

# 研究報告書

## 「慢性炎症における免疫細胞動態の神経性制御機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 鈴木 一博

### 1. 研究のねらい

「病は気から」という諺にも示されるように、神経系による免疫系の制御機構が存在することは古くから広く知られている。事実、リンパ節をはじめとするリンパ器官には種々の神経細胞が投射しており、免疫細胞上にはそれらの神経細胞から分泌される神経伝達物質に対する受容体が発現している。しかし、神経系からのインプットが免疫系からのアウトプットにどのようにして変換されるのか、その細胞および分子レベルでのメカニズムは今なお十分に理解されていない。交感神経と副交感神経から成る自律神経系は、ストレスや情動による中枢神経系の活動性の変化を他の生体システムに伝達する主要な経路であることから、神経系による免疫制御にも深く関与すると考えられている。特に交感神経は、慢性関節リウマチや多発性硬化症といった慢性炎症性疾患の病態との関連性が示唆されてきたにもかかわらず、そのメカニズムは不明であった。そこで私は、交感神経が免疫系に及ぼす影響とそのメカニズムの解明に着手した。

交感神経が免疫系に及ぼす影響を調べるに当たって、私は交感神経から分泌されるノルアドレナリンの受容体の一つである  $\beta_2$  アドレナリン受容体がリンパ球上に発現していることに着目した。交感神経が興奮したのと似た状況を作り出すため、マウスに  $\beta_2$  アドレナリン受容体の選択的な刺激薬を投与したところ、血液中およびリンパ液のリンパ球数が急激に減少することが確認された。このことは、交感神経がリンパ球の体内動態の制御に関与することを示唆している。そこで我々(研究者本人、研究補助員 2 名、学生 1 名)は、交感神経による免疫・炎症制御のメカニズムをリンパ球動態という切り口で解明することを目的として、交感神経によるリンパ球動態制御の細胞基盤と分子基盤、さらにその炎症性疾患の病態における意義について検討した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

交感神経によるリンパ球動態制御の細胞基盤について解析した結果、交感神経からの入力がリンパ球上に発現する  $\beta_2$  アドレナリン受容体を介してリンパ球のリンパ節からの脱出を抑制することが明らかになった。そのメカニズムとして、交感神経によるリンパ球動態制御の分子基盤について検討した結果、 $\beta_2$  アドレナリン受容体がリンパ球のリンパ節への保持に関わるケモカイン受容体 CCR7 および CXCR4 と複合体を形成すること、 $\beta_2$  アドレナリン受容体の活性化に伴ってこれらのケモカイン受容体の反応性が亢進することを見出した。これらのことから、 $\beta_2$  アドレナリン受容体とケモカイン受容体の物理的かつ機能的なクロストークによってリンパ球のリンパ節への保持が促される結果、リンパ節からの脱出が抑制されることが明らかになった(図)。

さらに、交感神経によるリンパ球動態制御の炎症性疾患の病態における意義を、T細胞依存性の炎症性疾患モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎および皮膚の遅延型過敏反応を用いて検討した。その結果、いずれのモデルにおいても $\beta_2$ アドレナリン受容体の刺激によって症状の進行が抑えられることが確認された。さらに皮膚の遅延型過敏反応のモデルを用いて、 $\beta_2$ アドレナリン受容体の活性化が抗原特異的なT細胞の体内動態に及ぼす影響について解析したところ、 $\beta_2$ アドレナリン受容体を介する刺激によって抗原特異的T細胞のリンパ節からの脱出が抑制され、炎症部位への移動が妨げられることがわかった。これらのことから、交感神経からの入力に伴う抗原特異的T細胞の動態変化が炎症を抑制する方向に作用することが示唆された。

