

論 文

ナマコ由来成分IJ-337のT細胞の機能とコリン作動系活性に及ぼす影響

¹間 下 雅 士、²金 取 里 美、³フー ワー フォン
⁴川 島 紘一郎、⁵藤 井 健 志¹同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・薬理学研究室・特任助教²同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・薬理学研究室・2015年度卒業生³イメックスジャパン株式会社・取締役⁴北里大学・薬学部・分子薬理学研究室・客員教授⁵同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・薬理学研究室・教授Effects of IJ-337 Derived from a Sea Cucumber on T-cell Function
and the Lymphocytic Cholinergic System¹Masato Mashimo, ²Satomi Kanatori, ³Foo Wah Foong
⁴Koichiro Kawashima, ⁵Takeshi Fujii¹ Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences,

Doshisha Women's College of Liberal Arts, Special Appointment Assistant Professor

² Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences,

Doshisha Women's College of Liberal Arts, Graduate of 2015

³ Imex Japan, Co., LTD., Director⁴ Department of Molecular Pharmacology, Kitasato University School of Pharmaceutical Sciences,
Visiting Professor⁵ Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences,

Doshisha Women's College of Liberal Arts, Professor

要 旨

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。しかしながら、AChはリンパ系細胞でも産生され、種々のサイトカイン産生やナイーブT細胞の分化に影響を及ぼして免疫機能調節に関与していることが明らかになっている。ナマコ (sea cucumber) 由来の抽出成分IJ-337には、サイトカイン産生抑制作用、神経性疼痛抑制作用や糖尿病性知覚異常改善作用などがあることが報告されている。本研究では、IJ-337のTリンパ球機能およびTリンパ球コリン作動系活性に及ぼす影響について検討した。T細胞のモデルとしてヒトT細胞系白血病細胞株MOLT-3を用いた。IJ-337は、MOLT-3細胞における転写調節因子c-fos遺伝子発現を抑制した。さらに、IJ-337は、インターロイキン-2 (IL-2) タンパク質産生量を減少させた。しかしながら、IJ-337はTリンパ球コリン作動系活性には影響を及ぼさなかった。IJ-337はMOLT-3細胞の増殖を抑制した。以上の結果より、IJ-337はコリン作動系には影響を与えることなく、T細胞機能を抑制して免疫活性を抑制する可能性が示唆された。

Abstract

Acetylcholine (ACh) is the oldest known neurotransmitter. However, ACh is also present in lymphoid cells, and it has been clarified that it is involved in the regulation of immune function through regulation of various cytokine expression and differentiation of naive T cells. It has been reported that extractive component, IJ-337 derived from sea cucumber has an inhibitory effect on cytokine expression, anti-diabetic action and anti-inflammatory action. In this study, we investigated the effect of IJ-337 on T lymphocyte function and T lymphocyte cholinergic system activity. A human T cell lineage leukemia cell line MOLT-3 was used as a model of T cells. IJ-337 suppressed transcription regulatory factor c-fos gene expression in MOLT-3 cells. In addition, IJ-337 decreased interleukin-2 (IL-2) protein production. However, IJ-337 did not affect T lymphocyte cholinergic system activity. IJ-337 suppressed proliferation of MOLT-3 cells. These results suggested that IJ-337 could suppress immune activity by suppressing T cell function, regardless of T lymphocyte cholinergic system.

Key Words: Acetylcholine, c-fos, IJ-337, Interleukin-2, T cell

背景・目的

アセチルコリン (ACh) は、中枢神経系および末梢神経系において、最も古くから知られている神経伝達物質のひとつである。しかしながら、リンパ球にも、ACh、ACh合成酵素コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT)、高親和性コリントランスポーター、ムスカリン性ACh受容体 (mAChR) およびニコチン性ACh受容体 (nAChR)、アセチルコリンエステラーゼなど、神経系と同様にコリン作動系として不可欠な構成要素がすべて備わっている¹⁻⁵⁾。

