

神経ペプチド calcitonin gene-related peptide (CGRP) による皮膚免疫制御

三上統久, 深田宗一朗,* 山元 弘, 辻川和丈

The Regulatory Mechanisms of Calcitonin Gene-related Peptide (CGRP)
in Skin InflammationNorihiisa Mikami, So-ichiro Fukada,* Hiroshi Yamamoto, and Kazutake Tsujikawa
*Laboratory of Molecular and Cellular Physiology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Osaka University; 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan.*

(Received July 30, 2012)

Skin inflammation is one of several allergic symptoms that are regulated by several mediator molecules. One of these molecules, calcitonin gene-related peptide (CGRP) affects several immune cells including T cells, B cells, dendritic cells and mast cells. CGRP binds to CGRP receptors composed of receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1) and calcitonin receptor-like receptor (CLR) to modulate various functions such as pain transmission and vasodilation. Studies showing that CGRP physiologically regulates skin inflammation using a CGRP antagonist, capsaicin-induced depletion model, RAMP1-deficient mice and mouse contact hypersensitivity (CHS) model have been reported. Interestingly, while CGRP has inhibitory effects on Th1-mediated CHS, it was demonstrated that CGRP enhances Th2-mediated CHS response. Moreover, these skin inflammations were affected by elevated CGRP concentrations through an abnormal condition of the nervous system induced by exposure to psychological stress or neonatal chemical stimulation. In this review, we present the importance of CGRP in the regulation of skin inflammation under the several nervous conditions and provide a new insight into understanding various types of skin inflammation and skin diseases.

Key words——calcitonin gene-related peptide; contact hypersensitivity; Th cell; dendritic cell

はじめに

皮膚組織は生体の最外部に位置し、外来抗原に対する物理的な障壁として機能するのみならず、免疫応答が活発に行われる場としても働く、生体における重要な免疫器官の1つである。また、皮膚組織内には多くの知覚神経が存在するが、近年この神経系と免疫系が神経伝達物質やサイトカインなどの共通の情報伝達物質を介してクロストークしていることが明らかとなってきた。皮膚に存在する知覚神経終末からは物理的な接触のほかにも熱や、酸など様々な刺激に応じて神経ペプチドなどの神経伝達物質が放出される一方で、免疫担当細胞はそれらの受容体を発現していることから、神経ペプチドによる免疫応答制御機構の解明と、その制御破綻による免疫疾

患発症との関連性研究が注目されている。そこで本総説では、皮膚に知覚神経が多く存在することに着目し、その神経終末から放出される神経ペプチド、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene-related peptide; CGRP) の皮膚炎症制御機構について最新の知見を含め概説する。

CGRP と CGRP 受容体

CGRP は C 線維から放出される神経ペプチドであり、強い血管平滑筋弛緩作用や痛覚伝達作用を有するだけでなく、T 細胞の増殖制御やマクロファージの抗原提示能抑制、B 細胞からの抗体産生抑制など免疫細胞に対しても多様な作用を示すことが報告されている。¹⁻³⁾ しかしながら、これら CGRP の作用解析はその多くが *in vitro* における検討であり、CGRP の生理活性物質としての役割は不明な点が多い。そこでわれわれは CGRP の生理的な機能について解析を進めるため、CGRP 受容体欠損マウスの作製に着手した。CGRP 受容体は Gs タンパク質共役型 7 回膜貫通タンパク質である calcitonin

The authors declare no conflict of interest.

大阪大学大学院薬学研究科細胞生理学分野 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6)

*e-mail: fukada@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 132 年会シンポジウム S01 で発表したものを中心に記述したものである。

receptor-like receptor (CLR) と 1 回膜貫通型タンパク質である receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1) のヘテロ二量体で構成されている。このうち、RAMP1 は分子構造に共通性を有する RAMP ファミリーに属しており、それ自身リガンド結合能はないが、CLR の細胞膜への移行や CGRP に対する結合特異性の決定を制御している。そこで当研究室では、CGRP 受容体特異的サブユニットである RAMP1 を欠損させたマウスを作製し表現型解析を行った。その結果従来考えられていた通り、RAMP1 欠損マウスでは CGRP の血管拡張作用が消失しており、高血圧症を呈することを明らかにした。⁴⁾