この研究成果は、The Journal of Experimental Medicine 電子版に2014年11月24日付で掲載された。

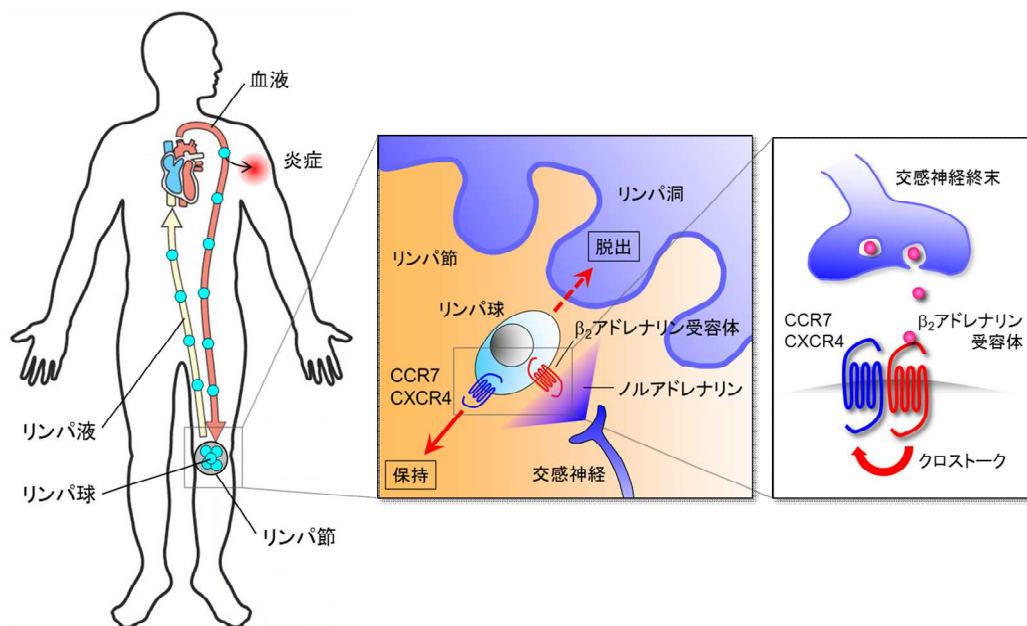


図. 交感神経によるリンパ球動態の制御

## (2) 詳細

### ① 交感神経によるリンパ球動態制御の細胞基盤

マウスに $\beta_2$ アドレナリン受容体刺激薬を投与することによって血液およびリンパ液中のリンパ球数が減少するメカニズムを細胞レベルで解明するに当たって、この $\beta_2$ アドレナリン受容体刺激薬の作用が、リンパ球に発現する $\beta_2$ アドレナリン受容体に媒介されているのか、あるいは非血液細胞上に発現する $\beta_2$ アドレナリン受容体に媒介されるのかを明らかにすることを試みた。そのために、 $\beta_2$ アドレナリン受容体刺激薬の作用が $\beta_2$ アドレナリン受容体の遺伝子欠損マウスでは完全に消失することを確認した上で、骨髄キメラマウスを用いた実験を行った。致死量の放射線を照射した野生型マウスに、 $\beta_2$ アドレナリン受容体欠損マウスの骨髄細胞を移入し、血液細胞上に $\beta_2$ アドレナリン受容体が発現していない状況を作り出したところ、 $\beta_2$ アドレナリン受容体刺激薬の作用がほとんど消失した。一方、 $\beta_2$ アドレナリン受容体欠損マウスをレシピエントとして骨髄キメラマウスを作製し、非血液細胞上に $\beta_2$ アドレナリン受容

体が発現していない状況にした場合には、野生型マウスをレシピエントとした場合と同等の作用が認められた。これらのことから、 $\beta_2$  アドレナリン受容体刺激薬の投与が血液・リンパ液中のリンパ球数に及ぼす影響の大部分は、血液細胞上に発現する  $\beta_2$  アドレナリン受容体に媒介されることが明らかになった。