ACh作用薬によるmAChR刺激は、主にM₃およびM₅ mAChRを介して、TおよびB細胞において細胞内Ca²⁺シグナルおよび転写調節因子c-fos遺伝子発現の増強を引き起こす^{6,7)}。さらに、一酸化窒素産生の増大およびインターロイキン-2 (IL-2) を介するシグナル伝達機構を調節する^{8,9)}。TおよびB細胞において、nAChR刺激は、少なくとも一部はα7 nAChRサブユニットを介して一過性の細胞内Ca²⁺シグナルを起こす¹⁰⁾。さらに、ノックアウトマウスを用いた研究から、M₁/M₅ mAChRおよびα7 nAChRが抗原特異的抗体産生に関与していることが報告されている^{11,12)}。

以上のように、リンパ球における非神経性コリン作動系により、免疫機能が調節されていることが明らかになってきた。

ナマコ (sea cucumber) は、棘皮動物の1種であり、日本では古くから食用されている。また、アジアの沿岸地区では滋養強壮等に用いられている。さらに、最近では、

ナマコ由来抽出物に関する様々な研究が進み、ナマコ由来抽出物には抗血栓作用、あるいは抗凝固作用などがあることが多数発見されている^{13,14)}。

IJ-337は、Stichopus badiolate Selenka (マナマコ) の抽出物であり、構造や作用機序は完全には解明されていない¹⁵⁾。IJ-337は、神経性疼痛抑制作用や糖尿病性知覚異常改善作用を有する¹⁶⁾。さらに、IJ-337は免疫に対して、ナチュラルキラー・ナチュラルキラーT細胞活性増強作用を有することがわかっている¹⁵⁾。

本研究では、IJ-337の免疫機能に対する作用を調べるためにヒトT細胞白血病細胞株MOLT-3細胞を用いて、細胞増殖やT細胞の活性化時に見られるc-fos遺伝子およびIL-2タンパク質発現、およびTリンパ球コリン作動系活性に及ぼす影響を検討した。

方 法

1. 試薬

ヒトT細胞系白血病細胞株MOLT-3 (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) をT細胞のモデルとして用いた。IJ-337は図1に示す過程に従ってマナマコより抽出されたものを用いた。

2. 細胞培養

MOLT-3細胞は、7% ウシ胎仔血清 (FBS)、100 units/mL ペニシリンおよび100 μg/mL ストレプトマイシンを含むRPMI1640培地 (日水製薬) で37°C、5% CO₂の条件下において培養した。2日ごとに培地交換を行い継代

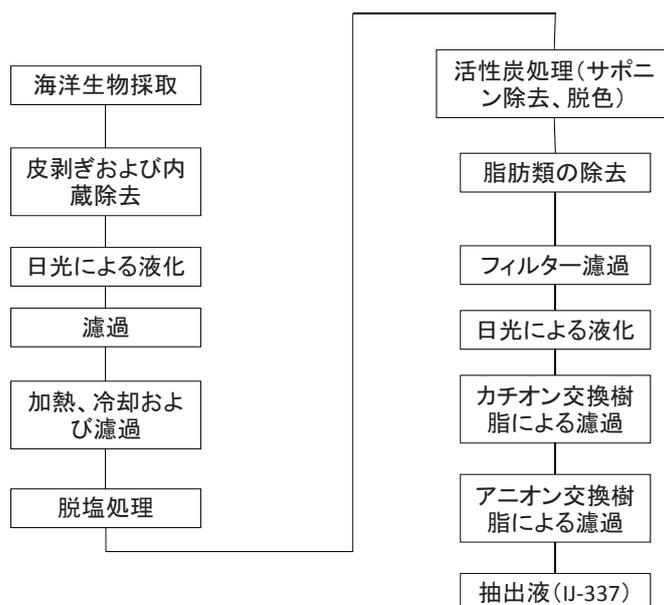


図1 IJ-337の抽出プロセス¹⁵⁾。文献15より改変して作成した。

した¹⁷⁾。

3. 細胞数測定

MOLT-3 細胞（1 ウェル当たり 5.0×10^5 個）を12ウェルプレートに播種し、IJ-337（30、100、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）およびフィトヘマアグルチニン（PHA、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）の存在下、7% FBS、100 units/mL ペニシリンおよび100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシンを含むRPMI1640培地中で、37°C、5% CO_2 の条件下において48時間培養した。培養懸濁液から一部を採取し、血球算定盤を用いて生存細胞数をトリパンブルー色素排除法により測定した。

4. リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法および半定量的PCR法

PCR法を用いた各種の遺伝子発現の解析方法の詳細については、すでに報告した方法に準じて実施した¹⁸⁾。MOLT-3細胞（1ウェル当たり 5.0×10^6 個）を12ウェルプレートに播種し、IJ-337（30、100、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）およびPHA（10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）の存在下、7% FBS、100 units/mL ペニシリンおよび100 mg/mL ストレプトマイシンを含むRPMI1640培地中で、37°C、5% CO_2 の条件下において24時間培養した。プレートより細胞を回収し、トータルRNAをセパゾールRNA II Super（ナカライテスク）を用いて抽出した。なお、上清については、培地中に放出されてきたIL-2を測定するために、Enzyme Linked Immuno Solvent Assay (ELISA) のサンプルとして測定まで-80°C

にて保存した。

トータルRNA（1 μg ）よりPrime Script RT reagent Kit（タカラバイオ）およびS1000 Thermal Cycler（バイオラッド）を用いて、逆転写反応により一本鎖cDNAを合成した。

リアルタイム PCR分析は、合成したcDNA、SYBR Premix Ex Taq II（タカラバイオ）、 M_1 、 M_3 および M_5 mAChR、ChAT、あるいはGAPDHに特異的なプライマーを用いてThermal Cycler Dice Real Time System（タカラバイオ）を用いて行った（Mashimo et al., 2016）。用いたプライマーは次の通りである。 M_1 mAChR（HA229529）：5'-TCAGCAAGACAATGACACTGGAA-3'および5'-GCTGGATAGCAGGCACACTTGA-3、 M_3 （HA220733）：5'-GGCTACTGGCTGTGCTACATCA-3'および5'-GACTGTCTCTGCTGGTACTGCTG-3'、 M_5 （HA200021）：5'-CCCACATCTGAGTGAAGGTCTTG-3'および5'-GAGATCAGCATGGGTTTCAGTGAG-3'、 $\alpha 7$ nAChRサブユニット（HA164722）：5'-TGGCCAGATTTGGAAACCAGA-3'および5'-AGTGTGGAATGTGGCGTCAAAG-3'、ChAT（HA221706）：5'-AGCCCTGCCGTGATCTTTG-3'および5'-GCACAGTCAGTGGGAATGGAGT-3'、GAPDH（HA067812）：5'-GCACCGTCAAGGCTGA GAAC-3'および5'-TGGTGAAGACGCCAGTGA-3'。

半定量的PCRは、合成したcDNA、TaKaRa Ex Taq（タカラバイオ）、GAPDHあるいはc-fosに特異的なプライマーによりS1000 Thermal Cyclerを用いてDNAを増幅

した。用いたc-fosに対するプライマーについては次の通りである。c-fos (HA231902) : 5'- CAGTGG AACCTGTC AAGAGCATC-3'および5'-GCTCCCAGTCTGCTGCATA GAA-3'。

PCR産物をMupid-2 plus (タカラバイオ) を用いて2.5% アガロース電気泳動することによりサイズ分画した。泳動後、エチジウムブロマイドによりDNAの染色を行い、UVトランスイルミネーター上で観察した。サイズマーカーには、100 bp DNA Ladder one (ナカライテスク) を用いた。

5. サンドイッチELISA法

上記4. で得られた上清サンプル中のIL-2タンパク量をサンドイッチELISAにより測定した^{18,19)}。捕捉抗体 (Purified Rat Anti-Human IL-2, BD Biosciences; 1:250) を96ウェルプレートに吸着させた。0.5% ウシ血清アルブミン (BSA) および0.5% Tweenを含むリン酸緩衝液 (PBS-T) でブロッキング反応を行った後、希釈した上清およびヒトIL-2標準品 (100 μ L) をプレートに加えて、1時間、室温で反応させた。PBS-Tで3回洗浄したのち、検出抗体 (ビオチン化Mouse Anti-Human IL-2, BD Biosciences; 1:500) を加え、37°Cで1時間反応させた。Streptavidin Horseradishペルオキシダーゼ (Life technologies; 1:5000) を用いてSUNRISE basic (テカン社製) で測定した。

