

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07969

研究課題名(和文) 内因性nAChR活性化蛋白質SLURP-1のT細胞分化に及ぼす作用の薬学的研究

研究課題名(英文) Role of SLURP-1, an endogenous alpha7 nicotinic acetylcholine receptor allosteric ligand, in T cell differentiation

研究代表者

川島 紘一郎 (Kawashima, Koichiro)

北里大学・薬学部・客員教授

研究者番号：70095008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Alpha7 nAChR (a7) 作用薬GTS-21とアロステリック・リガンドSLURP-1 (rhSLURP-1) のT細胞分化誘導に及ぼす作用を検討した。D011.10マウスの脾細胞を卵白アルブミン(OVA)またはOVAペプチドで抗原提示細胞(APC)依存的にT細胞の分化を活性化させた。GTS-21は、OVA刺激でTregへの分化を抑制したが、OVAペプチドでは促進させた。rhSLURP-1はいずれでも作用を示さなかった。a7刺激は、APCでは抗原処理を阻害して分化誘導を抑制し、分化活性化T細胞では分化を促進する。rhSLURP-1は種差により、作用を発現しなかった可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We studied roles of GTS-21, an alpha7 (a7) nAChR agonist, and recombinant human type SLURP-1 (rhSLURP-1), an endogenous allosteric a7 nAChR ligand, in regulation of T cell differentiation. The differentiation was activated by culturing spleen cells from D011.10 mice with ovalbumin (OVA) or OVA peptide (OVA-P). The effects of GTS-21 and rhSLURP-1 on T cell differentiation into regulatory T cell (Tregs) and effector T cells (Th1 and Th2) were determined by FACS or ELISA. GTS-21 inhibited the differentiation into Tregs and effector T cells under OVA activation, but facilitated the differentiation under OVA-P activation. rhSLURP-1 did not show any effect under the present experimental conditions. These results suggest that a7 nAChR activation in antigen-presenting cells prevents antigen processing leading to suppression of the differentiation while a7 nAChR activation in T cell facilitates the differentiation. No effect with rhSLURP-1 may be due to species difference.

研究分野：薬理学

キーワード：nAChR アロステリック・リガンド Treg Th1 Th2 GTS-21 alpha7 D011.10マウス

1. 研究開始当初の背景

T細胞やB細胞などのリンパ球、および抗原提示細胞 (APCs) として働く樹状細胞 (DCs) やマクロファージは、アセチルコリン (ACh) 合成酵素 (ChAT)、ムスカリンおよびニコチン性 ACh 受容体 (nAChR) などのすべてのコリン作動系構成要素を発現している^{1,2)}。抗原提示反応などの免疫刺激により、これらのコリン作動系構成要素の発現が誘導されることから、サイトカインやホルモンに加えて、コリン作動系の免疫機能調節への関与が明らかになってきた^{1,2)}。

潰瘍性大腸炎は、喫煙者での発症率は低く、しかも症状は軽いが、禁煙により症状が悪化する。そのため、nAChR の病態への関与が示唆されている³⁾。リポポリサッカライド誘発敗血症モデルマウスにおいて、迷走神経刺激やニコチンはショック死を抑制する⁴⁾。さらに $\alpha 7$ nAChR 部分的作用薬 GTS-21 は、マクロファージにおける炎症促進性サイトカイン TNF- α の産生を抑制するが、その作用は $\alpha 7$ nAChR 特異的遮断薬 methyllycaconitine (MLA) によって拮抗される⁵⁾。我々は、 $\alpha 7$ nAChR 遺伝子欠損 ($\alpha 7$ -KO) マウスにおいて抗原特異的 IgG₁ 抗体の血中濃度上昇と、炎症性促進性サイトカイン TNF- α 、IL-6 および IFN- γ の産生増大を観察した⁶⁾。また、免疫抑制に関与する制御性 T 細胞 (Tregs) の誘導とその機能調節に nAChR の関与が示唆されている⁷⁾。これらの知見は、 $\alpha 7$ nAChR を介する免疫と炎症の調節機構の存在を示唆するものである^{5,8)}。

