

機関番号：34311

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590096

研究課題名 (和文) 脂質代謝調節におけるリンパ球コリン作動系の役割の検討

研究課題名 (英文) Role of lymphocytic cholinergic system in regulation of fat metabolism

研究代表者

藤井 健志 (FUJII TAKESHI)

同志社女子大学・薬学部・准教授

研究者番号：80255380

研究成果の概要 (和文)：

脂質代謝調節におけるリンパ球コリン作動系の役割を検討した。対照 lean マウスと比較して、脂質代謝異常モデル *ob/ob* マウスにおいて、アセチルコリン (ACh)、ACh 合成酵素 (ChAT) の遺伝子発現胸腺および脾臓における ACh 産生量および ChAT 活性は低下していた。老化が進むと ACh 合成および ChAT は上昇していた。すなわち、脂質代謝の変化に伴いリンパ球コリン作動系活性が影響を受けることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

We investigated the involvement of non-neuronal cholinergic system in lymphocytes in fat metabolism. Acetylcholine (ACh) production, activity and mRNA expression of choline acetyltransferase (ChAT), an ACh-synthesizing enzyme, in *ob/ob* mice, an animal model of type 2 obese diabetes, is reduced when compared with that of control (lean) mice. Lymphocytic cholinergic activity increased with age. These findings suggest that lymphocytic cholinergic system is involved in regulation of fat metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：アセチルコリン、リンパ球、肥満、コリンアセチルトランスフェラーゼ、ムスカリン受容体、ニコチン受容体

1. 研究開始当初の背景

アセチルコリン (ACh) は、最も古くから知られている神経伝達物質である。ACh は ACh 受容体を介してリンパ球の機能変化を起こすことが 1970 年代には報告されていた (Maslinski, W., Brain Behav. Immun. 3: 1-14, 1989)。最近では、哺乳動物の神経系

以外の血液、血管内皮細胞、気道および消化管上皮細胞、羊膜細胞などの非神経性組織における ACh あるいは ACh 合成酵素コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) の存在が報告されている (Kawashima and Fujii, Front. Biosci. 9:2063-2085, 2004; Wessler, I. et al., Pharmacol. Ther. 77: 59-79, 1998)。

哺乳動物における非神経性 ACh は、局所作用伝達物質として細胞間機能調節に関与している可能性が示唆されている。

ACh の免疫系における役割に関する研究として、国内では、申請者ら以外には、安保教授ら（新潟大・医学部）が、副交感神経系（コリン作動系）と免疫系との間のシグナルクロストークの提唱（Abo, T., Kawamura, T., Ther. Apher. 6: 348-57, 2002; Toyabe, S. et al., Immunology 92:201-205, 1997）、村田（黒石市市民病院）・伊東（弘前大・医学部）らが、Th1 あるいは Th2 免疫応答調節を介するニコチンの潰瘍性大腸炎およびクローン病に及ぼす影響に関する研究（Murata, Y. et al., Gastroenterology 118: A112, 2000）、伊保（福井大・医学部）・高橋（神戸市市民病院）らが、ニコチンの好中球および T 細胞機能の変化に関する研究（Iho, S. et al., J. Leukoc. Biol. 74: 942-951, 2003）、を推進している。さらに、野村教授（横浜薬大/元北大・薬学部）らが、ムスカリン受容体（mAChR）刺激を介する T 細胞機能変化とサイトカイン遺伝子発現調節機構に関する研究をかつて行っていた（Okuma, Y., Nomura, Y., Jpn. J. Pharmacol. 85: 16-19, 2001; Nomura, J. et al., Life Sci. 72: 2121-2126, 2003）。申請者が以前に所属していた川島（武蔵野大/元共立薬大）らは、T 細胞による抗原提示細胞の認識におけるコリン作動系活性の調節メカニズムに関する研究を進めており、現在申請者らとも共同研究を行っている。

