

学位論文

「RAMP1 suppresses mucosal injury from dextran sodium
sulfate-induced colitis in mice. 」

(RAMP1 はマウスにおけるデキストラン硫酸ナトリウム誘発腸炎の粘膜損傷を抑制する)

指導教授名 渡邊 昌彦

申請者氏名 武田 憲子

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要旨

【序論】

カルシトニン遺伝子関連ペプチド（以下 CGRP）は中枢・末梢に広く分布する神経伝達ペプチドであり、そのひとつとして腸管運動の調節に関与している。この CGRP 受容体は receptor activity-modifying protein（以下 RAMP）1 が calcitonin receptor-like receptor（以下 CRLR）と結合して構成される。今回我々は、実験的に大腸炎を誘発したマウスを用いて CGRP の役割を検討した。

【方法】

マウスの大腸炎はデキストラン硫酸ナトリウム（以下 DSS）で誘発した。DSS は飲用水に溶解して投与すると腸管粘膜に炎症を引き起こして腸炎の状態を形成する。コントロール（以下 WT）マウス、CGRP 受容体拮抗薬（CGRP₈₋₃₇）を投与したマウス、RAMP1 ノックアウト（RAMP1^{-/-}）マウスの 3 群を比較して腸炎の重症度との関連を調べた。DSS を投与されたマウスは下痢・血便・体重減少といった腸炎の症状を呈する。組織的な炎症の評価の指標として、腸管粘膜の病理学的変化、組織内の炎症細胞浸潤、炎症性サイトカインの濃度を用いて計測した。

【結果】

DSS を投与されたマウスは腸炎となり、その炎症の重症度は WT 群よりも CGRP₈₋₃₇ 群、さらに RAMP1^{-/-} 群で著明に高度であった。体重減少率、血便による貧血の進行度、炎症による腸管短縮率、病理学的炎症グレードともに同じ結果であった。

また、PAS 染色陽性の細胞数は、WT 群よりも CGRP₈₋₃₇ 群で減少、さらに RAMP1^{-/-} 群でさらに減少したことから、粘膜を保護する粘液の減少も炎症の程度と同じ差を示した。同様に 3 群での炎症性細胞（マクロファージ、肥満細胞、T 細胞）が誘導される程度にも差を認めた。マクロファージ、肥満細胞から産生される局所組織内の炎症性サイトカイン濃度の上昇も認められ、tumor necrosis factor (TNF)- α と interleukin (IL)-1 β は、WT 群より CGRP₈₋₃₇ 群で増加し、さらに RAMP1^{-/-} 群で増加した。T 細胞に関しては、Th 細胞から産生される Th1 サイトカイン（インターフェロン (IFN) - γ ）と Th17 サイトカイン（IL-17）も同様に上昇したが、他のケモカインに関しては有意な差を認めなかった。

【考察】

DSS により腸炎が誘発され、その炎症における CGRP の抑制効果を示す実験を行った。CGRP₈₋₃₇ と RAMP1^{-/-} に差がでた理由は、CGRP₈₋₃₇ は受容体シグナル（かつての CGRP1 受容体のみブロック）を遮断するのにに対し受容体要素である RAMP のノックアウトではすべての CGRP が遮断される（かつての CGRP1、2 ともに遮断される）ためである。その結果、

CGRP は WT 群では効果を保ち、CGRP₈₋₃₇ 群では効果が抑制され、RAMP1^{-/-} 群ではさらに抑制された状態で、その CGRP 有効率に随伴して炎症の指標が強くなっていることから、CGRP は腸炎に対して抑制効果を持つと考えられた。

またそれに従い、DSS 誘発腸炎ではマクロファージ、肥満細胞が誘導され、各種ケモカインの上昇を認めた。マクロファージに関しては M1 の増加を認め M2 は有意差を認めなかった。肥満細胞も serine protease 等の放出をして炎症を惹起すること、また臨床での肥満細胞が腸炎で増加している報告から腸炎に関わると予想され、今回の結果もふまえて DSS 誘発腸炎で同様の結果を得たことから CGRP との関与が示唆されるものの、詳細なメカニズムはまだ不明である。リンパ球に関しては、やはり DSS 誘発腸炎の炎症に関わる要素であるが、B 細胞は関与せず T 細胞のみ炎症と関連し、特に今回 Th1/Th17 で同様の有意な結果を得た。

中枢・末梢神経系に広く分布する CGRP が腸管の動きを制御するという以前の報告から、CGRP の抑制による蠕動低下だけではなく、今回の腸炎では血便による貧血の進行、腸管の委縮による短縮、病理所見での炎症の増悪、粘膜を守る粘液を産生する胚細胞が減少した事象も DSS による腸管粘膜への直接的な侵襲を示唆している。そして、CGRP の抑制により各炎症の指標が増悪、さらに CGRP₈₋₃₇ よりも RAMP1^{-/-} で増悪の所見が増加していることが示された。

【総括】

本研究により、CGRP/RAMP1 が腸炎に関与しその炎症所見の程度の差から、CGRP は DSS 誘発腸炎に対して炎症抑制効果をもつことを示した。炎症性腸疾患 (IBD) をはじめ、非ウイルス性の腸炎に対して CGRP を介してこの腸管神経を調整し効果が得られることが、臨床の場に有用であることを期待する。

目次

	頁
1. 序論	1
2. 方法	
2-1. 動物	2
2-2. 病理	2
2-3. 大腸のサイトカイン測定	2
2-4. 免疫染色	2
2-5. RT-PCR	3
2-6. 統計	3
3. 結果	
3-1. 大腸のダメージパラメータ	3
3-2. 粘膜のムチンの形態学的変化	4
3-3. サイトカイン	4
3-4. 炎症性細胞浸潤	4
3-5. ケモカイン発現	4
3-6. 浸潤細胞上の CGRP 受容体	5
3-7. M1 または M2 の発現	5
3-8. ヘルパーT細胞の発現	5
4. 考察	6
5. 引用文献	9
6. 図表	13

1. 序論

カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は 37 のアミノ酸でできた中枢、末梢に広く分布する神経伝達物質である^{1,2}。CGRP の免疫反応は消化管の筋層間や粘膜下の神経叢で作用し³、例えば消化管や腸間膜の血流、胃酸分泌、消化管の動きを調整する機能を持つ^{4,5}。我々はかつて CGRP が胃潰瘍の修復に寄与することを示してきた⁵。Li らは臨床において炎症性腸疾患 (IBD) で CGRP の mRNA 発言が減少していると報告し⁶、Thompson らは腸炎に対する CGRP の保護効果を報告した⁷。Reinshagen らは、CGRP を免疫学的不活性にしたり拮抗薬 CGRP₈₋₃₇ を投与したものは、2,4,6 トリニトロベンゼンスルホン酸で処理した腸炎を増悪させると報告したこと⁸、CGRP にはなんらかの腸炎の程度を左右させる役割があると考えられた。

CGRP 受容体は、7 回膜貫通型 G タンパクである calcitonin receptor-like receptor (CRLR) と 1 回膜貫通型タンパクの receptor-associated modifying protein (RAMP1) で構成されており^{9,10}、CGRP₈₋₃₇ により拮抗されることが分かっている^{2,9}。

ここで、我々はこの CRLR/RAMP1 受容体が、CGRP₈₋₃₇ で拮抗させたマウスと RAMP1 ノックアウト (RAMP1^{-/-}) マウスで、どのように機能が変わるかを調べた。

2. 方法

2-1. 動物

RAMP1 ノックアウトマウス (RAMP1^{-/-}) は共著者の施設より提供された¹¹。日本クレア社の C57BL/6 マウスの 9 週オスを wild type (WT) とし、1-2 週間飼育して体重変化を安定させた後、床面が網構造で室温湿度が一定に保たれ、18 時-翌 6 時の 12 時間暗室サイクルが保持された部屋で飼育された。実験前に体重とヘマトクリットを計測し、7 日目に同様に計測したのち解剖し腸管検体を摘出した。北里大学医学部遺伝子高次機能解析センターのガイドラインに従って実施された。

腸炎は 36000-50000 分子のデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) (MP Bio Japan 社) を 1% の水溶液にして、7 日間マウスに自由水として与えることにより誘発した¹²。マウスの背側皮下に埋め込んだ Alzet ポンプ® (室町機械株式会社) に CGRP₈₋₃₇ (Tocris Bioscience, Wako Pure Medical Industries) を生理食塩水で溶解したものを充填し、3 μ g/h で皮下持続投与した⁸。

各群につき 5 匹で実験を行い、DSS 投与群と非投与群、また WT と比較検討した。

実験前の評価パラメータは体重、ヘマトクリット値で、7 日後の評価パラメータとして、体重、ヘマトクリット値、便性、腸管出血、腸管の長さを計測した^{8,13,14}。

2-2. 病理

大腸の腸管検体は縦に切開し便は洗い流し、近位側から 1 cm 長で切り検体とし 10%ホルマリンに浸透させた。パラフィンに包埋し薄切した後 HE 染色を行い観察した。病理スコアは、grade 0=正常、grade 1=軽度炎症と細胞浸潤（陰窩炎に陰窩膿瘍を伴う、またはどちらか）、grade 2=杯細胞の脱落や粘膜びらんを伴った炎症と細胞浸潤、とした。免疫染色は、avidin-biotin-peroxidase 法と LSAB2 キット（Daco 社）を用いた。内在性 peroxidase 活性は 0.3% H_2O_2 で失活させ、組織は 0.005% H_2O_2 を含んだ 50mM の Tris-HCl (pH7.6) で 10%ブタ血清、抗トリプターゼモノクローナル抗体（abcam 社）、ビオチン抗マウス免疫グロブリン、ストレプトアビジンホースラディッシュペルオキシダーゼ、0.02%3,3 ジアミノベンジジンでインキュベートした。対比染色はヘマトキシリンで行い、各モノクローナル抗体の免疫組織化学反応は光学顕微鏡で観察した。