6. 統計解析

データは、平均値 \pm 標準誤差で示した。統計解析はSigmaPlot (Version 12, Systat Software) を用いて行った。各群間の有意差検定については、2群間の場合に対応のないStudent's t-検定、3群以上の場合には一元配置分散分析 (ANOVA) および事後解析としてのDunnett's modified t-検定あるいはTukey's modified t-検定、あるいは二元配置ANOVAおよび事後解析としてのTukey's modified t-検定により行った。危険率 (P) が5%未満の場合、有意差ありと判定した。

結 果

IJ-337の免疫活性に及ぼす影響

最初に、c-fos 遺伝子発現の変化を免疫活性の変化の指

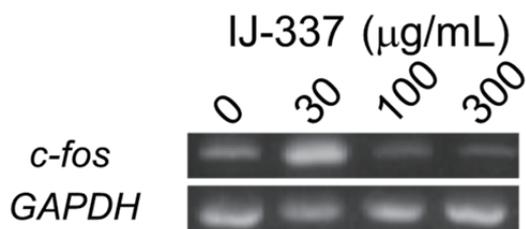


図2 MOLT-3細胞におけるIJ-337のc-fos 遺伝子発現に及ぼす影響。MOLT-3細胞 (1ウェル当たり 5.0×10^5 個) をIJ-337 (30、100および300 μ g/mL) の存在下48時間培養した。半定量的PCR法によりc-fos およびGAPDH 遺伝子の発現を測定した。

標として、IJ-337のMOLT-3細胞における免疫活性に及ぼす作用について調べた。

IJ-337 (30、100、300 μ g/mL) は、c-fos 遺伝子の発現に二相性の変化を引き起こした。IJ-337は、30 μ g/mLではc-fos 遺伝子の発現を増大させ、100および300 μ g/mLではc-fos 遺伝子の発現を減少させた (図2)。

IJ-337の活性化T細胞に及ぼす影響

IJ-337 (100 μ g/mL) が、T細胞の活性化を抑制したので、活性化T細胞に対する活性抑制作用について検討した。

PHAは、T細胞受容体 (TCR) と結合してT細胞を活性化させ、核内転写調節因子c-fos遺伝子の発現やIL-2の産生を増大させる²⁰⁾。さらに、ChAT遺伝子の発現増大、ACh産生および放出を促進させるなど、Tリンパ球コリン作動系を活性化する¹⁻⁵⁾。

PHA (10 μ g/mL) はc-fos遺伝子の発現を増大させたが、IJ-337 (100 μ g/mL) はPHAによるc-fos遺伝子発現の増大作用を抑制した (図3)。

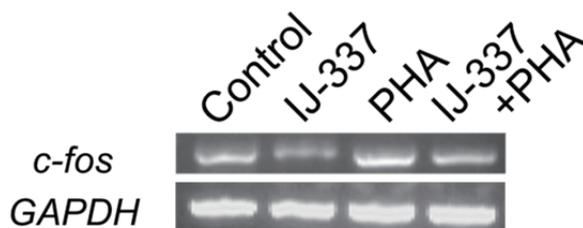


図3 MOLT-3細胞におけるIJ-337およびPHAのc-fos 遺伝子の発現に及ぼす影響。MOLT-3 (1ウェル当たり 5.0×10^6 個) にIJ-337 (100 μ g/mL)、PHA (10 μ g/mL)、あるいはIJ-337およびPHAの存在下に24時間培養した。半定量的PCR法によりc-fosおよびGAPDH 遺伝子の発現を測定した。

IL-2タンパク質発現に及ぼす影響

Tリンパ球において、c-fosはAP-1を形成しIL-2の遺伝子プロモーターに結合してIL-2の転写を促進させ、IL-2タンパク質産生を増大させる。IJ-337 (100 µg/mL) がc-fos発現を抑制することが明らかになったので、IL-2産生に対するIJ-337の作用を調べた。

IJ-337 (30, 100, 300 µg/mL) は、統計学的に有意ではなかったが、IL-2の産生を減少させた (図4)。これらの結果から、IJ-337は、T細胞の免疫抑制作用がある可能性が示唆された。PHA (10 µg/mL) は、IL-2の産生を増大させた。IJ-337 (100 µg/mL) は、PHAによる活性化時のIL-2の産生をわずかに抑制したが統計学的に有意でなかった (図4)。

