

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：32676

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640015

研究課題名(和文) 特定脳神経ネットワークの人工的制御技術を駆使した脳による全身免疫制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of changes in the systemic immune response connected to brain function by applying new technology for artificial manipulation of specific-neural brain network

研究代表者

成田 年(Narita, Minoru)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40318613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がんの発生・進展において、脳神経系の賦活化がどのような経路を介して末梢免疫に影響を与えるのかを解明する目的で、光遺伝学的手法ならびに薬理遺伝学的手法を駆使し、特に、視床下部弓状核プロオピオメラノコルチン(POMC)神経を人為的に活性化した際の抗腫瘍免疫に及ぼす影響について解析を試みた。その結果、視床下部弓状核POMC神経の活性化は、室傍核領域の $\mu$ -オピオイド受容体の活性化を介し、細胞性免疫の賦活化することで抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this research, we investigated the changes in the anti-tumor immune response by an activation of the hypothalamic POMC neurons oriented from the arcuate nucleus (ARC), using optogenetics and designer receptors exclusively activated by designer drugs (DREADD) technology, in order to elucidate how the activation of the central nervous system could affect the innate immune system in the development and progression of cancer. As a result, we found that the activation of the hypothalamic POMC neurons in the ARC may suppress the peripheral tumor growth associated with enhancing cell-mediated immunity via activation of the  $\mu$ -opioid receptor located in paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN).

研究分野：神経科学

キーワード：脳末梢関連 視床下部 オピオイド神経 抗腫瘍免疫 DREADD 細胞性免疫

### 1. 研究開始当初の背景

これまでにヒトなどの高等生物の免疫系の仕組みを解明する研究として、免疫系発生・分化のメカニズムや自己抗原に対する中枢性・末梢性寛容の獲得機構など、免疫系の認識・発動および制御に関する仕組みの解明が行われてきた。その結果、がんに関する免疫機構としては、抗原提示細胞によるがん関連抗原の提示とそれに基づく細胞性・液性免疫の活性化や、がんがこれらの自然免疫・獲得免疫系から逃れる寛容のメカニズムなどが明らかにされている。しかしながら、これまでのヒトの中枢神経系機構とがんの発生の関連に関する報告は、臨床疫学的な解析に限られており、脳内ネットワークが自然免疫・獲得免疫系に及ぼす直接的影響や、その制御機構は、ほとんど明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

がんの発生・進展において、ストレスやうつ状態が影響を及ぼしている可能性は以前より指摘されているが、具体的にどのような脳内ネットワークがどのような経路を介して自然免疫系や獲得免疫系に影響を及ぼしているのかはほとんど理解されていない。そこで本研究では、がん免疫と脳内ネットワーク、特に視床下部弓状核に存在する pro-opiomelanocortin (POMC) 含有神経との関連を明らかにすることを目指し、新たに開発された光遺伝学的手法 (オプトジェネティクス) ならびに薬理遺伝学的手法 (ファーマコジェネティクス) を用いた特定脳神経ネットワークの人為的制御により、特定脳神経系の全身免疫に対する制御機構を解明し、その破綻によるがんの発生・進展の機序を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 視床下部弓状核 POMC 神経特異的な神

経活動の操作を可能とする遺伝子改変マウスの作製とその人為的活動操作

POMC-Cre/ChR2 マウス

POMC 遺伝子プロモーターの下流に Cre 遺伝子を挿入した STOCK Tg (Pomc1-cre) 16Low/J 系マウス (POMC-Cre マウス) と channelrhodopsin-2 (ChR2) 遺伝子の上流に loxP 配列で挟まれたストップコドンカセットを有する B6;129S-Gt(ROSA)26Sor<tm32(CAG-COP4\*H134/EYFP)Hze>J マウス (LSL-ChR2 マウス) を交配させ、POMC 神経特異的に ChR2 が発現しているダブルトランスジェニックマウス (POMC-Cre/ChR2) マウスを作製した。このマウスの視床下部弓状核領域に光ファイバーを挿入し、オプトジェネティクス法に従い、青色光 (473nm, 20Hz) を局所照射することで視床下部弓状核 POMC 神経の特異的活性化を行った。

POMC-Cre/hM3Dq マウス

POMC-Cre マウスの視床下部弓状核領域に、Cre 存在下で遺伝子改変型ヒトムスカリン M3 受容体 (hM3Dq) を発現する AAV ベクター (AAV-hSyn-FLEX-hM3Dq) を微量注入することで、視床下部弓状核 POMC 神経特異的に hM3Dq が発現している遺伝子改変マウス (POMC-Cre/hM3Dq マウス) を作製した。Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADD) 法を応用し、このマウスに hM3Dq に対する特異的リガンドである clozapine-N-oxide (CNO) を腹腔内投与することで視床下部弓状核 POMC 神経の特異的活性化を行った。