2-3. 大腸のサイトカイン測定

組織は 2%の Triton-Tris バッファーを含んだ pH2 の 50mM の Tris-HCl の中に浮遊、ホモジナイズし 1 時間 37°C でインキュベートした。4°C30 分で 8000g 遠心分離の後、上清を回収した。TNF α 、IL-1 β は ELISA キット（Quntikine ELISA kit, R&D systems）で定量した^{8,15}。

2-4. 免疫染色

組織は 0.1M リン酸ナトリウムバッファー (pH7.4) を用い 4°C4 時間 4%パラホルムアルデヒドで固定した後¹⁶、30%ショ糖/0.1M リン酸バッファー (pH7.2) で凍結保護し、低温槽を使って検体を 8 μ m に薄切した。薄切は 1%ウシ血清アルブミン/リン酸バッファーで、非特異的な結合をしないように室温で 1 時間のインキュベーションをした。インキュベーション時の抗体は、ウサギ由来の RAMP1 抗体（Bioss 社）、ヤギ由来の CRLR 抗体（Santa Crus Biotechnology 社）、ラット由来の F4/80 モノクローナル IgG2a 抗体（Santa Crus Biotechnology 社）、ラット由来の CD3 抗体（Southern Biotech Associates 社）、ラット由来の B220 抗体（Southern Biotech Associates 社）、

ヤギ由来の tryptase 抗体 (Santa Crus Biotechnology 社)、ウサギ由来の TNF α 抗体 (Abcam 社)、ウサギ由来の IL-1 β 抗体 (Bioss 社)とした。リン酸バッファーで3回すすいだ後、室温1時間で2次抗体の反応をさせた。その抗体は、ロバ由来の抗ウサギ IgG 抗体の Alexa Fluor 488 色素、ロバ由来抗ラット抗体 Alexa Fluor 594 色素、またはロバ由来抗ヤギ抗体 Alexa Fluor 594 色素を用いた。イメージは蛍光顕微鏡 (Biozero BZ-9000 シリーズ) で観察した。標識化した後、5か所の領域で腸管を観察し (拡大 x100)、その染色陽性細胞の数をカウントした。結果は、1分野あたりの陽性細胞の数をカウントして得た。

2-5. RT-PCR

IL-4、IL-6、IL-9、IL-10、IL-17、IFN- γ 、iNOS、mannose 受容体、Fizz1、TGF β 、CCL2、CCL3、CCL5、CCL7、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase は RT-PCR で計測した。RNA は上皮ではなく肉芽組織から抽出し TRIzol (Gibco-BRL/Life Technologies 社)で均一化した。一本鎖 cDNA は RNA の 1 μ g から、ReverTra Ace (Toyobo 社)を使って逆転写により得た。定量的 PCR 増幅は SYBR Premix Ex Tag (Takara 社)で行った。遺伝子特有のプライマーは付録表 1 にある通りで、各サンプルでデータは glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase で正常化した。

2-6. 統計

統計的有意性は、Bonferroni の post-hoc test により一方向分散解析で行われ、平均 \pm SD で示され $P < 0.05$ を有意差ありとした。

3. 結果

3-1. 大腸のダメージパラメータ

体重減少率は、CGRP₈₋₃₇ 群では WT 群よりも大きく、RAMP1 β 群は更に大きい (図 1a)。WT 群では便性はややゆるく、CGRP₈₋₃₇ 群は中等度の下痢、RAMP1 β 群は高度の下痢を呈した。また WT 群はわずか、CGRP₈₋₃₇ 群は中等度、RAMP1 β 群は高度の腸管出血を示した (図なし)。ヘマトクリット値は、CGRP₈₋₃₇ 群で WT 群の 2 倍減少し、RAMP1 β 群は更に減少した (図 1b)。腸管長は、CGRP₈₋₃₇ 群は WT 群より短縮し、RAMP1 β 群は更に短縮した (図 1c)。組織学的評価は、DSS 投与により WT 群にも炎症所見を認め (図 2a) ており、CGRP₈₋₃₇ 群と RAMP1 β 群では WT 群より炎症は高度で、病理学的グレー

ドでは CGRP₈₋₃₇ 群は WT 群の 2 倍、さらに RAMP1^{-/-} 群はそれよりも高値を示した (図 2b)。この結果より、内因性 CGRP/RAMP1 シグナリングが DSS 誘発腸炎に対して保護的な効果を制御する不可欠なものであると考えられる。

3-2. 粘膜のムチンの形態学的変化

PAS 染色陽性細胞の数は、CGRP₈₋₃₇ 群で WT 群よりも少なく、RAMP1^{-/-} 群ではさらに少ない (図 3a,b)。このデータにより、大腸の炎症の程度とムチン産生の関係性が考察される。

3-3. サイトカイン

CGRP₈₋₃₇ 群では TNF α は WT 群より高値で、RAMP1^{-/-} 群では更にそれより 1.6 倍高値であった。IL-1 β では CGRP₈₋₃₇ 群では WT 群より 4 倍高値を示し、RAMP1^{-/-} 群では CGRP₈₋₃₇ 群より 1.8 倍の高値を示した (図 4a,b)。これらのデータにより、局所的な炎症反応はサイトカイン産生と関連し、CGRP₈₋₃₇ 群と RAMP1^{-/-} 群では増加し、特に RAMP1^{-/-} 群では著明な炎症の程度を示している。

3-4. 炎症性細胞浸潤

DSS で腸炎を誘発した WT マウスの腸管に白血球浸潤を認めた。CGRP₈₋₃₇ 群と RAMP1^{-/-} 群では WT 群よりも浸潤が増加した (図 5a)。3 群間で Gr1 陽性細胞の数に有意差は無かった。F4/80 陽性細胞 (マクロファージ) は、RAMP1^{-/-} 群で WT 群と CGRP₈₋₃₇ 群よりも有意に増加したが、CGRP₈₋₃₇ 群は WT 群よりも有意に増加はしなかった。CD3 陽性細胞 (T 細胞) は RAMP1^{-/-} 群で WT 群と CGRP₈₋₃₇ 群よりも有意に増加したが、WT 群と CGRP₈₋₃₇ 群間には有意差は無かった (図 5b)。B220 陽性細胞 (B 細胞) は 3 群間に有意差は無かった。Tryptase 陽性細胞 (肥満細胞) は RAMP1^{-/-} 群で WT 群と CGRP₈₋₃₇ 群よりも有意に増加した (図 5c)。これより、DSS 誘発腸炎におけるマクロファージや T 細胞と同様に、肥満細胞が炎症との関連性を持つことが示唆された。

3-5. ケモカイン発現

DSS 誘発腸炎において、RAMP1^{-/-} 群では WT 群に比較して有意にマクロファージや肥満細胞が腸管で増加した (図 5)。炎症性細胞はケモカインにより誘導されるため、我々はその値を RT-PCR を用いて DSS 腸炎における mRNA の値として得た (図 6a,b,付録図 1A,)。PCR 解析で求める mRNA 値には、CCL2、CCL5、CCL7 では RAMP1^{-/-} 群で WT 群よりも高く、CCL3 では有意に高かった。

3-6. 浸潤細胞上の CGRP 受容体

マクロファージや肥満細胞などの浸潤細胞が、DSS 誘発腸炎において RAMP1 を発現しているかを調べた。CGRP の受容体は RAMP1/CRLR と前述した通りである。RAMP1 と CRLR の二重蛍光抗体染色法により双方は共発現していると示した (付録図 2A)。この細胞は腸管粘膜下にありその発現は炎症細胞の表面に認められた。次に、マクロファージと肥満細胞を含む炎症細胞が RAMP1 を発現するか調べた。二重染色により RAMP1 は F4/80 陽性細胞や tryptase 陽性細胞で共発現すると示した (図 7a,b)。他の T 細胞や B 細胞のような炎症細胞には RAMP1 は発現するのだろうか。B220 陽性細胞では見られなかったが CD3 陽性細胞では共発現が見られた (付録図 2B,C)。さらにまた、TNF α や IL-1 β などの炎症誘発性サイトカインが腸炎により増加することから、マクロファージや肥満細胞がこれらを産生するかということ調べた。結果は、F4/80 陽性細胞と tryptase 陽性細胞は TNF α と IL-1 β を発現し (図 7c-f)、これよりマクロファージと肥満細胞は TNF α と IL-1 β を産生することが示唆された。

3-7. M1 または M2 の発現

近年、マクロファージは 2 つのグループに分類されている。これまでの活性型マクロファージ (炎症誘発型 M1 タイプ、M1 マクロファージ) と変性型マクロファージ (組織修復型 M2 タイプ、M2 マクロファージ) とに分類される¹⁸。大腸組織内のマクロファージは、RT-PCR により M1 と M2 に分析された。我々は mRNA を分析するにあたり、M1 に関しては iNOS と IL-6 を、M2 に関しては mannose 受容体、IL-10、TGF- β 、Fizz1 を調べた (図 6c,d, 付録図 1C,D,E,H)。これにより、iNOS に関してのみ CGRP₈₋₃₇ 群と RAMP1⁻群では WT 群よりも高値であった (図 6c)。これより DSS 誘発腸炎では RAMP1⁻群では M1 マクロファージが累積していることが示唆された。

