



免疫器官としての皮膚に対する活性型ビタミンD3の作用（研究報告）

谷, 昌寛

(Citation)

神戸大学医学部神緑会学術誌, 5:116-119

(Issue Date)

1989-06

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/81007118>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/81007118>



免疫器官としての皮膚に対する 活性型ビタミン D₃ の作用

神戸大学医学部皮膚科 谷 昌 寛

目 的

活性型ビタミン D₃ [1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃, 以下 1 α , 25 (OH)₂D₃] は従来から知られていたカルシウム代謝に対する作用以外に、細胞の分化誘導促進作用や免疫調節作用も有する事が最近明らかになってきており、特に免疫調節物質としての 1 α , 25 (OH)₂D₃ の役割が注目されてきている。一方、種々の皮膚疾患において皮膚表皮ケラチノサイトが MHC Class II 抗原を発現し、この抗原の発現はインターフェロナー γ (IFN- γ) で誘導される事が知られている。今回、我々は [I] 1 α , 25 (OH)₂D₃ がマウス接触過敏 (CHS) 反応の afferent phase および efferent phase にどのような影響を与えるか、[II] マウス recombinant IFN- γ (rIFN- γ) による Pam 212 cell (BALB/c マウス由来 spontaneously transformed keratinocyte cell line) の Ia 抗原発現が 1 α , 25 (OH)₂D₃ によってどのような影響を受けるか、[III] Pam 212 cell の prostaglandin E₂ (PGE₂) の生産に 1 α , 25 (OH)₂D₃ がどのような影響を与えるかについて検討した。

方 法

I. 1 α , 25 (OH)₂D₃ の外用が CHS 反応の afferent phase に及ぼす影響を検討するために、1 α , 25 (OH)₂D₃ (0.05 および 0.005 μ g/ml) を A/J マウス背部に 4 日間連続外用し、同外用部位から 5 % trinitrochlorobenzene (TNCB) を用いて経皮感作を行い、感作 6 日後に耳に 1 % TNCB を塗布する事により CHS 反応の誘発を行った。一方、efferent phase への影響を検討するために、背部皮膚にて 5 % TNCB 塗布による経皮感作を行い、5 % TNCB 塗布後 2 日目より 4 日間連続 1 α , 25 (OH)₂D₃ (0.05 および 0.005 μ g/ml) を耳に外用し、5 % TNCB 塗布による感作 6 日後に 1 α , 25 (OH)₂D₃ を外用した耳への 1 % TNCB 塗布による CHS 反応の誘発を行った。いずれの場合も、1 % TNCB 塗布による誘発 24 時間後に耳の腫脹の計測を行った。

II. Pam 212 cell を各種濃度の rIFN- γ および 1 α , 25 (OH)₂D₃ の存在下あるいは非存在下で 72 時間培養後、抗 I-A^d 抗体を用いて蛍光染色後 FACSscan を用いて I-A^d 陽性 Pam 212 cell の解析を行った。又、cyclooxygenase の inhibitor である indomethacin (1 μ g/ml) の存在下および非存在下においても上記と同様の実験を行った。

III. Pam 212 cell を各種濃度の rIFN- γ および 1 α , 25 (OH)₂D₃ の存在下あるいは非存在下で 72 時間培養し、その conditioned medium 中の PGE₂ を radioimmunoassay 法を用いて定量した。

結 果

I. 1 α , 25 (OH)₂D₃ の外用は CHS 反応の afferent phase には、何ら影響を与えなかったが (Table I)、誘発部位に事前に 1 α , 25 (OH)₂D₃ を外用する事により、その反応 (efferent phase) がコントロール群 [24, 25 (OH)₂D₃ 外用群] に比して有意に増強された (Table II)。1 α , 25 (OH)₂D₃ の efferent phase の増強作用が単なる 1 α , 25 (OH)₂D₃ 外用による刺激作用であった可能性は、1 α , 25 (OH)₂D₃ 外用前後の耳の厚さの計測や、組織学的検索の結果等から有り得ないと考えられた。又、1 α , 25 (OH)₂D₃ の外用が表皮内ランゲルハンス細胞や Thy-1 positive dendritic epidermal cell の数および形態に与える影響についてはコントロール群と比較して、特に差は認められなかった。

