

リポポリサッカライド刺激によるマクロファージからのサイトカイン産生に 対するカルシトニン遺伝子関連ペプチドの抑制

笹岡 知子

明治鍼灸大学大学院 免疫生化学

要旨: マクロファージは活性化刺激を受けると、種々のサイトカインを産生することにより、炎症反応調節の中心的役割を担う。また、神経系が神経ペプチドを介して炎症反応の調節に関与することも示されている。そこで今回、神経ペプチドによるマクロファージを介する炎症反応の調節作用を検討するために、リポポリサッカライド (LPS) 刺激によるマクロファージのサイトカイン産生へのカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) の効果について検討した。チオグリコレート培地投与により得た腹腔マクロファージをそのまま又はインターフェロン- γ で前処理した後 LPS 刺激することにより誘導した TNF- α 、IL-6、IL-12 の産生を、CGRP は濃度に依存して抑制した。また、CGRP と共に CGRP アンタゴニストであるヒト CGRP₈₋₂₇ を LPS 刺激マクロファージに加えると、CGRP の抑制効果は解除された。これらの結果は、CGRP がマクロファージのサイトカイン産生を、その活性化段階に関わらず特異的に抑制することを示しており、このことから、CGRP が炎症反応において負の調節因子として作用することが示唆される。

I. はじめに

炎症反応におけるマクロファージの役割についての研究は、メチニコフ以来長い歴史を持つ¹⁾。マクロファージは、食細胞として殺菌・消化の作用を示すばかりでなく、サイトカイン産生によって炎症反応の調節^{2,3)}を行うことも良く知られている。マクロファージはリポポリサッカライド (LPS) などによる活性化刺激を受けると、腫瘍壊死因子- α (TNF- α)⁴⁾、インターロイキン (IL)-1⁵⁾、IL-6⁶⁾、IL-10⁷⁾、IL-12⁸⁾、IL-15⁹⁾ などのサイトカインを産生する。そのうち、TNF- α ⁴⁾、IL-1⁵⁾、IL-6⁶⁾ は、炎症性サイトカインとして血管内皮細胞の活性化、白血球の活性化、白血球遊走の亢進などの作用を示す。IL-12⁸⁾ はナイーブなヘルパー T 細胞に働き、インターフェロン- γ (IFN- γ) や IL-2 を産生することを特徴とする I 型ヘルパー T 細胞への分化を誘導する。IL-15⁹⁾ は、IL-2 同様の T 細胞増殖因子として働く。また、IL-10⁷⁾ は炎症反応のネガティブフィードバック機構として、マクロファージからの炎症性サイトカイン産生を抑制する。この様に多様な作用を持

つ種々のサイトカインを産生することで、マクロファージは、炎症反応の調節に重要な役割を演じている。

皮膚などの局所での炎症反応においては、末梢神経系がその調節に関与することが報告されている¹⁰⁻¹¹⁾。その調節を行う分子として、神経終末から放出される種々の神経ペプチドが知られている¹⁰⁾。その中で、皮膚で最も多く発現が認められている神経ペプチドとしてカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) が知られている¹²⁾。CGRP は、カルシトニン遺伝子 mRNA の組織特異的なスプライシングにより生成される 37 個のアミノ酸から成る神経ペプチドである¹³⁾。この CGRP は、中枢¹³⁾ 及び末梢神経¹⁴⁻¹⁸⁾ に広く分布し、末梢神経では知覚神経¹⁴⁻¹⁶⁾ ばかりでなく自律神経¹⁷⁾ や運動神経¹⁵⁾ にも分布することが知られている。また CGRP については、炎症反応において炎症増強因子としても炎症抑性因子としても働く、という相反する報告がされている。炎症増強因子としては、CGRP 自身が強い血管拡張因子^{19, 20)} として働くばかりでなく、他の炎症性因子と共同して働

平成9年12月8日受付, 平成9年12月26日受理

Key Words : マウス腹腔マクロファージ mouse peritoneal macrophage, カルシトニン遺伝子関連ペプチド Calcitonin gene-related peptide (CGRP), 腫瘍壊死因子- α Tumor necrosis factor- α (TNF- α), インターロイキン-6 Interleukin-6 (IL-6), インターロイキン-12 Interleukin-12 (IL-12)

連絡先 : 〒629-0392 京都府船井郡日吉町 明治鍼灸大学 大学院免疫・微生物教室

くことで、血漿漏出や^{22,24)}白血球の遊走を高めることが報告されている²⁴⁾。他方、CGRPは、抗原提示細胞の活性の抑制^{25, 26)}や、T細胞のマイトージェンによる増殖反応²⁷⁾やヘルパーT細胞からのサイトカイン産生の抑制²⁸⁾、遅延型過敏症反応^{29,30)}や、接触型過敏症反応³⁰⁾の抑制を行うことも知られている。これらのことは、CGRPが炎症反応に対して重要な働きをしている可能性を示唆しており、CGRPが炎症反応調節の中心となって働くマクロファージの活性に対しても調節作用を持つことが強く示唆される。マクロファージや単球の活性に対するCGRPの効果に関しては、IFN- γ 刺激による過酸化水素産生の抑制²⁵⁾、活性化膜表面分子である主要組織適合抗原クラスIIやB7.2の発現抑制^{31, 32)}、食細胞活性の増強³³⁾が報告されている。さらに最近TopiiらはCGRPによるマクロファージのIL-10産生増強とIL-1産生抑制³⁴⁾を報告している。しかし、マクロファージからの種々のサイトカイン産生に対するCGRPの効果については充分明らかとなっていない。

そこで、本研究では、*in vitro*でのLPS刺激によるマクロファージのサイトカイン産生に対するCGRPの効果を検討した。マクロファージはマウス腹腔内に炎症惹起因子であるチオグリコレート培地を投与して誘導したものおよびそれを*in vitro*でIFN- γ 前処理によって活性化したものをを用い、LPS刺激によりサイトカイン産生を誘導した。その結果、CGRPはマクロファージの活性化段階に関わらず特異的な作用によってTNF- α 、IL-6、IL-12産生を抑制することが明らかとなった。

II 材料と方法

1. 試薬と培地

大腸菌O111:B4由来LPS (Difco laboratories, Detroit, MI), リコンビナントマウスIFN- γ (Genzyme, Cambridge, MA), リコンビナントTNF- α (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany), ラットCGRP, ヒトCGRP₈₋₃₇ (ペプチド研究所, 大阪), アクチノマイシン-D (和光純薬, 大阪), チオグリコレート培地 (TGC, 日水製薬, 東京) を用いた。CGRPはPBSに溶解して分注後、液体窒素内で保存した。マウスの腹腔内洗浄には、Eagle's minimal

essential medium培地 (MEM, 日水製薬, 東京) を用いた。マクロファージの培養には、RPMI 1640培地 (日水製薬, 東京) にペニシリンG (明治製菓, 東京) 100 U/ml, 硫酸ストレプトマイシン (明治製菓, 東京) 100 μ g/ml, 炭酸水素ナトリウム (和光純薬, 大阪) 2 g/l, 非必須アミノ酸 (BioWhittaker, Walkersville, MD) 1×10^{-3} mol/l, MEMピルビン酸ナトリウム (Gibco BRL, Grand Island, NY) 1×10^{-3} mol/l, L-グルタミン (ナカライテスク, 京都) 2×10^{-3} mol/l, 及び2-メルカプトエタノール (ナカライテスク, 京都) 5×10^{-5} mol/l を添加したものをを用いた。L929細胞の培養には、 α -MEM培地 (Gibco BRL, Grand Island, NY) にペニシリンG 100 U/ml, 硫酸ストレプトマイシン 100 μ g/ml, 炭酸水素ナトリウム 2 g/l 及び10% ウシ胎仔血清 (FCS, BioWhittaker, Walkersville, MD) を添加して用いた。

