

学 位 論 文 題 名

求心性迷走神経およびレプチンを介する

脳内免疫機能分子の誘導機構

学位論文内容の要旨

【序論】

サイトカインは免疫系のメディエーターであるとともに、神経系の重要なメディエーターでもあり、ストレス反応、発熱、摂食、内分泌系など多彩な脳の機能変化を惹起することが知られている。バクテリア・エンドトキシン (LPS) などによって誘発される末梢性炎症反応は中枢において IL-1 β 、IL-6 や TNF α の発現、発熱、睡眠、摂食抑制などの作用を惹起する。しかし、このような末梢の炎症反応の中枢神経系への伝達経路については不明な点が多い。現在、その伝達経路として主に、

- 1) 末梢の炎症性サイトカインが血液脳関門をトランスポーターを介して移行する
- 2) 末梢の炎症性サイトカインが第3脳室腹壁部 (血液脳関門の欠如した領域) を通過する
- 3) 末梢のシグナルが求心性迷走神経を介して伝達される

という可能性が示唆されているが不明な点が多く存在している。そこで本研究では、末梢における炎症時に脳内免疫機能におよぼす影響について検討した。

迷走神経の関与については IL-1 β や LPS の末梢投与による中枢神経系への反応に対して、迷走神経切断の効果を検討した報告があるが、必ずしも一致した結果が得られていない。そこで今回、求心性迷走神経を直接電気刺激することでその関与について直接の証明を試みた。

レプチンは主として脂肪組織より循環血液中に分泌され、摂食量抑制・体重増加抑制作用により生体のエネルギー代謝調節や神経内分泌調節に関与することが知られている。最近、肥満遺伝子産物であるレプチンが炎症反応によって誘導され、免疫機能にもレプチンが関与していることが示された。そこで末梢レプチンが中枢における免疫反応をメディエートする可能性について検討した。

【結果と考察】

1) 求心性迷走神経刺激による脳内 IL-1 β の発現および視床下部—下垂体前葉—副腎系 (HPA axis) 活性化に及ぼす影響

成熟 SD 雄性ラットをウレタン麻酔下に、頸部迷走神経を求心性に電気刺激 (10 Hz、0.5 msec、1 mA) した。IL-1 β mRNA の発現を RT-PCR 法で検討したところ刺激 2 時間後において IL-1 β mRNA が視床下部と海馬で有意に増加した。さらに、求心性迷走神経の細胞体が存在する nodose ganglion において LPS の受容体である Toll-like Receptor 4 が発現していることが明らかになった。したがって末梢性炎症反応時における脳内 IL-1 β 産生系において求心性迷走神経が関与し、LPS が nodose ganglion に作用する可能性が示唆された。また RT-PCR 法により視床下部

における CRF mRNA の発現を検討したところ迷走神経刺激 2 時間後において有意な上昇が認められた。さらに血漿中 ACTH とコルチコステロンレベルを RIA 法で測定したところ迷走神経刺激 2 時間後において有意に上昇した。したがって、炎症時にみられる HPA axis の活性化に求心性迷走神経が関与している可能性が示唆された。

2) 末梢レプチンの中枢神経系の免疫機能におよぼす影響

マウスにレプチンを静脈内に投与 2 時間後において視床下部、海馬、大脳皮質、小脳、延髄で IL-1 β および IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) の mRNA 発現誘導が認められた。したがって、末梢性炎症反応時における脳内サイトカイン産生にレプチンが関与している可能性が示唆された。炎症ストレスは、血中におけるグルココルチコイドの産生を増加させることが知られている。今回デキサメタゾン前処置により、レプチンによる IL-1 β の産生が抑制されたことから、生体内においてレプチンによる脳内 IL-1 β の産生は、グルココルチコイドによって負に制御されている可能性が示唆された。また、迷走神経切除マウスにおいても、レプチンによる IL-1 β の誘導は、正常マウスへのレプチン投与時と同レベル誘導された。したがって末梢レプチンによる視床下部 IL-1 β 産生は求心性迷走神経を介さずに惹起している可能性が示唆された。中枢神経系を構成している細胞群は、主にグリア細胞と神経細胞に大別される。その中でグリア細胞は中枢神経系における炎症時に重要な役割を担っており様々な炎症性サイトカインを産生することが知られている。そこで次に、レプチンがグリア細胞に作用する可能性を検討した。その結果、初代培養グリア細胞には、レプチン受容体が発現していることが明らかになった。また、初代培養グリア細胞においてレプチンは、IL-1 β の誘導を惹起したことから、レプチンによる脳内 IL-1 β 産生は少なくともグリア細胞において生じている可能性が示唆された。以上から、レプチンは脳内で IL-1 β の誘導を惹起し、この作用は求心性迷走神経とは独立した系で誘導すると考えられ、レプチンは脳内に移行し、少なくともグリア細胞に作用して IL-1 β を誘導する可能性が示唆された。

