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

2012 年度　博士論文

神経ペプチド CGRP の Th 細胞を介した アレルギー制御作用

大阪大学大学院薬学研究科　細胞生理学分野

三上　統久

目次

緒論 2

本論 4
第 1 章　神経ペプチド CGRP の Th 細胞制御機構解析 4
第 1 節　実験材料と実験方法 4
第 2 節　CGRP の Th 細胞分化制御作用 8
第 3 節　CGRP の Th 細胞制御機構解析 11
第 4 節　小括 16

第 2 章　神経ペプチド CGRP のアレルギー制御作用 17
第 1 節　実験材料と実験方法 17
第 2 節　EAE における CGRP の役割 20
第 3 節　気道炎症における CGRP の役割 22
第 4 節　小括 24

第 3 章　神経ペプチド CGRP の発現異常とアレルギー応答性 25
第 1 節　実験材料と実験方法 25
第 2 節　新生仔期の化学物質刺激と成体におけるアレルギー応答性の変化 27
第 3 節　精神的なストレス暴露がアレルギー応答性に与える影響 30
第 4 節　小括 33

総括 34

結論 37

謝辞 38

参考文献 39

略語 43

緒論

免疫系は外来抗原に対する生体防御として非常に重要な役割を持つと同時に，その過剰な活性化が様々な炎症性疾患の原因ともなりうる．そのため，生体内における免疫系の制御は複雑かつ巧妙に行われており，そ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．免疫反応は大きく分けて自然免疫応答と獲得免疫応答の 2 種類に分類できる．前者はマクロファージや好中球，NK 細胞などが外来抗原を直接攻撃することで排除するシステムであり，炎症性サイトカインの産生や貪食作用，細胞傷害作用などがその働きに寄与している．一方で獲得免疫応答は抗原に特異的な細胞応答および抗体産生を主とする反応であり，T 細胞や B 細胞がその中心的役割を担っている．この免疫系に関与する細胞，分子は極めて多種類であり，その制御の大部分は未だ明らかとなっていない．このことは自己免疫疾患をはじめとして，一般に難病と称される特定疾患の多くが免疫系に関連した病態を示すことからも伺える．

近年，そのような免疫系制御機構の中で神経系との関連性が注目されている．古くから精神的なストレスは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示唆されてきた．しかし，その分子生物学的な機序はほとんど不明であり，科学的な解析は不十分である．この神経系による免疫系の制御について基礎的な知見は比較的多く蓄積されており，神経系由来の神経伝達物質やホルモンが免疫系の細胞に様々な影響を与えることが明らかとなってきている(1，2)．私はそのような物質の中でも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)の機能に着目し，解析を進めてきた．CGRP は 37 アミノ酸からなる知覚神経ペプチドであり，ストレス応答の他にも酸や熱，化学物質の刺激など様々な要因によって神経末端より放出される．CGRP には αCGRP と βCGRP，2 種類のアイソフォームが存在し，両分子ともに 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ている CGRP 受容体に特異的に結合する(3)．そして，その結合よって細胞内 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)濃度の上昇が引き起こされ，血管平滑筋の弛緩作用などの生理的作用が発揮される(4，5)．

一方で CGRP の免疫細胞に対する作用についても古くから研究が進められており，T 細胞の増殖抑制や B 細胞からの抗体産生抑制，マクロファージの抗原提示能抑制といった働きを持つことが示されてきた(6-8)．またわれわれの検討でも CGRP が T 細胞からの IL-4 産生を促進することや樹状細胞からの炎症性サイトカイン産生を抑制することなどを見出してきた(9-11)．しかしながらこれらの検討は多くが *in vitro* におけるものであり，CGRP の生理的な作用には不明な部分が多かった．そこで CGRP 特異的受容体サブユニットである RAMP1 を欠損したマウスを作製し CGRP の生体内における役割を解析してきた(11)．

現在までに CGRP のアレルギー制御作用として皮膚炎症モデルである接触過敏反応(CHS)に対する作用が明らかとなっている(12)．CGRP は抗原提示細胞の遊走阻害や Th1 細胞分化の阻害によって Th1 細胞が寄与する 2,4,6-Trinitrochlorobenzene (TNCB)-CHS を抑制し，一方で Th2 細胞分化を促進することで Th2 型の fluoresceinisothiocyanate (FITC)-CHS を増強するという極めて複雑な機能を持っていることが示された(Figure 1)．そこで私は特に CGRP と T 細胞の関連に着目し，

その詳細な作用機序やアレルギー応答における重要性，そして神経系の異常とCGRPを介した炎症悪化の関連を見出したので，ここに博士論文としてまとめた．

CD4^{+}ヘルパーT(Th)細胞はそのサイトカイン産生パターンから様々なサブセットに分類できる．その代表的なサブセットとして，IL-2 や IFN-γ を産生する Th1 細胞と，IL-4，IL-5，IL-10，IL-13 を産生する Th2 細胞が存在する．Th1 細胞はマクロファージやキラーT 細胞などを活性化することでウイルスや細菌の排除に，Th2 細胞は IgE の産生を促すことで寄生虫の排除に寄与する．そして，Th1 細胞の産生する IFN-γ は Th2 細胞分化を抑制し，Th2 細胞の産生する IL-4 は Th1 細胞分化を抑制するなど，この 2 つの細胞は互いに制御し合いながら生体内でのバランスを維持している．このように，Th 細胞は体内に侵入した外敵に応じて活躍するサブセットが異なるが，このバランスが過度に Th2 細胞に傾いてしまうとアレルギー疾患を，Th1 細胞に傾くと自己免疫疾患を発症しやすくなってしまうと考えられてきた．

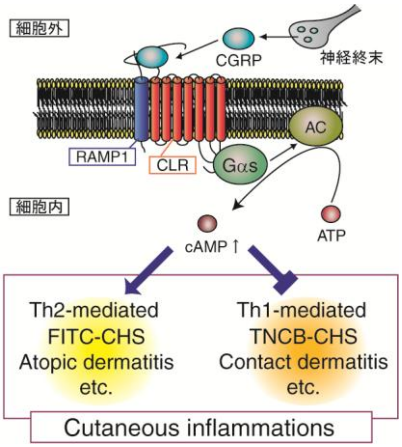


Figure 1. CGRP シグナルと皮膚炎症
CGRP 受容体は Gαs タンパク質と共役しており，アデニル酸シクラーゼ(AC)を活性化して細胞内 cAMP 濃度上昇を引き起こす．その作用によって Th1 型皮膚炎症を抑制し，Th2 型皮膚炎症を促進する(12).

近年これらに加えて新たな Th 細胞サブセットが多く発見されており，その中に Th9 細胞や Th17 細胞が存在する．Th9 細胞は，これまで Th2 細胞が主に産生するとされてきた IL-9 を産生する Th 細胞である(13, 14)．IL-9 は，B 細胞からの IgE 産生，好酸球の活性化，マスト細胞における Fcε 受容体の発現上昇を誘導することが報告されており(15-17)，また，IL-9 欠損マウスや IL-9トランスジェニックマウスを用いた検討により，IL-9 が気道炎症を促進することが明らかとなっている(18, 19)．一方，Th17 細胞は，IL-17 や IL-21 を産生する Th 細胞である(20-23)．IL-17 は，好中球の動員や増殖，マクロファージの活性化など種々の免疫応答を促進することで炎症を引き起こし，細胞外細菌や真菌の排除に寄与する(24)．IL-17 欠損マウスでは，CHS や実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)が発症しないことが報告されており(25, 26)，Th17 細胞は炎症性疾患の発症や進行に重要な因子と考えられる．

このように，Th 細胞やそれらを取り巻く環境は，実に絶妙なバランスで成り立っている(Figure 2)．このバランスを制御する分子のひとつとして，CGRP は非常に重要な役割を担っていると考えられる．本論では，この CGRP が，アレルギーや自己免疫疾患をどう制御するのかを Th2 細胞，Th9 細胞，Th17 細胞に焦点を当てて研究を進めた．

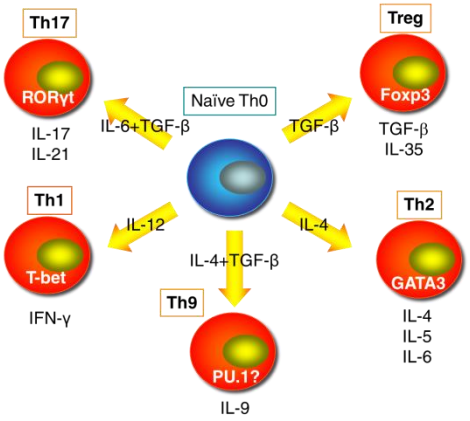


Figure 2. Th 細胞サブセットの分化
Th 細胞はその産生するサイトカインに応じて様々なサブセットに分類される．また，これらのサブセットはナイーブ Th0 細胞から周囲のサイトカイン環境に依存して選択的に分化する．

本論

第 1 章　神経ペプチド CGRP の Th 細胞制御機構解析

第 1 章ではまず *in vitro* における検討を中心に，CGRP の Th 細胞制御メカニズムについて検討した.

第 1 節　実験材料と実験方法

＜実験材料＞

・マウス

BALB/c マウス，C57BL/6 マウスは日本チャールズリバーより購入した．RAMP1 欠損マウスは BALB/c マウス，C57BL/6 マウスと 12 世代退交配したものを使用した.

・抗体と試薬

R-Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-mouse CD25 mAb (PC61) および PE-conjugated anti-mouse IL-17 mAb (TC11-18H10)は BD Pharmingen (San Diego, CA)より購入した.

Allophycocyanin (APC)-Cy7-conjugated anti-mouse CD4 mAb (GK1.5)および PE-conjugated anti-mouse IL-9 mAb (RM9A4)は BioLegend (San Diego, CA)より購入した.

Anti-phospho-glycogen synthase kinase (GSK) -3β (ser 9) polyclonal antibody は Bioss (Woburn, MA)より購入した.

Anti-PU.1 polyclonal antibody は Bioworld Technology (Louis Park, MN)より購入した.

APC-conjugated anti-mouse CD44 mAb (IM7.8.1)および recombinant mouse IL-23 は Miltenyi Biotec (Auburn, CA)より購入した.

FITC-conjugated anti-mouse CD62L mAb (REG56)は Immunotech (Marseille, France)より購入した.

PE-conjugated anti-mouse IL-23 receptor polyclonal antibody および recombinant mouse IL-6 は R&D Systems (Minneapolis, MN)より購入した.

Anti-GATA3 polyclonal antibody，anti-NFATc2 polyclonal antibody および NFAT activation inhibitor III (INCA-6)は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)より購入した.

αCGRP は Peptide institute (Osaka, Japan)より購入した.

βCGRP は Phoenix Pharmaceuticals, Inc. (Burlingame, CA)より購入した.

Recombinant human TGF-β1 および recombinant mouse IL-4 は PeproTech, Inc. (Rocky Hill, NJ)より購入した.

Dibutyryl cAMP (db-cAMP)は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)より購入した.

N6-Benzoyl-cAMP (6-bnz-cAMP), 8-(4-Chlorophenylthio)-2’-O-Methyl-cAMP (8-CPT-cAMP)および GSK-3β inhibitor VII は Calbiochem (San Diego, CA)より購入した.

PKA inhibitor H89 は Sigma Aldrich (St. Louis, MO)より購入した.

・完全培地

Fatal Calf Serum (FCS)	60	ml
0.05 M 2-mercaptoethanol (Wako)	0.5	ml
10 mM non-essential amino acids (GIBCO)	5.0	ml
100 mM pyruvic acid (Sigma)	5.0	ml
0.2 M L-glutamine (Wako)	5.0	ml
20000 units/ml penicillin (Wako)	2.5	ml
20 mg/ml streptomycin (Wako)	2.5	ml
50 μM kanamycin (Wako)	0.2	ml
RPMI1640 (Sigma)	500	ml
	580.7	ml

・使用機器

Microplate reader Model680 (BIO-RAD), Immuno Wash MODEL1575 (BIO-RAD), Light Cycler クイックシステム 350S (Roche Diagnostics), フローサイトメーターFACSCalibur (Becton Dickinson) , フローサイトメーターFACSAriaII (Becton Dickinson) , システム生物顕微鏡 BX51 (OLYMPUS).

＜実験方法＞

・ナイーブ Th 細胞(Th0 細胞)の精製と刺激

マウス脾臓細胞を抗 CD4 抗体, 抗 CD25 抗体, 抗 CD44 抗体, 抗 CD62L 抗体で染色し, FACSAriaII を用いて $CD4^{+}CD25^{-}CD44^{low}CD62L^{+}$細胞を精製した(Figure 3). この Th0 細胞を完全培地中, 種々のサイトカイン, CGRP および阻害剤存在下で固相化抗 CD3 抗体(2C11)と 1 μg/ml 抗 CD28 抗体(PV-1, BeckmanCoulter)による刺激を行った. 48 時間刺激後, 上清と細胞を回収し, ELISA 法, real-time PCR 法, 細胞内染色法, クロマチン免疫沈降(ChIP)法による解析を行った.

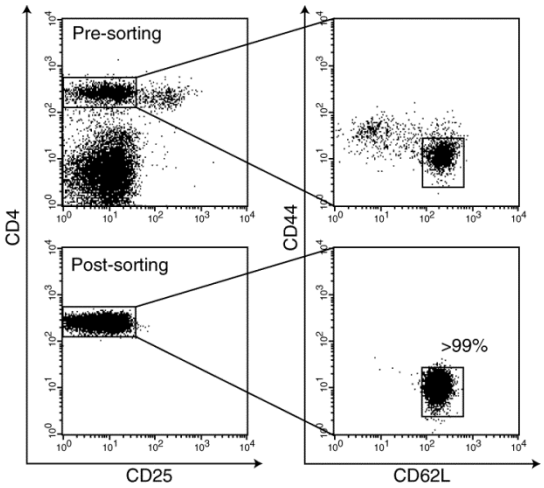


Figure 3. ナイーブ Th 細胞の精製
マウス脾臓より $CD4^{+}CD25^{-}CD44^{low}CD62L^{+}$細胞を FACS にて精製した.

・ELISA 法

IL-9 の測定には Mouse IL-9 Tissue Culture ELISA Ready-SET-Go!® set (eBioscience), IL-17 の測定では, ELISA MAX™ Set Deluxe (Mouse IL-17A) (BioLegend)を説明書に従い使用した.

IL-4 の測定では抗 mouse IL-4 抗体(11B11)産生ハイブリドーマの培養上清, ビオチン化抗 mouse IL-4 抗体(VBD6-24G2, eBioscience)を使用した.

IFN-γ の測定では抗 mouse IFN-γ 抗体(R4-6A2, BD Pharmingen), ビオチン化抗 mouse IFN-γ 抗体(XMG1.2, BD Pharmingen)を使用した.

・Real-time PCR 法

RNA の抽出は Trizol (Sigma)を用いて行った．凍結させた細胞ペレットに Trizol 500 μl を加え，1 分間ボルテックスした．そこに 100 μl のクロロホルムを添加し，1 分間ボルテックスした後に 12000G で 10 分間遠心分離した．新しいチューブに上層を 210 μl 移し，そこに 190 μl のイソプロパノールを加えて 5 秒間のボルテックスを 2 回行った．4℃にて 20 分静置した後に 15000G で 20 分遠心分離した．上清をデカントで除き，400 μl の 80%エタノールを加えて 15000G で 10 分間遠心分離した．同様の操作をもう一度行い，その後エタノールを風乾させた後に RNase free distilled H_2O に溶解させた．

RNA は PrimeScript® RT reagent Kit (TaKaRa)を用いて cDNA に逆転写した．

Real-time PCR では，LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green Ⅰ (Roche Diagnostics) と SYBR Premix Ex Taq (Takara) を使用した．また，以下のプライマーを使用した．

IL-9 … sense : GCATCAGAGACACCAATTAC
antisense : TCAGGTCGGCTTTTCTG
IL-17 … sense : ACCTCAACCGTTCCAC
antisense : CAGGACCAGGATCTCTT
IL-21 … sense : GCCAGATCGCCTCCTGATTA
antisense : CATGCTCACAGTGCCCCTTT
IL-23R … sense : TCAGTGCTACAATCTTCAGAGG
antisense : GCCAAGAAGACCATTCCCG
GATA3 … sense : CGGGACCCTGACTATGG
antisense : CAGCGATGAAGAATCTGT
NFATc2 … sense : TCTGAACCCTATCAAGAACCG
antisense : TTCTGGAACCCTATACTATCCG
RORγt … sense : TGTCCTGGGCTACCCTACT
antisense : GTGCAGGAGTAGGCCACAATT
PU.1 … sense: AGAGCTATACCAACGTCCAATGC
antisense : TTCTCAAACTCGTTGTTGTGGAC
GAPDH… sense : CATGCCATCACTGCCACCC
antisense : GGTAGGAACACGGAAGGCC

・細胞内染色法

フローサイトメトリー解析には，細胞を BD Cytofix/Cytoperm™ Kit で固定し，説明書に従って染色後 FACSCalibur による測定を行った．

蛍光顕微鏡による解析には，細胞を 4% paraformaldehyde (PFA)もしくはアセトンによって固定し，0.25% TritonX-100 による可溶化，5% bovine serum albumin-PBS 溶液によるブロッキングの後に抗体で染色した．その後，Vectashield with 4’,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories)を用いて封入し，システム生物顕微鏡 BX51 を用いて観察した．

・Chromatin immunoprecipitation (ChIP)法

ChIP 解析は EpiQuick ChIP kit (Epigentek)を用いて説明書に従い行った． また以下のプライマーを使用した.

