

平成 23 年 4 月 25 日現在

機関番号：3 2 6 8 0

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：2 0 5 9 0 0 9 4

研究課題名 (和文)：新規内因性コリン作動性ポリペプチドの免疫系細胞における発現と生理作用の薬学的研究

研究課題名 (英文)：Expression and biological function of a novel endogenous cholinergic polypeptide in immune cells

研究代表者

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：7 0 0 9 5 0 0 8

研究成果の概要 (和文)：新規内因性 $\alpha 7$ ニコチン受容体作動性ペプチド SLURP-1 の気道上皮細胞における特異的発現を免疫組織化学的手法により発見した。喘息モデル・マウスでは気道における SLURP-1 発現が低下しており，喘息の病態生理における SLURP-1 の関与が示唆された。SLURP-1 は，T 細胞の分化とコリン作動系活性に影響を及ぼすことが判明した。さらに SLURP-1 の血中濃度を測定して喘息などの疾患における役割の解明を目指して，SLURP-1 の ELISA を開発するために 2 種類の抗体を作製した。

研究成果の概要 (英文)：SLURP-1 is a novel endogenous peptide with an allosteric agonistic activity for $\alpha 7$ nAChR. Specific expression of SLURP-1 in the bronchial epithelial cells was discovered by an immunohistochemical procedure. SLURP-1 expression in the lung was significantly suppressed in mice with bronchial asthma. SLURP-1 modified differentiation and cholinergic activity of T cells. These findings suggest that SLURP-1 is involved in pathophysiology of asthma and regulation of immune function. We prepared two different kinds of antibodies against human type SLURP-1 in guinea pigs and rabbits in order to develop an ELISA for SLURP-1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2 0 0 8 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2 0 0 9 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2 0 1 0 年度	600,000	180,000	780,000
総 計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：SLURP-1，ニコチン受容体，気道上皮細胞，T 細胞，抗体，喘息

1. 研究開始当初の背景

免疫系細胞には独自の非神経性コリン作動系が発現しており，免疫機能調節に関与している。すなわち，T細胞や樹状細胞(DCs)にはアセチルコリン(ACh)産生能があり，免疫刺激によりACh合成酵素活性が上昇する。リンパ球，DCsおよびマクロファージ(MΦs)に

は，様々なムスカリンおよびニコチン性ACh受容体(それぞれ，mAChRおよびnAChR)サブタイプが存在し，ACh刺激により Ca^{2+} -シグナリングが誘発される。さらに M_1/M_5 mAChRノックアウト(KO)マウスにおける抗体産生の減弱と， $\alpha 7$ nAChR-KOマウスにおける抗体産生の促進が発見されている。これらの結果

は、免疫細胞のコリン作動系が、mAChRおよびnAChRを介して、免疫機能の調節に関与していることを示している。

これまでnAChRの内因性リガンドとして、神経伝達物質AChが唯一知られていた。ところが、最近発見された内因性ポリペプチドSLURP (secreted **L**y-6/**u**PAR-related **p**rotein)-1は、 $\alpha 7$ nAChRに対するリガンドであることが証明された。SLURP-1の遺伝子変異が皮膚の異常なケラチン化を伴うMal de Meleda病において発見されたことから、SLURP-1に関する研究は主としてケラチノサイトにおいて進行している。ヒトSLURP-1は、分子量が8843Daと推定されており、分子中に10個のシステイン残基を含んでいる。そのために複雑な立体構造をとっているものと考えられる。我々は、すでに、RT-PCRを用いて、SLURP-1遺伝子が、免疫系、中枢神経系、循環器系および消化器系組織などほぼ全身に発現していることを観察した。ヒトおよびマウスのSLURP-1をクローニングし、遺伝子組み換えによりSLURP-1を作製して、SLURP-1によるヒトT細胞系白血病細胞株MOLT-3細胞における Ca^{2+} -シグナリングの誘発を発見した。さらに、最近、マウス型SLURP-1に対する特異抗体を家兎で作製し、SLURP-1の感覚神経系における発現を免疫組織化学的手法により発見した。

2. 研究の目的

肺におけるSLURP-1の発現を検討し、喘息などの疾患における変化を調べて、SLURP-1の生理的役割を明らかにする。

SLURP-1のT細胞における生理作用を調べて、免疫機能の調節への関与を検討する。

SLURP-1の血中濃度と様々な病態との関連を調べるために、SLURP-1のELISAによる測定法を開発する。

本研究課題の遂行により、SLURP-1の生理作用を解明し、SLURP-1を介する新規の作用メカニズムをもつ免疫調整薬を開発するための理論的根拠の構築を目指す。

3. 研究の方法

-1. 肺におけるSLURP-1発現の検討

独自に開発した抗マウス型SLURP-1に対する特異抗体を用いて、マウスの肺におけるSLURP-1、コリン作動性神経マーカーCHT1、マクロファージ(MΦs)マーカーF4/80、神経マーカーPGP 9.5および粘液分泌細胞マーカーmucin 5ACの発現を免疫組織化学的に検討した。Western blotにより、肺と気道におけるSLURP-1発現を確認した。

-2. 喘息モデル・マウスにおけるSLURP-1発現変化の検討

Western blotting によって、肺におけるSLURP-1蛋白質の発現変化を検討した。組

織化学および免疫組織化学的手法を用いて、気管支における組織像とSLURP-1発現の変化を検討した。

遺伝子組み換えSLURP-1(rSLURP-1)とT細胞のモデルとしてヒトT細胞系白血病細胞株MOLT-3を用いて、細胞増殖とACh含量と遊離量などのコリン作動系活性に及ぼす作用を調べた。

