

機関番号：34311

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590121

研究課題名(和文) 免疫機能調節における液胞型プロトンポンプとコリン作動系の相互作用に関する研究

研究課題名(英文) Interaction between vacuolar H⁺ ATPase and lymphocytic cholinergic system in regulation of immune function

研究代表者

藤井 健志 (Fujii, Takeshi)

同志社女子大学・薬学部・教授

研究者番号：80255380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：免疫機能調節における液胞型プロトンポンプ(V-ATPase)とリンパ球コリン作動系の相互作用を検討した。V-ATPaseのうちメディエートフォアのほかに、V-ATPaseの膜貫通型部位V0セクターのサブユニットa,b,c,d,eの発現を確認できた。これらの発現は、メディエートフォアよりも相対的に少なかった。T細胞の活性化により各サブユニット遺伝子の発現が増強された。siRNAによるメディエートフォアの遺伝子発現により、アセチルコリン放出が減少した。以上より、Tリンパ球におけるV-ATPaseサブユニットの発現、Tリンパ球からのアセチルコリン放出におけるV-ATPaseの関与が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We investigated interaction between vacuolar type H⁺ ATPase (V-ATPase) and lymphocytic cholinergic system in regulation of immune activity. In addition of mediatoaphore, which is a homooligomer with a 16-kDa subunit homologous to proteolipid subunit c of the V0 sector of V-ATPase, expression of several subunits (a,b,c,d,e) of the V0 sector mRNAs, which is a hydrophobic transmembrane sector of the V-ATPase, were detected in two human leukemic T cell lines CCRF-CCRF-CEM and MOLT-3, and MNLS of human and mouse. T cell activation induced a slight increase in expression of V-ATPase subunits. Anti-mediatoaphore siRNA decreased mediatoaphore mRNA expression and release of acetylcholine (ACh) from T cells, without reducing expression of choline acetyltransferase, a synthesizing enzyme of ACh. These findings indicate that T cells express several subunits of V-ATPase V0 component, and acetylcholine release from T cells is regulated by V-ATPase.

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：アセチルコリン Tリンパ球 Bリンパ球 コリンアセチルトランスフェラーゼ 液胞型プロトンポンプ
メディエートフォア

1. 研究開始当初の背景

アセチルコリン (ACh) は、化学伝達の概念の構築に寄与した物質であり、最も古くから知られている神経伝達物質である。副交感神経系の節前・節後線維、交感神経節前線維 (節後線維のうち汗腺を支配するものも含む) および運動神経終末部において分泌される。しかしながら、ACh は ACh 受容体 (AChR) 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、哺乳動物における神経系以外の血液、血管内皮細胞、気道および消化管上皮細胞、羊膜細胞、心臓、および皮膚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)。すなわち、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。

国内では、申請者ら以外には、安保 (新潟大・医学部) らが、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 & Kawamura, Ther Apher 6: 348-57, 2002) 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 et al, Gastroenterology 118: A112, 2000; Kikuchi et al, Neurosci Lett 432: 217-221, 2008) 伊保 (福井大・医学部) 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 et al, J Leukoc Biol 74: 942-951, 2003) を推進している。さらに、野村 (北大・薬) らが、ムスカリン性 AChR (mAChR) を介する T 細胞の機能変化およびサイトカイン (IL-2) 遺伝子発現調節機構を研究していた (Okuma & Nomura, Jpn J Pharmacol 85: 16-19, 2001; Hosoi et al, Life Sci 72: 2117-2120, 2003) 川島 (北里大・薬) らは新規 7 型ニコチン性 AChR (nAChR) アロステリックリガンド SLURP-1 の生理的役割について研究を進めており、現在申請者らとも共同研究を行っている (業績論文 1)。その他、リンパ球ではないが、佐藤 (高知大・医学部) らは、心筋が ACh を産生することを報告しており、ドネペジルの心疾患への応用も視野に入れた研究を推進している。しかしながら、全体として国内においては外国で行われているほど、リンパ球コリン作動系に

着目している研究は盛んではない。

外国では、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, Dermatology 201: 290-295, 2000; Grando et al, Life Sci 91: 969-972, 2012; Wessler et al, Pharmacol Ther 77: 59-79, 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 nAChR の役割 (Mihovilovic et al, J Neuroimmunol 117: 58-67, 2001) Amenta (Camerio 大) らがリンパ球における種々のコリン作動系マーカー遺伝子の発現を研究している (Ricci et al, Pulm Pharmacol Ther 21: 79-87, 2008) Tracy (North Shore Long Island Jewish Inst) らがマクロファージ機能における nAChR の役割に関する研究を精力的に行っている (Wang et al, Nature 421: 384-388, 2003; Nat Med 10: 1216-1221, 2004)。さらに、Rinner (Graz 大) らが ACh の T および B 細胞の分化における役割 (Rinner et al, J Neuroimmunol 81: 31-37, 1998) Skok ら (Palladin Inst) が制御性 B 細胞の分化における 7 型 nAChR の役割に関する研究を推進している (Skok et al, J Neuroimmunol 171: 86-98, 2006)。

上記の Tracy らの研究が契機となって「Cholinergic anti-inflammatory pathway」が提唱され、マクロファージ・樹状細胞上の 7 型 nAChR の抗炎症作用への関与が注目を集めている (Nizri et al, J Immunol 183: 6681-6688, 2009; Makwana et al, Br J Pharmacol 165: 1978-1991, 2012; Sadis et al, PLOS ONE 8: e79984, 2013)。しかしながら、現在では、副交感神経系が直接マクロファージ・樹状細胞上の 7 型 nAChR を刺激するのではないことが判明している。すなわち、申請者らが提唱してきた T 細胞による ACh 産生が、副交感神経系-脾臓神経からの信号をリレーしているとの説に修正されている (Rosas-Ballina et al, Science 334: 98-101, 2011; Olofsson et al, Immunol Rev 248: 188-204, 2012)。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・外国の多数のグループにより行われている。

以上のように、国内・外国において、徐々に免疫系と非神経性コリン作動系との関連が証明されつつあるが、mAChR に着目して行われている研究はほとんどない。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。非神経コリン作動系 (Non-neuronal cholinergic system) に関する国際シンポジウムがこれまでに3回開催され、2006年9月にドイツ・マインツにて開催された、「Second International Symposium on Non-neuronal 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。また、オランダ・グローニンゲンにて開催された第3回シンポジウムでは、Tリンパ球コリン作動系の調節メカニズムについて報告した。さらに、第4回シンポジウムが本年8月28-30日の日程でドイツ・ギーセンにて開催されることが決定している。

以上のように、リンパ球における非神経性コリン作動系の発現とその生理的役割は徐々に注目を集めつつあるが、系統的に研究を行っている研究者は、申請者を除き存在しない。申請者は、「リンパ球における非神経性コリン作動系の発見およびその生理的役割の解析」により第19回日本薬理学会学術奨励賞を受賞した。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産生および放出の増大、さらに、mAChRおよびnAChRを介するAChによる情報伝達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

AChは、リンパ球やマクロファージなどの免疫系細胞においてmAChRあるいはnAChRを介して促進的あるいは抑制的に調節している。

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。しかしながら、これらの非神経性コリン作動系からのACh放出機構に関する研究はほとんど進んでいない。Tリンパ球からのACh放出機構においても、コリン作動性神経においてAChの貯蔵・遊離に関与している小胞型AChトランスポーターは関与していない (Fujii et al, J Neuroimmunol 101: 107-108, 1998) ことから、AChの放出メカニズムは不明のままである。

液胞型プロトンポンプ (V-ATPase) は様々

な細胞において酸性環境の形成に重要な分子である。

V-ATPaseは、膜内在性部分 (V0) と表在性部分 (V1) より構成されている。V1部分には触媒ドメインが存在し、A、B、C、D、E、F、GおよびHの8種類のサブユニットから構成される。他方、V0部分はプロトン輸送を担っており、a、c²、d、cおよびc'のサブユニットから構成されている。さらに、これらのサブユニットのいくつかについてはアイソフォームの存在が明らかになっている。

腎臓、破骨細胞などではその生理的役割の比較的良く研究されている。しかしながら、血球系細胞におけるV-ATPaseの役割については、ほとんど報告がない。V-ATPaseサブユニットcと相同性の高い膜内在性分子メディアートフォアが神経および非神経性細胞からのACh遊離に関与しているとの報告がある (Israël et al, J Neurochem 71: 630-635, 1998)。

申請者は、ヒトT細胞系白血病細胞株において、V-ATPaseのサブユニットcがACh遊離に関与していることを最近発見した (本申請課題の研究成果と合わせて論文業績5として報告できた)。したがって、V-ATPaseとコリン作動系との間に互いに調節し合っている。

本研究では、免疫療法や自己免疫疾患の治療に応用できる可能性を解明するために、V-ATPaseによるリンパ球コリン作動系活性調節とリンパ球機能に及ぼす作用を検討した。

申請者のこれまでの研究成果により、mAChRおよびnAChR刺激が免疫グロブリン産生の調節に関与している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。したがって、免疫系におけるAChの役割に関する研究は、今後競争が一層激化し、急速に進展するものと考えられる。

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 (Kawashima, K, Fujii, T., Pharmacol. Ther. 86: 29-48, 2000) が、TおよびBリンパ球の機能調節に関与しており、V-ATPaseとの相互作用により免疫機能調節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V-ATPase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を開発するための理論的根拠の構築を目的としている。

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

実験動物には、6-10 週齢の C57BL/6 および BALBc マウスを用いた。

ヒト T 細胞系白血病細胞株 CCRF-CEM 細胞および MOLT-3 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)。ヒト単核白血球 (MNL) は倫理的にクリアした細胞を株式会社ケー・エー・シーより入手して用いた。

(2) マウス単核白血球 (MNL) の調製:

エーテル麻酔下、失血死させた後、胸腺および脾臓を採取して重量を測定した。

脾臓を培養液中におい金属メッシュ (#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・MNL 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 μ g/ml) を含む RPMI1640 培地 (日水製薬) を用いて、培養フラスコ (3110-075、岩城硝子) 中に行った。なお、培養は、すべて 37 $^{\circ}$ 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プル (GIBCO BRL) 色素排除法により計数した。

ヒト細胞 (細胞株、MNL) の場合は T 細胞活性化薬 PHA (10 μ g/ml)、マウス MNL の場合は T 細胞活性化薬コンカナバリン A (ConA、和光) (3 μ g/ml) の存在下、24 時間培養した。

CCRF-CEM および MOLT-3 細胞の場合、メディアエートフォアに選択的な siRNA を遺伝子導入装置 (Nucleofector™、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。

(4) ACh の測定

細胞浮遊液 (5×10^6 個) を 4 $^{\circ}$ C、8 分、300g で遠心した。上清は細胞外への ACh 放出量の測定に用いた。得られた沈査は 1 μ M 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 1×10^6 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

細胞を Triton X-100 を含むリン酸緩衝液中で超音波破碎し、4 $^{\circ}$ 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 活性については、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 (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、メディアエートフォア、V-ATPase サブユニット (V₀a,b,c,d,e) 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 $^{\circ}$ C、30 秒; 56-58 $^{\circ}$ C、30 秒; 72 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C、1 分; 58 $^{\circ}$ C、1.5 分; 72 $^{\circ}$ C、1.5 分を 21 サイクル)。

