

## 「神経系」と「免疫系」の脳内クロストークを生殖制御で探る

Neuroimmune crosstalk in the central nervous system  
 and its possible involvement in the regulation of reproduction

金子 (大谷) 律子\*

### 1. はじめに

人間を含む動物の体は、「神経系」、「免疫系」、「内分泌系」の3つのシステムを中心に制御されていると考えられている(図1)。例えば、痛覚刺激を受ければ、その情報は中枢神経系に届き、運動神経により筋を動かして痛みを避ける。あるいは、細菌による感染が体に起これば、免疫系の細胞や抗体を用いて攻撃する。血糖値が上昇すれば、内分泌系細胞からホルモンが分泌され血糖値を下げようとする。このように、3つの系は独立して働くように嘗ては思われていたが、現在では3つの系はかなり協力して働いている(クロストークがある)と想定されている(図1)。

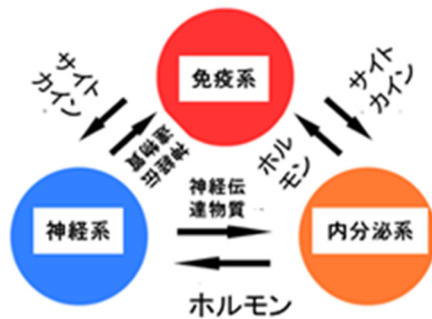


図1. 動物の体内調節機構の基本

これらのクロストークのうち、感覚的に昔から知られていたのは、「病は気から」つまり神経系によって受容される精神的ストレスにより免疫系の作用が低下するという「神経系から免疫系へのクロストーク」である。ストレス受容が免疫系に影響する仕組みとしては、図2のような内分泌経路を含んだ経路が良く示めされる。つまりストレスを神経系が受容し、その後交感神経や副交感神経などの自律神経系が、ノルアドレナリンやアドレナリンといった神経伝達物質やホルモン

を介して免疫反応に影響を与える経路(図2左側)

や、ストレスが「視床下部-下垂体-副腎系

(hypothalamic-pituitary-adrenal axis)」(図2右側)である。後者の経路は、視床下部から分泌される

副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン、次にその刺激を受けて下垂体から副腎皮質刺激ホルモン、さらにこの刺激を受けて副腎皮質から分泌される副腎皮質ホルモン(コルチゾールなど)が分泌され、副腎皮質ホルモンの免疫抑制作用により免疫系機能の低下が起こるとされる経路である(図2)。

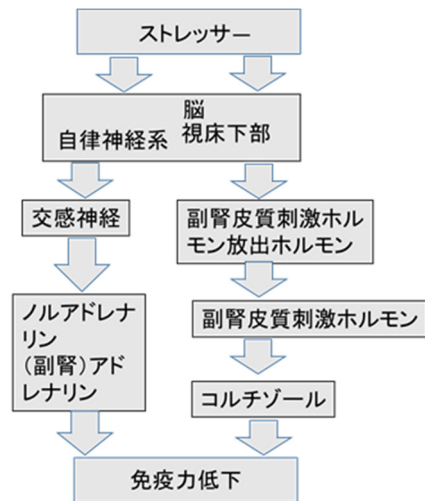


図2. ストレスを伝える内分泌経路を含んだ経路

最近では図2の系と別に、「ストレスを脳が受けることにより、脳内に微細な炎症が起こり、免疫系の異常を介して消化器機能障害や心機能低下などを引き起こす」という「神経系から免疫系そして各臓器」への情報の流れが動物実験により示された(「世界初! 「病は気から」の分子メカニズムの解明、北海道大学 Press release, 2017/8/16; Arima et al., 2017)。