SLURP-1 は、皮膚のケラチノサイトにおいて発見された内因性ペプチドで、 $\alpha 7$ nAChR のアロステリック・リガンドとしての作用をもっている⁹⁾。我々は、SLURP-1 の遺伝子が、ケラチノサイト以外に、胸腺や脾臓などの免疫組織を始めとして様々な組織に発現していることを発見した¹⁰⁾。免疫細胞に発現する $\alpha 7$ nAChR の免疫機能調節における役割が注目を集めている⁸⁾ことから、ヒト免疫組織扁桃のリンパ濾胞周辺部に局在する CD205 陽性成熟樹状細胞 (CD205⁺ DCs) における SLURP-1 発現を発見した¹¹⁾。これらの CD205⁺ DCs は、CD4⁺ T 細胞と近接していることが免疫組織化学的に観察されている¹¹⁾。さらに、ヒト遺伝子組み換え SLURP-1 (rhSLURP-1) は、ヒト T 細胞系白血病細胞株とヒト末梢血単核白血球において、増殖抑制に加えて、細胞内 ACh 含量および ACh 合成酵素遺伝子発現量を増大させた¹¹⁾。その他に、免疫細胞に発現する $\alpha 7$ nAChR の活性化は、T 細胞の分化誘導を介して免疫機能に影響を及ぼす可能性が指摘されている⁸⁾。これらの知見は、 $\alpha 7$ nAChR 作用薬や SLURP-1 が T 細胞の機能調節に関与している可能性を示唆するものである。

2. 研究の目的

上記の知見を踏まえて、 $\alpha 7$ nAChR 作用薬

GTS-21 と rhSLURP-1 の $\alpha 7$ nAChR を介する T 細胞の分化誘導に及ぼす作用を検討した。

3. 研究の方法

(1) 主な試薬: $\alpha 7$ nAChR 特異的部分的作用薬 GTS-21、ヒト遺伝子組み換え SLURP-1 (rhSLURP-1) (Abnova 社, Taiwan)。

(2) 細胞: 5~8 週齢の C57BL/6J 系 $\alpha 7$ -KO および野生型 (WT) マウスと、BALB/c 系卵白アルブミン (OVA) 特異的 MHC クラス 拘束性 TCR 遺伝子導入トランスジェニック DO11.10 マウスの脾臓から常法により脾細胞を調製して実験に使用した。

(3) 細胞培養: 5.0×10^5 個の脾細胞を RPMI1640 培地中で培養した。 $\alpha 7$ -KO および WT マウスの脾細胞には anti-CD3 mAb と anti-CD28 mAb を添加して、ナイーブ T 細胞 (Th0) を活性化させた。DO11.10 マウスの脾細胞には OVA もしくは OVA peptide を添加して Th0 を活性化させた。さらに GTS-21 (3, 10, 30 μ M)、または一部に rhSLURP-1 (0.5 μ g/ml) を添加して $\alpha 7$ nAChR を刺激した。これらの脾細胞を 37[°]C、5% CO₂ の条件下で 5 日間培養して、分化に及ぼす作用を観察した。

(4) フローサイトメトリー法: Th0 分化を測定するために、培養液を 0.1% BSA と 0.1% NaN₃ を含む HBSS に置換し、各 T 細胞サブセットに対する蛍光色素標識抗体 (FITC-抗 CD-4 抗体, PE-抗 FoxP3 抗体, PE/Cy7-抗 CD-25) を用いて培養脾細胞を染色した。

(5) ELISA 法

Th1 および Th2 への分化は、培養液中の IFN- γ および IL-4 を、それぞれの特異抗体を用いて ELISA によって調べた。

(6) APCs による OVA 飲食作用の検討

APCs として抗原提示にマクロファージ (CD11b⁺) と DCs (CD11c⁺) が関与する可能性が考えられる。APCs の飲食能を調べるために、上記の DO11.10 マウスの脾細胞に OVA-fluorescein を添加した。4 時間培養後に PE-抗 CD11b 抗体および APC-抗 CD11c 抗体を用いて、それぞれ、マクロファージおよび DCs を染色した。さらに Cytoflex フローサイトメーターを用いて、マクロファージと DCs に飲食された OVA の蛍光を測定した。

