

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

畑中 浩成
東京薬科大学 博士論文
(2015 年度)

目次

要旨	1
略語一覧	5
緒言	6
本文	
第 1 節・序論	8
第 2 節・方法	8
2.1 試薬	8
2.2 被験者	8
2.3 PBMC の分離と PBMC のマイトゲン応答性増殖に対する効果の検討	9
2.4 PBMC 培養上清中の各種サイトカインの定量分析	11
2.5 ビタミン K 処理した PBMC 中のアポトーシス細胞の分析	11
2.6 CD4 陽性、CD25 陽性、Foxp3 陽性、制御性 T 細胞の分析	12
2.7 統計解析	13
第 3 節・結果	14
3.1 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	14
3.2 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 ₃ と K ₅ の効果	15
3.3 末梢血単核細胞からの Th1/Th2/Th17 系サイトカイン産生に及ぼすビタミン K ₃ と K ₅ の効果	16
3.4 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 ₃ と K ₅ の効果	17
第 4 節・考察	20
総括	23
謝辞	25
文献	26

略語一覧

CD: cluster of differentiation 分化抗原クラスター

FITC: fluorescein isothiocyanate フルオレセインイソチオシアネート (蛍光色素の一種)

APC: allophycocyanin (蛍光色素の一種)

Foxp3: forkhead box protein 3 フォークヘッドボックスタンパク質 3

IFN γ : interferon γ インターフェロン γ

IL: interleukin インターロイキン

MAPK: mitogen-activated protein kinase マイトゲンで活性化されるタンパクキナーゼ MAP kinase

PBMC: peripheral-blood mononuclear cell 末梢血単核細胞

PE: phycoerythrin フィコエリスリン (蛍光色素の一種)

PI : propidium iodide ヨウ化プロピジウム

Treg: regulatory T cell 制御性 T 細胞

Th: helper T cell ヘルパー T 細胞

WST-8: 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt

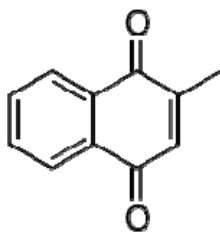
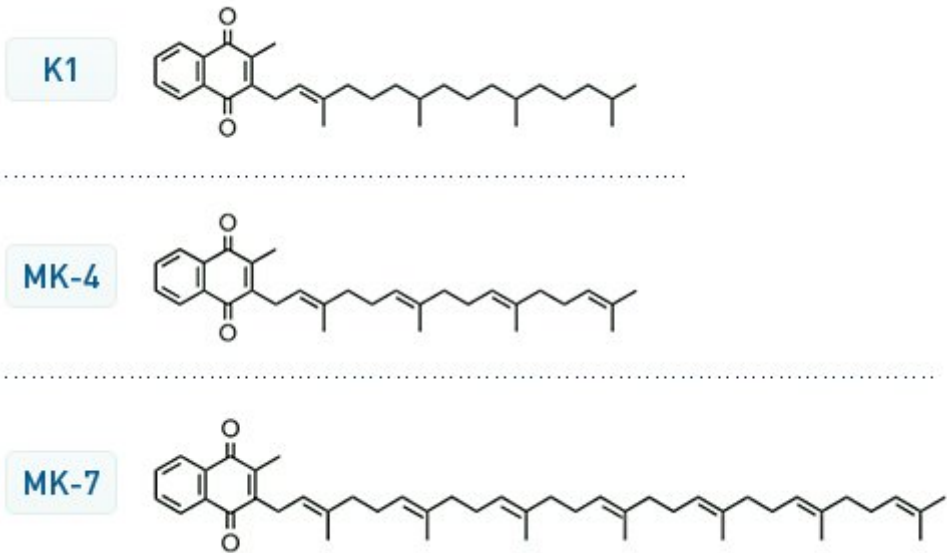
TNF α : tumor necrosis factor 腫瘍壊死因子

緒 言

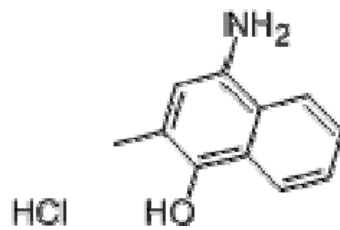
多くの脂溶性ビタミンには、各種ビタミンとしての作用の他に、抗腫瘍作用があることが報告されている (Ishibashi ら 2011 年; Chiang ら 2013 年; Paroni ら 2012 年; Wang ら 2013 年)。例えばトレチノインは、前骨髄球性白血病に対して分化誘導作用が知られている (Komura ら 2007 年)。またトコフェロールには、乳癌や大腸癌に対する増殖抑制作用、あるいは膀胱癌に対するアポトーシス誘導作用や化学療法感受性増強作用が報告されている (Kanai ら 2010 年)。メナキノンやメナジオンなどのビタミン K 類にも、ヒト悪性黒色腫に対する腫瘍増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 (Ishibashi ら 2011 年)。さらには、ビタミン K₂、K₃、および K₅ 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 (Kuriyama ら 2005 年; Ogawa ら 2007 年; Akiyoshi ら 2009 年)。

このようにビタミン K 類を含めた脂溶性ビタミンの抗腫瘍作用を示す所見は多いが、ヒト免疫細胞に対するビタミン K 類の作用を調べた研究は少ない (Kohi ら 2011 年)。しかし一方でメナジオン (ビタミン K₃) は、正確なメカニズムはわかっていないものの、酸化還元系に対する作用を介して炎症や免疫反応を抑制することが示唆されている (Checker ら 2011 年)。ビタミン K 類に免疫抑制作用が期待できれば、臓器移植患者や自己免疫疾患患者に適応し、ステロイド剤との併用によりステロイドの副作用である骨粗鬆症を軽減すると共に、免疫抑制作用を増強できる可能性がある。なおビタミン K 類には、フィロキノロン (またはフィトナジオン; K₁)、メナキノン (またはメナテトレノン; K₂)、メナジオン (K₃)、フィチオコール (phthiocol: K₄) および 2-メチル-4-アミノ-1-ナフトール塩酸塩 (K₅) が知られている (図 1)。このうち臨床で用いられているのは、血液凝固薬のフィロキノロンとメナキノンであるが、その他のビタミン K に臨床上の適応はない。

以上の背景を踏まえ、申請者は本研究において、ビタミン K 類が免疫系に及ぼす作用を、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を用いて検討した。本研究にて検討したビタミン K 誘導体の作用に関する検討項目は、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。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。



ビタミンK₃



ビタミンK₅

図1 ビタミンK類の化学構造式 (Wikipedia より引用) MK-4 と MK-7 はいずれもビタミンK₂の一種。

第1節 序 論

申請者が所属する教室では、T細胞マイトゲンで *in vitro* において刺激した患者 PBMC の増殖に対する既存の免疫抑制薬の効果が、これらの薬物の治療効果と一致することを、臓器移植患者や各種自己免疫疾患患者を対象とした研究において確認している (Hirano ら 1995、2006、2007 年)。

そこで本研究においてはまず、T細胞マイトゲンで刺激したヒト PBMC の *in vitro* 増殖に対するビタミン K 類の効果を検討した。検討したビタミン K 類は、ビタミン K₁ ~K₃ および K₅ である。なおメナジオール (ビタミン K₄) はビタミン K₃ の還元体であることから、ビタミン K₃ の効果を検討することで代替した。

続いて、上記 PBMC 増殖に対する顕著な効果が示されたビタミン K 類に対し、さらにその作用機序に関する検討を行った。すなわち、T細胞マイトゲンで刺激したヒト PBMC に対するアポトーシス誘導作用、各種サイトカイン産生抑制作用、および制御性 T 細胞率に対する作用である。

以上の検討結果を踏まえ、免疫抑制薬としてのビタミン K 類の可能性について考察した。

第2節 試薬と方法

2.1 試 薬

RPMI1640 培地と子牛血清は、Gibco 社から購入した。コンカナバリン A は生化学工業から購入した。ビタミン K₁ ~K₃ および K₅ は、Wako Chemical 社から購入し、5mM の濃度となるようエタノールで溶解してこれを原液とした。ビタミン K 類の原液は、使用前にエタノールで作用濃度に溶解した。シクロスポリン A は Novartis Pharma 社より提供されたものを用いた。細胞増殖 WST - 8 分析キットは Promega 社より購入した。BD™ フローサイトメトリービーズアレーヒト Th1/2/17 サイトカインアッセイキット、ヒト FoxP3 測定キット、ヒト CD4 FITC、CD25 APC、FITC マウス IgG1 κ アイソタイプ (コントロール)、APC マウス IgG1 κ アイソタイプ (コントロール)、および PE マウス IgG1 κ アイソタイプ (コントロール) は、BD Biosciences 社より購入した。アネキシン V-FITC アポトーシス検出 Kit I は、BD PharMingen (米国 San Diego) 社より購入した。

