

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07938

研究課題名(和文) 神経系による炎症・免疫・組織修復反応の新しい制御機構

研究課題名(英文) Regulation of inflammation, immunity, and tissue repairing by nervous system.

研究代表者

柳川 芳毅 (Yanagawa, Yoshiki)

北海道医療大学・薬学部・准教授

研究者番号：20322852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、ストレス-神経系による炎症・免疫・組織修復反応の新しい制御機構について検討した。その結果、マクロファージにおけるTGF- $\beta$ の発現が、アドレナリンによってアイソフォーム選択的に誘導されることを見出した。また、マクロファージにアドレナリンとデキサメタゾンと同時に処理すると、共刺激分子であるCD86の発現が上昇し、免疫チェックポイント分子であるPD-L1の発現が低下することを見出した。こういったストレス関連物質による制御機構は、ストレス関連性疾患の病態に関係している可能性があり、さらに詳細なメカニズムを解析することは、ストレスと疾患との関係を明らかにする新たな手がかりになると考える。

研究成果の概要(英文)：Stress events activate the sympathetic nervous system and result in the secretion of catecholamines including adrenaline. In the present study, we examined the influence of the stress-related mediators such as adrenaline and glucocorticoids in inflammation, immunity, and tissue repairing. TGF- $\beta$  is a multifunctional cytokine responsible for not only immune regulations but also tissue repairing. We found that treatment with adrenaline markedly increased the mRNA expression of TGF- $\beta$ 3 but not TGF- $\beta$ 1 and - $\beta$ 2 in macrophages. In addition, we found that simultaneous treatment with adrenaline and dexamethasone increases cell surface expression of the costimulatory molecule CD86, while decreasing that of the immune checkpoint protein PD-L1 in RAW264.7 macrophages. Further elucidation of the complex pathways regulated by stress-related mediators may lead to the development of a new therapeutic strategies focused on pathogenic immune-response and tissue repair in stress-related disorders.

研究分野：生物系薬学

キーワード：ストレス アドレナリン 糖質コルチコイド マクロファージ TGF- $\beta$  組織修復

1. 研究開始当初の背景

現代社会におけるストレスが様々な疾患に関係していると考えられている。ストレスと疾患との関係を分子レベルで解明し、それにもとづく治療法を確立することは、ストレス社会と言われる現代において、早急に取り組むべき課題であると言える。

組織が損傷を受けると、炎症・免疫・組織修復反応が起こり、通常であれば治癒に至るが、この一連の反応に異常が起これば、様々な疾患の要因になると考えられる。一方、ストレスが組織修復過程に少なからず影響を与えていると考えられるが、その詳細な分子機構は不明なままである。

研究開始当初、申請者らは、ストレス-神経系による炎症・免疫・組織修復反応の新しい制御機構を示唆する発見をし、その現象に着目した研究は、新たな疾患制御法の確立につながると考えられた。

2. 研究の目的

生体がストレスを受けると交感神経・副腎髄質系からアドレナリンなどのカテコラミンが分泌され、その一方で、視床下部・下垂体・副腎皮質系から糖質コルチコイドが分泌される。これらのストレス関連物質は、生体にとって必要な様々な生理応答を誘導するが、過剰な分泌は免疫系の変様とそれに基づく様々な疾患につながると考えられる。しかしながら、その詳細な分子メカニズムについては不明な点が多い。

マクロファージは、炎症・免疫反応の調節のみならず、組織修復反応において重要な役割を果たしている。本研究では、マクロファージの機能に対するアドレナリンや糖質コルチコイドなどのストレス関連物質の影響に着目した研究を行い、神経系による炎症・免疫・組織修復反応の新しい制御機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

マウスマクロファージ細胞株 (RAW264.7) は ATCC より入手した後、5% FCS RPMI 1640 で培養し実験に用いた。

マウス骨髄由来マクロファージは、常法にしたがって、C57BL/6 マウス骨髄細胞を L929 細胞培養上清を含む培地で 7 日間培養することによって調製した。

(2) mRNA およびタンパクレベルの測定

各細胞における mRNA レベルはリアルタイム PCR 法により測定した。細胞培養液中のサイトカインは ELISA 法によって定量した。

(3) 細胞表面抗原の測定

細胞表面における CD86 および PD-L1 の発現量測定に際しては、各分子に対する蛍光標識抗体で細胞を処理した後、細胞の蛍光強度をフローサイトメトリーにより解析した。

