

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590086

研究課題名(和文) 免疫系と神経系で働く新しい分子機構の解明

研究課題名(英文) Study of the molecular mechanism underlying interaction between immune system and nervous system

研究代表者

柳川 芳毅 (YANAGAWA, Yoshiki)

北海道医療大学・薬学部・講師

研究者番号：20322852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、免疫反応の調節に重要な役割を果たしている樹状細胞やマクロファージの機能に対するアドレナリンおよびノルアドレナリンの作用について検討した。その結果、アドレナリン受容体刺激によってアレルギー増悪因子(IL-33)、抗ウイルス分子(REDD1)、組織修復関連分子(トランスグルタミナーゼ2)の発現が上昇することを見出した。これらの結果は、炎症・免疫・組織修復反応が交感神経系によって制御されていることを示唆する。アドレナリンおよびノルアドレナリンはストレスによって交感神経系より分泌されることから、今回得られた知見は、ストレスと炎症・免疫疾患との関係を解明する手がかりとなる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we examined the effects of the stress-related catecholamines adrenaline and noradrenaline on the functions of dendritic cells and macrophages. We found adrenoceptor-mediated increase in IL-33, REDD1, and transglutaminase 2 expressions by these cells. Because stress events activate the sympathetic nervous system and result in secretion of the catecholamines, adrenoceptor-mediated increase in these molecules might be associated with stress-related inflammatory disorders.

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：アドレナリン受容体 IL-33 REDD1 トランスグルタミナーゼ2 ストレス

1. 研究開始当初の背景

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、ストレス社会といわれる現代において、早急に取り組むべき課題であるといえる。免疫領域においては、ストレスが感染症やアレルギー性疾患などに関係していると考えられているが、その詳細な分子機構については不明なままである。

樹状細胞およびマクロファージは、病原体に対する監視役として全身に分布し、免疫反応の始動および調節に重要な役割を果たしている。一方、生体がストレスを受けると交感神経系が活性化されアドレナリン (Ad) やノルアドレナリン (NAd) が分泌される。そこで本研究では、ストレスによる免疫疾患の発症および増悪に、これらのカテコラミンが影響していると考え、樹状細胞およびマクロファージ機能に対する Ad および NAd の作用に着目した本研究課題を申請した。

2. 研究の目的

生体がストレスを受けると交感神経系が活性化され、様々な生理応答が誘導される。一方、ストレスによる持続的な交感神経系の活性化とそれに基づく過度のカテコラミン分泌は、生体にとって有害であると考えられる。しかしながら、カテコラミン (Ad や NAd) の免疫系に対する作用については未だ不明な点が多い。本研究では、アドレナリン受容体を介した樹状細胞およびマクロファージの機能調節に着目し、神経系と免疫系で働く新しい分子機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

マウス骨髄由来樹状細胞は、C57BL/6 lineage marker negative 骨髄細胞を GM-CSF 存在下 5% FCS を含む RPMI1640 培地 (5% FCS RPMI1640) で 6 日間培養することによって調製した。マウスマクロファージ細胞株 (RAW264.7) およびヒト単球様細胞株 (THP-1) はそれぞれ ATCC および ECACC より得た後、5% FCS RPMI1640 で培養し実験に用いた。チオグリコレート浸潤腹腔内マクロファージは常法にしたがって C57BL/6 マウス腹腔内より調製した。マウス骨髄由来マクロファージは L929 細胞培養上清を含む培地を用いて常法にしたがって調製した。

(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。培養上清中のサイトカイン量は ELISA 法によって測定した。また、凍結融解により細胞を壊死させた後、培養液中に放出されるサイトカイン量も ELISA 法によって測定した。細胞内のタンパクレベルはウエスタンブロッティング法により測定した。

4. 研究成果

(1) 樹状細胞におけるアドレナリン受容体を介した IL-33 産生増強。

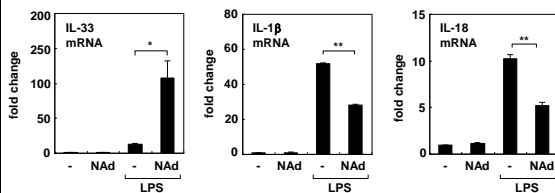


図1. ノルアドレナリンによる樹状細胞からのIL-33 mRNA発現増強  
樹状細胞にノルアドレナリン (NAd) とリボポリサッカライド (LPS) を4時間処理し各種サイトカイン (IL-1ファミリー) の mRNA 発現量を解析した。

