

学内グラント 終了時報告書

平成18年度 学内グラント報告書

ドパミンを介した免疫制御機構の解析

研究代表者 中野 和久

(前 埼玉医科大学 医学教育センター学生保健管理室

現 産業医科大学第一内科学 助教)

分担研究者 松下 祥¹⁾, 穂田 真澄²⁾

1. はじめに

1986年にT. R. Mosmannら¹⁾が初めてマウスのT細胞クローン間のサイトカインの分泌パターンの違いによってTh1細胞及びTh2細胞の二つのヘルパーT細胞の亜集団の概念を提起して以来、この二つの亜集団に関しては精力的な研究が行われてきた。IFN- γ を主に産生するTh1細胞は、細胞性免疫を媒介し、自己免疫疾患、遅延型アレルギーに、一方IL-4やIL-5、IL-13を産生するTh2細胞は液性免疫を媒介し、即時型アレルギーに関与すると考えられ、このTh1/Th2のバランスがお互いに拮抗しあって恒常性が保たれるという、いわゆるTh1/Th2パラダイムに支配されてきたが、多くの自己免疫疾患モデルマウスにおいて、IL-17を産生するTh17細胞が病態の発症に深く関与していることが解明され、このTh1/Th2パラダイムは崩壊しつつある。しかしながら、近年も増加の一途を辿るアレルギー疾患治療の新たなストラテジーを探るためには、とりわけTh2の分化を決定づける因子については追求する必要がある。

樹状細胞(Dendritic cell; DC)は最も強力な抗原提示細胞(antigen presenting cell; APC)であり、抗原特異的な免疫応答の誘導・制御の中心的な存在である。DCはリンパ器官だけでなく全身に分布しており、非リンパ系組織に存在する未成熟なDCは抗原捕捉能を有し、外界からの病原微生物の侵襲を監視する機能を持つと考えられる。抗原を取り込んだDCは、Toll-like receptor (TLR)をはじめとするパターン認識受容体(pattern recognition receptor; PRR)を介した刺激やケミカルメディエーター、サイトカイン、ケモカインなどの周囲の環境に応じて成熟し、所属リンパ器官へ

と移行する。そこでプロセッシングした抗原ペプチドをナイーブT細胞に提示し、DC-Tの相互作用により抗原特異的なヘルパーT細胞への分化を促し獲得免疫の成立に大きく寄与する。ヘルパーT細胞への分化にはT細胞受容体(TCR)とCD28を介したシグナルが必要であるが、DC-T細胞の相互作用時にDC側から産生される何らかの因子が、T細胞の分化方向をTh1もしくはTh2に偏向させると考えられている。

グラム陰性菌のリポ多糖、微生物DNA (CpG DNA)、リポタンパク質、ウィルス由来の二本鎖RNAなど多くの病原体の構成成分は、これらを特異的に認識するTLRを介しMyD88依存性シグナルによってDCの機能を偏向し、主にIL-12の産生を増強することにより、抗原非特異的にTh1反応を惹起、増強する^{2,3)}。つまり、DCが産生するIL-12はTh1偏向因子であることが、これまでのin vitro, in vivoの数多くの検討から明らかとなっている。

一方、thymic stromal lymphopoietin (TSLP)やprostaglandin E₂ (PGE₂)やヒスタミンなどはDCに作用してTh2反応を惹起することが知られる。これらによるDCの変化としてはCD86の発現の上昇^{4,5)}、IL-12の産生抑制^{6,7)}、NotchリガンドであるDelta 1の発現上昇⁸⁾などが報告されてきたが、このような変化がTh2分化偏向を誘導するという決定的な証拠に乏しく、その詳細なメカニズムは不明であった。つまり、Th2偏向因子は未発見であり、DC自体が積極的にTh2分化に寄与するかどうか不明であった。

今回我々は、これまで「神経伝達物質」として知られてきたドパミンがDCにおいても産生され、DCとナイーブT細胞の相互作用時にTh2分化偏向因子として機能することを発見し、マウスにおいて、ドパミンD1様受容体の阻害が多発性硬化症のモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎の発症抑制・治療に有用であるこ