2.2 被験者

本研究は、世界医師会の倫理基準（ヘルシンキ宣言）に則って行った。また本研究は、「東京薬科大学ヒト組織等を研究活用するための倫理委員会」の承認を受けて実施した。健常者 8 名（男 4 名、女 4 名、平均 30.8 歳）を被検者とし、全被験者より文書にてインフォームドコンセントを得た後に、血液検体を入手した。なおすべての被験者は、本研究以前及び研究期間中に免疫疾患の既往が無く、また研究期間中は免疫抑制薬を含めた一切の薬物服用がなかった。

2.3 PBMC の分離と PBMC のマイトゲン応答性増殖に対する効果の検討

静脈血 20mL を午前 9 時 30 分から 11 時 00 分の間に採取し、ヘパリン化した。この採血量 20mL は、PBMC に対するビタミン K 類およびコントロールとして用いるシクロスポリンの作用を検討するための必要最小量である。

市販の RPMI1640 培地に子牛血清を 10% となるように加え、さらにペニシリン 10 万単位およびストレプトマイシン 100mg/L を加えたものを本実験用の培地とし、PBMC の洗浄や培養に用いた。15mL 用量の遠心管に Ficoll-Hypaque 3ml 加えた後、上述のようにして得たヘパリン血 5mL を静かに重層し、これを 1300 x g で 20 分間遠心分離した。遠心後、PBMC を含む中間層のバッフィーコート部分を採取し、これを別の遠心管に入れ、上記培地にて 3 回洗浄した。洗浄後、培地にて 1×10^6 細胞/mL となるように PBMC 懸濁液を希釈し、この細胞懸濁液を以下の培養に用いた（Hirano ら 1995、2006、2007 年）。

まずこの細胞懸濁液 196 μ L を、96 ウェルの平底プラスチックプレートの各ウェルに分注した。T 細胞マイトゲンとしてコンカナバリン A を上述の培地に溶解し、次にその 4 μ L を、培地中の最終濃度が 5 μ g/mL となるよう平底プラスチックプレートの各ウェルに添加した。その後、種々の濃度の各種ビタミン K 類を含んだエタノール溶液を、最終濃度が 0.1–100 μ M となるように添加した。対照のウェルには、4 μ L のエタノールを添加した。プレートは、マイクロミキサーにてよく攪拌後、5%CO₂/ 空気を含むインキュベーター中で、37°C の条件下にて 96 時間培養した。

培養後、cell counting Kit-8 試薬 20 μ L を各ウェルに加えてよく攪拌後、5% CO₂/ 空気を含むインキュベーター中、37°C の条件下にてさらに 2 時間培養した。その後、増殖した PBMC によって産生された色素の吸光度を、マイクロプレートリーダーにて 450nm の波長で測定した（図 2）。コントロールウェルの吸光度を 100% としたときの、種々の濃度の薬物を添加したウェルの吸光度 (%) を求め、用量反応曲線を作成すると共に、細胞増殖を 50% 抑制する薬物濃度 (IC₅₀ 値) を算出した（Hirano ら 1995、2006、2007 年）。

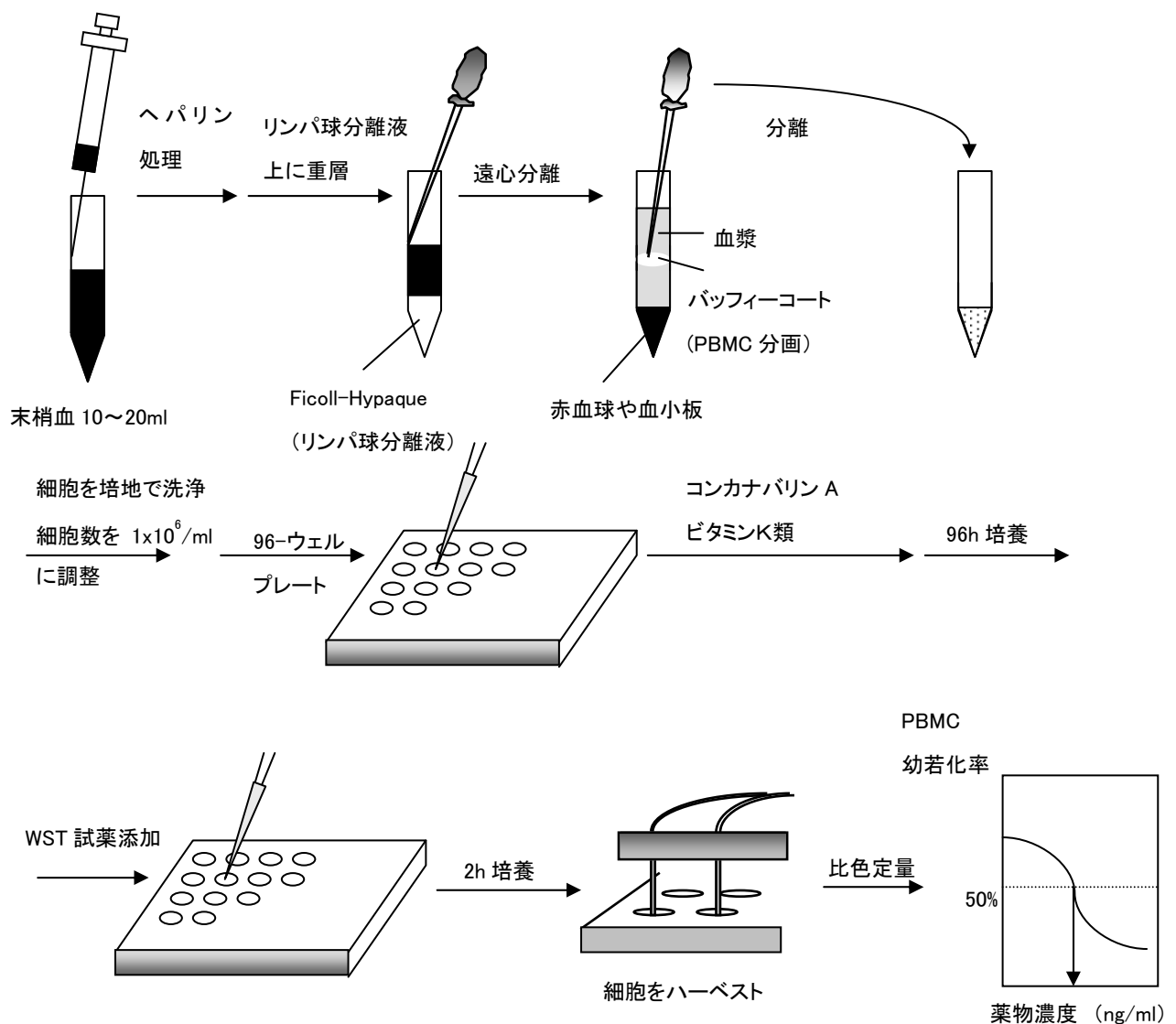


図2 T細胞マイトゲンで刺激したPBMCの増殖に対するビタミンK類の効果の評価方法

Ficoll-Hypaque を加えた遠心管にヘパリン血を静かに重層し、遠心分離した。PBMC を含むバッフィーコートを採取し、培地にて洗浄した。洗浄後、培地にて 1×10^6 細胞/mL となるように希釈し、この細胞懸濁液 $196 \mu\text{L}$ を、96 ウェルの平底プラスチックプレートの各ウェルに分注した。コンカナバリン A を、最終濃度が $5 \mu\text{g/mL}$ となるよう各ウェルに添加し、種々の濃度の各種ビタミン K 類を添加した。マイクロミキサーにて攪拌後、 37°C で 96 時間培養した。培養後、WST 用試薬を加えよく攪拌し、さらに 2 時間培養した。その後、増殖した PBMC によって産生された色素の吸光度を、マイクロプレートリーダーにて測定した。コントロールウェルの吸光度を 100% としたときの、種々の濃度の薬物を添加したウェルの吸光度 (%) を求め、用量反応曲線を作成すると共に、細胞増殖を 50% 抑制

