

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590062

研究課題名（和文） 感覚神経伝達物質 CGRP による生体防御系制御機構の解明

研究課題名（英文） Investigation of host defense mechanisms by sensory nerve transmitter CGRP

研究代表者

辻川 和文 (TSUJIKAWA KAZUTAKE)

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号：10207376

研究成果の概要（和文）：

カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は、cAMP/PKA 経路の活性化、GSK-3 β の不活性化による NFATc2 の核内移行促進により Th1 細胞分化を抑制し、Th2 細胞、Th9 細胞、Th17 細胞分化を促進した。また CGRP 受容体欠損マウスでは気道炎症や EAE の減弱が認められた。さらに新生仔期の化学物質暴露は CGRP の産生・放出量の増加により気道炎症や皮膚炎症を悪化させた。

研究成果の概要（英文）：

Calcitonin gene-related peptide (CGRP) suppressed Th1 differentiation and induced Th2, Th9, and Th17 differentiation via activation of the cAMP/protein kinase A pathway and inactivation of GSK-3 β leading to nuclear localization of NFATc2. In CGRP receptor-deficient mice, airway inflammation and experimental autoimmune encephalomyelitis were suppressed. Moreover, we found that airway and skin inflammation were promoted by increased production and release of CGRP from mice exposed by chemicals in neonatal.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：CGRP, Th 細胞, 神経系, 環境因子, 化学物質

1. 研究開始当初の背景

免疫担当細胞の機能研究では、多くの研究

成果が蓄積されてきた。しかし、免疫系は独立した統御系として機能しているわけでは

なく、神経系による制御を受けており、その制御バランスの崩壊が免疫疾患の発症・悪化につながると考えられるようになった。その証拠として末梢神経の解剖学的所見から、免疫器官には交感神経終末が分布しており、リンパ球とシナプス様構造を介して接していることが示された。またマクロファージやリンパ球にはアドレナリン受容体が発現し、カテコールアミンはこれらの受容体を介して免疫細胞の機能を制御することも報告された。これらの知見は、個体における免疫制御機構の解明研究では免疫担当細胞の機能解析とともに、神経伝達物質による免疫担当細胞の機能制御解析も含めた総合的な研究が必要不可欠であることを示すものである。そこで皮膚や腸管上皮といった生体防御の最前線にある組織に投射し、熱や炎症性刺激により活性化されることが知られている感覚神経系に着目した。感覚神経は、神経伝達物質としてカルシトニン遺伝子関連ペプチド CGRP を分泌する。また CGRP は、ヘルパー T (Th) 細胞のサイトカイン産生をアレルギー型の Th2 へ偏倚させることを突き止めている。そこで個体レベルで CGRP の免疫系に対する機能を検討するため、CGRP 受容体の特異的サブユニットである RAMP1 (receptor activity-modifying protein 1) の欠損マウスを作成して解析した。その結果、このマウスでは免疫系が Th1 型へ偏倚していることを突き止めた。さらに CGRP 受容体が抗原提示細胞である抗原提示細胞にも発現し、CGRP の 2 つのアイソフォーム (α CGRP, β CGRP) はその受容体を介して樹状細胞機能を制御することも発見した。以上の *in vitro*, *in vivo* の知見は、CGRP が重要な生体防御系制御作用を発現することを示すものである。

2. 研究の目的

免疫細胞や皮膚、腸管粘膜上皮細胞は、病原性細菌やウイルスに対する生体防御系を構築している。一方、その生体防御系は神経系によって巧妙に制御されており、その制御バランスの破綻が免疫疾患の発症に繋がると考えられてきた。申請者は、CGRP がこの制御バランスの維持調節に必須の役割を果たしているとして仮説を立てた。本研究では、CGRP と CGRP 受容体の遺伝子改変動物を駆使し、CGRP を介した感覚神経による生体防御系の制御機構解明に着手し、アレルギー疾患、自己免疫疾患の発症機序解明に革新的展開をもたらすことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Th 細胞, Th17 細胞の分化, 機能に対する CGRP の作用解析
樹状細胞はマウス骨髄細胞を非接着性プレ