SLURP-1のELISAを開発するために必要な2種の抗ヒトSLURP-1抗体の作製。

SLURP-1分子上の異なる2部位を含む環状および直鎖フラグメントを合成し、KLHに結合させて2種の抗原を作製した。これらの抗原を家兎とモルモットに免疫して抗血清を採取した。抗体産生は、抗血清とSLURP-1抗原との反応から確認した。

4. 研究成果

-1. 肺におけるSLURP-1の発現

免疫組織化学的に、気管支線毛上皮細胞におけるSLURP-1の発現を発見した(図1)。

Western blotにより、肺と気道におけるSLURP-1発現を確認した。線毛上皮細胞と気管支固有層PGP 9.5陽性神経におけるCHT1発現を確認した。線毛上皮細胞とコリン作動性神経の近傍におけるF4/80陽性MΦsの浸潤を観察した。

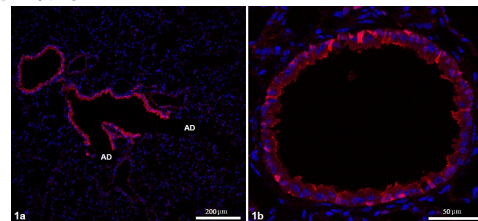


図1. 気管支上皮細胞におけるSLURP-1の発現

[結論] 線毛上皮細胞は、SLURP-1とACh産生能をもち、 $\alpha 7$ nAChRを発現している。

線毛上皮細胞が産生したAChとSLURP-1は、

自身の $\alpha 7$ nAChRに、オートクライン的に働いてホメオステシス維持に関与し、

線毛上皮細胞および固有層コリン作動性神経近傍では、MΦsの $\alpha 7$ nAChRに働いて、TNF- α の遊離を抑制する可能性が考えられる。

-2. 喘息による肺におけるSLURP-1発現の変化

喘息マウスでは、気管支上皮細胞の肥厚と粘液分泌杯細胞化生が観察された。

SLURP-1発現は、喘息マウスの気管支粘膜で大きく低下した。他方、喘息マウスの気管支粘膜における粘液分泌細胞の発現が著明に増大した。

[結論] 喘息マウスにおけるSLURP-1発現量の低下は、粘液分泌杯細胞化生により、線毛上皮細胞が激減した結果と考えられる。線毛上皮細胞が産生するAChとSLURP-1は、気管支上皮細胞上の $\alpha 7$ nAChRに、オートクライ

的に働いて恒常性の維持，傷害からの保護や修復を促進し，マクロファージやリンパ球などの $\alpha 7$ nAChRにパラクライン的に働いて，さらにTNF- α などの炎症促進性サイトカインの遊離抑制を介して，炎症および免疫反応の抑制に寄与するものと考えられる．そのため，喘息モデルの気管支におけるSLURP-1発現の低下は，喘息の遷延や悪化の一因となっている可能性が考えられる．

SLURP-1のT細胞増殖とコリン作動系活性に及ぼす作用．

rSLURP-1は，PHAの非存在下および存在下のいずれにおいても，細胞増殖を有意に抑制した．PHAは，ACh含量と遊離量を有意に増大させた．rSLURP-1は，PHA非存在下でACh遊離量の上昇傾向を，存在下でACh含量の上昇傾向を示した．

[結論] SLURP-1は，T細胞の分化を促進し，コリン作動系を促進させる可能性が判明した．

抗ヒト型SLURP-1抗体の作製．

家兎およびモルモットにおいて，抗環状SLURP-1フラグメント抗体の産生を確認した．

抗直鎖SLURP-1フラグメント抗体の産生を家兎において確認した．

[結論] ヒトSLURP-1分子上のそれぞれ異なる部位を認識する2種の抗体作製に成功した．これらの抗体を用いて，SLURP-1のELISAを開発する準備が整った．

5．主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Horiguchi K, Yamashita N, Horiguchi S, Irie K, Masuda J, Takano-Ohmuro H, Himi T, Miyazawa M, Moriwaki Y, Okuda T, Misawa H, Ozaki H, Kawashima K: Expression of SLURP-1, an endogenous $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor allosteric ligand, in murine bronchial epithelial cells. *J Neurosci Res* 87: 2740-2747, 2009

Narumoto O, Horiguchi K, Horiguchi S, Moriwaki Y, Takano-Ohmuro H, Shoji S, Misawa H, Yamashita N, Nagase T, Kawashima K, Yamashita N: Down-regulation of secreted lymphocyte antigen-6/urokinase-type plasminogen activator receptor-related peptide-1 (SLURP-1), an endogenous $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor modulator, in murine and human asthmatic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 398: 713-718, 2010

[学会発表](計3件)

Kawashima K, Horiguchi K, Horiguchi S, Yamashita N, Moriwaki Y, Misawa H: Expression of SLURP-1, an endogenous $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor modulator, in

bronchial epithelial cells. Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2009/10/21, Chicago, IL, USA.

Yamashita N, Horiguchi K, Horiguchi S, Moriwaki Y, Misawa H, Kawashima K: Decreased expression of SLURP-1, an endogenous $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor modulator, in the bronchus of asthmatic mice. Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2010/10/17, San Diego, CA, USA.

Fujii T, Takada-Takatori Y, Kawashima K: SLURP-1 up-regulates acetylcholine release in T cells. The 48th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society, 11/3/23, Yokohama, Kanagawa-ken, Japan

6．研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

氷見 敏行 (HIMI TOSHIYUKI)
武蔵野大学・薬学研究所・教授
研究者番号：30222243