

## ヒト結腸癌由来上皮細胞株による炎症性サイトカイン IL-8産生に及ぼす活性型ビタミンD3抑制作用の血清依存性

日高麻由美・徳村 彰

Serum-dependent Inhibitory Effect of Active Form of Vitamin D3 on IL-8 Production  
by Human Colon Cancer-derived Epithelial Cell Lines

Mayumi HIDAOKA and Akira TOKUMURA

### 要 旨

腸管は、栄養の吸収という重要な役割を果たしている一方で、有害な病原性微生物の侵入に絶えず曝されている。そのため、腸上皮には巧妙な免疫・炎症システムが存在し、病原体の侵入や有害作用を防御している。しかし過剰な炎症は正常腸組織を傷つけ、炎症性腸疾患発症の一因となる。著者らは最近、活性型ビタミンD3 (VD3) が腸上皮細胞からの可溶性CD14の分泌促進を介して、グラム陰性菌由来リポポリサッカライド (LPS) による炎症性サイトカイン産生を抑制することを見いだした。

本研究では、結腸癌由来腸上皮細胞株HT-29細胞を用い、従来行ってきた通常培養条件に加えて、低栄養培養条件におけるVD3のIL-8産生に及ぼす作用について検討を行った。その結果、VD3がIL-8産生抑制作用を示したのは、通常培養でかつLPS刺激した条件下のみであることが明らかとなった。通常培養で用いるウシ胎児血清中に含まれるLPS結合タンパクが、VD3によるIL-8産生抑制に寄与していることが示唆された。

キーワード：インターロイキン (IL)-8, ビタミンD, soluble form CD14 (sCD14),  
LPS結合タンパク

### 序 論

腸管は、食物由来の栄養素・ミネラルの吸収という重要な役割を果たしている。しかし、食物に混在している有害な病原性微生物や異物（アレルギー性物質、食品汚染物質）に絶えず曝されており、腸上皮は病原性微生物・異物の侵入を防ぐため、タイトジャンクション等で強い細胞間バリアーを形成している。また、腸上皮には、必要な因子には寛容で有害な因子には拒否を示す免疫システムが存在する。この巧妙な免疫系からの指令で、腸上皮は一連の炎症反応を誘導し、病的事態からの回復を図る。しかし、免疫寛容の破綻や過剰な炎症は正常な腸組織を傷つけ、潰瘍性大腸炎やクローン病をはじめとする炎症性腸疾患の発症を誘導する。我が国では食習慣の欧風化に伴い、これら炎症性腸疾患の罹患率が近年増加しており、有効な予防や治療法の開発が待

望されている。すでに、腸管免疫や炎症に関する基礎研究が幅広く実施されており、多種類の内因性液性因子がこれらの複雑な炎症反応に関与していることが明らかにされているが、それらの相互作用に関しては不明な点が多い<sup>1) 2)</sup>。

ヒトは植物エルゴステロール由来のビタミンD2と動物コレステロール由来のビタミンD3を摂取している。ビタミンD3は肝臓と腎臓で代謝活性化を受けた後に活性型の1,25-ジヒドロキシビタミンD3 (VD3) となり<sup>3)</sup>、小腸でカルシウムイオンやリン輸送の調節を行い骨リモデリングに寄与している(図1)。これら無機イオン吸収へのVD3の作用機構の研究は大きく進展しているが、腸粘膜に及ぼす直接作用に関する研究は数少ない。近年、ビタミンD欠乏と腸炎との間に相関があることは実験動物を用いて報告されているが、その分子機序には不明な点が多い<sup>4)</sup>。著者らは、ヒト結腸癌由来上皮細胞株HT-29の培養液に活性型VD3を添加すると、グラム陰性菌由来リポポリサッカライド(LPS)応答性の炎症性サイトカインIL-8分泌が抑制されることを初めて明らかにした。また、その抑制作用には細胞内シグナル伝達経路extracellular-regulated kinase (ERK)のリン酸化(活性化)に伴うsoluble form CD14 (sCD14)の産生分泌増加が関与するという新メカニズムを提示した<sup>5)</sup>。この研究の進展として、今回、HT-29細胞のような未分化の腸由来癌細胞が遭遇する過酷な環境(低栄養)でのVD3によるIL-8産生抑制作用を、正常環境の場合と比較しようと考えた。さらに得られた結果より、血清中に含まれるどの成分がVD3と協調的に働きIL-8産生による炎症の調節に寄与しているかについて考察を行った。