樹状細胞を Toll-like receptor (TLR) リガンドと NAd を組み合わせて処理し、マイクロアレイ法により NAd 処理による遺伝子変化を網羅的に解析した。その結果、IL-33 の遺伝子発現が NAd によって上昇する可能性が示された。そこで、樹状細胞における IL-33 および同じ IL-1 ファミリーに属する IL-1β と IL-18 の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法により定量した (図 1)。NAd (10 μM) 単独処理では、IL-33 発現量にほとんど影響を示さなかった。一方、LPS は IL-33 mRNA 発現量を約 10 倍に増加させた。これに対し、LPS と NAd を組み合わせて処理した場合、IL-33 mRNA 発現量は相乗的に増加し、その値は無処理と比較して約 100 倍に増加した。

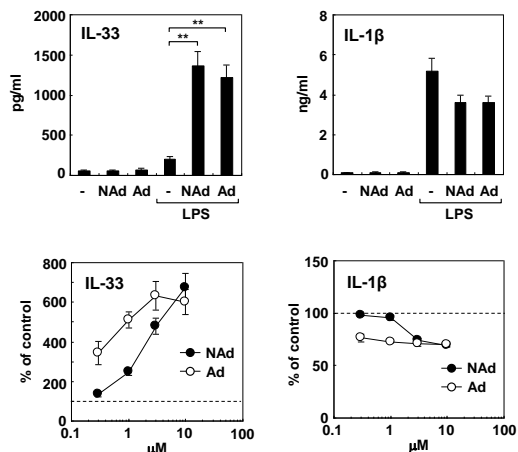


図2. カテコラミンによる樹状細胞からのIL-33 mRNA発現増強  
樹状細胞にノルアドレナリン (NAd) またはアドレナリン (Ad) とリボポリサッカライド (LPS) を8時間処理し、細胞を凍結融解によって壊死させた後、培養上清中に放出されたIL-1βとIL-33の値をELISA法により測定した。

次に、タンパクレベルでの解析を行った。細胞内に産生された IL-33 タンパクは、壊死にともない細胞外に放出されると報告されている。そこで、樹状細胞を刺激した後、凍結融解によって壊死させ、培養液中に放出されたサイトカイン量を ELISA 法により測定した (図 2)。mRNA レベルでの解析と同様に、IL-33 産生は NAd と LPS を組み合わせることにより相乗的に上昇した。また、Ad と LPS との組み合わせによっても同様の相乗効果が認められた。NAd に比べ Ad はより低用量で IL-33 産生増強作用を示した。

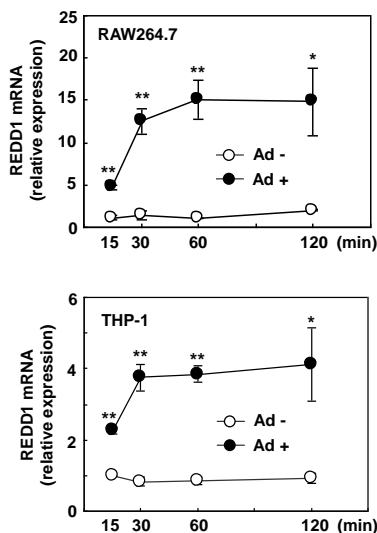
Ad 受容体サブタイプに対するアゴニスト、アンタゴニストを用いた実験から、NAd, Ad による IL-33 産生増強は、おもに β<sub>2</sub> 受容体を介していると考えられる。また、細胞膜透過

性 cAMP アナログやプロテインキナーゼ A (PKA) 阻害剤を用いた実験から、IL-33 産生上昇には  $\beta_2$  受容体の活性化による cAMP 上昇と PKA の活性化が関与していると考えられる。さらに、Ad 受容体を介した IL-33 の産生増強は、増加率や経時変化に違いはあるものの、RAW264.7 マクロファージにおいても確認された。

アトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患は、ストレスによって症状が悪化すると考えられるが、その詳細なメカニズムは解明されていない。生体がストレスを受けると交感神経-副腎髄質系より NAd および Ad が分泌される。本研究では、これらのカテコラミンが樹状細胞やマクロファージにおける IL-33 の発現を増強することを見出した。IL-33 はアレルギー性疾患において増悪因子として働くことが報告されており、ストレスによるアレルギー性疾患の増悪には、NAd や Ad による IL-33 の産生増強が関係している可能性がある。