2. 腹腔マクロファージの分離と培養

6-12週令C57BL/6雄性マウスの腹腔内にTGCを1.5ml投与してマクロファージを誘導した。TGC投与後5日目にマウスを脱血死させた後、MEMで腹腔内を洗浄し腹腔細胞を回収した。細胞は130gで5分間遠心分離し、マクロファージ培養用培地で2回洗浄した後、24穴培養用プレート (岩城硝子, 千葉) に 10^6 個/1ml/穴で入れ、37°C, 5% CO₂のインキュベーター内で培養した。培養2時間後、培地でプレートを3回洗浄することで非付着性細胞を取り除き、残った付着性細胞をマクロファージ画分とした。マクロファージからのサイトカイン産生誘導は、LPSを含む培地で37°C, 5% CO₂条件下で培養することにより行った。ラットCGRP及びヒトCGRP₈₋₃₇の効果は、LPSとの同時添加により検討した。また、CGRP前処理群はマクロファージにCGRPを加えて24時間前培養した。IFN- γ によるマクロファージの活性化はマクロファージにIFN- γ を加えて24時間前培養することにより誘導した。LPS刺激マクロファージを培養後、培養上清を採取し、マイクロチューブ (岩城硝子, 千葉) に分注後、サイトカイン測定まで-80°Cで保存した。全ての実験において培養終了後、培養したマクロファージの生細胞数に変化がないことを確認した。

3. サイトカイン測定

3-1) TNF- α 測定 ; L929 細胞を用いた細胞傷害性アッセイ法で測定した. 培養フラスコにセミコンフルーエントとなった L929 細胞を, トリプシン処理してチューブに回収した後遠心洗浄し, L929 細胞培養用培地に浮遊させ 10' 個ずつ (100 μ l/穴) 96 穴平底培養プレート (岩城硝子, 千葉) に分注し, 37°C, 5% CO₂ のインキュベーター内で 18 時間培養した. 培養上清試料, 及び標準試料として用いたリコンビナント TNF- α は, 1% FCS 及びアクチノマイシン-D (0.5 μ g/ml) を加えた α -MEM 培地にて, 5 倍希釈系列をトリプリケートで作り, 培地を吸引除去した L929 細胞の培養プレートの各穴に 200 μ づつ加えて, さらに 24 時間培養した. 培養終了後, 細胞を 0.5% クリスタルバイオレット (ナカライテスク, 京都) の 20% エタノール溶液にて固定/染色した. このプレートを水洗, 乾燥後, 0.05M リン酸二水素ナトリウムの 50% エタノール溶液にて色素抽出を行い, 570 nm のフィルターを付けたマイクロプレートリーダー (東ソー, 東京) で各々の吸光度を測定し, 各培養上清試料中の TNF- α 量を, 標準曲線から算出した. 尚, 培養上清試料中に含まれる LPS 及び CGRP はアッセイ系に影響しない事は前もって確認していた.

3-2) IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 測定 ; マウスサイトカインイムノアッセイキット (BioSource International, Camarillo, CA) を用いて酵素抗体法により測定した. 測定には, 培養上清の 5 倍希釈系列をトリプリケートで作成したものを用いた. それぞれのインターロイキンに特異的な単クローン抗体が固相化された 96 穴プレートの各穴に, 希釈系列をつかった培養上清及び標準のインターロイキン試料を加え, キット添付のマニュアルに従って反応させた後, 450 nm のフィルターを付けたマイクロプレートリーダーで吸光度を測定した. サイトカインの量は, 標準試料から求めた曲線を用い算出した.

4. 統計処理

数値は全て平均 (Mean) \pm 標準誤差 (SEM) で示した. 各群が等分散であることを Windows 95 用統計処理ソフト (STATISTICA51, StatSoft Inc., USA) を用いバートレット法により確認し

た上で, サイトカイン産生量の群間比較については, Macintosh 用表計算ソフト (Microsoft Excel 5.0, Microsoft Inc., USA) を用いボンフェローニ多重比較検定法で有意差検定を行った.

III 結 果

1. LPS 刺激によるマクロファージからのサイトカイン産生の至適条件の検討

LPS 刺激によるマクロファージからのサイトカイン産生における LPS 濃度及び刺激時間についての至適条件を, TNF- α 産生を指標とし検討した.

まず, マクロファージの刺激に用いる LPS の至適濃度について検討を行った. マクロファージに無添加または LPS 1~10000 ng/ml を加えて 18 時間培養した後培養上清を採取し, 培養上清中の TNF- α 量を測定した (図. 1). 上清中に TNF- α は, LPS 無添加及び LPS 1 ng/ml で認められず, LPS 10, 100, 1000, および 10000 ng/ml ではそれぞれ 19.3 \pm 5.8 pg/ml, 9071.2 \pm 1351.6 pg/ml, 4291.1 \pm 386.1 pg/ml, および 6982.5 \pm 509.5 pg/ml であり, LPS 100 ng/ml の時 TNF- α 産生が最も高かった.

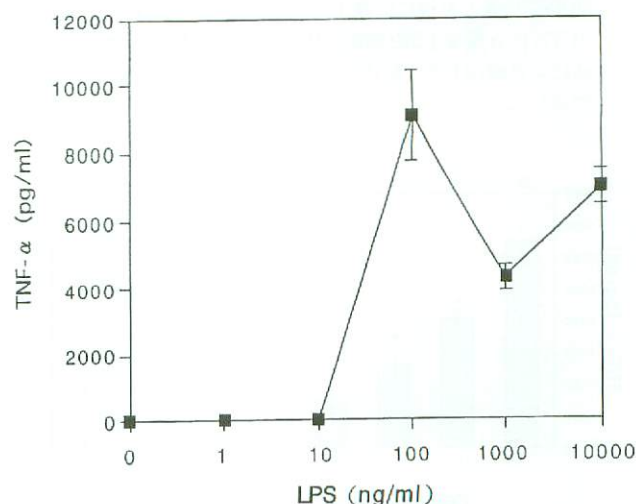


図1 種々の LPS 濃度によるマクロファージからの TNF- α 産生の
マクロファージに無添加または LPS (1,10,100,1000, 10000ng/ml) を加えて 18 時間培養した. 培養後上清を採取し, 培養上清中の TNF- α 量を L929 細胞を用いた細胞障害アッセイ法で測定した. 数値は Mean \pm SEM (n = 4) で示した.