4. 研究成果

(1) Th0 細胞上の $\alpha 7$ nAChR の役割

抗 CD3/CD28 抗体を用いて Th0 細胞の分化を非特異的に活性化させて、GTS-21 により $\alpha 7$ nAChR を刺激すると、WT において Treg への分化が濃度依存的に促進された。しかし、 $\alpha 7$ -KO では、これらの変化は見られなかった (図 1)。

以上より、Th0 細胞上の $\alpha 7$ nAChR は少なくとも Treg への分化の促進に関与していることが明らかになった。

(2) 抗原特異的 APCs 依存的分化活性化条件下における $\alpha 7$ nAChR の役割

APCs における OVA の抗原処理を經由

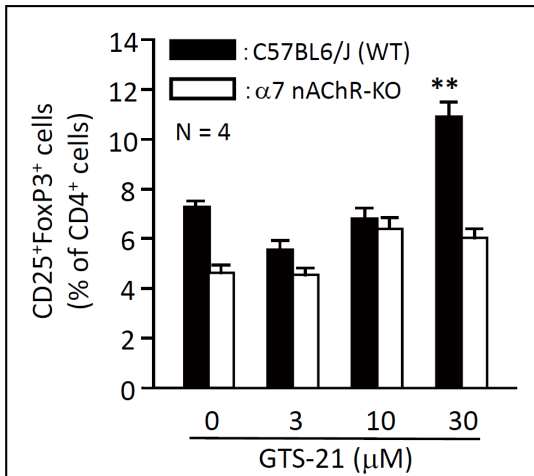


図1. 非特異的に活性化したTh0細胞におけるα7 nAChRの分化に及ぼす役割. GTS-21による刺激はwild-type (WT) マウスでのみTregへの分化を促進した. **P < 0.01 vs GTS-21 (0 μM).

して分化を活性化させる条件下では, GTS-21は10および30 μMにおいてTh1, Th2およびTregへの分化をすべて抑制した. しかし, rhSLURP-1はTregへの分化に影響を及ぼさなかった.

以上より, GTS-21によるAPCs上のα7 nAChR刺激は濃度依存的にTh0分化を抑制した.

抗原処理を要しないOVA peptideによって分化を活性化させた条件下では, GTS-21はTh1, Th2およびTregへの分化をすべて促進した. しかし, rhSLURP-1はTregへの分化に影響を及ぼさなかった.

以上より, GTS-21によるT細胞上のα7 nAChR刺激はTh0分化を濃度依存的に促進した.

(3) APCsのOVA飲食作用におけるα7 nAChRの役割

OVA-fluorescein投与4時間後には, OVA-fluoresceinの蛍光がAPCs (CD11b⁺およびCD11c⁺細胞)内部に観察された, すなわち, OVAがAPCsに飲食されていることが確認された(図2上). GTS-21は, マクロファージ(CD11b⁺)およびDCs (CD11c⁺)のいずれのAPCsにおいてもOVA-fluorescein飲食作用には影響を及ぼさなかった(図2下).

(4) 考察

本研究により, 分化が活性化されたTh0細胞上のα7 nAChRは, TregおよびすべてのエフェクターT細胞への分化を促進させることが初めて発見された. Th0細胞上のα7 nAChRを活性化して分化の促進に至るメカニズムの解明は, 今後の課題である.

OVAはTh0の分化を活性化させるためには, APCsにおけるOVAの取込みと処理が必要である. 他方, OVA peptideはそのままAPCs細胞表面のMHCクラス分子に結合してTh0の分化を活性化させることができる. GTS-21は, OVAでTh0の分化を活性化させた場合には, Th0の分化を抑制し, OVA peptide