1) 埼玉医科大学 免疫学

2) 埼玉医科大学 中央研究施設 形態部門

とを実証した。

Th1/Th2アジュバントのスクリーニング

アジュバントの多くはDCに直接作用し、その性質を抗原非特異的に変化させることによってTh1/Th2分化に深く関与する。それに対応した用語としてTh1/Th2アジュバントも用いられる。これまで我々はDCを介したTh1/Th2アジュバント探索のために、アジュバントで刺激したヒト単球由来DC (Mo-DC) とナイーブCD4T細胞 (CD45RA陽性CD4T細胞) の共培養によりアロMLRを誘導し、活性化したT細胞が産生するTh1/Th2サイトカインのバランスをみる評価系⁹⁾ (図1A) の解析を行ってきた。今回はこの系を用いて、すでに上市され一般に処方される無数の薬剤のTh1/Th2アジュバント活性の有無をスクリーニングした。薬剤の作用機序をもとにして、Th1/Th2分化偏向のためのDC側の変化を集約することが主目的であった。

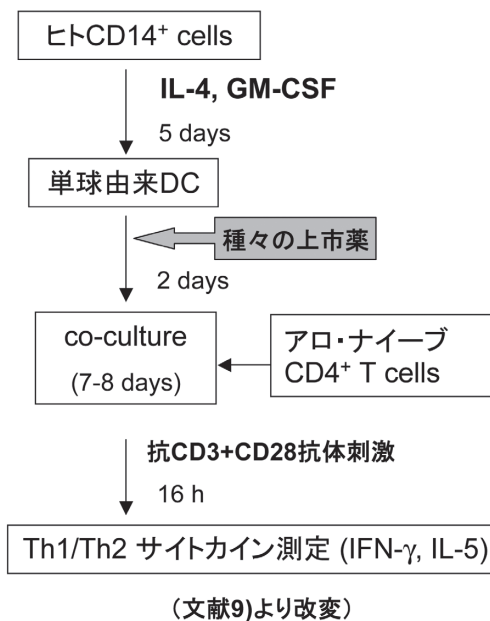
このスクリーニングにより、抗精神病薬の中で、ドパミンD2様受容体阻害薬であるスルピリド、ネモナプリドなどがPGE₂と同程度に高いIL-5/IFN- γ 比を呈し、Th2アジュバント活性を有することが判明した (図1B)。逆にパーキンソン病薬として使用される非麦角系ドパミンD2様受容体作動薬であるレキップやビ・シフロールでMo-DCを処理した場合、LPSと同程度にIL-5/IFN- γ 比が低下した (図1C)。これらの結果から、DCに発現するドパミン受容体からのシグナルがもたらすDCの性質の変化がTh1/Th2分化偏向に強く関与していることが示唆された。

DCにおけるドパミン受容体の発現とドパミン合成系の存在

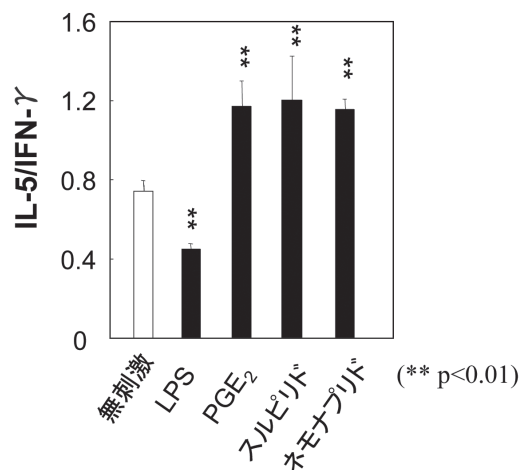
ドパミン受容体は少なくとも5つの遺伝子から作られるサブタイプ (D1 ~ D5) を持つ¹⁰⁾。それぞれのサブタイプはいずれも7回膜貫通型 (GTP結合蛋白連関型) であり、薬理学的にD1様受容体 (D1, D5) とD2様受容体 (D2, D3, D4) とに大別される。これらの大きな違いはD1様受容体が細胞内アデニルシクラーゼ (Adenyl cyclase; AC) の活性化によりcAMPを上昇させる作用を持つG α sサブユニットと共役するのに対し、D2様受容体は細胞内AC活性の抑制によりcAMPを低下させる作用を持つG α iサブユニットと共役することにある¹⁰⁾。