RAMP1 欠損マウスにおける CHS 応答性

そこで CGRP が皮膚炎症において果たす生理的な役割を明らかにするため、われわれは RAMP1 欠損マウスを用いて接触過敏反応 (contact hypersensitivity; CHS) に対する応答性を検討した。代表的な CHS 反応である 2,4,6-trinitrochlorobenzene (TNCB) 誘発性 CHS と fluorescein isothiocyanate (FITC) 誘発性 CHS について検討した結果、RAMP1 欠損マウスは TNCB 誘発性 CHS に対する反応性が低下し、FITC 誘発性 CHS に対して強い応答性を示すということが明らかとなった。⁵⁾ これは CGRP が生理的に CHS を制御していること、そしてハプテンの種類に応じて異なる制御機構が働いていることを示している。

では CGRP はどのような機構によって CHS を制御しているのか。CHS の感作期では①抗原提示細胞のリンパ節への遊走、②抗原提示細胞による T 細胞への抗原提示、③T 細胞の分化・免疫記憶の成立というイベントが起こっている。さらに誘発期においては T 細胞から産生されるサイトカインが炎症応答を惹起する。そこでわれわれは抗原提示細胞と T 細胞に着目し、CGRP の CHS 制御機構解明を目指した。

CGRP による抗原提示細胞の遊走阻害

TNCB 誘発性 CHS の感作期においては Langerin 陽性の抗原提示細胞が所属リンパ節へ遊走することで免疫記憶が成立すると考えられている。⁶⁾ さらに、皮膚に常在する Langerin 陽性細胞には 2 つの異なるサブセットが存在することが知られており、細胞接着分子である CD103 の有無をマーカーとし

て表皮に存在する CD103 陰性のランゲルハンス細胞 (Langerhans cell; LC) と真皮に存在する CD103 陽性 Langerin 陽性真皮樹状細胞 (dermal dendritic cell; dDC) に区別される。そこで、TNCB 感作後のリンパ節に遊走してきた Langerin 陽性細胞集団を CD103 の発現によって識別した結果、CD103 陽性の dDC が増加し、RAMP1 欠損マウスにおいて、その細胞集団の更なる増加が認められた。⁵⁾ また CGRP は樹状細胞の遊走に必須のケモカイン受容体である CCR7 の発現を抑制することも明らかにしており、CGRP の dDC 遊走阻害作用はケモカイン受容体である CCR7 の発現制御に依存する可能性が考えられる。

CGRP による Th1 細胞からのサイトカイン産生制御

CHS の誘発期には T 細胞からの炎症性サイトカイン産生が重要な役割を担っている。皮膚炎症に係わる T 細胞の中でも CD4 陽性ヘルパー T 細胞 (Th 細胞) は産生するサイトカインの種類によっていくつかの機能的なサブセットに分類されている。代表的なものとして IFN- γ を産生することで細胞性免疫に寄与する Th1 細胞や、IL-4, IL-5, IL-6 などを産生して液性免疫に寄与する Th2 細胞が存在する。これらのサブセットは周囲の環境に依存してナイーブ Th 細胞から分化することが知られており、それぞれのサブセット分化を促進する液性因子が数多く同定されている。われわれは現在までに、*in vitro* において CGRP が Th 細胞の分化を Th2 側に偏倚させること、Th 細胞からの IL-4 産生を促進することを明らかとしている。⁷⁾ 一方で TNCB 誘発性 CHS においては T 細胞から産生される IFN- γ が必要不可欠という報告もあることから、⁸⁾ CGRP の T 細胞制御を介した CHS 抑制機構を解析した。TNCB による CHS 誘発後の所属リンパ節細胞を回収し、抗 CD3/CD28 抗体を用いて再刺激した際の IFN- γ 産生量を測定した。その結果、RAMP1 欠損マウス由来 T 細胞では IFN- γ 産生量が高値を示しており、CGRP が生理的に IFN- γ 産生を抑制することで CHS を制御している可能性が示された。⁹⁾

CGRP の Th1 細胞分化に与える影響として、抗原提示細胞からの IL-12 産生抑制作用も挙げられる。IL-12 は主に抗原提示細胞から分泌され、初回抗原提示における Th1 細胞分化に大きく寄与するサイ

トカインである。われわれは CGRP がマクロファージや樹状細胞からの IL-12 産生を抑制することを見い出しており、さらに CGRP が LC からの IL-12 産生を抑制するという報告も存在する。⁹⁾ CGRP のこのような作用も生体内における Th1 細胞分化の抑制に寄与している可能性がある。また、CGRP は LC からの Th1 型ケモカインの産生を抑制し、Th2 型ケモカイン産生を増強するという報告も存在し、¹⁰⁾ 今後さらに皮膚炎症における抗原提示細胞からの液性因子産生に対する CGRP の作用を検討する必要性は大きいと考えられる。

