The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | 神経ペプチドCGRPのTh細胞を介したアレルギー制御作用 |
| Author(s) | 三上, 統久 |
| Citation | 大阪大学, 2013, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/24956 |
| rights | |
| Note | |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【20】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 三　上　統　久（みかみ　のりひさ） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（薬学） |
| 学　位　記　番　号 | 第　２５９７２　号 |
| 学位授与年月日 | 平成25年３月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第４条第１項該当<br>薬学研究科応用医療薬科学専攻 |
| 学　位　論　文　名 | **神経ペプチドCGRPのTh細胞を介したアレルギー制御作用** |
| 論文審査委員 | （主査）<br>教　授　辻川　和丈<br>（副査）<br>教　授　八木　清仁　　教　授　中川　晋作　　教　授　水口　裕之 |

## 論文内容の要旨

ストレスによる免疫力の低下やアレルギーの悪化など，神経系による免疫系の制御は生体の恒常性維持において非常に重要な役割を担っていると考えられるが，その分子科学的メカニズムには不明な点が多い．神経ペプチドであるcalcitonin gene-related peptide (CGRP)も神経系に由来し，免疫系に作用する神経伝達物質である．このCGRPは神経系において痛覚伝達や血管平滑筋弛緩作用を発揮する一方で免疫系に対してもサイトカイン産生制御や増殖抑制など様々な作用を示す．これらの作用は，Gαsタンパク質に共役してアデニル酸シクラーゼを活性化するcalcitonin receptor-like receptor (CLR)とCGRPと特異的に結合するreceptor activity-modifying protein 1 (RAMP1)のヘテロ二量体で構成される受容体にCGRPが特異的に結合して発揮される．私はこれまでに，RAMP1を欠損したマウスにおいてはTh2型の皮膚炎症が悪化することを明らかにしており，本論ではCGRPがTh細胞サブセットに与える影響とT細胞特異的CGRP受容体欠損マウスのアレルギー応答性について詳細な検討を進めた．

私はまずCGRPがhelper T (Th)細胞の分化に対してどのような作用を示すのか検討した．マウス脾臓よりNaïve Th細胞をFACSによって精製し，各Th細胞サブセット分化条件下において培養することで産生されるサイトカイン量をELISAにて測定した．その結果，CGRPの添加はTh1細胞分化を抑制し，Th2細胞，Th9細胞，Th17細胞から産生されるサイトカインを増加させた．さらにこのサイトカイン産生促進作用について詳細な機序を解明するため，CGRP受容体シグナル伝達において重要な役割を果たすと考えられるcAMP/PKA経路の寄与について検討した．結果，CGRPとPKA阻害剤を同時に添加するとCGRPのサイトカイン産生促進作用が消失することが確認でき，CGRPはPKAの活性化を介してTh細胞分化を制御することが示された．また，PKAによるサイトカイン産生制御機構としてPKAがGSK-3βの不活性化を介してNFATc2の核内移行を促進するという新たなシグナル伝達経路を見出し，CGRPがこのPKA/GSK-3β/NFATc2という経路を介してサイトカイン産生を促進することも示唆された．

次にこのin vitroで見られたTh細胞制御作用の重要性を評価するため，T細胞特異的RAMP1欠損マウスのアレルギー応答性を評価した．ここではTh9細胞がその発症に寄与する気道炎症モデルとTh17細胞の寄与が示されている脳脊髄炎モデルを用いた．まず表現型に関して種々の解析を進めた結果，両炎症モデルにおいてT細胞特異的RAMP1欠損マウスで有意な炎症反応の抑制が認められた．これはCGRPのT細胞制御作用が生理的にこれらのアレルギー反応を促進していることを示している．またその原因として気道炎症においてはTh9細胞からのIL-9産生量が，脳脊髄炎においてはTh17細胞からのIL-17産生量がT細胞特異的RAMP1欠損マウスで減少していることを見出した．この結果からCGRPがTh細胞分化促進作用を介して様々なアレルギーの悪化に寄与していることが示された．