単球由来DCのドパミン受容体発現パターンをフローサイトメーターで解析したところ、D1様受容体、D2様受容体ともに全てのサブタイプの発現が認められた⁹⁾ (表1)。そこで単球由来DCをD2様受容体阻害剤 (L-750667)、D1様受容体阻害剤 (SCH-23390) で処理すると、アロMLR実験系でそれぞれ強力なTh2アジュバント、Th1アジュバントとなることが判明した。

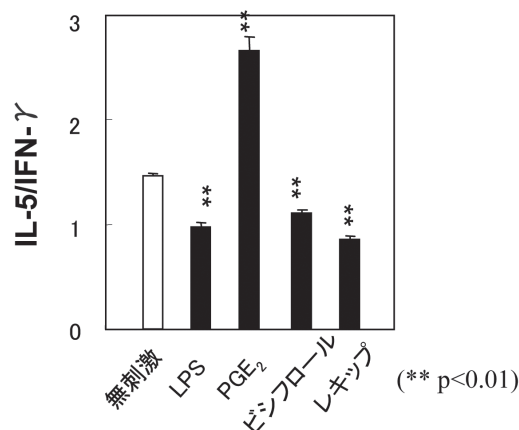
ドパミン産生細胞に発現するドパミン受容体はその細胞内のドパミン合成量を調整するために存在する



A. アロMLRによるTh1/Th2分化の評価系。



B. ドパミンD2様受容体阻害薬によるTh2シフト。



C. ドパミンD2様受容体作動薬によるTh1シフト。

図1.

ものと考えられる。ドーパミンは、チロシンからDOPAを経て合成され、小胞内に貯留され、脱顆粒刺激を受けた際に開口分泌によって細胞外に放出される。このドーパミン合成過程では、チロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase; TH) が律速酵素となるが、このTH活性は細胞内cAMPの上昇によって亢進することが知られる¹¹⁾。発現するD2様受容体は自己受容体として機能しcAMP低下シグナルを転送することでドーパミン産生にネガティブフィードバックをかける¹²⁾。

これまでDCにおけるドーパミン合成・貯留については知られていなかったが、我々はDCもドーパミンを貯留すること、さらにDC内ドーパミンは小胞内に局在することを免疫電顕で明らかにした。さらに、このDC内のドーパミン量は、TH阻害薬である α -methyl-*p*-tyrosine (AMPT)で処理した際には減少し、DCにおいてもドーパミン合成系が存在することが明らかとなった。また、DCにドーパミンを添加するとDCの細胞内cAMP濃度は低下し、これはD2様受容体阻害剤であるL-750667による前処理で阻害された。この結果はDCに発現するD2様受容体が自己受容体として機能している可能性を示唆した。実際に、D2様受容体阻害剤であるスルピリドやL-750667で処理したDCではドーパミン貯留が増加した。D2様受容体阻害剤はドーパミン合成抑制シグナルを阻害することでDC内のドーパミン合成を増加させることが示唆された(図2)。なお、cAMP上昇薬剤であるフォスコリンやPGE₂などもDC内ドーパミン貯留を著明に増加させることが判明した。これらの現象はマウスの骨髄由来DCにおいても観察された。

ドーパミン刺激によるCD4陽性T細胞の反応

CD4陽性T細胞のドーパミン受容体の発現状態やドーパミンに対する反応も、ナイーブT細胞、メモリーT細胞それぞれで検討した。興味深いことにメモリーT細胞ではD1～D5まで全てのドーパミン受容体サブタイプの発現が認められたが、ナイーブT細胞ではD1様受容体は強く発現するものの、D2様受容体の発現はごく低レベルであった⁹⁾(表1)。ドーパミンの添加により、ナイーブT細胞では細胞内cAMP濃度が上昇したのに対し、メモリーT細胞ではcAMP濃度が低下した。この結果はナイーブT細胞ではD1様受容体を介して、メモリーT細胞ではD2様受容体を介してドーパミンが作用することを示唆した。

ナイーブT細胞に抗CD3+CD28抗体刺激を加える際にフォスコリンなどの細胞内cAMP上昇薬剤を同時添加するとIL-5などTh2サイトカインの産生が亢進することが知られるが¹³⁻¹⁵⁾、ドーパミンも同様に添加した場合は濃度依存性にIL-5産生を増強し、Th2反応を惹起することが示唆された。