このようにストレスについては、神経系-内分泌系-

### \*\*\*プロジェクト研究報告\*\*\*

#### =工業技術研究所プロジェクト研究報告=

免疫系間のクロストーク、あるいは神経系-免疫系間のクロストークに関する新たな経路が明らかになりつつある。

動物にはストレス以外に、「生殖」という非常に大きなライフイベントがある。「生殖」に関して、「生殖行動や生殖周期」が神経系と内分泌系のクロストークにより制御されていることは昔から知られている。また「生殖」への免疫系の関与に関して哺乳類では、母体にとっては異物である生殖細胞の侵入や胎児に対する免疫寛容（妊娠免疫寛容）について、内分泌系と免疫系とのクロストークが知られている。しかし「生殖行動や生殖周期」の制御への免疫系の関与については、殆ど報告がない。そこで本研究では、生殖行動を中心とした「脳の性転換」への免疫系の関与の可能性について調べた。

実験に使用したティラピア（モザンビークティラピア、*Oreochromis mossambicus*）は、雄は「巣穴掘りと攻撃行動」、雌は「口内保育（mouth brooding）」という雌雄で全く異なる生殖に伴う行動を行う（図 3.）。未熟な雌も成熟した雌も、巣穴掘りを行うことは正常な飼育下ではない。しかし成熟した雌ティラピアに魚類の雄性ホルモンである 11-ケトテストステロン（11-keto-testosterone, 11-KT）を腹腔内投与すると、巣穴掘りを始めることを私の研究室では見出した（Kuramochi et al., 2011）。つまり雄性ホルモンによって脳内の神経回路が変化し、雄に特異的な行動を雌が始めた（脳の性転換が起きた）と考えられる。この時 11-KT により明瞭な変化が起きたニューロンを少なくとも 1 種類同定できたので（Gonadotropin releasing hormone 3 expressing neuron, GnRH3 neuron）（Kuramochi et al., 2011）、このニューロンに変化をもたらすメカニズムについて様々な角度から調べている（GnRH3 ニューロンの増殖に関する証拠とそのメカニズムについて示した論文、Narita et al., 2018。また 11-KT により GnRH3 ニューロンへの分化が脳内で促進されている証拠と GnRH3 ニューロンの分化に関わる細胞内シグナル伝達経路について示した論文、現在投稿準備中など）。

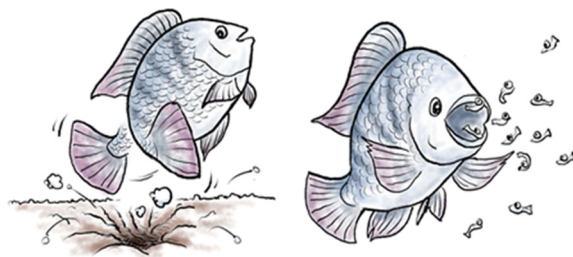


図 3. (左) 雄ティラピアの生殖行動である巣穴掘り  
(右) 雌ティラピアの生殖行動である口内保育

本研究では生殖行動の制御に、「神経系」や「内分泌系」に加えて「免疫系」も関与する可能性を調べる事を目的として、免疫系分子や免疫系細胞内シグナル伝達経路構成分子の発現変動について、11-KT を投与した成熟雌ティラピアと対照群の脳を用いて調べた。さらに変動が確認された経路について機能の検討や、雄性ホルモン受容体の発現細胞の存在部位の検討を行った。

## 2. 実験の概略

### 2. 1 方法

実験では 75 匹の成熟雌ティラピアを使用した。同程度のサイズの成熟した雌ティラピアを選び、11-KT 投与群には 11-KT を 5  $\mu\text{g/g}$  BW を sesame oil に溶かして投与した。また対象群には sesame oil のみを投与した。投与 24 時間後に麻酔下で断頭後、終神経節付近の脳領域を摘出した。脳片から RNA を抽出し、Genomic BioSci & Tech (New Taipei City, Taiwan) にトランスクリプトーム解析を依頼した（注：この部分は本研究とは別の予算で、台湾中央研究院 Hwang 教授との共同研究として実施したものである）。トランスクリプトーム解析により得られた結果の中から、免疫系に属する分子を洗い出した。また免疫系応答に関与する細胞内シグナル伝達経路で、11-KT により構成分子の発現が変化するものを探した（Kyoto Encyclopedia Genes and Genomes (KEGG) pathway ([https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?hsa04630](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04630))）。次に、これらの分子の 11-KT による発現変化を確かめるために、リアルタイム PCR を行っ