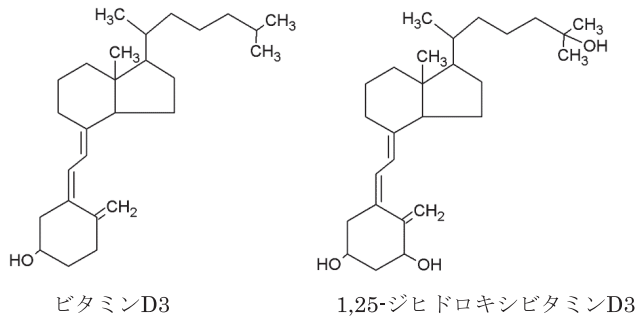


図1. ビタミンD3の構造

#### 材料および方法

ヒト結腸癌由来上皮細胞株HT-29細胞 ( $0.5 \times 10^6$  cells) を10%非働化ウシ胎児血清(FCS)含有RPMI1640培地500  $\mu$ Lに懸濁させ48ウェルプレートに播き、37°Cで24時間培養することでプレート表面に付着させた。10% FCSもしくは0.3% FCS含有RPMI1640培地中でさらに24時間の前培養を行った。その後、100  $\mu$ M 1,25-ジヒドロキシビタミンD3 (VD3)のエタノール溶液0.5  $\mu$ L(最終濃度100nM)もしくは対照としてエタノール0.5  $\mu$ Lを培養液に添加し、1  $\mu$ g/mLリポポリサッカライド(LPS)刺激もしくは未刺激下でさらに24時間培養した。培養終了後、上清を採取して4°C、5,800  $\times$ gで10分遠心し、その上清をIL-8産生量測定に供した。

統計解析は、同一の刺激、同血清条件下での対照グループ(エタノール)と試験グループ(VD3)について、平均値の差をun-paired Student's t-testを行った。 $p$ 値が0.05以下の場合を有意差ありとした。

結 果

i) 10% FCS条件下で培養したHT-29細胞によるIL-8産生

LPSで処理しない条件（非炎症状態）の場合は、VD3添加によってHT-29細胞によるIL-8産生は増加する傾向にあったが、統計学的有意差は認められなかった。一方、LPS刺激下（炎症状態）では、VD3はHT-29細胞によるIL-8産生を有意に抑制した。この結果は、すでに著者らが報告したデータと一致する（図2）。

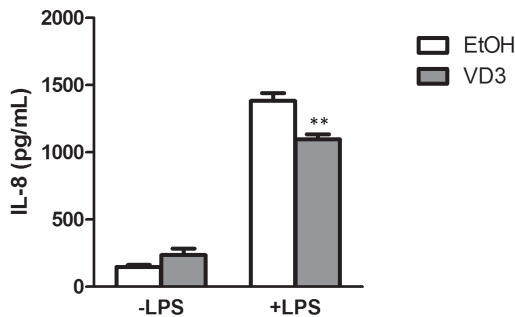


図2. 通常培養条件下におけるHT-29細胞によるIL-8産生に及ぼすVD3の作用  
\*\* $p < 0.01$

ii) 0.3% FCS条件下で培養したHT-29細胞によるIL-8産生

LPS未刺激の場合、10% FCS含有培地で培養したHT-29細胞で得た結果と同様、0.3% FCS含有培地で培養したHT-29細胞によるIL-8分泌は、VD3添加で増加傾向であった。次に、HT-29細胞をLPS刺激下で培養しVD3を添加した。しかし、HT-29細胞によるIL-8産生はVD3で阻害されず、むしろ増加する傾向が観察された（図3）。

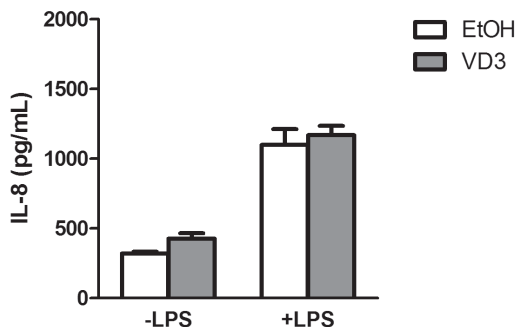


図3. 低栄養培養条件下におけるHT-29細胞によるIL-8産生に及ぼすVD3の作用

## 考 察

今回の検討によって、ヒト結腸癌由来上皮細胞株HT-29細胞において、VD3がIL-8産生抑制作用を示すのは、調べた4条件では10% FCS条件下LPS刺激時のみであることが明らかとなった。