4. 研究成果

(1) マクロファージにおけるアドレナリンによる Transforming growth factor (TGF)-アイソフォーム選択的発現調節

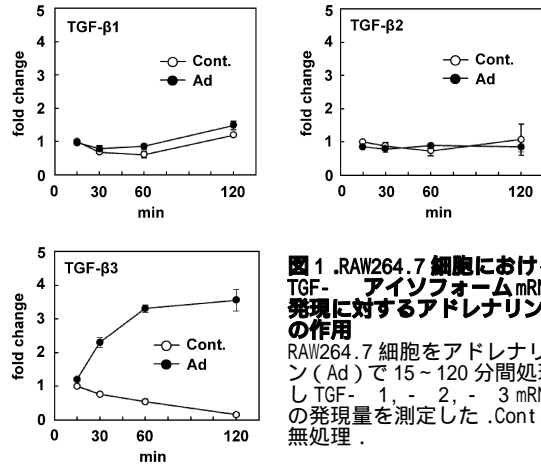


図1. RAW264.7 細胞における TGF-アイソフォーム mRNA 発現に対するアドレナリンの作用  
RAW264.7 細胞をアドレナリン (Ad) で 15 ~ 120 分間処理し TGF- 1, - 2, - 3 mRNA の発現量を測定した。Cont., 無処理。

TGF- は、免疫反応の調節のみならず、組織修復に関与している。哺乳類においては、TGF- 1, - 2, and - 3 の 3 種類のアイソホームが存在する。そこで、RAW264.7 マクロファージをアドレナリンで 15 ~ 120 分間処理し、TGF- 1, - 2, - 3 mRNA の発現量をリアルタイム PCR 法により測定した (図 1)

TGF- 1, - 2 mRNA の発現量は、すべての処理時間において、アドレナリンの影響を受けなかった。一方、TGF- 3 mRNA の発現量は、処理後 30 分からアドレナリンによって著しく上昇した。すなわち、アドレナリンは TGF- 3 mRNA の発現量をアイソホーム選択的に上昇させると考えられた。

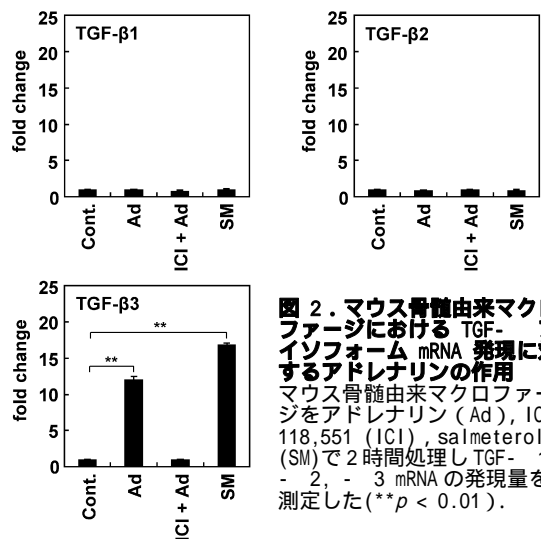


図2. マウス骨髄由来マクロファージにおける TGF-アイソフォーム mRNA 発現に対するアドレナリンの作用  
マウス骨髄由来マクロファージをアドレナリン (Ad), ICI 118,551 (ICI), salmeterol (SM) で 2 時間処理し TGF- 1, - 2, - 3 mRNA の発現量を測定した (\*\*p < 0.01)。

次に、マウス骨髄由来マクロファージをアドレナリン、ICI 118,551 (アドレナリン<sub>2</sub> 受容体選択的アンタゴニスト)、salmeterol (アドレナリン<sub>2</sub> 受容体選択的アゴニスト) で 2 時間処理し TGF- 1, - 2, - 3 mRNA の発現量を測定した (図 2)。

TGF- $\beta$  1, -2 mRNA の発現量は、いずれの処理においても影響を受けなかった。一方、TGF- $\beta$  3 mRNA の発現量は、アドレナリンの処理によって著しく上昇した。この上昇は、アドレナリン $\beta_2$  受容体選択的アンタゴニストである ICI 118,551 の処理により完全に抑制された。一方、アドレナリン $\beta_2$  受容体選択的アゴニストである salmeterol は、アドレナリンと同様に、TGF- $\beta$  3 mRNA の発現量を著しく上昇させた。したがって、アドレナリンは、 $\beta_2$  受容体を介して TGF- $\beta$  3 mRNA の発現を上昇させると考えられた。