そこで、LPS 100ng/mlに設定してマクロファージを刺激した時のサイトカイン産生の至適時間を検討した。マクロファージにLPS 100ng/mlを加えて6, 18, および30時間培養した後上清を採取し、各上清中のTNF- α 量を測定した(図. 2)。TNF- α 量は刺激後6, 18, および30時間で、それぞれ1330 \pm 84.2pg/ml, 2068.5 \pm 974.7pg/ml, および126.6 \pm 22.4pg/mlであり、刺激後18時間がピークであった。

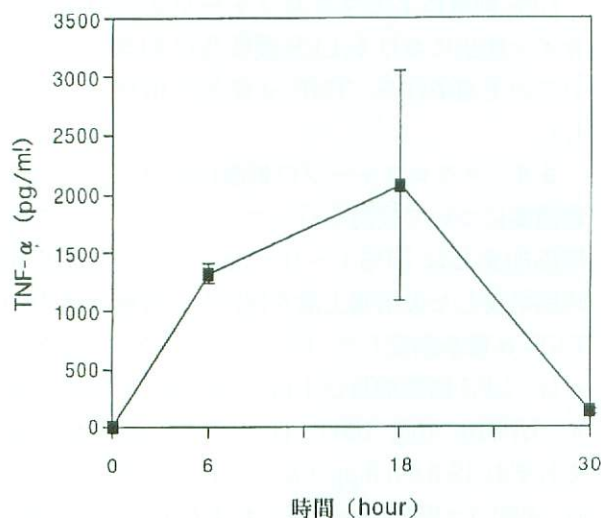


図2 LPS刺激によるマクロファージからのTNF- α 産生の経時変化

マクロファージにLPS (100ng/ml)を加えて6, 18, 30時間培養した後に培養上清を採取し、培養上清中のTNF- α 量をL929細胞を用いた細胞障害アッセイ法により測定した。数値はMean \pm SEM (n=4)で示した。

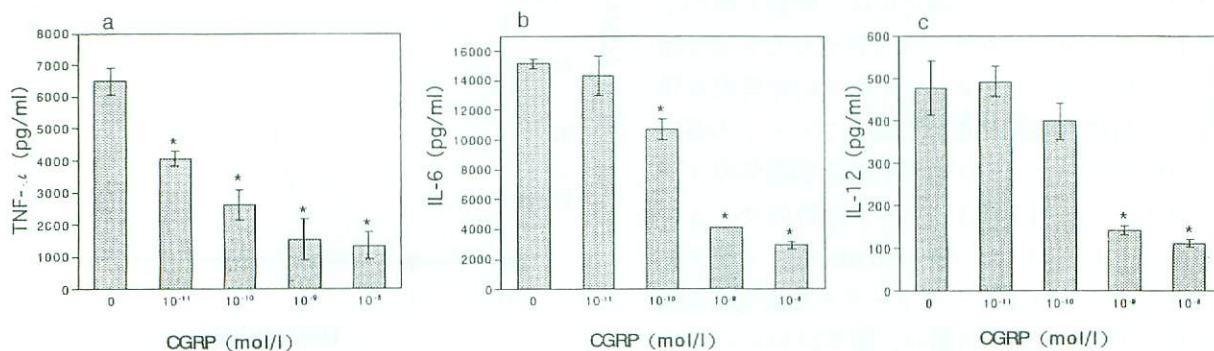


図3 CGRP添加によるLPS刺激マクロファージからのTNF- α , IL-6, IL-12産生の抑制効果

マクロファージにLPS (100ng/ml)のみ, LPSとCGRP (10⁻¹¹, 10⁻¹⁰, 10⁻⁹, 10⁻⁸ mol/l)を加えて18時間培養した後上清を採取し、培養上清中のTNF- α (a), IL-6 (b), IL-12 (c)量を測定した。(a)TNF- α 産生量はL929細胞を用いた細胞障害アッセイ法で、(b)IL-6と(c)IL-12産生量はイムノアッセイキットを用いて測定した。有意差検定は、CGRP無添加群をコントロールとし、各濃度のCGRP添加群の間で行った。数値はMean \pm SEM (n=4)で示した。*; P<0.05

以上の結果より、LPS刺激によるマクロファージからのサイトカイン産生は、LPSを100ng/ml, 刺激時間18時間としたとき最大であり、これを至適条件として、以下この条件下でサイトカイン産生に対するCGRPの効果を検討した。

2. CGRPによるLPS刺激マクロファージからのサイトカイン産生の抑制

LPS刺激によるマクロファージからのサイトカイン産生に対し、CGRPがどのように影響するのかを検討した。マクロファージにLPSのみ, LPSと共にCGRP 10⁻¹¹から10⁻⁸ mol/lを加えて培養した後培養上清を採取し、上清中のTNF- α , IL-6, IL-12量を測定した(図. 3)。

上清中のTNF- α 量は、LPS刺激のみでは6497.1 \pm 427.4 pg/mlであったが、それに対してCGRP 10⁻¹¹, 10⁻¹⁰, 10⁻⁹, および10⁻⁸ mol/lの存在下では、それぞれ4067.1 \pm 230.5pg/ml, 2622.7 \pm 475.3pg/ml, 1534.6 \pm 636.9pg/ml, および1334.7 \pm 423.4pg/mlであり、10⁻¹¹ mol/lより有意な減少が認められた(図. 3a)。このことより、LPS刺激によるマクロファージのTNF- α 産生は、CGRPの濃度に依存して抑制されることが明らかとなった。

上清中のIL-6量は、LPS刺激のみでは15135.7 \pm 314.7pg/mlであったが、それに対してCGRP 10⁻¹¹, 10⁻¹⁰, 10⁻⁹, および10⁻⁸ mol/lの存在下では、それぞれ14335.8 \pm 1303.1pg/ml, 10709.2 \pm

692.4pg/ml, 4104.5±51.6pg/ml, および 2920.6±240.2pg/mlであり, 10⁻¹⁰mol/lより有意な減少が認められた(図. 3b). このことから, LPS刺激によるマクロファージのIL-6産生はCGRP 10⁻¹⁰mol/l以上で濃度依存的に抑制されることが示された.

培養上清中のIL-12量は, LPS刺激では477.6±64.5pg/mlであったが, それに対してCGRP 10⁻¹¹, 10⁻¹⁰, 10⁻⁹, および10⁻⁸mol/lの存在下では, それぞれ493.3±35.4pg/ml, 399.0±44.2pg/ml, 142.7±11.1pg/ml, および111.1±9.3pg/mlであり, CGRP10⁻⁹mol/lより有意な減少が認められた(図. 3c). このことより, LPS刺激によるマクロファージのIL-12産生はCGRP10⁻⁹mol/l以上の濃度で抑制されることが示された.

これらの結果より, マクロファージのLPS刺激によるTNF-α, IL-6, およびIL-12産生は, CGRPにより抑制されることが示された. また, CGRPの抑制作用は産生されるサイトカインの種類によって異なることが明らかとなった.

今回の実験系ではLPS刺激マクロファージからのIL-1とIL-10の産生はどちらも認められなかったので, 以後TNF-α, IL-6, IL-12のみについて検討した.

3. CGRP アンタゴニスト：ヒトCGRP₈₋₃₇はCGRPによるLPS刺激マクロファージからのTNF-α, IL-6, IL-12産生の抑制作用に拮抗する^{35, 36)}

CGRPの存在下ではLPS刺激マクロファージからのTNF-α, IL-6, IL-12産生が抑制されたが, その抑制作用がCGRP特異的効果であるのかどうかを検討するために, CGRPの特異的活性部位であるN末端を欠きCGRPレセプターの結合部位のみを持ち, アンタゴニストでありカルシトニンのアゴニストであるヒトCGRP₈₋₃₇を用いてCGRPの効果に対する拮抗作用の有無を検討した. マクロファージにLPSのみ, LPSとCGRP (10⁻⁹mol/l), LPSとCGRPおよびヒトCGRP₈₋₃₇ 10⁻⁸~10⁻⁶mol/lを加えて培養した後培養上清を採取し, 上清中のTNF-α, IL-6, およびIL-12量を測定した(図. 4).

