

Title	Lipopolysaccharide and interleukin-1 $\beta$ augmented histidine decarboxylase activity in cultured cells of the rat embryonic brain
Author(s)	新美, 満洋
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40886">https://hdl.handle.net/11094/40886</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏 名	新 美 満 洋
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 5 8 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 10 年 3 月 9 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	Lipopolysaccharide and interleukin-1 $\beta$ augmented histidine decarboxylase activity in cultured cells of the rat embryonic brain (リポ多糖およびインターロイキン-1 $\beta$ によるラット胎児脳培養細胞におけるヒスチジン脱炭酸酵素活性の上昇)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岡 本 光 弘 (副査) 教 授 遠 山 正 彌 教 授 三 木 直 正

## 論 文 内 容 の 要 旨

### [目的]

ヒスタミンは末梢組織においてはアレルギー反応、血管収縮、胃酸分泌に関与することが知られている。また、T細胞でのIL-2やIFN- $\gamma$ の産生、末梢単核球でのH<sub>2</sub>受容体を介したTNF- $\alpha$ の産生抑制、腹腔マクロファージでのIL-1産生の調節、B細胞でのIL-6産生の増加など、細胞性免疫に対し調節作用を示すことが知られている。一方、脳内においては視床下部後部の結節乳頭核(TM)にその細胞体を有するヒスタミン神経系を形成し、種々の生理機能の調節に関与することが明らかにされている。

我々は、これまでにリポ多糖(LPS)のマウス脳室内投与により視床下部のヒスチジン脱炭酸酵素(HDC)活性の上昇を認め、また、ラット視床下部のTMにIL-1 $\beta$ を投与することにより、視床下部前部よりヒスタミン遊離が増加することを報告してきた。しかし、ここで認められたHDC活性の上昇やヒスタミン遊離の増加がヒスタミン神経のみに由来するものであるか否かは明らかではない。そこで私は、脳内において免疫調節刺激に応答するHDC含有細胞を検索する目的で、ラット胎児脳の培養細胞を用い、HDC活性に対するLPSおよび各種サイトカインの影響を検討した。

### [方法ならびに成績]

胎生21日齢のウイスター系ラットより全脳を摘出後、間脳と大脳皮質を分離し、トリプシン処理の後、ポリリジン処理プレートに播種し、10%牛胎児血清を含むMEMにて1週間培養した(初代混合培養細胞)。一部の細胞については分裂性細胞の増殖を抑制するために、培養5日目にAraC処理(終濃度1 $\mu$ M)を施した(AraC処理混合培養細胞)。また、神経細胞を除去する目的でポリリジン非処理フラスコにて1週間培養し、振とう後浮遊した細胞を除去し、フラスコに残存した細胞を再度1週間培養した(付着性細胞)。なお、いずれの条件下においても肥満細胞が混在していないことを免疫組織学的に確認した。

初めに、間脳初代混合培養細胞にヒスタミン神経が含まれるか否かを確認する目的で、培養細胞からのヒスタミン遊離の有無を検討した。まず、培養7日目にEBSSに置換し、1時間経過後の上清を回収し、ヒスタミン濃度を測定

した(細胞外ヒスタミン遊離)。更に、ヒスタミン遊離後に残存した細胞内ヒスタミン濃度を測定した(細胞内ヒスタミン含量)。その結果、遊離量と残存量の総和より求めた刺激前の細胞内ヒスタミン含量に占める遊離ヒスタミン量比は、high K<sup>+</sup> 条件下で有意に高値を示し、Ca<sup>2+</sup> 除去により消失した。一方、大脳皮質においては、ヒスタミン遊離および細胞内ヒスタミンは検出されなかった。このことより、間脳初代混合培養細胞には、ヒスタミン神経が含まれることが示唆された。

そこで次に、HDC 活性に対する LPS および各種サイトカインの影響を種々の培養条件下で検討した。初代混合培養細胞および AraC 処理混合培養細胞については培養 6 日目、付着性細胞については培養 13 日目に LPS (終濃度 0~10 μg/ml)、IL-1β (終濃度 0~10 ng/ml)、TNF-α (終濃度 0~200 U/ml)、IL-6 (終濃度 0~10 ng/ml) を添加し、12 時間後の HDC 活性を測定した。