3-8. ヘルパー-T 細胞の発現

図 5b にあるように、T 細胞は RAMP1⁻群で増加しており、DSS 誘発腸炎で T 細胞がその進行に関わっていることを示唆した。そのため、Th タイプ 1 (Th1)、Th2、Th9、Th17 を含むヘルパー-T (Th) サイトカインを PCR で調べた。IFN γ を含む Th1 サイトカインは RAMP1⁻群では WT 群よりも高値であった (図 6e)。Th2 と Th9 サイトカインに対しては、IL-4 と IL-9 の mRNA を調べた。IL-4 に関しては群間で有意差がなかった (付録図 1F) が、IL-9 に関しては 3 群とも検出されなかった (付録図 1G)。対照的に Th17 サイトカイン

ンの発現に関して、IL-17はRAMP1^{-/-}群においてWT群やCGRP₈₋₃₇群に比べて上方制御されていた。IL-6やTGF- β はTh17細胞分化の重要分子であるから、IL-6やTGF- β のmRNA発現を調べた。結果は3群間で有意な差はなかった(付録図1C,H)。

4. 考察

先行の研究において、我々は、胃潰瘍の治癒過程の胃粘膜でCGRP発現が増加したことを示し^{5,19,20}、胃でのCGRPの役割を明らかにしたことを報告した。加えて、下部消化管の炎症に対する保護作用も推測されたが^{6,8}、内因性CGRPが予防的効果を示すメカニズムは完全には分かっていなかった。従って、我々は、CGRP拮抗薬CGRP₈₋₃₇の処理を加えたマウスやRAMP1をノックアウト(RAMP1^{-/-})したマウスを用いて、DSSで腸炎を誘発することで研究を行った。CGRPはRAMP1とCRLRから成る受容体に結合する。CGRP₈₋₃₇は主にCGRP受容体シグナルを遮断する^{21,22}。RAMP1はCGRP活性を補助する重要な受容体であるから、*in vivo*においてRAMP1^{-/-}マウスモデルはCGRPとRAMP1の役割を明らかにするために適切であると考えられる¹⁶。この仮定の上で、我々は今回の実験のデザインをした。

本実験で、RAMP1の遺伝子的欠損や薬理的抑制によりDSS誘発腸炎が悪化することを示した。特に、WTと対照的に、RAMP1^{-/-}マウスではDSS投与下での腸管においてマクロファージや肥満細胞の誘導が著明であり、それはTNF α やIL-1 β を含む炎症誘発性サイトカインが関与している。RAMP1^{-/-}マウスでは、腸管粘膜下においてT細胞浸潤が増加しており、同様にTh1/Th17サイトカインとしても表れていた。これらの結果から、RAMP1シグナリングがDSS誘発腸炎においてマクロファージや肥満細胞やT細胞の浸潤を抑制し、炎症を予防する効果を及ぼすことを示している。

炎症細胞の増加はケモカインにより誘導されることから、我々はDSS誘発腸炎におけるいくつかのケモカインを調べた。RAMP1^{-/-}マウスではCCL3の発現が増加し、それによりマクロファージや肥満細胞の誘導につながる²³。これらの結果から、RAMP1^{-/-}マウスにおいて、上方制御されたケモカインがマクロファージや肥満細胞の誘導につながることは分かったが、RAMP1シグナリングがCCL3発現に対して下方制御するメカニズムは明らかになっていない。

大腸における局所の炎症をみるために炎症性サイトカインを計測すると、TNF α やIL-1 β に関してはWT群と比較して、CGRP₈₋₃₇群とRAMP1^{-/-}群で増加していた。これらの結果を整合し、RAMP1^{-/-}マウスでは内因毒性のTNF α

を含む炎症誘発サイトカインを増加させたことから、内因性 CGRP の強力な抗炎症性活性について示唆された¹¹。さらにマクロファージや肥満細胞を含む炎症性細胞は、DSS 誘発腸炎において CGRP₈₋₃₇ 群と RAMP1^{-/-}群で組織内に蓄積されており、同様に炎症性サイトカインも放出されている^{19,24,25}。RAMP1^{-/-}群でのサイトカインは CGRP₈₋₃₇ 群に比較して有意に高く、炎症所見の重症度も反映していた。これまでの過去²⁶や我々の報告に^{16,27} 合致する通り、今回我々は、DSS 誘発腸炎においてマクロファージと肥満細胞が RAMP1 を発現していることを示した。実際に、Eftekhari らは RAMP1 がラット硬膜に発現していることを報告した²⁶。我々はまた、RAMP1 が傷害したマクロファージに発現していること¹⁶、RAMP1 の mRNA を骨髄から遊離した肥満細胞に認めたこと²⁷を報告した。これよりマクロファージと肥満細胞が TNF α や IL-1 β を産生するように見え^{28,29}、また今回の結果から RAMP1 シグナリングは蓄積されたマクロファージや肥満細胞から TNF α や IL-1 β の産生を抑制していることが分かった。

M1 や M2 マクロファージに関して、TNF α や IL-1 β に加えて iNOS のような M1 マクロファージ標識は、RAMP1^{-/-}群で WT 群よりも増強され、M2 マクロファージ標識に関しては有意差を認めなかった。このことから、炎症誘発性 M1 マクロファージが RAMP1^{-/-}マウスにおける腸管ダメージを引き起こすことが示唆された。

腸管の肥満細胞は腸炎を起こす要因であり³⁰、臨床においても IBD 患者では肥満細胞の数は多い³¹。Kurashima らは肥満細胞の活性化が腸炎を発症させ、また増悪を誘発することを示した²⁸。別の報告によれば、肥満細胞の減少により DSS 誘発腸炎の改善が見られ、TNF α などの炎症メディエーターの減弱と関与していた²⁹。また RAMP1 シグナリングが腸管にいる肥満細胞を抑制することで DSS 誘発腸炎を軽快し、加えて TNF α や IL-1 β などの炎症誘発サイトカインの産生を減少させた¹¹という報告がある。炎症性細胞の不活性化により、神経系からの CGRP の持続的な放出が炎症を抑制する。肥満細胞はまた、セリンプロテアーゼなどの種々の炎症性メディエーターを放出し組織傷害を呈する^{30,32}。肥満細胞プロテアーゼ 6 欠損マウスでは DSS 誘発腸炎において炎症が軽減する³²という報告もあった。

肥満細胞やマクロファージが、CGRP₈₋₃₇ マウスの腸管粘膜で遊走してこない理由は明らかではない。これはケモカインの値が違うことにも示されている (図 6a,b,付録図 1A,B)。それにも関わらず、CGRP₈₋₃₇ の作用がケモカイン発現と反映しない理由は、RAMP1 の遺伝子的欠損とともにみてもはっきりしない。加えて、CGRP₈₋₃₇ と RAMP1^{-/-}の作用の差は、CGRP₈₋₃₇ の薬理学的特性の差にあるだろう。それは CGRP₈₋₃₇ が親水性ペプチド拮抗薬であり、血中で容易

に分解するものであることも一つであろう。また CGRP₈₋₃₇ の親和性が組織により違いがあるという説もある。結果、CGRP₈₋₃₇ がすべての拮抗作用を発揮することができず、RAMP1^{-/-}よりも拮抗としての効果が低かったものと考えられる。

リンパ球も DSS 誘発腸炎の原因となる。この研究でも B 細胞ではなく T 細胞が RAMP1^{-/-}マウスで WT マウスよりも増加したことから、RAMP1 により DSS 誘発腸炎で T 細胞の誘導が抑制されると考えられる。さらに、CGRP は Th1 を抑制し、Th2、Th9、Th17 を活性化する³³⁻³⁶。RAMP1 シグナリングは Th1 サイトカイン (IFN γ) の発現を下方制御することが示されている。これらの結果は、CGRP が *in vitro* でも *in vivo* でも IFN γ の産生を抑制するという我々の以前の結果と整合性を持つものである^{33,34}。また、今回の結果から、RAMP1 シグナリングは IL-17 産生を抑制し、DSS 誘発腸炎の進行を軽減したと考えられた。しかしながら、自己免疫性脳脊髄炎マウスの実験において CGRP が IL-17 産生を促進したという報告とは異なっている可能性がある³⁵。従って、IL-17 に対する CGRP の作用は実験の条件で違ってくるかもしれないこと、DSS 誘発腸炎で RAMP1 シグナリングが Th1 や Th17 細胞のどのように関与するかは、今後明らかにされると考えられる。

予想されるように、CGRP₈₋₃₇ 群と RAMP1^{-/-}群はともに体重減少を示し、ヘマトクリット値は下がり、腸管は短縮した。体重減少率は、下痢と腸管吸収による脱水の結果により RAMP1^{-/-}群で CGRP₈₋₃₇ 群よりも有意に増加した。

CGRP は末梢、中枢の神経系に広く発現しているため^{4,8,26}、腸炎や代謝系機能障害による全身的な神経系障害が関与して、体重減少を導いた可能性もある。以前、我々の報告において、マウスの胃内容排出との関連性から³⁷、CGRP が胃腸の運動性の変調に関わっていると考えられた³⁸。CGRP 受容体 (CRLR/RAMP1) は人³⁹やラット⁴の腸管の筋層間神経叢や周囲の粘膜下神経ニューロンにある。これにより、CGRP は腸管神経系の CGRP 受容体シグナリングを介して腸管の動きを制御していることが示唆される。従って、DSS 誘発腸炎において、その神経叢の傷害により CGRP シグナリングが弱められると、腸管の動きが障害され、腸管の蠕動が低下し下痢が生じる²⁷。またほかのパラメータに関しては、今回の研究では CGRP₈₋₃₇ 群と RAMP1^{-/-}群間でヘマトクリット値と腸管長短縮に関しては有意差を得られなかったが、おそらく血便と炎症による腸管萎縮がそれぞれの原因であると考えられる。