### (2) マクロファージにおけるアドレナリン受容体を介した REDD1 の発現上昇。

Regulated in development and DNA damage responses 1 (REDD1) はストレス応答性遺伝子として知られており、低酸素状態や酸化ストレスなどの様々なストレスによって上昇することが報告されている。しかしながら、REDD1 発現に対する Ad や NAd の作用については知られていない。そこで、マクロファージにおける REDD1 発現に対する Ad の作用について解析した。



**図3. アドレナリンによるREDD1 mRNA発現増強**  
RAW264.6マクロファージ細胞株またはTHP-1単球様細胞株にアドレナリン(Ad)を処理し、各時間におけるREDD1 mRNAレベルを測定した。

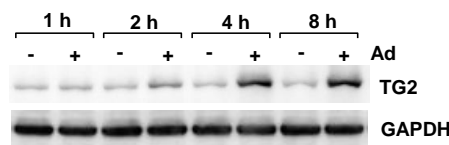
短時間 (15-60 min) の Ad 処理によって、RAW264.7 マクロファージ細胞株および THP-1 単球様細胞株における REDD1 mRNA 発現が著しく上昇した (図 3)。Ad による REDD1 発現上昇は、腹腔内マクロファージや骨髄由来マクロファージにおいても認められた。さらに、

蛋白レベルにおいても Ad による REDD1 発現上昇が認められた。Ad 受容体サブタイプに対するアゴニスト、アンタゴニストを用いた実験から、Ad による REDD1 発現増強は、おもに  $\beta_2$  受容体を介していると考えられる。また、細胞膜透過性 cAMP アナログ、exchange protein activated by cAMP (Epac) 選択的 cAMP アナログ、PKA 阻害剤を用いた実験から、 $\beta_2$  受容体刺激による細胞内 cAMP レベルの上昇は REDD1 の発現上昇に関与するが、PKA や Epac はこの発現上昇に関与していないと考えられた。

最近、REDD1 はインフルエンザウイルスなどのウイルスに対する生体防御機構において重要な役割を果たしていることが報告されている。Ad 受容体を介した REDD1 発現上昇は短時間で起こることから、短期ストレスによるカテコラミンの分泌は、REDD1 発現上昇を介した生体防御機構に関与しているのかもしれない。

### (3) マクロファージにおけるアドレナリン受容体を介したトランスグルタミナーゼ 2 の発現上昇。

トランスグルタミナーゼ 2 (TG2) は、タンパクを架橋する酵素で、多彩な機能を有する。TG2 は細胞外マトリクスを架橋し、組織修復・創傷治癒に関与するが、過度の TG2 活性は炎症性疾患や線維症の原因になると考えられている。TG2 はマクロファージにおいても発現しているが、その発現調節機構はほとんど知られていない。本研究では、マクロファージにおける TG2 発現に対するストレス関連カテコラミン (Ad や NAd) の影響について検討した。Ad 受容体刺激によって、マクロファージにおける TG2 mRNA およびタンパクの発現は著しく上昇した (図 4)。Ad 受容体サブタイプに対するアゴニスト、アンタゴニストを用いた実験から、Ad による TG2 発現上昇は、おもに  $\beta_2$  受容体を介していると考えられる。また、細胞膜透過性 cAMP アナログ、Epac 選択的 cAMP アナログ、PKA 阻害剤を用いた実験から、 $\beta_2$  受容体刺激による細胞内 cAMP レベルの上昇と、PKA および Epac 以外のシグナル伝達系が、TG2 発現上昇に関与していると推察される。



**図4. アドレナリンによるTG2発現誘導**  
RAW264.7マクロファージにアドレナリン(Ad)を処理し、各時間におけるトランスグルタミナーゼ2(TG2)のタンパク発現量をウエスタンブロット法により解析した。

### (4) まとめ

本研究課題では、樹状細胞やマクロファージの Ad 受容体を介した機能調節について研究を進めた。その結果、LPS 存在下での Ad 受

容体刺激によってアレルギー増悪因子である IL-33 の発現が上昇することが見出された。この発見は、ストレスとアレルギー疾患との関係を解明する手がかりとなる。また、この現象について公表した論文は、Faculty of 1000 の Pharmacology & Drug Discovery 部門に選出され、国際的にも高く評価された。