DC-T細胞の相互作用におけるドーパミンの役割

ドーパミン神経シナプスにおいて、ドーパミンはシナ

プス前ニューロンで合成・貯留・放出の過程を経て、“神経伝達物質”としてシナプス後ニューロンに発現するドーパミン受容体を介して情報を伝達しシナプス後ニューロンに作用を及ぼす。DC-T細胞の相互作用も“免疫シナプス”として喩えられるが、我々はDC-ナイーブT細胞の相互作用の際には、DCがシナプス前ニューロン、ナイーブT細胞がシナプス後ニューロンに相当する形でシナプスを構成し、ドーパミンが“免疫伝達物質”として機能し、Th2偏向因子として作用しているのではないかと考えた。

実際に単球由来DCに抗原をパルスし、同一人由来T細胞クローンと反応させると、DCからT細胞に向けた脱顆粒が観察され、反応後のDC内のドーパミンは減少した。この結果は、抗原提示の際にT細胞からDCへの刺激によりドーパミンがT細胞に向けて放出されることを示唆した。さらに、AMPTでドーパミン合成を減らしたDC、コルヒチンで脱顆粒を阻害したDCなどを用いたアロMLR実験系では、おもにIL-5産生の低下によりTh1分化偏向を来したことから、DC-ナイーブT細胞の相互作用でDCから放出されるドーパミンはTh2偏向因子として作用することが実証された(図3)。

EAEモデルマウスにおけるドーパミン受容体阻害剤による免疫修飾

多発性硬化症 (Multiple sclerosis; MS) のモデルとして実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) が使われてきたが、これらを誘発するT細胞は、最近ではTh17やTh2に原因を求

表 1. 各細胞表面に発現するドーパミン受容体サブタイプ

		単球由来DC	ナイーブCD4 T細胞	メモリーCD4 T細胞
D1様受容体 (G α_s と共役)	D1	+	+	+
	D5	+	+	+
D2様受容体 (G α_i と共役)	D2	+	—	+
	D3	+	—	+
	D4	+	±	+

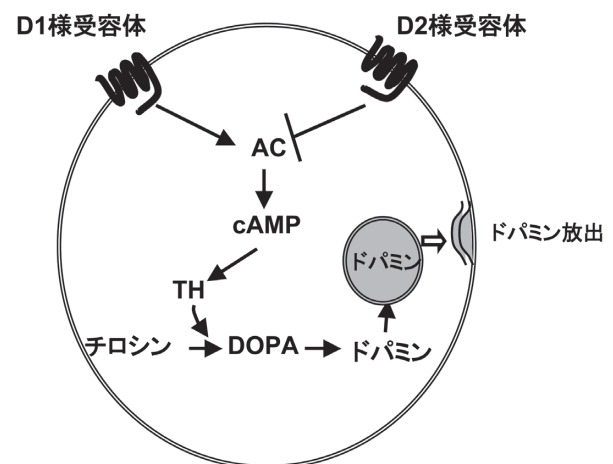


図 2. 樹状細胞におけるドーパミン合成・貯留。

める動きが出てきたものの¹⁶⁻¹⁸⁾, 古典的には自己抗原特異的なTh1細胞であると考えられ, Th2シフトによる病態改善の試みがこれまでも行われてきた。

我々はこの従来の見地から, Th2アジュバントであったL-750667 (D2様受容体阻害剤) などのEAEへの病態抑制効果を期待し, SJL/JマウスにPLP₁₃₉₋₁₅₁と完全フロイントアジュバントで免疫し, L-750667の内服投与を行った。しかし, 期待に反してL-750667投与群はすべて発症後致死的な経過をたどった(図4A)。脾細胞を分離し, PLP再刺激の上で行ったサイトカイン測定(IFN- γ , IL-4)では, L-750667投与群はin vitroと同様にTh2優位にシフトしており⁹⁾, L-750667投与によるTh2シフトがEAEの病態の悪化をもたらしていることが示唆された。骨髓細胞由来DCにL-750667処理を加え, PLP₁₃₉₋₁₅₁をパルス後にSJL/Jマウスに細胞を移入した場合も同様の結果を認め⁹⁾, L-750667は直接的にDCに作用してEAEの悪化をもたらすことが示唆された。