間脳初代混合培養細胞においては、LPS、IL-1β、TNF-α および IL-6 刺激前の各対照群の HDC 活性はそれぞれ 0.053±0.007 (n=6)、0.136±0.012 (n=6)、0.113±0.017 (n=5)、0.102±0.019 (n=6) pmol HA/4h/dish であった。LPS 刺激では 1、10 および 100 ng/ml でそれぞれ 0.192±0.028、0.245±0.017 および 0.222±0.032 と対照群に比し活性は有意に上昇した (p<0.05)。IL-1β 刺激においても 1 および 10 ng/ml で 0.235±0.025 および 0.256±0.017 と活性は有意に上昇した (p<0.05)。一方、TNF-α、IL-6 においては有意な変動を示さなかった。間脳付着性細胞においては、LPS および IL-1β 処置前の各対照群の活性はそれぞれ 0.026±0.002 (n=6)、0.028±0.002 (n=6) であった。LPS 処置では 1、100 および 1000 ng/ml の濃度において 0.057±0.010、0.074±0.007、0.067±0.005 (各 n=6) と活性は著明に上昇した (p<0.05)。IL-1β 処置でも同様に 0.1、1 および 10 ng/ml で 0.053±0.003、0.050±0.004、0.049±0.003 (各 n=6) と活性は著明に上昇した (p<0.05)。大脳皮質初代混合培養および付着性細胞においては、対照群の活性はそれぞれ 0.027±0.001 (n=6) および 0.026±0.002 (n=6) であった。初代混合培養細胞においては 10、100 および 1000 ng/ml の LPS 処置により 0.099±0.004、0.123±0.014 および 0.112±0.011 (各 n=6) と活性は有意に上昇した。同様に付着性細胞においても 1、100 および 1000 ng/ml の LPS 処置により 0.057±0.001、0.073±0.007 および 0.067±0.005 (各 n=6) と活性は有意に上昇した。このことより、脳内には間脳に存在するヒスタミン神経や肥満細胞以外にも HDC 活性を示す細胞が存在することが示された。

次に、LPS および IL-1β 刺激による HDC 活性上昇の機序を検討するために、AraC 処理 2 日後(培養 7 日目)の間脳初代混合培養細胞を用いて実験を行った。LPS および IL-1β 処置の各対照群の HDC 活性はそれぞれ 0.146±0.017 (n=3)、0.136±0.006 (n=3) であった。LPS 刺激による活性の変化は AraC 処理に影響を受けなかったが、IL-1β 刺激による変化は、AraC 処理によって抑制された。また、LPS および IL-1β 添加後の HDC mRNA 量の変化を Northern blot 法により検討したところ、いずれの場合においても HDC mRNA の発現量に違いは認められなかった。このことから、IL-1β 刺激による HDC 活性の上昇は、細胞数の増加によるものと考えられた。一方、LPS 刺激による HDC 活性の上昇の機序は IL-1β とは異なることが示された。

#### [総括]

間脳初代混合培養細胞および付着性細胞において、LPS および IL-1β 刺激により有意な HDC 活性の上昇が認められた。また、大脳皮質初代混合培養細胞および付着性細胞でも同様に LPS 刺激により HDC 活性の有意な上昇が認められた。間脳初代混合培養細胞での HDC 活性に対する LPS 刺激の効果は、AraC 処理の影響を受けなかったが、IL-1β 刺激の効果は AraC 処理により消失した。LPS 刺激による HDC 活性の上昇には mRNA 量の変化を伴わなかった。

以上の結果より、ラット間脳初代混合培養細胞中にはヒスタミン含有神経細胞や肥満細胞以外にも HDC 活性を有する細胞が存在する事が示された。また、IL-1β 刺激による HDC 活性の上昇は、細胞数の増加によるものと考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、ラット胎児脳の培養系を用いてヒスタミン合成酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) 活性を指標として、種々の免疫刺激に応答する細胞の検索を行ったものである。これまでの一連の検討では、マウス視床下部へのリポ多糖 (LPS) 投与により、視床下部の HDC 活性が上昇すること、ラット視床下部後部の結節乳頭核 (TM) への interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) 投与により視床下部前部からのヒスタミン遊離が上昇することが明らかにされていた。従って、本研究の位置づけは、脳内でこれらの現象をもたらす責任細胞を明らかにすることであり、LPS や IL- $1\beta$  刺激により HDC 活性が上昇する細胞は、既知のヒスタミン含有細胞であるヒスタミン神経、肥満細胞以外の細胞であること、この細胞はヒスタミン合成能やヒスタミン含有量はヒスタミン神経と比較して低いものの、大脳皮質にも多く存在していることを明らかにした。

今後の課題としてこの細胞の同定およびその機能解析が残されているが、末梢組織においてヒスタミンが免疫調節因子として機能していることを考慮すれば、この細胞はヒスタミンを介して脳内における普遍的な免疫応答の一翼を担っている可能性が考えられる。

以上のように本研究によって明らかとなった事象は、これまで報告されていた脳内ヒスタミンの役割に加えて、新たに脳内免疫調節因子としての可能性を示唆するものであり、学位授与に値するものと認める。