ートを用いて顆粒球マクロファージコロニー刺激因子存在下培養し、分化誘導させる。一方、マウス脾臓細胞から磁気ビーズを用いて CD4+CD62L+ ナイーブ T 細胞を精製し、上記樹状細胞との共培養系により Th1/Th2 細胞を、Transforming growth factor beta (TGF- β) 刺激により Treg 細胞を、TGF- β /IL-6 刺激により Th17 細胞へと分化誘導させる。これらの細胞分化において遺伝子欠損マウス細胞を用いた解析や、 α CGRP や β CGRP の作用を評価する。具体的には Th17 細胞や Treg 細胞では、それぞれ主要転写因子である ROR γ t や Foxp3 の発現を real-time PCR で、IL-17, IL-22, IL-23 等のサイトカインレベルや、Th 細胞の分化による発現サイトカイン特性を酵素標識免疫吸着法 (ELISA) で測定する。またそれぞれの細胞から抽出した RNA を用いて、real-time PCR array 解析により活性化シグナル伝達機序を解明する。

(2) 胎児, 新生児期の感覚神経刺激による過形成解析

野生型マウスや各ノックアウトマウスの新生児マウスにカプサイシンや LPS を腹腔内投与、TNFB (1%アセトン溶液) を腹部や耳介皮膚に経目的に塗布する。産児マウスを含む各投与マウスが 8 週令になった時点で、肺、腸管、耳介、腹部皮膚の凍結切片を作成する。それら標本を用いて抗 CGRP 抗体による免疫組織染色を行う。また臓器、組織レベルでの CGRP ならびに CGRP 受容体の mRNA, 蛋白質発現を定量化する。

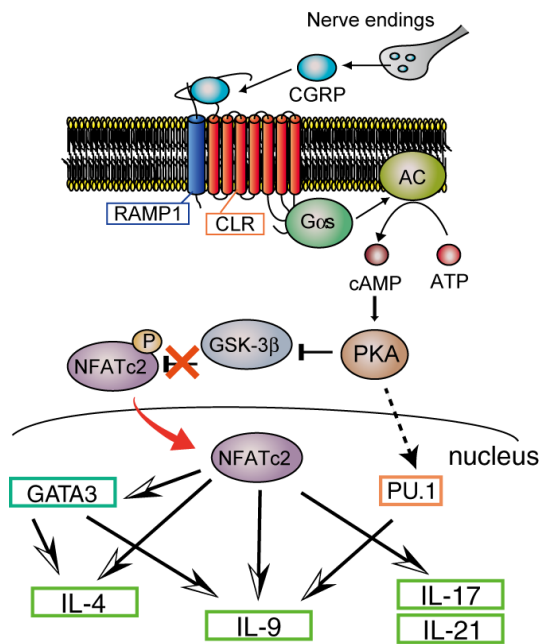
(3) RAMP1 コンディショナルノックアウト, α CGRP や β CGRP 欠損マウスを用いた, アレルギー, 自己免疫疾患モデルを用いた個体レベルでの解析

食物アレルギーモデルは、卵白アルブミン (OVA) と水酸化アルミニウムゲルとの懸濁液を 2 回腹腔内に免疫し、その 2 週間後 OVA を 2 日ごとに計 4 回経口投与して作製する。下痢の誘発や、血中 IL-9, OVA 特異的 IgE とともに腸管リンパ節や脾臓から精製した CD4+T 細胞が産生するサイトカインを ELISA で測定する。接触性皮膚炎はマウス腹部に TNFB を塗布して感作し、その 2 週間後に耳介に塗布することにより浮腫を誘発する。遅延型過敏症では、マウスの尻尾付根に、完全フロイントアジュバントとともに OVA を皮下注射し、7 日後に足踵へ OVA を皮下注射することにより誘発する。これら IV 型アレルギーモデルでは、経時的に浮腫の測定を行うとともに血中特異的抗体の定量化や樹状細胞, Th 細胞の活性化を評価する。自己免疫性脳脊髄炎モデルは、ミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白質ペプチド (MOG35-55) を百日咳菌ワクチンとともに免疫して誘発し、臨床的症状

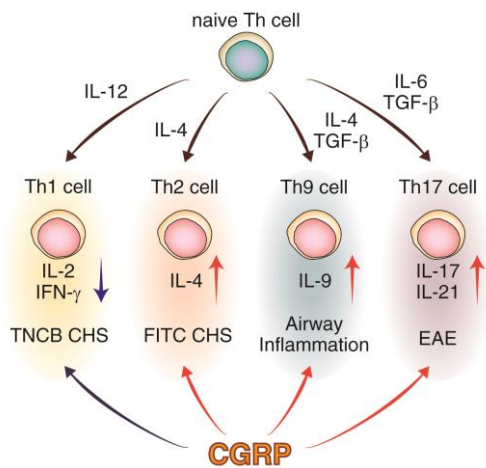
と組織病理学的変化, 炎症性サイトカインを定量する. さらに化学物質刺激による感覚神経増幅マウスを使用し, CGRP 分泌増加と病態との関連性評価を進める.