粘膜防御に関して、我々は粘液を保持できる杯細胞の変化を調べた。PAS 染色で観察すると、CGRP₈₋₃₇ 群と RAMP1^{-/-}群では、WT 群と比較して多く杯細胞の脱落をみとめ、さらに RAMP1^{-/-}群では CGRP₈₋₃₇ 群よりも脱落が有意に多かった。これらの結果から、粘液が炎症から粘膜を守る役割を持っていると考

えられる。このように杯細胞の脱落により粘液が産生されないことは腸炎の病的指標の一つとして評価されるため、直接的に炎症の増悪を反映していた。つまりここでは DSS の投与により腸管粘膜の傷害を惹起し、杯細胞の脱落に至ったものであることから、杯細胞の減少は DSS 誘発腸炎の‘原因’ではなく‘結果’なのである。

結論として、CGRP/RAMP1 は腸管炎症に関わっており、そしてその活動性は炎症の重症度に依存する。我々は、今回の研究を通して、IBD のような非ウイルス性の炎症性腸疾患を含む腸炎という病態に対して、腸管神経系のコントロールが効果的である可能性を持ちうると考え、また今回の研究結果がそれに寄与するデータを提供したと考える。

5. 引用文献

1. Wimalawansa SJ. Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr Rev* 1996;17:533-85.
2. Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith D, Quirion R, Born W, et al. International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol Rev* 2002;54:233-46.
3. Bulut K, Felderbauer P, Deters S, Hoeck K, Schmidt-Choudhury A, Schmidt WE, et al. Sensory neuropeptides and epithelial cell restitution: the relevance of SP- and CGRP-stimulated mast cells. *Int J Colorectal Dis* 2008;23:535-41.
4. Cottrell GS, Roosterman D, Marvizon JC, Song B, Wick E, Wong H, et al. Localization of calcitonin receptor-like receptor and receptor activity modifying protein 1 in enteric neurons, dorsal root ganglia, and the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 2005;490:239-55.
5. Ohno T, Hattori Y, Komine R, Ae T, Mizuguchi S, Arai K, et al. Roles of calcitonin gene-related peptide in maintenance of gastric mucosal integrity and in enhancement of ulcer healing and angiogenesis. *Gastroenterology* 2008;134:215-25.
6. Li FJ, Zou YY, Cui Y, Yin Y, Guo G, Lu FG. Calcitonin gene-related peptide is a promising marker in ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2013;58:686-93.
7. Thompson BJ, Washington MK, Kurre U, Singh M, Rula EY, Emeson RB. Protective roles of alpha-calcitonin and beta-calcitonin gene-related peptide in spontaneous and experimentally induced colitis. *Dig Dis Sci* 2008;53:229-41.
8. Reinshagen M, Flamig G, Ernst S, Geerling I, Wong H, Walsh JH, et al. Calcitonin

- gene-related peptide mediates the protective effect of sensory nerves in a model of colonic injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;286:657-61.
9. Hay DL, Christopoulos G, Christopoulos A, Poyner DR, Sexton PM. Pharmacological discrimination of calcitonin receptor: receptor activity-modifying protein complexes. *Molecular Pharmacology* 2005;67:1655-1665.
 10. Kuwasako K, Cao YN, Nagoshi Y, Tsuruda T, Kitamura K, Eto T. Characterization of the human calcitonin gene-related peptide receptor subtypes associated with receptor activity-modifying proteins. *Mol Pharmacol* 2004;65:207-13.
 11. Tsujikawa K, Yayama K, Hayashi T, Matsushita H, Yamaguchi T, Shigeno T, et al. Hypertension and dysregulated proinflammatory cytokine production in receptor activity-modifying protein 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:16702-7.
 12. Eijkelkamp N, Kavelaars A, Elsenbruch S, Schedolowski M, Holtmann G, Heijnen CJ. Increased visceral sensitivity to capsaicin after DSS-induced colitis in mice: spinal cord c-Fos expression and behavior. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:G749-57.
 13. Hirata I, Yasumoto S, Toshina K, Inoue T, Nishikawa T, Murano N, et al. Evaluation of the effect of pyrrolidine dithiocarbamate in suppressing inflammation in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis. *World J Gastroenterol* 2007;13:1666-71.
 14. Yoshihara K, Yajima T, Kubo C, Yoshikai Y. Role of interleukin 15 in colitis induced by dextran sulphate sodium in mice. *Gut* 2006;55:334-41.
 15. Bauer C, Loher F, Dauer M, Mayer C, Leh HA, Schonharting M, et al. The ICE inhibitor pralnacasan prevents DSS-induced colitis in C57BL/6 mice and suppresses IP-10 mRNA but not TNF-alpha mRNA expression. *Dig Dis Sci* 2007;52:1642-52.
 16. Kurashige C, Hosono K, Matsuda H, Tsujikawa K, Okamoto H, Majima M. Roles of receptor activity-modifying protein 1 in angiogenesis and lymphangiogenesis during skin wound healing in mice. *FASEB J* 2014;28:1237-47.
 17. Podolsky D K. Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347: 417-429.
 18. Gordon S: Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003, 3:23-35.
 19. Arai K, Ohno T, Saeki T, Mizuguchi S, Kamata K, Hayashi I, et al. Endogenous prostaglandin I₂ regulates the neural emergency system through release of calcitonin gene related peptide. *Gut* 2003;52:1242-9.
 20. Hayashi H, Ohno T, Nishiyama K, Boku K, Katori M, Majima M. Transient prevention of ethanol-induced gastric lesion by capsaicin due to release of endogenous calcitonin gene-related peptide in rats. *Jpn J Pharmacol* 2001;86:351-4.
 21. Juaneda C, Dumont Y, Quirion R. The molecular pharmacology of CGRP and related

- peptide receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 2000;21:432-8.
22. Engel MA, Khalil M, Mueller-Tribbensee SM, Becker C, Neuhuber WL, Neurath MF, et al. The proximodistal aggravation of colitis depends on substance P released from TRPV1-expressing sensory neurons. *J Gastroenterol* 2012;47:256-65.
 23. Halova I, Draberova L, Draber P. Mast cell chemotaxis—chemoattractants and signaling pathways. *Front. Immunol.* 2012; 3, 119. doi:10.3389/fimmu.2012.00119. eCollection 2012.
 24. Dieleman LA, Palmén MJ, Akol H, Bloemena E, Pena AS, Meuwissen SGM. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 1998;114:385-91.
 25. Chizzolini C, Chiccheportiche R, Burger D, Dayer JM. Human Th1 cells preferentially induce interleukin (IL)-1 β while Th2 cells induce IL-1 receptor antagonist production upon cell/cell contact with monocytes. *Eur J Immunol* 1997;27:171-7.
 26. Eftekhari S, Warfvinge K, Blixt FW, Edvinsson L. Differentiation of nerve fibers storing CGRP and CGRP receptors in the peripheral trigemino-vascular system. *J. Pain* 2013; 14: 1289–1303.
 27. Yoshikawa R, Mikami N, Otani I, Kishimoto T, Nishioka S, Hashimoto N, et al. Suppression of ovalbumin-induced allergic diarrhea by diminished intestinal peristalsis in RAMP1-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;410: 389-93.
 28. Kurashima Y, Amiya T, Nochi T, Fujisawa K, Haraguchi T, Iba H, et al. Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nat Commun* 2012;3:1034.
 29. Matsukawa T, Izawa K, Isobe M, Takahashi M, Maehara A, Yamanishi Y, et al. Ceramide-CD300f binding suppresses experimental colitis by inhibiting ATP-mediated mast cell activation. *Gut.* 2016 ;65 :777-87.
 30. De Winter BY, van den Wijngaard RM, de Jonge WJ. Intestinal mast cells in gut inflammation and motility disturbances. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 2012;1822:66-73.
 31. Boeckxstaens G. Mast cells and inflammatory bowel disease. *Curr Opin Pharmacol.* 2015 ; 25:45-9.
 32. Hamilton MJ, Sinnamon MJ, Lyng GD, Glickman JN, Wang X, Xing W, et al. Essential role for mast cell tryptase in acute experimental colitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:290–5.
 33. Tokoyoda K, Tsujikawa K, Matsushita H, Ono Y, Hayashi T, Harada Y, et al. Upregulation of IL-4 production by the activated cAMP/cAMP-dependent protein

- kinase (protein kinase A) pathway in CD3/CD28-stimulated naive T cells. *Int Immunol* 2004; 16: 643–653.
34. Mikami N, Matsushita H, Kato T, Kawasaki R, Sawazaki T, Kishimoto T, et al. Calcitonin gene-related peptide is an important regulator of cutaneous immunity: effect on dendritic cell and T cell functions. *J Immunol* 2011; 186: 6886–6893.
 35. Mikami N, Watanabe K, Hashimoto N, Miyagi Y, Sueda K, Fukuda S, et al. Calcitonin gene-related peptide enhances experimental autoimmune encephalomyelitis by promoting Th17 cell functions. *Int Immunol* 2012; 24: 681–691.
 36. Mikami N, Miyagi Y, Sueda K, Takatsuji M, Fukuda S, Yamamoto H, et al. Calcitonin gene-related peptide and cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A pathway promote IL-9 production in Th9 differentiation process. *J Immunol* 2013; 190: 4046–4055.
 37. Mizuguchi S, Ohno T, Hattori Y, Kamata K, Arai K, Saeki T, et al. Calcitonin gene-related peptide released by capsaicin suppresses myoelectrical activity of gastric smooth muscle. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005 ;20: 611-8.
 38. Holzer P, Barthó L, Matusák O, Bauer V. Calcitonin gene-related peptide action on intestinal circular muscle. *Am J Physiol.* 1989; 256:G546–52.
 39. Cottrell GS, Alemi F, Kirkland JG, Grady EF, Corvera CU, Bhargava A. Localization of calcitonin receptor-like receptor (CLR) and receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1) in human gastrointestinal tract. *Peptides.* 2012; 35:202-11.
 40. Engel MA, Becker C, Reeh PW, Neurath MF. Role of sensory neurons in colitis: increasing evidence for a neuroimmune link in the gut. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:1030-3.