以上のように CGRP は Th1 型の皮膚炎症を様々な細胞に作用することで制御している (Fig. 1)。これらの結果は CGRP の皮膚免疫における生理的重要性を示した。一方で、われわれは CGRP が Th2 型の皮膚炎症反応 (FITC 誘発性 CHS) においては促進的に機能することを明らかにしているが、この FITC 誘発性 CHS では抗原提示細胞の遊走に対する CGRP の作用はみられなかった。⁵⁾ そこで T 細胞に対する作用を中心に CGRP の FITC 誘発性 CHS 増強機構の解析を進めた。

CGRP による FITC 誘発性 CHS 増強機構

Th 細胞に着目した検討から、TNCB 誘発性 CHS と FITC 誘発性 CHS では分化誘導される Th 細胞のサブセットが異なる偏りをみせることが報告されている。つまり TNCB 誘発性 CHS では Th1 細胞

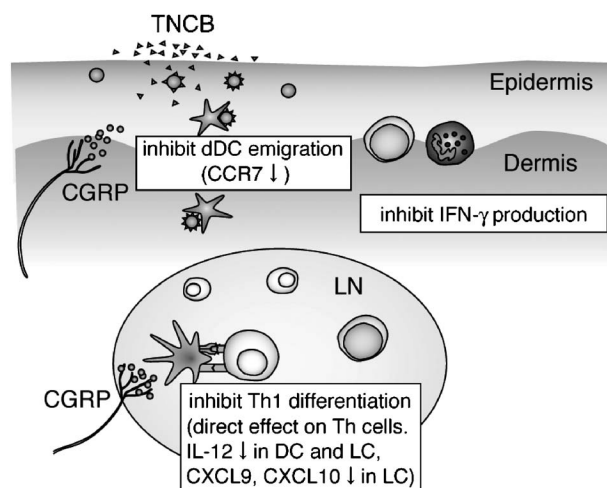


Fig. 1. CGRP Suppresses Th1-mediated TNCB-CHS

CGRP regulates TNCB-CHS through (1) inhibition of dDC migration by CCR7 down-regulation, (2) inhibition of Th1 cell differentiation by IL-12 or chemokine down-regulation in antigen presenting cells and (3) direct inhibition of Th1 cell differentiation and IFN-γ production in T cells.

が、FITC 誘発性 CHS では Th2 細胞が優位に誘導されることが示されている。^{11,12)} そこで FITC により CHS 誘導後、マウスから所属リンパ節を回収し、抗 CD3/CD28 抗体を用いて再刺激した際に産生されるサイトカイン量を cytometric bead array (CBA) 法によって測定した結果、FITC 誘発性 CHS では無処置のマウスと比較して特に Th2 型のサイトカイン (IL-4, IL-5, IL-6) が高値を示していた。さらに、RAMP1 欠損マウスでは特に IL-4 の顕著な産生抑制が認められ、CGRP シグナルが欠損することで IL-4 産生が十分に行われなくなることが示された。この結果は CGRP が生体内において Th2 細胞分化を促進し、IL-4 産生を増強することで FITC 誘発性 CHS を促進させることを示唆した。

一方、皮膚組織における Th2 型免疫応答増強メカニズムの 1 つとして LC に対する CGRP の作用も報告されている。炎症反応において、抗原提示細胞は Th1 細胞や Th2 細胞それぞれに特異的なケモカインを放出することで、これらの細胞を活性化する機構を備えている。Th2 細胞特異的なケモカイン受容体として CCR4 が発現しており、そのリガンドである CCL17 や CCL22 によって誘引される。Ding らは LC から放出される CCL17 や CCL22 の量を CGRP が増強することで Th2 型の免疫応答を促進することを報告している。¹⁰⁾ さらに異なる機構として、*in vitro* における検討では CGRP がマスト細胞の脱顆粒を促進することも知られている。¹³⁾ このように CGRP は生体内において Th2 型免疫応答を強く促進する因子であり、その様々な作用によって Th2 型 CHS を増強していると考えられる (Fig. 2)。