4. 研究成果

(1) CGRP の in vitro における Th 細胞分化機序を解析した結果, 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.

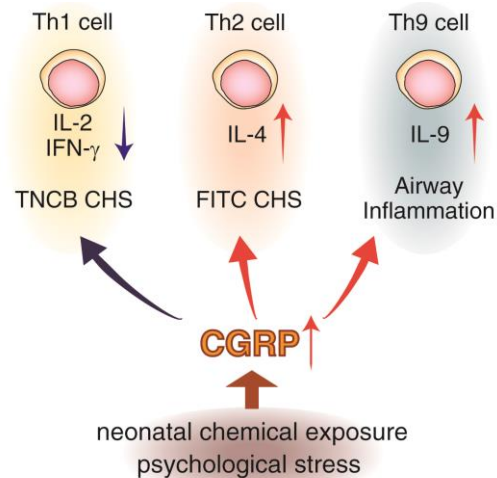


(2) CGRP 受容体である RAMP1 欠損マウスを用いて, CGRP が Th1 型皮膚炎症である TNCB-CHS を抑制し, Th2 型皮膚炎症である FITC-CHS を悪化させることを見出した. さらに CGRP が IL-17 産生促進作用によって EAE を, IL-9 産生促進作用によって気道炎症を悪化させることも示した. IL-17 は EAE における脊髄へ



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, 炎症病態と関連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

(3) 化学物質による知覚神経伸長が引き起こす 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



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① The Regulatory Mechanisms of Calcitonin Gene-related Peptide (CGRP) in Skin Inflammation. Mikami N, Fukada S, Yamamoto H, TsujiKawa K. Yakugaku Zasshi. 132(11):1211-5 (2012). 査読有. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23123709>.
- ② Neuronal Derivative Mediators that Regulate Cutaneous Inflammations, Mikami N, Fukada S, TsujiKawa K, Critical Rev. Immunol. 32(4):307-20 (2012). 査読有. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23237507>.
- ③ Calcitonin gene-related peptide enhances experimental autoimmune encephalomyelitis by promoting Th17 cell functions. Mikami N, Watanabe K,

Hashimoto N, Miyagi Y, Sueda K, Fukada SI, Yamamoto H, Tsujikawa K. Int Immunol. 24(11):681-91 (2012). 査読有. doi: 10.1093/intimm/dxs075.

- ④ Deficiency of the CGRP receptor component RAMP1 attenuates immunosuppression during the early phase of septic peritonitis. Jusek G, Reim D, Tsujikawa K, Holzmann B. Immunobiology. 217(8):761-7 (2012). 査読有. doi: 10.1016/j.imbio.2012.04.009.
- ⑤ Neuropeptide deficient mice have attenuated nociceptive, vascular, and inflammatory changes in a tibia fracture model of complex regional pain syndrome. Guo TZ, Wei T, Shi X, Li WW, Hou S, Wang L, Tsujikawa K, Rice KC, Cheng K, Clark DJ, Kingery WS. Mol Pain. 2012;28:8:85-99 (2012). 査読有. doi: 10.1186/1744-8069-8-85.
- ⑥ 皮膚炎と神経ペプチド CGRP. 三上統久, 辻川和丈. 臨床免疫・アレルギー科, 57, 450-456 (2012). 査読無
- ⑦ Suppression of ovalbumin-induced allergic diarrhea by diminished intestinal peristalsis in RAMP1-deficient mice. Yoshikawa R, Mikami N, Otani I, Kishimoto T, Nishioka S, Hashimoto N, Miyagi Y, Takuma Y, Sueda K, Fukada S, Yamamoto H, Tsujikawa K. Biochem Biophys Res Commun., 410, 389-393 (2011). 査読有. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.05.141.
- ⑧ Calcitonin Gene-Related Peptide is an Important Regulator of Cutaneous Immunity: Effect on Dendritic Cell and T Cell Functions. 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. J. Immunol., 186, 6886-93 (2011). 査読有. doi: 10.4049/jimmunol.1100028.
- ⑨ 神経ペプチド CGRP による皮膚過敏症の増強. 三上統久, 辻川和丈. 臨床免疫・アレルギー科, 56, 736-741 (2011). 査読無