一方, D1様受容体阻害薬であるSCH-23390はin vitroではTh1アジュバントであったにもかかわらず, EAEの臨床症状に対して強い抑制効果を認めた(図4A)。同様に分離脾細胞のPLP再刺激後のサイトカイン測定では, in vitroと同様にTh1優位のシフトを認めた(図4B)⁹⁾。さらに, SCH-23390の効果は発症抑制にとどまらず, 一旦発症したEAEの臨床症状も劇的に改善した(図4C)⁹⁾。他のD1様受容体阻害薬(LE300等)を用いても同様の結果であった。一連のin vivo実験は, 最近の多くの報告と同様に, Th2シフトがEAEの病態の悪化につながることを示唆した。なお, 同時にIL-17も測定したが, 病態が悪化した群ではIL-17 > IFN- γ , 病態が改善した群ではIL-17 < IFN- γ という結果となり(図4D)⁹⁾, IL-17がEAE病態の悪化をもたらすとする最近の知見^{16, 17)}を支持する結果であった。また, 非麦角系ドパミンD2様受容体作動薬であるレキップやビ・シフロールなどのD2様受容体作動薬を用いて, 発症後のEAEマウスにおける臨床

効果を検証したところ, 一旦は臨床症状を改善させたものの, 発症後1ヶ月程度から効果は減弱した。このエスケープ現象はドパミンD2様受容体のhomologous down-regulationの誘導などが原因として考えられた。

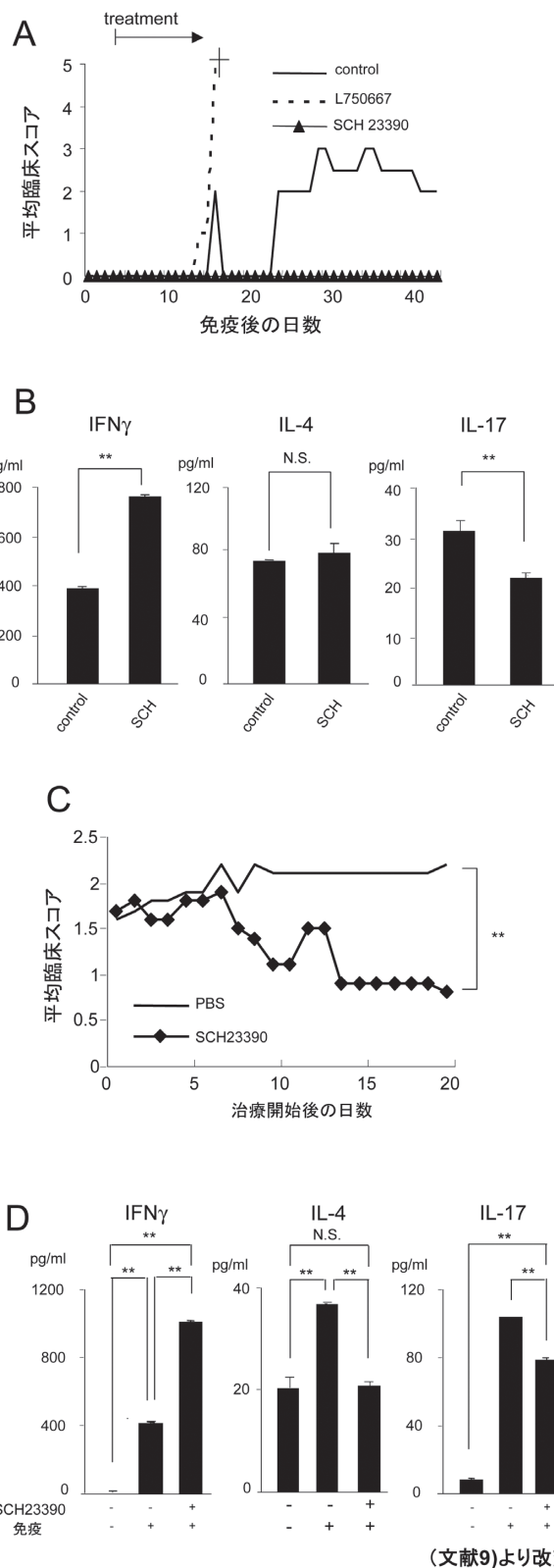


図3. DC-T細胞 相互作用におけるドパミンのTh2偏向機序.