図1

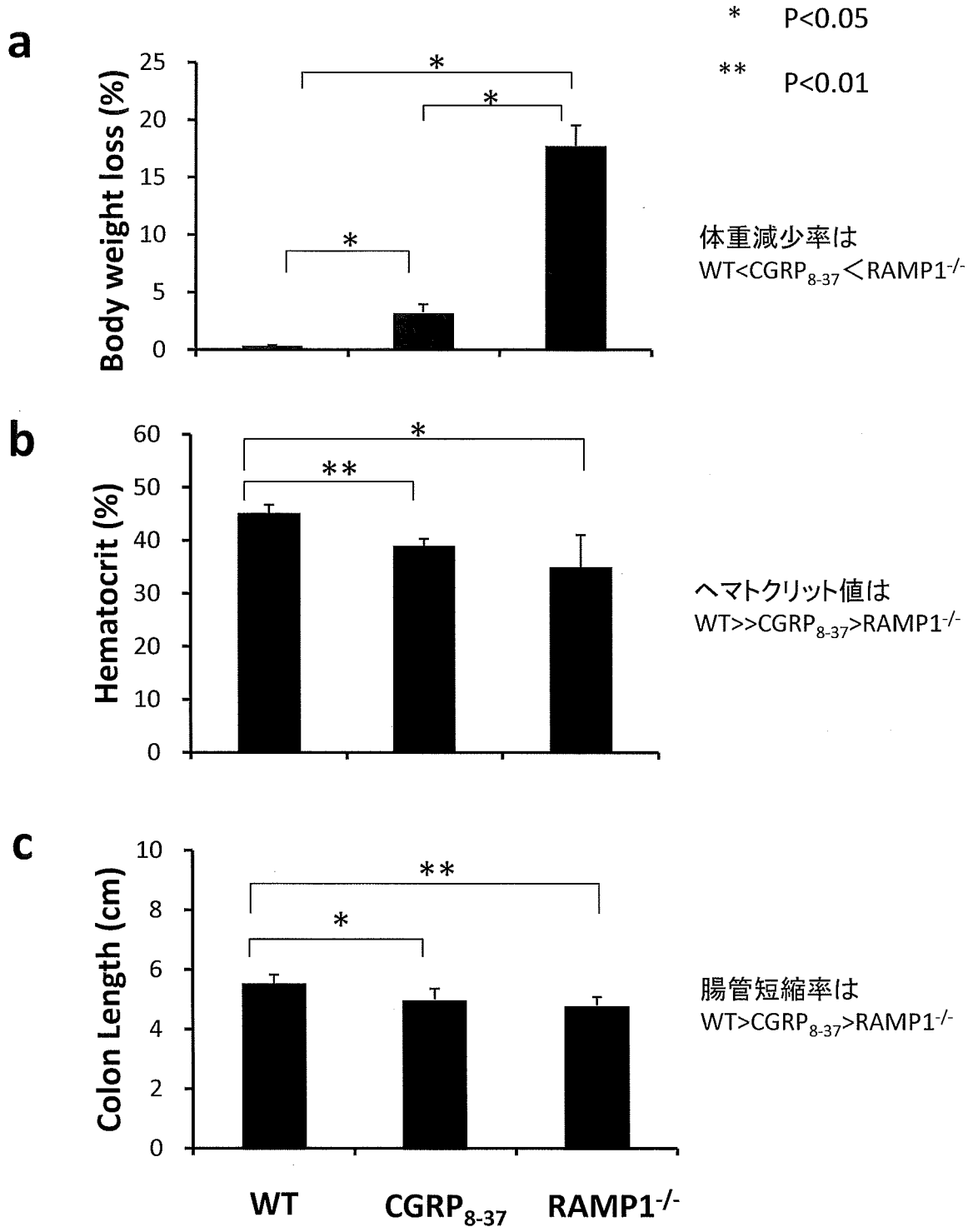
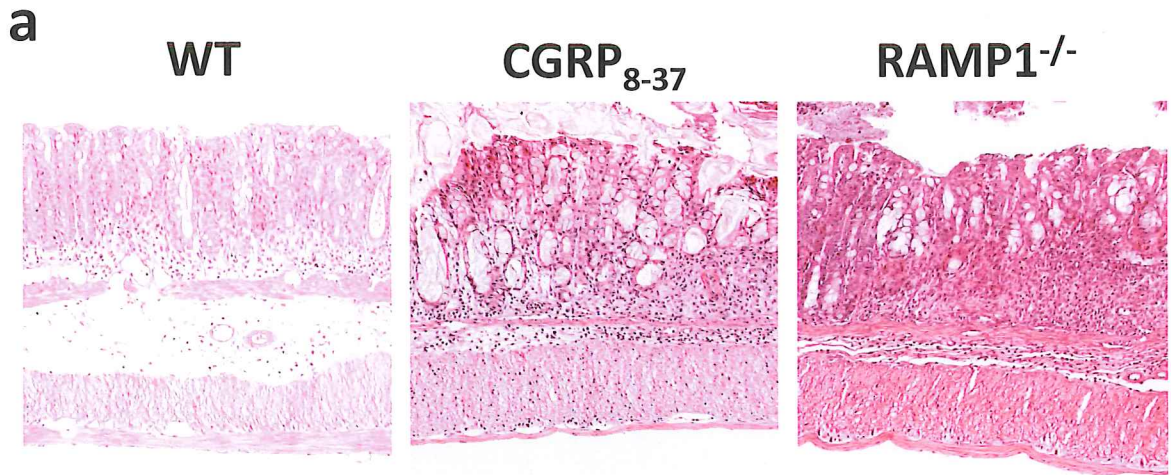
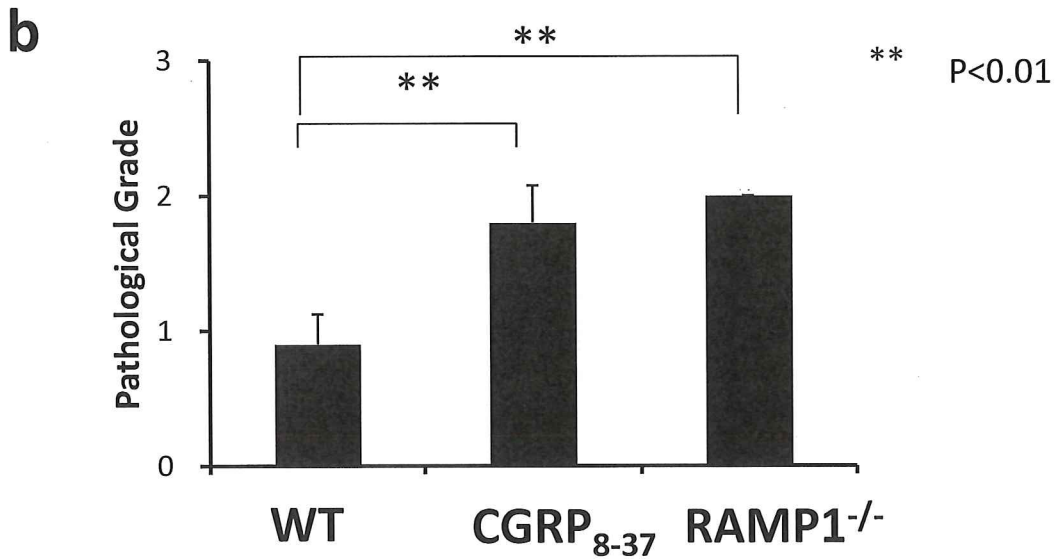