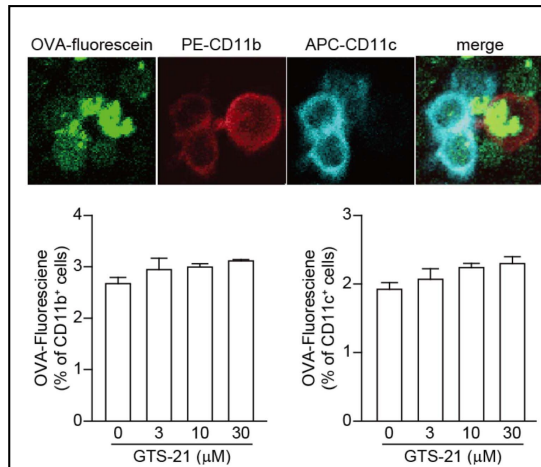


図2. APCのOVA-fluorescein飲食作用におけるα7 nAChRの役割. マウス脾細胞をOVA-fluoresceinとGTS-21 (30 μM)刺激下で4時間培養した. PE-抗CD11bおよびAPC-CD11cで標識後, その蛍光を共焦点顕微鏡で観察し(上), フローサイトメトリーでOVA-fluoresceinを飲食したAPCを定量した(下). α7 nAChR刺激はAPCの飲食作用に影響を及ぼさなかった.

で分化を活性化させた場合には促進させた. これらの結果は, APCs細胞上のα7 nAChRは, OVAの飲食作用もしくは処理過程を抑制的に制御して, Th0の分化を抑制している可能性を示唆している. 他方, 非特異的に分化を活性化させた場合のα7 nAChRの役割からも推定できるように, 分化が一旦活性化されたTh0上のα7 nAChRはTregおよびエフェクターT細胞への分化を促進的に制御しているものと考えられる.

OVAおよびOVA peptideのいずれでTh0の分化を活性化させた条件下においても, rhSLURP-1はTh0の分化に影響を及ぼさなかった. その理由として, マウスとヒトのSLURP-1のアミノ酸配列に種差があるために, 今回用いたDO11.10マウスの脾細胞におけるα7 nAChRでは, rhSLURP-1は作用を発現できなかった可能性が考えられる. 現時点で, 研究に使用できるのはrhSLURP-1のみである.

GTS-21は, APCsにおけるOVA取込みには影響を及ぼさなかったことから, APCs上のα7 nAChRは抗原処理過程において抑制的役割を担っていることが明らかになった.

以上の研究結果から, 免疫細胞上に発現するα7 nAChRの活性を制御することにより, 免疫活性をコントロールできる可能性が判明した. すなわち, APCs上のα7 nAChRの活性化は, 抗原処理過程を抑制してCD4⁺T細胞分化を阻害して免疫を抑制し, CD4⁺T細胞上のα7 nAChRの活性化は, TregsおよびすべてのThサブセットへの分化を促進することが明らかになった.

(5) 今後の展望

今回の研究成果を踏まえると、 $\alpha 7$ nAChR 作用薬と遮断薬を以下のように臨床応用できる可能性が考えられる。

免疫抑制： $\alpha 7$ nAChR 作用薬を多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、関節リウマチなどの自己免疫疾患や、アトピーあるいは気管支喘息などの免疫疾患の治療に応用する。

免疫抑制：in vitro で $\alpha 7$ nAChR 作用薬によって Th0 細胞を抗原特異的に Tregs へ分化誘導し、得られた Tregs を選別して多発性硬化症などの治療に利用する。免疫疾患の治療に必要とされる量的に十分な Tregs の入手が可能になり、しかも $\alpha 7$ nAChR 作用薬の全身作用を回避できる利点が考えられる。

免疫促進：癌治療を想定した場合には、siRNA を含む $\alpha 7$ nAChR 遮断薬を投与して、癌抗原に対する免疫を促進できる可能性が考えられる。

< 引用文献 >

Fujii T, Mashimo M, Moriwaki Y, Misawa H, Ono S, Horiguchi K, Kawashima K. Physiological roles of cholinergic system in immune cells. *J Pharmacol Sci.* 2017;134:1-21.

Fujii T, Mashimo M, Moriwaki Y, Misawa H, Ono S, Horiguchi K, Kawashima K. Expression and function of the cholinergic system in immune cells. *Front Immunol.* 2017;8: 1085.