た。

上記の結果、11-KT 投与により多くの構成分子の mRNA 発現が変動 (増加) したジャック-スタット (JAK-STAT) 細胞内シグナル伝達経路 (免疫系応答に関与することが知られている) について、11-KT による GnRH3 ニューロン数増加に関与する機能があるかを、スライス脳培養法と 11-KT・ヤヌスキナーゼ (JAK) 阻害剤添加実験により調べた。方法としては、終神経節付近の脳スライスをヴィブラトームにより作製し、正中線で左右に切り離した (図 4)。片方を 11-KT 投与群、もう片方を対照群とし、11-KT による GnRH ニューロンの増加を確かめた。次に、片方を 11-KT 添加群、もう片方を 11-KT とヤ JAK 阻害剤添加群とし、11-KT による GnRH3 ニューロン数増加作用が JAK 阻害剤により抑えられるか調べた。(GnRH3 ニューロンの検出は、抗 GnRH3 抗体を用いた免疫染色により行った。)

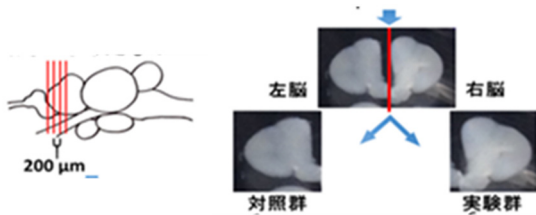


図 4. スライス培養用の脳スライスの作製

次に雄性ホルモン受容体やサイトカイン類の発現細胞の脳内での位置や細胞種を決定するために、免疫染色を行った。しかし市販の抗体でテラピアのこれらの分子を検出できるものが無かった。そこで切片上での特異的 mRNA 検出法である *in situ hybridization* を行った (台湾・中央研究院 Hwang 教授にご協力頂いた)。方法としては、11-KT 投与群あるいは対照群の成熟雌テラピアを麻酔下で灌流固定し、脳を摘出後、スクロース溶液での浸漬を経て、凍結薄切切片を作製した。切片の前処理は proteinase K で行った。プローブとしては digoxigenin (DIG) 標識したプローブを作製して用いた。プローブをハイブリダイズした後、洗いを経て、抗 DIG 抗体で免疫染色を行い、プロ

ーブが結合した mRNA 発現細胞を検出した。

## 2. 2 結果

トランスクリプトーム解析により得られたデータから、免疫系分子に注目して 11-KT 投与による発現変動の大きかった分子を抽出したところ、サイトカインやサイトカインの受容体の mRNA およびそれらの下流に位置する細胞内シグナル伝達経路 (JAK-STAT シグナル伝達経路) に属する分子の mRNA 発現が増加することを見出した。例えばサイトカインやその受容体の分子である以下の分子は、C-C motif chemokine receptors (CCR1 や CCR2 など)、Interferon-inducible proteins (IFI27、IFI30 など)、Interferon regulatory factor (IRF3、IRF7 など)、Suppressor of cytokine signaling (SOCS1 など)、Toll-like receptor (TKR2 など)、11-KT 群では対照群に比べて、3~5 倍 mRNA の発現量が増加した。

また免疫系応答に関与することが知られる細胞内シグナル伝達経路についてもトランスクリプトーム解析のデータを用いて調べたところ、JAK-STAT 経路に属する多くの分子の mRNA 発現が、11-KT により顕著に増加することが分かった (図 5)。