する薬物濃度 (IC₅₀ 値) を算出した。

2.4 PBMC 培養上清中の各種サイトカインの定量分析

PBMC は、2.3 の項に示す方法により、コンカナバリン A と各濃度のビタミン K 類の存在下に 96 時間培養した。培養後、プラスチックプレートを 1300 回転で 5 分間遠心分離した後、細胞が混入しないようにエッペンドルフピペットで培養上清 100 μL を採取し、これをサイトカイン測定用検体として、サイトカイン濃度の測定まで -80°C で保存した。

上記培養上清中のインターフェロン (IFN) γ、腫瘍壊死因子 tumor necrosis factor (TNF) α、インターロイキン (IL) - 2、4、6、10、および 17 の濃度を、フローサイトメトリービーズアレー法により、BD 社発行の操作手順に従って測定した。測定法の原理としては、以上 7 種類のサイトカインに対する色素標識モノクローナル抗体と、これらの抗体が装着されたフローサイトメトリー用ビーズにより各サイトカインをそれぞれサンドイッチし、生成したビーズ-サイトカイン-色素標識抗体複合体を、フローサイトメーターで測定する (図 3)。

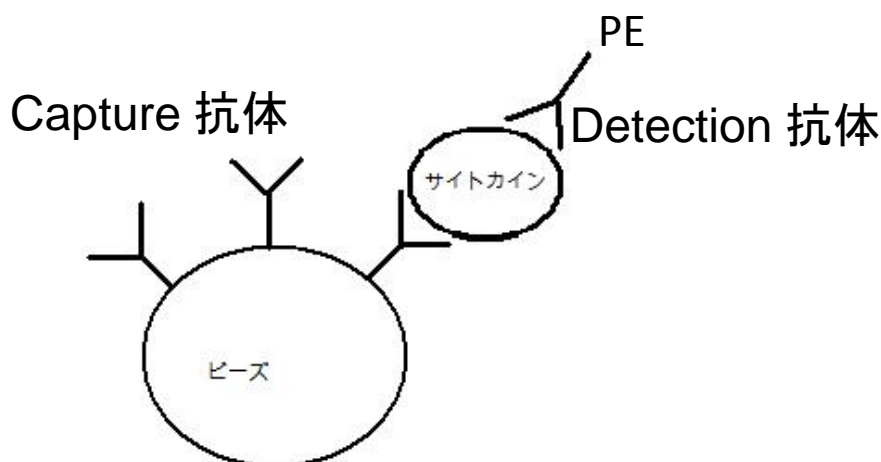


図 3 フローサイトメトリービーズアレー法によるサイトカイン定量の原理 種々の色素で標識した抗サイトカインモノクローナル抗体とこれらの抗体が装着されたフローサイトメトリー用ビーズで、サイトカインをサンドイッチし、生成したビーズ-サイトカイン-色素標識抗体複合体を、フローサイトメーターで測定する。

2.5 ビタミン K 処理した PBMC 中のアポトーシス細胞の分析

2.3 項で述べた方法により、コンカナバリン A 存在下にビタミン K 類で処理した PBMC を培地で 2 回洗浄後、リン酸緩衝生理食塩水を加えて PBMC の再

懸濁液を作成した。この時の細胞密度は 10^6 個/mL とした。

細胞懸濁液中のアポトーシス細胞は、アネキシン V-FITC アポトーシス検出 Kit I を用いて測定した。本細胞懸濁液 $500\ \mu\text{L}$ に、キット試薬のアネキシン V-FITC を $5\ \mu\text{L}$ および propidium iodide (PI) 試薬 $5\ \mu\text{L}$ を添加し、遮光下に室温で 15 分インキュベートとした。このようにアネキシンと PI で細胞を染色した後、細胞をリン酸緩衝生理食塩水で 2 回洗浄して、フローサイトメトリーで分析するまで暗室で氷蔵した。染色した細胞の保存は 1 時間までとし、それ以内に BD 社製のフローサイトメーターを用いて、1 検体あたり 30000 個の細胞を測定した。データは、BD 社の Cell Quest ソフトウェアを用い、BD バイオサイエンス社の FACScanTMII によって解析した。

PBMC のリンパ球分画をゲーティングし、リンパ球分画中のアポトーシス細胞を、アネキシン V 陽性/PI 陰性の細胞として計測した。

2.6 CD4 陽性、CD25 陽性、Foxp3 陽性、制御性 T 細胞の分析

2.3 項に示す方法により、PBMC をコンカナバリン A 存在下にビタミン K 類と共に 96 時間処理した後、細胞をリン酸緩衝生理食塩水で 2 回洗浄した。リン酸緩衝生理食塩水に 10^6 個細胞/mL の細胞濃度となるよう再懸濁させた。この細胞の懸濁液 1mL に対し、APC 標識した抗ヒト CD25 モノクローナル抗体試薬 $20\ \mu\text{L}$ と、FITC 標識した抗ヒト CD4 モノクローナル抗体試薬 $20\ \mu\text{L}$ を各々加えた。一方、FITC 標識したマウス IgG1 κ アイソタイプコントロール抗体 $20\ \mu\text{L}$ と、APC 標識したマウス IgG1 κ アイソタイプコントロール抗体 $20\ \mu\text{L}$ を、対照の細胞ウェルに加えた。この細胞懸濁液を、暗室中室温で 20 分間インキュベートした。インキュベーション後、リン酸緩衝生理食塩水で細胞を洗浄した後、細胞をリン酸緩衝生理食塩水 1mL で再懸濁させた。その後フローサイトメトリーで分析した。

データは、Cell Quest ソフトウェアを用いて FACScanTMII により分析した。リンパ球分画の CD4 陽性細胞をゲーティングして、CD4 陽性細胞分画のうち、制御性 T 細胞として、CD4 陽性、CD25 陽性、かつ Foxp3 陽性の細胞の割合を計測した(図 4)