(2) 担がんモデルマウスの作製ならびに腫瘍増殖試験

担がんモデルマウスは、マウス由来肺がん細胞株である Lewis lung carcinoma (LLC) 細胞を使用し、3% isoflurane 麻酔下で、マ

ウスの右腰背部に皮下移植 ( $2 \times 10^6$  cells/mouse) することで作製した。移植後 2 週間、ノギスを用いて腫瘍サイズの測定を行った。腫瘍増殖の評価は、腫瘍の長径 (L) と短径 (W) を測定し、計算式  $(L \times W^2)/2$  より腫瘍体積を算出して比較を行った。

(3) Fluorescence activated cell sorting (FACS) 法による NK 細胞ならびに NKT 細胞の定量

マウスから摘出した脾臓を単一の細胞に分離し、抗 CD16/32 抗体によりブロックした。その後、脾臓における NK 細胞ならびに NKT 細胞数を定量するため、PE 標識抗 CD3 抗体および APC 標識抗 CD49b 抗体により染色し、BD FACS Verse™ Flow Cytometer により解析を行った。CD3 陰性 CD49b 陽性分画を NK 細胞、CD3 陽性 CD49b 陽性分画を NKT 細胞とし、比較解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 腫瘍生着初期において視床下部弓状核 POMC 神経を特異的に活性化した際の腫瘍増殖への影響

POMC-Cre/ChR2 マウスに LLC 細胞を皮下移植することで、担がんモデルマウスを作製した。移植直後 24 時間、青色光の照射により、視床下部弓状核 POMC 神経を特異的に活性化した際の腫瘍増殖への影響を解析した。その結果、control 群と比較し、POMC-Cre/ChR2 群において、有意な腫瘍増殖の抑制が認められた。

(2) 腫瘍増殖期において視床下部弓状核 POMC 神経を特異的に活性化した際の腫瘍増殖への影響

Cre 存在下で hM3Dq を発現させることが可能な AAV ベクターを、POMC-Cre マウス

の視床下部弓状核領域に局所感染させた POMC-Cre/hM3Dq マウスを用い、LLC 細胞を皮下移植することで担がんモデルマウスを作製した。移植後 2 週間、CNO を腹腔内投与 ( $3\text{mg/kg}$ , *t.i.d.*) することにより、視床下部弓状核 POMC 神経を特異的に活性化した。その結果、control 群と比較し、POMC-Cre/hM3Dq 群において、有意な腫瘍増殖の抑制が認められた。さらに、この腫瘍増殖抑制効果は、視床下部弓状核 POMC 神経の投射先である室傍核領域への  $\mu$ -オピオイド受容体拮抗薬であるナロキシンの微量注入 ( $0.5\mu\text{g/hr}$ ) により有意な減弱が認められた。

以上の結果より、視床下部弓状核 POMC 神経の活性化は、室傍核領域の  $\mu$ -オピオイド受容体の活性化を介し、抗腫瘍効果を示す可能性が示唆された。

(3) 視床下部弓状核 POMC 神経の活性化による末梢免疫への影響

担がんモデルマウスを用いて、視床下部弓状核 POMC 神経の特異的活性化による細胞性免疫への影響を検討した。担がん状態の POMC-Cre/hM3Dq マウスに、移植後 2 週間、CNO を腹腔内投与した際の脾臓における NK 細胞および NKT 細胞数の比較解析を行った。その結果、control 群と比較し、POMC-Cre/hM3Dq 群において、脾臓における NK 細胞および NKT 細胞数の有意な増加が認められた。

以上の結果より、視床下部弓状核 POMC 神経の活性化による抗腫瘍効果は、細胞性免疫の賦活化により引き起こされる可能性が示唆された。

## 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)

[学会発表](計 3 件)

1) 濱田祐輔、田崎慶彦、森田加奈、伊藤 航、志保井美桜、藤森由梨、成田道子、田村英紀、鈴木雅美、葛巻直子、青木一教、山中章弘、成田 年、視床下部 POMC 神経の抗腫瘍免疫機構における役割、第 89 回日本薬理学会年会、2016 年 3 月 9-11 日、横浜

2) 成田 年、痛みがもたらす末梢免疫増悪化や脳神経免疫ネットワークの負の連鎖：鎮痛薬によるダイナミックな“生体恒常性回復効果”、第 25 回日本医療薬学会、2015 年 11 月 21-23 日、横浜

3) 成田 年、痛みによるがん免疫変容を考える：痛みによる腫瘍修飾とオピオイド生理応答、第 9 回日本緩和医療薬学会、2015 年 10 月 2-4 日、横浜

[その他]

ホームページ等

<http://polaris.hoshi.ac.jp/kyoshitsu/yakuri/research-results/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

成田 年 (NARITA MINORU)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40318613

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：