

Title	カルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）による免疫応答制御機構の解析
Author(s)	吉川, 倫太郎
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/57950
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

【18】

氏名	よし かわ りん たろう 吉 川 倫 太 郎
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 2 3 7 6 1 号
学位授与年月日	平成 22 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	カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)による免疫応答制御機構の解析
論文審査委員	(主査) 教授 山元 弘 (副査) 教授 平田 収正 教授 八木 清仁 教授 松田 敏夫

論文内容の要旨

神経系と免疫系は独立した統御系ではなく、共通のリガンドや受容体を介してコミュニケーションネットワークを形成していることが実証されてきている。よってこれらのネットワークが破綻すると、神経疾患や免疫疾患の発症や病態の増悪を引き起こすと考えられる。したがって、神経系と免疫系のコミュニケーションメカニズムを解明することは、生体がいかにして恒常性を維持しているかを理解するためだけでなく、神経系と免疫系が関与する疾患に対する新たな治療戦略を構築するためにも非常に重要である。神経系による免疫系の制御に関しては、現在までに多くの神経伝達物質による免疫機能制御に関する報告がなされている。知覚神経終末から放出される神経ペプチドcalcitonin gene-related peptide (CGRP) も、そのひとつである。CGRPは主に痛覚伝達に機能するとともに強力な血管平滑筋弛緩作用を有する知覚神経ペプチドである。

一方、神経系以外にリンパ器官や皮膚にもCGRP含有神経が存在することから、炎症・免疫系に対する機能が注目されている。

本研究では、CGRP特異的受容体サブユニットであるreceptor activity-modifying protein 1 (RAMP1) 欠損マウスを用いて、CGRPの炎症・免疫制御機能について解析した。免疫応答には、先天的に備わっている自然免疫と、抗原記憶をもとに後天的に確立される獲得免疫が存在する。そこで、自然免疫系に対するCGRPの機能について、種々のToll様受容体 (Toll-like receptor : TLR) アゴニストを用いて解析し、獲得免疫系に対するCGRPの機能については、IV型アレルギーに分類される遅延型過敏反応 (delayed-type hypersensitivity : DTH) モデルを用いて解析した。

細菌の生体内への侵入に起因する敗血症において、多くの組織でCGRPが発現上昇することが知られている。そこでグラム陰性菌細胞壁外膜構成成分であるリポ多糖 (LPS) を腹腔内投与したところ、野生型 (WT) マウスと比べて、RAMP1 欠損マウスにおいて有意な血中CGRPレベルの上昇や炎症性サイトカインレベルの低下抑制が認められた。この結果は、CGRPが*in vivo*でLPSによる炎症性サイトカイン産生を制御していることを示唆するものと考えられた。そこで、CGRPによる炎症性サイトカイン産生制御についてより詳細に解析するため、TLRを発現する重要な免疫担当細胞の1つである樹状細胞を骨髓細胞から分化させて (BMDC) 検討に用いた。その結果、LPS刺激BMDCによって産生されるIL-12, TNF- α がCGRP添加によって抑制され、その抑制は転写段階で行われていることが明らかとなった。また、他のTLRのアゴニストを用いたBMDC刺激においても、CGRP添加群では、アゴニスト単独刺激群と比べてIL-12, TNF- α の産生が有意に抑制され、その抑制作用はcAMP/PKA経路の活性化を介していることも明らかとした。次に、WTマウスおよびRAMP1欠損マウス由来BMDCのCGRPに対する応答性を比較した。WTマウス由来BMDCではLPS刺激によって産生されるIL-12, TNF- α が α CGRPによって有意に抑制されたが、RAMP1欠損マウス由来BMDCでは α CGRPによる抑制効果は見られなかった。また、IL-12, TNF- α の産生量を比較すると、RAMP1欠損マウス由来BMDCのほうがWTマウス由来BMDCより有意に高いことがわかった。この結果から、BMDC自身がCGRPを産生し、IL-12とTNF- α の産生を抑制したのではないかと推測された。そこで、BMDCにおけるCGRPの発現をmRNAレベル、ペプチドレベルで解析した結果、BMDCにおいては β CGRPのみが発現されており、LPS刺激によりそれが直ちに放出され、24時間後までに再び蓄えられることが明らかとなった。さらに、CGRPアゴニストであるhCGRP₈₋₃₇を用いた解析からも、 β CGRPはautocrine作用により、BMDCのIL-12, TNF- α 産生を制御していることが分かった。