上清中のTNF-α量はLPS刺激のみでは6976.9±635.1pg/mlであり, CGRP10⁻⁹mol/lの存在下では1885.7±311.9pg/mlに有意に減少した. 一方, CGRPとヒトCGRP₈₋₃₇ 10⁻⁸, 10⁻⁷, および10⁻⁶mol/lの共存下では, それぞれ6629.9±431.5pg/ml, 7116.6±562.5pg/ml, および5098.9±636.9pg/mlであり, LPS刺激のみとほぼ同等まで回復した(図. 4a). このことより, CGRP10⁻⁹mol/lによるLPS刺激マクロファージからの

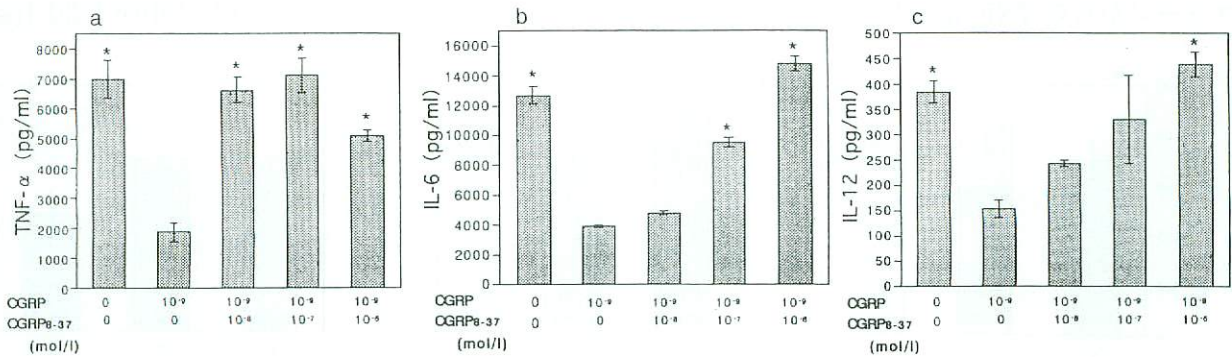


図4 ヒトCGRP₈₋₃₇によるCGRPのLPS刺激マクロファージからのTNF-α, IL-6, IL-12産生抑制の解除

マクロファージにLPS (100ng/ml)のみ, LPSとCGRP (10⁻⁹mol/l), LPSとCGRP及びヒトCGRP₈₋₃₇ (10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶mol/l)を加えて18時間培養した後上清を採取し, 培養上清中のTNF-α(a), IL-6(b), IL-12(c)量を測定した. (a)TNF-α産生量はL929細胞を用いた細胞障害アッセイ法で, (b)IL-6と(c)IL-12産生量はイムノアッセイキットを用いてそれぞれ測定した. 有意差検定は, 先ずCGRP無添加群に比べCGRP添加群でのサイトカイン産生が有意に減少したのを確認した上で, CGRP添加群とCGRPとヒトCGRP₈₋₃₇の各濃度の添加群の間で行った. 数値はMean±SEM (n=4)で示した. *; P<0.05

TNF- α 産生抑制作用はヒトCGRP $_{8-37}$ 10^{-8} mol/l以上の濃度で有意に拮抗されることが明らかとなった。

上清中のIL-6量は、LPS刺激のみでは 12700.9 ± 570.1 pg/mlであったが、CGRP 10^{-9} mol/lの存在下で 3926.2 ± 69.3 pg/mlに減少した。一方、CGRPとヒトCGRP $_{8-37}$ 10^{-8} 、 10^{-7} 、および 10^{-6} mol/l共存下では、それぞれ 4835.4 ± 110.6 pg/ml、 9505.1 ± 330.8 pg/ml、および 14784.7 ± 495.0 pg/mlであり、ヒトCGRP $_{8-37}$ 10^{-6} mol/lでLPS刺激のみと同等まで回復した(図. 4b)。このことから、CGRPによるLPS刺激マクロファージからのIL-6産生抑制作用はヒトCGRP $_{8-37}$ 10^{-7} mol/l以上の濃度で有意に拮抗されることが示された。

上清中のIL-12量は、LPS刺激のみでは 384.7 ± 21.8 pg/mlであり、CGRP 10^{-9} mol/lの添加で 153.3 ± 17.3 pg/mlに減少したが、一方ヒトCGRP $_{8-37}$ を 10^{-8} 、 10^{-7} 、および 10^{-6} mol/lの共存下では、それぞれ 243.9 ± 21.8 pg/ml、 331.1 ± 86.6 pg/ml、および 439.7 ± 23.4 pg/mlであり、ヒトCGRP $_{8-37}$ 10^{-6} mol/lでLPS刺激のみと同等まで回復した(図. 4c)。このことから、CGRPによるLPS刺激マクロファージからのIL-12産生抑制作用は、ヒトCGRP $_{8-37}$ 10^{-6} mol/l以上の濃度の添加により有意に拮抗されることが示された。

以上のように、CGRPによるLPS刺激マクロファージからのTNF- α 、IL-6、IL-12産生抑制

はいずれもヒトCGRP $_{8-37}$ により拮抗されたことから、このCGRPの抑制作用は、活性部位であるN末端を介したCGRPの特異的な効果であることが明らかとなった。

4. CGRPによる前処理では、マクロファージのLPS刺激でのTNF- α 、IL-6、IL-12産生は抑制されない

CGRPはその特異的な効果によりLPS刺激マクロファージからのTNF- α 、IL-6、IL-12産生を抑制することが明らかとなった。他方、マクロファージはIFN- γ 刺激により細胞内過酸化水素を産生するが、この反応に対して、CGRPはマクロファージへの前処理で抑制効果を示すことが報告²⁵⁾されている。そこで、マクロファージからのTNF- α 、IL-6、IL-12産生に対してもCGRPはLPS刺激時の同時に存在する時ばかりでなく、CGRPでマクロファージを前処理した後にLPS刺激した場合でも抑制効果を示すのかどうかを検討した。マクロファージに無添加またはCGRP 10^{-8} 、 10^{-9} mol/lを加えて24時間前培養した後、CGRPを取り除く為に培地にて洗浄し、LPS刺激を行った。培養終了後培養上清を採取し、上清中のTNF- α 、IL-6、IL-12量を測定した(図. 5)。

上清中のTNF- α 量は、前培養でCGRPを加えなかった対照群では 1749.1 ± 198.8 pg/mlで、CGRP 10^{-9} 、 10^{-8} mol/lでの前処理培養群ではそれぞれ 2083.5 ± 275.3 pg/ml、 1916.6 ± 291.1 pg/ml