この結果から、IJ-337は、活性化T細胞に対しても免疫抑制作用があることが示唆された。

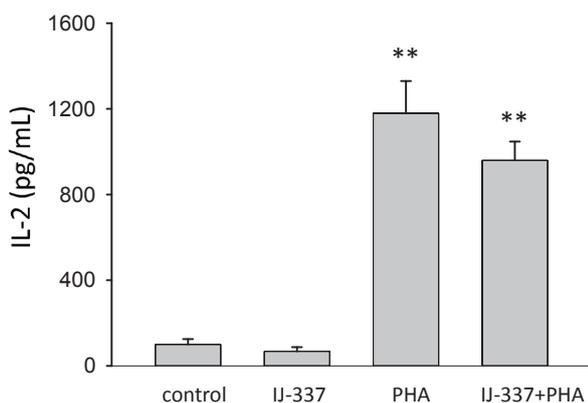


図4 MOLT-3細胞におけるIJ-337およびPHAのIL-2産生に及ぼす影響。MOLT-3細胞 (1ウェル当たり 5.0×10^6 個) をIJ-337 (100 µg/mL) およびPHA (10 µg/mL) の存在下に24時間培養した。培養上清中のIL-2蛋白量をサンドイッチELISA法により測定した。データは平均値±標準誤差で示した (例数は3)。** $P < 0.01$ 対照群との比較。二元配置 ANOVAおよび事後解析としてのTukey's modified t-検定。

IJ-337の細胞増殖に及ぼす影響

IJ-337 (100 µg/mL) は、c-fos発現を減少させるが、T細胞の増殖に及ぼす作用を、PHAによる活性化時と非活性化時において検討した。

非活性化時において、IJ-337 (30, 100 および 300 µg/mL) は用量依存的にMOLT-3細胞の増殖を抑制し、その抑制作用は最大で約10%の抑制作用を示した (図5)。なお、死細胞数には影響を及ぼさなかった (データは示していない)。これらの結果から、IJ-337は、非活性化時においてT細胞の増殖を抑制することが分かった。

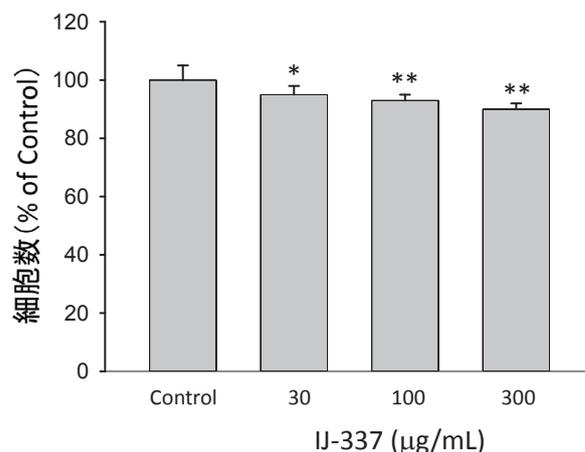


図5 MOLT-3細胞におけるIJ-337の細胞増殖への影響。MOLT-3細胞 (1ウェル当たり 5.0×10^5 個) をIJ-337の存在下48時間培養し、生存細胞数をトリパンブルー色素排除法により測定した。データは平均値±標準誤差で示した (例数は6)。* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 対照群との比較。一元配置ANOVA および事後解析としてのDunnett's modified t-検定。

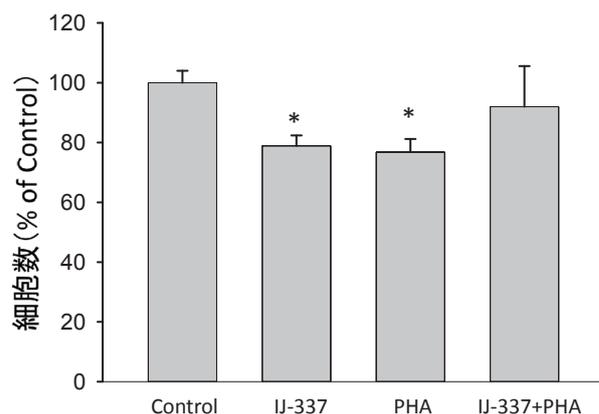


図6 MOLT-3細胞におけるIJ-337およびPHAの細胞増殖に及ぼす影響。MOLT-3細胞 (1ウェル当たり 5.0×10^6 個) をIJ-337 (100 µg/mL) およびPHA (10 µg/mL) の存在下に48時間培養し、トリパンブルー色素排除法により測定した。データは平均値±標準誤差で示した (例数は6)。* $P < 0.05$ 対照群との比較。二元配置 ANOVAおよび事後解析としてのTukey's modified t-検定。