他方、国外では、Grando (UCDMC 大) ら、Wessler (Mainz 大) らが、免疫調節物質あるいは局所作用物質として機能する非神経性 ACh の存在とその生理的な役割に関する研究（Grando, S.A., Dermatology 201:290-295, 2000; Wessler, I. et al., Pharmacol. Ther. 77: 59-79, 1998）、Rinner (Graz 大) らが、ACh の T および B 細胞の分化における役割（Rinner, I. et al., J. Neuroimmunol. 81: 31-37, 1998）、Mihovilovic (Duke 大) らが、T 細胞の胸腺内分化および重症筋無力症における神経型ニコチン受容体（nAChR）の役割（Mihovilovic, M. et al., J. Neuroimmunol. 79: 176-184, 1997; J. Neuroimmunol. 117: 58-67, 2001）、Amenta (Camerio 大) らによるリンパ球における種々のコリン作動系マーカー発現（Ricci, A. et al., J. Neuroimmunol. 129: 178-185, 2002; Tayebati, S.K. et al., J. Neuroimmunol. 132: 147-155, 2002）、Tracy (North Shore Long Island Jewish 研) らが、マクロファージ機能における nAChR の役割（Wang, H. et

al., Nature 421: 384-388, 2003; Nat. Med. 10: 1216-1221, 2004）、に関する研究を精力的に行っている。さらに、骨格筋型 nAChR に対する自己抗体産生と重症筋無力症との関連に関する研究は国内・外の多数のグループにより行われている（Thanvi, B. R., Lo, T. C., Postgrad. Med. J. 80:690-700, 2004; Lindstrom, J.M., Ann. N. Y. Acad. Sci. 998: 41-52, 2003 などの多数の原著論文および総説がある）。

免疫活性とリンパ球コリン作動系活性の間には関連性があることが示唆されている。さらに、サイトカイン（インターロイキン-8 など）産生の変動、ニコチンによるリンパ球の L 型カルシウムチャネルの機能変化、nAChR を介する炎症性反応の調節などが、リンパ球におけるコリン作動系と免疫系との関連を示す知見として最近の話題のひとつとなっている。

この方面の研究は、新たな側面からの免疫系と神経系とのクロストーク機構を考えるものとして、神経学だけでなく免疫学においても有用な知見を提供することが考えられる。2006 年 9 月にドイツ・マインツにて開催された、「Second International Symposium on Non-neruonal Acetylcholine」において申請者は、リンパ球における非神経性コリン作動系に関する最新の知見として、「スタチン系薬シンバスタチンが CD11a を介する T 細胞活性化を抑制するメカニズム」について招待講演者として発表した。申請者のこれまでの研究成果により、T 細胞活性化による ACh 産生増大およびムスカリン性 ACh 受容体 (mAChR) および nAChR 刺激がリンパ球機能に及ぼすことが明らかなることから、リンパ球の非神経性コリン作動系が創薬のターゲットとしても重要となる可能性がある。

2. 研究の目的

申請者が発見したリンパ球における固有のコリン作動系が、T および B リンパ球の機能調節に関与しており、それを介して脂質代謝の制御に関与していることを証明する。これまでその生理的な役割がほとんど解明されていないリンパ球の mAChR および nAChR をターゲットとして、新しい作用メカニズムをもつ免疫調節薬・抗肥満薬を開発するための理論的根拠の構築を目的としている。

脂質代謝異常動物モデルを用いて、リンパ球および免疫器官の mAChR および nAChR 機能を細胞内情報伝達系に着目して調べて、リンパ球コリン作動系のリンパ球機能への関与を in vivo レベルで証明する。

small interfering RNA (siRNA) により mAChR および nAChR をノックアウトしたリンパ球系細胞における情報伝達系を解析することにより、特異的な免疫調節薬を開発するための理論的根拠を構築する。mAChR および nAChR 刺激は主として M₃/M₅ mAChR および α7-nAChR を介して細胞内カルシウムシグナルを起こす。カルシウムシグナルに続くシグナル伝達機構を解析することにより、特異的な治療薬を開発するための理論的基盤を提供するはずである。

申請者が発見した「リンパ球における固有の非神経性コリン作動系」が免疫機能調節に重要な役割を果たしていることがこれまでの研究から推測される (Kawashima, K, Fujii, T., Pharmacol. Ther. 86: 29-48, 2000)。タクロリムスやシクロスポリンのような免疫抑制薬が、T リンパ球の ACh 産生を抑制すること、T リンパ球活性化による ACh 産生増大および ACh 受容体刺激がリンパ球機能に影響を及ぼすことが明らかなことから、リンパ球の非神経性コリン作動系が、創薬のターゲットとしても重要となる可能性がある。免疫不全が報告されている高血圧自然発症ラットにおいて、リンパ系コリン作動系活性の低下を発見し (Fujimoto, K., et al., Life Sci. 69: 1629-1638, 2001)、自己免疫性の腎炎を発症する MRL-*lpr* マウスではリンパ系コリン作動系活性が亢進していることを観察している。本研究結果は、生体防御機構における ACh (リンパ球コリン作動系) の役割を明らかにするとともに、新たな作用機序をもつ免疫調節薬開発のための理論的根拠を目指す。本研究の成果は、より特異的な免疫調節薬・抗肥満薬の開発に資するはずである。

