

Title	神経ペプチドCGRPの免疫制御作用の解析
Author(s)	松下, 浩明
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47253">https://hdl.handle.net/11094/47253</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	まつ した ひろ あき 松 下 浩 明
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 2 1 1 0 5 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 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 の免疫制御作用の解析
論文審査委員	(主査) 教授 山元 弘 (副査) 教授 前田 正知 教授 中川 晋作 教授 松田 敏夫

#### 論 文 内 容 の 要 旨

古くから、神経系と免疫系は異なった制御系であると認識されながらも、互いに相互作用していると考えられてきた。カルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene-related peptide : CGRP) は、そのような両系のクロストークに関与している神経ペプチドである。私は、CGRP が免疫性疾患の炎症部位で過剰に検出されることや、免疫担当細胞が CGRP の受容体を発現していることに着目し、CGRP の免疫系に対する機能を解析した。特にその中で、CGRP 含有神経が皮膚に存在すること、表皮に存在する樹状細胞であるランゲルハンス細胞が CGRP 受容体を発現していることから、CGRP の皮膚炎症における関与を予想した。したがって、ハプテン誘導性の接触過敏症反応 (contact hypersensitivity : CHS) を用いて、CGRP の皮膚炎症における作用と、その作用メカニズムの解析を目的として、当研究室で樹立した CGRP 受容体欠損マウス (RAMP1 欠損マウス) を用いて研究を行った。

まず、CHS 誘導前に CGRP を抗原感作部に投与し、CGRP の皮膚炎症に対する効果を検討した。その結果、CGRP 投与により CHS による皮膚の腫れや細胞浸潤が抑制することから、皮膚炎症が抑制することが分かった。また、RAMP1 欠損マウスは、野生型マウスと比較して CHS による皮膚炎症が増強することがわかった。このことは、CGRP が皮膚炎症時に生理的に機能していることを意味し、抗炎症物質としての生理機能を追加する確証となる。そこで、CGRP の皮膚炎症抑制機構を解明するため、T 細胞や樹状細胞といった CHS に大きく貢献する細胞に対する CGRP の機能解析を行うことにした。

まず、T 細胞活性化時のサイトカイン産生に与える影響を調べた。BALB/c マウス脾臓由来ヘルパーT 細胞に擬似的な抗原刺激を行い、サイトカイン mRNA 発現量をマイクロアレイにより解析した。その結果、CGRP は IL-4 mRNA 発現を顕著に増強することが分かった。その後、ヘルパーT 細胞を刺激した培養上清を用いて、サイトカイン産生量を ELISA により測定した。その結果、CGRP は、IL-4 産生を増強し、IFN $\gamma$ 、IL-2 産生を抑制することが分かった。この結果から、CGRP がナイーブヘルパーT 細胞の分化を Th2 側に傾けると考え、刺激後の細胞を分化させ、Th1、Th2 細胞への分化割合を比較した。その結果、CGRP はヘルパーT 細胞の分化を、皮膚炎症に対し抑制的に働く Th2 側に傾けることが分かった。

次に、一般的な抗原提示細胞である脾臓由来抗原提示細胞に対する CGRP の作用を解析するため、RAMP1 欠損マウス脾臓由来抗原提示細胞の機能を野生型マウスのものと比較した。その結果、RAMP1 欠損マウスの細胞は T 細胞に対する増殖誘導能が高く、CGRP が抗原提示細胞の機能を抑制していることが分かった。しかし、CGRP は共刺激