IL-9 promoter … sense : GATTCTCACAACCAGAATTCCTGC
IL-9 promoter … antisense : CTACCAGCATCTTCCAGTCTAGC
IL-17 promoter … sense : GGGCAAGGGATGCTCTCTAG
IL-17 promoter … antisense : CTGAAGCTGCTGCAGAGCTG

＊すべての実験において CGRP は 1 nM の最終濃度で培養開始と同時に培地に添加している. また, 図中の表記として α:αCGRP, β:βCGRP を意味する.

＊すべての実験において Th0 条件:サイトカイン添加なし, Th1 条件:IL-12 (10 ng/ml), Th2 条件: IL-4 (10 ng/ml), Th9 条件:IL-4 (10 ng/ml)+TGF-β (5 ng/ml), Th17 条件:IL-6 (20 ng/ml)+ TGF-β (5 ng/ml)で培養している.

＊すべての実験において mRNA の発現量は GAPDH の発現量に対する相対値を示している.

＊2 群間の統計値解析には Student's *t*-test を適用した. 3 群以上の解析には適当な分散分析後に Student-Newman-Keuels test を適用した. また有意水準は 5%とした.

第 2 節　CGRP の Th 細胞分化制御作用

＜Th 細胞分化に対する CGRP の作用＞

まず，各 Th 細胞サブセット（Th1, Th2, Th9, Th17 細胞）に対する CGRP の作用を確認するため，ナイーブ Th 細胞を種々の分化条件下で培養し，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 は Th1 細胞からの IFN-γ 産生を顕著に抑制する一方で，Th2 細胞からの IL-4 産生，Th9 細胞からの IL-9 産生および Th17 細胞からの IL-17 産生を有意に増加させた(Figure 4).

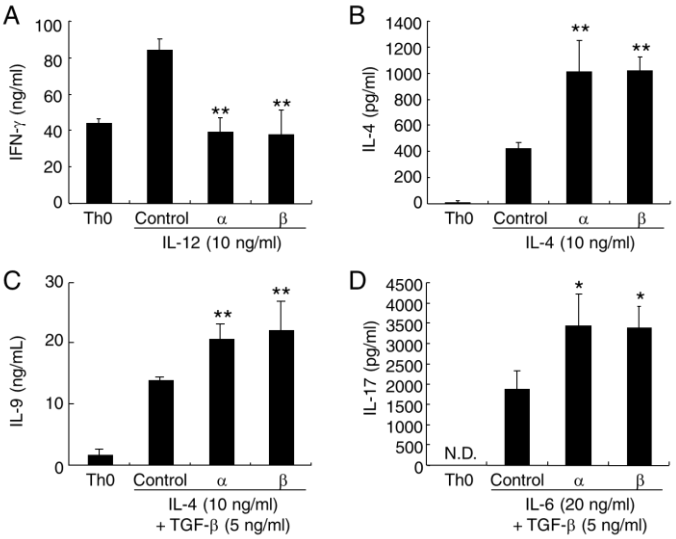


Figure 4. Th 細胞分化に対する CGRP の影響
ナイーブ Th 細胞を各分化条件(Th1:A，Th2:B，Th9:C，Th17:D)で培養し，産生されるサイトカイン量を ELISA で測定(n=3). α:αCGRP，β:βCGRP.
Values are presented as mean ± SD.
*P < 0.05，**P < 0.01 vs. control.

特に新規 Th 細胞サブセットである Th9 細胞や Th17 細胞に対する作用について詳細に検討するため，real-time PCR 法および細胞内サイトカインの染色を行った．その結果，CGRP は IL-9, IL-17 それぞれの mRNA 発現量と陽性細胞の割合を増加させており(Figure 5，6)，CGRP が確かにこれらサイトカインの産生や Th9, Th17 細胞への分化を促進していることが示された．またこの分化促進作用は RAMP1 欠損マウス由来の Th 細胞を用いた実験では観察されなかったことから(data not shown)，CGRP は RAMP1/CLR 受容体を介して Th 細胞分化を制御していることも確認している．以上の結果から CGRP が Th1 分化を抑制し，Th2，Th9，Th17 細胞への分化およびサイトカイン産生を促進することが明らかとなった．

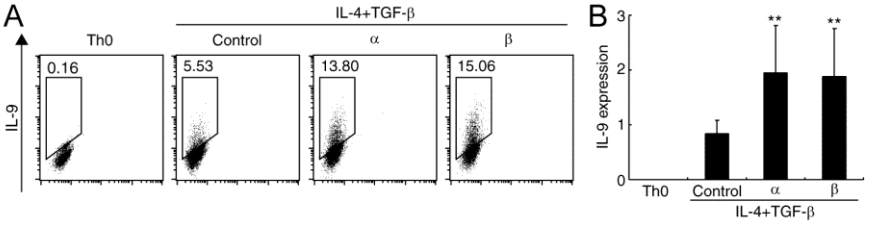


Figure 5. Th9 細胞に対する作用
Th9 細胞分化時の IL-9 陽性細胞の割合(A)と mRNA 発現量(B, n=3). α:αCGRP，β:βCGRP.
Values are presented as mean ± SD.
**P < 0.01 vs. control.

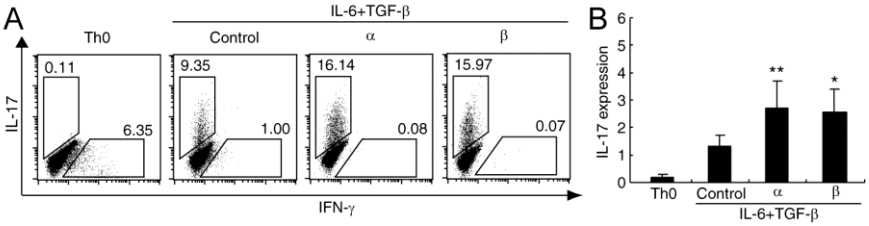


Figure 6. Th17 細胞に対する作用
Th17 細胞分化時の IL-17 陽性細胞の割合(A)と mRNA 発現量(B，n=3). α:αCGRP，β:βCGRP.
Values are presented as mean ± SD.
*P < 0.05，**P < 0.01 vs. control.

＜CGRP の Th9 細胞分化に与える詳細な作用＞

Th9 細胞は IL-9 を産生するとされる新規 Th 細胞サブセットであるが，その機能や分化における詳細な制御機構，生理的役割には不明な部分が多い．Th9 細胞における重要な因子としては現在までに PU.1 や IRF4，GATA3 といった転写因子の寄与が報告されている(27，28)．そこで，CGRP が Th9 細胞分化時にどのような影響を与えているのか詳細に検討するため，real-time PCR 法によって転写因子の発現を解析した．その結果，CGRP の添加によって PU.1 および GATA3 遺伝子の発現上昇が認められた(Figure 7A)．また，これら遺伝子の発現増加はタンパク質レベルでも確認できており(Figure 7B and C)，CGRP による IL-9 産生促進作用にこのような転写因子の発現促進作用が寄与している可能性が示唆された．

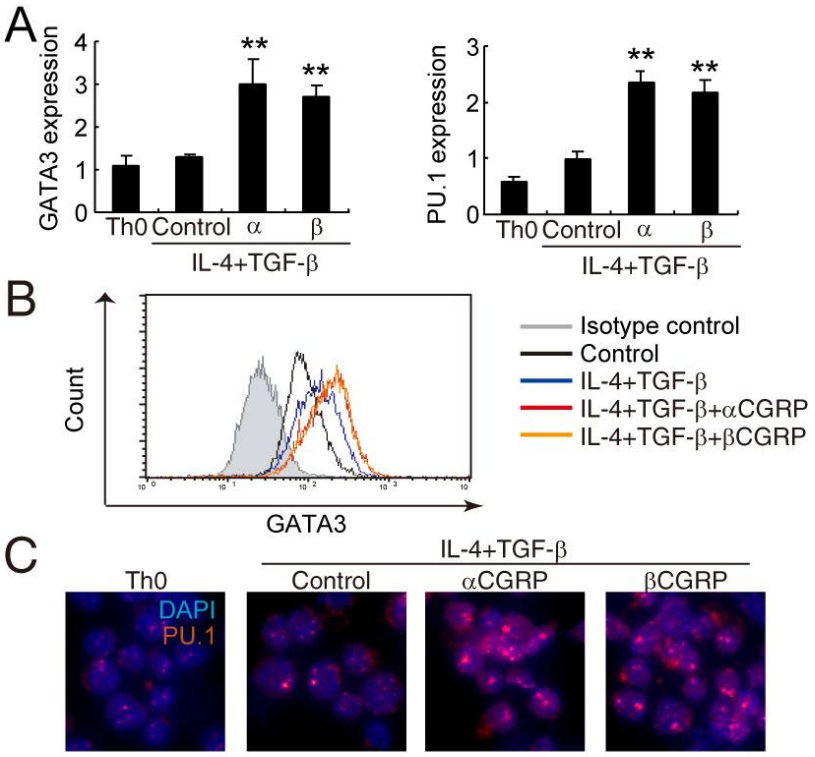


Figure 7. Th9 細胞分化における転写因子発現に対する CGRP の影響

A，Th9 細胞分化時の GATA3，PU.1 mRNA 発現量を real-time PCR 法にて測定(n=3)．B，GATA3 タンパク質の発現量をフローサイトメトリー解析にて測定．C，PU.1 の発現量を免疫蛍光染色法にて測定．α:αCGRP，β:βCGRP．

Values are presented as mean ± SD.　**P < 0.01 vs. control.

＜CGRP の Th17 細胞分化に与える詳細な作用＞

Th17 細胞も比較的新しく同定された Th 細胞サブセットであり，様々な炎症性疾患への関与が推測されている．Th17 細胞分化において重要な転写因子として RORγt が知られている(20)．そこで RORγt 遺伝子の発現量を解析したが，CGRP による影響は見られなかった(Figure 8A)．一方で Th17 細胞の機能促進には IL-21 のオートクライン作用や IL-23 受容体を介したシグナル伝達が重要であることも知られている(29-31)．そこで，IL-21 および IL-23 受容体の発現に与える CGRP の作用を検討した結果，mRNA レベルやタンパク質レベルでの発現増強作用が認められた(Figure 8B-E)．そこで培地中に IL-23 を添加した際の CGRP の作用も検討したところ，IL-23 存在下では CGRP による IL-17 産生増強作用がより強く表れていた(Figure 8F)．これらの結果は CGRP が IL-21 の産生や IL-23 受容体の発現を増加させることで IL-17 産生を促進している可能性を示している．

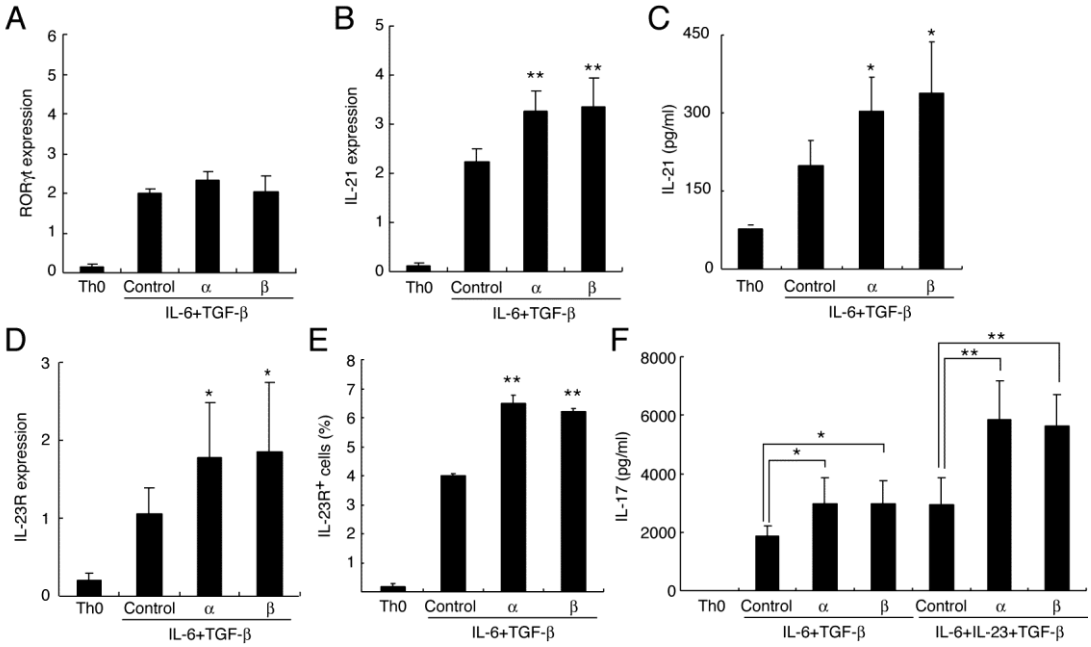


Figure 8. Th17 細胞分化における CGRP の影響

A，Th17 細胞分化時の RORγt mRNA 発現量を real-time PCR 法にて測定(n=3)．B，IL-21 mRNA 発現量を real-time PCR 法にて測定(n=3)．C，IL-21 産生量を ELISA 法にて測定(n=3)．D，IL-23 receptor (IL-23R) mRNA 発現量を real-time PCR 法にて測定(n=3)．E，IL-23R タンパク質の発現量をフローサイトメトリー解析にて測定(n=3)．F，IL-23 (20 ng/ml) 存在下での IL-17 産生に対する CGRP の作用を ELISA 法にて解析(n=3)．α：αCGRP，β：βCGRP．
Values are presented as mean ± SD.　*P < 0.05，**P < 0.01 vs. control.

第 3 節　CGRP の Th 細胞制御機構解析

＜cAMP/PKA 経路を介した制御機構＞

ここまで CGRP が Th 細胞分化時にどのような表現型への作用を示すのか検討を進めてきた. そこで次に CGRP の作用機序を細胞内シグナル伝達系に着目して解析を進めた. 緒論で述べたとおり, CGRP は細胞内 cAMP 濃度の上昇を引き起こしてシグナルを伝達する. そこでまず, cAMP 経路の下流について膜透過型 cAMP アナログを用いた検討を行った. 一般的に cAMP の濃度上昇は PKA および exchange protein directly activated by cAMP (EPAC)を介在して生理活性を発揮する(32). そこで PKA または EPAC に特異的な cAMP アナログを用いた検討を進めた結果, PKA 特異的な cAMP アナログである 6-bnz-cAMP のみが IL-9 および IL-17 の産生を促進することが分かった(Figure 9A and B). 一方, PKA 阻害剤である H89 を培地に添加すると CGRP によるサイトカイン産生促進作用は消失することも明らかとした(Figure 9C and D). これらの結果から, CGRP は cAMP/PKA 経路の活性化を介して様々な Th 細胞サブセットからのサイトカイン産生を促進していることが示された.

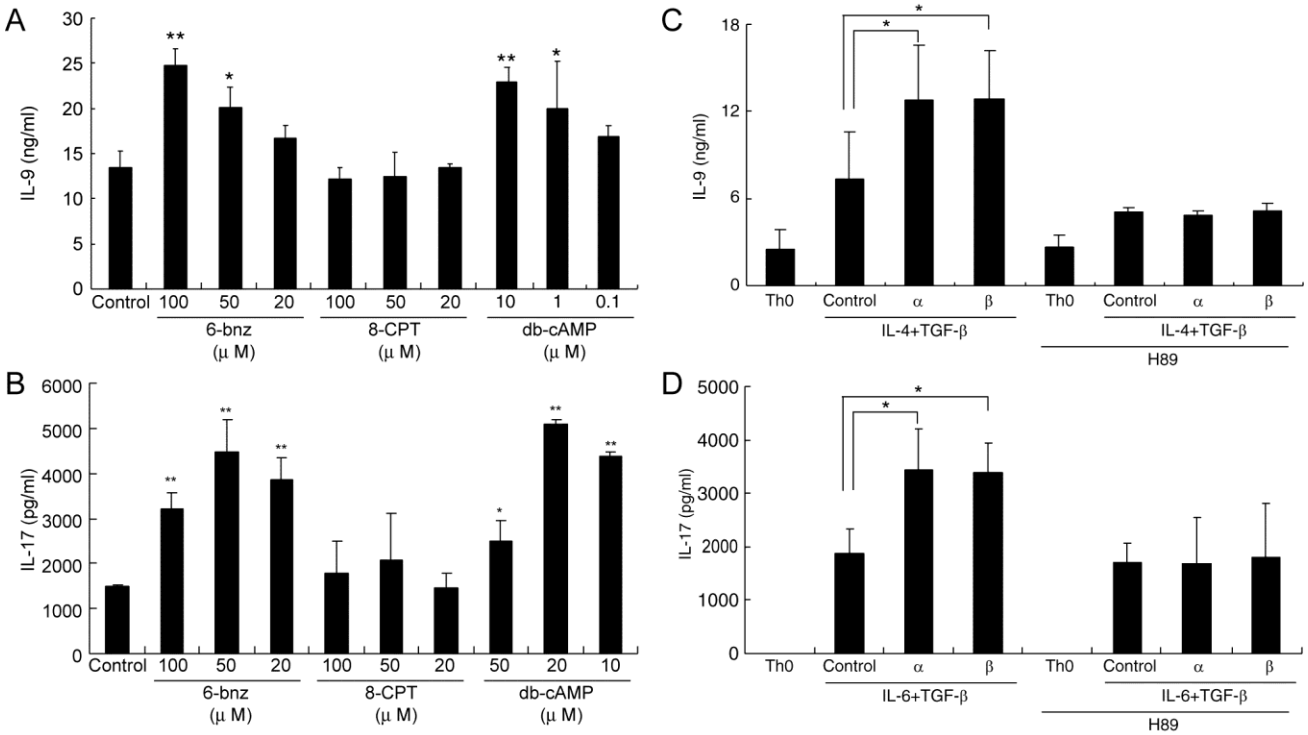


Figure 9. Th9, Th17 細胞分化における cAMP/PKA 経路の関与

A and B, IL-9, IL-17 産生に与える cAMP アナログの影響を ELISA 法にて測定(n=3). C and D, IL-9, IL-17 産生に与える PKA 阻害剤の影響を real-time PCR 法にて測定(n=3).

