

Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis

Citation for published version (APA):

Smolders, J. J. F. M. (2011). *Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20110512js>

Document status and date:

Published: 01/01/2011

DOI:

[10.26481/dis.20110512js](https://doi.org/10.26481/dis.20110512js)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

11

Multiple sclerosis (MS) is a severe inflammatory disease of the central nervous system. In patients with MS, the immune system attacks and damages the surrounding isolation sheet of neurons, the myelin. This results in a dysfunction of these neurons, and subsequently the patient will experience loss of body function. The reason for this attack of the immune system is not clear.

In the inflammatory reaction of MS, CD4⁺ T cells play an important role. These cells are central players in the adaptive immune response. When specialized antigen presenting cells encounter a pathogen (for instance a bacteria), they present this to CD4⁺ T cells. If a CD4⁺ T cell recognizes this pathogen, it reacts by starting to proliferate and to produce inflammatory mediators (cytokines). These cytokines mediate clearance of the pathogen by other cells. It is important that T cells only start an inflammatory response upon presentation of an intruder from outside the body, and not upon presentation of self-antigens. To ensure this, T cells are carefully selected for being not auto-reactive during their development, and, additionally, specialized regulatory T cells (Treg) control the remaining peripheral autoimmune T cell response when needed. Current opinion is that, in patients with MS, these regulatory mechanisms fail, and that T cells start an inflammatory response against self-antigens (autoimmune disease). The auto-antigen which causes this response, is at present unknown. In patients with MS, a relatively disturbed T cell compartment is frequently found, with less functional Treg and CD4⁺ T cells which produce more pro-inflammatory cytokines.

Vitamin D is acquired both from dietary intake and from exposure of the skin to sunlight. It is predominantly known as an important molecule in calcium homeostasis. Several studies show an association between a limited exposure to vitamin D, and an increased level of disability of MS. This could indicate that vitamin D acts as an inhibitor on the disease process and disease activity of MS. With the vitamin D project of which this thesis is the start, we want to investigate i) if disease activity of MS can be inhibited by supplementation of vitamin D, and ii) which biological mechanisms mediate this effect.

In **chapter 2**, we describe a literature study. We review the evidence for a disease modulating effect of vitamin D in MS, and the role of vitamin D in the immune response. Experimental studies in animals and plastic dishes (*'in vitro'*) show that vitamin D plays an essential role in the adaptive immune response as a strong promoter of T cell homeostasis. T cell proliferation and pro-inflammatory cytokine production are inhibited, and the production of anti-inflammatory cytokines and the development of Treg are promoted. In animal models of MS, vitamin D prevents and inhibits symptoms of disease. Interestingly, vitamin D status, or correlates of vitamin D status, correlate negatively with the risk on developing MS. An increased disease activity of MS has also been associated with an impaired vitamin D status. However, besides a few safety studies, large intervention-studies with vitamin D are

lacking. We conclude that vitamin D is an immune modulator, but it is uncertain whether it can also be considered as an immune and disease modulator in MS.

In **chapter 3**, we investigated in a cross-sectional study among 267 patients from our MS population an association between vitamin D status and disease activity of MS. We showed that poor vitamin D statuses are especially found in patients with a high level of disability and in older patients. Additionally, we showed that RRMS patients with a short disease duration (<5 years) who remained relapse-free prior to serum sampling displayed a better vitamin D status when compared to patients with relapses prior to serum sampling. The latter observation suggests that a good vitamin D status might lower the hazard for relapses in this cohort.

Because a disturbed peripheral CD4⁺ T cell homeostasis is especially found in RRMS patients with a short disease duration, and vitamin D is an important promoter of T cell homeostasis *in vitro*, we assessed in this cohort cross-sectionally if a correlation between vitamin D status and both function and composition of the peripheral CD4⁺ T cell compartment was present (described in **chapter 4**). In 29 RRMS patients, not the number of Treg in the circulation, but rather the function of Treg was negatively correlated with vitamin D status. This means that Treg were less capable of controlling T cell proliferation in patients with a poor vitamin D status. CD4⁺ T cells in the circulation produced relatively less pro- and more anti-inflammatory cytokines in patients with a good vitamin D status. We concluded that vitamin D appears to promote the regulation of T cell homeostasis *in vivo* in MS.