図 2



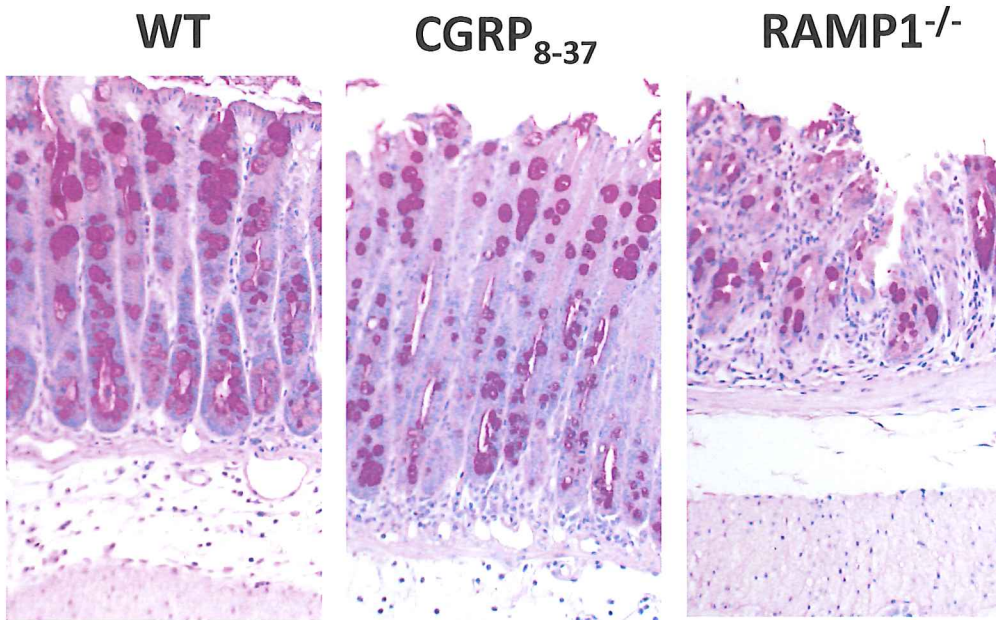
HE染色においてWT<CGRP₈₋₃₇<RAMP1^{-/-}で炎症所見が強い



病理グレードはWT<CGRP₈₋₃₇<RAMP1^{-/-}で増加

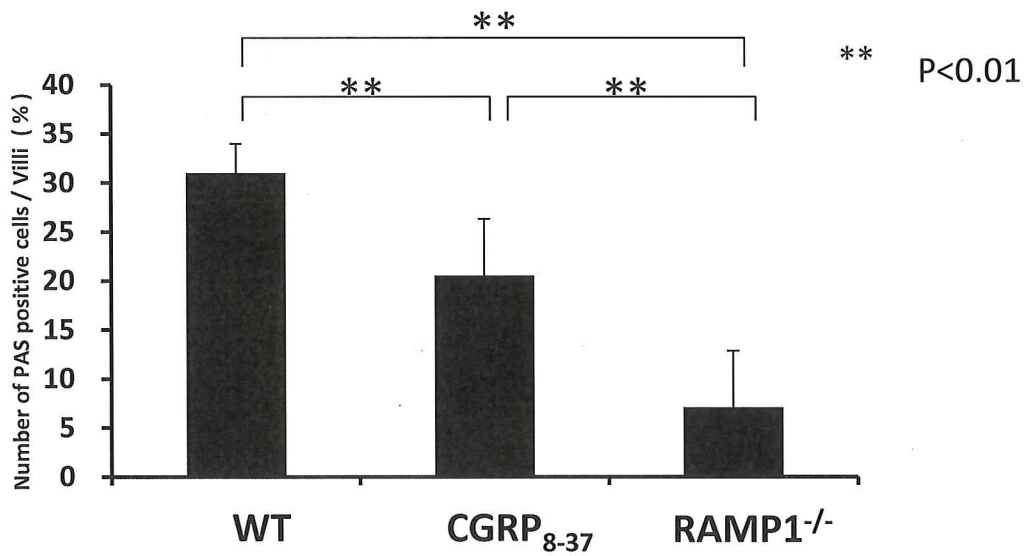
図3

a



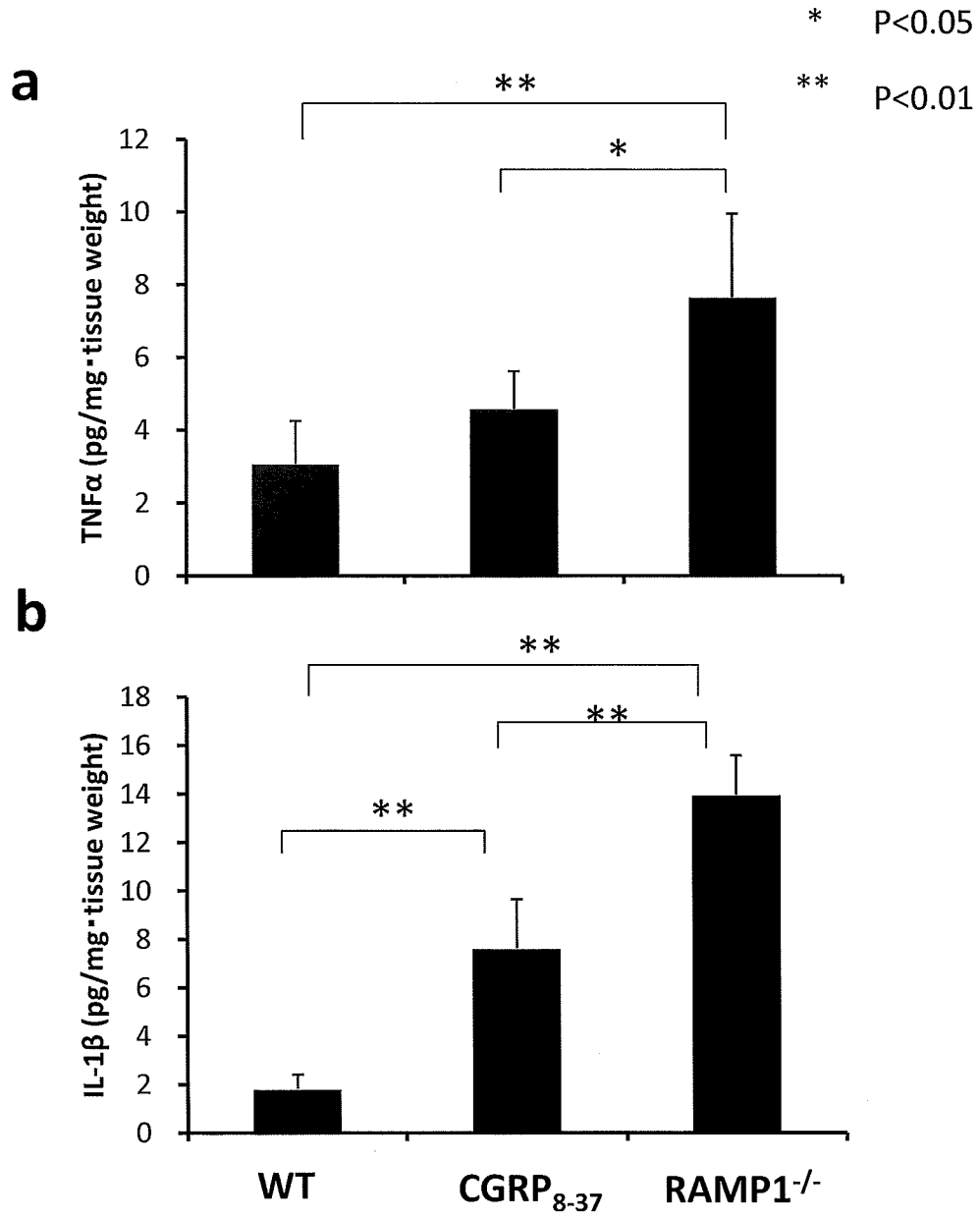
WT>CGRP₈₋₃₇>RAMP1^{-/-}でPAS染色陽性細胞が多い

b



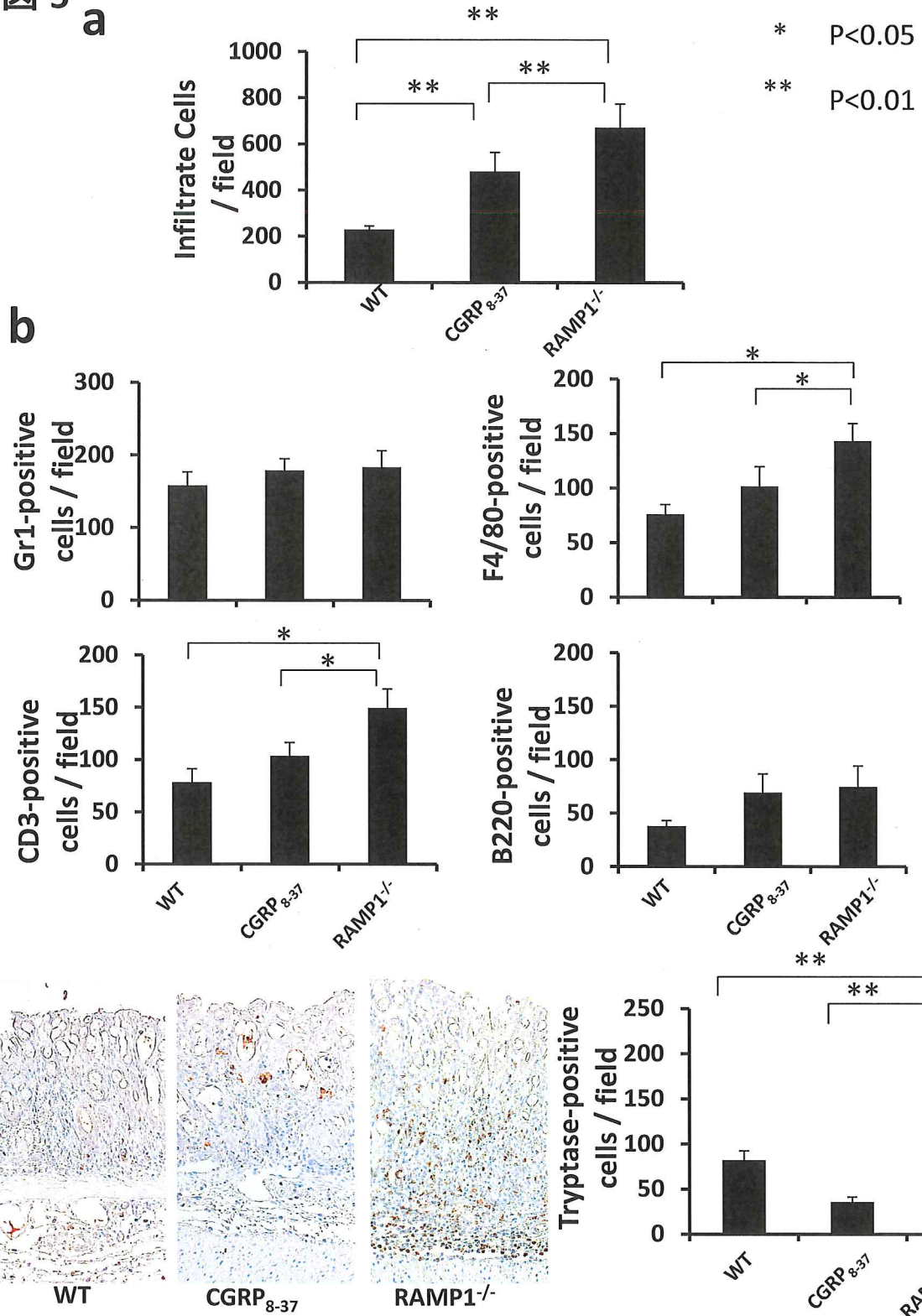
WT>CGRP₈₋₃₇>RAMP1^{-/-}でPAS染色細胞は有意に多い
→ WT<CGRP₈₋₃₇<RAMP1^{-/-}で杯細胞の脱落が増える