図4. EAEマウスにおけるドパミン受容体阻害薬の効果.

おわりに

情動やストレスが免疫系に強く影響すること、つまり免疫系は交感神経系の活動により大きく左右されることを我々は経験的に知っている。中枢性ドパミン神経系の低もしくは過剰活動を伴うパーキンソン病や統合失調症などの重要な精神神経疾患が多くの場合免疫異常を伴うこと^{19, 20)}、ドパミンD2様受容体の過剰活動が大きな原因とされる統合失調症患者では、一般人口と比べて様々な種類の癌の発生率が低いこと²¹⁾、等の報告もあり、これまでも各々の領域からのアプローチで「神経-免疫-内分泌」連関が検討されてきた。

近年、リンパ球の細胞表面にもドパミンを含むカテコラミン、セロトニン、アセチルコリンなどの神経伝達物質の受容体が発現していることが明らかとなり、さらに、リンパ球は神経伝達物質を自ら合成・放出しうることが判明し、神経伝達物質はパラクライン、オートクラインにリンパ球に作用し、免疫修飾作用を有することが明らかとなってきた²²⁾。

しかしながら、これまでドパミンと免疫系の関係の検討においては、ほとんどがリンパ節に分布した神経終末からドパミンが分泌されるという前提に基づいていたため、多様な自己免疫疾患やアレルギー疾患とドパミンの関連は想定不能であった。自然免疫の最前線に分布し獲得免疫との橋渡しをするDCがドパミン分泌能を有し、ナイーブCD4 T細胞との相互作用時に放出されるドパミン量がTh1/Th2分化方向を決定する重要な因子であることを明らかにした今回の検討は、従来Th1/Th2分化偏向に起因するとされていた各種の疾患の病態の見直しにつながるとともに、新たな治療法の開発につながるものと思われる。

また、EAEモデルマウスでの検討で高い臨床効果が明らかとなったドパミン受容体阻害薬に関しては、他の自己免疫疾患や喘息・アトピー性皮膚炎等のアレルギー性疾患のモデル動物における効果を検討中である。ヒトとマウスでの違いなど乗り越えるべき課題は存在するが、近い将来、このドパミンによる免疫調節機構をもとにした創薬が、種々の疾患へ臨床応用されることを期待したい。

研究成果リスト

(論文)

1. Antagonizing dopamine D1-like receptor inhibits Th17 cell differentiation: Preventive and therapeutic effects on experimental autoimmune encephalomyelitis. Nakano K, Higashi T, Hashimoto K, Takagi R, Tanaka Y and Matsushita S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008; 373: 286-91.
 2. 樹状細胞とT細胞の相互作用とTh1/Th2細胞の分化. 中野和久, 松下祥: 臨床免疫・アレルギー科. 47 (4): 458-63. 2007
 3. ドーパミンによる免疫調節作用. 中野和久, 松下祥: アレルギー 56: 679-84. 2007
 4. 樹状細胞の機能をめぐって. 中野和久, 松下祥: 呼吸 26 (8): 701-6. 2007
 5. Th2細胞分化におけるドーパミンの役割. 中野和久, 松下祥: 気道のアレルギー .5 (4): 9-14. 2007
 6. 樹状細胞によるTh2細胞の誘導とドーパミン. 中野和久, 松下祥: 臨床免疫・アレルギー科, 48(3): 256-62. 2007
- (学会発表)
1. 樹状細胞はドパミン合成・放出によりTh2分化偏向を誘導する. 中野和久, 田中良哉, 松下祥. 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2007年 11月
 2. Dopamine synthesized and released by dendritic cells polarizes Th2 differentiation. Nakano K, Tanaka Y, Matsushita S. 第37回 日本免疫学会, 2007年 11月