リンパ球はリンパ節からリンパ液中に脱出し、リンパ液が血液と合流するのに伴って血流に乗り、再びリンパ節に戻る(再循環)という形で全身を巡回している。そこで我々は、 $\beta_2$  アドレナリン受容体が刺激されることによって血液とリンパ液中のリンパ球数が共に減少するのは、リンパ節からのリンパ球の脱出が抑制されるためではないかと推測した。この仮説を検証するため、リンパ球が血液中からリンパ節に進入する際に必須の接着因子  $\alpha 4$  および  $\alpha L$  インテグリンの中和抗体をマウスに投与することによって、リンパ球のリンパ節への進入を遮断し、その一定時間後にリンパ節に残存するリンパ球の数を測定するという方法を用いて、リンパ球のリンパ節からの脱出頻度を評価した。その結果、 $\beta_2$  アドレナリン受容体刺激薬を投与することによって、より多くのリンパ球がリンパ節に残存することが確認され、 $\beta_2$  アドレナリン受容体を刺激することによってリンパ球のリンパ節からの脱出が抑制されることが証明された。

次に我々は、交感神経からの生理的なレベルの  $\beta_2$  アドレナリン受容体を介する入力があるリンパ球のリンパ節からの脱出に関するか検討した。まず  $\beta_2$  アドレナリン受容体を欠損するリンパ球あるいは野生型のリンパ球をマウスに移入し、それらのリンパ節からの脱出頻度を評価したところ、 $\beta_2$  アドレナリン受容体欠損リンパ球は野生型のリンパ球に比べてリンパ節から脱出しやすいことがわかった。また、交感神経に選択的に取り込まれる神経毒 6-hydroxydopamine を投与することによって交感神経を除去したマウスにおいても、リンパ球のリンパ節からの脱出が亢進した。これらの結果から、交感神経から  $\beta_2$  アドレナリン受容体を介して供給される生理的なレベルの入力もまたリンパ球のリンパ節からの脱出を抑制することが示された。

以上の結果から、交感神経からの入力がリンパ球上に発現する  $\beta_2$  アドレナリン受容体を活性化し、リンパ球のリンパ節を介する再循環を調節することによって、リンパ球の体内動態の恒常性維持に寄与していることが明らかになった。しかし、交感神経がリンパ節のどこでどのようにリンパ球と相互作用しているのか、その実態は現時点では不明であり、今後の検討課題の一つである。

## ② 交感神経によるリンパ球動態制御の分子基盤

リンパ球のリンパ節からの脱出頻度は、リンパ球のリンパ節からの脱出を促すスフィンゴシン 1 リン酸受容体 S1PR1 を介するシグナルと、リンパ球のリンパ節への保持を促すケモカイン受容体 CCR7 および CXCR4 を介するシグナルのバランスで決定される。そこで我々は、これらの走化性因子受容体のシグナルがリンパ球上に発現する  $\beta_2$  アドレナリン受容体の活性化に伴ってどのように変化するか検討した。その結果、CCR7 および CXCR4 を介する small GTPase Rac1 の活性化、およびリンパ球の走化性が  $\beta_2$  アドレナリン受容体を刺激することによって亢進することがわかった。一方、S1PR1 を介するリンパ球の反応には影響は認められなかった。これらの結果から、 $\beta_2$  アドレナリン受容体の活性化に伴って CCR7 および CXCR4 の反応性が選択的に増強されるというシグナル伝達のクロストークが存在することが示され

た。さらに、リンパ球における CCR7 の欠損、あるいは CXCR4 の特異的阻害剤の投与によって、 $\beta_2$  アドレナリン受容体刺激薬によるリンパ球のリンパ節からの脱出を抑制する効果が減弱することが判明し、 $\beta_2$  アドレナリン受容体の活性化に伴うリンパ球動態の変化が CCR7 と CXCR4 に依存することが確認された。

アドレナリン受容体とケモカイン受容体はいずれも G タンパク共役型受容体であるが、異なる G タンパク共役型受容体どうしが複合体を形成し、受容体間でシグナル伝達のクロストークが起こることが知られている。そこで、 $\beta_2$  アドレナリン受容体とケモカイン受容体の物理的な相互作用について免疫沈降法を用いて検討したところ、 $\beta_2$  アドレナリン受容体が CCR7 および CXCR4 と選択的に複合体を形成することが示唆された。我々は、この受容体間の物理的な相互作用が、シグナル増強作用の基盤になっていると推測している。