To investigate whether the role of vitamin D in calcium homeostasis was of primary importance, we investigated in **chapter 5** in the same 29 patients whether T cell regulation was also correlated with the effects of vitamin D on calcium homeostasis. There was no correlation of either Treg suppressive function or CD4⁺ T cell cytokine balance with serum levels of 1,25-dihydroxyvitamin D, total calcium, and parathyroid hormone (PTH) levels. This observation suggests that the interaction between vitamin D status and T cells *in vivo* is not dependent on calcium metabolism.

The associations between vitamin D status and CD4⁺ T cell function suggest that supplementation of vitamin D might be used to skew the T cell compartment to a more regulatory state in patients with MS. In preparation of a large intervention study, we performed a pilot study to assess both the safety of vitamin D supplementation and the effects of vitamin D supplementation on the T cell compartment (described in **chapter 6**). We observed in 15 RRMS patients that supplementation of 500 µg/day (20.000 IU/day) vitamin D₃ for 12 weeks did not affect the proportion of Treg in the circulation. The suppressive capacity of Treg was not enhanced significantly, and only a marginal trend towards improvement could be observed. However, after vitamin D supplementation, relatively more CD4⁺ T cells produced anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10), and relatively less cells produced pro-inflammatory cytokines (IFN-γ). This study suggests that the cytokine profile of pe-

ipheral CD4⁺ T cells may form an interesting marker to monitor the immune modulating effects of vitamin D in randomized placebo-controlled clinical trials. Additionally, we conclude that supplementation of high doses of vitamin D₃ was without side-effects in our cohort. Participants reported no side-effects, and the calcium levels in the circulation were unaffected.

In **chapter 7**, we assessed whether a functional genetic polymorphism of the vitamin D receptor (VDR) gene was associated either with MS, or with vitamin D status in patients with MS and healthy subjects. A genetic polymorphism is a common variation in the genome. In the case of this specific polymorphism, it leads to a longer or shorter VDR protein. We found no difference in the distribution of the polymorphism between 289 healthy subjects and 212 patients with MS. However, both in summer and in winter, lower vitamin D statuses were observed in carriers of the allele encoding the shorter VDR protein. The association was found both in patients and in healthy controls. We concluded that vitamin D related genetic variation may be an important confounder in intervention studies on vitamin D in MS, and should therefore be taken into account.

All the knowledge collected in the previously described chapters was combined in the development of an international trial on vitamin D supplementation in MS, of which the protocol is described in **chapter 8**. In a multi-center trial in several European countries, 348 RRMS patients with a disease duration <5 years will be included. In a double-blind, randomized, placebo-controlled design, we will assess whether supplementation of either vitamin D₃ or placebo aside regular MS therapy (Beta Interferon) has an additive inhibiting effect on disease activity of MS. In several sub-studies, the effects of this intervention on the peripheral immune system will be assessed. Additionally, potential genetic confounders of treatment effects will be taken into account.

In this thesis, we did not answer the question whether vitamin D reduces disease activity of MS. However, this thesis did contribute significantly to the development of a trial which might provide answers to this question. Additionally, a mechanism was conceptualized by which vitamin D may influence the pathophysiology of MS. We conclude (**chapter 9**) that a poor vitamin D status is associated with a high level of both relapse rate and disability in our MS population. Furthermore, vitamin D status correlates with the composition and function of the peripheral CD4⁺ T cell compartment in patients with MS. In a small pilot study, patients displayed after supplementation a less pro-inflammatory cytokine profile, which at least supports the idea that vitamin D supplementation may restore the imbalance in the peripheral CD4⁺ T cell compartment as is frequently found in MS. In a large clinical trial, we will investigate whether vitamin D can be used as a disease and immune modulator in MS.

Dutch summary

Nederlandse samenvatting

12

Multipele sclerose (MS) is een ernstige ontstekingsziekte van het centrale zenuwstelsel. In MS patiënten valt het immuunsysteem de isolatielaag rond zenuwen, het myeline, aan en zorgt ervoor dat deze isolatielaag beschadigd wordt. Hierdoor kunnen deze zenuwen niet meer goed functioneren en ervaart de patiënt uitval van lichaamsfuncties. De reden waarom het afweersysteem in de aanval gaat is niet duidelijk.