PHA (10 µg/mL) は、MOLT-3細胞の増殖を抑制した。IJ-337 (100 µg/mL) はPHAによる増殖抑制作用を減弱させた (図6)。これらの結果から、IJ-337は、PHAの細胞活性化を抑制する可能性が示唆された。

IJ-337のTリンパ球コリン作動系活性に及ぼす影響

IJ-337は、免疫抑制作用をもつ可能性が示唆されたので、IJ-337のTリンパ球コリン作動系活性に及ぼす影響を検討した。コリン作動系活性の指標として、ChAT、M₁、M₃

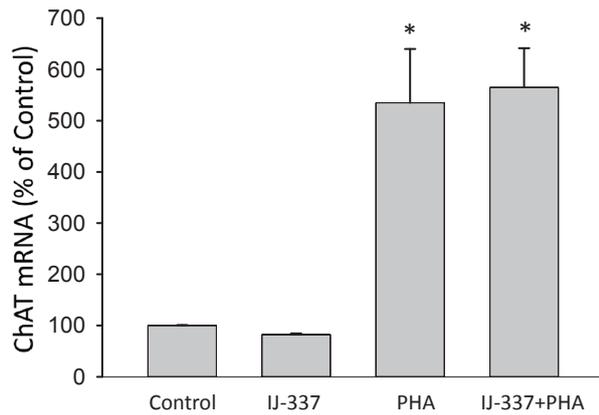


図7 MOLT-3細胞におけるIJ-337およびPHAのChAT遺伝子発現に及ぼす影響。MOLT-3細胞(1ウェル当たり 5.0×10^6 個)をIJ-337(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)およびPHA(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)の存在下に24時間培養した。ChAT遺伝子の発現量をReal-time PCR法により測定した。ChAT遺伝子の発現量は、GAPDH遺伝子の発現量で補正した。データは平均値 \pm 標準誤差で示した(例数は3)。** $P < 0.01$ 対照群との比較。二元配置ANOVAおよび事後解析としてのTukey's modified t-検定

および M_5 mAChR、および $\alpha 7$ nAChR遺伝子発現の変化を調べた。

IJ-337(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)は、非活性化および活性化時のいずれのT細胞においてもChATの発現に影響を及ぼさなかった(図7)。これらの結果から、IJ-337は、Tリンパ球のACh産生に影響を及ぼさないことが明らかになった。

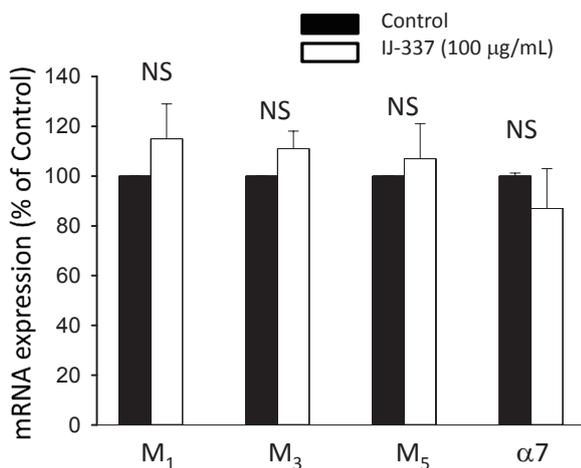


図8 MOLT-3細胞におけるIJ-337の M_1 、 M_3 および M_5 mAChR、および $\alpha 7$ nAChR遺伝子発現に及ぼす影響。MOLT-3細胞(1ウェル当たり 5.0×10^6 個)をIJ-337(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)およびPHA(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)の存在下に24時間培養した。 M_1 、 M_3 および M_5 mAChR、および $\alpha 7$ nAChR遺伝子発現量をReal-time PCR法により測定した。各遺伝子の発現量は、GAPDH遺伝子の発現量で補正した。データは平均値 \pm 標準誤差で示した(例数は3)。各群の間に有意差はなかった。Student's t-検定。

IJ-337(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)は、 M_1 、 M_3 および M_5 mAChR、および $\alpha 7$ nAChR遺伝子発現に影響を及ぼさなかった(図8)。すなわち、IJ-337(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)は、AChRの発現にも影響を及ぼさないことが明らかになった。

以上の結果より、IJ-337(>100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)はTリンパ球コリン作動系活性には影響を及ぼさないことが明らかになった。

考 察

本ナマコ抽出物IJ-337は構造決定されていないために、作用の本体がどのような物質であるかは現在のところ不明である。種々のナマコ由来の抽出成分には、サポニン的一种ホロツリンをはじめとして、スフィンゴ糖脂質など多数報告されている^{13,14})。したがって、抽出過程(図1)から考えて、IJ-337はサポニン系化合物以外の物質である可能性が考えられる。

c-fosは、細胞への刺激に反応して速やかに発現が誘導される最初期遺伝子である。T細胞では、TCRが抗原提示細胞の主要組織適合抗原MHCクラスII受容体から抗原提示を受けると、ホスホリパーゼC(PLC)が活性化され、小胞体からの Ca^{2+} の放出やプロテインキナーゼC(PKC)の活性化が起こる。さらに、PKCは分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)系を介し、AP-1経路を活性化させることでc-fosの転写を開始させる²⁰)。これらのことから、c-fos遺伝子の発現の変化を免疫活性の変化の指標として用いた。本研究により、IJ337はc-fos遺伝子およびIL-2タンパク質発現を抑制することが明らかになった。したがって、IJ337にはTリンパ球機能に対する抑制作用がある可能性が示唆された。

T細胞活性化薬PHAは、TCRに作用し、上記メカニズムを介してリンパ球の芽球化や分裂促進などのマイトジェン作用を示す。IJ-337は、PHAのc-fos発現増大作用を抑制した。したがって、IJ-337がc-fos発現を減少させるメカニズムとして、AP-1活性化経路を抑制していることが推測される。しかしながら、IJ-337がAP-1経路以外を抑制することによって、c-fosの発現を調節している可能性もある。IJ-337のc-fos発現阻害のメカニズムの解明は、今後の研究の課題としたい。

IJ-337によるIL-2産生の減少は、c-fosの発現減少と一致することからT細胞機能の抑制に起因するものと考えられる。IL-2産生を減少させる機構としては、c-fosの発現減少が関与している可能性が考えられる。さらに、IJ-337

が、細胞増殖抑制をもたらすメカニズムについても、c-fosの関与が推測される。AP-1は、細胞分裂にも関与しているので、c-fos発現を減少させることによって細胞分裂が抑制されたことが推測される。

PHAは、Tリンパ球におけるChAT遺伝子発現の増大、ACh産生および放出を促進する²¹⁾。これらのPHAの作用はMAPK阻害薬PD98059で拮抗され、少なくとも一部はPKCおよびMAPKを介するAP-1活性化経路が関与していることが知られている。さらに、PHAは種々のmAChRサブタイプあるいはnAChRサブユニットの遺伝子発現を変化させる。IJ-337は、ChAT、M₁、M₃およびM₅ mAChRサブタイプ、 $\alpha 7$ nAChRサブユニットの遺伝子発現に影響を及ぼさなかった。すなわち、IJ-337はコリン作動系が免疫活性を調節するメカニズムには関与しない可能性が示唆された。

本研究結果より、IJ-337には、T細胞に対する免疫抑制作用があることが明らかになった。IJ-337は、天然物由来の新たな免疫調節薬となる可能性が考えられる。

謝 辞

ヒト白血病細胞株を御供与頂きました林原生物化学研究所・藤崎細胞センター 藁和田潤前所長、折田薫三所長、松尾良信先生に心より深謝申し上げます。

IJ-337については著者の一人であるフォンが特許権を有する物質であり、研究対象として提供を受けて本研究は実施された。しかしながら、フォンを除く他の著者らは、あるいは同志社女子大学における本研究の遂行には、イメックスジャパンより研究資金やその他の何ら利益の提供を受けておらず利益相反はない。