II. Pam 212 cell を 20 あるいは 100 U/ml の rIFN- γ の存在下で 72 時間培養したところ、いずれの場合も約 50 % の Pam 212 cell に I-A^d 抗原の発現を認めた。一方、rIFN- γ と同時に 10⁻⁸M あるいは 10⁻¹⁰M の 1 α , 25 (OH)₂D₃ を培養液中に添加した場合 Pam 212 cell の I-A^d 抗原の発現は 10⁻⁸M および 10⁻¹⁰M のいずれの場合にも約 1/5 (約 10 % の Pam 212 cell が I-A^d 抗原陽性) に抑制された (Table III)。コントロールとして 1 α , 25 (OH)₂D₃ のかわりに 10⁻⁸M の 24, 25 (OH)₂D₃ を添加した場合には Pam 212 cell の I-A^d

Table I. Effect of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on induction of CHS response to TNCB

Group ^a	Treatment		Challenge ^d	Increase in Ear	
	before	Sensitization ^c		Thickness ^e	p Value ^f
	Sensitization ^b			(mm $\times 10^{-2} \pm$ SD)	
I	$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	+	+	10.63 ± 1.64	—
II	$24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	+	+	11.14 ± 1.42	NS
III	ethanol	+	+	10.70 ± 1.54	NS
IV	$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	—	+	2.55 ± 0.50	< 0.01
V	$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	+	—	0.05 ± 0.64	< 0.01

^aFive mice per group. Data from a representative of three separate experiments at the concentration of $0.05 \mu\text{g } 1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{ml}$.

^b20 μl of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ or ethanol alone was applied to the dorsal trunk of the mice on days 0 to 3 prior to sensitization.

^cSensitization was done on day 4 by painting 50 μl of 5% TNCB in acetone on the $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ or ethanol alone treated site. —; acetone alone.

^dMice were challenged with 5 μl of 1% TNCB in acetone to both surfaces of each ear on day 10. —; acetone alone.

^eEars were measured before and 24 hr after challenge. Increase in ear thickness = mean thickness at 24 hr minus thickness before challenge.

^fGroup I compared to groups II, III, IV and V; Student's t-test. NS; not significant.

Table II. Effect of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on elicitation of CHS response to TNCB

Group ^a	Sensitization ^b	Treatment		Increase in Ear		p Value ^f
		before	Challenge ^d	Thickness ^e	% Increment ^f	
		Challenge ^c		(mm $\times 10^{-2} \pm$ SD)		
I	+	$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	+	14.63 ± 1.82	—	—
II	+	$24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	+	10.37 ± 0.98	41	< 0.01
III	+	ethanol	+	10.40 ± 1.39	40	< 0.01
IV	+	$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (on abdomen)	+	11.03 ± 3.11	33	< 0.01
V	—	$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	+	2.43 ± 1.03	—	< 0.01
VI	+	$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	—	0.96 ± 0.52	—	< 0.01

^aFive mice per group. Data are from a representative of three separate experiments at $0.05 \mu\text{g } 1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{ml}$.

^bDorsal trunk was treated with 50 μl of 5% TNCB in acetone on day 0. —; acetone alone.

^c10 μl of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ or ethanol alone was painted on both surfaces of each ear except group IV from days 2 to 5. In group IV, 20 μl of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ were applied to abdomen from days 2 to 5.

^dChallenge was performed by painting 5 μl of 1% TNCB in acetone on both surfaces of each ear on day 6. —; acetone alone.

^eEars were measured before and 24 hr after challenge. Increase in ear thickness = mean thickness at 24 hr minus thickness before challenge.

^f% increment = $100 (\text{net increase of } 1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3 \text{ treated mice} / \text{net increase of control mice} - 1)$.

^aGroup I compared to groups II, III, IV and VI; Student's t-test.

