

論 文

T細胞活性化によるアセチルコリン受容体の発現抑制機構の検討

¹間下雅士、²坂口美咲、³田中菜穂子
⁴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・6年次生³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⁴同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・薬理学研究室・教授Activation of T cell reduces acetylcholine receptors
on immune cells.¹Masato Mashimo, ²Misaki Sakaguchi, ³Nahoko Tanaka
⁴Takeshi Fujii¹Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College of Liberal Arts,
Special Appointment Assistant Professor²Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College of Liberal Arts,
Undergraduate of 6th grader³Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College of Liberal Arts,
Graduate of 2015⁴Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College of Liberal Arts,
ProfessorKeywords: Acetylcholine, intracellular Ca²⁺ concentration, Muscarinic receptor, Nicotinic receptor, T cell

要旨

T細胞にはムスカリン性およびニコチン性アセチルコリン受容体 (mAChRおよびnAChR) が発現している。T細胞のAChRは、細胞傷害性の増強、細胞分裂の促進、細胞内cGMP濃度の上昇などの生理的役割を担っている。本研究では、T細胞の活性化がAChRの遺伝子発現に及ぼす影響および発現調節メカニズムを検討した。マウス脾臓細胞あるいは脾臓細胞から単離したCD4陽性T細胞において、2日間の抗CD3/CD28抗体刺激は、*M₁M₅ mAChR* mRNAおよび α_4 、 α_7 、 β_2 *nAChR* mRNAの発現を減少させた。この減少作用には、nuclear factor- κ Bが関与していることが明らかとなった。さらに、2日間の抗CD3/CD28抗体刺激は、mAChRあるいはnAChRの活性化による細胞内Ca²⁺濃度上昇を抑制した。以上の結果より、T細胞の活性化は受容体発現を減少させることによりAChに対する反応性を低下させることが明らかとなった。すなわち、T細胞の活性化は、mAChRおよびnAChRを介した細胞障害性の増強や細胞分裂促進などの生理作用を低下させる可能性が示唆された。

Abstract

Muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors (mAChR and nAChR) are expressed in immune cells including T cells. AChR of T cells plays physiological roles such as the enhancement of cytotoxicity, the promotion of cell division, the elevation of intracellular cGMP concentration. In this study, the effect of T cell activation on the expression of AChR and the mechanism of its expression were examined. In CD4-

positive T cells or CD4-negative cells isolated from mouse spleen cells, anti-CD3/CD28 antibody stimulation for 2 days reduced the expression of M_1 - M_5 mAChR mRNAs and $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\beta 2$ nAChR mRNAs. It was revealed that nuclear factor- κ B is involved in this decreasing action. Furthermore, stimulation of intracellular Ca^{2+} concentration by activation of mAChR or nAChR was suppressed by stimulation with anti-CD3/CD28 antibody for 2 days. From the above results, it was revealed that activation of T cells reduces the reactivity to ACh by decreasing AChR expression. That is, it was suggested that differentiation of T cells may decrease physiological effects such as enhancement of cytotoxicity and promotion of cell division via mAChR and nAChR.

背景・目的

アセチルコリン (ACh) は、中枢および末梢のコリン作動性神経における重要な神経伝達物質として知られている。しかしながら、AChは、様々な非神経性組織・器官においても産生されており、種々の生理機能の調節に関与していることが明らかになっている^{1,3)}。さらに、非神経系細胞であるT細胞においても、AChの生合成に関わるコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) や高親和性コリントランスポーターが発現しており、AChを恒常的に産生および放出している。加えて、ムスカリン性およびニコチン性ACh受容体 (mAChRおよびnAChR) も発現しており、これらの受容体は、T細胞の細胞増殖や腫瘍壊死因子 (TNF- α) およびインターフェロン- γ (IFN- γ) の産生など、免疫応答に関与している⁴⁻⁶⁾。

mAChRには M_1 - M_5 mAChRの5種類のサブタイプが存在する⁷⁾。T細胞にはすべてのmAChRサブタイプが発現している⁴⁻⁶⁾。各mAChRサブタイプはGタンパク共役型受容体である。 M_1 、 M_3 および M_5 サブタイプは $G_{q/11}$ タンパク質に共役しておりホスホリパーゼC (PLC) を介してイノシトール三リン酸 (IP_3) とジアシルグリセロール (DG) を産生する⁸⁾。 IP_3 は細胞内貯蔵から Ca^{2+} を遊離させ、他方DGはプロテインキナーゼC (PKC) を活性化する。 M_2 および M_4 サブタイプは $G_{i/o}$ タンパク質に共役しておりアデニル酸シクラーゼ (AC) を介したcAMP産生を抑制し、プロテインキナーゼAによるタンパク質のリン酸化を抑制する⁹⁾。

nAChRサブユニットには、骨格筋型の受容体を構成する $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 γ (生体では ϵ) δ 、神経型の受容体を構成する $\alpha 2$ - $\alpha 10$ (ただし、ヒトの場合 $\alpha 8$ は存在しない) および $\beta 2$ - $\beta 4$ サブユニットが存在する。T細胞には $\alpha 2$ - $\alpha 7$ および $\alpha 10$ サブユニットと $\beta 2$ - $\beta 4$ サブユニットが発現している¹⁰⁾。これらのサブユニットが、ヘテロもしくはホモ五量体によりカチオンチャンネルを形成する。nAChR