4. 研究成果

(1) ヒト白血病細胞株における各種 V-ATPase サブユニットの遺伝子発現の検討

T リンパ球のモデルとして用いたヒト T 細胞系株白血病細胞株 MOLT-3 および CCRF-CEM 細胞における V-ATPase c サブユニットの遺伝子発現を RT-PCR 法により確認した。さらに、V-ATPase c サブユニットに特異的な抗体を用いて免疫組織学的にタンパク質が発現していることも確認した。MOLT-3 および CCRF-CEM 細胞のフィトヘマアグルチニン (PHA) による活性化に伴い V-ATPase c サブユニット発現量が増大することが明らかになった。V-ATPase c サブユニット以外のサブユニットの遺伝子発現を確認した。

MOLT-3 および CCRF-CEM 細胞における各種 V-ATPase サブユニットの遺伝子発現を確認した。膜貫通部位を構成している V₀ a,b,c,d,e 各サブユニットが発現していた。これらのサブユニットの遺伝子発現量は、mediatophore と比較して少ないものと考えられた。T リンパ球からのアセチルコリンには、mediatophore が主として関与している可能性が考えられた。

ヒト末梢血単核白血球およびマウス単核白血球における各種 V-ATPase サブユニットの遺伝子発現を確認した。膜貫通部位を構成している V₀ a,b,c (mediatophore), d,e 各サブユニットが発現していた。このうち V₀ c

サブユニットの遺伝子発現量が一番多いものと考えられた。

(2) siRNAによるV-ATPase ノックダウンのリンパ球系細胞における情報伝達系への影響の検討

siRNAによるV-ATPase cサブユニットのノックダウンは、MOLT-3 および CCRF-CEM 細胞の生存率および増殖には影響を与えなかった。PHAにより、両細胞株におけるアセチルコリン(ACh)産生および遊離、およびACh合成酵素コリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)の遺伝子発現および酵素活性が増大した。一方、siRNAによるV-ATPase cサブユニットのノックダウンにより、ChAT 遺伝子発現および活性には影響することなくACh遊離が減少した。

以上のことから、Tリンパ球からのACh放出にはV-ATPase cサブユニットが関与していること、Tリンパ球活性化によるコリン作動系の活性化には、V-ATPase cサブユニットの機能亢進も重要であることが明らかとなった。

さらに、Tリンパ球には各種のV-ATPaseサブユニットが発現していること、Tリンパ球活性化に伴い、V-ATPaseサブユニットの機能亢進も重要である可能性が明らかとなった。

(3) T細胞活性化による各種V-ATPase サブユニット遺伝子発現へ及ぼす影響の検討

MOLT-3 および CCRF-CEM 細胞のフィトヘマアグルチニン(PHA)による活性化に伴い、各種V-ATPaseサブユニットの遺伝子発現は若干増大した。しかしながら、その増大はごくわずかのものではあった。

ヒト末梢血単核白血球におけるフィトヘマアグルチニン(PHA)によるTリンパ球活性化に伴い、各種V-ATPaseサブユニットの遺伝子発現は若干増大した。

ニコチン受容体が免疫機能の調節に関与していることの重要性は我々の研究で明らかになりつつある。内在性ニコチン受容体アロステリックリガンド(SLURP-1)は、Tリンパ球からのアセチルコリン放出を促進させるが、メディエートフォア遺伝子発現には影響しなかった。すなわち、メディエートフォア遺伝子発現およびアセチルコリン放出を増大させるPHAとはTリンパ球に及ぼす影響が異なることが明らかとなった。

(4) 展望

以上のことから、ヒトおよびマウスリンパ球には各種のV-ATPaseサブユニットが発現していること、Tリンパ球活性化に伴い、V-ATPaseサブユニットの機能亢進も重要で

ある可能性が明らかとなった。

本研究課題により、今まで未解明であったTリンパ球からのアセチルコリン放出にV-ATPase活性をもつメディエートフォアが重要な役割を果たしていることを明らかにすることができた。