分子の発現や抗原貪食能に対して、大きな変化をもたらさなかった。

そこで、CHSにより近い環境でCGRPの機能を解析するため、皮膚にハプテンを塗布した際の皮膚由来樹状細胞に与える影響を検討した。蛍光物質であるFITCをハプテンとして塗布すると、皮膚由来樹状細胞は蛍光標識され、活性化してリンパ節に遊走する。この方法を用いて、皮膚からリンパ節に遊走した皮膚由来樹状細胞について、CGRP投与による変化を解析した。その結果、CGRPの皮内投与により、リンパ節に遊走した細胞のFITC蛍光強度が低下することがわかった。さらに、RAMP1欠損マウスを用いて同様の解析をした結果でも、RAMP1欠損マウスでは、野生型マウスよりもFITC蛍光強度が上昇することが分かった。この結果から、CGRPがハプテン塗布後にリンパ節に遊走する皮内抗原提示細胞の、抗原含有量を低下させることがわかった。さらに、表皮内抗原提示細胞（ランゲルハンス細胞）に対するCGRPの機能を組織化学的に解析するため、ハプテン塗布後にリンパ節へ遊走することによる表皮内ランゲルハンス細胞数の低下を調べた。その結果、CGRP投与により、ハプテン塗布後にリンパ節へ遊走せずに表皮内に残ったランゲルハンス細胞数が増加した。このことは、CGRP投与によりランゲルハンス細胞のリンパ節への遊走能が低下したことを意味する。また、RAMP1欠損マウスは野生型マウスと比較して、未感作の状態では表皮内ランゲルハンス細胞数に変化は無かったものの、ハプテン塗布による感作後は表皮内ランゲルハンス細胞数が少ないことが分かった。これらの結果により、CGRPはランゲルハンス細胞のリンパ節への遊走を低下させることが分かった。

以上の結果から、CGRPは皮膚抗原提示細胞の遊走活性や貪食能、さらに2次リンパ器官でのT細胞に対する抗原提示能を低下させ、T細胞の分化を皮膚炎症に対し抑制的に働くTh2側に傾ける機能を有することがわかった。これらのことはすべてCHSによる皮膚炎症を抑制する方向に働いていることや、RAMP1欠損マウスを用いた解析においても確認できることから、CGRPが皮膚炎症を抑制する生理機能を有していることがわかった。さらに、CGRPの皮膚炎症時の発現変化や、今回見いだした遊走抑制の機構などが解析されることで、神経ペプチドによる免疫調節作用の生理的意義が、より詳細に解明されることが期待される。

## 論文審査の結果の要旨

神経系と免疫系は異なった制御系でありながらも、互いに相互作用していると考えられている。近年さまざまな免疫学的・炎症学的状況で、血中や組織中の神経ペプチドの量が上昇することが知られ、その役割や意義について研究が進められているが、まだその詳細な機構については不明な点が多い。カルシトニン遺伝子関連ペプチド（calcitonin gene-related peptide : CGRP）は、強力な血管平滑筋弛緩作用や、痛覚の伝達物質として働くことが知られている神経ペプチドではあるが、一方マイトジェン刺激T細胞やマクロファージ、さらにはB細胞の機能を抑制することが知られており、神経系から免疫系に働く神経ペプチドの一種と考えられる。

本研究は、CGRP含有神経が皮膚に存在すること、皮膚に存在する樹状細胞であるランゲルハンス細胞がCGRP受容体を発現していることから、CGRPの皮膚炎症に対する関与を予想し、マウス接触過敏症反応モデルを用いて、CGRPの皮膚炎症における作用と、その作用メカニズムの解析を進め、以下の知見を得た。

1. T細胞活性化時のサイトカイン産生に与える影響を調べた結果、CGRPはIL-4産生を顕著に増強し、免疫系にTh2優位な状況をもたらすことを明らかにした。
2. CGRPは接触過敏症反応を抑制すること、またCGRP受容体遺伝子欠損マウスを用いて、皮膚での生理的なCGRP産生低下は接触過敏症反応を増強させることを見出した。
3. ハプテン塗布によって誘導される皮膚由来樹状細胞の機能に対するCGRPの作用を解析し、CGRPはランゲルハンス細胞の遊走を抑制することで接触過敏症反応を抑制することを明らかにした。

以上本研究は、CGRPの免疫学的作用機構を解析することで、神経系と免疫系の相互作用の一端を細胞レベルで明らかにした重要な研究であり、薬学博士の学位を授与するにふさわしいものとする。