Green JT, Thomas GA, Rhodes J. Nicotine: therapeutic potential for the treatment of ulcerative colitis. *Expert Opin Investig Drugs.* 1997; 6:17-22.

Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagusnerve stimulation attenuates the systemic inflammatory responses to endotoxin. *Nature.* 2000; 405: 458-462.

Wang H, Yu Man, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature.* 2003;421:384-388.

Fujii YX, Fujigaya H, Moriwaki Y, Misawa H, Kasahara T, Kawashima K. Enhanced serum antigen-specific IgG₁ and proinflammatory cytokine production in nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit gene knockout mice. *J Neuroimmunol.* 2007;189: 69-74.

Galitovskiy V, Qian J, Chernyavsky AI, Marchenko S, Gindi V, Edwards RA, Grando SA. Cytokine-induced alterations of $\alpha 7$ nicotinic receptor in colonic CD4 T cells mediate dichotomous response to nicotine in murine models of Th1/Th17- versus Th2-mediated colitis. *J Immunol.* 2011;187(5):2677-87.

Kawashima K, Fujii T, Moriwaki Y, Misawa

H, Horiguchi K. Non-neuronal cholinergic system in regulation of immune function with a focus on $\alpha 7$ nAChRs. *Int Immunopharmacol.* 2015; 29: 127-134.

Chimienti F, Hogg RC, Plantard L, Lehmann C, Brakch N, Fischer J, Huber M, Bertrand D, Hohl D. Identification of SLURP-1 as an epidermal neuromodulator explains the clinical phenotype of Mal de Meleda. *Hum Mol Genet.* 2003;12(22):3017-3024.

Moriwaki, Y., Yoshikawa, K., Fukuda, H., Fujii, Y.X., Misawa, H., Kawashima, K., 2007. Immune system expression of SLURP-1 and SLURP-2, two endogenous nicotinic acetylcholine receptor ligands. *Life Sci.* 2007; 80: 2365-2368.

Fujii T, Horiguchi K, Sunaga H, Moriwaki Y, Misawa H, Kasahara T, Tsuji S, Kawashima K. SLURP-1, an endogenous $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor allosteric ligand, is expressed in CD205(+) dendritic cells in human tonsils and potentiates lymphocytic cholinergic activity. *J Neuroimmunol* 2014;267 (1-2):43-49.

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 8 件)

Grando SA, Kawashima K, Kirkpatrick CJ, Kummer W, Wessler I: Recent progress in revealing the biological and medical significance of the non-neuronal cholinergic system. *Int Immunopharmacol*, 査読：有, 2015; 29: 1-7. doi: 10.1016/j.intimp.2015.08.023.

Moriwaki Y, Takada K, Tsuji S, Kawashima K, Misawa H: Transcriptional regulation of SLURP2, a psoriasis-associated gene, is under control of IL-22 in the skin: a special reference to the nested gene LYNX1. *Int Immunopharmacol*, 査読：有, 2015; 29: 71-75. doi: 10.1016/j.intimp.2015.05.030.

Kawashima K, Fujii T, Moriwaki Y, Misawa H, Horiguchi K: Non-neuronal cholinergic system in regulation of immune function with a focus on $\alpha 7$ nAChRs. *Int Immunopharmacol*, 査読：有, 2015; 29: 127-134. doi: 10.1016/j.intimp.2015.04.015.

Moriwaki Y, Takada K, Nagasaki T, Kubo N, Ishii T, Kose K, Kageyama T, Tsuji S, Kawashima K, Misawa H: IL-22/STAT3-induced increases in SLURP1 expression within psoriatic lesions exerts antimicrobial effects against *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 査読：有, 2015 Oct 16; 10(10):e0140750. doi: 10.1371/journal.pone.0140750.

Mashimo M, Yurie Y, Kawashima K Fujii T: CRAC channels are required for $[Ca^{2+}]_i$ oscillations and c-fos gene expression after muscarinic acetylcholine receptor activation in leukemic T cells. Life Sci, 査読: 有, 2016; 161: 40-45. doi: 10.1016/j.lfs.2016.07.014.