以上の結果から、 $\beta_2$  アドレナリン受容体と CCR7 および CXCR4 のクロストークがリンパ球のリンパ節への保持を促すシグナルを増強する結果、リンパ球のリンパ節からの脱出が抑制されることが示された。しかし本研究では、 $\beta_2$  アドレナリン受容体とケモカイン受容体のクロストークの分子機序を明らかにするまでには至らなかった。

### ③ 交感神経によるリンパ球動態制御の炎症性疾患の病態における意義

さらに我々は、 $\beta_2$  アドレナリン受容体によるリンパ球の動態制御が炎症性疾患の病態においてどのような意味を持つのか検討した。ヒトの多発性硬化症のマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎、およびアレルギー性皮膚炎のマウスモデルである皮膚の遅延型過敏反応において、 $\beta_2$  アドレナリン受容体刺激薬を投与したところ、いずれの炎症性疾患モデルにおいても症状の進行が抑制された。一方、 $\beta_2$  アドレナリン受容体欠損マウスでは野生型マウスに比べて症状が増悪した。これらのことから、 $\beta_2$  アドレナリン受容体のシグナルは炎症を鎮静化することが確かめられた。

これらの炎症性疾患モデルでは、免疫部位の所属リンパ節でエフェクター細胞に分化した抗原特異的 T 細胞が、特異抗原の存在する中枢神経系あるいは皮膚に移動して炎症を誘導することで病態が形成される。そこで我々は、皮膚の遅延型過敏反応の実験系を利用して、抗原特異的 T 細胞の体内動態における  $\beta_2$  アドレナリン受容体の役割について検討した。その結果、 $\beta_2$  アドレナリン受容体刺激薬の投与によって、抗原特異的 T 細胞のリンパ節からの脱出が抑制され、炎症部位である皮膚への到達が妨げられることがわかった。一方、 $\beta_2$  アドレナリン受容体を欠損する抗原特異的 T 細胞は、野生型の抗原特異的 T 細胞よりもリンパ節から脱出しやすく、炎症部位に到達しやすいことが判明し、生理的なレベルの  $\beta_2$  アドレナリン受容体を介する入力もまた抗原特異的 T 細胞の動態に関与することが明らかになった。これらのことから、交感神経からの入力に伴う抗原特異的 T 細胞の動態変化が T 細胞依存性の炎症を抑制する方向に作用することが示唆された。

## 3. 今後の展開

本研究では、交感神経がリンパ節のどこでどのようにリンパ球と相互作用するのか、その実態を明らかにするには至らなかった。そこで我々は、2 光子励起蛍光顕微鏡を用いた生体イメージングを用いて、生きたマウスのリンパ節における交感神経とリンパ球の相互作用を可視化することによって、交感神経によるリンパ球動態制御の実態を解明することを計画している。

また、 $\beta_2$  アドレナリン受容体の活性化がケモカイン受容体の反応性を増強するメカニズムは不明である。我々は、両受容体間のクロストークに関与する分子の同定を進めており、今後これらの分子の機能解析を通じて $\beta_2$  アドレナリン受容体-ケモカイン受容体間クロストークの分子機序を明らかにしたい。

さらに重要な課題は、本研究で明らかになった交感神経によるリンパ球動態制御が生理的にどのような意義を有しているかを明らかにすることである。交感神経の活動性は、1 日の内で身体活動性の高い時間帯に上昇し、身体活動性の低い時間帯に低下するという日内変動を示す。そこで我々は、この交感神経活動の概日リズムと免疫応答の関連性に注目して交感神経によるリンパ球動態制御の生理的意義を明らかにすることを試みる。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