精神的ストレス応答時における CGRP の役割

以上のように CGRP は皮膚炎症を多様なメカニズムで制御している。また、CGRP は神経系に由来する物質であり、神経系に様々な異常が生じることでその量が変化することが予想される。実際に、精神的なストレスを暴露することで、CGRP の発現が上昇し、炎症反応に対する応答性が変化することが報告されている。¹⁴⁾ また、われわれもマウスへのストレス暴露によって血中 CGRP 濃度の顕著な上昇を認めている。そこで精神的なストレス暴露と皮膚炎症の関係における CGRP の重要性について

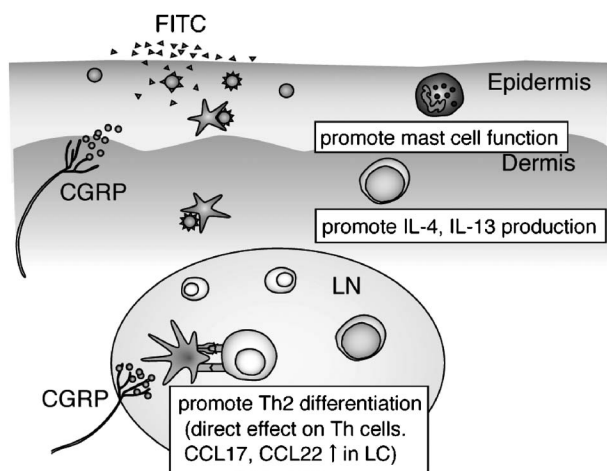


Fig. 2. CGRP Enhances Th2-mediated FITC-CHS

CGRP promotes FITC-CHS through (1) induction of Th2 cell differentiation by Th2 related chemokine up-regulation in antigen presenting cells, (2) direct induction of Th2 cell differentiation and Th2-related cytokine production and (3) promotion of mast cell degranulation, although CGRP does not affect antigen presenting cell migration in FITC sensitization phase.

評価した。

CHS 感作時に野生型マウスに拘束ストレスを与えることで TNCB 誘発性 CHS が抑制され、FITC 誘発性 CHS は亢進するという結果が得られた。そして興味深いことに RAMP1 欠損マウスではそのような作用がみられない (unpublished data)。ヒトにおいても経験的にストレスがアトピー性皮膚炎を増強することが知られており、これらの知見はその分子機構には神経終末からの CGRP の増強と CLR/RAMP1 を介した免疫担当の細胞の制御機構が関与している可能性を示している。

新生仔期化学物質暴露モデルにおける CGRP の役割

最後にマウスの新生仔期に化学物質を塗布して知覚神経刺激を与えることで成体における CGRP 含有知覚神経の分布を変化させたモデルを紹介する。一般的に新生仔期における持続的な神経刺激は成体における神経分布を変化させることが知られている。¹⁵⁾ そこで生後 5-7 日目のマウスにホルムアルデヒドを塗布することで刺激を与え、6 週齢において皮膚組織中の CGRP 含有神経を観察したところ、その伸長が確認できた。そこでこのモデルマウスに CHS を誘導してその応答性を評価すると、やはり TNCB 誘発性 CHS が抑制され、FITC 誘発性 CHS は亢進するという結果が得られた (unpublished data)。そして RAMP1 欠損マウスではその作用が

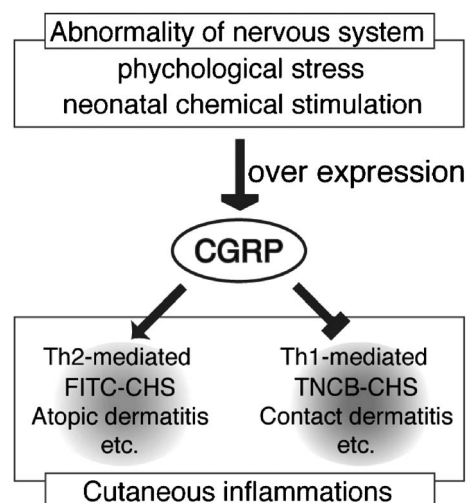


Fig. 3. CGRP Is an Important Regulator of Cutaneous Immunity under the Abnormal Nervous Conditions

Abnormal nervous system induces high CGRP levels to change reactivity of skin inflammation. These changes are not observed in RAMP1-deficient mice, suggesting that CGRP plays an important role in skin inflammations.