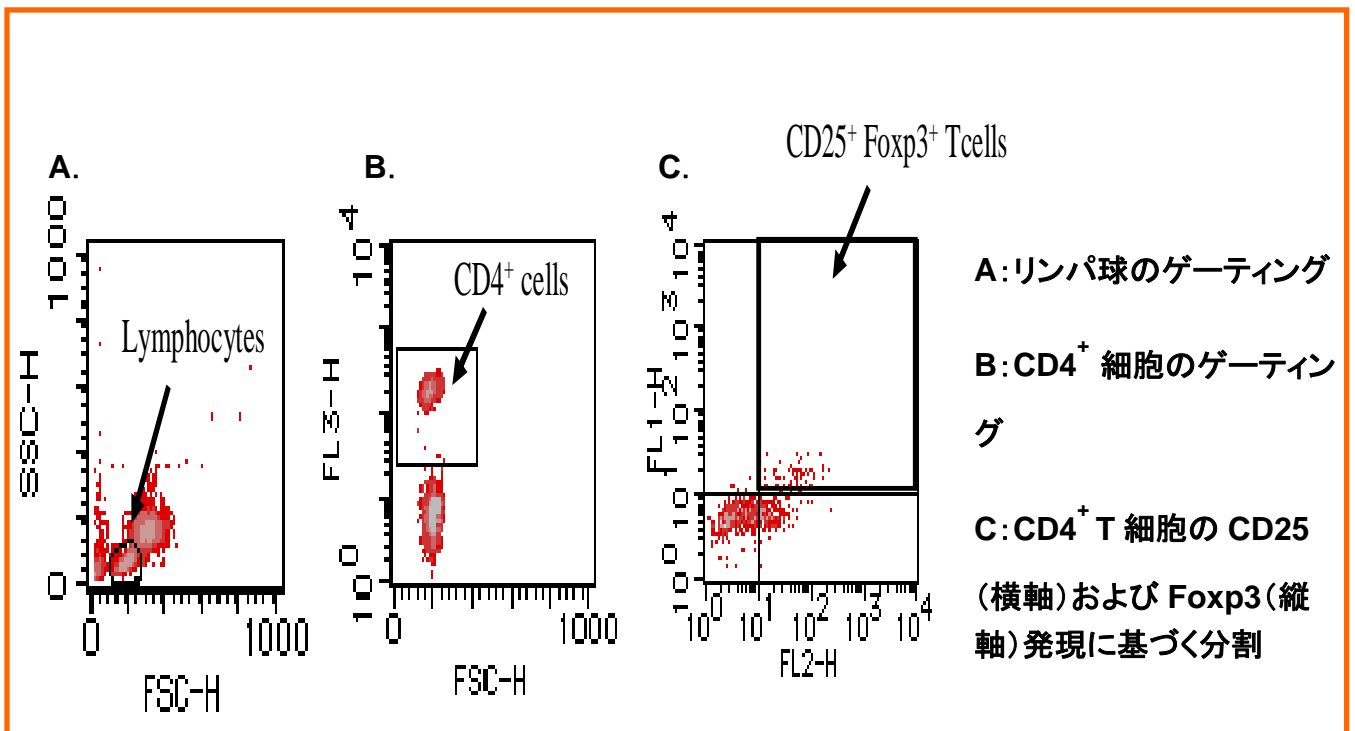


図4 PBMC中のCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg細胞のフローサイトメトリー解析

2.7 統計解析

種々の濃度のビタミンK類がPBMC増殖に及ぼす効果、培養上清中のサイトカインの量に及ぼす効果、およびPBMC中のCD4陽性細胞や制御性T細胞の割合に及ぼす効果を、各々のコントロールと比較する場合、ボンフェローニ検定により解析した。また、WSTアッセイで検討したビタミンK類処理PBMCの増殖率とPBMC培養上清中のサイトカイン濃度との相関は、スピアマン検定により解析した。これらの統計解析は、グラフパッドプリズム40(米国サンディエゴGraphPad Software Inc.)を用いて行なった。いずれの場合も、両側検定で危険率0.05以下を有意差有りとした。

第3節 結果

3.1 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

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（図5）。

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K₁には、PBMC増殖に対する抑制作用は認められなかった（データ未表示）。ビタミンK₂は、用量依存的にPBMC増殖を抑制し、そのIC₅₀値（SD）は20.7（25.9） μ Mであった（n=6）。一方ビタミンK₃とK₅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（図5A）。IC₅₀値はいずれも10 μ M未満であり、100 μ Mでは有意にPBMC増殖を抑制した（p<0.001）。ビタミンK₅は、10 μ MでもPBMC増殖を有意に抑制した（p<0.05）。

免疫抑制薬として汎用されるシクロスポリンは、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10ng/mL以上の濃度で有意であった（図5B）。

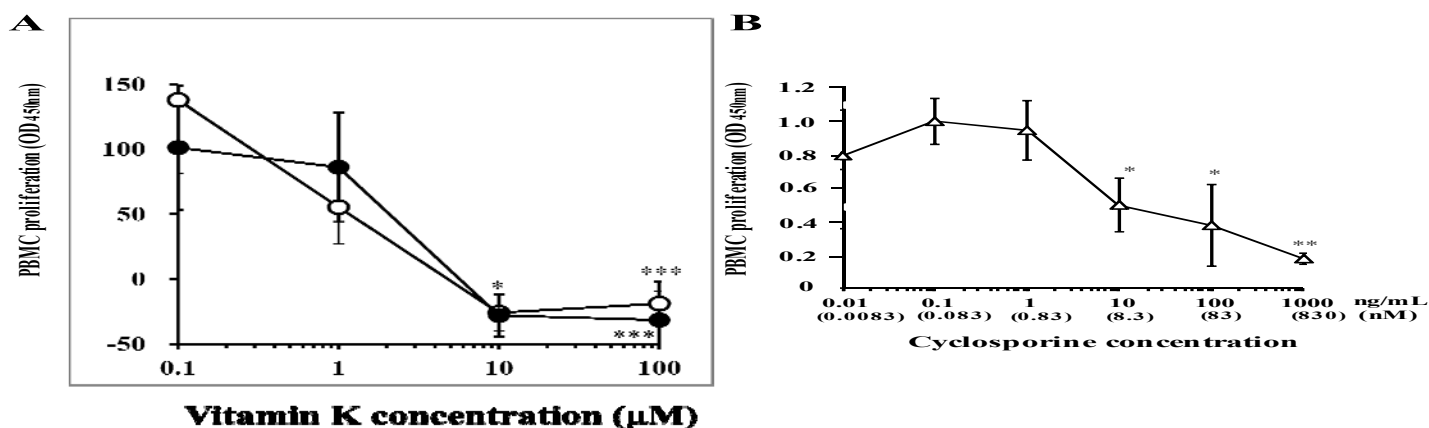


Fig. 1

図5 Effects of VK₃ and VK₅ on proliferation of human PBMCs activated with concanavalin A *in vitro*. A; PBMCs were cultured with concanavalin A and serial concentrations of VK₃ (open circle) and VK₅ (closed circle) for 96h, and the cell proliferation was analyzed as described in Materials and methods. B; dose-response curve of the PBMC proliferation stimulated with concanavalin A in the presence of cyclosporine. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 as compared to each control (n=9 in A and n=6 in B). In A, PBMCs of one healthy volunteer were obtained at two different days and used for each experiment.

3.2 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 K₃ と K₅ 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。

3.1 項に示すように、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 K₃ と K₅ 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 (図 6)。

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 μM) 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った (図 6A、B)。

A

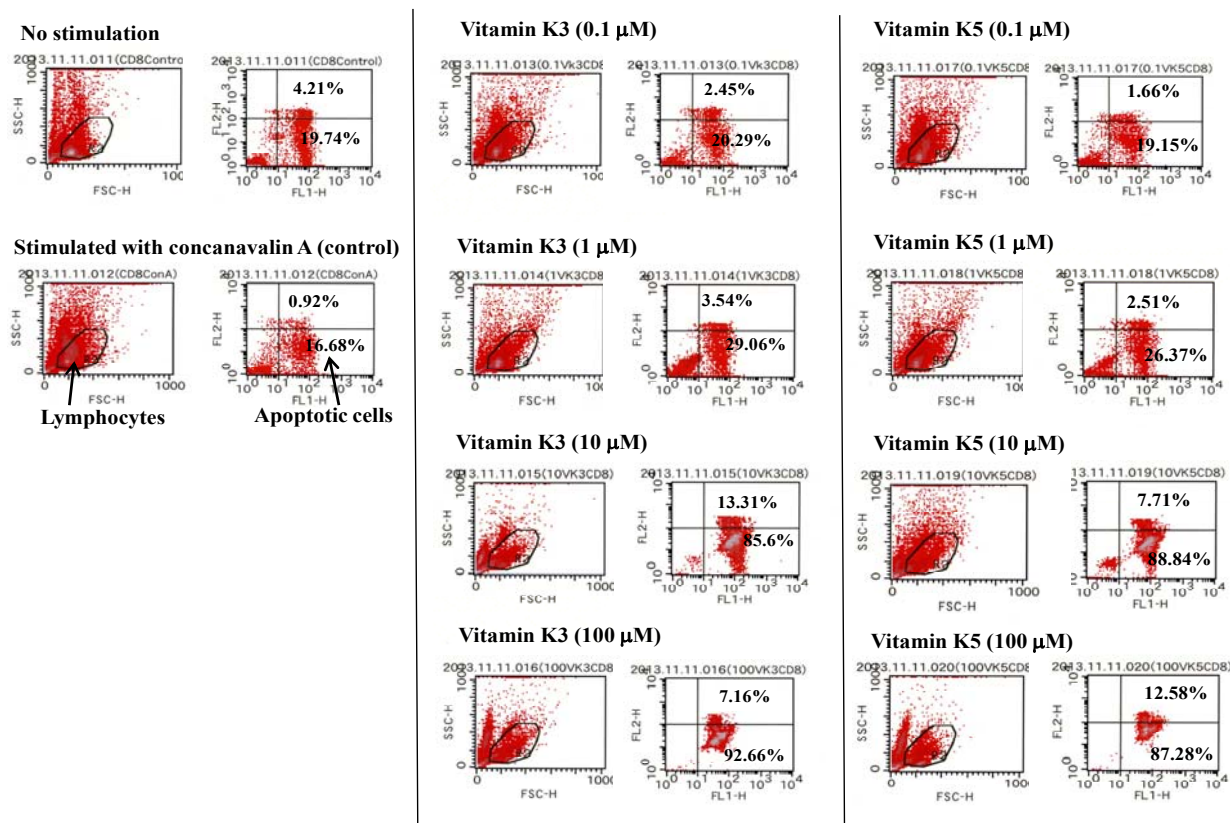


図 6 (次ページに続く)