3. 研究の方法

(1) 実験動物と細胞株

脂質代謝異常モデルとして 12 週齢および 20 週齢の雄性 *ob/ob* マウスを用いた。その対照マウスには、lean (?/+) マウスを用いた。

ヒト T 細胞系白血病細胞株 CCRF-CEM 細胞を T 細胞のモデルとして用いた (林原生物化学研究所・研究センター・基礎細胞研究部門より供与を受けた)。

(2) マウス単核白血球 (MNL) の調製:

エーテル麻酔下、尾部より血糖自己測定器 (ワンタッチウルトラTM、ジョンソンアンドジョンソン) 用いて血糖値を測定した。失血させた後、胸腺および脾臓を採取して重量を測定した。採取した一部の胸腺および脾臓は ACh 含量および ChAT 活性の測定まで -80°C にて保存した。

脾臓を培養液中で金属メッシュ (#200) ですりつぶした後、リンホライト-M (Cedarlane) を用いて MNL を調製した。MNL は、90%以上のリンパ球 (T および B リンパ球) と単球を含んでいた。

(3) 細胞培養

ヒト細胞株およびマウス MNL の培養は、7% 牛胎仔血清、ペニシリン (100 units/ml)、1 mM L-グルタミン、ストレプトマイシン (100 μg/ml) を含む RPMI1640 培地 (日本製薬) を用いて、培養フラスコ (3110-075、岩城硝子) 中にて行った。なお、培養は、すべて 37°C、5% CO₂ の条件下で行った。細胞数は、血球算定盤を用いてトリパンブルー (GIBCO BRL) 色素排除法により計数した。

マウス MNL の場合、一部の細胞は、T 細胞活性化薬コンカナバリン A (ConA、和光) (3 μg/ml) の存在下、24 時間培養した。さらに一部は、サブタイプ非選択的 mAChR 作用薬オキソトレモリン-M (Oxo-M) (100 μM、Sigma) で最後の 1 時間刺激した。

CCRF-CEM 細胞の場合、M₃ および M₅ サブタイプ mAChR あるいは α7 型 nAChR に選択的な siRNA を遺伝子導入装置 (NucleofectorTM、Amaxa) を用いて導入した。使用した siRNA はタカラバイオより購入した。CCRF-CEM 細胞には、mAChR サブタイプのうち M₁、M₃、M₄ および M₅ サブタイプ、nAChR サブユニットのうち、α3、α5、α6、α7、α9、α10 および β4 サブユニットが発現している。

(4) ACh の測定

細胞浮遊液 (5×10⁶ 個) を 4°C、8 分、300g で遠心した。上清は細胞外への ACh 遊離量の測定に用いた。得られた沈査は 1 μM ジイソプロピルフルオロホスフェート (和光) を含むリン酸緩衝液に 1×10⁶ 個/ml で再懸濁して細胞内 ACh 量の測定に用いた。ACh は、³H]ACh (specific activity: 2.96 TBq/mmol、GE ヘルスケア) および抗 ACh 抗血清を用いてラジオイムノアッセイ法により測定した。

(5) ChAT 活性の測定

胸腺および脾臓を Triton X-100 を含むリン酸緩衝液中で超音波破碎し、4°C、30 分、15,000g で遠心した。得られた上清を ChAT 活性の測定に用いた。ChAT 活性は、Fonnum 法 (J. Neurochem. 242:407-409, 1975) により測定した。

(6) 遺伝子発現の解析

各細胞から、セパゾール II (ナカライテスク) を用いて抽出した総 RNA より一本鎖 cDNA を合成した。ChAT、インターロイキン-2 (IL-2)、転写調節因子 *c-fos*、M₃ および M₅ mAChR の各遺伝子 (ヒトおよびマウス) に特