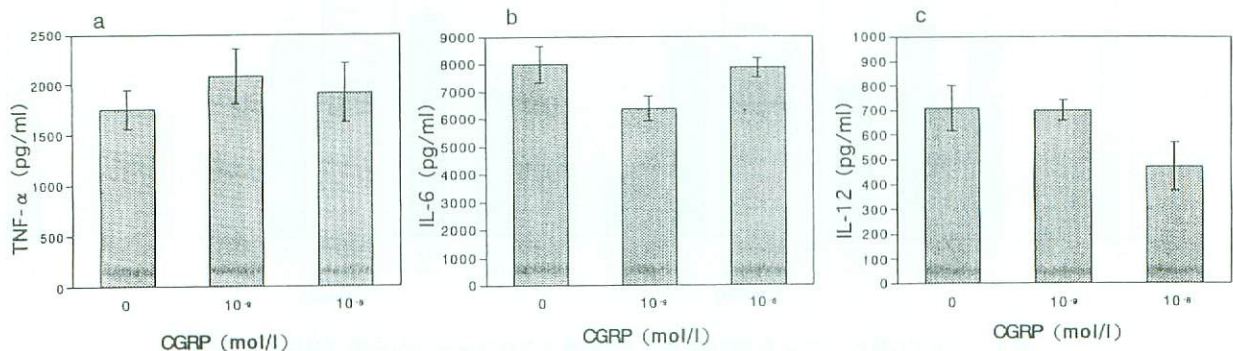


図5 CGRP前処理によるマクロファージのLPS刺激によるTNF- α 、IL-6、IL-12産生への影響

マクロファージに無添加及びCGRP (10^{-9} 、 10^{-8} mol/l)を加えて24時間前培養し、培地で洗浄した後、LPS (100ng/ml)を加えて18時間培養した。培養後上清を採取し、培養上清中のTNF- α (a)、IL-6 (b)、IL-12 (c)量を測定した。(a)TNF- α 産生量はL929細胞を用いた細胞障害アッセイ法で、(b)IL-6と(c)IL-12産生量はイムノアッセイキットを用いて測定した。有意差検定は、CGRP無添加群をコントロールとし、各濃度のCGRP添加群の間で行った。数値はMean \pm SEM (n = 4)で示した。

／mlであった(図. 5a).

上清中のIL-6量は、対照群では7998.6±665.5 pg/mlで、前処理群ではそれぞれ6376.5±441.9 pg/ml, 7864.1±347.5pg/mlであった(図. 5b).

上清中のIL-12量は、対照群では708.2±92.1 pg/mlで、前処理群ではそれぞれ699.3±43.5pg/ml, 472.8±96.7pg/mlであった(図. 5c).

これらの結果より、CGRPはマクロファージへの前処理では、その後のLPS刺激によるマクロファージからのTNF-α, IL-6, IL-12産生を抑制しないことが示された。このことから、CGRPがマクロファージからのLPS刺激によるTNF-α, IL-6, IL-12産生を抑制するには、CGRPがLPS刺激時に存在することが必要であることが明らかとなった。

5. CGRPはIFN-γ刺激によって活性化したマクロファージでのLPS刺激によるTNF-α, IL-6, IL-12産生も抑制する

マクロファージは、炎症局所において浸潤してきた型ヘルパーT細胞やナチュラルキラー細胞により産生されたIFN-γの刺激で活性化され、主要組織適合抗原クラス分子が発現し、さらに種々の細胞内酵素の産生が誘導されることが知られている³⁷⁾。そこで、IFN-γ刺激により活性化したマクロファージにおいてもCGRPがLPS刺激によるTNF-α, IL-6, IL-12産生において同様な抑

制効果を示すのかどうかを検討した。マクロファージをIFN-γ100U/ml存在下で24時間前培養し、培地で洗浄してIFN-γを取り除いた後、LPSのみ、及びLPSとCGRP $10^{-8} \sim 10^{-11} \text{ mol/l}$ を加え培養した後上清を採取し、培養上清中のTNF-α, IL-6, IL-12量を測定した(図. 6)。IFN-γで活性化したマクロファージでは、IFN-γによる前培養なしのマクロファージと比較して、TNF-α及びIL-12の産生亢進と、IL-6の産生低下が認められた。

上清中のTNF-α量はLPS刺激のみでは14846.5±1960.7pg/mlであったが、それに対してCGRP 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , および 10^{-8} mol/l の存在下では、それぞれ13000.2±1087.6pg/ml, 10946.0±2318.1pg/ml, 4667.6±591.3pg/ml, および3964.7±1382.7pg/mlであった(図. 6a).

上清中のIL-6量は、LPS刺激のみでは2519.1±87.5pg/mlであったが、それに対してCGRP 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , および 10^{-8} mol/l の存在下では、それぞれ2333.3±92.9pg/ml, 2127.5±135.7pg/ml, 1035.4±28.6pg/ml, および1231.0±117.6pg/mlとなった(図. 6b).

上清中のIL-12量はLPS刺激のみでは1866.8±313.8pg/mlであったが、それに対してCGRP 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , および 10^{-8} mol/l の存在下では、それぞれ1704.3±64.0pg/ml, 1339.0±44.2pg/ml, 412.1±60.9pg/ml, 232.1±57.9pg/ml

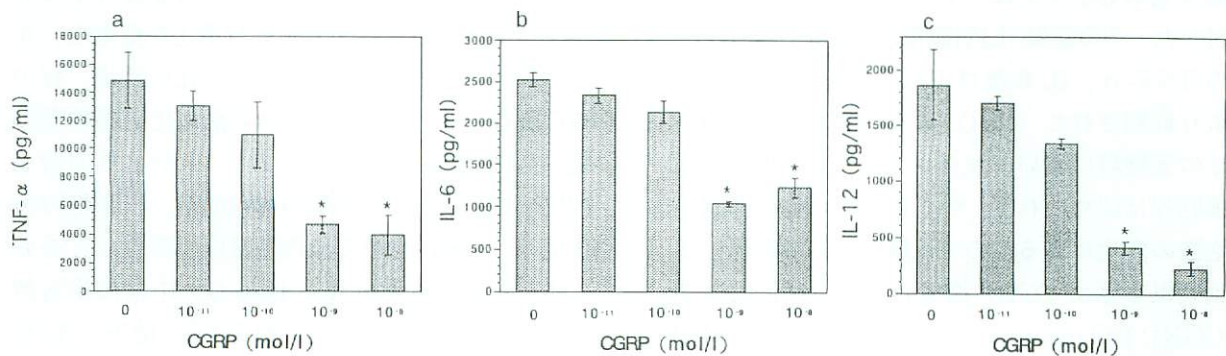


図6 IFN-γ前処理マクロファージでのLPS刺激によるTNF-α, IL-6, IL-12産生に対するCGRPの抑制効果

マクロファージにIFN-γ(100U/ml)を加えて24時間前培養後、培地にて洗浄し、LPS(100ng/ml)のみ、LPSとCGRP(10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} mol/l)を加えて18時間培養し、培養上清中に産生されたTNF-α(a), IL-6(b), IL-12(c)量を測定した。(a)TNF-α産生量はL929細胞を用いた細胞障害アッセイ法で、(b)IL-6と(c)IL-12産生量はイムノアッセイキットを用いて測定した。有意差検定は、CGRP無添加群をコントロールとし、各濃度のCGRP添加群の間で行った。数値はMean±SEM(n=4)で示した。*; P<0.05

となった(図. 6c).