Mashimo M, Iwasaki Y, Inoue S, Saito S, Kawashima K, Fujii T: Acetylcholine released from T lymphocytes acts via nicotinic acetylcholine receptors to regulate T cell intracellular Ca^{2+} , interleukin-2 secretion and proliferation. Life Sci, 査読: 有, 2017; 172: 13-18. doi: 10.1016/j.lfs.2016.12.015.

Fujii T, Mashimo M, Moriwaki Y, Misawa H, Ono S, Horiguchi K, Kawashima K: Physiological functions of the cholinergic system in immune cells. J Pharmacol Sci, 査読: 有, 2017; 134:1-21. doi: 10.1016/j.jphs.2017.05.002.

Fujii T, Mashimo M, Moriwaki Y, Misawa H, Ono S, Horiguchi K, Kawashima K: Expression and function of the cholinergic system in immune cells. Front Immunol, 査読: 有, 2017; 8: 1085. doi: 10.3389/fimmu.2017.01085

〔学会発表〕(計 7 件)

○岩崎有可里, 間下雅士, 井上笙子, 齋藤聖子, 川島紘一郎, 藤井健志. T リンパ球モデル細胞 MOLT3 におけるアセチルコリンのオートクラインおよびパラクライン作用による細胞増殖および IL-2 の産生への影響. 第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 富田林市、大阪府 (2015 年 10 月 17 日).

○Kawashima K, Mashimo M, Fujii T, Moriwaki M, Misawa H, Ono S. Role for $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in naïve T cell differentiation into regulatory T cells. Society for Neuroscience-2016, San Diego, CA, USA (Nov. 15, 2016).

○小森 眞紗代, 間下 雅士, 松井 悠理子, 井上 笙子, 齋藤 聖子, 小野史郎, 川島 紘一郎, 奥山洋美, 藤井 健志. $\alpha 7$ ニコチン受容体シグナルは抗原提示細胞の抗原プロセッシング過程を阻害して制御性 T 細胞分化を抑制する. 第 130 回日本薬理学会近畿部会 (2016 年 11 月 19 日).

○岩崎 有可里, 間下 雅士, 井上 笙子, 齋藤 聖子, 川島 紘一郎, 藤井 健志. T リンパ球におけるアセチルコリンのオートクライン作用の生理的役割の解明. 第 67 回日本薬学会近畿支部総会 (2017 年 10 月 14 日).

○祭田 絢子, 間下 雅士, 小森 眞紗代,

松井 悠理子, 小野 史郎, 川島 紘一郎, 奥山 洋美, 森脇 康博, 三澤 日出巳, 藤井 健志. $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体刺激による制御性 T 細胞の分化促進. 第 67 回日本薬学会近畿支部総会 (2017 年 10 月 14 日).

○坂口 美咲, 間下 雅士, 田中 菜穂子, 川島 紘一郎, 藤井 健志. マウス脾臓細胞における T 細胞の活性化がアセチルコリン受容体の発現に及ぼす影響の検討. 第 138 回日本薬学会年会 (2018 年 3 月 25-28 日).

○松井 悠理子, 間下 雅士, 小森 眞紗代, 井上 笙子, 齋藤 聖子, 奥山 洋美, 小野 史郎, 川島 紘一郎, 藤井 健志. $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体は抗原提示細胞の抗原提示過程を阻害しヘルパー T 細胞の分化を抑制する. 第 138 回日本薬学会年会 (2018 年 3 月 25-28 日).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川島 紘一郎 (KAWASHIMA Koichiro)
北里大学・薬学部・客員教授
研究者番号: 70095008

(2) 研究分担者

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

間下 雅士 (MASHIMO Masato)

同志社女子大学・薬学部・助教
研究者番号：30738886

堀口 和秀 (HORIGUCHI Kazuhide)
福井大学・医学部・准教授
研究者番号：20377451

(3)連携研究者

三澤 日出巳 (MISAWA Hidemi)
慶応大学・薬学部・教授
研究者番号：80219617

森脇 康博 (MORIWAKI Yasuhiro)
慶応大学・薬学部・講師
研究者番号：00392150

(4)研究協力者

()