異的なプライマーを用いて、RT-PCR 法により遺伝子を増幅した (PCR 条件: 95°C、30 秒; 56-58°C、30 秒; 72°C、30 秒を 37-40 サイクル)。発現量の比較のために、内部標準として glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 発現量を解析した (PCR 条件: 95°C、1 分; 58°C、1.5 分; 72°C、1.5 分を 21 サイクル)。

(7) 細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 変化の測定

Ca²⁺感受性蛍光色素 (Fluo-3) および共焦点レーザー顕微鏡を用いて、Oxo-M あるいはニコチンによる蛍光強度の変化を測定して $[Ca^{2+}]_i$ に及ぼす作用を観察した。M₃ あるいは M₅ サブタイプ mAChR、あるいは $\alpha 7$ 型 nAChR に選択的な siRNA により、各受容体のみをそれぞれノックダウンした細胞を用いて作用薬による $[Ca^{2+}]_i$ 変化を観察した。

4. 研究成果

(1) 脂質代謝異常マウスにおけるリンパ球コリン作動系活性

脾臓重量について、12 週齢の時点では対照マウス (lean(?/+)) と *ob/ob* マウスとの間に差はなかった。しかしながら、20 週齢では *ob/ob* マウスにおいて有意に脾臓重量が増大していた。

胸腺重量について、20 週齢の時点では、対照マウスと比較して *ob/ob* マウスで有意に重量が増大していた。

血糖値は、12 週齢の時点では、有意に *ob/ob* マウスにおいて上昇していたが、20 週齢の時点では対照マウスよりもむしろ低下していた。

全てのマウスにおいて、調べたコリン作動系構成要素 (ChAT、M₃ mAChR および $\alpha 7$ nAChR) の遺伝子発現が観察された。M₃ mAChR および $\alpha 7$ nAChR の遺伝子発現には両群で差はなかった。さらに、12 週齢の時点において、ConA による転写調節因子 *c-fos* およびインターロイキン-2 (IL-2) 遺伝子発現の誘導が、Oxo-M により増強された。しかしながら、この増強作用には両群間で差はなかった。

12 週齢の時点において、*ob/ob* マウスでは、対照マウスと比較して、ChAT の遺伝子発現は有意に低下していた。また、両群において、ConA により ChAT 遺伝子発現は増強した。対照マウスと比較すると、*ob/ob* マウスにおいて ConA による ChAT 遺伝子発現の増強の度合いは弱かった。20 週齢の時点において、*ob/ob* マウスにおける ChAT 遺伝子発現は 12 週齢の時点と比較して増大していた。しかしながら、両群間には有意な差はなかった。

20 週齢の時点では、*ob/ob* マウスでは、対照マウスと比較して ChAT 活性が低下傾向にあった。

20 週齢の時点では、ACh 産生量は、対照マウスと比較して *ob/ob* マウスにおいて低下していた。

肥満モデル動物において、免疫担当細胞における ACh 産生が影響を受けていることが明らかとなった。すなわち、リンパ球コリン作動系活性が脂質代謝の変化により影響を受けている可能性が考えられた。今後はさらに脂質異常症治療薬による改善効果などを検討することにより、コリン作動系活性の変化が原因か結果なのかを明らかにしたい。

以前に、研究代表者らは免疫低下モデル動物高血圧自然発症ラットおよび免疫亢進モデル動物 MRL/*lpr* マウスにおけるコリン作動系活性の変動を明らかにしている。*ob/ob* マウスは創傷治癒が遅いことが報告されているので、今後、免疫能との関連についても解析する必要がある。

(2) siRNA を用いた細胞内カルシウムシグナルに関与する ACh 受容体

M₃ および M₅ サブタイプ特異的な siRNA (500 nM) は、M₃ および M₅ サブタイプ mAChR の遺伝子発現を、それぞれ対照群の約 37 および 80% まで減弱させた。このとき、他のサブタイプの mAChR 遺伝子の発現量は影響を受けなかった。

受容体アゴニストとして Oxo-M を用いた mAChR 刺激による細胞内 Ca²⁺シグナルを検討したところ、500 nM の siRNA により、対照群のそれぞれ約 42 および 68% にまで減弱した。さらに、Oxo-M による *c-fos* 遺伝子発現の増強を抑制した。