(2) RAW264.7 マクロファージにおける interleukin (IL)-33 発現のアドレナリンによる増強。

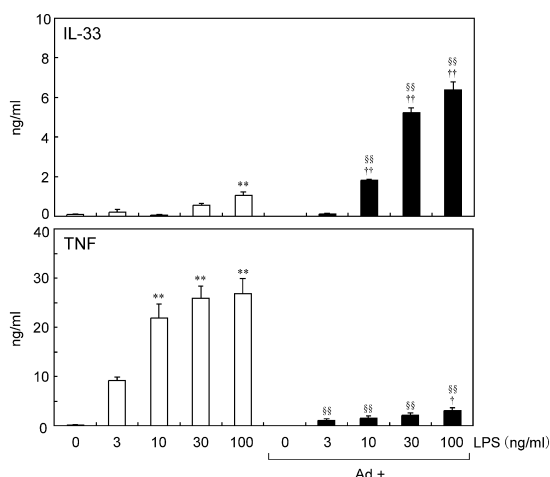


図3. RAW264.7 細胞における IL-33 発現に対するアドレナリンの作用

RAW264.7 細胞をアドレナリン (Ad; 1  $\mu$ M) 存在下または非存在下、リポポリサッカライド (LPS; 3~100 ng/ml) で 8 時間処理し、IL-33 および TNF- $\alpha$  の産生量を ELISA 法により測定した (\*\* $p$  < 0.01 vs. medium alone; † $p$  < 0.01, † $p$  < 0.05 vs. Ad alone; § $p$  < 0.01 vs. Ad + at each dose of LPS)。

我々はすでに、樹状細胞におけるリポポリサッカライド (LPS) による IL-33 産生誘導が、アドレナリンの処理によって増強されることを報告している (BBI, 2011)。しかしながら、低用量の LPS 刺激におけるアドレナリンの作用については不明であった。本研究では、RAW264.7 マクロファージを低用量~高用量 (3~100 ng/ml) の LPS で刺激した場合、アドレナリンがどのような影響を示すかについて検討した (図3)。

代表的な炎症性サイトカインである TNF の産生は、10 ng/ml の LPS 刺激によって著しく上昇した。一方、IL-33 の産生は低用量の LPS 刺激 (30 ng/ml 以下) では有意な変化が認められず、100 ng/ml の LPS 刺激によって有意に上昇した。

これに対しアドレナリン存在下においては、低用量 (10 ng/ml) の LPS 刺激によって IL-33 の有意な産生上昇が認められ、高用量の LPS 刺激では、アドレナリン非存在下における同用量の LPS 刺激と比較して、著しく高

い IL-33 の産生が認められた。

したがって、アドレナリンは IL-33 産生においてマクロファージの LPS に対する感受性を高め、IL-33 産生を増強すると考えられた。

(3) RAW264.7 マクロファージにおける CD86 および PD-L1 発現に対するストレス関連物質の影響。

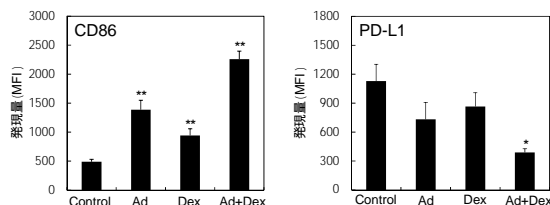


図4. RAW264.7 細胞における CD86 および PD-L1 発現に対するストレス関連物質の影響

RAW264.7 細胞をアドレナリン (Ad; 1  $\mu$ M)、デキサメタゾン (Dex; 1  $\mu$ M) または両者で 48 時間処理し、CD86 および PD-L1 の発現量 (平均蛍光強度; MFI) をフローサイトメトリーにより解析した (\* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 vs control)。

CD86 は代表的な共刺激分子であり、抗原提示の際、T 細胞に活性化シグナルを導入する。一方、PD-L1 は免疫チェックポイント分子の 1 つであり、抗原提示の際、T 細胞に抑制性のシグナルを導入する。そこで、RAW264.7 マクロファージ細胞表面におけるこれらの分子の発現量に対するアドレナリンおよびデキサメタゾン (合成糖質コルチコイド) の影響について検討した。

RAW264.7 マクロファージをアドレナリン、デキサメタゾンまたは両者で 48 時間処理し、CD86 および PD-L1 の発現量をフローサイトメトリーにより解析した (図4)。

CD86 の発現量はアドレナリンまたはデキサメタゾンの処理により有意に上昇し、両者の処理によってさらに上昇した。これとは逆に、PD-L1 の発現量は、アドレナリンまたはデキサメタゾンの処理により減少傾向を示し、両者の処理によって有意に低下した。

したがってこれらのストレス関連物質は協調して CD86 を上昇させ PD-L1 を低下させると考えられた。

またデータは示さないが、この現象のメカニズムについて検討した結果、PD-L1 の発現にはオートクリンに発現する TNF が関与しており、アドレナリンとデキサメタゾンは TNF の産生を抑制することにより PD-L1 の発現を低下させると考えられた。一方、これらのストレス関連物質による CD86 の発現上昇には TNF が関与しておらず、アドレナリン単独による CD86 の発現上昇については  $\beta_2$  受容体を介した細胞内 cAMP の上昇が関与していると考えられた。