In de ontstekingsreactie bij MS spelen $CD4^+$ T cellen een belangrijke rol. Deze cellen zijn een essentieel onderdeel van de verworven immuun respons. Als een antigeen presenterende cel een pathogeen (bijvoorbeeld een bacterie) oppikt, laat hij deze aan de $CD4^+$ T cel zien. Als de $CD4^+$ T cel dit pathogeen herkent, reageert deze hierop door te gaan delen en door ontstekingsstoffen (cytokines) te maken. Dit zorgt ervoor dat het pathogeen door andere cellen opgeruimd wordt. Het is belangrijk dat een T cel normaal gesproken alleen bij indringers van buiten voor ontsteking zorgt, en niet bij het zien van lichaamseigen eiwitten. Hiervoor worden T cellen in hun ontwikkeling zorgvuldig geselecteerd, en zijn er speciale regulerende T cellen (Treg) in het lichaam, die de T cel respons in bedwang houden wanneer nodig. Bij MS patiënten denkt men dat dit proces mis gaat, en dat het lichaam een afweerreactie tegen een lichaamseigen stof veroorzaakt (auto-immuunziekte). Welke stof dit precies is, is onbekend. Wel wordt bij MS patiënten een instabiel T cel compartiment gevonden, met minder goed werkende Treg en $CD4^+$ T cellen die relatief gezien meer ontstekingsstoffen maken.

Vitamine D komt uit het voedsel en het zonlicht, en kennen we vooral als een belangrijke speler in de calcium huishouding. Verschillende studies suggereren een verband tussen een beperkte blootstelling aan vitamine D, en een toegenomen mate van beperking door MS. Dit zou kunnen betekenen dat vitamine D wellicht een remmende werking op de ziekteactiviteit van MS zou kunnen hebben. Met het vitamine D project waar dit proefschrift de start van is, willen we onderzoeken i) of we met het toedienen van vitamine D de ziekteactiviteit van MS kunnen remmen, en ii) welke biologische mechanismen hieraan ten grondslag liggen.

In **hoofdstuk 2** beschrijven we een literatuurstudie. Hierin hebben we onderzocht hoe stevig de aanwijzingen voor een ziektemodulerend effect van vitamine D op MS zijn, en welke rol vitamine D in het afweersysteem heeft. Experimentele studie in proefdieren en plastic schaaltes (*'in vitro'*) laten zien dat vitamine D een essentiële rol in de verworven immuun respons speelt, en een sterke promotor van T cel homeostase is. T cel proliferatie en productie van ontstekingsbevorderende cytokines worden geremd, de productie van ontstekingsremmende cytokines en de ontwikkeling van Treg worden gestimuleerd. In proefdiermodellen van MS voorkomt en remt vitamine D ook de ziekteverschijnselen. Interessant genoeg correleert vitamine D status, of afgeleiden hiervan, negatief met het risico op het ontwikkelen van MS. Ook een grote ziekteactiviteit van MS is geassocieerd met een beperkte vitamine D status. Echter, naast veiligheidsstudies zijn geen grote interventiestudies

met vitamine D verricht. We concluderen dat vitamine D een immuun modulator is, maar of vitamine D ook een immuun en ziekte modulator in MS is, is op dit moment onzeker.

In **hoofdstuk 3** hebben we in een cross-sectionele studie onder 267 patiënten uit onze MS populatie onderzocht of er een verband tussen ziekteactiviteit van MS en vitamine D status is. Lage vitamine D statussen werden gevonden in oudere patiënten en in patiënten met een grote mate van beperking. Hiernaast hadden RRMS patiënten met een korte ziekteduur (<5 jaar) die relapsvrij waren voor bloedafname, een betere vitamine D status dan patiënten die relapsen hadden. Deze laatste observatie is suggestief voor het idee dat een goede vitamine D status het risico op relapsen van MS zou kunnen verlagen.

Omdat in het cohort RRMS patiënten met een korte ziekteduur vooral een verstoring van perifere CD4⁺ T cel homeostase wordt gevonden, en vitamine D *in vitro* een belangrijke promotor van T cel homeostase is, onderzochten we in dit cohort cross-sectioneel of er een correlatie tussen vitamine D status en functie en samenstelling van het perifere CD4⁺ T cel compartiment was (beschreven in **hoofdstuk 4**). In 29 RRMS patiënten hing het aantal Treg in de circulatie niet samen met vitamine D, maar de Treg leken wel minder goed te werken in patiënten met een beperkte vitamine D status. CD4⁺ T cellen in de circulatie maakten bij patiënten met een hoge vitamine D status relatief minder ontstekingsbevorderende en meer ontstekingsremmende cytokines. Vitamine D lijkt dus *in vivo* in MS patiënten dus de regulatie van T cel homeostase te bevorderen.

