

学 位 論 文 題 名

ストレスによる末梢サイトカインの誘導とその機序

－齧歯類を用いた検討－

学位論文内容の要旨

脳が生体防御能に多大な影響を与えていることは古くから良く知られている。その典型がストレスによる免疫修飾である。従来、ストレスによる免疫修飾は、下垂体-副腎皮質系や交感神経-副腎髄質系由来の作動物質が免疫細胞表面の受容体に直接作用することによって行われると考えられてきたが、このような直接的な機構だけでは複雑かつ多様な免疫修飾を説明するのは困難である。むしろ、脳が一旦、インターロイキン（IL）などの多様な免疫調節活性を有する免疫サイトカインの産生を調節し、これによって間接的にも免疫機能を調節している可能性が考えられる。本研究では、実際にストレス時に脳が末梢臓器におけるサイトカインの産生を調節しているのか否か、またそれがどのような機構によるものであるのかについて、ラットとマウスを用いて検討した。

1. マウスを閉所に閉じこめ、いわゆる拘束ストレスを負荷して、血中IL-6と主要な産生臓器と考えられる脾臓や肝臓でのIL-6 mRNAの発現パターンを調べ、大腸菌菌体内毒素であるリポ多糖体（LPS）を投与したときと比較した。マウスに拘束ストレスを負荷すると、血中コルチコステロン濃度の増加と並行して血中IL-6濃度の増加が見られた。また、これに先立ち、脾臓や肝臓でIL-6 mRNAの増加がみられ、これらの臓器で確かにIL-6が産生されていることが示唆された。さらに、臓器当たりの総IL-6 mRNA量を比較したところ、脾臓より肝臓の方がはるかに多かった。一方、LPSをマウスの腹腔内に投与すると、全身性の炎症になることが知られているが、この時にも両臓器でIL-6 mRNAの増加がみられた。しかし、拘束ストレス時とは異なり、脾臓での発現がより著明であった。拘束ストレス時のIL-6産生細胞を免疫組織化学的手法で調べたところ、肝臓では肝実質細胞が、脾臓では血管周囲の単核球が主であった。一方、LPS投与時は、肝臓では類洞内のおそらくクッパー細胞と思われる細胞で、脾臓では赤脾髄のマクロファージで主にIL-6の産生が認められた。以上の結果より、拘束ストレス時のIL-6産生には脾臓よりむしろ肝臓の、特に肝実質細胞が重要であり、LPS投与時の反応とは大きく異なることが明らかになった。

2. 近年、ストレス反応時における脳内IL-1の役割が注目されている。そこで次に拘束ストレス負荷の代わりにIL-1をラットの脳室内に投与して、末梢サイトカインの変化を調べた。ラットの脳室内にリコンビナントヒトIL-1βを微量投

与すると、肝臓や脾臓でのIL-6 mRNAの増加と並行して血中IL-6濃度の増加が確認された。これらのIL-6応答はマウスに拘束ストレスを負荷したときにみられる応答とほぼ同じであった。またこのIL-6誘導は自律神経節の遮断薬であるクロリソングダミン投与で大幅に抑制できた。一方副腎を摘除したラットではIL-6誘導はさらに亢進したが、これもクロリソングダミン投与によって抑制された。IL-1脳室内投与によって、IL-6に加えて、同じく代表的な免疫サイトカインであるIL-1や腫瘍壊死因子(TNF)も誘導が確認できた。IL-1の誘導についてはクロリソングダミン処置で抑制できたが、TNFについては影響が見られなかった。また、脳内IL-1投与後、血中IL-6の増加に引き続いて、代表的な急性相タンパク質であるハプトグロビンの肝臓内mRNA量および血中濃度の増加が認められた。以上の結果より、脳内IL-1は肝臓や脾臓でのIL-6、IL-1、TNFの誘導を促すが、そのメカニズムはサイトカイン毎に異なっており、IL-6やIL-1の様に誘導に自律神経系が関与するものと、TNFの様に別の経路によるものがあることが明らかになった。また、血中に放出されたサイトカインが急性相タンパク質の誘導といった生体防御反応の一端を担っていることが示唆された。