$\alpha 7$ 型 nAChR 遺伝子発現を選択的に減弱させる siRNA (500 nM) は、対照群の約 50% にまで $\alpha 7$ サブユニット遺伝子発現を減弱させた。このとき、他のサブユニットの遺伝子発現量には影響を与えなかった。

受容体アゴニストとしてニコチンを用いた nAChR 刺激による細胞内 Ca²⁺シグナルを検討したところ、500 nM の siRNA により、対照群の約 43% にまで減弱した。

T および B リンパ球において、拮抗薬を用いた薬理的な検討から、mAChR および nAChR 刺激を介する細胞内カルシウムシグナルには、mAChR では M₃ および M₅ サブタイプ、nAChR では $\alpha 7$ 型受容体の関与が示唆されている。siRNA を用いることにより、M₃ および M₅ サブタイプ mAChR、 $\alpha 7$ 型 nAChR を介するカルシウムシグナルが減弱することが明らかになった。この作用は各 mAChR あるいは nAChR 選択

的な拮抗薬を用いた薬理的な検討結果と一致するものであったことから、T細胞におけるM₃およびM₅サブタイプmAChR、およびα7nAChRを介するシグナル伝達メカニズムの存在を証明できた。

M₅サブタイプmAChRおよびα7型nAChR遺伝子発現は影響を受けていなかった。研究代表者らは、TCRを介する刺激がT細胞におけるChATおよびM₅サブタイプmAChR遺伝子発現を選択的に上昇させることを明らかにしている。さらに、M₅サブタイプmAChRおよびα7型nAChRが抗体産生に影響を及ぼすことが明らかとなっている (Fujii et al., J. Neuroimmunol. 188:80-85; *ibid*, 189: 69-74, 2007)。ChAT遺伝子のみが影響を受ける理由は明らかとならなかったが、今後は、ACh産生量およびChAT活性、受容体を介するシグナル伝達を含めて解析する予定である。

長期ニコチン曝露あるいは喫煙者により、Tリンパ球のα7型nAChR発現が減少すること、喫煙による免疫能の低下が明らかになっている。α7型nAChRノックアウトマウスにおいて、サイトカイン産生 (TNF-α, IFN-γ および IL-6) が増強される。今後はインビボ実験系により免疫機能調節におけるα7型nAChRの役割をさらに証明したいと考えている。

(3) 展望

血液・血管系のコリン作動系の研究はまだ端緒についたばかりである。本研究により、脂質代謝と血液・血管系における作動物質としてのAChとの関連がほんのわずかではあるが明らかにすることができた。リンパ球だけでなく、すべての血球細胞にはいずれかのサブタイプのACh受容体が発現している。今後は、生活習慣病全般の予防、あるいは改善のための薬物治療におけるリンパ球コリン作動系の役割について注目してさらに解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① 藤井 健志、高鳥 悠記、免疫機能とムスカリン受容体、鼻アレルギーフロンティア、11: 36-41、2011. 査読無し
- ② Fujii T, Masai M, Misawa H, Okuda T, Takada-Takatori Y, Moriwaki Y, Haga T, Kawashima K. Acetylcholine synthesis and release in NIH3T3 cells co-expressing the high-affinity choline transporter and choline acetyltransferase. Journal of

Neuroscience Research. 87: 3024-3032, 2009. 査読有り

[学会発表] (計3件)

- ① 藤井 健志、高鳥 悠記、川島 紘一郎、SLURP-1によるTリンパ球からのアセチルコリン遊離促進、第84回日本薬理学会年会2011年3月23日、神奈川
- ② 藤井 健志、高鳥 悠記、川島 紘一郎、メディエートフォアを介するT細胞からのアセチルコリン遊離機構、第83回日本薬理学会年会2010年3月17日、大阪
- ③ 藤井 健志、高鳥 悠記、川島 紘一郎、リンパ球における非神経性コリン作動系の発現と免疫調節機構、日本薬学会第129年会、2009年3月28日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 健志 (FUJII TAKESHI)
同志社女子大学・薬学部・准教授
研究者番号: 80255380

(2) 研究分担者

高鳥 悠記 (TAKATORI YUKI)
同志社女子大学・薬学部・助教
研究者番号: 90411090

(3) 連携研究者

川島 紘一郎 (KAWASHIMA KOICHIRO)
武蔵野大学・薬学研究所・客員教授
研究者番号: 70095008