いくつかの問題点が未解明のまま残されているものの、交感神経によるリンパ球動態制御の細胞・分子基盤とその炎症性疾患の病態における意義を明らかにすることができたため、本研究の目的は概ね達成できたと考えている。本さきがけ研究の開始時期が研究室の立ち上げの時期と重なったこともあり、研究費は生物学的実験の遂行に必須の基本的な機器、および本研究の目的に特化した機器・消耗品の購入のために効果的に使用することができた。本研究は研究者本人、技術補助者 2 名、学生 1 名という体制で行われたが、研究計画と予算の規模に照らして適切であったと考えられる。

本研究を足掛かりとして、ストレスあるいは情動が交感神経を介して免疫機能にどのように反映されるのか、まさに「病は気から」を明確な分子の言葉で語る事が可能になると予想される。それが実現すれば、交感神経による免疫制御に関わる分子を標的として、ストレス応答を人為的にコントロールするという新しいコンセプトに基づいた病気の予防・治療法の開発につながると期待される。

##### (2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

交感神経が免疫系に及ぼす影響とそのメカニズムについて研究し、 $\beta_2$ アドレナリン受容体は刺激を受けて活性化すると、リンパ球のリンパ節への保持に関わるケモカイン受容体(CCR7およびCXCR4)とGタンパク共役型受容体同士で複合体を形成し、ケモカイン受容体の反応性が亢進することにより、リンパ球のリンパ節からの脱出を抑制することを明らかにした。さらに、ヒトの多発性硬化症およびアレルギー性皮膚炎のマウスモデルにおいて、 $\beta_2$ アドレナリン受容体を介する刺激を加えることより抗原特異的T細胞のリンパ節からの脱出と炎症部位への移動が阻害され、その結果として症状の進行が抑制されることを明らかにし発表した。今後、病態はもとより日内変動などの生理的条件下におけるこの交感神経によるリンパ球動態の制御についての研究も予定されており、興味が尽きない。本さきがけ研究は新たな研究分野を開拓するものと国内外において評価され、研究者としての飛躍につながった

#### 5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

Nakai, A., Hayano, Y., Furuta, F., Noda, M. and **Suzuki, K. (Corresponding author)**  
Control of lymphocyte egress from lymph nodes through  $\beta_2$ -adrenergic receptors.  
**J. Exp. Med.** Published online on November 24, 2014.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. **鈴木一博**. 「アドレナリン受容体とケモカイン受容体のクロストークによるリンパ球動態制御」, 第37回 日本分子生物学会年会 ワークショップ:免疫受容体による細胞間コミュニケーションの新しい地平線, パシフィコ横浜, 横浜, 2014年11月26日.
2. **Suzuki, K.** Adrenergic control of lymphocyte trafficking. France-Japan Immunology Meeting, Royal Cottage Hotel, Cassis, France, October 23, 2014. Invited.
3. **Suzuki, K.** Imaging the immune system and beyond. The 37<sup>th</sup> Naito Conference, Hilton Niseko Village, Hokkaido, Japan, July 17, 2014. Invited.
4. **Suzuki, K.** Nakai, A. and Hayano, Y. Adrenergic control of lymphocyte dynamics. The 9<sup>th</sup> IMS-JSI International Symposium on Immunology, Pacifico Yokohama, Kanagawa, Japan, June 27, 2014. Invited.
5. **Suzuki, K.** Nakai, A. and Hayano, Y. Adrenergic control of B cell egress from lymph nodes. The 42<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Makuhari Messe, Makuhari, Chiba, Japan, December 13, 2013.

受賞

日本免疫学会研究奨励賞(日本免疫学会、2012年)

プレスリリース

1. 「『病は気から』の実験的証明」, 大阪大学, 2014年11月25日.  
<http://www.ifrec.osaka-u.ac.jp/jpn/research/2014/11/20141125-JEM.php>
2. 「『病は気から』の根拠を実験的に証明」, JST, 2014年11月25日.  
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20141125-2/index.html>
3. 「『病は気から』の仕組みの一端を実証」, サイエンスポータル, 2014年11月25日.  
<http://scienceportal.jst.go.jp/>