以前に報告した通り、血液から供給されうるVD3は腸管上皮細胞内に入り核内受容体（VDR）への結合を介してERKを活性化させる。その結果、核内のCD14は細胞質を通り細胞外に分泌され、LPSとLPS受容体（Toll様受容体4とCD14の複合体）の結合に競合するため、LPSによるIL-8分泌が抑制されるものと思われる<sup>5)</sup>。

今回、0.3% FCS条件下で培養したHT-29細胞によるLPS刺激IL-8産生をVD3が抑制しなかったことから、FCS中に含まれる何らかの物質がsCD14分泌や作用に影響すると考えた。FCSなどの血清中にはLPS-binding protein（LBP）が存在し、LPSのキャリアーとしての役割を果たし、LPS応答を調節している<sup>6) 7)</sup>。著者らは0.3% FCS条件下ではこのLBPが微量となるために、sCD14が増加してもLPS応答性IL-8産生抑制作用が見られなかったと推定している。

図4にまとめたように、VD3によるERK活性化はIL-8産生の増加とsCD14産生の増加を促進する。LPS未刺激下では、VD3はERK活性化を介してIL-8産生を増強させると思われるが、LPS刺激下ではsCD14分泌量増大を介するLPSのLPS受容体への結合阻害の方が優り、IL-8産生が低下すると思われる。このVD3の抑制効果は、血清成分おそらくLBPの存在に依存しており、LPS/LBP複合体へ選択的にsCD14が作用するのであろう。

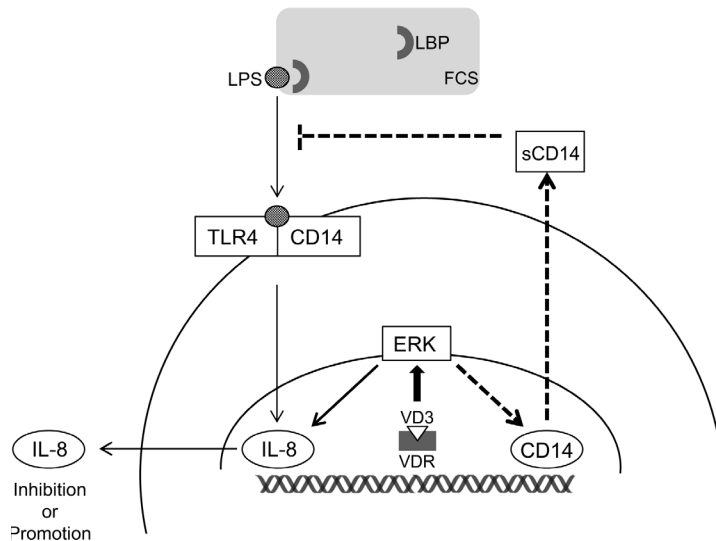


図4. IL-8産生に及ぼすVD3の作用機構の概略図

### 引用文献

- 1) Kaser A., Zeissig S., Blumberg RS. Inflammatory Bowel Disease. *Annu Rev Immunol.* 28, (2010) 573-621
- 2) Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* 14, (2014) 329-342
- 3) Lawson DE., Fraser DR., Kodicek E., Morris HR., Williams DH. Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a new kidney hormone controlling calcium metabolism. *Nature.* 230, (1971) 228-230
- 4) Wöbke TK., Sorg BL., Steinhilber D. Vitamin D in inflammatory diseases. *Front Physiol.* 5, (2014) 1-20
- 5) Hidaka M., Wakabayashi I., Takeda Y., Fukuzawa K. Vitamin D3 derivatives increase soluble CD14 release through ERK1/2 activation and decrease IL-8 production in intestinal epithelial cells. *Eur J Pharmacol.* 721, (2013) 305-312
- 6) Kato A., Ogasawara T., Homma T., Saito H., Matsumoto K. Lipopolysaccharide-binding protein critically regulates lipopolysaccharide-induced IFN- $\beta$  signaling pathway in human monocytes. *J Immunol.* 172, (2004) 6185-6194
- 7) Kitchens RL., Thompson PA. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. *J Endotoxin Res.* 11, (2005) 225-229

[2015. 6. 25 受理]