次に、獲得免疫におけるCGRPの機能を調べるため、卵白アルブミン (OVA) 誘発DTH応答性をWTマウスとRAMP1欠損マウスで比較した。その結果、RAMP1欠損マウスではWTマウスと比較して、顕著な足腫浮腫の促進が認められた。また、RAMP1欠損マウスではWTマウスと比べて、血清中のOVA特異的IgG1のレベルは低かったが、IgG2aのレベルは高値を示した。したがって、RAMP1欠損マウスにおけるDTHの悪化は、ヘルパーT (Th) 1応答が亢進したことが一因であると推測できた。次に、RAMP1欠損マウスのDTH促進作用機構について、細胞レベルでより詳細に解析した。まず、WTマウスまたはRAMP1欠損マウス由来BMDCとOVA特異的T細胞受容体トランスジェニック (DO11.10 Tg) マウス由来ナイーブTh細胞を共培養したところ、培養上清中のIL-12, IFN- γ 量はRAMP1欠損マウス由来BMDCを用いた共培養系のほうが高かった。よって、BMDC由来 β CGRPのautocrine作用によるIL-12の産生抑制がTh細胞のTh1型への分化を制御していると考えられた。次にBALB/cマウス由来BMDCとWT-DO11.10Tg またはRAMP1 KO-DO11.10Tg由来ナイーブTh細胞を共培養したところ、培養上清中のIL-12量は差は認められなかったが、IFN- γ 量は、RAMP1 KO-DO11.10Tg由来ナイーブTh細胞共培養系のほうが高かった。この結果は、BMDC由来 β CGRPがparacrine作用によりTh細胞分化を制御しているためであると考えられた。最後に、*In vivo*におけるBMDC由来 β CGRPのautocrine作用解析として、BMDC移入OVA誘発遅延型過敏反応モデルを用いた。その結果、RAMP1欠損マウス由来BMDC移入マウスでは、WTマウス由来BMDC移入マウスに比べ顕著な足の腫れが認められ、さらに、血清中OVA特異的IgG2aレベルが高いことが分かった。よって、樹状細胞由来 β CGRPがautocrine作用によりTh細胞のTh1型への分化を抑制し、DTHを抑制したと考えられた。

本研究において、知覚神経由来CGRPならびに樹状細胞由来 β CGRPが巧妙なコミュニケーションネットワークにより免疫系制御に重要な役割を演じていることを明らかにした。今後、RAMP1欠損マウス、 α CGRP欠損マウス、 β CGRP欠損マウスを用いた*in vitro*, *in vivo*解析により、CGRPによる免疫系のホメオスタシス維持に関してより詳細な知見が得られると確信している。そして将来、CGRPの研究成果が免疫疾患の発症機構解明や治療薬開発へ展開できることを期待する。

論文審査の結果の要旨

神経系と免疫系のコミュニケーションネットワークの要因としての神経ペプチド calcitonin gene-related peptide (CGRP) の免疫系での役割を検討した。CGRP は主に痛覚伝達に機能するとともに強力な血管平滑筋弛緩作用を有する知覚神経ペプチドである。一方神経系以外にリンパ器官や皮膚にも CGRP 含有神経が存在することから、炎症・免疫系に対する機能が予想される。本研究では、CGRP 特異的受容体サブユニットである receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1) 欠損マウスを用いて、CGRP の炎症・免疫制御機能について解析した。

まずリポ多糖 (LPS) を腹腔内投与したところ、野生型 (WT) マウスと比べて、RAMP1 欠損マウスにおいて有意な血中 CGRP レベルの上昇や炎症性サイトカインレベルの低下抑制が認められた。この結果は CGRP が *in vivo* で LPS による炎症性サイトカイン産生を制御していることを示唆する。CGRP による炎症性サイトカイン産生制御について詳細に解析するため、骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を用いた。LPS 刺激 BMDC によって産生される IL-12、TNF- α は CGRP 添加によって抑制され、その抑制は転写段階で行われていることを明らかにした。

次に WT マウスおよび RAMP1 欠損マウス由来 BMDC の CGRP に対する応答性を比較した。WT マウス由来 BMDC では LPS 刺激によって産生される IL-12 や TNF- α が α CGRP によって有意に抑制されたが、RAMP1 欠損マウス由来 BMDC では抑制効果は見られなかった。また IL-12、TNF- α の産生量を比較すると、RAMP1 欠損マウス由来 BMDC のほうが有意に高いこともわかった。この結果から、BMDC 自身が CGRP を産生し、IL-12 と TNF- α の産生を抑制したのではないかと推測した。そこで BMDC での CGRP の発現を mRNA レベル、ペプチドレベルで解析したところ、BMDC は β CGRP のみを産生し、LPS 刺激によりそれが直ちに放出され、24時間後までに再び蓄えられることが明らかとなった。さらに CGRP アンタゴニストである hCGRP₈₋₃₇ を用いた解析でも、 β CGRP は autocrine 作用により BMDC の IL-12、TNF- α 産生を抑制していることがわかった。

次に獲得免疫における CGRP の機能を調べるため、卵白アルブミン誘発遅延型過敏反応 (DTH) を調べたところ、RAMP1 欠損マウスで顕著な DTH の増強が認められた。また BMDC 由来 β CGRP の autocrine 作用による IL-12 の産生抑制が Th細胞の Th1型への分化を制御していること、BMDC 由来 β CGRP が paracrine 作用により Th細胞分化を制御していることを示した。さらに *in vivo* における BMDC 由来 β CGRP の autocrine 作用を解析し、RAMP1 欠損マウス由来 BMDC 移入マウスで DTH が増強された。これらのことは、樹状細胞由来 β CGRP が autocrine 作用により Th細胞の Th1型への分化を抑制し、DTH を抑制したと考えられた。

以上、知覚神経由来 CGRP ならびに樹状細胞由来 β CGRP が巧みなコミュニケーションネットワークにより免疫系制御に重要な役割を演じていることを明らかにした。よって本研究は、大阪大学博士学位 (薬学) に値するものと判断した。