以上のように，CGRPはTh2型皮膚炎症やTh17細胞による脳脊髄炎，Th9細胞による気道炎症を亢進する．そこで最後にCGRPの産生量を変化させるような神経系の異常とアレルギー応答性の関連について評価した．第一に知覚神経刺激がCGRP含有神経線維の分布に与える影響を評価した．生後3~5日目のマウス皮膚にホルムアルデヒドを塗布し，6週齢において皮膚組織を観察するとCGRP陽性神経線維の長さが伸長していた．そこでこのマウスに皮膚炎症を誘導すると，Th2型皮膚炎症の悪化，そしてTh2型サイトカインIL-4の産生促進作用が認められた．さらに興味深いことにRAMP1欠損マウスではこのようなホルムアルデヒド塗布の作用が見られず，新生仔期におけるホルムアルデヒド暴露はCGRP陽性神経線維の伸長を介して皮膚炎症応答性を変化させることが明らかとなった．

次に精神的なストレス暴露によるCGRP放出とアレルギー応答性の関連を検討した．精神的なストレスを与えると血中CGRP濃度の有意な上昇が認められ，Th2型皮膚炎症や気道炎症の悪化も確認できた．そしてやはりRAMP1欠損マウスではストレスによるアレルギー悪化はほとんど見られず，CGRP産生量増加がストレス応答時のアレルギー悪化を引き起こすことが示された．

本研究により，CGRPが免疫系の制御において重要な役割を果たし，さらに神経系の異常に伴うCGRP産生制御の崩壊が免疫系のバランス，ひいてはアレルギー疾患の発症や悪化につながる可能性が示された．このような神経系由来の物質による免疫系の恒常性制御とその破たんによるアレルギー発症機構という新たな生体現象を解明できたことが今後の免疫研究や免疫系疾患の新たな治療戦略につながることを期待する．

## 論文審査の結果の要旨

外来抗原に対する生体防御として非常に重要な機能を果たす免疫系は複雑かつ巧妙に制御されており，その制御機構の全容を明らかとすることは難治性疾患や感染症の治療に必要不可欠である．近年，免疫系制御機構について神経系との関連性が注目されている．神経系による免疫系の制御に関しては，古くから精神的なストレスが免疫応答を弱めること，一方で自己免疫疾患を悪化させることが経験的に理解されてきた．しかし，その分子生物学的な機序はほとんど不明であり，科学的な解析が必要とされていた．本論文ではストレス応答時に放出され，多様な免疫制御作用を持つ神経ペプチドとしてcalcitonin gene-related peptide (CGRP)に着目し，遺伝子改変動物を駆使してCGRPによる免疫系制御機構の解明と免疫疾患との関連性を解析した．その結果，

（１）神経ペプチドCGRPはTh1細胞分化を抑制し，Th2細胞，Th9細胞，Th17細胞分化を促進する作用を有する．また，そのシグナル伝達機序としてcAMP/PKA経路の活性化，GSK-3βの不活性化によるNFATc2の核内移行促進機構が存在する．

（２）CGRP受容体を欠損したマウスではTh9細胞分化の抑制による気道炎症の減弱やTh17細胞分化の抑制により多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊炎の減弱が認められる．

（3）新生仔期における化学物質暴露や成体における精神的ストレス暴露によってCGRPの産生・放出量が増加し，気道炎症や皮膚炎症が悪化する．
ことを明らかとした．

免疫系疾患の発症を理解するためには，免疫担当細胞の微妙な機能バランスがどのように調節されているか，またそのバランスがどのような機序により偏っているのかを理解することが重要である．本論文において神経系の異常に伴うCGRP産生制御の崩壊が免疫系のバランス，ひいてはアレルギー疾患の発症や悪化につながる可能性を示したことは大変重要な意義を持つ．ヒトアトピー性皮膚炎や気道炎症でCGRPが増加しているという報告もあることから，本研究に基づいた精神的ストレスと環境要因とを併せたさらなる解析により，CGRPシグナル伝達分子が有望な免疫疾患の治療標的となることも期待できる．以上のように重要かつ応用性が期待できる知見を得た本論文は，博士（薬学）の学位論文に値するものと認める．