[学会発表] (計 14 件)

- ① 日本薬学会 第 133 年会. 村上聡、吉村

一樹、三上統久、末田佳織、上田裕子、深田宗一郎、山元 弘、辻川和丈. 知覚神経ペプチド CGRP はマクロファージによる脂肪炎症を制御する. 2013 年 3 月 30 日(土). パシフィコ横浜

- ② 第 41 回日本免疫学会学術集会. 末田佳織、三上統久、深田宗一郎、山元弘、辻川和丈. The regulatory mechanisms of CGRP on IL-12 and IL-10 expression from dendritic cells in DTH models. 2012 年 12 月 5 日. 神戸国際会議場
- ③ 第 41 回日本免疫学会学術年会. 三上統久、宮城弥生、深田総一郎、山元弘、辻川和丈. CGRP and cyclic AMP/PKA pathway promote IL-9 production in Th9 cells. 2012 年 12 月 5 日. 神戸国際展示場
- ④ 第 39 回日本毒性学会学術年会. 三上統久、深田総一郎、山元弘、辻川和丈. 神経ペプチド CGRP による皮膚免疫制御. 2012 年 7 月 19 日. 仙台国際センター
- ⑤ 日本薬学会 132 年会. 三上統久、深田総一郎、山元弘、辻川和丈. 神経ペプチド CGRP の皮膚免疫制御作用. 2012 年 3 月 28 日. 北海道大学
- ⑥ 第 40 回日本免疫学会総会. 脂肪組織における CGRP の炎症制御作用. 宅間祐太郎, 西岡諭史, 吉村一樹, 鄭洋, 深田宗一郎, 山元弘, 辻川和丈. 2011 年 11 月 29 日. 幕張メッセ
- ⑦ 第 40 回日本免疫学会. 宮城弥生、三上統久、末田佳織、深田総一郎、山元弘、辻川和丈. The promoting effect of CGRP in Th9 differentiation. 2011 年 11 月 27 日. 幕張メッセ
- ⑧ 第 40 回日本免疫学会学術集会. 神経ペプチド CGRP の cAMP/PKA 経路を介した Th17 細胞分化促進作用. 三上統久、渡邊佳子、橋本なぎさ、深田宗一郎、山元弘、辻川和丈. 2011 年 11 月 28 日. 幕張メッセ 千葉
- ⑨ 第 61 回日本薬学会近畿支部. 末田佳織、三上統久、宮城弥生、深田宗一郎、山元弘、辻川和丈. 神経ペプチド CGRP による樹状細胞の制御解析. 2011 年 10 月 22 日. 神戸学院大学
- ⑩ 第 84 回日本生化学会大会. RAMP1 欠損マウスにおける肥満化の解析. 宅間祐太郎,

西岡諭史 吉村一樹, 鄭洋, 深田宗一郎, 山元弘, 辻川和丈. 2011年9月24日.
京都国際会館

- ⑪ 7th Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists. Calcitonin gene-related peptide promotes Th17 cell differentiation and enhances experimental autoimmune encephalomyelitis. Norihisa Mikami, Keiko Watanabe, Nagisa Hashimoto, So-ichiro, Fukada, Kazutake Tsujikawa, Hiroshi Yamamoto. June 4, 2011. Seoul, Korea.
- ⑫ 日本薬学会第130年会, 三上統久, 深田宗一郎, 辻川和丈, 山元弘, 神経ペプチド CGRP による皮膚炎症制御機構の解析. 2010年3月30日. 岡山桃太郎アリーナ
- ⑬ 日本薬学会第130年会, 宮城弥生, 吉川倫太郎, 三上統久, 渡辺桂子, 西岡諭史, 橋本なぎさ, 山田和弘, 深田宗一郎, 辻川和丈, 山元弘, カルシトニン遺伝子関連ペプチドによる cAMP/PKA 経路を介した免疫応答制御. 2010年3月30日. 岡山桃太郎アリーナ
- ⑭ 第20回 Kyoto T Cell Conference. 三上統久, 深田宗一郎, 山元弘, 辻川和丈. 神経ペプチド CGRP のヘルパーT細胞に対する作用. 2010年6月5日. 京都大学

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ:

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b008/info.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻川 和丈 (TSUJIKAWA KAZUTAKE)
大阪大学・薬学研究科・教授
研究者番号: 10207376

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: