

研究テーマ**リンパ球におけるナノマイシンV-ATPaseを標的とした免疫制御法の開発**

1. はじめに

アセチルコリン (ACh) は、中枢および末梢神経系における重要な神経伝達物質である。しかしながら、ヒトでは、血液、血管内皮細胞、気道および消化管上皮細胞などの様々な非神経性組織におけるAChの存在が判明しており、オータコイドのように、局所において産生細胞より周辺へ放出されて作用する細胞機能調節物質としての役割が徐々に明らかになってきている^{1,2)}。これらの知見を踏まえて、非神経性コリン作動系 (non-neuronal cholinergic system) の存在が提唱されている。

リンパ球にはコリン作動系として不可欠な構成要素 (ACh, ACh 合成酵素コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT), ムスカリン性 ACh 受容体およびニコチン性 ACh 受容体 (nAChR), 高親和性コリントランスポーター, および ACh 分解酵素アセチルコリンエステラーゼ) が、神経系と同様にすべて備わっている。私たちは、リンパ球における非神経性コリン作動系の存在の提唱および ACh による免疫機能調節メカニズムの研究を進めてきた²⁻⁴⁾。

神経終末部において ACh は、プロトンポンプのひとつ小胞型 ACh トランスポーター (VChT) によりシナプス小胞へ貯蔵され、開口放出によりシナプス間隙へ遊離される。神経系において遊離される ACh の一部は開口放出を介さずに、vacuolar proton pump (V-ATPase) 類似の分子 mediatoaphore により遊離されるとの報告がある⁵⁾。他方、Tリンパ球にはシナプス小胞のような分泌顆粒が存在せず、VChT も発現していない。ACh は形質膜を自由に通過できないため、形質膜上に輸送メカニズムが必要である。したがって、V-ATPase などの分子がTリンパ球における ACh 遊離メカニズムに寄与している可能性がある。胎盤では、有機カチオントランスポーター (OCT) が ACh 遊離に関与する分子として注目されている⁶⁾。しかしながら、リンパ球からの ACh 遊離機構は解明されていない。本研究は、非神経性コリン作動系のひとつとしてTリンパ球からの ACh 遊離機構におけるナノマシンとしての形質膜輸送系の重要性を明らかにする目的で行った。

2. 方法

ヒト T 細胞系白血病細胞株 CCRF-CEM および MOLT-3 細胞を T リンパ球のモデルとして用いた。細胞株は、林原生物化学研究所・研究センター・基礎細胞研究部門 (藤崎細胞センター) より供与を受けた。7% 牛胎仔血清を含む RPMI1640 培地中で 37°C, 5% CO₂ の条件下で培養した。一部の細胞は、T リンパ球活性化薬 フィトヘマアグルチニン (PHA) (10 μg/ml) の存在下、24 時間培養した。V-ATPase (mediatoaphore) 遺伝子をノックダウンする目的で、V-ATPase (mediatoaphore; accession number: M62762) に選択的な siRNA を遺伝子導入装置 (Nucleofector™) を用いて導入した (プログラム: X-001, 導入試薬: 細胞株用キット C)。

ChAT および V-ATPase 遺伝子の発現は、特異的なプライマーを用いて、RT-PCR 法により検出した (PCR 条件: ChAT: 95°C, 30 秒; 62°C, 30 秒; 72°C, 30 秒を 37 サイクル; V-ATPase: 95°C, 30 秒; 60°C,

30 秒; 72°C, 30 秒を 32 サイクル).

1次抗体にウサギ抗ヒトV-ATPase抗体(故大熊教授・金沢大より供与を受けた), 2次抗体にFITC標識ヤギ抗ウサギIgG抗体および共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510, カールツァイス)を用いて, V-ATPaseたんぱく質の細胞内局在について検討した.

ACh の測定は, [³H]ACh (specific activity: 3.02 TBq/mmol, GE ヘルスケア) および抗 ACh 抗血清 (川島教授・武蔵野大より供与) を用いるラジオイムノアッセイ法により行った⁷⁾.

3. 結果

CCRF-CEMおよびMOLT-3細胞において, V-ATPase (mediatophore) 遺伝子の発現が認められた. さらに, 免疫染色により, 両細胞株において, V-ATPase (mediatophore) たんぱく質の発現も確認できた. V-ATPase (mediatophore) たんぱく質の発現は細胞膜付近に局在していた. 一方, 両細胞株において, 有機カチオントランスポーターOCT1, OCT2およびOCT3遺伝子の発現は認められなかった.

PHAによるTリンパ球活性化により, CCRF-CEMおよびMOLT-3細胞におけるChATの遺伝子発現とChAT活性, およびACh産生と遊離が増大することが明らかになっている⁸⁾. そこで, PHAによりTリンパ球を活性化させた場合のV-ATPase (mediatophore) 遺伝子発現とACh遊離の変化を検討した. CCRF-CEMおよびMOLT-3細胞において, PHAによりV-ATPase (mediatophore) 遺伝子の発現は, それぞれ約36%および20%増強した. 両細胞株において, PHAは細胞内ACh量および細胞外への遊離ACh量を増大させた(図1).

V-ATPase (mediatophore) 遺伝子の発現を効率良く抑制する siRNA を, CCRF-CEMおよびMOLT-3細胞に導入した. CCRF-CEM および MOLT-3 細胞において, siRNA の導入により V-ATPase (mediatophore) 遺伝子の発現は対照群のそれぞれ約 56 および 58%にまで減少した. siRNA により ChAT 遺伝子の発現は影響を受けないことを確認した. 両細胞株において, siRNA により, 遊離 ACh は対照群のそれぞれ約 70 および 74%にまで減少した(図2). 一方, 細胞内 ACh 量はわずかに増大した(図2).

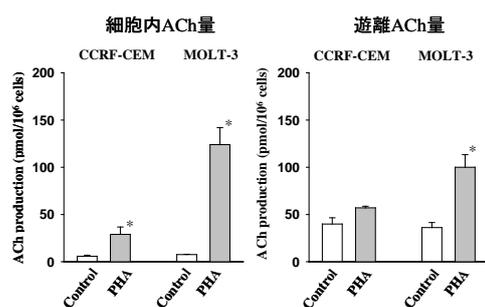


図1 PHAによる細胞内ACh量および遊離の変化.
*P<0.05 vs. control (Student's t-test).

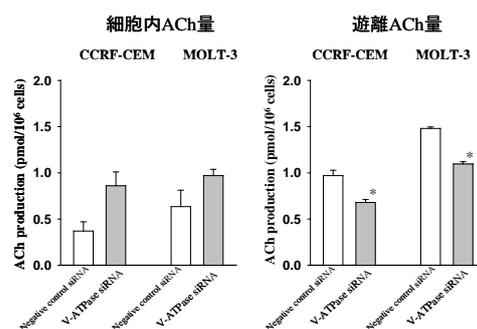


図2 V-ATPase 特異的 siRNA による細胞内 ACh 量および遊離の変化. *P<0.05 vs. control (Student's t-test).

4. 考察

PHA は, V-ATPase (mediatophore) 遺伝子の発現および ACh 遊離をともに増大させた. さらに, siRNA は, V-ATPase 遺伝子 (mediatophore) の発現および ACh 遊離が減少させた. 以上より, Tリンパ球からの ACh 遊離メカニズムに V-ATPase (mediatophore) が関与していることが明らかになった. 本報告書には間にあわなかったが, 免疫異常動物モデルにおいて, リンパ球および免疫器官の ACh 遊離能と形質膜輸送系の輸送能との関連について検討中である. これにより, 免疫調節薬のターゲットとし

でのリンパ球コリン作動系の重要性をより明らかにしたい。

喫煙者における免疫活性の低下や nAChR を介する炎症性反応の調節機構などが、リンパ球コリン作動系と免疫系との関連を示す知見として話題となっている。難病（特定疾患）に指定されているクローン病および潰瘍性大腸炎において、喫煙により摂取されるニコチンがクローン病では症状を増悪させ、潰瘍性大腸炎では発症・再燃に抑制的に影響することが知られている。しかしながら、そのメカニズムは未解明のままであり、これらの自己免疫疾患の根本的な治療法は見つかっていない。リンパ球コリン作動系をターゲットとする新たな側面からの治療法の開発を目指したい。

血液・血管系の非神経性コリン作動系の研究はまだ端緒に着いたばかりである。今後は、膜輸送分子をターゲットとする薬物の免疫調節薬としての可能性を追究したい。さらに、免疫疾患だけでなく、生活習慣病の予防、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も解析を進めていく予定である。

謝辞：本研究を遂行するにあたり、ご援助を賜りました財団法人病態代謝研究会に厚く御礼申し上げます。この研究は、同志社女子大学・薬学部・薬理学教室 高鳥 悠記助教、片岡 真希子氏、武蔵野大学・薬学研究所 川島 紘一郎客員教授の協力を得た。

5. 参考文献

1. Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racké K. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule widely distributed in biological system: expression and function in humans. *Pharmacol Ther* 77: 59-79, 1998.
2. Kawashima K, Fujii T. Expression of neon-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. *Front Biosci* 9: 2063-2085, 2004.
3. Fujii YX, Tashiro A, Arimoto K, Fujigaya H, Moriwaki Y, Misawa H, Fujii T, Matsui M, Kasahara T, Kawashima K: Diminished antigen-specific IgG1 and interleukin-6 production and acetylcholinesterase expression in combined M₁ and M₅ muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *J Neuroimmunol* 188: 80-85, 2007.
4. Fujii YX, Fujigaya H, Moriwaki Y, Misawa H, Kasahara T, Grando SA, Kawashima K. Enhanced serum antigen-specific IgG₁ and proinflammatory cytokine production in nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit gene knockout mice. *J Neuroimmunol* 189: 69-74, 2007.
5. Israël M, Lesbats B, Tomasi M, Ohkuma S. Enhanced acetylcholine release from cells that have more 15-kDa proteolipid in their membrane, a constituent V-ATPase, and mediophore. *J Neurochem* 71: 630-635, 1998.
6. Wessler I, Roth E, Deutsch C, Brockerhoff P, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Kilbinger H. Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. *Br J Pharmacol* 134: 951-956, 2001.
7. Kawashima K, Ishikawa H, Mochizuki M. Radioimmunoassay for acetylcholine in the rat brain. *J Pharmacol Methods* 3: 115-123, 1980.
8. Fujii T, Yamada S, Watanabe Y, Misawa H, Tajima S, Fujimoto K, Kasahara T, Kawashima K. Induction of choline acetyltransferase mRNA in human mononuclear leukocytes stimulated by phytohemagglutinin, a T-cell activator. *J Neuroimmunol* 82: 101-107, 1998.