α:αCGRP, β:βCGRP. 6-bnz: PKA specific cAMP analog, 8-CPT: EPAC specific cAMP analog, H89: PKA inhibitor (20 μM で使用).

Values are presented as mean ± SD.　*P < 0.05, **P < 0.01 vs. control.

＜NFATc2 の活性化を介した CGRP の作用＞

では Th9 細胞や Th17 細胞において，PKA の活性化はどのような経路でサイトカイン産生や転写因子の発現を制御しているのであろうか．現在までにわれわれは CGRP の IL-4 産生制御機構として転写因子 NFATc2 の核内移行促進作用を明らかとしている(10)．また，IL-9 や IL-17 の産生に NFATc2 が寄与している可能性も示唆されている(33, 34)．そこでまず NFATc2 の核内移行について解析を進めることとした．CGRP は NFATc2 の mRNA，タンパク質発現量には影響を与えなかったが(data not shown)，蛍光免疫染色によって核内への移行を促進することが確認できた(Figure 10A)．また ChIP 解析によって CGRP が NFATc2 の IL-9 プロモーター領域および IL-17 プロモーター領域への結合を促進することも明らかとなった(Figure 10B and C)．これらの結果は NFATc2 の活性化が CGRP による Th 細胞分化促進に大きく寄与している可能性を示している．

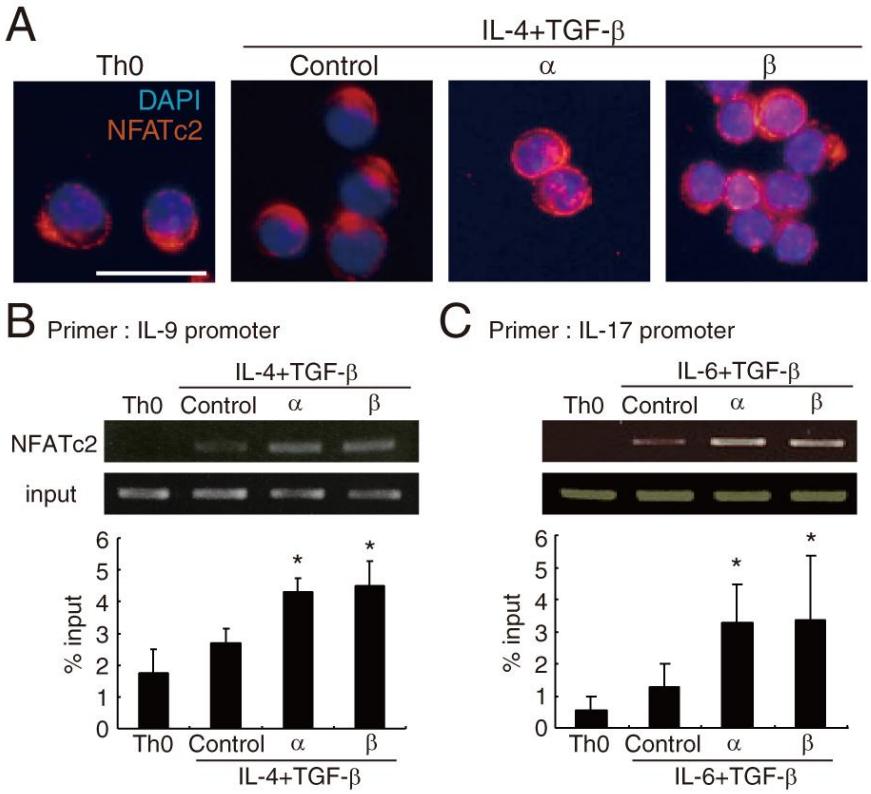


Figure 10．Th9，Th17 細胞分化における NFATc2 の活性化

A，NFATc2 の細胞内局在を蛍光免疫染色法により解析．B，IL-9 プロモーター領域への NFATc2 の結合を ChIP 法にて測定(n=3)．C，IL-17 プロモーター領域への NFATc2 の結合を ChIP 法にて測定(n=3)．α：αCGRP，β：βCGRP．

Values are presented as mean ± SD.　*P < 0.05 vs. control.

さらに NFAT 阻害剤を用いた実験を行い，CGRP の作用が NFATc2 の活性化を介しているかどうか詳細な検討を加えた．Th9 細胞分化時に NFAT 阻害剤を添加すると，CGRP による IL-9 および GATA3 mRNA 発現量の促進作用が消失していた(Figure 11A and B)．GATA3 は IL-9 産生促進に働くことが知られており，NFATc2 が GATA3 の発現促進を介して IL-9 産生を間接的に促進しているという可能性も示された．一方で，PU.1 の発現は NFAT 阻害剤存在下でも CGRP による促進的制御を受けており，NFAT 非依存的な経路の存在も示唆された(Figure 11C).

また，Th17 細胞分化条件においても，NFAT 阻害剤によって CGRP による IL-17 mRNA 発現促進作用は見られなくなっていた(Figure 11D)．これらの結果は CGRP によるサイトカイン産生促進作用において NFATc2 の核内移行が重要な機序のひとつであることを示唆している．

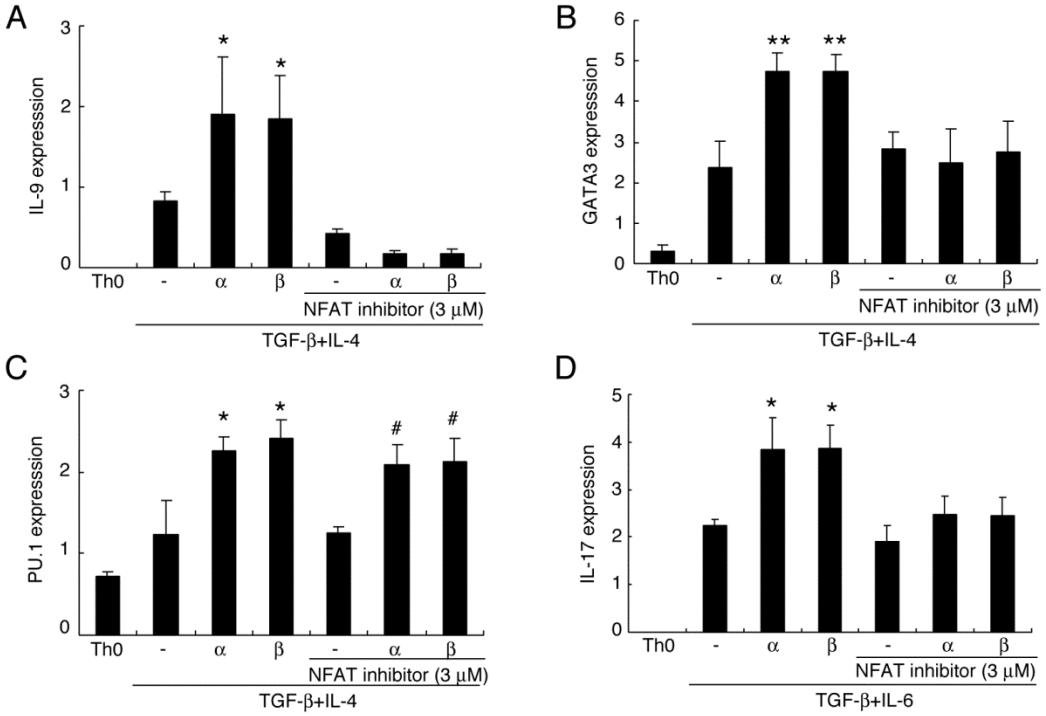


Figure 11. Th9, Th17 細胞分化における NFAT 阻害剤の作用

A-C, Th9 分化条件で 24 時間刺激した後の IL-9(A), GATA3(B), PU.1(C) mRNA 発現量を real-time PCR 法にて解析(n=3). D, Th17 分化条件で 24 時間刺激した後の IL-17 mRNA 発現量を real-time PCR 法にて解析(n=3). α:αCGRP, β:βCGRP.

Values are presented as mean ± SD. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. TGF-β+IL-4 or TGF-β+IL-6/CGRP(-), #P < 0.05 vs. NFAT inhibitor+TGF-β+IL-4 or NFAT inhibitor+TGF-β+IL-6/CGRP(-).

＜GSK-3β の不活性化を介した NFATc2 活性化/サイトカイン産生の制御＞

最後に PKA の活性化がどのような機構で NFATc2 を活性化しているのか検討した. NFATc2 を制御する主要な因子の一つとして glycogen synthase kinase 3β (GSK-3β) が知られている. GSK-3β は定常状態において NFATc2 をリン酸化し, NFATc2 を細胞質に局在させる(35). また, この GSK-3β の活性は PKA によって 9 番目のセリンがリン酸化されることで不活性化されることも知られている(36). これらの知見は CGRP が PKA の活性化を介して GSK-3β のリン酸化を誘導し, その結果として NFATc2 の核内移行を促進しているという可能性を推測させた. 実際に Th9 細胞分化条件下において, CGRP および PKA 特異的 cAMP アナログを作用させることで GSK-3β のリン酸化が引き起こされていた(Figure 12A). さらに GSK-3β 阻害剤を添加することで NFATc2 の核内移行が促進されることも確認している(Figure 12B). その結果として GSK-3β 阻害剤は IL-9 産生を促進し, その作用は NFAT 阻害剤存在下では消失していた(Figure 12C and D). さらに GSK-3β 阻害剤の存在下では CGRP の作用が消失することも明らかとしている(Figure 12E and F). 以上の結果は PKA の活性化⇒GSK-3β の不活性化⇒NFATc2 の核内移行という経路が CGRP のサイトカイン産生促進作用において重要な役割を担っていることを示唆するものである.

一方で GSK-3β シグナルを阻害しても PU.1 の発現に対する CGRP の促進作用は解除されていなかった(Figure 12F). しかしながら PKA 阻害剤存在下では PU.1 に対する制御作用が消失していたことから, PKA 依存的・GSK-3β 非依存的な経路が存在することが示唆された. 現在のところその経路について詳細なことは分かっていないが, この PU.1 発現促進作用も IL-9 の産生促進には何らかの寄与をすると考えられる. 実際により遅いタイミングでの遺伝子発現変化を解析すると NFAT 阻害剤や GSK-3β 阻害剤の存在下でも CGRP のサイトカイン産生促進作用が認められるようになり (data not shown), これが他の経路の存在も示唆している. 以上の結果は CGRP のサイトカイン産生促進作用について, cAMP/PKA 経路を介している点は共通であるものの, 分化初期の段階では GSK-3β/NFATc2 を介した核内移行促進作用による制御が重要となり, 分化後期にかけては他の転写因子の発現制御を介した, GSK-3β/NFATc2 非依存的なメカニズムが存在すると考えられる.

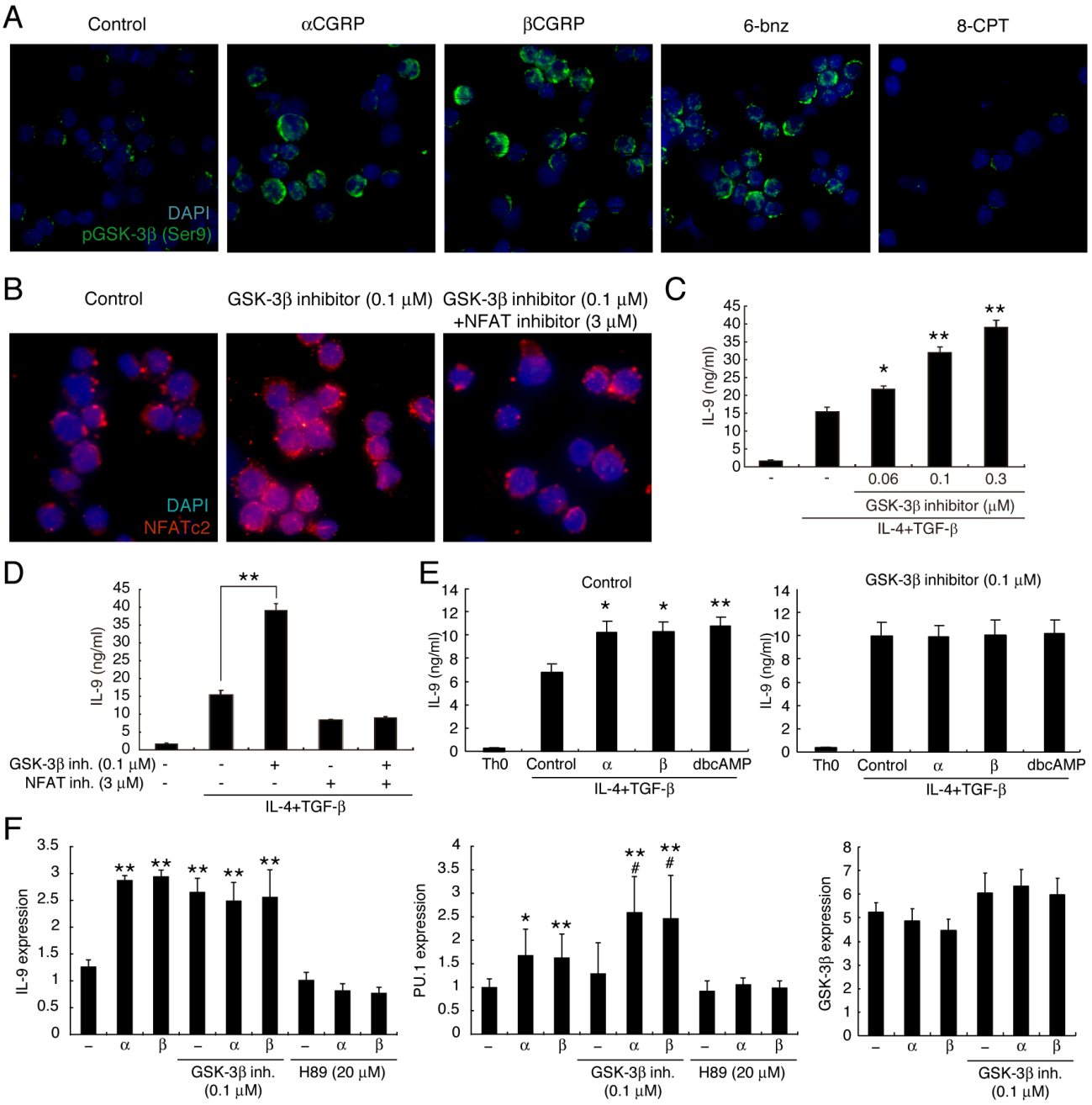


Figure 12. Th9 細胞分化における GSK-3β の役割

A, リン酸化 GSK-3β (ser 9)の検出. B, NFATc2 の局在に与える阻害剤の作用. C-E, IL-9 産生に与える GSK-3β 阻害剤の作用を ELISA で解析(n=3). F, Th9 分化条件で 24 時間刺激した後の mRNA 発現量を real-time PCR 法にて解析(n=3). α:αCGRP, β:βCGRP.

Values are presented as mean ± SD. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. TGF-β+IL-4/CGRP(-), #P < 0.05 vs. GSK-3β inhibitor+TGF-β+IL-4/CGRP(-).