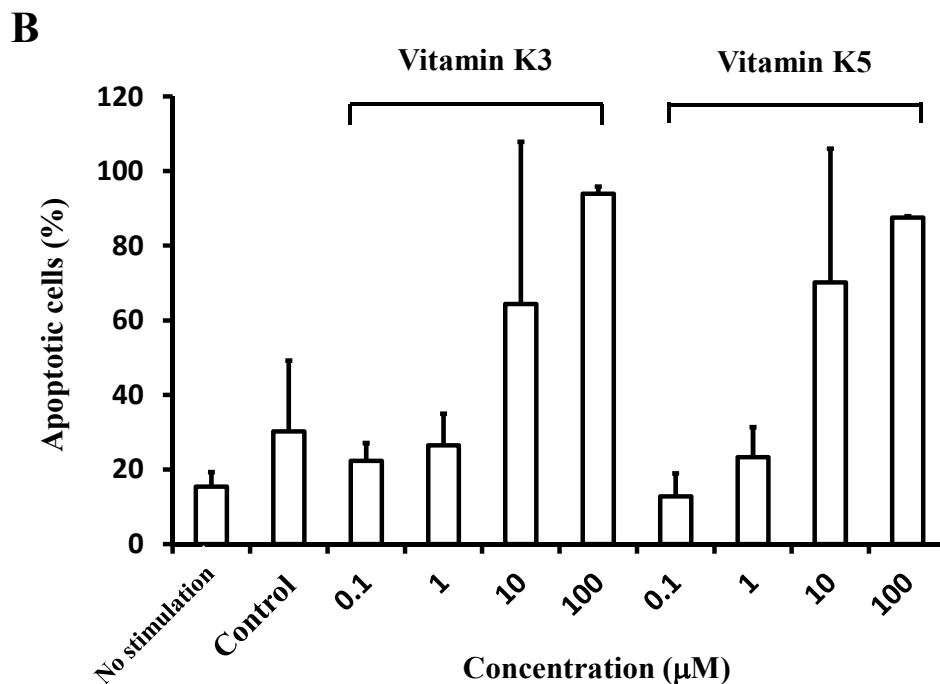


図6 Flow cytometric analysis of apoptotic cells in concanavalin A-stimulated PBMCs treated with VK derivatives. (A) Lymphocyte fraction of PBMCs activated with concanavalin A in the presence or absence of serial concentrations of VK derivatives were gated (left in each), and the percentages of Annexin V+/PI- cells (apoptotic cells shown in the lower-right area) in the activated lymphocyte fraction were calculated (right in each). (B) The mean percentages of apoptotic cells in the concanavalin A-activated lymphocyte fraction cultured in presence or absence of VK derivatives are shown (n=3).

3.3 末梢血単核細胞からのTh1/Th2/Th17系サイトカイン産生に及ぼすビタミンK₃とK₅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からの、7種のTh1/Th2/Th17系サイトカイン(IFN γ 、TNF α 、IL-2、-4、-6、-10、および-17)の産生に及ぼす、0.1–100 μ MのビタミンK₃とK₅の効果を検討した(図7)。

いずれのサイトカインも、両ビタミンK類の高用量(10–100 μ M)を用いた場合に、産生が抑制される傾向を示した。TNF α 、IL-4、-6、および-10の産生は、10–100 μ 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た(p<0.05)。ビタミンK₃は、1 μ Mの濃度でも、TNF α の産生を有意に抑制した(p<0.05)一方IFN γ 、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、 $0.1\mu\text{M}$ のビタミン K_3 と K_5 は、いずれも有意に IL - 6 の産生を増加させた ($p<0.05$)。

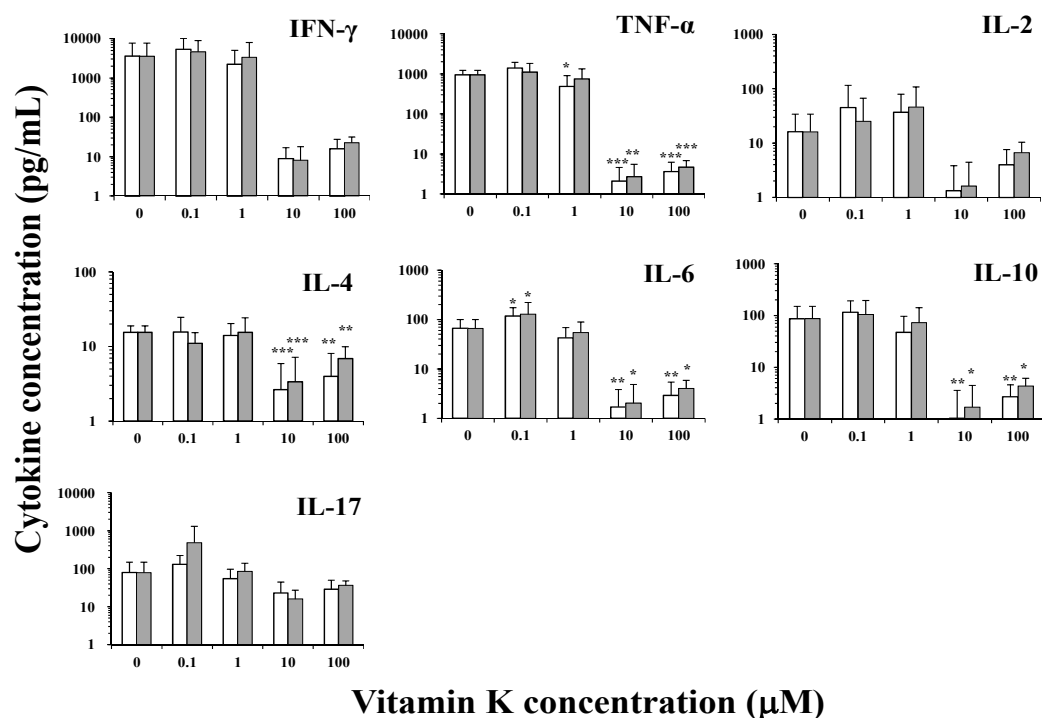


図 7 Cytokine concentrations in the supernatant of T-cell mitogen activated PBMCs treated with VK derivatives. PBMCs were stimulated with concanavalin A for 96h in the absence ($0\mu\text{M}$) or presence ($0.1\text{-}100\mu\text{M}$) of VK_3 (open bars) or VK_5 (shaded bars). Then, the culture supernatant was analyzed for concentrations of $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 and IL-17 ($n=6$ for each) using beads-array procedures followed by flow cytometry. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$ as compared to each control.