3) レプチンによる脳内サイトカイン誘導機構についての検討

レプチンの受容体にはスプライシングの違いにより少なくとも五つのアイソフォームの存在が知られている。レプチンは Ob-Rb 受容体を介して STAT3 を活性化することが知られているが、他の受容体アイソフォーム (ショートアイソフォーム) は、STAT3 活性化能を有していない。db/db マウス (Ob-Rb 受容体変異肥満モデルマウス) を用いた解析から、レプチンによる脳内 IL-1 β 、IL-1ra の産生は STAT3 活性化非依存的に、おそらくショートアイソフォームレプチン受容体を介して誘導されることが示唆された。さらに、STAT3 の活性化を指標にレプチンの脳内作用部位をリン酸化 STAT3 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検討したところ従来から知られている視床下部に加え脳幹部もレプチンの作用点である可能性が示唆された。抗リン酸化 STAT3 抗体を用いた免疫組織化学的検討の結果、興味深いことにレプチン投与によって視床下部の弓状核、腹内側核、脳幹部の孤束核、迷走神経背側核において免疫陽性細胞が認められた。さらに JAK-STAT シグナルに対する負のフィードバック機構として誘導される SOCS3 (Suppressor of Cytokine Signaling 3) の発現誘導が脳幹部で認められたことから、レプチンの Ob-Rb 受容体を介した摂食抑制・エネルギー消費亢進に関与する脳部位として新たに脳幹部の存在を明らかにした。以上より、レプチンは STAT3 の活性化非依存的に IL-1 β および IL-1ra の発現を視床下部、海馬、大脳皮質、小脳、延髄において誘導し、一方レプチンの Ob-Rb 受容体を介する脳内作用部位として視床下部の他に、脳幹部の存在が明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 大 熊 康 修
副 査 教 授 野 村 靖 幸
副 査 教 授 松 田 正
副 査 助 教 授 高 橋 和 彦

学 位 論 文 題 名

求心性迷走神経およびレプチンを介する

脳内免疫機能分子の誘導機構

申請者は、末梢性炎症反応時における中枢神経系の免疫機能誘導に、求心性迷走神経およびレプチンが関与していることを明らかにした。

サイトカインは免疫系のメディエーターであるとともに、神経系の重要なメディエーターでもあり、ストレス反応、発熱、摂食、内分泌系など多彩な脳の機能変化を惹起することが知られている。バクテリア・エンドトキシン (LPS) などによって誘発される末梢性炎症反応は中枢において IL-1 β 、IL-6 や TNF α の発現、発熱、睡眠、摂食抑制などの作用を惹起する。しかし、このような末梢の炎症反応の中枢神経系への伝達経路については不明な点が多く存在している。そこで申請者は、末梢における炎症時に脳内免疫機能におよぼす影響について検討した。

末梢性炎症反応時における中枢神経系の免疫機能誘導における求心性迷走神経の関与については、IL-1 β や LPS の末梢投与による中枢神経系への反応に対して、横隔膜直下での迷走神経切断の効果をみた報告がなされてきているが、投与ルートや投与量、あるいはどのような脳内反応を指標とするかによって、必ずしも一致した結果が得られておらず、迷走神経切断モデル動物を用いた実験による証明には限界があった。そこで申請者は、求心性迷走神経を直接電気刺激するという方法を新たに用いてその関与について直接の証明を試みた。その結果、求心性迷走神経の直接の電気刺激により脳内 IL-1 β の誘導および視床下部—下垂体—副腎系の活性化が認められた。以上から、申請者は求心性迷走神経の脳内免疫機能誘導への関与について決定的なものとした。