参考文献

- 1) Kawashima K, Fujii T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Ther* (2000) 86: 29-48.
- 2) Kawashima K, Fujii T. The lymphocytic cholinergic system and its biological function. *Life Sci* (2003) 72: 2101-2110.
- 3) Kawashima K, Fujii T. Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. *Front Biosci* (2004) 9:2063-2085.
- 4) 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* (2017) 134:1-21.
- 5) 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* (in press)
- 6) Fujii T, Kawashima K. Calcium oscillation is induced by muscarinic acetylcholine receptor stimulation in human leukemic T- and B-cell lines. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* (2000) 362:14-21.
- 7) Fujii T, Kawashima K. Calcium signaling and c-fos gene expression via M3 muscarinic acetylcholine receptors in human T- and B-cells. *Japan J Pharmacol* (2000) 84:124-132.
- 8) Kamimura Y, Fujii T, Kojima H, Nagano T, Kawashima K. Nitric oxide (NO) synthase mRNA expression and NO production via muscarinic acetylcholine receptor-mediated pathways in the CEM, human leukemic T-cell line. *Life Sci* (2003) 72: 2151-2154.
- 9) Kaneda T, Kitamura Y, Nomura Y. Presence of m3 subtype muscarinic acetylcholine receptors and receptor-mediated increases in the cytoplasmic concentration of Ca²⁺ in Jurkat, a human leukemic helper T lymphocyte line. *Mol Pharmacol* (1993) 43:356-364.
- 10) Kimura R, Ushiyama N, Fujii T, Kawashima K. Nicotine-induced Ca²⁺ signaling and down-regulation of nicotinic acetylcholine receptor subunit expression in the CEM human leukemic T-cell line. *Life Sci* (2003) 72:2155-2159.
- 11) 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* (2007) 188:80-85.
- 12) Fujii YX, Fujigaya H, Moriwaki Y, Misawa H, Kasahara T, Grand SA, Kawashima K. Enhanced serum antigen-specific IgG1 and proinflammatory cytokine production in nicotinic acetylcholine receptor

- alpha7 subunit gene knockout mice. *J Neuroimmunol* (2007) 189:69-74.
- 13) Suzuki N, Kitazato K, Takamatsu J, Saito H. Antithrombotic and anticoagulant activity of depolymerized fragment of the glycosaminoglycan extracted from *Stichopus japonicus* Selenka. *Thromb Haemost* (1991) 65:369-373.
- 14) 若生 豊、黒澤 夏美、佐藤 慎也. *Stichopus japonicus* (ナマコ) 抽出物中の細胞増殖抑制活性成分。八戸工業大学異分野融合科学研究所紀要 (2009) 7:9-15
- 15) Foong F. W., 海洋生物由来の新規治療薬. 特許第5107043号. 2012-12-26.
- 16) Tamura Y, Monden M, Matsuura F, Foong FW, Ohta M, Arimoto S, Sugita A, Shiomi H. Beneficial actions of a sea cucumber extract (IJ-337) on diabetes derived hypoalgesia and neuropathic pain induced by chronic constriction injury. *J Pharmacol Sci* (2010) 112 (Suppl I):192P.
- 17) Fujii T, Takada-Takatori Y, Kawashima K: Mediatophore regulates acetylcholine release from T cells. *J Neuroimmunol* (2012) 244:16-22.
- 18) 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* (2016) 161: 45-50.
- 19) Mashimo M, Iwasaki Y, Inoue S, Saito S, Kawashima K, Fujii T. Acetylcholine released from T cells regulates intracellular Ca^{2+} , IL-2 secretion and T cell proliferation through nicotinic acetylcholine receptor. *Life Sci* (2017) 172:13-18.
- 20) Fujii T, Yamada S, Watanabe Y, Misawa H, Tajima S, Fujimoto K, Kasahara T, Kawashima K. 1998. Induction of choline acetyltransferase mRNA in human mononuclear leukocytes stimulated by phytohemagglutinin, a T-cell activator. *J Neuroimmunol* (1998) 82:101-107.
- 21) Fujii T, Watanabe Y, Inoue T, Kawashima K. Up-regulation of mRNA encoding the M5 muscarinic acetylcholine receptor in human T- and B-lymphocytes during immunological responses. *Neurochem Res* (2003) 28:423-429.