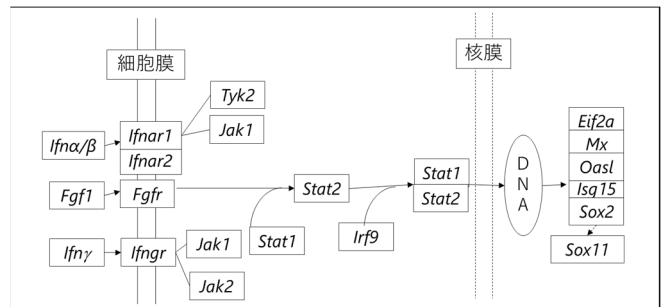


図 5. 11-KT により多くの構成分子の発現が増大した JAK-STAT シグナル伝達経路

トランスクリプトーム解析で 11-KT による発現変動が示唆された JAK-STAT 経路の分子について、リアルタイム PCR で実際の mRNA 発現変化を確認したところ、IFN $\alpha$ r1、IFN $\alpha$ r2、STAT1、IRF9、EIF2ak2、MX の mRNA に 11-KT による統計的に有意な発現増加が見られた (Student *t* test、*p* < 0.05)。

この結果から、11-KTにより脳内で生じる変化に JAK-STAT シグナル伝達経路が関わることを示唆された。そこで JAK-STAT 経路が「11-KT による GnRH3 ニューロンの増加」に関与するか否かについて、JAK 阻害剤を用いたスライス培養法により調べた。しかし、JAK 阻害剤は 11-KT による GnRH3 ニューロンの増加を抑えなかったことから、JAK-STAT 経路は、11-KT の GnRH3 ニューロン増加作用には関与しないと考えられた。

さらに *in situ* hybridization 法により、雄性ホルモン受容体が脳室周囲や脳外表面に並ぶ細胞に発現していることが観察された。雄性ホルモン受容体 mRNA を発現する細胞が脳室周囲および脳外表面に存在することから、放射状グリア (radial glia cells) と呼ばれる神経幹細胞が雄性ホルモン受容体を発現している可能性が強いと考えられた。

## 2. 考察・展望

雄に特異的な生殖行動 (巣穴掘りや攻撃) を雌に引き起こす雄性ホルモン・11-KT を成熟雌に投与することにより、その脳内でサイトカインやその受容体の仲間の遺伝子発現が増加することが明らかとなった。また、サイトカインの最も主要な細胞内シグナル伝達経路とされることが多い JAK-STAT シグナル伝達経路の構成分子の多くが、11-KT によって遺伝子発現を増加させることが、トランスクリプトーム解析およびリアルタイム PCR から明らかとなった。これらのことから、脳内 (神経系) で、内分泌系の要素である雄性ホルモンが、免疫系の要素や経路の遺伝子発現を変動させることが示された。

今回の結果では、これらのサイトカインやその受容体の仲間や、JAK-STAT シグナル伝達経路の機能までは明らかにすることが出来なかった。11-KT により GnRH3 ニューロン数は雌脳内で増加するが、今回のスライス培養実験では JAK-STAT シグナル伝達経路は 11-KT のこの作用には関与していないと考えられた。また *in situ* hybridization 法による染色結果から、雄性ホルモン受容体の mRNA は放射状グリア細胞 (神

経幹細胞) に発現していると考えられた。これら 11-KT を発現している神経幹細胞が、サイトカイン類を産生する細胞であるのか、*in situ* hybridization 法により今後明らかにしたい。また JAK-STAT シグナル伝達経路を発現している細胞はどのような細胞であるのか今後さらに調べ、JAK-STAT シグナル伝達経路が脳内で果たす機能について類推する手がかりを得たいと考えている。さらに、JAK-STAT シグナル伝達経路の脳内での機能が、ホルモン (11-KT など) によってどのように変化するかについても明らかにしたいと考えている。最近の研究によれば、JAK-STAT 経路が neural stem 細胞の分化制御に関わっているとの報告がある (Tanaka et al., 2018)。11-KT は、ティラピア脳での成体神経新生 (Adult neurogenesis) を増加させることを私たちは見出しているが (Narita et al., 2018)、この作用に JAK-STAT 経路が関係するのかもしれない。