の活性化は、膜透過性の Na^+ 、 K^+ および Ca^{2+} の急速な増大を引き起こす¹¹⁾。

ACh作用薬によるmAChR刺激は、主に M_3 および M_5 mAChRを介して、TおよびB細胞において細胞内 Ca^{2+} シグナル ($[Ca^{2+}]_i$) 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^{12,13)}。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^{14,15)}。TおよびB細胞において、nAChR刺激は、少なくとも一部は $\alpha 7$ nAChRサブユニットを介して一過性の細胞内 Ca^{2+} シグナルを起こす¹⁶⁾。さらに、ノックアウトマウスを用いた研究から、 M_1 / M_5 mAChRおよび $\alpha 7$ 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^{17,18)}。しかしながら、T細胞の活性化がAChRの発現に及ぼす影響は未だ十分には明らかとなっていない。

我々は、以前にT細胞あるいはB細胞の活性化直後には、mAChRの遺伝子発現が増大していることを報告している¹⁹⁾。しかしながら、長時間の活性化に関する検討はなされてこなかった。本研究では、T細胞を多く含むマウス脾臓細胞 (T細胞: 約20%、B細胞: 約60%、マクロファージ: 約5%) あるいはCD4陽性T細胞を用い、T細胞活性化がmAChRおよびnAChRの発現に与える影響とその細胞内メカニズムを検討した。

方法

1. 試薬

カルシウム蛍光指示薬Fura-2 AMは同仁化学研究所、Sepasol RNA II Superはナカライテスク、Prime Script RT reagent Kit、SYBR Premix Ex Taq IIおよびRT-PCR用プライマーはタカラバイオ、Anti-Biotin MicroBeadsおよびCD4⁺ T Cell Biotin Antibody Cocktail mouseはMiltenyi Biotec社よりそれぞれ購入した。

2. 脾臓細胞の調製と培養

マウスから脾臓を摘出後、常法に従って、脾臓細胞を調製した¹⁶⁾。その後、脾臓細胞を液に懸濁し、Red blood cell lysing buffer (Sigma-Aldrich) により赤血球を除去した。脾臓細胞 (1 ウェル当たり 1×10^7 個) は、10% 牛胎子血清 (FBS)、100 units/mL ペニシリン、100 $\mu\text{g/mL}$ ストレプトマイシンおよび 100 μM 2-メルカプトエタノールを含む RPMI1640 培地 (日水製薬) を用いて、6-well プレートに播種して培養した。さらに、抗CD3抗体 (0.1 $\mu\text{g/mL}$) および抗CD28抗体 (1 $\mu\text{g/mL}$) を添加し、37°C、5% CO_2 の条件下で2日間培養した。なお、T細胞受容体を介するT細胞の活性化機構の時間経過を考慮して、培養時間を2日間と設定した。CD4陽性T細胞の分取は、上記の方法により調製した脾臓細胞より、Anti-Biotin MicroBeads および CD4⁺ T Cell Biotin Antibody Cocktail mouse (Miltenyi Biotec) を加え、LSカラムを用いて、試薬に添付のマニュアルに従って分離した。調製したCD4陽性T細胞は、脾臓細胞の場合と同様の方法で培養した。なお、生存細胞数の測定は、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。

3. リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (real-time PCR) 法^{13,16)}

脾臓細胞あるいはCD4陽性T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、抗CD3抗体 (0.1 $\mu\text{g/mL}$) および抗CD28抗体 (1 $\mu\text{g/mL}$) の存在下、7% FBS、100 units/mL ペニシリンおよび 100 $\mu\text{g/mL}$ 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2日間培養した。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で抽出した。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、下記の各遺伝子に特異的なプライマーを用いて Thermal Cycler Dice Real Time System を用いて行った。用いたプライマーは次の通りである。M₁ m A C h R (M A 1 4 8 3 8 2) : 5'-AGGGATGCGGCAAACCTGGTA-3' および 5'-AGGTACAGGGTAAGACCTGGGTGA-3'、M₂ m A C h R (M A 1 5 0 5 4 2) :