3.4 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_3 と K_5 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。

PBMC 中のリンパ球分画をゲーティングした後(図 8A-C 左)、この中の CD4 陽性細胞をさらにゲーティングし(図 8A-C 中間)、CD25 陽性(横軸)かつ FoxP3 陽性(縦軸)の細胞を制御性 T 細胞として(図 8A-C 右)、その割合をそれぞれ求めた(図 8)。図 8A-C は、ビタミン K_3 存在下にコンカナバリン A

で刺激した PBMC 中の制御性 T 細胞率を示す。ドットプロットのデータから、ビタミン K 未処理の細胞に比べ (図 8A)、10 あるいは 100 μM のビタミン K_3 処理した PBMC (図 8B、C) は制御性 T 細胞の割合が増加したことがうかがえる。

0.1–100 μM のビタミン K_3 あるいは K_5 で処理した PBMC における CD4 陽性細胞 (図 8D、E 上)、CD25 陽性細胞 (図 8D、E 中)、および制御性 T 細胞として (図 8D、E 下) の割合を各々棒グラフに示す。10–100 μM のビタミン K_3 あるいは K_5 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。

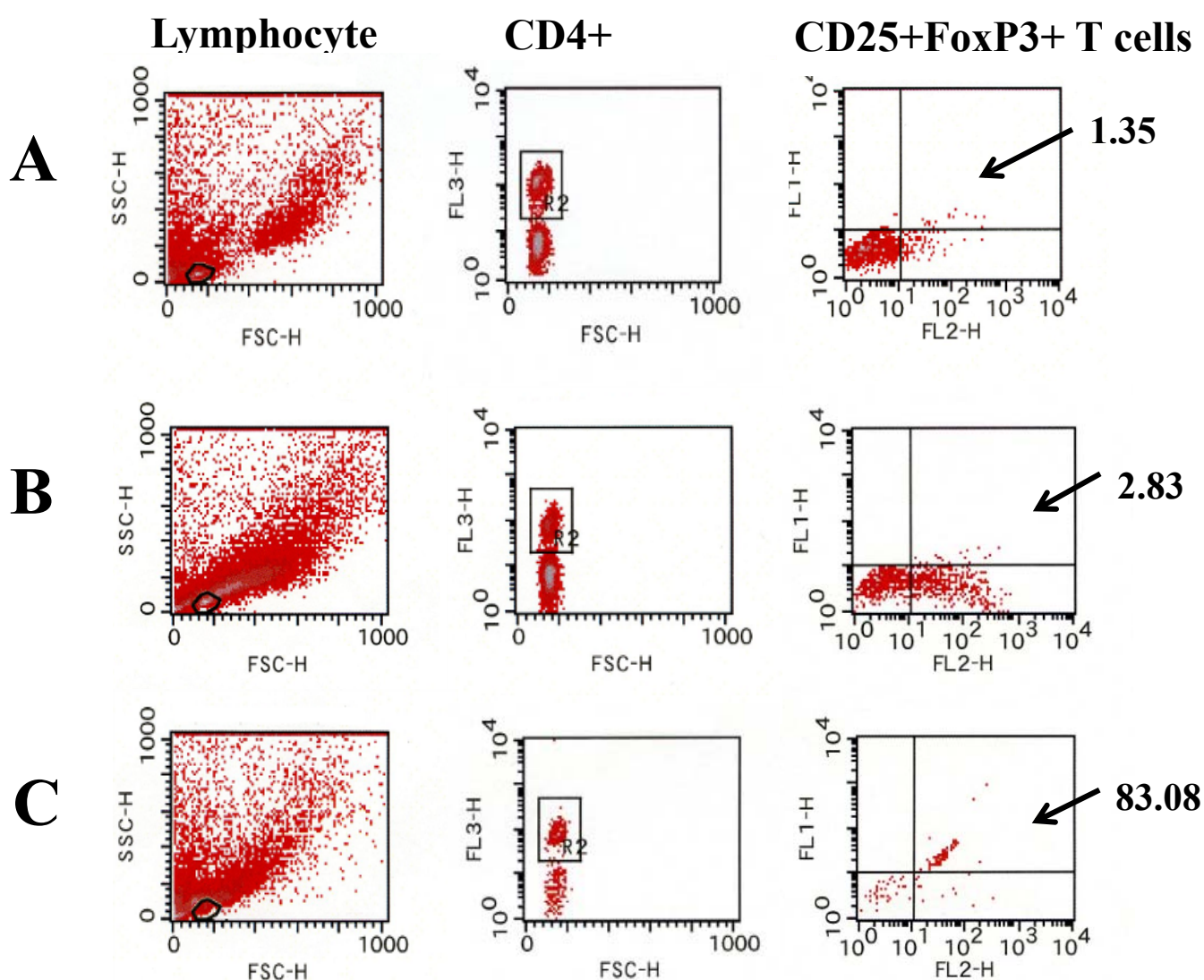
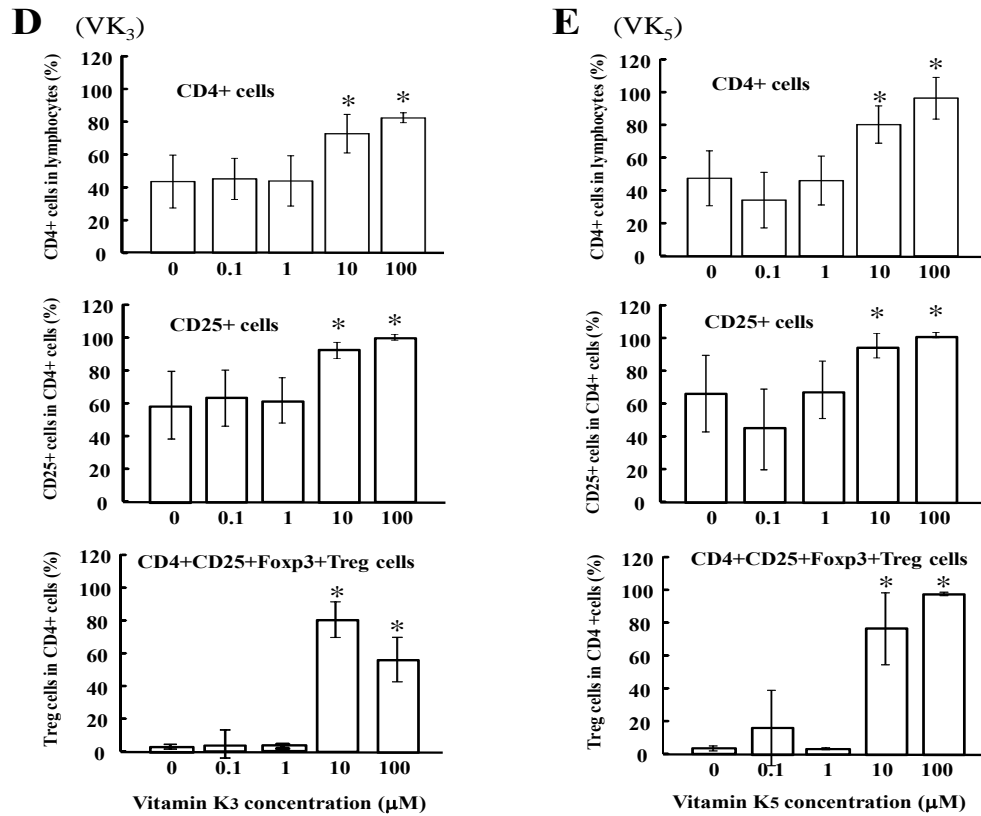


図 8 (次ページに続く)



8 Flow cytometric analysis of CD4+CD25+Foxp3+ cells (Treg cells) in concanavalin A-stimulated PBMCs treated with VK derivatives. (A-C) Lymphocyte fraction of PBMCs (left) were gated for CD4+ cells (middle), and the percentages of CD25+Foxp3+ cells (Treg cells) in the CD4+ cell fraction were calculated (right). The representative dot plot data of unstimulated PBMCs (A), PBMCs stimulated with concanavalin A in the absence of VK (control) (B), and those stimulated with concanavalin A in the presence of 10μM VK₃ (C) are shown. (D) Percentages of CD4+CD25+Foxp3+Treg cells in concanavalin A-stimulated PBMCs cultured in the presence or absence of VK₃ for 96h (n=10 from eight healthy volunteers). Top: CD4+ cells in lymphocytes, Middle: CD25+cells in CD4+ cells, Bottom: CD25+Foxp3+cells in CD4+ cells (Treg cells). *p<0.001 as compared to each control (VK 0μM). (E) Percentages of CD4+CD25+Foxp3+Treg cells in concanavalin A-stimulated PBMCs cultured in the presence or absence of VK₅ for 96h (n=10 from eight healthy volunteers). Top: CD4+ cells in lymphocytes, Middle: CD25+cells in CD4+ cells, Bottom: CD25+Foxp3+cells in CD4+ cells (Treg cells). *p<0.001 as compared to each control (VK 0μM). In D and E, PBMCs of two healthy volunteers were obtained at two different days, and used for each experiment.