さらに、Ad 受容体を介したシグナルが、マクロファージ機能を多彩に制御していることが示された (図 5)。プロジェクトの中盤では、最近注目されている抗ウイルス分子 REDD1 の遺伝子発現が、Ad 受容体刺激によって、短時間で著しく上昇することが見出された。この現象は、短期ストレスが生体防御系を増強することを示唆している。プロジェクトの後半では、組織修復・創傷治癒に関与している TG2 の発現が、Ad 受容体刺激によって著しく上昇することを見出した。この現象は、ストレス下における組織修復・創傷治癒を理解するうえにおいて重要な知見であると考えられる。また、TG2 の過剰発現が、炎症性疾患や線維症の原因となることから、この発見はストレスとこれらの疾患との関係を明らかにする手がかりとなる。

以上、本研究によって得られた知見は、炎症・免疫・組織修復反応が、Ad 受容体を介して交感神経系により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。

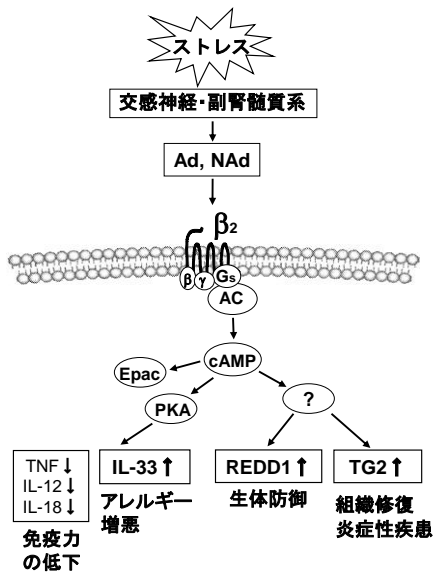


図5. Ad 受容体を介した樹状細胞, マクロファージの機能制御

#### 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 22 件)

1. Yanagawa Y, Hiraide S, Matsumoto M, Shimamura K, Togashi H. Enhanced transglutaminase 2 expression in response to stress-related catecholamines in macrophages. Immunobiology in press. doi:

- 10.1016/j.imbio.2014.04.002. 査読有
2. Yanagawa Y, Hiraide S, Matsumoto M, Togashi H. Rapid induction of REDD1 gene expression in macrophages in response to stress-related catecholamines. Immunol. Lett. 158:109-15, 2014. doi: 10.1016/j.imlet.2013.12.015. 査読有
3. Yanagawa Y, Suzuki M, Matsumoto M, Togashi H. Prostaglandin E2 enhances IL-33 production by dendritic cells. Immunol Lett. 141:55-60, 2011. doi: 10.1016/j.imlet.2011.07.005. 査読有
4. Yanagawa Y, Matsumoto M, Togashi H. Adrenoceptor-mediated enhancement of interleukin-33 production by dendritic cells. Brain, Behavior, and Immunity 25:1427-33, 2011. doi: 10.1016/j.bbi.2011.04.012. 査読有

[学会発表] (計 21 件)

1. 柳川芳毅, 富樫廣子: シンポジウム「自律神経と免疫機能」アドレナリン受容体を介した樹状細胞機能の調節: 第 87 回日本薬理学会年会 (2014. 3. 19-21) 仙台
2. 平出幸子, 柳川芳毅, 松本真知子, 富樫廣子: マクロファージにおけるアドレナリン受容体を介した REDD1 遺伝子発現の増強: 第 87 回日本薬理学会年会 (2014. 3. 19-21) 仙台
3. 柳川芳毅, 松本真知子, 富樫廣子: アレルギー増悪因子 IL-33 のアドレナリン受容体を介した発現調節機構: 第 132 回日本薬理学会年会 (2012. 3. 28-31) 札幌
4. 柳川芳毅, 松本真知子, 富樫廣子: アドレナリン受容体を介したアレルギー増悪因子 IL-33 の産生上昇機構: 第 85 回日本薬理学会年会 (2012. 3. 14-16) 京都

[その他]

ホームページ

<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・講師  
研究者番号: 20322852

##### (2) 研究分担者

松本 真知子 (MATSUMOTO Machiko)  
北海道医療大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 70229574

##### (3) 研究分担者

富樫 廣子 (TOGASHI hiroko)  
北海道医療大学・薬学部・教授  
研究者番号: 20113590