第 4 節　小括

本章では CGRP の *in vitro* における Th 細胞分化制御作用に着目し，その詳細な機序を解析してきた．その結果として，CGRP が Th2 細胞からの IL-4 産生，Th9 細胞からの IL-9 産生そして Th17 細胞からの IL-17 産生を促進することを明らかとした．また，そのメカニズムとして cAMP/PKA 経路の活性化⇒GSK-3β 不活性化⇒NFATc2 の活性化という経路の重要性を示した(Figure 13)．しかしながら NFATc2 による GATA3 の転写促進や GSK-3β 非依存的な PU.1 の活性化といった経路の存在も示唆されたため，それぞれの因子の重要性についてさらなる解析が必要であると考えられる．

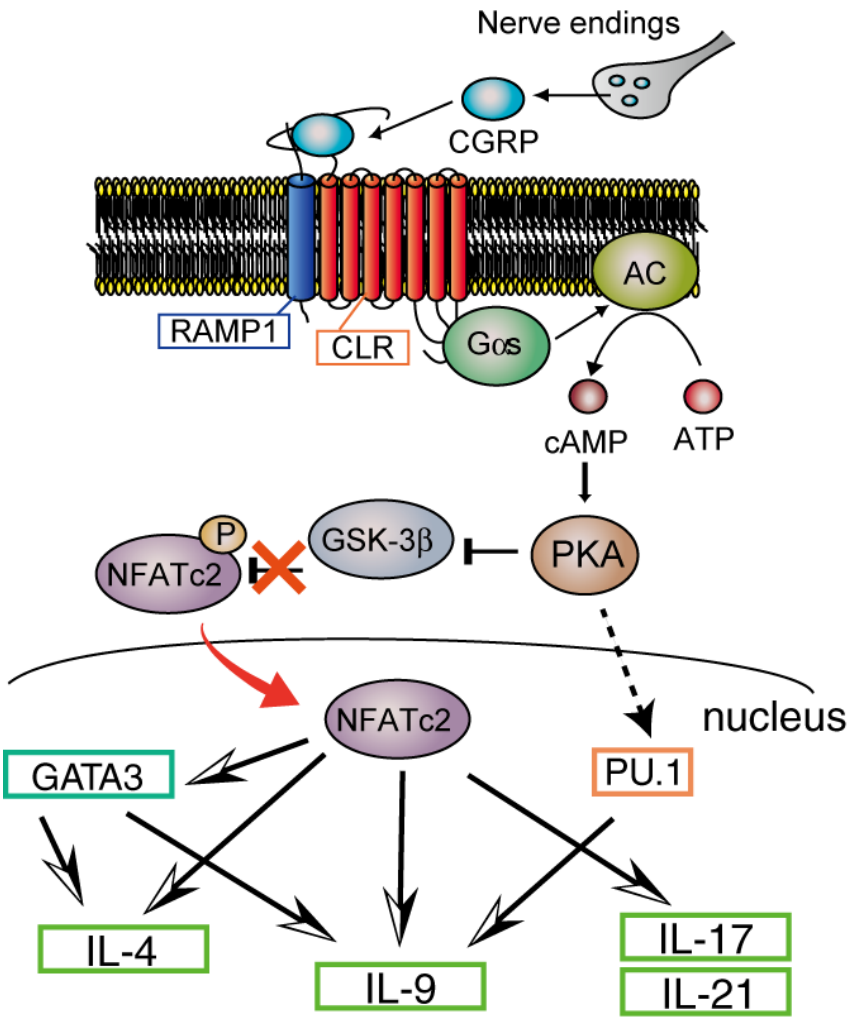


Figure 13. Th 細胞分化における PKA/GSK-3β/NFATc2 の役割
CGRP は cAMP/PKA 経路を活性化させ，GSK-3β の Ser9 をリン酸化させ不活性化する．その結果，NFATc2 の核外局在が解除され，核内へ移行することでサイトカインの転写が促進される．

第 2 章　神経ペプチド CGRP のアレルギー制御作用

第 2 章では CGRP 受容体である RAMP1 を欠損したマウスを用いて，CGRP による Th 細胞分化制御が種々のアレルギー反応を促進するという可能性について検討を進めた．Th17 細胞が関与する炎症モデルとして EAE が，Th9 細胞が関与する炎症モデルとしては気道炎症が一般的であり，それぞれ IL-17 欠損マウスや IL-9 欠損マウスでは病態が形成されないことが報告されている．そこでこれらのアレルギーモデルを用いて CGRP による Th 細胞分化促進作用がアレルギー応答性に影響を与えるかどうか評価した．

第 1 節　実験材料と実験方法

＜実験材料＞

・マウス

BALB/c マウス，C57BL/6 マウス，RAMP1 欠損マウスは第 1 章と同様のものを用いた．Lck-cre トランスジェニックマウスは Jackson Laboratory より購入した．T 細胞特異的 RAMP1 欠損マウスは Lck-cre トランスジェニックマウスと RAMP1 flox/flox (f/f)マウスを交配させることで作製した．

・抗体と試薬

FITC-conjugated anti-mouse CD11c mAb (HL3)および PE-conjugated anti-mouse CD19 mAb (1D3)は BD Pharmingen (San Diego, CA)より購入した．

Biotin-conjugated anti-mouse CD3ε mAb (145-2C11), FITC-conjugated anti-mouse c-kit mAb (2B8)および PE-conjugated anti-mouse FcεRIα mAb (MAR-1)は eBioscience (San Diego, CA)より購入した．

Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 35-55 ペプチドは PEPTIDES INTERNATIONAL (Louisville, KY)より購入した．

Pertussis toxin は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)より購入した．

LPS-free ovalbumin (OVA)は Seikagaku Corp. (Tokyo, Japan)より購入した．

その他第 1 章に記した抗体・試薬を用いた．

＜実験方法＞

・実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の誘導と脊髄の組織化学的解析

マウスの両脇腹に, complete Freund's adjuvant を用いてエマルジョンを形成させた MOG_{35-55} ペプチドを 100 μg 皮下注射した. この日を day 0 とし, day 0, 2, 7 に百日咳毒素 150 ng を腹腔内投与した. その後, 病態スコア(Table 1)を測定すると同時に, day 20 において脊髄組織を回収し, 4% PFA-PBS 溶液にて固定した. その後, 脱灰液に浸して室温で数日処理し, 骨を除いた後に液体窒素を用いて凍結サンプルを作製した. 作製した凍結サンプルからクリオスタットを用いて 20 μm の切片を作製した. 凍結切片をアルコール : クロロホルム=1 : 1 の溶液につけ, 4℃で一晩処置した後 95% エチルアルコールで洗浄した. これを 0.1% luxol fast blue (LFB)溶液に浸し, 56℃で一晩処置した. 続いて, これを 95% エチルアルコールで洗浄し, さらに MilliQ で洗浄した. その後凍結切片を室温で 0.05%炭酸リチウム溶液に 30 秒浸し, さらに 70%エチルアルコールで 30 秒浸した後 MilliQ で洗浄し, 髄鞘を青色に染色した. 次に凍結切片を室温でヘマトキシリンを用いて 30 秒対比染色した後 MilliQ で洗浄した. さらにエオジンで 30 秒対比染色した後 MilliQ で洗浄した. 試料を 100% アルコールに 5 分×2 回, 続いてキシレンに 5 分×2 回浸し, 固定した. これを風乾した後, 上からカバーガラスをのせて封入した. サンプルはシステム生物顕微鏡で観察した.

スコア	症状
0	症状なし
0.5	尾の脱力
1	尾の麻痺
2	歩行異常、後肢脱力
2.5	片側後肢麻痺
3	両後肢麻痺
3.5	後肢麻痺、前肢脱力
4	前肢麻痺
5	瀕死

Table 1. EAE スコア表

T 細胞の浸潤を検出する際には, 8 μm で作製した凍結切片を 0.05% Triton X-PBS を用いて室温で 15 分処置して固定した. PBS で 5 分間×3 回洗浄した後, 4%スキムミルクをのせ室温で 1 時間インキュベートしてブロッキングした. CD3 の染色では, PBS で 5 分間×3 回洗浄した後, PBS で希釈した抗 CD3 抗体をのせて, 4℃で一晩インキュベートした. 再度 PBS で 5 分間×3 回洗浄した後, streptavidin-Alexa488 をのせて室温で 1 時間反応させた. その後, PBS で 5 分間×3 回洗浄し, VECTASHIELD WITH DAPI を滴下して核に対比染色を施し, 上からカバーガラスをのせて封入した. サンプルはシステム生物顕微鏡で観察した.

・EAE における所属リンパ節 Th 細胞からの IL-17 産生

Day10 において所属リンパ節を回収し, $CD4^{+}$T 細胞を Imag 法により精製した. 得られた細胞を 48 時間抗 CD3/CD28 抗体刺激した後, 上清と細胞を回収した. 上清中の IL-17 濃度は ELISA 法によって測定した. また, 回収した細胞を phorbol-12-myristate-13-acetate (15 ng/ml) と ionomycin (750 ng/ml) で再刺激し, Cytofix/CytoPerm Kit を用いて抗 IL-17 抗体で染色し, IL-17 発現細胞の割合をフローサイトメーターで解析した.

・気道炎症の誘導と肺の組織化学的解析

マウスに aluminium hydroxide gel (4 mg)と混合した OVA (20 mg)を腹腔内投与し，感作した．1 週間後にも同様に免疫を行い，その 1 週間後に 1% OVA をネブライザー(Omron, Kyoto, Japan)で 30 分間吸入させた．誘発は 3 日間連続で行い，最終誘発時から 24 時間後に血清，肺組織，肺リンパ節を回収した．肺組織は 4% PFA-PBS 溶液で固定し，スクロース置換後に液体窒素を用いて凍結サンプルとした．作製した凍結サンプルからクリオスタットを用いて 10 μm の切片を作製し，ヘマトキシリンで 15 分，エオジンで 5 分間染色した後に，マウントクイックを用いて封入した．得られた染色像は Table 2 に示すスコア表に従って病理解析した．

スコア	気管支周辺	血管周辺
0	浸潤なし	全ての血管で浸潤なし
1	細胞層 5 未満	細胞層 5 未満の血管が 30%以上
2	細胞層 5 以上 10 未満	細胞層 5 以上の血管が 30%以上
3	細胞層 10 以上	細胞層 5 以上の血管が 70%以上

Table 2. 気道炎症スコア表
各気管支周辺のスコアを算出して平均したものを気管支周辺のスコアとし，血管周辺のスコアと合計して個体の病態スコアとした．

・肺組織中の浸潤細胞および IL-9 測定

回収した肺組織をすりガラスでホモジナイズし，108 μm のメッシュを通して濾過した後に 700G で遠心分離した．上清に含まれる IL-9 量を ELISA にて測定した．また，沈殿中の細胞を抗 CD4 抗体，抗 c-kit 抗体，抗 FcεR 抗体で染色し，フローサイトメトリー解析を行った．

・血清中の OVA 特異的抗体の検出

回収した血清に含まれる OVA 特異的な IgG および IgE を ELISA によって検出した．ELISA には DS Mouse IgE ELISA (OVA) (DS Pharma Biomedical Co., Ltd，Osaka，Japan) および HRP-conjugated anti-mouse IgG mAb (Santa Cruz, CA) を用いた．

・T 細胞特異的 RAMP1 欠損マウス由来細胞の RAMP1 発現解析

Lck-cre RAMP1 f/f マウスの脾臓より $CD3^+CD4^+$Th 細胞，$CD3^+CD8^+$細胞障害性 T 細胞，$CD19^+$B 細胞，$CD11c^+$樹状細胞を精製し，第 1 章と同様に RNA を抽出した．RT-PCR 解析には以下のプライマーを用いた．

RAMP1 … sense : TTGGGAAGACGCTATGGTGTGACTG
antisense : AGCGCAATGAAAGGGCAGAGGATGC

CLR … sense: GGACGGATGGCTATGC
antisense : CAGGTAAACGCCTTCAC

第 2 節　EAE における CGRP の役割

＜RAMP1 欠損マウスの EAE に対する応答性＞

まず CGRP が EAE において生理的にどのような役割を果たしているのか検討するため，RAMP1 欠損マウスの EAE に対する応答性を検討した．その結果，RAMP1 欠損マウスでは EAE の病態スコアについて曲線下面積(AUC)および最大スコア値(Max)に有意な低下が見られ，髄鞘の脱落および脊髄への T 細胞の浸潤が抑制されていたことから，CGRP が EAE の発症に寄与していることが示された(Figure 14A-C)．また，RAMP1 欠損マウスにおいては所属リンパ節中の Th 細胞からの IL-17・IL-21 産生が減少していることも明らかとなった(Figure 14D-G)．これらの結果は CGRP が IL-17 の産生を増強することで EAE を引き起こす可能性を示している．

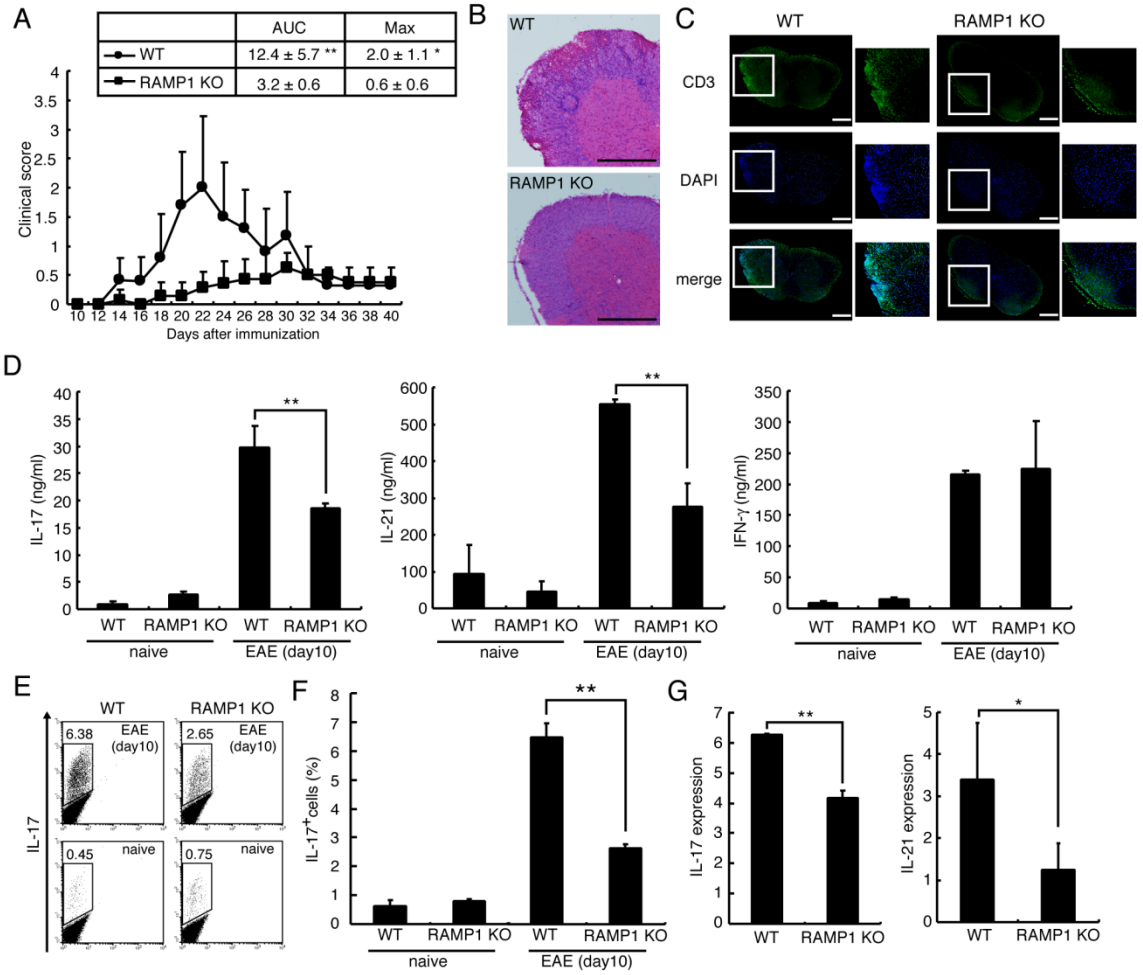


Figure 14. EAE における CGRP の役割

A，免疫 10 日から 40 日目までの EAE スコアを測定(n = 6 for WT，n = 7 for RAMP1 KO)．B，免疫 20 日目の脊髄組織を LFB 染色．C，免疫 20 日目の脊髄組織を抗 CD3 抗体で染色．D，免疫 10 日目の所属リンパ節 Th 細胞を再刺激した際に産生される IL-17，IL-21，IFN-γ 量を ELISA で測定(n=3)．E and F，免疫 10 日目の所属リンパ節 Th 細胞における IL-17^{+}細胞の割合をフローサイトメトリー法により解析(n=3)．G，免疫 10 日目の所属リンパ節 Th 細胞における IL-17，IL-21mRNA 発現量を real-time PCR 法により解析(n=3)．Values are presented as mean ± SD.　*P < 0.05，**P < 0.01．Scale bar：500 μm.

＜T 細胞特異的 RAMP1 欠損マウスの EAE 応答性＞

次に CGRP による T 細胞制御作用がどの程度 EAE の病態促進に寄与しているのかを T 細胞特異的な RAMP1 欠損マウスを用いて検討した. この Lck-cre RAMP1 f/f マウスは $CD4^+$および $CD8^+$T 細胞においてのみ RAMP1 遺伝子が発現していない(Figure 15A). また, このマウス由来のナイーブ Th 細胞を用いた検討では CGRP による IL-17 産生促進作用も見られなかった(Figure 15B). これらのことから CGRP 受容体の機能的な欠損を確認している.

このマウスに EAE を誘導した結果, コントロールマウスにくらべて EAE の病態が抑制されていた(Figure 15C). また, RAMP1 欠損マウスと同様に IL-17, IL-21 産生量の低下も認められた(Figure 15D). しかしながら, 病態抑制は RAMP1 欠損マウスよりも弱く, T 細胞を介さない CGRP の制御機構が存在する可能性も残された.

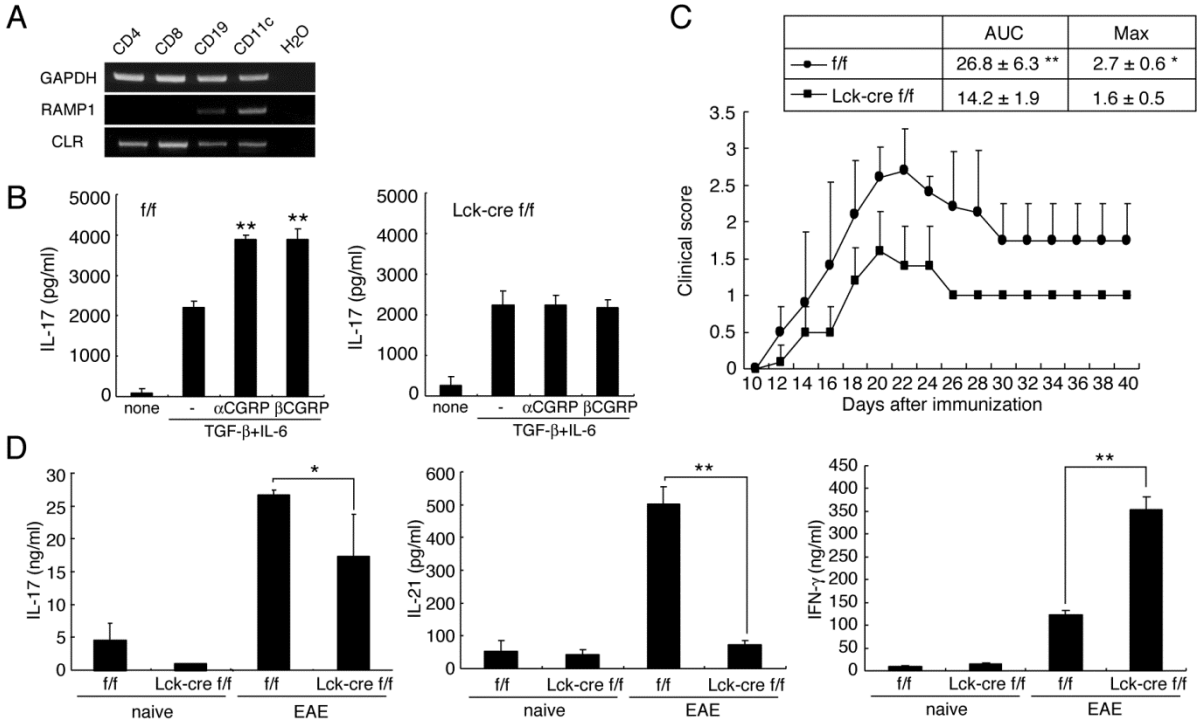


Figure 15. T 細胞特異的 RAMP1 欠損マウスの EAE に対する応答性

A, Lck-cre RAMP1 flox/flox (Lck-cre f/f)マウスの脾臓より各細胞を精製し, CLR, RAMP1 mRNA の発現を RT-PCR にて解析. B, Lck-cre f/f マウスの脾臓よりナイーブ Th 細胞を精製し, Th17 細胞分化条件下で 48 時間刺激後の IL-17 産生量を ELISA で測定(n=3). C, 免疫 10 日から 40 日目までの EAE スコアを測定(n=5). D, 免疫 10 日目の所属リンパ節 Th 細胞を再刺激した際に産生される IL-17, IL-21, IFN-γ 量を ELISA で測定(n=3). Values are presented as mean ± SD. *P < 0.05, **P < 0.01.

第 3 節　気道炎症における CGRP の役割

＜RAMP1 欠損マウス, T 細胞特異的 RAMP1 欠損マウスの気道炎症に対する応答性＞

続いてTh9細胞が寄与するアレルギーモデルとして気道炎症に対する作用を検討した. まず, 炎症誘導後の肺組織の解析を行った結果, RAMP1 欠損マウスでは肺組織の炎症が有意に抑えられていた(Figure 16A and B). さらに肺に浸潤していた Th 細胞およびマスト細胞数も RAMP1 欠損マウスでは低下しており(Figure 16C), CGRP が生理的に気道炎症を促進することが示された. 一方で OVA 特異的 IgE および IgG 濃度には変化が見られなかった(Figure 16D).

そこで, Th 細胞からの IL-9 産生に着目して検討を進めた. 気道炎症誘導後の脾臓 Th 細胞においては産生される IL-4, IL-9 量に大きな差は認められなかったが, 肺組織中の IL-9 量は RAMP1 欠損マウスにおいて減少していた(Figure 17A and B). また, 肺リンパ節における IL-9 mRNA 発現量も RAMP1 欠損マウスで低下しており(Figure 17C), CGRP が肺の炎症部位において IL-9 産生を促進することが炎症悪化に重要である可能性が示された.

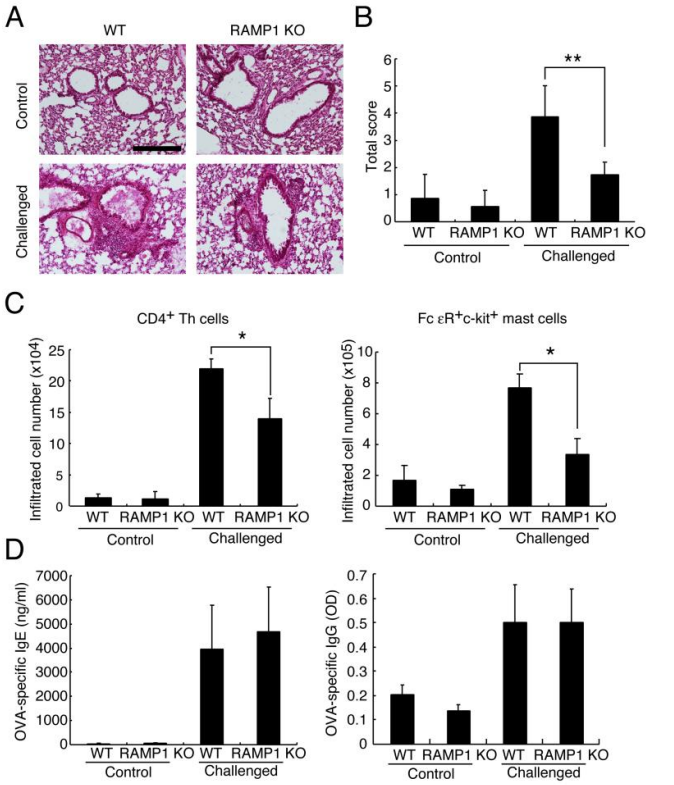


Figure 16.　RAMP1 欠損マウスの気道炎症に対する応答性
A and B, 気道炎症誘導後 24 時間後の肺組織を HE 染色で解析(n=6). C, 肺に浸潤した Th 細胞およびマスト細胞数をフローサイトメトリー法により測定(n=3). D, 血中 OVA 特異的抗体量を ELISA 法で測定(n=4).
Values are presented as mean ± SD.
*P < 0.05, **P < 0.01. Scale bar：200 μm.

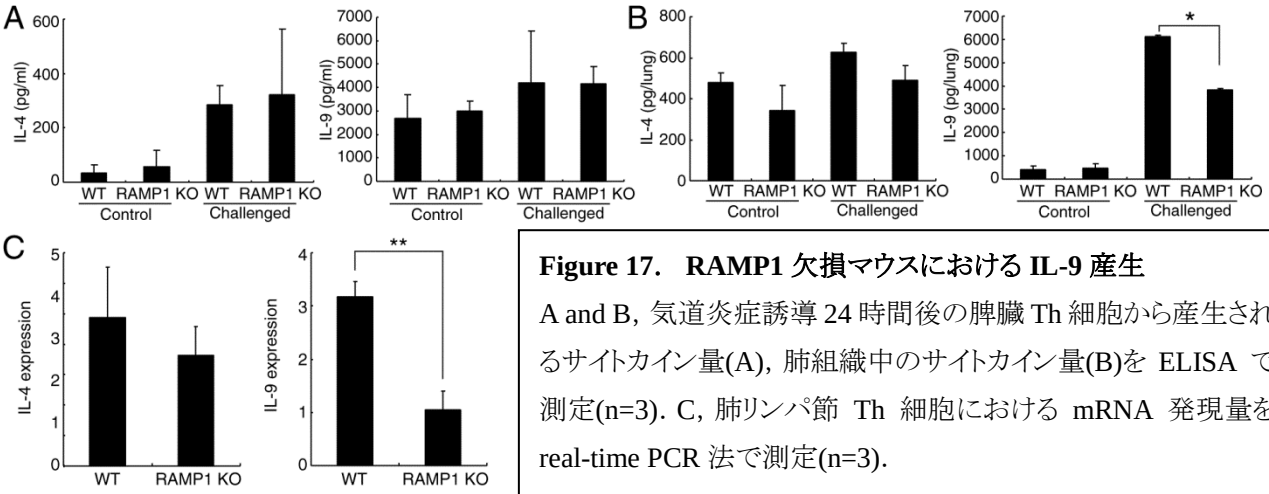


Figure 17.　RAMP1 欠損マウスにおける IL-9 産生
A and B, 気道炎症誘導 24 時間後の脾臓 Th 細胞から産生されるサイトカイン量(A), 肺組織中のサイトカイン量(B)を ELISA で測定(n=3). C, 肺リンパ節 Th 細胞における mRNA 発現量を real-time PCR 法で測定(n=3).
Values are presented as mean ± SD.　*P < 0.05, **P < 0.01.

この Th 細胞に対する作用について詳細に解析するため，前節と同様に T 細胞特異的 RAMP1 欠損マウスを用いた検討を行った．その結果，T 細胞特異的 RAMP1 欠損マウスにおいても気道炎症時の細胞浸潤が改善していた(Figure 18A-C)．また，RAMP1 欠損マウスと同じく IgE 量に大きな変化は認められなかったが(Figure 18D)，肺組織中の IL-9 量減少が確認できた(Figure 18E)．さらに，*in vitro* における Th9 細胞分化時に見られた GSK-3β のリン酸化や PU.1 の発現上昇といった作用を肺組織における浸潤細胞について検討した結果，T 細胞特異的 RAMP1 欠損マウスでは GSK-3β のリン酸化および PU.1 の発現が低下していた(Figure 19)．以上の結果から，CGRP は気道炎症時に *in vitro* と同様の機構で Th9 細胞からの IL-9 産生を増強し，その作用によって炎症の悪化に寄与していると考えられる．

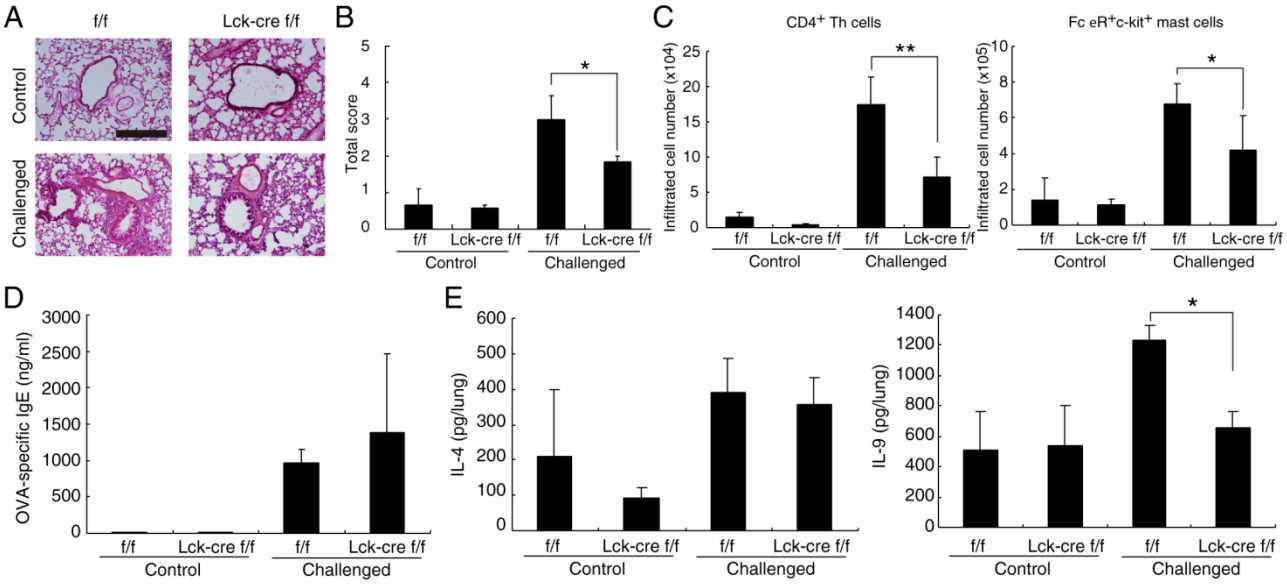


Figure 18.　T 細胞特異的 RAMP1 欠損マウスの気道炎症に対する応答性

A and B，気道炎症誘導後 24 時間後の肺組織を HE 染色で解析(n=4)．C，肺に浸潤した T 細胞およびマスト細胞数をフローサイトメトリー法により測定(n=4)．D，血中 OVA 特異的抗体量を ELISA 法で測定(n=4)．E，気道炎症誘導後 24 時間後の肺組織中のサイトカイン量を ELISA で測定(n=3)．F，気道炎症誘導後 24 時間の肺組織を抗 pGSK-3β 抗体で染色．G，F，気道炎症誘導後 24 時間の肺組織を抗 PU.1 抗体で染色．Values are presented as mean ± SD.　*P < 0.05，**P < 0.01．Scale bar：200 μm.

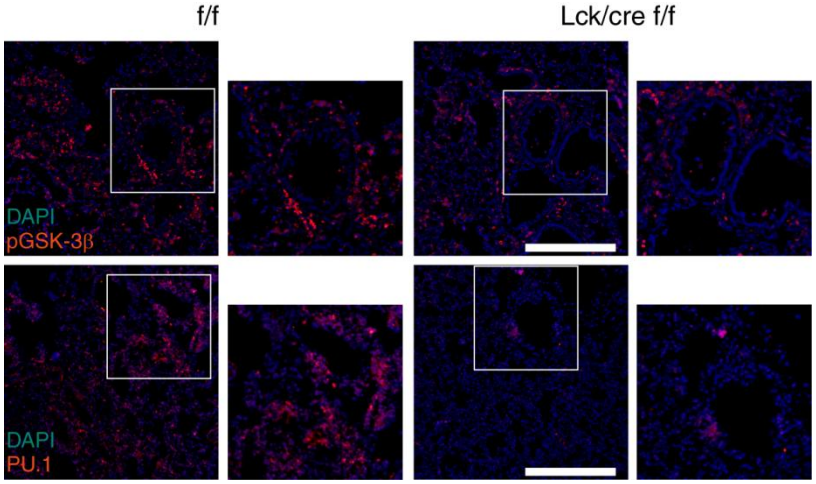


Figure 19．　肺組織における pGSK-3β および PU.1 の発現

気道炎症誘導後 24 時間の肺組織を抗 pGSK-3β 抗体，抗 PU.1 抗体で染色．Scale bar：200 μm.

第 4 節　小括

第 2 章では CGRP 受容体である RAMP1 欠損マウスを用いて CGRP の Th 細胞分化制御作用がアレルギー反応の増悪に直結していることを示してきた．私は既に CGRP が Th1 型皮膚炎症である TNCB-CHS を抑制し，Th2 型皮膚炎症である FITC-CHS を悪化させることを見出しており(12)，今回はさらに IL-17 産生促進作用によって EAE を，IL-9 産生促進作用によって気道炎症を悪化させることを示した．IL-17 は EAE における脊髄への T 細胞の浸潤に，IL-9 は気道炎症におけるマスト細胞の活性化などに寄与すると考えられており，RAMP1 欠損マウスでは脊髄への T 細胞浸潤や肺へのマスト細胞浸潤が減少するなど，炎症病態と相関した結果も得られたことから CGRP の生理的アレルギー制御作用の重要性が示された(Figure 20).

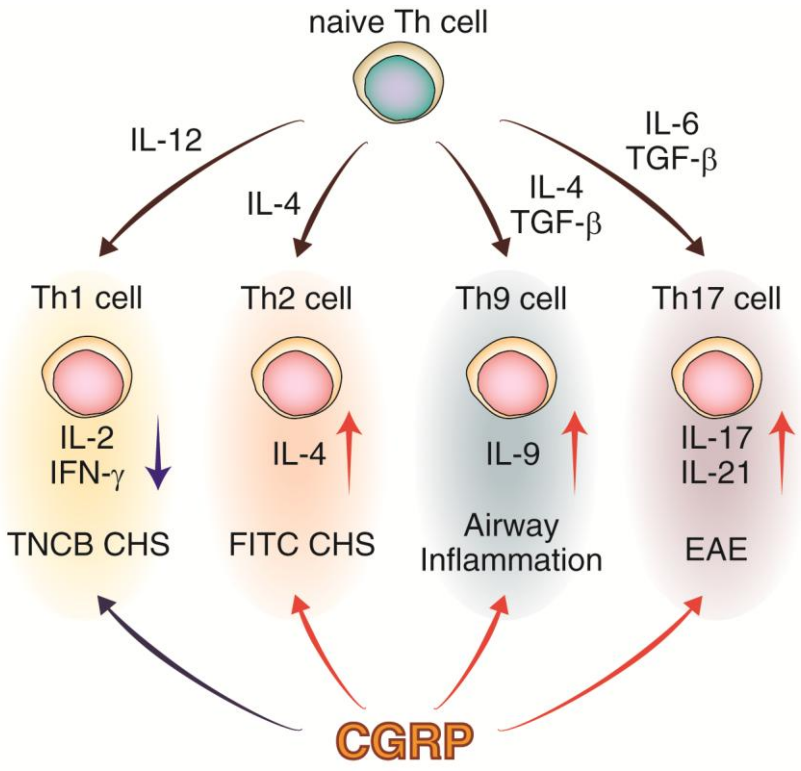


Figure 20. CGRP による Th 細胞分化とアレルギー反応の制御
CGRP は各 Th 細胞サブセットを多様に制御することで，それぞれの細胞が寄与するアレルギー反応を生理的に制御している．

第 3 章　神経ペプチド CGRP の発現異常とアレルギー応答性

前章までに CGRP の *in vitro*, *in vivo* における作用を明らかとしてきたが，第 3 章では神経系と免疫系のクロストークを明確にするため，神経系に対する様々な要因によって CGRP の産生量が変化し，アレルギー応答性を変化させるという可能性について検討を進めた．ここでは神経系に対する異常として新生仔期の化学物質刺激モデルと，精神的なストレス負荷モデルを用いた．また，Th1 型の炎症モデルとして TNCB-CHS を，Th2 型の炎症モデルとして FITC-CHS を，Th9 細胞が寄与するモデルとして気道炎症を用いた検討を行った．

第 1 節　実験材料と実験方法

＜実験材料＞

・マウス

BALB/c マウス，RAMP1 欠損マウスは第 1 章と同様のものを用いた．αCGRP 欠損マウスは東京大学栗原裕基先生からご供与いただき，BALB/c マウスと 8 世代退交配したものを使用した．βCGRP 欠損マウスは BALB/c マウスと 8 世代退交配したものを使用した．

・抗体と試薬

Anti-mouse CGRP polyclonal antibody は Abcam (Cambridge, UK)から購入した．
その他第 1 章に記した抗体・試薬を用いた．

・新生仔期における化学物質暴露モデルと皮膚の組織化学的解析

生後 3~5 日目においてマウスの腹部に 30 μL の 1% TNCB または 10 % ホルムアルデヒド(FA)を塗布して知覚神経刺激を与えた．6 週齢において血清，皮膚組織を回収した．回収した皮膚組織は第 2 章と同様の方法で凍結試料とした．作製した凍結サンプルからクリオスタットを用いて 6 μm の切片を作製し，抗 CGRP 抗体による染色後，蛍光顕微鏡での観察を行った．

・精神的ストレス暴露モデル

マウスに精神的なストレスを与えるため拘束ストレスモデル(immobilization stress: IMS)および水槽隔離ストレスモデル(water avoidance storess: WAS)を用いた．IMS ではマウスを 50 ml チューブに 2 時間拘束した．WAS ではマウスを水槽中の島に 30 分間隔離した．ストレス暴露後，マウスから血清を回収した．

・血中 CGRP 濃度，血中コルチコステロン濃度の測定

血中 CGRP 濃度は CGRP (Rat, Mouse) - EIA Kit (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA)を用いて測定した．血中コルチコステロン濃度は AssayMax Corticosterone ELISA Kit (AssayPure, St Charles, MO)を用いて測定した．

・CHS の誘導

TNCB-CHS はマウスの腹部に 1% TNCB を 100 μl 塗布して感作し, 5 日後に耳に 1% TNCB を 20 μl 塗布して誘発した. その後耳の腫れを測定して炎症反応の指標とした.

FITC-CHS はマウスの腹部に 1% FITC を 200 μl, 2 日間連続で塗布して感作し, 5 日後に耳に 1% FITC を 20 μl 塗布して誘発した. その後耳の腫れを測定して炎症反応の指標とした.

・βCGRP 欠損マウスの作製と遺伝子発現確認

βCGRP 欠損マウスを作製するため, βCGRP 遺伝子の開始コドンを含むエキソン 2, そしてフレームシフトで開始コドン配列が出来る可能性を有するエキソン 3 を欠損させることとした. 後述の Figure 24A に示すコンストラクションを作製し, pNT1.1 ベクターに組み込んだ. 作製した targeting vector を 129 マウス由来の ES 細胞にエレクトロポレーションによりトランスフェクションした. ES 細胞培養培地にネオマイシン, ガンシクロビルを入れ, それぞれネオマイシン耐性遺伝子, チミジンキナーゼ遺伝子によるポジティブセレクション, ネガティブセレクションを行った. セレクションされた ES 細胞を C57BL/6 の胚盤胞期の受精卵にできる腔にマイクロマニピュレーターを用いて注入し, 仮親の子宮に入れ, キメラマウスを作製した. このキメラマウスを C57BL/6, BALB/c それぞれと掛け合わせ βCGRP 欠損マウスを作製した. βCGRP 欠損マウスと野生型マウスの脳から第 1 章と同様に mRNA を回収し, RT-PCR によって αCGRP, βCGRP, RAMP1, CLR の mRNA 発現を確認した. CGRP 遺伝子の発現確認には以下のプライマーを使用した.

αCGRP … sense : CTCCAGGCAGTGCCTTTGA
antisense : AACCTTCATTCTGGGGCTG

βCGRP … sense: ACACTTCACTCTCGCTGTTCCA
antisense : CAGGTGGCAGTGTTGCAGG

第 2 節　新生仔期の化学物質刺激と成体におけるアレルギー応答性の変化

＜新生仔期における化学物質暴露と CGRP 含有神経線維の分布＞

発生段階での知覚神経刺激は成体における神経の分布に影響を与えることが知られている(37-40). そこでまず, 新生仔期に化学物質を用いて刺激を与えることで成体における CGRP 陽性神経線維の分布に変化が見られないか検討した. その結果, TNCB や FA 塗布によって CGRP 陽性神経線維が伸長していることを見出した(Figure 21A and B). また血中 CGRP 濃度についても FA 塗布マウスにおける増加が認められた(Figure 21C). また, このような結果は RAMP1 欠損マウスにおいても同様に認められた(data not shown). これらの結果から新生仔期における化学物質暴露が成体における CGRP シグナル増強をもたらす可能性が示唆された.

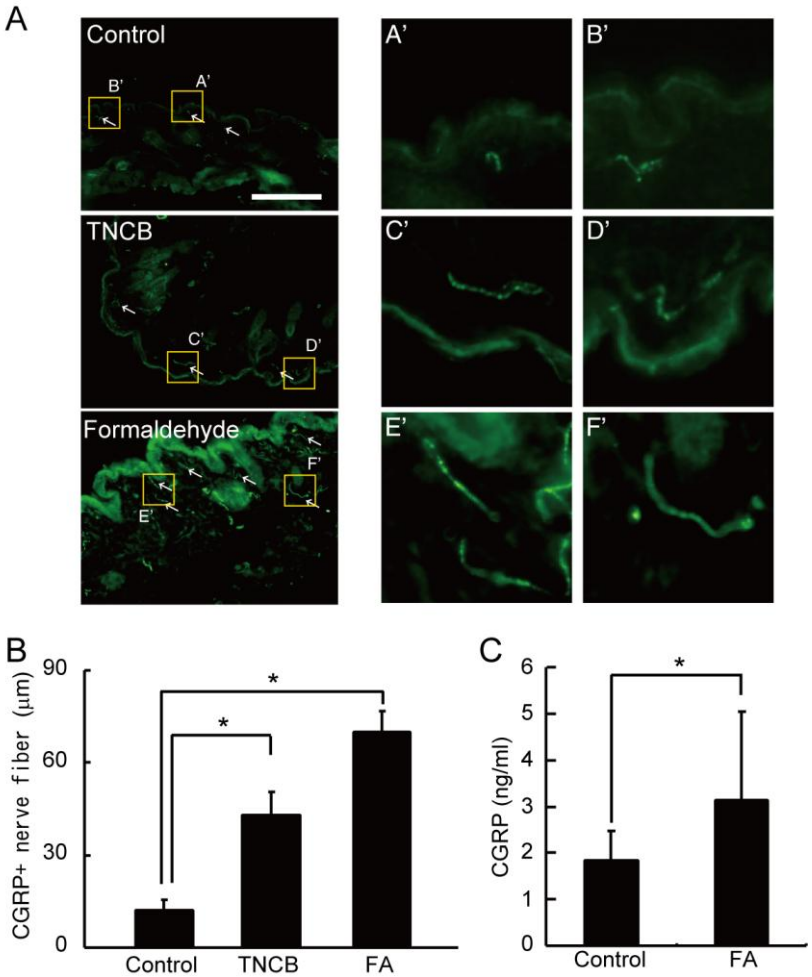


Figure 21.　新生仔期の化学物質暴露が成体における CGRP 陽性神経線維の長さを伸ばす

A and B, 生後 3～5 日目に化学物質を塗布し, 6 週齢において皮膚組織を回収して抗 CGRP 抗体による染色を行った(n=4). C, 血中 CGRP 量を ELISA で測定(n=3).

A'-F', Figure A における CGRP 陽性神経線維部分の拡大像.

TNCB : 2,4,6-trinitrochlorobenzene, FA : formaldehyde.

Values are presented as mean ± SD. *P < 0.05. Arrow : $CGRP^{+}$nerve fiber. Scale bar : 200 μm.

＜新生仔期の化学物質暴露が成体における CHS 応答性に与える影響＞

新生仔期の化学物質暴露が成体における CGRP シグナルを増強している可能性が示されたため, このマウスに CHS を誘導してその応答性の変化を観察した. まず CGRP が抑制的に制御する TNCB-CHS を化学物質暴露マウスに誘導した結果, TNCB および FA を新生仔期の塗布したマウスでその炎症が抑制されていた(Figure 22). さらに注目すべきことに RAMP1 欠損マウスではその作用が全く見られなかった(Figure 22).

一方で CGRP が促進的に寄与する FITC-CHS を同様に検討した結果, FA を塗布したマウスで反応性の増強が認められた(Figure 23A). そしてやはり RAMP1 欠損マウスではその増強作用が消失していた. また, CGRP がどのような機序で FITC-CHS の増悪に寄与しているのかを検討するため, FITC 感作後の所属リンパ節を回収し, IL-4 の産生量を測定した. その結果, FA 塗布マウスでは所属リンパ節 Th 細胞からの IL-4 産生が増加しており, これが炎症反応を悪化させる原因と考えられる(Figure 23B). 以上の結果は新生仔期の化学物質暴露による CGRP 含有神経の伸長が成体における CGRP シグナル増強につながり、皮膚炎症の反応性を変化させたことを示している.

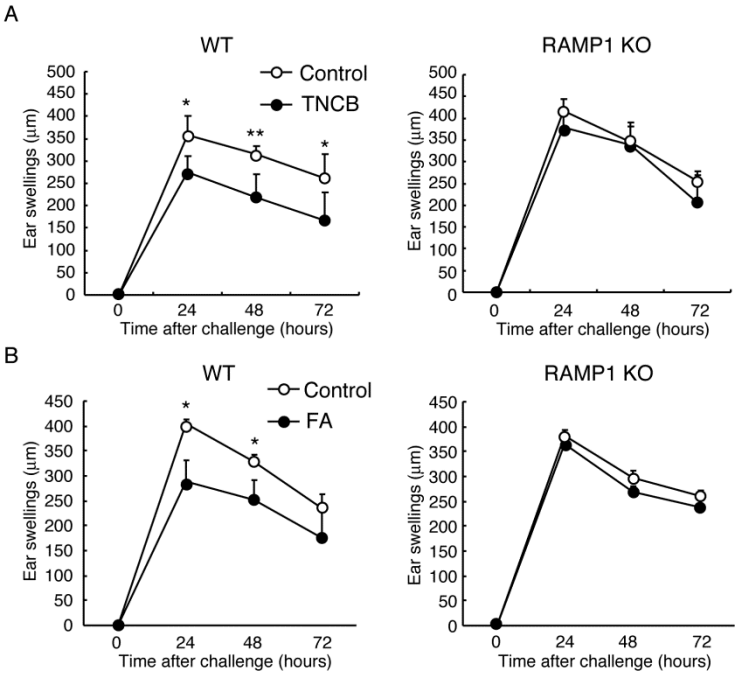


Figure 22.　新生仔期の化学物質暴露と TNCB-CHS
生後 3～5 日目に TNCB (A), formaldehyde (FA) (B)を塗布し, 6 週齢において TNCB-CHS を誘導した(n=4).
Values are presented as mean ± SD.
*P < 0.05. **P < 0.01 vs. control.

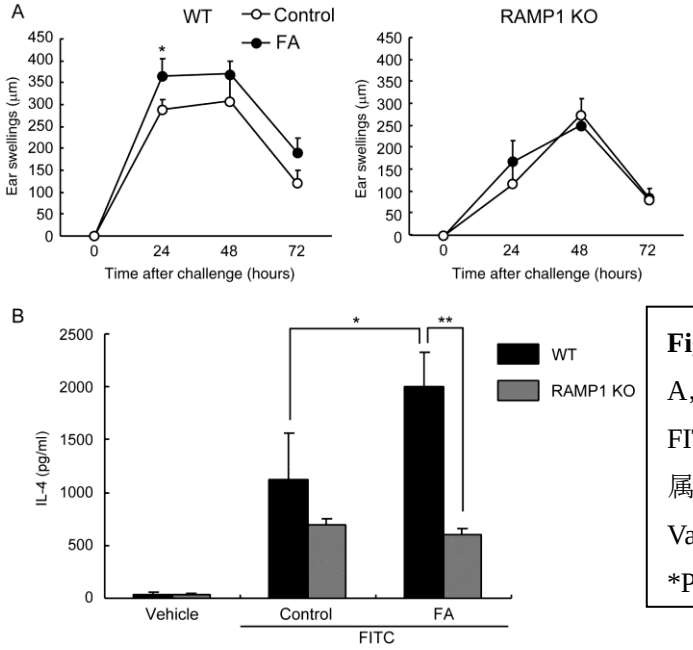


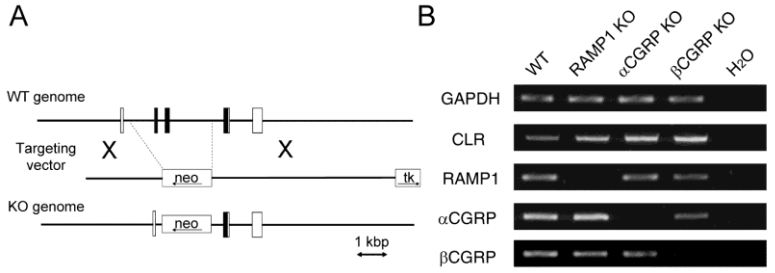
Figure 23.　新生仔期の化学物質暴露と FITC-CHS
A, 生後 3～5 日目に化学物質を塗布し, 6 週齢において FITC-CHS を誘導した(n=4). B, FITC 感作 24 時間後の所属リンパ節 Th 細胞からの IL-4 産生を ELISA で測定(n=4).
Values are presented as mean ± SD.
*P < 0.05, **P < 0.01. FA : formaldehyde.

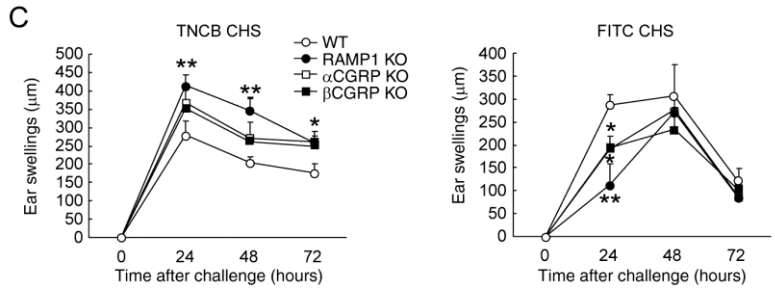
＜CGRP 欠損マウスにおける皮膚炎症の表現型と新生仔期の化学物質暴露モデル＞

CGRP にはαCGRP とβCGRP という 2 種類のアイソフォームが存在するが，特定の組織において特異的な発現パターンを示す点以外に機能的な差異は認められていない．私は，前述の CGRP 含有知覚神経伸長と皮膚炎症の関係には CGRP が深く関わっているという知見から CGRP アイソフォーム欠損マウスを用いてそれぞれの CGRP がどのように知覚神経からの分泌や炎症反応制御に寄与しているのかを調べる必要があると考えた．そこで世界で初めて βCGRP 欠損マウスを作製し(Figure 24A)，αCGRP 欠損マウスと合わせて皮膚炎症における表現型と新生仔期の化学物質暴露モデルを用いた解析を行った．

まず，αCGRP 欠損、βCGRP 欠損マウスにおける CGRP の発現を確認した結果，確かにそれぞれの CGRP アイソフォームが欠損していることを認めた(Figure 24B)．そこでこれらのマウスに CHS を誘導して表現型を解析した．その結果，両 CGRP 欠損マウスともに野生型マウスと比べ若干の皮膚炎症誘発の表現型相違を示したが，その作用は RAMP1 欠損マウスよりも弱いものであった(Figure 24C)．

さらに新生仔期の CGRP 欠損マウスに FA を塗布し，成体における FITC-CHS 応答性を評価した．その結果もやはり RAMP1 欠損マウスとは異なり，両 CGRP 欠損マウスでは弱い炎症増強作用が認められた(Figure 25)．これらの結果は皮膚炎症や新生仔期の化学物質刺激にともなう CGRP シグナルの増強においては両 CGRP アイソフォームが同程度の寄与をしており，どちらか一方が欠損していても他方が機能を補完することができるという可能性を示している．今後 CGRP 二重欠損マウスを用いた解析などを加えることでより詳細な評価を行う予定である．





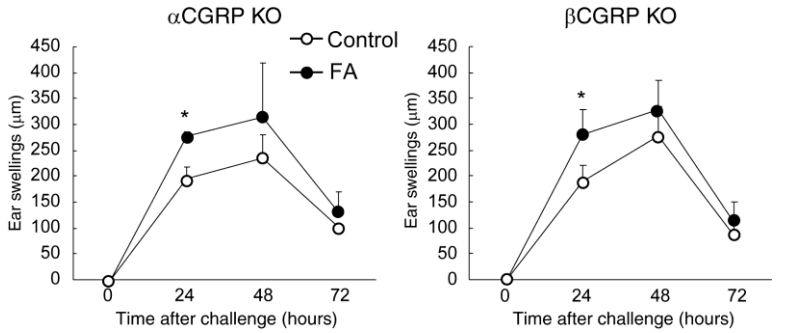


Figure 24.　CGRP 欠損マウスと CHS
A，βCGRP 欠損マウスのコンストラクト．B，各マウスの脳における CGRP 関連遺伝子の発現．C，TNCB-CHS または FITC-CHS の表現型解析 (n=4)．Values are presented as mean ± SD. *P < 0.05，**P < 0.01 vs. WT.

Figure 25.　CGRP 欠損マウスと CHS
新生仔期に FA を塗布したマウスに FITC-CHS を誘導して耳の腫れを測定 (n=4)．FA：formaldehyde.
Values are presented as mean ± SD. *P < 0.05 vs. control.

第 3 節　精神的なストレス暴露がアレルギー応答性に与える影響

＜皮膚炎症に対する精神的ストレスの影響＞

最後に CGRP の産生増強を引き起こす神経系の要因として，精神的なストレス暴露とアレルギー応答性の関係について検討した．まず皮膚炎症モデルと精神的ストレスの関係を調べるため，マウスに IMS を与えることによる影響を評価した．IMS を 2 時間与えたマウスでは，血中の CGRP 濃度およびストレス応答の指標であるコルチコステロン濃度の顕著な上昇が認められた(Figure 26A and B)．これによって精神的ストレス負荷と CGRP 産生増強が確認できたので，このマウスに CHS を誘導してその表現型を解析した．

ここでは CHS を感作する 2 時間前から感作時まで IMS を与えている．まず，TNCB-CHS をマウスに誘導した結果，IMS を与えたマウスで反応性の低下が見られた(Figure 27)．これは CGRP による TNCB-CHS 抑制作用が増強されたためだと予想できる．実際 RAMP1 欠損マウスを用いた実験ではこの作用が認められなかった(Figure 27)．そこでストレス応答によって反応性が増強すると予想される FITC-CHS における作用も検討した．TNCB-CHS とは反対に IMS を与えることで炎症の悪化が見られた(Figure 28A)．そしてやはり RAMP1 欠損マウスではその作用が消失しており，CGRP が精神的ストレス応答時のアレルギー反応制御に非常に重要な役割を担っている可能性が示された．また，この炎症悪化メカニズムとして感作 24 時間後の所属リンパ節 Th 細胞からの IL-4 産生量を測定した結果，IMS 暴露によって IL-4 の産生が増加していることも明らかとなった(Figure 28B)．これらの結果から CGRP は精神的ストレス応答時に産生量が増加し，Th 細胞の分化促進などの機構によって皮膚炎症を制御していることが示唆された．

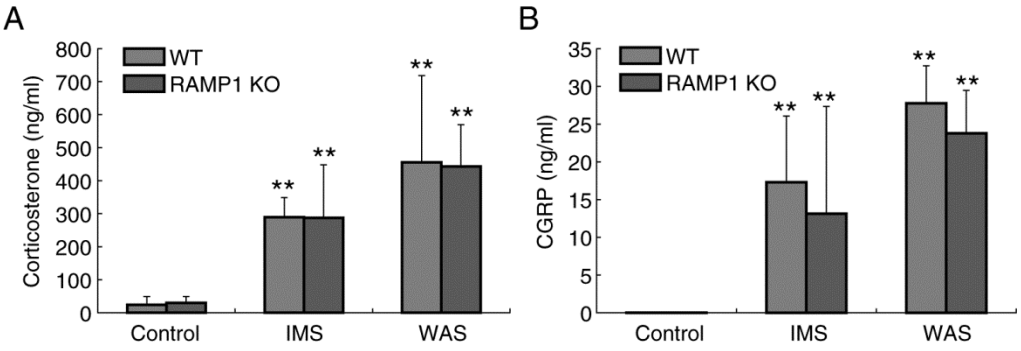


Figure 26.　精神的ストレス応答時の血中 CGRP 濃度変化

A，ストレス暴露後の血中コルチコステロン濃度を ELISA で測定(n=3).

B，ストレス暴露後の血中 CGRP 濃度を ELISA で測定(n=3).

Values are presented as mean ± SD.　**P < 0.01 vs. control.

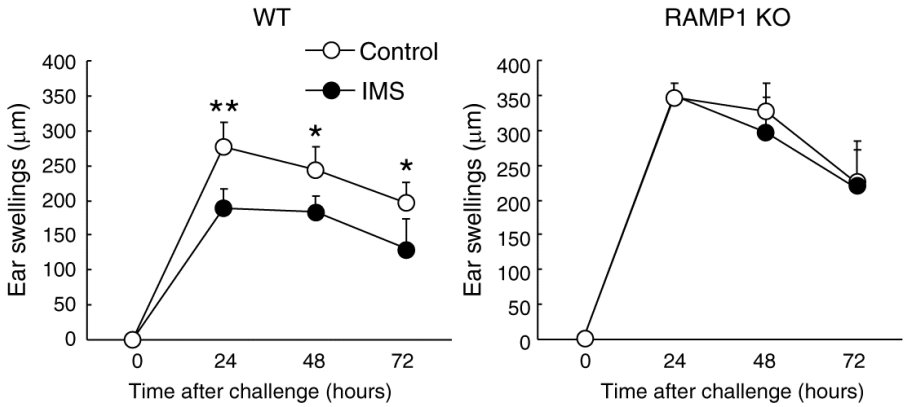


Figure 27.　精神的ストレス応答時の TNCB-CHS

IMS 暴露後に TNCB を感作し，その 5 日後に CHS を誘発した(n=4).

Values are presented as mean ± SD.　*P < 0.05，**P < 0.01 vs. control.

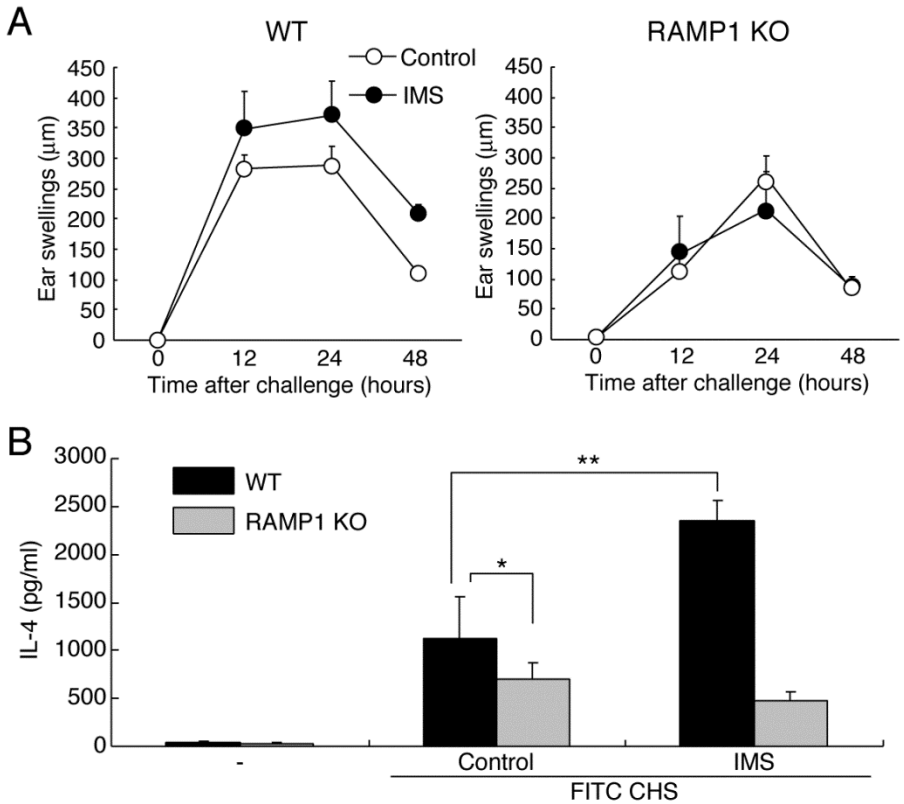


Figure 28.　精神的ストレス応答時の FITC-CHS

A，IMS 暴露後に FITC を感作し，その 5 日後に CHS を誘発した(n=4).

B，IMS 暴露後に FITC を感作し，24 時間後における所属リンパ節 Th 細胞からの IL-4 産生を ELISA で測定(n=4).

Values are presented as mean ± SD.　*P < 0.05，**P < 0.01.

＜気道炎症に対する精神的ストレスの影響＞

続いて，Th9 細胞が寄与する気道炎症モデルについても検討を行った．気道炎症の感作時に IMS および WAS を暴露した結果，特に WAS 暴露群において肺への浸潤細胞の増加および炎症反応の悪化が認められた(Figure 29A-D)．また，コントロール群では差が見られなかった IgE 量についてもストレス暴露による上昇傾向が認められた(Figure 29E)．さらに肺リンパ節中の IL-9 発現量も増加しており，RAMP1 欠損マウスではこれらの作用が消失していた(Figure 29F)．以上の結果から，気道炎症においても CGRP の IL-9 産生促進作用は精神的ストレスによる病態悪化に寄与している可能性が示された．

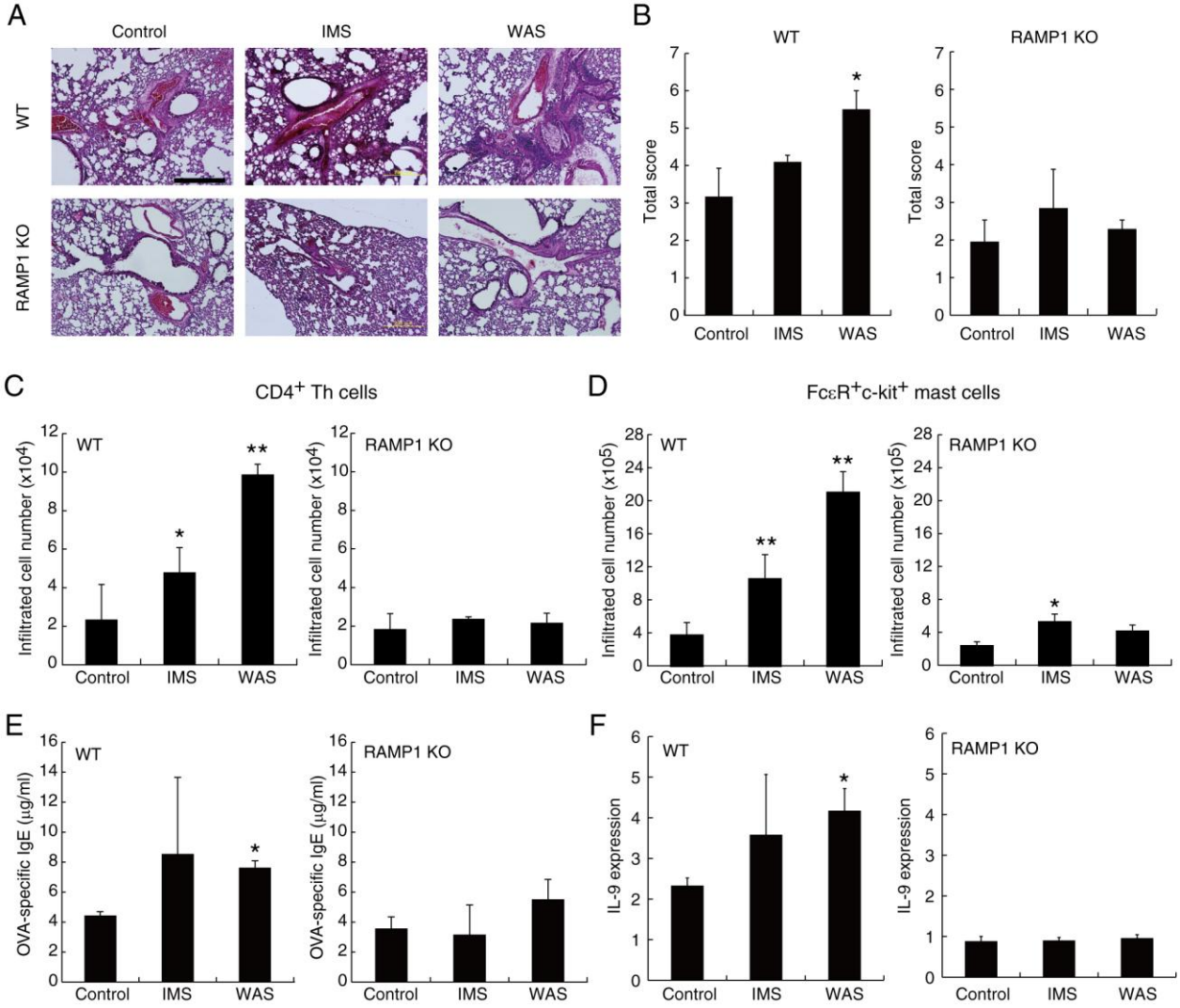


Figure 29.　精神的ストレス応答時における気道炎症の表現型

A and B，ストレス暴露後に気道炎症を誘発し，24 時間後の肺組織を HE 染色で解析(n=3)．C and D，肺に浸潤した T 細胞およびマスト細胞数をフローサイトメトリー法により測定(n=3)．E，血中 OVA 特異的抗体量を ELISA 法で測定(n=3)．F，肺リンパ節 Th 細胞における IL-9 mRNA 発現量を real-time PCR 法で測定(n=3)．Values are presented as mean ± SD.　*P < 0.05，**P < 0.01 vs. control．Scale bar：200 μm.

第 4 節　小括

第 3 章では化学物質による知覚神経伸長や精神的なストレスなどが引き起こす CGRP の産生促進がアレルギー応答性に与える影響を評価してきた. その結果, 皮膚炎症や気道炎症における CGRP の影響が見出され, 特に Th2 細胞や Th9 細胞に起因するアレルギーモデルにおいては CGRP を介したストレスによる病態悪化が示された(Figure 30).

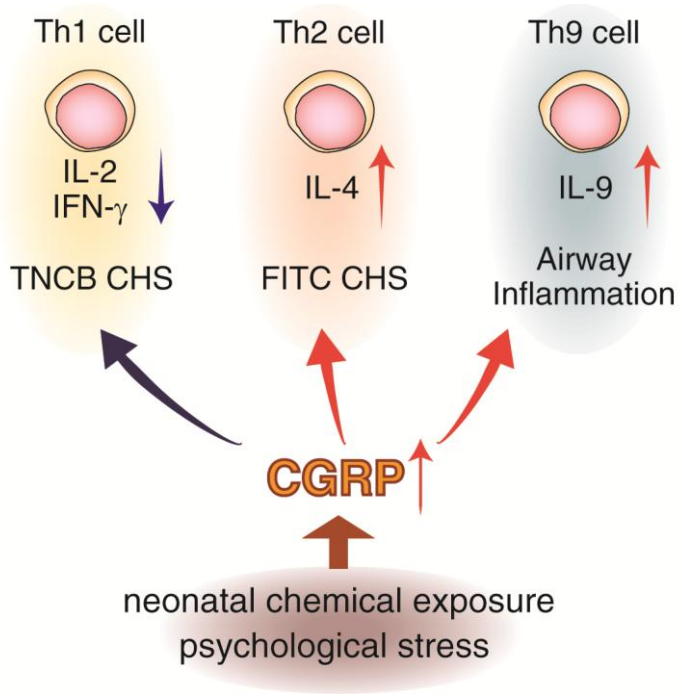


Figure 30. 神経系の異常は CGRP を介してアレルギー応答性を制御する
新生児期の化学物質暴露や精神的なストレス暴露は CGRP 産生量を増加させ, Th 細胞に対する作用を介してアレルギー応答性を制御している.

総括

神経系による免疫系の制御機構の存在は古くから提唱されているが，実際に精神的な要因と炎症性疾患を科学的かつ詳細に解析した例は少ない．本研究では，RAMP1 欠損マウスを用いた検討により，神経ペプチド CGRP が生理的に Th2 細胞，Th9 細胞，Th17 細胞の機能を促進し，アレルギー反応を悪化させていることが示された．さらに精神的ストレスや化学物質刺激などによって CGRP の産生量が増加し，このアレルギー促進作用がより強くなることも示唆されたことから，様々な環境要因が神経系に対する影響を介してアレルギー疾患の発症や悪化を引き起こす過程における CGRP の重要性も示された．さらに獲得免疫やアレルギー疾患において重要な役割を担う Th 細胞に対する cAMP/PKA 経路の新たな制御機構を提唱することもできた．

Th 細胞に対する制御機構については非常に多くの研究がなされており，免疫系疾患の治療に向けて様々な機能的分子が注目されている．インターロイキンやインターフェロンなどのサイトカインはその代表であり，Th 細胞サブセットの分化から活性化，抑制にいたるまで様々な機能を有している．実際にアレルギー疾患の治療標的としても最有力候補であり， Th2 サイトカイン阻害薬のスプラタストや抗 IL-6 受容体抗体であるトシリズマブがアレルギー疾患の治療に用いられている．また新規 Th 細胞サブセットである Th9 細胞や Th17 細胞についても， IL-9 は喘息をはじめとする I 型アレルギーの，IL-17 は自己免疫疾患の治療標的として臨床開発が進められている(41, 42).

これらのサイトカインとは異なるシグナル伝達経路として CGRP と cAMP/PKA 経路が存在する．一般的に cAMP 濃度の上昇は Th 細胞の増殖抑制や不活性化を引き起こし，免疫応答を抑制すると考えられている(6, 43, 44). 実際に CGRP も高濃度で作用させると増殖抑制作用がサイトカインの産生促進作用を上回り，IL-4 や IL-9 などの産生量が激減する(data not shown). これらの結果は Th 細胞の制御において生理的な cAMP/PKA 経路の役割を解析する上で，そのリガンドとなる物質の定常状態での作用濃度やその変化を踏まえた検討が必要であることを示唆している．CGRP に関しては RAMP1 欠損マウスを用いた本検討により，生理的に Th2 細胞，Th9 細胞，Th17 細胞の機能を促進し，アレルギー反応を促進させることが示された．さらに精神的ストレスなどによってその産生量が増加することでアレルギー促進作用がより強くなることも示唆され，アレルギー疾患の発症や悪化において重要な役割を担っている可能性が考えられる．

一方で CGRP は炎症の抑制や免疫力の低下にも関わっていると考えられる．CGRP は T 細胞増殖抑制作用と IL-2 や IFN-γ 産生抑制作用によって Th1 反応や IV 型アレルギー反応を強く抑制する．また，本検討によって CGRP がストレス応答時の Th1 型皮膚炎症抑制に寄与していることが示されたほか，ストレス暴露によって CGRP の放出が起こり，IV 型アレルギーが抑制されるという報告も存在する(45). このような Th1 反応は通常細菌性感染症に対する防御機構として存在している．精神的なストレスはアレルギー疾患を悪化させるといわれる一方で免疫力の低下や易感染性につながる可能性も示唆されているが，この一見矛盾する事象も CGRP の作用によって説明することが可能であろう．

Th 細胞における cAMP/PKA 経路を介した制御は主に G タンパク共役型受容体(GPCR)によって引き起こされる. GPCR リガンドはケモカインのほかに神経系由来の物質が多く存在し, 神経系による免疫系の制御における重要な経路のひとつである. CGRP 以外にもこの cAMP/PKA 経路を介して Th 細胞機能を制御する神経伝達物質がいくつか知られており, その機能が注目されている. 中でも研究が進んでいるものとして pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)や vasoactive intestinal peptide (VIP)が存在する. これらの物質は CGRP と同様に精神的なストレスによってその産生が亢進すると考えられ, GPCR を介した細胞内 cAMP 濃度の上昇を引き起こす. 実際に *in vitro* における抗原提示細胞からの炎症性サイトカイン産生抑制に関して, CGRP と VIP・PACAP が同様の作用機序で機能することが知られている(46). そして VIP が IL-17 産生に促進的に機能することや(47), VIP 欠損マウスが EAE に抵抗性を持つことも報告されており(48), CGRP と類似した作用が認められる. しかしながらこれらの神経ペプチドが生理的に Th 細胞制御作用を発揮するかどうかについては十分に解析が進んでおらず, EAE についての作用機序解析では Th17 細胞に対する作用ではなくケモカイン産生に変化が認められるという知見や(48), 気道炎症においては VIP や PACAP が抑制的な働きをしているという知見も存在するなど(49, 50), CGRP とは機能が異なる点も多く示唆されている. この生理的作用の違いは前述の生理的濃度の違いに加えて, 生体内での発現分布の違いにも起因すると考えられる. 実際にマウス各組織を用いた RT-PCR 解析によって, αCGRP や βCGRP, VIP の mRNA は生体内での発現分布がかなり異なるという結果を得ており, リンパ節においては特に αCGRP が高発現していることなどが明らかとなっている(data not shown). また, タンパク質レベルにおいても VIP 陽性神経線維は皮膚や消化管, 血管周辺や筋組織などに発現していることが報告されているが, リンパ節周辺にはほとんど存在していない. 一方で CGRP は肺や皮膚組織に加えてリンパ節周辺にも多く分布しており(data not shown), Th 細胞分化時における作用が他の神経ペプチドよりも強力である可能性が存在する. CGRP の生理的機能における最大の特徴はこの Th 細胞機能促進作用であり, CGRP が促進的に作用する Th2, Th9, Th17 細胞に起因するアレルギー疾患の病態形成における重要性が示唆される.

このように cAMP/PKA 経路の活性化による Th 細胞の制御は多く検討されてきたが, サイトカイン産生に対する直接的な機序は不明な点が多かった. 本論では PKA の活性化とサイトカイン産生制御を結ぶ新たな経路として PKA が GSK-3β の 9 番目のセリンをリン酸化し, 不活性化することで NFATc2 の核内移行が促進されるという機構を示した. その結果 NFATc2 によるサイトカイン mRNA 転写が促進されるほか, GATA3 の発現も促進することが明らかとなった. GATA3 は IL-4 や IL-9 の産生に寄与する Th2 細胞の主要転写因子であり, これらの経路が CGRP や cAMP/PKA による Th 細胞機能制御機構のひとつであると考えられる. 一方で Th9 細胞における PU.1 発現は NFATc2 や GSK-3β を介していないことも示された. これは活性化 PKA がほかの経路を介して作用する可能性を示している. 実際に 48 時間以降の IL-9 mRNA 発現量を解析してみると, NFAT 阻害剤による CGRP の作用減弱が認められなくなる(data not shown). これはタンパク質の転写・翻訳を介さない NFATc2 の核内移行促進という機構が刺激後比較的早い段階で重要となり, その後ほかの制御因子の発現が誘導されることによる影響が強く現れるという可能性を示唆している.

以上のようにCGRPはTh細胞の制御において非常に重要な役割を担っている．特に精神的ストレス暴露状態において，野生型マウスと RAMP1 欠損マウスのアレルギー応答性やサイトカイン産生には大きな差が生じており，治療標的としての価値も計り知れない．もちろん，実際にはストレス応答としてあらゆる種類の生理活性物質が放出され，様々な機能を示す．本検討でも化学物質を暴露するタイミングやストレスを与える時間を変化させると全く異なる表現型が現れることを認めている．つまり，ヒトにおいてはこのような環境要因がさらに多岐にわたり，アレルギー悪化につながるメカニズムも多様であると考えられる．今後臨床における CGRP の重要性をそのような環境要因と関連させながら検討していくことが求められるであろう．

免疫系の疾患を考える上で最も重要なことは，免疫系が Th1 反応や Th2 反応という全か無かという状態にあるのではなく，すべての反応のバランスがどのように偏っているのかを理解すること，そしてその微妙なバランス調節がどのように行われているのかを考察することである．一方で，CGRP や cAMP/PKA 経路はコルチコステロンのように免疫反応全般を完全に抑制するなどといった強力な作用は持たないが，その濃度や対象とする細胞の種類によって異なる作用を示すことで免疫系のバランスを制御していると考えることができる．そし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が示された．実際ヒトの疾患においても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り，精神的なストレスなどの環境要因と併せた解析を進めることで治療標的としての有用性評価につながることが期待できる．今回，CGRP という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治療戦略に一石を投じることとなれば幸いである．

結論

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. また, その機序として 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る EAE 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.

謝辞

本研究をまとめるにあたり，貴重なご指導・ご鞭撻を賜りました，大阪大学大学院薬学研究科細胞生理学分野教授，辻川和丈先生に心より謝意を表します．

また，本研究を進めるにあたり種々のご指導を頂きました，大阪大学大学院薬学研究科細胞生理学分野前教授，山元　弘先生ならびに同特任准教授，深田宗一朗先生に深謝いたします．

研究の遂行にあたり遺伝子欠損マウスの作製にご協力くださった，大阪大学遺伝情報実験センター遺伝子機能解析学分野，岡部　勝教授に御礼申し上げます．また，αCGRP 欠損マウスを提供して頂いた，東京大学大学院医学系研究科代謝性理化学分野，栗原裕基教授に御礼申し上げます．

最後に研究全般において多くの助言と協力を頂きました，吉川倫太郎博士，渡辺桂子修士，西岡諭史修士，橋本なぎさ修士，宮城弥生修士，末田佳織学士，高辻未来特別実習生，北惠郁緒里特別研究員をはじめとする大阪大学薬学研究科細胞生理学分野の皆様に心より感謝いたします．

参考文献

1. Bhalla AK. 1989. Hormones and the immune response. Ann Rheum Dis 48:1-6.
2. Franco R, Pacheco R, Lluis C, Ahern GP, O'Connell PJ. 2007. The emergence of neurotransmitters as immune modulators. Trends Immunol 28:400-407.
3. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM. 1998. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. Nature 393:333-339.
4. Van Valen F, Piechot G, Jurgens H. 1990. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptors are linked to cyclic adenosine monophosphate production in SK-N-MC human neuroblastoma cells. Neurosci Lett 119:195-198.
5. Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. 1985. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. Nature 313:54-56.
6. Boudard F, Bastide M. 1991. Inhibition of mouse T-cell proliferation by CGRP and VIP: effects of these neuropeptides on IL-2 production and cAMP synthesis. J Neurosci Res 29:29-41.
7. Liu J, Chen M, Wang X. 2000. Calcitonin gene-related peptide inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin-12 release from mouse peritoneal macrophages, mediated by the cAMP pathway. Immunology 101:61-67.
8. McGillis JP, Humphreys S, Rangnekar V, Ciallella J. 1993. Modulation of B lymphocyte differentiation by calcitonin gene-related peptide (CGRP). I. Characterization of high-affinity CGRP receptors on murine 70Z/3 cells. Cell Immunol 150:391-404.
9. Miyauchi K, Tadotsu N, Hayashi T, Ono Y, Tokoyoda K, Tsujikawa K, Yamamoto H. 2002. Molecular cloning and characterization of mouse calcitonin gene-related peptide receptor. Neuropeptides 36:22-33.
10. Tokoyoda K, Tsujikawa K, Matsushita H, Ono Y, Hayashi T, Harada Y, Abe R, Kubo M, Yamamoto H. 2004. Up-regulation of IL-4 production by the activated cAMP/cAMP-dependent protein kinase (protein kinase A) pathway in CD3/CD28-stimulated naive T cells. Int Immunol 16:643-653.
11. Tsujikawa K, Yayama K, Hayashi T, Matsushita H, Yamaguchi T, Shigeno T, Ogitani Y, Hirayama M, Kato T, Fukada S, Takatori S, Kawasaki H, Okamoto H, Ikawa M, Okabe M, Yamamoto H. 2007. Hypertension and dysregulated proinflammatory cytokine production in receptor activity-modifying protein 1-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 104:16702-16707.
12. Mikami N, Matsushita H, Kato T, Kawasaki R, Sawazaki T, Kishimoto T, Ogitani Y, Watanabe K, Miyagi Y, Sueda K, Fukada S, Yamamoto H, Tsujikawa K. 2011. Calcitonin gene-related peptide is an important regulator of cutaneous immunity: effect on dendritic cell and T cell functions. J Immunol 186:6886-6893.

13. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, Martin B, Wilhelm C, Stockinger B. 2008. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. Nat Immunol 9:1341-1346.
14. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, Mitsdoerffer M, Strom TB, Elyaman W, Ho IC, Khoury S, Oukka M, Kuchroo VK. 2008. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. Nat Immunol 9:1347-1355.
15. Demoulin JB, Renauld JC. 1998. Interleukin 9 and its receptor: an overview of structure and function. Int Rev Immunol 16:345-364.
16. Dong Q, Louahed J, Vink A, Sullivan CD, Messler CJ, Zhou Y, Haczku A, Huaux F, Arras M, Holroyd KJ, Renauld JC, Levitt RC, Nicolaides NC. 1999. IL-9 induces chemokine expression in lung epithelial cells and baseline airway eosinophilia in transgenic mice. Eur J Immunol 29:2130-2139.
17. Renauld JC, Houssiau F, Louahed J, Vink A, Van Snick J, Uyttenhove C. 1993. Interleukin-9. Adv Immunol 54:79-97.
18. Townsend JM, Fallon GP, Matthews JD, Smith P, Jolin EH, McKenzie NA. 2000. IL-9-deficient mice establish fundamental roles for IL-9 in pulmonary mastocytosis and goblet cell hyperplasia but not T cell development. Immunity 13:573-583.
19. Temann UA, Ray P, Flavell RA. 2002. Pulmonary overexpression of IL-9 induces Th2 cytokine expression, leading to immune pathology. J Clin Invest 109:29-39.
20. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. 2006. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. Cell 126:1121-1133.
21. Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, Ma L, Shah B, Panopoulos AD, Schluns KS, Watowich SS, Tian Q, Jetten AM, Dong C. 2008. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. Immunity 28:29-39.
22. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. 2008. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat. Nat Immunol 9:641-649.
23. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR. 2007. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. Nat Immunol 8:967-974.
24. Iwakura Y, Nakae S, Saijo S, Ishigame H. 2008. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. Immunol Rev 226:57-79.
25. Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, Sekikawa K, Asano M, Iwakura Y. 2002. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. Immunity 17:375-387.

26. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y. 2006. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 177:566-573.
27. Chang HC, Sehra S, Goswami R, Yao W, Yu Q, Stritesky GL, Jabeen R, McKinley C, Ahyi AN, Han L, Nguyen ET, Robertson MJ, Perumal NB, Tepper RS, Nutt SL, Kaplan MH. 2010. The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. Nat Immunol 11:527-534.
28. Staudt V, Bothur E, Klein M, Lingnau K, Reuter S, Grebe N, Gerlitzki B, Hoffmann M, Ulges A, Taube C, Dehzad N, Becker M, Stassen M, Steinborn A, Lohoff M, Schild H, Schmitt E, Bopp T. 2010. Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. Immunity 33:192-202.
29. Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jager A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. 2007. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. Nature 448:484-487.
30. Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM, Dong C. 2007. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. Nature 448:480-483.
31. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. Immunity 24:179-189.
32. Cheng X, Ji Z, Tsalkova T, Mei F. 2008. Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 40:651-662.
33. Jash A, Sahoo A, Kim GC, Chae CS, Hwang JS, Kim JE, Im SH. 2012. Nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT1)-induced permissive chromatin modification facilitates nuclear factor-kappaB (NF-kappaB)-mediated interleukin-9 (IL-9) transactivation. J Biol Chem 287:15445-15457.
34. Liu XK, Lin X, Gaffen SL. 2004. Crucial role for nuclear factor of activated T cells in T cell receptor-mediated regulation of human interleukin-17. J Biol Chem 279:52762-52771.
35. Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR. 1997. Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. Science 275:1930-1934.
36. Fang X, Yu SX, Lu Y, Bast RC Jr, Woodgett JR, Mills GB. 2000. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. Proc Natl Acad Sci U S A 97:11960-11965.
37. Nielsch U, Keen P. 1987. Effects of neonatal 6-hydroxydopamine administration on different substance P-containing sensory neurones. Eur J Pharmacol 138:193-197.
38. Brauer MM, Lincoln J, Sarner S, Blundell D, Milner P, Passaro M, Burnstock G. 1994. Maturational changes in sympathetic and sensory innervation of the rat uterus: effects of neonatal capsaicin treatment. Int J Dev Neurosci 12:157-171.
39. Silver WL, Farley LG, Finger TE. 1991. The effects of neonatal capsaicin administration on

trigeminal nerve chemoreceptors in the rat nasal cavity. Brain Res 561:212-216.
40. Hammond DL, Ruda MA. 1991. Developmental alterations in nociceptive threshold, immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P, and fluoride-resistant acid phosphatase in neonatally capsaicin-treated rats. J Comp Neurol 312:436-450.
41. Corren J. 2011. Cytokine inhibition in severe asthma: current knowledge and future directions. Curr Opin Pulm Med 17:29-33.
42. Hueber W, Patel DD, Dryja T, Wright AM, Koroleva I, Bruin G, Antoni C, Draelos Z, Gold MH, Durez P, Tak PP, Gomez-Reino JJ, Foster CS, Kim RY, Samson CM, Falk NS, Chu DS, Callanan D, Nguyen QD, Rose K, Haider A, Di Padova F. 2010. Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis. Sci Transl Med 2:52ra72.
43. Li X, Murray F, Koide N, Goldstone J, Dann SM, Chen J, Bertin S, Fu G, Weinstein LS, Chen M, Corr M, Eckmann L, Insel PA, Raz E. 2012. Divergent requirement for Galphas and cAMP in the differentiation and inflammatory profile of distinct mouse Th subsets. J Clin Invest 122:963-973.
44. Crocker IC, Townley RG, Khan MM. 1996. Phosphodiesterase inhibitors suppress proliferation of peripheral blood mononuclear cells and interleukin-4 and -5 secretion by human T-helper type 2 cells. Immunopharmacology 31:223-235.
45. Kawaguchi Y, Okada T, Konishi H, Fujino M, Asai J, Ito M. 1997. Reduction of the DTH response is related to morphological changes of Langerhans cells in mice exposed to acute immobilization stress. Clin Exp Immunol 109:397-401.
46. Ding W, Wagner JA, Granstein RD. 2007. CGRP, PACAP, and VIP modulate Langerhans cell function by inhibiting NF-kappaB activation. J Invest Dermatol 127:2357-2367.
47. Yadav M, Rosenbaum J, Goetzl EJ. 2008. Cutting edge: vasoactive intestinal peptide (VIP) induces differentiation of Th17 cells with a distinctive cytokine profile. J Immunol 180:2772-2776.
48. Abad C, Tan YV, Lopez R, Nobuta H, Dong H, Phan P, Feng JM, Campagnoni AT, Waschek JA. 2010. Vasoactive intestinal peptide loss leads to impaired CNS parenchymal T-cell infiltration and resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. Proc Natl Acad Sci U S A 107:19555-19560.
49. Elekes K, Sandor K, Moricz A, Kereskai L, Kemeny A, Szoke E, Perkecz A, Reglodi D, Hashimoto H, Pinter E, Szolcsanyi J, Helyes Z. 2011. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide plays an anti-inflammatory role in endotoxin-induced airway inflammation: in vivo study with gene-deleted mice. Peptides 32:1439-1446.
50. Szema AM, Hamidi SA, Lyubsky S, Dickman KG, Mathew S, Abdel-Razek T, Chen JJ, Waschek JA, Said SI. 2006. Mice lacking the VIP gene show airway hyperresponsiveness and airway inflammation, partially reversible by VIP. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 291:L880-886.

略語

6-bnz: N^6-benzoyl cAMP (PKA-specific cAMP analogue)
8-CPT: 8-(4-chlorophenylthio)-2'-O-methyl cAMP (EPAC-specific cAMP analogue)
AC: adenylate cyclase
cAMP: cyclic adenosine monophosphate
CGRP: calcitonin gene-related peptide
CHS: contact hypersensitivity
CLR: calcitonin receptor-like receptor
db-cAMP: N,N-dibutyl cAMP
EAE: experimental autoimmune encephalomyelitis
EPAC: exchange proteins activated by cAMP
FA: formaldehyde
FITC: fluorescein isothiocyanate
GSK-3: Glycogen synthase kinase 3
IMS: immobilization stress
NFAT: nuclear factor of activated T-cells
PKA: protein kinase A
RAMP1: receptor activity-modifying protein 1
TNCB: 2,4,6-trinitrochlorobenzene
WAS: water avoidance stress