第4節 考察

本研究では、健常者から得た PBMC を用い、ビタミン K 類の免疫調節作用を検討した。検討項目としては、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、の主に 4 点である。

ビタミン K₁には、コンカナバリン A で刺激した PBMC に対する増殖抑制作用は認められなかったが、ビタミン K₂、K₃、および K₅はいずれも PBMC 増殖を抑制した。またこの効果は、特にビタミン K₃および K₅で強く認められた。そこでこれら 2 種のビタミン K 類に対し、さらにサイトカイン産生に及ぼす影響やアポトーシス細胞率に及ぼす影響を検討したところ、高濃度 (10–100 μM) で種々のサイトカイン産生を抑制し、また有意ではないが PBMC のアポトーシスを誘導することが示唆された。さらにビタミン K₃および K₅は、PBMC 中の制御性 T 細胞率を顕著に増加させることを示した。

以上の結果から、ビタミン K 類は活性化リンパ球に対して抑制性に働き、さらに制御性 T 細胞率を相対的に増加させることによって、免疫抑制作用を示すものと考えられた。

ヘルパー T 細胞は、後天性免疫反応 (adaptive immune responses) に係る重要な役割を担っているが、自己免疫疾患などでその機能が自己成分に対して異常に働くと、免疫系が破たんし自己組織が破壊されていく。これらの自己免疫反応には、種々の Th1 系または Th2 系サイトカインやケモカインが関わっており (Ishida ら 1994 年; Nicholson ら 1995 年; Racke ら 1994 年)、自己免疫疾患の進展を抑えるためには、これらサイトカイン等の産生を抑制することが重要である。

活性化ヒト末梢血リンパ球からのサイトカイン産生に及ぼすビタミン K 類の効果については、これまであまり検討されていなかったが、申請者がここを得た結果は、ビタミン K₃と K₅が T 細胞マイトゲンで刺激した PBMC からの TNF α、IL-4、IL-6、および IL-10 の産生を抑制することを示した。しかしながら、これらのビタミン K 類は 10–100 μM という比較的高濃度で、種々のサイトカイン産生を抑制した。これらのビタミン K 類の濃度は、T 細胞マイトゲンで刺激した PBMC の増殖を抑制する濃度とほぼ一致しており、このことはビタミン K 類のサイトカイン産生抑制効果が T 細胞増殖抑制効果と並行して発現することを示唆する。

既存の免疫抑制薬であるシクロスポリンは 1 μM 以下の濃度でも、用量依存的に T 細胞マイトゲン応答性 PBMC 増殖を抑制した (図 5B)。シクロスポリンはまた、PBMC からの IL-2 やその他のサイトカイン産生を抑制することにより

免疫抑制作用を示すことが知られている (Hirano ら 1995 年)。ビタミン K_3 と K_5 のサイトカイン産生抑制作用およびマイトゲン応答性 PBMC 増殖を抑制作用は、シクロスポリン作用に比べておよそ 10 分の 1 以下と思われる。

CD4 陽性 T 細胞は局所的なサイトカインの環境によって、制御性 T 細胞と Th17 細胞へと分化しうる (Bettelli ら 2006 年)。制御性 T 細胞は自己免疫に対してこれを制御する方向に働き、胸腺は制御性 T 細胞の分化と自己免疫寛容の形成に重要である (Sakaguchi ら 1995 年)。本研究において申請者は、ビタミン K_3 と K_5 が、末梢血リンパ球中の CD4 陽性細胞率や制御性 T 細胞率を増加させることを示した (図 8D・E)。特に制御性 T 細胞率の増加は顕著であった。しかしながら、図 6 に示すように、制御性 T 細胞を含めて多くの T 細胞がビタミン K_3 と K_5 処理後にアポトーシスによって減少している。以上の結果は、ビタミン K_3 と K_5 処理によって種々の活性化 T 細胞が抑制を受けて減少するものの、制御性 T 細胞はこれらのビタミン K の効果に比較的感受性が低く、結果としてビタミン K 処理 PBMC 中の相対的比率が高くなった可能性がある。

制御性 T 細胞は過剰な免疫反応の抑制に役立っており、従って免疫抑制薬の効果発現にも、制御性 T 細胞の比率や活性が重要と思われる (Petersen 2012 年)。CD4 陽性/CD25 陽性制御性 T 細胞は、健常者と比較して重症筋無力症の患者の末梢血で減少していることが報告されている (Balandina ら 2005 年; Battaglia ら 2005 年)。FoxP3 は、DNA 結合転写因子の forkhead 系に属し、自己寛容を維持するのに重要な役割を持つ (Sakaguchi ら 2004 年)。FoxP3 は、リンパ球中の制御性 T 細胞を特定する分子として認識されており (Samstein ら 2012 年)、この報告に基づき本研究において CD4 陽性/CD25 陽性/FoxP3 陽性細胞として検出された細胞を制御性 T 細胞とした。

ビタミン K 類の中で、ビタミン K_1 と K_2 は骨粗鬆症の治療に適応となっている。これらのビタミン K 類は、経口投与に加え、10–20 mg の静脈内投与も行われる。これらビタミン K 類の 10mg を静脈内投与後は、重篤な副作用もなく血中濃度は 1–10 μ M に到達する。急速静脈内投与した場合には、顔面紅潮、胸部圧迫感、あるいはチアノーゼ等の副作用を伴うが、本研究において *in vitro* で用いたビタミン K 類の濃度は、これら静脈内投与したビタミン K 類の濃度とそれほど大きく異なっていない。

本研究にて示した、ビタミン K_3 や K_5 のヒト末梢血 T 細胞に対する効果の正確な機序はわからないが、ビタミン K_3 によるユビキチンリガーゼの阻害が、Ras/マイトゲン活性化タンパクキナーゼによるシグナル伝達の抑制に寄与することが報告されている (Shah ら 2009 年)。一方 Chowdhury らによると、ビタミン K_3 は活性酸素分子種の発生、p38 シグナル伝達、および p53 の活性化を介し、メラノーマ細胞におけるアポトーシスを引き起こすことにより、ヒ素化

化合物の抗メラノーマ作用を増強する (Chowdhury ら 2009 年)。以上のような細胞内シグナル伝達の遮断等の機序が、ビタミン K 類の抗腫瘍作用に係っているものと推察される。また Checker らは、ビタミン K₃ が細胞のグルタチオン濃度を減少させることにより、リンパ球内の活性酸素分子種量を増加させることを提唱した (Checker ら 2011 年)。

このように、本研究において示した活性化リンパ球に対するビタミン K 類の作用は、MAPKinase 活性の抑制や活性酵素分子種の産生によって生じた可能性が考えられた。このようなビタミン K 類の作用は、活性化 T 細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導して免疫反応を減弱させるものと考えられる。またこれらの機序に加え、エフェクター T 細胞に比べると制御性 T 細胞の方がビタミン K 類の抑制作用に比較的感受性が低いため、結果として全活性化 T 細胞中の制御性 T 細胞率が増え、免疫系が抑制される方向に傾くものと思われた。

適応のあった薬物は、治験を大幅に省略して臨床で使用できる。ビタミン K₃ や K₅ は、肝障害などの副作用のため現在臨床では使用されていないが、免疫抑制作用を保ちつつ副作用を軽減できるような化学構造修飾を施すことで、市場に登場出来る可能性も残される。さらには、本研究で得られた以上の知見が新たな免疫抑制薬開発の布石となることを期待したい。

総 括

ビタミンK類は、血液凝固促進や骨粗鬆症の改善を目的として、臨床で広く用いられている。一方ビタミン K 類には、抗腫瘍作用など、従来よく知られていたビタミンとしての作用以外の生物活性があることも報告されている。そこで本研究では、免疫系へのビタミン K 類の作用を知ることを目的とし、ヒト PBMC に対するビタミン K₁ (フィロキノンまたはフィトナジオン)、K₂ (メナキノンまたはメナテトレノン)、K₃ (メナジオン)、および K₅ (4-アミノ-2-メチル-1-ナフトール) の効果を、*in vitro* にて検討した。

本研究における検討項目は以下の4点である。すなわち上記ビタミンK類の、コンカナバリン A 刺激した PBMC の 1) 増殖に及ぼす作用、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、を検討した結果以下の知見を得た。

