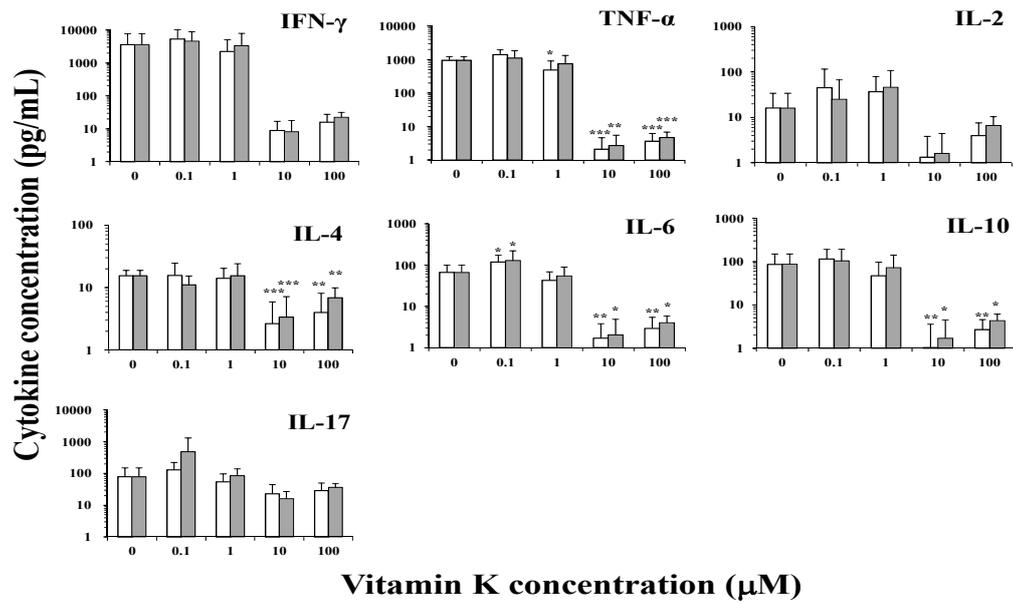
Fig. 2B



**Fig. 2** Cytokine concentrations in the supernatant of T-cell mitogen activated PBMCs treated with VK derivatives. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  as compared to each control.