消失していることも確認している。このように様々な皮膚炎症において CGRP が生理的な役割を担っていると考えられる。

おわりに

以上のように CGRP は抗原提示細胞や T 細胞を始め、様々な細胞に対して作用し、皮膚免疫応答を制御していると考えられる。さらにその役割は二面的であり、Th1 型の皮膚炎症反応には CGRP が抑制的に働く一方で Th2 型の皮膚炎症反応を促進するという作用を持っていることが示唆された。これは皮膚炎症そのものが多様な細胞によって様々なタイプの免疫応答が引き起こされる複雑な反応であることと、CGRP の多様な制御機構が原因である。また、神経系に異常が起きることで、CGRP の産生量に変化し、皮膚炎症の応答性が複雑に変化する可能性も示されてきた (Fig. 3)。本総説では皮膚炎症を大きく 2 つのタイプに分けて論じてきたが、近年、Th1 細胞や Th2 細胞に加え新規 Th 細胞サブセットである Th17 細胞が皮膚炎症に寄与することや、¹⁶⁾ CGRP が Th17 細胞分化を促進することも明らかとなっており、¹⁷⁾ まずまずその制御の複雑さが窺える。そこで皮膚炎症における神経ペプチドの役割を完全に解明し、アレルギー疾患の新規治療戦略を打ち出すためにも、これら神経ペプチドが「どのような皮膚炎症反応においてどのような制御を行っているのか」という包括的な解析が行われ、

皮膚炎症の発症機序解明が進展することを期待する。

謝辞 本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金、一般社団法人日本化学工業協会 長期自主研究 (LRI) 助成金を受けて行われました。

REFERENCES

- 1) Boudard F., Bastide M., *J. Neurosci. Res.*, **29**, 29–41 (1991).
- 2) Liu J., Chen M., Wang X., *Immunology*, **101**, 61–67 (2000).
- 3) McGillis J. P., Humphreys S., Rangnekar V., Ciallella J., *Cell. Immunol.*, **150**, 391–404 (1993).
- 4) Tsujikawa K., Yayama K., Hayashi T., Matsushita H., Yamaguchi T., Shigeno T., Ogitani Y., Hirayama M., Kato T., Fukada S., Takatori S., Kawasaki H., Okamoto H., Ika-wa M., Okabe M., Yamamoto H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 16702–16707 (2007).
- 5) Mikami N., Matsushita H., Kato T., Kawasaki R., Sawazaki T., Kishimoto T., Ogitani Y., Watanabe K., Miyagi Y., Sueda K., Fukada S., Yamamoto H., Tsujikawa K., *J. Immunol.*, **186**, 6886–6893 (2011).
- 6) Bennett C. L., van Rijn E., Jung S., Inaba K., Steinman R. M., Kapsenberg M. L., Clausen B. E., *J. Cell Biol.*, **169**, 569–576 (2005).
- 7) Tokoyoda K., Tsujikawa K., Matsushita H., Ono Y., Hayashi T., Harada Y., Abe R., Kubo M., Yamamoto H., *Int. Immunol.*, **16**, 643–653 (2004).
- 8) Saulnier M., Huang S., Aguet M., Ryffel B., *Toxicology*, **102**, 301–312 (1995).
- 9) Torii H., Hosoi J., Beissert S., Xu S., Fox F. E., Asahina A., Takashima A., Rook A. H., Granstein R. D., *J. Leukoc. Biol.*, **61**, 216–223 (1997).
- 10) Ding W., Stohl L. L., Wagner J. A., Granstein R. D., *J. Immunol.*, **181**, 6020–6026 (2008).
- 11) Hayashi M., Higashi K., Kato H., Kaneko H., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **177**, 38–45 (2001).
- 12) Hopkins J. E., Naisbitt D. J., Kitteringham N. R., Dearman R. J., Kimber I., Park B. K., *Chem. Res. Toxicol.*, **18**, 375–381 (2005).
- 13) De Jonge F., De Laet A., Van Nassauw L., Brown J. K., Miller H. R., van Bogaert P. P., Timmermans J. P., Kroese A. B., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, **287**, 178–191 (2004).
- 14) Kawaguchi Y., Okada T., Konishi H., Fujino M., Asai J., Ito M., *Clin. Exp. Immunol.*, **109**, 397–401 (1997).
- 15) Brauer M. M., Lincoln J., Milner P., Sarner S., Blundell D., Passaro M., Corbacho A., Burnstock G., *Int. J. Dev. Neurosci.*, **12**, 579–586 (1994).
- 16) van Beelen A. J., Teunissen M. B., Kapsenberg M. L., de Jong E. C., *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, **7**, 374–381 (2007).
- 17) Mikami N., Watanabe K., Hashimoto N., Fukada S., Yamamoto H., Tsujikawa K., *Int. Immunol.*, 2012. (in press)