- 1) ビタミン K₁ には、PBMC 増殖に対する抑制作用は認められなかった。ビタミン K₂、K₃ および K₅ は用量依存的に、PBMC のコンカナバリン A 応答性増殖を抑制した。なかでもビタミン K₃ と K₅ の IC₅₀ 値はいずれも 10 μ M 未満であり、100 μ M では有意に PBMC 増殖を抑制した ($p < 0.001$)。
- 2) 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 μ 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った。
- 3) ビタミン K₃ と K₅ は、コンカナバリン A 刺激した PBMC からの 7 種の Th1/Th2/Th17 系サイトカイン産生を抑制する傾向を示し、TNF α 、IL - 4、- 6、および - 10 の産生は、10–100 μ M のビタミン K₃ あるいは K₅ で有意に抑制された ($p < 0.05$)。
- 4) ビタミン K₃ と K₅ は、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、および制御性 T 細胞の比率を有意に増加させた ($p < 0.001$)。特に制御性 T 細胞率の増加は著しかった。

以上の結果から、ビタミン K 類は活性化 T 細胞の増殖を抑制し、またエフェクター T 細胞などのアポトーシスを誘導することによって、サイトカイン産生を抑制し、免疫反応を減弱させるものと考えられた。また、エフェクター T 細胞に比べると制御性 T 細胞の方がビタミン K 類の抑制作用に比較的感受性が低いため、結果としてビタミン K 処理により全活性化 T 細胞中の制御性 T 細胞率が増

え、免疫系が抑制されるものと考えられた。

以上の知見は、ビタミン K 類に免疫抑制効果のあることを示唆するものである。ビタミン K 類は一部すでに臨床で用いられており、このような副作用の比較的少ないビタミン K 類を免疫抑制薬として使用する可能性を、新たに提示した。

謝 辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成に関して、終始ご懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました恩師、東京薬科大学薬学部 臨床薬理学教室 平野俊彦教授に深甚なる謝意を表します。また本研究の遂行に関して数多くの御指導、御助言を賜りました東京薬科大学薬学部 臨床薬理学教室 杉山健太郎准教授、恩田健二講師、および田中祥子助教に深謝いたします。

更に、本研究にご協力頂きました東京薬科大学 臨床薬理学教室 石澤 瞳氏、中村友利恵氏、田所弘子氏をはじめ、同臨床薬理学教室の皆様にご心より厚く御礼申し上げます。

利益相反

本研究の利益相反はない。

引用文献

- Akiyoshi T, Matzno S, Sakai M, Okamura N, Matsuyama K. The potential of vitamin K3 as an anticancer agent against breast cancer that acts via the mitochondria-related apoptotic pathway. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;65:143-150.
- Balandina A, Lécart S, Dartevelle P, Saoudi A, Berrih-Aknin S. Functional defect of regulatory CD4+CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood* 2005;105:735–741.
- Battaglia A, Di Schino C, Fattorossi A, Scambia G, Evoli A. Circulating CD4+ CD25+ T regulatory and natural killer T cells in patients with myasthenia gravis: a flow cytometry study. *J Biol Regul Homeost Agents* 2005;19:54–62.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235–238.
- Checker R, Sharma D, Sandur SK, Khan NM, Patwardhan RS, Kohli V, Sainis KB. Vitamin K3 suppressed inflammatory and immune responses in a redox-dependent manner. *Free Radic Res* 2011; 45: 975-985.
- Chiang KC, Yeh CN, Hsu JT, Yeh TS, Jan YY, Wu CT, Chen HY, Jwo SC, Takano M, Kittaka A, Juang HH, Chen TC. Evaluation of the potential therapeutic role of a new generation of vitamin D analog, MART-10, in human pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *Cell Cycle* 2013;12:1316-1325.
- Chowdhury R, Chowdhury S, Roychoudhury P, Mandal C, Chaudhuri K. Arsenic induced apoptosis in malignant melanoma cells is enhanced by menadione through ROS generation, p38 signaling and p53 activation. *Apoptosis* 2009;14:108–123.
- Hirano T. Cellular pharmacodynamics of immunosuppressive drugs for individualized medicine. *Int Immunopharmacol* 2007; 7: -22.
- Hirano T, Fukushima H, Sasaki Y, Yoshikawa N, Yoshida M, Oka K. Bacterial Superantigen TSST-1 attenuates suppressive efficacy of glucocorticoids and calcineurin inhibitors against blastogenesis of peripheral blood mononuclear cells from patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis and nephrosis. *Int Immunopharmacol* 2006; 6: 924-934.
- Hirano T, Oka K, Tamaki T. Gramicidin as a potent immunosuppressant for organ transplantation: Suppression of human lymphocyte blastogenesis in vitro and prolongation of heart allograft survival in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;273:223-229.

- Ishibashi M, Arai M, Tanaka S, Onda K, Hirano T. Antiproliferative and apoptosis-inducing effects of lipophilic vitamins on human melanoma A375 cells *in vitro*. *Biol Pharm Bull* 2011;35:10-17.
- Ishida H, Muchamuel T, Sakaguchi S, Andrade S, Menon S, Howard M. Continuous administration of anti-interleukin 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/W mice. *J Exp Med* 1994;179:305–310.
- Kanai K, Kikuchi E, Mikami S, Suzuki E, Uchida Y, Kodaira K, Miyajima A, Ohigashi T, Nakashima J, Oya M. Vitamin E succinate induced apoptosis and enhanced chemosensitivity to paclitaxel in human bladder cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Sci* 2010;101:216-223.
- Komura N, Ikeda Y, Masuda N, Umezawa Y, Ito K, Kizaki M, Umezawa K. Designed ATRA analogue active against ATRA-resistant acute promyelocytic leukemia cells having a single nucleotide substitution in their retinoic acid receptor. *Leuk Res* 2007;31:301-313.
- Kuriyama S, Hitomi M, Yoshiji H, Nonomura T, Tsujimoto T, Mitoro A, Akahane T, Ogawa M, Nakai S, Deguchi A, Masaki T, Uchida N. Vitamins K2, K3 and K5 exert *in vivo* antitumor effects on hepatocellular carcinoma by regulating the expression of G1 phase-related cell cycle molecules. *Int J Oncol* 2005;27:505-511.
- Kohli V, Sharma D, Sandur S, Suryavanshi S, Sainis K. Immune response to novel allergens and modulation of inflammation by vitamin K3 analogue :A ROS dependent mechanism. *Int Immunopharmacol* 2011; 11: 233-243.
- Nicholson LB, Greer JM, Sobel RA, Lees MB, Kuchroo VK. An altered peptide ligand mediates immune deviation and prevents autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 1995;3:397–405.
- Ogawa M, Nakai S, Deguchi A, Nonomura T, Masaki T, Uchida N, Yoshiji H, Kuriyama S. Vitamins K2, K3 and K5 exert antitumor effects on established colorectal cancer in mice by inducing apoptotic death of tumor cells. *Int J Oncol* 2007;31:323-331.
- Paroni G, Fratelli M, Gardini G, Bassano C, Flora M, Zanetti A, Guarnaccia V, Ubezio P, Centritto F, Terao M, Garattini E. Synergistic antitumor activity of lapatinib and retinoids on a novel subtype of breast cancer with coamplification of ERBB2 and RARA. *Oncogene*. 2013; 31: 3431-3443.
- Peterson RA. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol Pathol* 2012; 40: 186-204.
- Racke MK, Bonomo A, Scott DE, Cannella B, Levine A, Raine CS, Shevach EM, Röcken M. Cytokine-induced immune deviation as a therapy for inflammatory autoimmune disease. *J Exp Med* 1994; 180: 1961–1966.
- Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic selftolerance

- and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 531–562.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic selftolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151–1164.
- Samstein RK, Arvey A, Josefowicz SZ, Reynolds A, Sandstrom R, Neph S, Sabo P, Kim JM, Liao W, Li MO, Leslie C, Stamatoyannopoulos JA, Rudensky AY. Foxp3 exploits a pre-existent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification. *Cell* 2012; 151: 153-166.
- Shah M, Stebbins JL, Dewing A, Qi J, Pellecchia M, Ronai ZA. Inhibition of Siah2 ubiquitin ligase by vitamin K3 (menadione) attenuates hypoxia and MAPK signaling and blocks melanoma tumorigenesis. *Pigment Cell Melanoma Res* 2009; 22: 799–808.
- Wang G, Yu B, Wu Y, Huang B, Yuan Y, Liu CS. Controlled preparation and antitumor efficacy of vitamin E TPGS-functionalized PLGA nanoparticles for delivery of paclitaxel. *Int J Pharm* 2013; 446: 24-33.