### 3 末梢血単核細胞から Th1/Th2/Th17 系サイトカイン産生に及ぼすビタミン K<sub>3</sub>と K<sub>5</sub>の効果

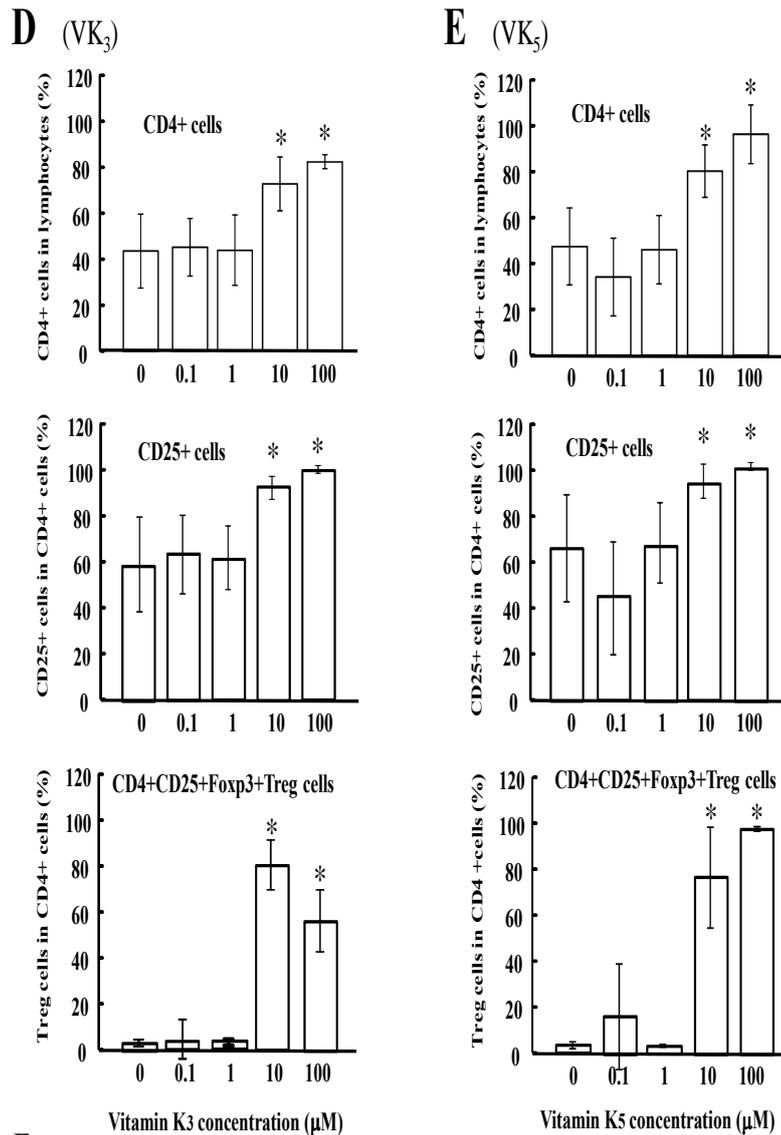
T細胞マイトゲンで刺激した PBMC からの、7種の Th1/Th2/Th17 系サイトカイン (IFN  $\gamma$ 、TNF  $\alpha$ 、IL - 2、 - 4、 - 6、 - 10、および - 17) の産生に及ぼす 0.1–100  $\mu$  M のビタミン K<sub>3</sub>と K<sub>5</sub>の効果を検討した (Fig. 3)。いずれのサイトカインも、両ビタミン K 類の高用量 (10–100  $\mu$  M) を用いた場合に、産生が抑制される傾向を示した。TNF  $\alpha$ 、IL - 4、 - 6、および - 10 の産生は、10–100  $\mu$  M のビタミン K<sub>3</sub>あるいは K<sub>5</sub>で処理した場合に有意に抑制された ( $p < 0.05$ )。ビタミン K<sub>3</sub>は、1  $\mu$  M の濃度でも、TNF  $\alpha$  の産生を有意に抑制した ( $p < 0.05$ ) 一方 IFN  $\gamma$ 、IL - 2、および IL - 17 産生に対しては、いずれのビタミン K 類の効果も有意ではなかった。なお、0.1  $\mu$  M のビタミン K<sub>3</sub>と K<sub>5</sub>は、いずれも有意に IL - 6 の産生を増加させた ( $p < 0.05$ )。



**Fig. 3** Flow cytometric analysis of CD4+CD25+Foxp3+ cells (Treg cells) in concanavalin A-stimulated PBMCs treated with VK derivatives. \*p<0.001 as compared to each control (VK 0μM).

#### 4 末梢血単核細胞における制御性 T 細胞率に及ぼすビタミン K<sub>3</sub> と K<sub>5</sub> の効果

最後に、コンカナバリン A で刺激した PBMC における、CD4 陽性細胞（主にヘルパー T 細胞）、CD25 陽性細胞（インターロイキン-2 受容体 α 鎖を有する細胞）および CD4 陽性/CD25 陽性/FoxP3 陽性細胞（制御性 T 細胞）の割合に及ぼすビタミン K 類の効果を検討した (Fig. 4)。PBMC 中のリンパ球分画をゲーティングした後、この中の CD4 陽性細胞をさらにゲーティングし、CD25 陽性かつ FoxP3 陽性の細胞を制御性 T 細胞として、その割合をそれぞれ求めた。0.1–100 μM のビタミン K<sub>3</sub> あるいは K<sub>5</sub> で処理した PBMC における CD4 陽性細胞 (Fig. 4D、E 上)、CD25 陽性細胞 (Fig. 4D、E 中)、および制御性 T 細胞として (Fig. 4D、E 下) の割合を各々示す。10–100 μM のビタミン K<sub>3</sub> あるいは K<sub>5</sub> で処理した PBMC では、これらの細胞の割合が有意に増加した (p<0.001)。特に、制御性 T 細胞の割合の増加は著しかった。



**Figs. 4D, E**

Flow cytometric analysis of CD4+ cells, CD25+ cells, and CD4+ CD25+Foxp3+ cells (Treg cells) (%) in concanavalin A-stimulated PBMCs treated with VK 3(D) and VK5 (E).