「はじめに」で紹介したように、内分泌系、神経系と免疫系のクロストークは、副腎皮質ホルモンを介した経路や自律神経を介したストレス反応経路について知られている (図 2)。しかしその他にも、性ステロイドホルモンである女性ホルモンがサイトカインの産生を抑えたり、抗原提示細胞 (antigen-presenting cells) の分化や機能を抑制することや (Nalbandian & Kovacs S, 2005)、女性ホルモンが高い値で維持される妊娠中は、細胞性免疫による炎症が主体となると考えられる「多発性硬化症」や「関節リウマチ」は軽快することが報告されている (Ysraelit & Correale, 2019; Hughes & Choubey, 2014)。また一方で、自己抗体が病態の主体となると考えられている「全身性エリテマトーデス」は、妊娠中に悪化すると報告されている (Eudy et al., 2018)。この様に、雄性ホルモン (ヒトでは男性ホルモン) や雌性ホルモン (ヒトでは女性ホルモン) は生殖制御に主に働くホルモンであるが、免疫系の調節に関与する作用も次第に分かってきている。インターロイキン (interleukin : IL) やインターフェロン (interferon : IFN) 等のサイトカインやその受容体が脳にも存在することが最近報告されて

おり、脳の発生過程との関係が示唆されている

(Morimoto & Nakajima, 2019)。しかし、これらサイトカインの詳細な機能はまだ解明されていない。免疫系と内分泌系のクロストークや、免疫系と神経系のクロストークは今後益々明らかになってくることと思う。特に脳内での免疫系分子の作用と作用機序については、今後の基礎研究の広がりや製薬などへの応用研究が期待できる領域であろう。

まとめ

本研究により、雄性ホルモンである 11-KT が脳内でサイトカインやサイトカイン受容体、あるいは JAK-STAT シグナル伝達経路の構成分子の遺伝子発現を変動させることが明らかとなった。脳の性転換とこれら免疫系分子との関係は未だ不明であるが、脳内での免疫系分子の作用と作用機序は今後の発展が期待できる研究領域であろう。

#### 参考文献

- 1) Arima Y., Ohki T., Nishikawa N. et al. Brain micro-inflammation at specific vessels dysregulates organ-homeostasis via the activation of a new neural circuit. *eLIFE*, 6, e25517 (2017)
- 2) Kuramochi A, Tsutiya A, Kaneko T, Ohtani-Kaneko R. Sexual dimorphism of gonadotropin-releasing hormone type-III (GnRH3) neurons and hormonal sex reversal of male reproductive behavior in Mozambique tilapia. *Zoolog Sci.*, 28: 733-9 (2011)
- 3) Narita Y., Tsutiya A., Nakano Y., Ashitomi M., Sato K., Hosono K., Kaneko T., Chen R.D., Lee J.R., Tseng Y.C., Hwang P.P., Ohtani-Kaneko R. Androgen induced cellular proliferation, neurogenesis, and generation of GnRH3 neurons in the brain of mature female Mozambique tilapia. *Sci Rep.*, 8: 16855 (2018)
- 4) Tanaka Y., Yasugi T., Nagayama M., Sato M., Ei S. JAK/STAT guarantees robust neural stem cell differentiation by shutting off biological noise. *Sci. Rep.*, 8:12383 (2018)
- 5) Nalbandian G., Kovats S. Understanding sex biases in immunity: effects of estrogen on the differentiation and function of antigen-presenting cells. *Immunol Res.*, 31: 91-106. Review (2005)
- 6) Ysrraelit M.C., Correale J. Impact of sex hormones on immune function and multiple sclerosis development. *Immunology*, 156: 9-22. Review (2019)
- 7) Hughes G.C., Choubey D. Modulation of autoimmune rheumatic diseases by oestrogen and progesterone. *Nat Rev Rheumatol.*, 10:740-51 (2014)
- 8) Eudy A.M., Siega-Riz A.M., Engel S.M., Franceschini N., Howard A.G., Clowse M.E.B., Petri M. Effect of pregnancy on disease flares in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.*, 77:855-860 (2018)
- 9) Morimoto K., Nakajima K. Role of the Immune System in the Development of the Central Nervous System. *Front Neurosci.*, 13:916 (2019)