Om te onderzoeken of de rol van vitamine D in de calcium huishouding voor deze interactie primair belangrijk is, bekeken we in **hoofdstuk 5** in dezelfde 29 patiënten of T cel regulatie ook samenhangt met afgeleiden van de effecten van vitamine D op de calcium huishouding. Zowel serum waarden van 1,25-dihydroxy vitamine D, totaal calcium, en parathyroïd hormoon (PTH) correleerden niet met Treg functie en CD4⁺ T cel cytokine balans. Deze observatie suggereert dat de interactie tussen vitamine D en T cellen ook *in vivo* onafhankelijk van het calcium metabolisme is.

De associaties tussen vitamine D status en CD4⁺ T cel functie suggereren dat met vitamine D suppletie het T cel compartiment gestuurd zou kunnen worden. Als voorbereiding op een grote studie verrichtten we een pilotstudy om naar zowel de veiligheid van vitamine D, als naar de effecten van vitamine D op de T cellen te kijken (beschreven in **hoofdstuk 6**). We vonden in 15 RRMS patiënten dat suppletie van 500µg/dag vitamine D voor 12 weken geen effect had op het aantal Treg in de circulatie. Hiernaast werd ook de Treg functie niet significant beïnvloed, en leek deze hooguit marginaal gestimuleerd te worden. Wel vonden we na vitamine D suppletie relatief gezien meer CD4⁺ T cellen die ontstekingsremmende cytokines maakten (IL-4, IL-10), en minder die ontstekingsbevorderende cytokines maakten (IFN-γ). Deze studie suggereert dat perifere CD4⁺ T cellen een interessante marker vormen om de immuun modulerende gevolgen van vitamine D suppletie in grote

gerandomiseerde en placebo gecontroleerde studies te onderzoeken. Verder concluderen we dat suppletie van hoge dosis vitamine D zonder bijwerkingen was. Deelnemers rapporteerden geen bijwerkingen, en de calcium waarden in het bloed bleven onveranderd.

In **hoofdstuk 7** onderzochten we de associatie van een functioneel vitamine D receptor (VDR) gen polymorfisme met MS, én met vitamine D status in MS patiënten en gezonde proefpersonen. Een genetisch polymorfisme is een veel voorkomende variatie in het erfelijk materiaal, dat in het geval van dit polymorfisme tot een langer of korter VDR eiwit leidt. Er was geen verschil in het voorkomen van het polymorfisme tussen 289 gezonde proefpersonen en 212 patiënten met MS. Wel werden zowel in de zomer als in de winter lagere vitamine D statussen gemeten in patiënten met het allel dat met een korter VDR eiwit geassocieerd is. In de gezonde proefpersonen vonden we dit verband ook. We concluderen dat vitamine D gerelateerde genetische variatie mogelijk een belangrijke confounder is in interventiestudies met vitamine D en daarom in deze studies meegenomen moet worden.

Alle opgedane kennis uit de verschillende hoofdstukken hebben we gecombineerd in de ontwikkeling van het protocol voor een grote internationale studie naar vitamine D suppletie in MS dat beschreven staat in **hoofdstuk 8**. In een Multicenter studie in verschillende Europese landen wordt in 348 patiënten met RRMS en een korte ziekteduur onderzocht of suppletie van vitamine D of placebo naast reguliere MS therapie (Interferon Beta) een toegevoegd remmend effect op de ziekteactiviteit van MS heeft. Hiernaast zal in verschillende substudies het effect op het perifere immuunsysteem onderzocht worden. Verder worden in de trial ook genetische variabelen meegenomen.

Met dit proefschrift hebben we niet de vraag beantwoord of vitamine D de ziekteactiviteit van MS kan remmen. Wel heeft dit proefschrift bijgedragen aan de ontwikkeling van een klinische studie die dit wel kan doen. Daarnaast heeft het een mechanisme uitgekristalliseerd waardoor vitamine D de pathofysiologie van MS kan beïnvloeden. We concluderen (**hoofdstuk 9**) dat een slechte vitamine D status samenhangt met een grote relaps activiteit en een grote mate van beperking in onze patiëntenpopulatie. Verder hangen de samenstelling en functie van het perifere CD4⁺ T cel compartiment samen met vitamine D status in de circulatie van MS patiënten. In een kleine openlabel interventiestudie hadden patiënten na vitamine D suppletie een minder ontstekingsbevorderend CD4⁺ T cel cytokine profiel, wat op z'n minst de suggestie wekt dat vitamine D suppletie de imbalance in het perifere CD4⁺ T cel compartiment bij patiënten met MS kan herstellen. In een grote interventiestudie gaan we onderzoeken of vitamine D als ziekte en immuun modulator in MS ingezet kan worden.