以上のようにIFN- γ 前処理マクロファージのLPS刺激によるTNF- α , IL-6, IL-12産生は、いずれもCGRP 10^{-9} mol/l以上で有意に抑制されることが示された。これらの結果から、CGRPはIFN- γ 前処理で活性化を受けたマクロファージにおいてもLPS刺激によるTNF- α , IL-6, IL-12産生を抑制することが明らかとなった。

IV 考 察

CGRPは、広く中枢¹³⁾および末梢神経系に存在することが示されている^{4, 18)}。末梢では、血管周囲に存在する自律神経¹⁷⁾、皮膚や粘膜に分布する知覚神経^{14, 16, 18)}にCGRPが存在し、CGRP陽性神経線維の一部は、サブスタンスPも同時に含有すること³⁸⁾が示されている。また、知覚神経に存在するCGRPは、神経の電気刺激³⁹⁾、カプサイシン刺激⁴⁰⁾、ヒスタミン⁴¹⁾やブラジキニン⁴²⁾などの炎症性メディエーターによる刺激で、逆行性輸送により神経末端から放出される事が示されており、CGRPの局所反応への関与が示唆されている。

本研究では、末梢神経系から局所に放出されるCGRPが、炎症調節のカギを握る細胞の一つであるマクロファージに対して作用することで、炎症反応調節に寄与する可能性から、CGRPがLPS刺激マクロファージからのサイトカイン産生にどのような効果を示すかについてin vitroにおいて検討した。その結果、LPS刺激によるマクロファージのTNF- α , IL-6及びIL-12の産生はCGRPにより抑制された(図.3)。また今回の実験では、全ての実験群においてマクロファージの増殖または細胞死は認められず、サイトカイン産生抑制が細胞数の変化によるものでは無いことを確認した。抑制効果を示すCGRP濃度はTNF- α に対してはCGRP 10^{-11} mol/l、IL-6に対してはCGRP 10^{-10} mol/l、IL-12に対してはCGRP 10^{-9} mol/lと、サイトカインの種類によって差がみられた。この結果は、マクロファージの産生するサイトカインの種類によってその調節系が異なることを示唆する。これらの抑制効果を示すCGRPの濃度は局所におけるCGRPの濃度(5×10^{-9} mol/l)とほぼ一致している⁴³⁾。しかし、マクロファージをCGRPで前もって処理することによっては、

このサイトカイン産生の抑制効果は認められなかった(図. 5)。このことから、CGRPがLPS刺激によって誘導されてくるマクロファージのサイトカイン産生を抑制するためには、少なくともLPS刺激と同時に、マクロファージのCGRPレセプター⁴⁴⁾を刺激することが必要であると示唆される。また、CGRPによるLPS刺激マクロファージからのTNF- α , IL-6及びIL-12の産生抑制は、ヒトCGRP₈₋₃₇を同時に添加することにより完全に拮抗された(図. 4)。このことは、このCGRPの作用が、CGRPの結合にはC末端部分を用い、作用にはN末端部分を必要とするI型のCGRPレセプターを介して起こっていることを示している⁴⁵⁾。また、IFN- γ 処理により活性化したマクロファージをLPS刺激した場合でも、同様にCGRPによるTNF- α , IL-6及びIL-12の産生抑制が認められた(図. 6)。このことは、CGRPが炎症初期のマクロファージ浸潤相ばかりでなく炎症局所において $\gamma \delta$ T細胞、ナチュラルキラー細胞、I型ヘルパーT細胞などが活性化刺激を受けてIFN- γ を産生し炎症が増幅される過程³⁷⁾においても、マクロファージのサイトカイン産生に対して抑制的に働くことを示唆している。

本研究においてCGRPは、LPS刺激マクロファージからのTNF- α , IL-6及びIL-12の産生を抑制した。この3つのサイトカインは、局所炎症反応においてきわめて重要な働きをしている^{47, 8)}。TNF- α は⁴⁾、血管内皮細胞の細胞接着分子の発現を誘導することにより白血球遊走を促進し、また、マクロファージの活性化や分化の誘導、好中球の脱顆粒の誘導、リンパ球の活性化や線維芽細胞の活性化をおこす。IL-6は⁶⁾、未分化な血液系細胞の増殖促進、T細胞の増殖促進、B細胞の分化促進、肝臓における急性期蛋白の誘導などをおこす。また、TNF- α 及びIL-6は、中枢作用も持ち、発熱や摂食抑制を引き起こす⁴⁷⁾。他方、IL-12は⁸⁾、ナチュラルキラー細胞やT細胞を活性化してIFN- γ の産生を誘導することや、ナイーブなヘルパーT細胞をI型ヘルパーT細胞へと分化誘導することが知られている。CGRPがマクロファージからの上記のような活性を持つ3つのサイトカイン産生を抑制するということから、炎症反応の増幅過程においてもCGRPがマクロファージのサイトカイン産生を調節することによって炎症抑

制因子として働く可能性が示唆される。

今回の結果と関連した CGRP の炎症反応抑制効果を示す報告がいくつかされている。表皮の CGRP 陽性神経線維終末の一部はランゲルハンス細胞ときわめて近接しており、さらに一部のランゲルハンス細胞では表面に CGRP を結合しているものも認められている²⁶⁾。また CGRP は、ランゲルハンス細胞や²⁶⁾ マクロファージ²⁵⁾、単球³²⁾ による T 細胞への抗原提示を抑制することや、IFN- γ 刺激によるマクロファージからの過酸化水素の産生を抑制すること²⁵⁾、ナチュラルキラー細胞の活性を抑制すること²⁷⁾ が報告されている。さらに、CGRP は T 細胞の増殖反応や²⁷⁾、ヘルパー T 細胞からの、IL-2、TNF- α 、TNF- β や IFN- γ の産生を抑制すること²⁸⁾、I 型ヘルパー T 細胞細胞による遅延型過敏症反応²⁹⁾、³⁰⁾ や接触型過敏症反応³⁰⁾ の抑制をすることも示されている。これらの結果は、CGRP が炎症の後期過程、ことに T 細胞活性化以降の炎症増幅過程においても抑制的に働くことを示唆している。

他方、CGRP は、きわめて強い血管拡張作用を有する¹⁹⁾、²⁰⁾ と共に、炎症メディエーターである IL-1、血小板活性化因子、ヒスタミン、ブラジキニンやサブスタンス P との共存下では細動脈の拡張や血管透過性の亢進作用を示すこと²⁰⁾、²⁴⁾ や、白血球の血管内皮細胞への接着を増強すること⁴⁸⁾、さらには好中球の脱顆粒を増強すること⁴⁹⁾ が示されている。これらの報告が、CGRP は局所炎症反応において増強因子としても働くことが示唆されるが、それは炎症反応の初期のみに限局している可能性もある。

CGRP 作用のメカニズムについては、CGRP がマクロファージ⁴⁴⁾ や骨格筋細胞内⁵⁰⁾ のサイクリック AMP (cAMP) を上昇させることが示唆されている。また、CGRP レセプターは、細胞内の G 蛋白を共役していることが示されており、この G 蛋白の活性化と関係するシグナル伝達経路としては、cAMP⁵¹⁾-A キナーゼの系⁵²⁾、イノシトールリン酸 - C キナーゼの系⁵⁰⁾ およびイオン・チャンネルの系⁵³⁾ が示されている。さらに、マクロファージをプロスタグランジン E₂⁵⁴⁾ やノルアドレナリン⁵⁵⁾ で刺激すると、マクロファージの TNF- α の産生が低下するという報告がされており、この反応でも cAMP の上昇が関与することが示唆さ

れている。これらの結果は、CGRP による LPS 刺激マクロファージからのサイトカイン産生の抑制においても、細胞内 cAMP の上昇を介している可能性を示唆している。他方、CGRP による単球やマクロファージからのサイトカイン産生抑制効果が、IL-10 の誘導を介する可能性を示唆する報告もされている³²⁾、³⁴⁾。すなわち、マクロファージに LPS による活性化刺激と共に CGRP を加えると IL-10 の産生が増強され、その IL-10 により、IL-1 等のサイトカイン産生抑制が行われることが示されている。ところが、今回の実験においてはマクロファージからの IL-10 産生は認められなかった。このことは、マクロファージの培養条件の違いや用いた測定系の感度の差に起因する可能性もある一方、IL-10 を介さないマクロファージのサイトカイン抑制系の存在も否定できない。依って、マクロファージのサイトカイン産生に対する CGRP の抑制作用のメカニズムについてはさらなる今後の検討が必要とされる。