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、V-ATPaseとコリン作動系との間の相互作用の免疫機能調節における役割を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、免疫執権の予防、あるいは改善のための薬物治療におけるV-ATPaseによるリンパ球コリン作動系の活性調節メカニズム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5件)

Fujii T, Horiguchi K, Sunaga H, Moriwaki Y, Misawa H, Kasahara T, Tsuji S, Kawashima K. SLURP-1, an endogenous alpha7 nicotinic acetylcholine receptor allosteric ligand, is expressed in CD205+ dendritic cells in human tonsils and potentiates lymphocytic cholinergic activity. *Journal of Neuroimmunology* 267: 43-49, 2014. 査読あり。doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.12.003.

Kawashima K, Fujii T, Moriwaki Y, Misawa H. Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function. *Life Sciences* 91: 1027-1032, 2012. 査読あり。doi: 10.1016/j.lfs.2012.05.006.

Fujii T, Takada-Takatori Y, Kawashima K. Regulatory mechanisms of acetylcholine synthesis and release by T cells. *Life Sciences* 91: 981-985, 2012. 査読あり。doi: 10.1016/j.lfs.2012.04.031.

Kawashima K, Fujii T, Moriwaki Y, Misawa H, Horiguchi K. *Annals of New York Academy of Sciences*. 1261: 7-17, 2012. 査読あり。doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06516.x.

Fujii T, Takada-Takatori Y, Horiguchi

K, Kawashima K. Mediatophore regulates acetylcholine release from T cells. Journal of Neuroimmunology 244: 16-22, 2012. 査読あり。doi: 10.1016/j.jneuroim.2011.12.022.

〔学会発表〕(計6件)

上里彩夏、高鳥悠記、武政翔大、泉安彦、赤池昭紀、久米利明、藤井健志。青ジソ由来 Nrf2-ARE 経路活性化物質のヒト表皮細胞への酸化ストレスに対する保護作用。第63回日本薬学会近畿支部総会・大会、2013年10月12日、同志社女子大学 京都・京田辺市

角野有紀、堀口和秀、三澤日出巳、森脇康博、高鳥悠記、川島紘一郎、藤井健志。内在性7型ニコチン受容体アロステリックリガンド SLURP-1 の免疫器官における発現とリンパ球コリン作動系活性の調節。第63回日本薬学会近畿支部総会・大会、2013年10月12日、同志社女子大学 京都・京田辺市

Kawashima K, Fujii T, Horiguchi K, Moriwaki Y, Misawa H. SLURP-1, an endogenous alpha7 nAChR allosteric ligand, expression in human immune organs and function in regulation of lymphocytic cholinergic activity. 8th Congress of the International Society for Autonomic Neuroscience (ISAN), 15th Meeting of the European Federation of Autonomic Societies (EFAS) with participation of the German Autonomic Society and the LOEWE Research Focus Non-neuronal Cholinergic Systems. 2013年7月31日、Giessen Germany

Kawashima K, Fujii T, Monma T, Suzuki I. Roles of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in regulation of lymphocytic cholinergic activity. 42nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience. 2012年10月16日、米国・ルイジアナ州・ニューオリンズ。

Fujii T, Takada-Takatori Y, Kawashima K. Regulatory mechanisms of acetylcholine synthesis and release in T cells. 3rd International Symposium on Non-Neuronal acetylcholine. 2011年8月25日、オランダ・グローニンゲン。

Kawashima K, Fujii T. Roles of non-neuronal cholinergic system in immunoregulation. 3rd International Symposium on Non-Neuronal acetylcholine.

2011年8月24日、オランダ・グローニンゲン。

〔その他〕

同志社女子大学 研究者データベース 藤井健志

http://research-db.dwc.doshisha.ac.jp/rd/html/japanease/researchersHtml/2703/2703_Researcher.html

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・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)
北里大学・薬学研究所・客員教授
研究者番号：70095008