Table II. Inhibitory effect of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on rIFN- γ induction of I-A^d antigen expression in Pam 212 cells

Vitamin D ₃ Derivatives	% Of Pam 212 cells positive for I-A ^d antigens		
	Medium	20 U/ml rIFN- γ	100 U/ml rIFN- γ
Medium	0.5	49.0	47.7
10^{-8} M $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	1.1	11.1	11.3
10^{-10} M $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	0.9	11.1	10.3
10^{-8} M $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	1.0	47.8	48.5

Note. Pam 212 cells (1×10^5) were cultured for 72 hr in the presence of either rIFN- γ , $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, or combinations of rIFN- γ with either of the vitamin D₃ derivatives at the various concentrations shown. Pam 212 cells were stained with anti-I-A^d antibody and FITC-conjugated goat F(ab')₂ anti-mouse IgG antibody by indirect immunofluorescence, and then analyzed by FACScan analyzer.

抗原の発現の抑制は認められなかった。 10^{-12} M以下の $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ では上記抑制効果は認められなかった。又、10あるいは50U/mlのrIFN- γ の存在下でも、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は、同様にI-A^d抗原の発現の抑制を示した。一方、マウス・マクロファージにおいてはPGE₂等prostaglandinでIa抗原の発現が抑制される事が知られているので、cyclooxygenaseのinhibitorであるindomethacin (1 μ g/ml)を培養液中に添加し同様の実験を行った。 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ によるPam 212 cellのI-A^d抗原発現の抑制はindomethacin

の添加によって影響を受けなかった (Table IV)。

III. Pam 212 cell 培養液中に $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を添加する事により、Pam 212 cellのPGE₂産生が濃度依存性に増強された (Table V)。10あるいは50U/mlのrIFN- γ の培養液中への添加は、Pam 212 cellのPGE₂産生に影響を与えなかった。又、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-8} 、 10^{-10} あるいは 10^{-12} M)とrIFN- γ (10あるいは50U/ml)とを同時に培養液中に添加しても、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ によるPam 212 cellのPGE₂産生の増加には影響を与えなかった。

Table III. Effect of indomethacin on inhibition of rIFN- γ -induced Pam 212 cell I-A^d antigen expression by $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	% Of Pam 212 cells positive for I-A ^d antigens			
	- Indomethacin		+ Indomethacin	
	Medium	50 U/ml rIFN- γ	Medium	50 U/ml rIFN- γ
Medium	1.4	21.5	0.5	18.2
10^{-10} M	0.9	4.6	0.8	6.2

Note. Pam 212 cells (1×10^5) were cultured for 72 hr in the media containing 50 U/ml rIFN- γ and/or 10^{-10} M $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in the presence or absence of 1 μ g/ml indomethacin, and then analyzed by FACScan analyzer as described for Table II.

Table V. Effect of $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on PGE_2 production by Pam 212 cells

Culture Treatment	PGE_2 Levels (ng $\pm$ SD/ml)
10^{-6} M $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$	2.165 ± 0.115
10^{-8} M $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$	1.893 ± 0.482
10^{-10} M $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$	1.313 ± 0.300
10^{-12} M $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$	0.949 ± 0.159
10^{-14} M $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$	0.901 ± 0.180
10^{-8} M $24, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$	0.876 ± 0.098
10^{-10} M $24, 24(\text{OH})_2\text{D}_3$	0.701 ± 0.114
Medium alone	0.708 ± 0.098

Note. Pam 212 cells (1×10^5) were cultured for 72 hr in MEM with 2% HI-FCS containing varying concentrations of either $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ or $24, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Conditioned media were aspirated and PGE_2 levels were measured by a RIA. Data are from a representative of two separate experiments, each done in triplicate. Basal PGE_2 level of MEM containing 2% HI-FCS was 0.468 ± 0.039 ng/ml when Pam 212 cells were absent.

結 語

$1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が in vitro ばかりでなく in vivo においても免疫調節物質として作用する可能性ならびに免疫担当細胞としての表皮ケラチノサイトに対して、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が影響を及ぼす可能性を示唆し

た。

本研究の一部は昭和61年度社団法人神緑会助成金によって行われたものである。