図4



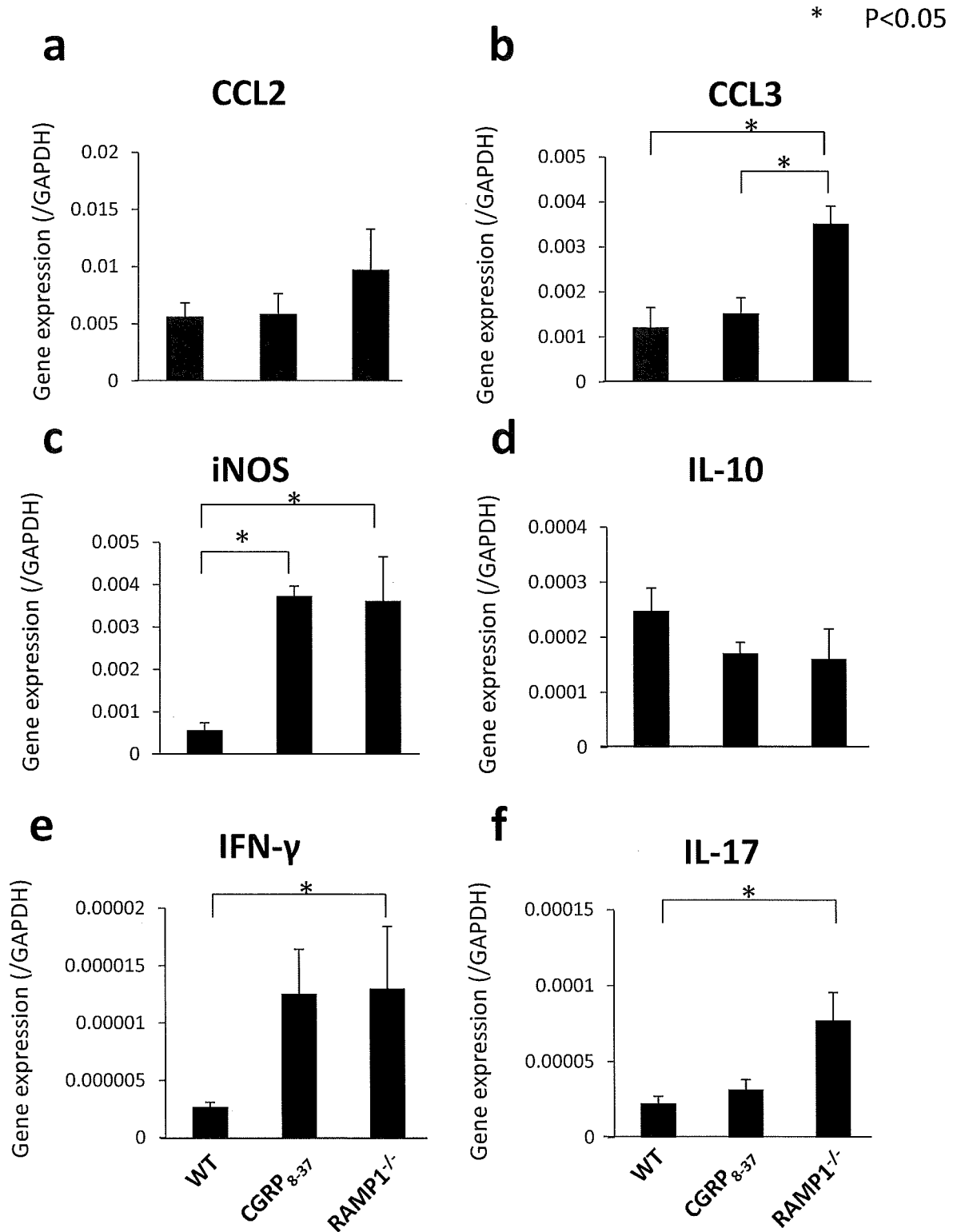
WT<CGRP₈₋₃₇<RAMP1^{-/-}で組織内サイトカイン値が大きい
(TNFα、IL-1β)

図 5



WT<math><CGRP_{8-37}</math><math><RAMP1^{-/-}</math>で炎症細胞浸潤が多く、とくにF4/80(マクロファージ)、CD3(T細胞)、tryptase(肥満細胞)に差が見られた。