鍼刺激は、局所で知覚神経を刺激することにより、逆行性輸送による神経終末からの CGRP の放出を誘導する⁵⁶⁾。また、鍼刺激は局所の血管拡張を起こし血流を増加させることが良く知られており⁵⁷⁾、その作用には、強力な血管拡張因子である CGRP が関与していることも考えられる。本研究で示されたマクロファージからのサイトカイン産生を CGRP が抑制するという結果から、鍼刺激で誘導される CGRP が、マクロファージのサイトカイン産生を抑制することによって炎症反応を抑制する可能性が示唆される。よってこの抑制作用が、慢性的な炎症反応に対する鍼灸治療⁵²⁾、⁶²⁾ の効果のメカニズムとして働く可能性が推察される。他方、鍼灸刺激は、局所炎症反応を初期にも後期にも増強させる働きを持つサブスタンス P の放出を促進することも報告されており⁵⁶⁾、これらのことと、鍼灸刺激が生体の調整作用を持ち局所反応を正にも負にも調節するという仮説⁶³⁾、⁶⁴⁾ をあわせて考えると、鍼灸による炎症調節作用の負の調節因子としては CGRP が、正の調節因子としてはサブスタンス P が関与することが示唆される。

V 謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御指導頂きました恩師 明治鍼灸大学免疫・微生物学教室 雨貝孝教授に深謝いたします。研究の過程において多大なる御助言を頂いた明治鍼灸大学院免疫・生化学部門 京極方久教授と、明治鍼灸大学免疫・微生物学教室 糸井マナミ助手に厚く感謝いたします。また、統計処理について御助言を頂いた明治鍼灸大学基礎鍼灸学教室 篠原 鼎講師に感謝いたします。

VI 参考文献

- 1) Adams D O, Hamilton T A : The cell biology of macrophage activation. *Ann Rev Immunol*, 2 : 83~318, 1984.
- 2) Unanue E R, Allen P M : The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science*, 236 : 551~557, 1987.
- 3) Dinarello C A : Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor in systemic responses to infection and inflammation. In Gallin J I, Goldstein I M, Snyderman R (eds) : *Inflammation-Basic principles and clinical correlates*, Raven Press, New York, pp211~232, 1992.
- 4) Vassalli P : The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Ann Rev Immunol*, 10 : 411~452, 1982.
- 5) Durum S K, Schmidt J A, Oppenheim J J, et al : Interleukin 1 : An Immunological perspective. *Ann Rev Immunol*, 3 : 263~287, 1985.
- 6) Snick J V : Interleukin-6 : An overview. *Ann Rev Immunol*, 8 : 253~278, 1990.
- 7) Moore K W, O'Garra A, Malefyt R W, et al : Interleukin-10. *Ann Rev Immunol*, 11 : 165~190, 1993.
- 8) Trinchieri G : Interleukin-12: A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Ann Rev Immunol*, 13 : 251~276, 1995.
- 9) Doherty T M, Seder R A, Sher A : Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. *J Immunol*, 156 : 735~741, 1996.
- 10) Payan D G, Levine J D, Goetzl E J : Modulation of immunity and hypersensitivity by sensory neuropeptides. *J Immunol*, 132 : 1601~1604, 1984.
- 11) Weigent D A, Blalock J E : Interactions between the neuroendocrine and immune system : common hormones and receptors. *Immunol Rev*, 100 : 79-108, 1987.
- 12) Wallengren J, Ekman R, Sundler F : Occurrence and distribution of neuropeptides in the human skin. An immunocytochemical and immunochemical study on normal skin and blister fluid from inflamed skin. *Acta Derm Venereol*, 67 : 185~192, 1987.
- 13) Amara S G, Arriza J L, Leff S E, et al : Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science*, 229 : 1094~1097, 1985.
- 14) 松浦忠夫, 本賢三, 榎原智美 : 皮膚の神経支配と感覚受容器. *明治鍼灸医学*, 6 : 37~53, 1990.
- 15) Ishida-Yamamoto A, Senda E, Tohyama M : Distribution and fine structure of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactive nerve fibers in the rat skin. *Brain Res*, 491 : 93~101, 1989.
- 16) Kruger L, Silverman J D, Mantyh P W, et al : Peripheral patterns of calcitonin gene-related peptide general somatic sensory innervation : cutaneous and deep terminations. *J Comp Neurol*, 280 : 291-302, 1989.
- 17) Landis S C, Fredieu J R : Coexistence of calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal peptide in cholinergic sympathetic innervation of rat sweat glands. *Brain Res*, 377 : 177~181, 1986.
- 18) Rosenfeld M G, Mermod J J, Amara S G, et al : Production of a novel

- neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature*, 304 : 129~135, 1983.
- 19) Brain S D, Williams T J, Tippins J R, et al : Calcitonin gene-related peptide is potent vasodilator. *Nature*, 313 : 54~56, 1985.
 - 20) Kawasaki H, Takasaki K, Saito A : Calcitonin gene-related peptide acts a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat. *Nature*, 335 : 164~167, 1988.
 - 21) Louis S M, Jamieson A, Russel N J W, et al : The role of Substance P and calcitonin gene-related peptide in neurogenic plasma extravasation and vasodilatation in the rat. *Neuroscience*, 32 : 581~586, 1989.
 - 22) Brain S D, Williams T J : Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide(CGRP) and mediators of increased vascular permeability. *Br J Pharmacol*, 86 : 855~860, 1985.
 - 23) Gamse R, Posch M, Saria A, et al : Several mediators appear to interact in neurogenic inflammation. *Acta Physiol Hung*, 69 : 343~354, 1987.
 - 24) Buckley T L, Brain S D, Collins P D, et al : Inflammatory edema induced by interactions between IL-1 and the neuropeptide calcitonin gene-related peptide. *J Immunol*, 146 : 3424~3430, 1991.
 - 25) Nong Y, Titus R G, Ribeiro J M C, et al : Peptides encoded by the calcitonin gene inhibit macrophage function. *J Immunol*, 143 : 45~49, 1989.
 - 26) Hosoi J, Murphy G F, Egan C L, et al : Regulation of langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature*, 363 : 159~163, 1993.
 - 27) Umeda Y : Inhibition of immune responses by calcitonin gene-related peptide. *Ann N Y Acad Sci*, 621 : 552~554, 1991.
 - 28) Wang F, Millet I, Bottomly K, et al : calcitonin gene-related peptide inhibits interleukin 2 production by murine T lymphocytes. *J Biol Chem* 267 : 21052~21057, 1992.
 - 29) Nilsson G, Ahlstedt S : Increased Delayed-type hypersensitivity reaction in rats neuromanipulated with capsaicin. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 90 : 256~260, 1989.
 - 30) Asahina A, Hosoi J, Beissert S, et al : Inhibition of the induction of delayed-type and contact hypersensitivity by calcitonin gene-related peptide. *J Immunol*, 154 : 3056~3061, 1995.
 - 31) Ashahina A, Moro O, Hosoi J, et al : Specific induction of cAMP in langerhans cells by calcitonin gene-related peptide : Relevance to functional effects. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92 : 8323~8327, 1995.
 - 32) Fox F E, Kubin M, Cassin M, et al : Calcitonin gene-related peptide inhibits proliferation and antigen presentation by human peripheral blood mononuclear cells : effects on B7, Interleukin 10, and Interleukin 12. *J Invest Dermatol*, 108 : 43~48, 1997.
 - 33) Ichinose M, Sawada M : Enhancement of phagocytosis by Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) in cultured mouse peritoneal macrophages. *Peptides*, 17 : 1405~1414, 1996.
 - 34) Torii H, Hosoi J, Beissert S, et al : Regulation of cytokine expression in macrophages and the Langerhans cell-like line XS52 by calcitonin gene-related peptide. *J Leukoc Biol*, 61 : 216~223, 1997.
 - 35) Chiba T, Yamaguchi A, Yamatani T, et al : calcitonin gene-related peptide receptor antagonist human CGRP-(8-37).