文 献

- 1) T Mosmann, H Cherwinski, M Bond, M Giedlin, R Coffman. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136: 2348-57.
- 2) T Kaisho, S Akira. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1589: 1-13.
- 3) ML Kapsenberg. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3: 984-93.
- 4) VK Kuchroo, MP Das, JA Brown, AM Ranger, SS Zamvil, RA Sobel, et al. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell*. 1995; 80: 707-18.
- 5) GJ Freeman, VA Boussiotis, A Anumanthan, GM Bernstein, XY Ke, PD Rennert, et al. B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity*. 1995; 2: 523-32.
- 6) R Gutzmer, C Diestel, S Mommert, B Kother, H Stark, M Wittmann, et al. Histamine H4 Receptor Stimulation Suppresses IL-12p70 Production and Mediates Chemotaxis in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J Immunol* 2005; 174: 5224-32.
- 7) H Harizi, M Juzan, V Pitard, J.-F. Moreau, N Gualde. Cyclooxygenase-2-Issued Prostaglandin E2 Enhances the Production of Endogenous IL-10, Which Down-Regulates Dendritic Cell Functions.

- J Immunol 2002; 168: 2255-63.
- 8) M Wakui, K Nakano, S Matsushita. Notch ligand mRNA levels of human APCs predict Th1/Th2-promoting activities. *Biochem and Biophys Res. Commun.* 2007; 358: 596-601.
 - 9) K Nakano, T Higashi, K Hashimoto, R Takagi, Y Tanaka, S Matsushita. Antagonizing dopamine D1-like receptor inhibits Th17 cell differentiation: Preventive and therapeutic effects on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008; 373: 286-91.
 - 10) C Missale, SR Nash, SW Robinson, M Jaber, MG Caron. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 1998; 78: 189-225.
 - 11) R Roskoski Jr, LM Roskoski. Activation of tyrosine hydroxylase in PC12 cells by the cyclic GMP and cyclic AMP second messenger systems. *J Neurochem.* 1987; 48: 236-42.
 - 12) RS Salah, DM Kuhn, MP Galloway. Dopamine autoreceptors modulate the phosphorylation of tyrosine hydroxylase in rat striatal slices. *J Neurochem.* 1989; 52: 1517-22.
 - 13) A Suarez, L Mozo, C Gutierrez. Generation of CD4 + CD45RA + Effector T Cells by Stimulation in the Presence of Cyclic Adenosine 5'-Monophosphate-Elevating Agents. *J Immunol* 2002; 169: 1159-67.
 - 14) S Klein-Hessling, MK Jha, B Santner-Nanan, F Berberich-Siebelt, T Baumruker, A Schimpl, et al. Protein Kinase A Regulates GATA-3-Dependent Activation of IL-5 Gene Expression in Th2 Cells. *J Immunol* 2003; 170: 2956-61.
 - 15) S Roy, J Wang, R Charboneau, HH Loh, RA Barke. Morphine Induces CD4 + T Cell IL-4 Expression through an Adenylyl Cyclase Mechanism Independent of the Protein Kinase A Pathway. *J Immunol* 2005; 175: 6361-67.
 - 16) CL Langrish, Y Chen, WM Blumenschein, J Mattson, B Basham, JD Sedgwick, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005; 201: 233-40.
 - 17) Y Komiyama, S Nakae, T Matsuki, A Nambu, H Ishigame, S Kakuta, et al. IL-17 Plays an Important Role in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* 2006; 177: 566-73.
 - 18) H Lassmann, RM Ransohoff. The CD4-Th1 model for multiple sclerosis: a critical [correction of crucial] re-appraisal. *Trends Immunol.* 2004; 25: 132-7.
 - 19) S Basu, PS Dasgupta. Dopamine, a neurotransmitter, influences the immune system. *J Neuroimmunol.* 2000; 102: 113-24.
 - 20) EJ Meredith, A Chamba, MJ Holder, NM Barnes, J Gordon. Close encounters of the monoamine kind: immune cells betray their nervous disposition. *Immunology.* 2005; 115: 289-95.
 - 21) Y Barak, A Achiron, M Mandel, I Mirecki, D Aizenberg. Reduced cancer incidence among patients with schizophrenia. *Cancer.* 2005; 104: 2817-21.
 - 22) R Franco, R Pacheco, C Lluís, GP Ahern, J O'Connell P. The emergence of neurotransmitters as immune modulators. *Trends Immunol.* 2007; 28: 400-7.