### 総括

本研究では、ビタミン K 類の免疫抑制作用を臨床に応用することを目的とし、T 細胞マイトゲン刺激した PBMC に対するビタミン K<sub>1</sub>、K<sub>2</sub>、K<sub>3</sub>、および K<sub>5</sub> の効果を検討し、以下の知見を得た。

1. ビタミン K<sub>2</sub>、K<sub>3</sub> および K<sub>5</sub> は用量依存的に PBMC の T 細胞マイトゲン応答性増殖を抑制した。特にビタミン K<sub>3</sub> と K<sub>5</sub> の PBMC 増殖抑制作用が強かった。
2. ビタミン K<sub>3</sub> あるいは K<sub>5</sub> で処理した PBMC では、アポトーシス細胞率が高い傾向にあった。
3. ビタミン K<sub>3</sub> と K<sub>5</sub> は、TNF $\alpha$ 、IL - 4、- 6、および - 10 の産生を有意に抑制した。
4. ビタミン K<sub>3</sub> と K<sub>5</sub> は、PBMC における制御性 T 細胞の比率を有意に増加させた。

以上の結果から、ビタミン K 類は活性化 T 細胞増殖とサイトカイン産生を抑制し、またエフェクター T 細胞などのアポトーシスを誘導し結果的に制御性 T 細胞率を増加させることによって、

過剰な免疫反応を減弱させるものと考えられた。本研究結果は、ビタミン K 類を新たな免疫抑制薬として臨床で使用する可能性を新たに提示した。

【研究結果の掲載誌】 *Life Sciences* 99; 61–68:2014

## 論文審査の結果の要旨

多くの脂溶性ビタミンには、各種ビタミンとしての作用の他に、種々の生物活性があることが報告されている。中でもビタミン K 類を含めた脂溶性ビタミンの抗腫瘍効果を示す所見は多いが、ヒト免疫細胞に対するビタミン K 類の効果を調べた研究は少ない。

畑中浩成氏は本研究において、ビタミン K 類が免疫系に及ぼす効果を、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を用いて検討した。本研究では、T 細胞マイトゲンで刺激した PBMC の 1) 増殖に対する作用、2) アポトーシス誘導作用、3) 各種サイトカイン産生に対する作用、4) および制御性 T 細胞に対する作用、の 4 点について精査している。本論文では、これらの検討結果からビタミン K 類の免疫系に及ぼす作用機序を考察し、さらにビタミン K 類を免疫抑制薬として臨床で使用する可能性について言及した。

本研究ではまず、T 細胞マイトゲンであるコンカナバリン A で刺激した PBMC の、*in vitro* 増殖に対するビタミン K 類 (ビタミン K1 ~ K3、および K5) の効果を検討した。ビタミン K1 には、PBMC 増殖に対する抑制作用はなかったが、ビタミン K2、K3 および K5 は PBMC の T 細胞マイトゲン応答性増殖を抑制し、特に K3 と K5 はこの効果が顕著であることを見出した。

次に、コンカナバリン A で刺激した PBMC におけるアポトーシス細胞の割合に及ぼすビタミン K 類の効果を検討した。ビタミン K 類未処理のコントロール PBMC と比較し、高濃度 (10–100  $\mu$  M) のビタミン K3 あるいは K5 で処理した PBMC では、アポトーシス細胞率が高い傾向にあることを示した。

次に、T 細胞マイトゲンで刺激した PBMC からの、7 種の Th1/Th2/Th17 系サイトカイン (インターフェロン  $\gamma$ 、TNF  $\alpha$ 、インターロイキン - 2、- 4、- 6、- 10、および - 17) の産生に及ぼす 0.1–100  $\mu$  M のビタミン K3 と K5 の効果を検討した。TNF  $\alpha$ 、インターロイキン - 4、- 6、および - 10 の産生は、10–100  $\mu$  M のビタミン K3 あるいは K5 で処理した場合に有意に抑制されることを明らかとした。

最後に、コンカナバリン A で刺激した PBMC における、CD4 陽性細胞、CD25 陽性細胞および CD4 陽性/CD25 陽性/FoxP3 陽性細胞 (制御性 T 細胞) の割合に及ぼすビタミン K 類の効果を検討した。その結果、10–100  $\mu$  M のビタミン K3 あるいは K5 で処理した PBMC では、これらの細胞の割合が増え、特に制御性 T 細胞率の増加が著しいことを示した。

以上本論文は、ビタミン K 類が活性化 T 細胞増殖とサイトカイン産生を抑制し、またエフェクター T 細胞などのアポトーシスを誘導して結果的に制御性 T 細胞率を増加させることによって、過剰な免疫反応を減弱させることを示した。このように本論文は、ビタミン K 類のヒト免疫系細胞に対する抑制作用を初めて示し、さらにはビタミン K 類を免疫抑制薬として臨床で使用する可能性を新たに提示した点で、博士 (薬学) の学位に十分値するものと判断した。