最近、肥満遺伝子産物であるレプチンが炎症反応によって誘導され、免疫機能にもレプチンが関与していることが示された。そこで末梢レプチンが中枢における免疫反応をメディエートする可能性について検討した。その結果、マウスにレプチンを静脈内に投与 2 時間後において視床下部、海馬、大脳皮質、小脳、延髄で IL-1 β および IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) の mRNA 発現誘導が認められた。したがって、末梢性炎症反応時における脳

内サイトカイン産生にレプチンが関与している可能性を明らかにした。

炎症ストレスは、血中におけるグルココルチコイドの産生を増加させることが知られている。今回デキサメタゾン前処置により、レプチンによる IL-1 β の産生が抑制されたことから、生体内においてレプチンによる脳内 IL-1 β の産生は、グルココルチコイドによって負に制御されている可能性が示唆された。また、迷走神経切除マウスにおいても、レプチンによる IL-1 β の誘導は、正常マウスへのレプチン投与時と同レベル誘導された。したがって末梢レプチンによる視床下部 IL-1 β 産生は求心性迷走神経を介さずに惹起している可能性が示唆された。中枢神経系を構成している細胞群は、主にグリア細胞と神経細胞に大別される。その中でグリア細胞は中枢神経系における炎症時に重要な役割を担っており様々な炎症性サイトカインを産生することが知られている。そこで次に、レプチンがグリア細胞に作用する可能性を検討した。その結果、初代培養グリア細胞には、レプチン受容体が発現していることが明らかになった。また、初代培養グリア細胞においてレプチンは、IL-1 β の誘導を惹起したことから、レプチンによる脳内 IL-1 β 産生は少なくともグリア細胞において生じている可能性が示唆された。以上から、レプチンは脳内で IL-1 β の誘導を惹起し、この作用は求心性迷走神経とは独立した系で誘導すると考えられ、レプチンは脳内に移行し、少なくともグリア細胞に作用して IL-1 β を誘導することを明らかにした。

レプチンの受容体にはスプライシングの違いにより少なくとも五つのアイソフォームの存在が知られている。レプチンは Ob-Rb 受容体を介して STAT3 を活性化することが知られているが、他の受容体アイソフォーム(ショートアイソフォーム)は、STAT3 活性化能を有していない。db/db マウス(Ob-Rb 受容体変異肥満モデルマウス)を用いた解析から、レプチンによる脳内 IL-1 β 、IL-1ra の産生は STAT3 活性化非依存的に、おそらくショートアイソフォームレプチン受容体を介して誘導されることが示唆された。さらに、STAT3 の活性化を指標にレプチンの脳内作用部位をリン酸化 STAT3 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検討したところ従来から知られている視床下部に加え脳幹部もレプチンの作用点である可能性が示唆された。抗リン酸化 STAT3 抗体を用いた免疫組織化学的検討の結果、興味深いことにレプチン投与によって視床下部の弓状核、腹内側核、脳幹部の孤束核、迷走神経背側核において免疫陽性細胞が認められた。さらに JAK-STAT シグナルに対する負のフィードバック機構として誘導される SOCS3 (Suppressor of Cytokine Signaling 3) の発現誘導が脳幹部で認められたことから、レプチンの Ob-Rb 受容体を介した摂食抑制・エネルギー消費亢進に関与する脳部位として新たに脳幹部の存在を明らかにした。以上より、レプチンは STAT3 の活性化非依存的に IL-1 β および IL-1ra の発現を視床下部、海馬、大脳皮質、小脳、延髄において誘導し、一方レプチンの Ob-Rb 受容体を介する脳内作用部位として視床下部の他に、脳幹部の存在が明らかとなった。

以上、本論文審査委員会は、本論文を求心性迷走神経およびレプチンを介する脳内免疫機能への関与について、とくに脳サイトカイン誘導機構および STAT3 の活性化を指標とした新規脳内作用部位を明らかにした内容であると判定し、博士(薬学)学位を受けるに十分値すると認めた。