- Am J Physiol, 256 : E331-335, 1989.
- 36) Han S-P, Naes L, Westfall T C : Inhibition of periarterial nerve stimulation-induced vasodilation of the mesenteric arterial bed by CGRP (8-37) and CGRP receptor desensitization. *Biochem Biophys Res Commun*, 168 : 786~791, 1990.
- 37) Billiau A : Gamma-interferon: the match that lights the fire?. *Immunol today*, 9 : 37~40, 1988.
- 38) Lee Y, Takami K, Kawai Y, et al : Distribution of calcitonin gene-related peptide in the rat peripheral nervous system with reference to its coexistence with Substance P. *Neuroscience*, 15 : 1227~1237, 1985.
- 39) Stjarne P, Lacroix J S, Anggard A, et al : Release of calcitonin gene-related peptide in the pig nasal mucosa by antidromic nerve stimulation and capsaicin. *Regul Pept*, 33 : 251~262, 1991.
- 40) Martling C R, Saria A, Fischer J A, et al : Calcitonin gene-related peptide and the lung : neuronal coexistence with substance P release by capsaicin and vasodilatory effect. *Regul Pept*, 20 : 125~139, 1988.
- 41) Lou Y P, Karlsson J A, Franco-Cereceda A, et al : Selectivity of ruthenium red in inhibiting bronchoconstriction and CGRP release induced by afferent C-fibre activation in the guinea-pig lung. *Acta Physiol Scand*, 142 : 191~199, 1991.
- 42) Amann R, Donnerer J, Lembeck F : Ruthenium red selectively inhibits capsaicin-induced release of calcitonin gene-related peptide from the isolated perfused guinea pig lung. *Neurosci Lett*, 101 : 311~315, 1989.
- 43) Gillardon F, Moll I, Michel S, et al : Calcitonin gene-related peptide and nitric oxide are involved in ultraviolet radiation-induced immunosuppression. *Eur J Pharmacol*, 293 : 395~400, 1995.
- 44) Vignery A, Wang F, Ganz M B : Macrophages express functional receptors for calcitonin gene-related peptide. *J Cell Physiol*, 149 : 301~306, 1991.
- 45) Quirion R, Rossum DV, Dumont Y, et al : Characterization of CGRP1 and CGRP2 receptor subtypes. *Ann NY Acad Sci*, 657 : 88-105, 1992.
- 46) Baumann H, Gauldie J : The acute phase response. *Immunology Today*, 15 : 74~80, 1994.
- 47) 堀 哲郎 : サイトカインと視床下部機能, *免疫薬理*, 11 : 145~151, 1993.
- 48) Zimmerman B J, Anderson D C, Granger D N : Neuropeptides promote neutrophil adherence to endothelial cell monolayers. *Am J Physiol* : G678~682, 1992.
- 49) Richter J, Andersson R, Edvinsson L, et al : Calcitonin gene-related peptide (CGRP) activates human neutrophils- Inhibition by chemotactic peptide antagonist BOC-MLP. *Immunology*, 77 : 416~421, 1992.
- 50) Laufer R, Changeux JP : Calcitonin gene-related peptide and cyclic AMP stimulate phosphoinositide turnover in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*, 264 : 2683~2689, 1989.
- 51) Tang W-J, Gilman A : Adenylyl cyclases. *Cell*, 70 : 869-872, 1992.
- 52) Quayle J M, Bonev A D, Brayden J E et al : Calcitonin Gene-Related Peptide activated ATP-sensitive K⁺ currents in rabbit arterial smooth muscle via protein kinase A. *J Physiol*, 475 : 9~13, 1994.
- 53) Lewis DL, Lechleiter JD, Kim D, et al : Intracellular regulation of ion channels in cell membranes. *Mayo Clin Proc*, 65 : 1127~1143, 1990.
- 54) Kunkel S L, Spengler M, May M A, et al : Prostaglandin E2 regulates

- macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. *J Biol Chem*, 263 : 5380~5384, 1988.
- 55) Spengler R N, Chensue S W, Giacherio D A, et al : Endogenous norepinephrine regulates tumor necrosis factor- α production from macrophages in vitro. *J Immunol*, 152 : 3024~3031, 1994
- 56) Kashiba H, Ueda Y : Acupuncture to the skin induces release of Substance P and calcitonin gene-related peptide from peripheral terminals of primary sensory neurons in the rat. *Am J Chin Med*, 19 : 189~197, 1991.
- 57) Jansen G, Lundeberg T, Kjartansson J, et al : Acupuncture and sensory neuropeptides increase cutaneous blood flow in rats. *Neurosci Lett*, 97 : 305~309, 1989.
- 58) Chari P, Biwas S, Mann S B S : Acupuncture therapy in allergic rhinitis. *Am J Acupuncture*, 16 : 143~147, 1988.
- 59) Sternfeld M, Eliraz A, Fink A, et al : Moxibustion therapy for allergic rhinitis. *Am J Acupun*, 20 : 151~155, 1992.
- 60) Zwolfer W, Ding Z, Webster M E D, et al : Beneficial effect of acupuncture on adult patients with asthma bronchiale. *Am J Acupun*, 21 : 113~117, 1993.
- 61) Mitchell P, Wells JE : Acupuncture for chronic asthma : a controlled trial with six months follow-up. *Am J Acupun*, 17 : 5~13, 1989.
- 62) Lewis G B H : Acupuncture at points Yangchi and Waiguan compared with the established points Feishu and Dazhui in the therapy of asthma. *Am J Acupun*, 21 : 241~245, 1993.
- 63) Kendall DE : A scientific model for acupuncture. *Am J Acupun*, 17 : 251~268, 1989.
- 64) 雨貝 孝, 糸井マナミ : 鍼灸医学と免疫システム. *全日本鍼灸学会誌*, 46 : 315~325, 1996.

Inhibition of cytokine productions in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by calcitonin gene-related peptide

SASAOKA Tomoko

*Department of Immunology and Biochemistry, Graduate School of
Acupuncture and Moxibustion, Meiji University of Oriental Medicine*

Summary : Macrophages play a central role in the regulation of inflammation through the production of various cytokines. On the other hand, it is shown that peripheral nervous system also regulates inflammatory responses by the release of neuropeptides. To clarify the regulatory role of a neuropeptide in the activities of macrophages in inflammatory responses, in the present study, I investigated the effect of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on the cytokine productions of macrophages after stimulation with lipopolysaccharide (LPS). By the addition of CGRP, the productions of tumor necrosis factor α , Interleukin-6 and Interleukin-12 in LPS-stimulated macrophages were suppressed in a dose dependent manner. The suppression of the cytokine productions by CGRP was also observed in the macrophages which were pretreated with Interferon- γ . When CGRP antagonist; CGRP₈₋₃₇ was added simultaneously with CGRP into the culture medium of LPS-stimulated macrophages, the inhibitory effects of CGRP were antagonized. These results indicate that CGRP suppresses the cytokine productions of macrophages despite of their stages of activation. Therefore, it is suggested that CGRP functions as a negative regulator in inflammatory response.