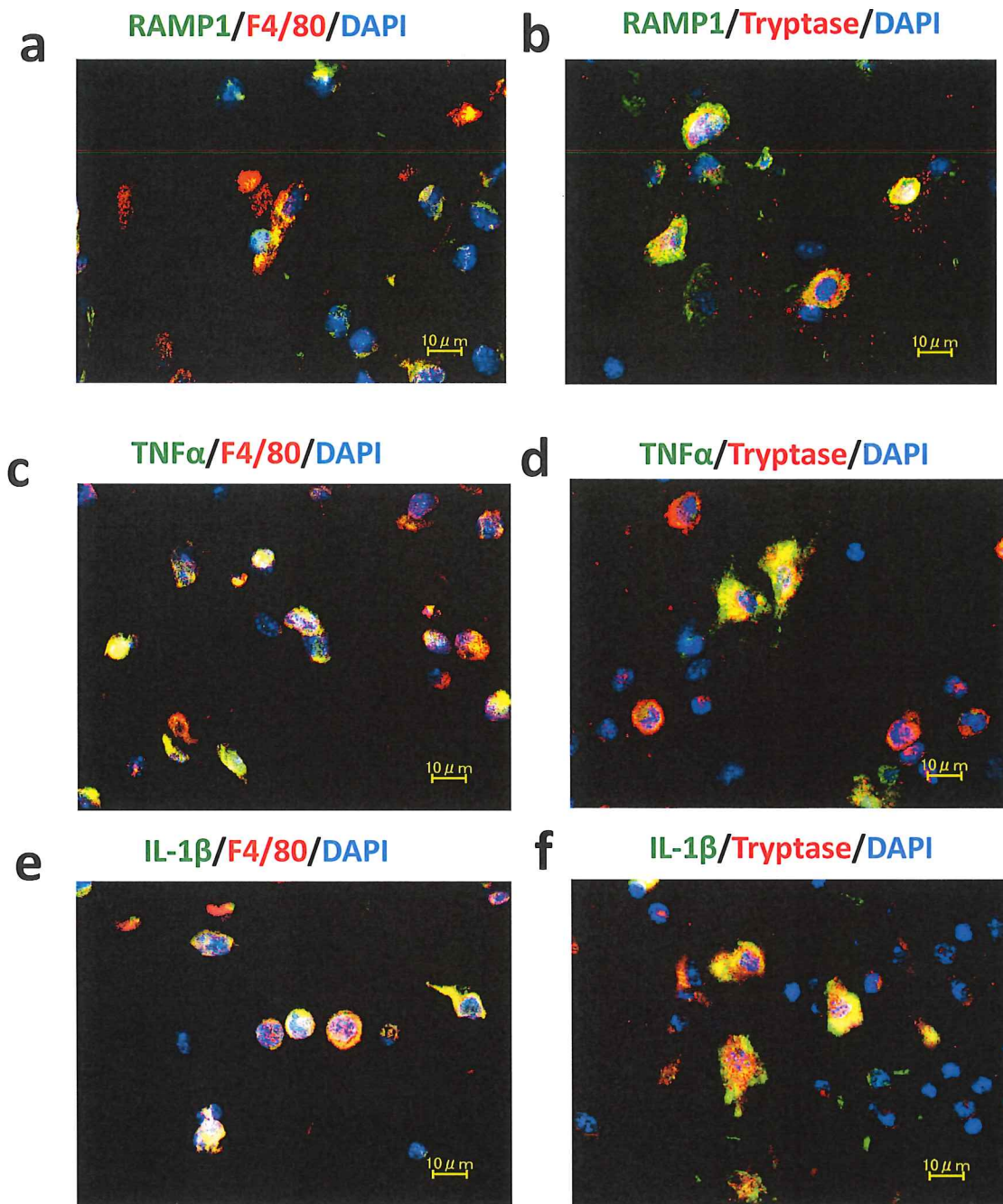
図 6



ケモカインのmRNA値と炎症メディエータ値。

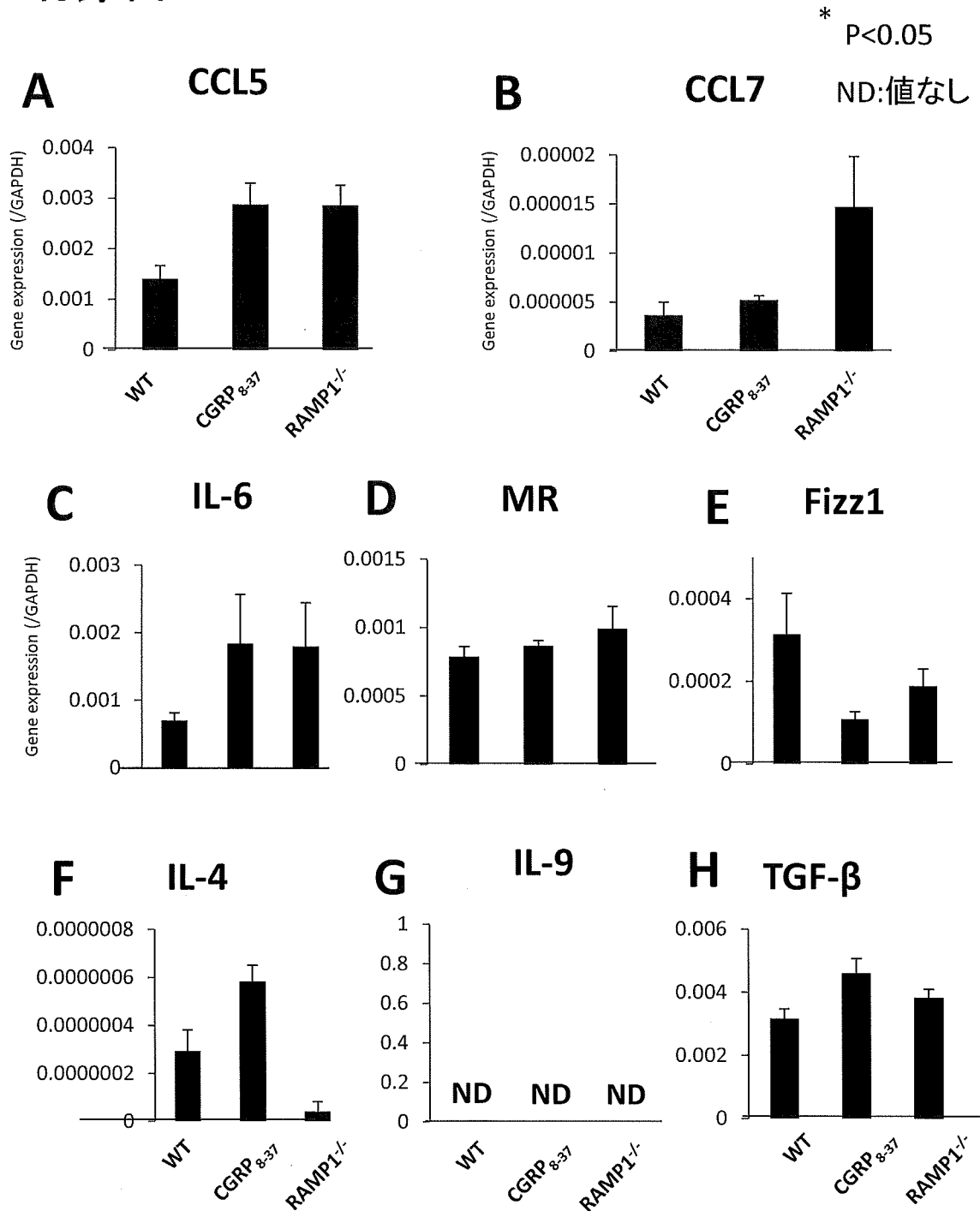
CCL2、CCL3:ケモカイン、iNOS:M1マクロファージ、IL-10:M2マクロファージ、IFN γ :Th1サイトカイン、IL-17:Th17サイトカイン

図 7



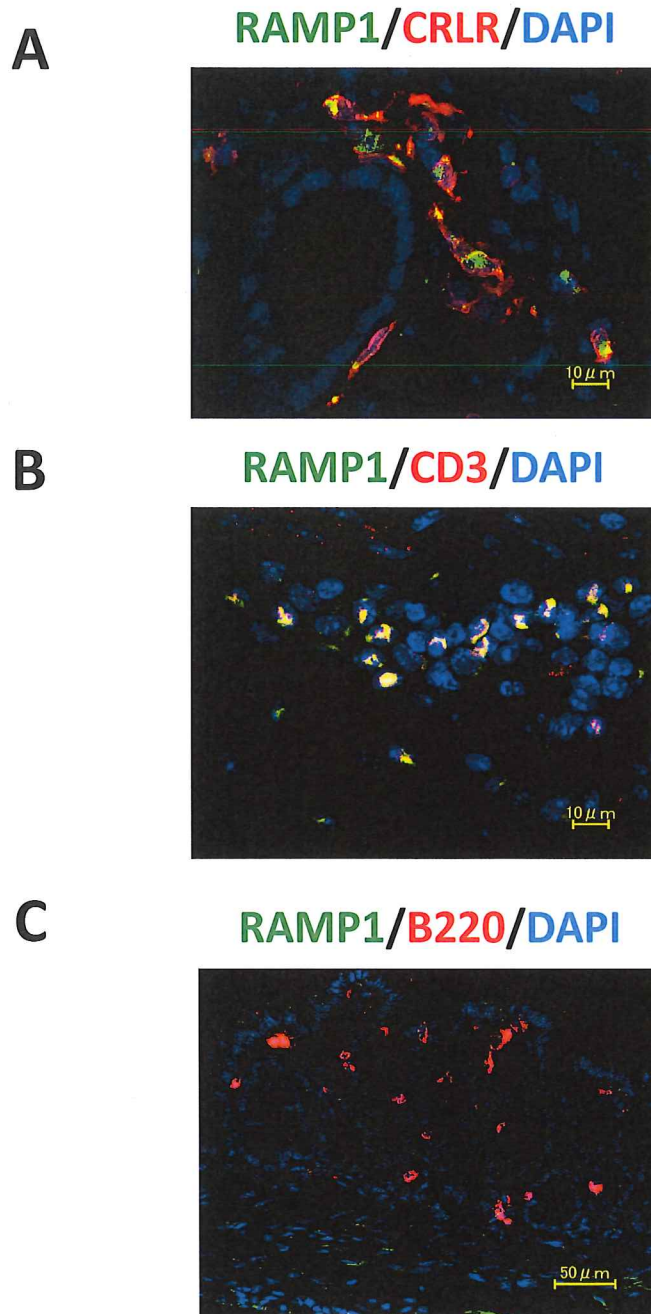
マクロファージ (F4/80) と肥満細胞 (tryptase) での CGRP 受容体と炎症誘発性サイトカインの発現。
二重染色 : a,b: RAMP1 (緑) / マクロファージ or 肥満細胞 (赤)
c,d: TNFα (緑) / マクロファージ or 肥満細胞 (赤)、e,f: IL-1β (緑) / マクロファージ or 肥満細胞 (赤)
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (青) で標識。

付録図 1



ケモカインのmRNA値と炎症メディエータ値。
 CCL5、CCL7: ケモカイン、IL-6: M1マクロファージ、MR・Fizz1: M2マクロファージ、
 IL-4: Th2サイトカイン、IL-9: Th9サイトカイン、TGF-β

付録図 2



T細胞(CD3)とB細胞(B220)でのCGRP受容体(RAMP1/CRLR)の発現。
二重染色:A: RAMP1(緑)/CRLR(赤)
B: RAMP1(緑)/T細胞(赤)、C: RAMP1(緑)/B細胞(赤)
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)(青)で標識。

付録 表 1

プライマー一覧

Gene	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
IL-4	5'-GAACGAGGTCACAGGAGAAGG-3'	5'-CTTGAAGCCCTACAGACGAG-3'
IL-6	5'-CAAAGCCAGAGTCCTTCAGAG-3'	5'-TAGGAGAGCATTGGAAATTGG-3'
IL-9	5'-CATCACGTGTCCGTCCTTTTC-3'	5'-TGCCTTTGCATCTCTGTCTTC-3'
IL-17	5'-CTGTGTCTCTGATGCTGTTGC-3'	5'-AGGTTGACCTTCACATTCTGG-3'
CCL2	5'-CCCAATGAGTAGGCTGGAGAG-3'	5'-GTCTGGACCCATTCTTCTTG-3'
CCL3	5'-TGACTAAGAGAAACCGGCAGA-3'	5'-TCAGGCATTCAAGTCCAGGTC-3'
CCL5	5'-CTGCTGCTTTGCCTACCTCTC-3'	5'-GTGACAAACACGACTGCAAGA-3'
CCL7	5'-TGCTTTCAGCATCCAAGTGTG-3'	5'-ACCGACTACTGGTGATCCTTC-3'
MR	5'-TTTGTCCATTGCACTTTGAGG-3'	5'-TGCCAGGTAAAGCAGACTTG-3'
IL-10	5'-CGGAAATGATCCAGTTTTACC-3'	5'-TGAGGGTCTTCAGCTTCTCAC-3'
Fizz1	5'-TGCCAATCCAGCTAACTATCC-3'	5'-CACACCCAGTAGCAGTCATCC-3'
TGFβ	5'-AACAATTCCTGGCGTTACCTT-3'	5'-TGTATTCCGTCTCCTTGGTTC-3'
IFN-γ	5'-ATCTGGAGGAACTGGCAAAG-3'	5'-CGCTTATGTTGTTGCTGATGG-3'
iNOS	5'-AAAACCCCTTGTGCTGTTCTC-3'	5'-CTGGAACATTCTGTGCTGTCC-3'
GAPDH	5'-ACATCAAGAAGGTGGTGAAGC-3'	5'-AAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG-3'