(4) まとめ

本研究課題では、炎症・免疫・組織修復において重要な役割を果たしているマクロファージの機能に対するストレス関連物質の

影響に着目した研究を行った。

プロジェクトの前半においては、TGF- $\beta$  の発現に対するアドレナリンの作用について解析した。哺乳類において、TGF- $\beta$  には TGF- $\beta$  1, - 2, - 3 の3種類のアイソフォームが存在するが、それぞれのアイソフォームに選択的な発現調節機構についてはほとんど知られていない。

TGF- $\beta$  1, - 2, - 3 は、類似した構造と機能を有するが、それぞれ異なった機能も有すると考えられている。TGF- $\beta$  3 は、創傷治癒の過程において表皮細胞や真皮細胞の移動を調節していることが報告されており、組織の修復に関与していると考えられている。

近年、自己免疫性の炎症性疾患には病原性の Th17 細胞が関与していると考えられている。一方、Th17 細胞が病原性を獲得するためには TGF- $\beta$  3 による刺激が重要であることが報告されている (Nat Immunol 2012)。

本研究では、アドレナリンがマクロファージにおいて TGF- $\beta$  3 の発現をアイソフォーム選択的に上昇させることを見出した。また、この現象はノルアドレナリン処理によっても確認された (データは示さない)。したがって、ストレス-交感神経によるカテコラミンの分泌が、組織修復や病原性 Th17 細胞の誘導に関係している可能性がある。

さらに、マクロファージの IL-33 産生誘導における LPS に対する感受性が、アドレナリンによって上昇することを見出した。この現象は、感染症や腸内フローラの異常によって生体内に LPS などの菌体成分が存在する場合、ストレスによって IL-33 の産生が増強される可能性があることを示唆する。IL-33 はアレルギー疾患や自己免疫疾患の増悪因子として報告されていることから、この知見はストレスと疾患との関係を明らかにする手がかりとなるかもしれない。

また、マクロファージにストレス関連物質であるアドレナリンと糖質コルチコイドを同時処理した場合、共刺激分子 (CD86) の発現が上昇し、免疫チェックポイント分子 (PD-L1) の発現が低下することを見出した。このことは、ストレス下においてマクロファージが T 細胞を活性化しやすい状態になることを示唆しており、ストレスによる免疫疾患の増悪と関係しているのかもしれない。

以上、本研究によって得られた知見は、ストレス-神経系によって炎症・免疫・組織修復反応が制御されていることを示唆し、今後のさらなる展開が期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Hiraide S, Yanagawa Y, Iizuka K.  
Tranilast inhibits interleukin-33 production by macrophages. Eur. J.

Pharmacol. 818:235-240, 2018. doi:  
10.1016/j.ejphar.2017.10.057. 査読有  
Sato S, Yanagawa Y, Hiraide S, Iizuka K. Cyclic AMP signaling enhances lipopolysaccharide sensitivity and interleukin-33 production in RAW264.7 macrophages. Microbiol. Immunol. 60:382-389, 2016. doi:  
10.1111/1348-0421.12381. 査読有  
Yanagawa Y, Hiraide S, Iizuka K. Isoform-specific regulation of transforming growth factor- $\beta$  mRNA expression in macrophages in response to adrenoceptor stimulation. Microbiol. Immunol. 60:56-63, 2016. doi: 10.1111/1348-0421.12344. 査読有

[学会発表](計12件)

Yanagawa Y, Sato S, Hiraide S, Iizuka K. The role of cAMP signaling in the regulation of interleukin-33 production by RAW264.7 macrophages in response to various doses of lipopolysaccharide. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (2018).

柳川芳毅, 佐藤静香, 平出幸子, 飯塚健治. RAW264.7 マクロファージにおける cAMP シグナルによる IL-33 の産生増強. 第90回日本薬理学会年会(2017).

平出幸子, 柳川芳毅, 飯塚健治. ケミカルメディエーター遊離抑制薬トラニラストによる IL-33 産生抑制作用. 第90回日本薬理学会年会(2017).

柳川芳毅, 平出幸子, 飯塚健治. マクロファージにおける TGF- $\beta$  アイソフォーム選択的発現調節. 第89回日本薬理学会年会(2016).

[その他]

ホームページ等

<http://www.hoku-iryo-u.ac.jp/~byoutai/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柳川 芳毅 (YANAGAWA Yoshiki)  
北海道医療大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 20322852

### (2) 研究分担者

平出 幸子 (HIRAIDE Sachiko)  
北海道医療大学・薬学部・助教  
研究者番号: 50709277

### (3) 研究分担者

飯塚 健治 (IIZUKA Kenji)  
北海道医療大学・薬学部・教授  
研究者番号: 10344467