3. IL-1やコルチコトロピン放出ホルモンなどストレス反応に関わるとされる脳内メディエーターは、同時に炎症急性期反応の脳内メディエーターとしても知られている。両反応の間には共通の反応もあるが、上記のようにIL-6産生細胞の違いなど大きく異なる点も多い。そこで炎症時やストレス時に特異的な役割を果たす脳内の新規遺伝子を見出すために、LPS投与または拘束ストレスを負荷したマウスと無処置マウスの脳からmRNAを調製し、両者で発現に差異のある遺伝子をRNA arbitrarily primed-polymerase chain reaction(RAP-PCR)法で検索した。その結果、拘束時にだけ変動する遺伝子を11個、LPS投与時にだけ変動する遺伝子を10個、双方で共通に変動がみられる遺伝子を24個、それぞれ見いだした。このうち142.5はLPS投与時にだけ脳内の発現量が増加した遺伝子である。この遺伝子は、脳のみならず全身の臓器でも発現量が増加し、なかでも脾臓や肺など免疫担当細胞の多い臓器では、LPS投与30分という極めて急性の時期から著しい増加が見られた。従って、142.5は免疫担当細胞の機能分子の一つであり、炎症時の免疫-脳相関に携わる分子の一つと予想される。一方、脾臓や肝臓の142.5のmRNA発現量は、拘束ストレス負荷やIL-1脳室内投与時でも増加が見られたことから、この分子もIL-6、IL-1、TNFと同様に、脳によって発現調節を受けることが分かった。なお、その応答はクロリソングダミンで抑制されないため、自律神経系の関与は無いと思われる。142.5を始めとして、今回見出した新規遺伝子の構造と機能の解析によって、ストレス時や炎症時の脳と免疫系の複雑な相互連関を分子レベルで明らかに出来るものと考えている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齊 藤 昌 之

副 査 教 授 岩 永 敏 彦

副 査 教 授 小 沼 操

副 査 助 教 授 森 松 正 美 (岩手大学農学部)

学 位 論 文 題 名

ストレスによる末梢サイトカインの誘導とその機序

－齧歯類を用いた検討－

ストレス刺激が脳を介して免疫機能を修飾することは広く知られているが、その分子機構については不明な点が多い。本研究では、脳による免疫制御に多様な免疫修飾能をもつサイトカインが果たす役割を明らかにする目的で、末梢サイトカイン産生に及ぼすストレス負荷の影響とそれに関与する因子・機構について、ラットとマウスを用いて検討した。

1. マウスに拘束ストレスを負荷すると、30分後より脾臓や肝臓でインターロイキン (IL) -6 mRNAの増加がみられ、その後血中IL-6濃度が上昇した。さらに、臓器当たりの総IL-6 mRNA量を比較したところ、脾臓より肝臓の方がはるかに多かった。IL-6産生細胞を免疫組織化学的手法で調べたところ、拘束ストレス時は肝臓では肝実質細胞が、脾臓では血管周囲の単核球が主であった。以上の結果より、拘束ストレス時のIL-6産生には肝臓の、特に肝実質細胞が重要であることが明らかになった。

2. ストレスによる末梢IL-6誘導における脳内IL-1の役割を明らかにするために、ラットの脳室内に微量のIL-1を投与したところ、拘束ストレス時と同様に末梢IL-6の誘導が認められた。この時、IL-1や腫瘍壊死因子 (TNF) も誘導されることが確認された。IL-6とIL-1の誘導については交感神経節の遮断薬であるクロリソндаミンの前処置で抑制できたが、TNFについては影響が見られなかった。一方、これらの誘導は副腎摘除によって消失することはなかった。以上の結果より、ストレス刺激は脳内IL-1を介して末梢サイトカインの誘導を促すことと、交感神経の役割が重要であることが明らかになった。

3. ストレス時に脳内で重要な役割を果たす新規遺伝子を見出すために、拘束ストレスによって発現が変化する遺伝子をRNA arbitrarily primed-polymerase chain reaction法で検索した結果、35個の変動遺伝子が見いだされた。これら遺伝子の構造と機能の解析によって、ストレス時の末梢サイトカイン誘導に関わる新たな脳内分子を明らかにする手掛かりが得られた。

以上のように、本研究は、脳による末梢サイトカインの産生調節について、脳内関与分子、サイトカイン

ン産生細胞、及び介在経路を明らかにしたものであり、哺乳動物の神経科学及び免疫学への貢献が大である。よって審査員一同は北村浩氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格が充分であると認めた。