5'-TTAAAGTCAACCGCCACCTTCAG-3' および 5'-CCAAAGGCCAGTAGCCAATCA-3'、M₃ m A C h R (M A 1 3 2 0 1 1) : 5'-TGCTGAGCAGATGGACCAAGA-3' および 5'-CGGCAGCTTGAGTACAATGGAA-3'、M₄ m A C h R (M A 1 5 8 1 7 3) : 5'-CGTAACCAGGTGCGCAAGAA-3' および 5'-ATGACATTGTAGGGTGTCCAGGTG-3'、M₅ m A C h R (M A 1 5 5 2 7 5) : 5'-ATTGGCAAGGCAACAGCAAG-3' および 5'-AGGGACTCAGAATGGCAGATGAC-3'、 $\alpha 4$ n A C h R (M A 1 0 7 5 1 5) : 5'-TACGTGGCTCCAACCACAAGAA-3' および 5'-CTGTCAGGAGCATCCCAGCA-3'、 $\beta 2$ n A C h R s u b u n i t (M A 0 6 9 7 9 8) : 5'-TGCGAAGTGAAGATGATGACCAG-3' および 5'-ACATGCCAATGGTCCCAAAGA-3'、 $\alpha 7$ n A C h R s u b u n i t (M A 1 5 3 0 0 4) : 5'-ACTATGGCCTCAACCTGCTCATTC-3' および 5'-CTGGCATGATCTCAGCCACAA-3'、GAPDH (M A 0 5 0 3 7 1) : 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3' および 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'。

4. 細胞内Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) 測定^{12,13)}

マウス脾臓細胞 (1×10^7 cells/well) を上記条件下で2日間培養した後、0.5 mg/mL poly-d-lysineでコーティングしたガラスボトムディッシュ (Greiner bio one) に播種し1時間、37°C、5% CO_2 の条件下で培養した。10 mM HEPESを含むTyrode緩衝液で置換した後、0.5% bovine serum albuminを含む5 μM Fura-2 AM (室温、30分) を取り込ませた。細胞内のFura-2を、TILL Monochromator Polychrome IV (TILL Photonics) を用いて、340 nm および 380 nm 照明を用いて励起し、放出された510 nmの蛍光を、InCyt Im2TM (Intracellular imaging inc) で取得し、Image J (NIH) を用いて解析した。

5. 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 13, Systat Software) を用いて行った。各群間の有意差検定については、2群間の場合は対応のない 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 Tukey's modified t-検定を行った。なお、危険率 (P) が 5% 未満の場合、有意差ありと判定した。

結果

マウス脾臓細胞において、2日間の抗CD3/CD28抗体刺激は、*mAChR*および*nAChR* mRNAの発現を減少させる。

T細胞を多く含むマウスの脾臓細胞において、T細胞の活性化が*mAChR*および*nAChR*の発現に及ぼす影響を検討した。*nAChR*サブユニットについては、これまでの研究によりT細胞において重要な働きを果たしている可能性があるサブユニット⁴⁶⁾について解析した。T細胞受容体(TCR)およびCD28分子を介してT細胞を活性化させる抗CD3抗体および抗CD28抗体を用いてマウスの全脾臓細胞を刺激し、2日後に*M1-M5 mAChR*および $\alpha 4$ 、 $\alpha 7$ 、 $\beta 2$ *nAChR* mRNAの発現量をリアルタイムPCR法で測定した。調べたすべての*AChR* mRNAの発現量が有意に減少した(図1)。なお、これ以降の実験では*mAChR*については、すべてのサブタイプで同様の反応が起こると考え、*M1 mAChR*サブタイプに関してのみ解析した。

マウスCD4陽性T細胞において、2日間の抗CD3/CD28抗体刺激は、*M1 mAChR* mRNAおよび $\alpha 4$ 、 $\alpha 7$ 、 $\beta 2$ *nAChR* mRNAの発現を減少させる。

T細胞活性化による*mAChR*および*nAChR* mRNAの減少がT細胞自体に存在するAChR、あるいはB細胞やマクロファージなどの脾臓細胞に存在するAChRのどちらに生じているのかを検討する目的で、脾臓細胞よりCD4陽性T

細胞のみを分取して同様に解析した。抗CD3およびCD28抗体で刺激した2日後に*M1 mAChR*および $\alpha 4$ 、 $\alpha 7$ 、 $\beta 2$ *nAChR* mRNAの発現量をリアルタイムPCR法で測定した。調べたすべての*AChR* mRNAの発現量が有意に減少した(図2)。

マウス脾臓細胞において、抗CD3/CD28抗体刺激による*mAChR*および*nAChR* mRNAの減少作用はNF- κ Bシグナルを介している。

T細胞活性化による*AChR*遺伝子発現の減少に関与する細胞内経路を検討する目的で、nuclear factor- κ B (NF- κ B) 阻害薬BAY 11-7082、IP₃受容体遮断薬2APBおよびmitogen-activated protein kinase (MAPK) 阻害剤U0126の抗CD3抗体および抗CD28抗体による*M1 mAChR* mRNAおよび $\alpha 4$ *nAChR*発現の減少作用に及ぼす影響を検討した。

BAY 11-7082は、有意にT細胞活性化による*M1 mAChR* mRNA発現の減少作用を抑制した(図3A)。さらに、BAY 11-7082はT細胞活性化による $\alpha 4$ *nAChR* mRNA発現の減少作用を抑制した(図3B)。

2APBおよびU0126は、T細胞活性化による*M1 mAChR* mRNAの減少には影響を及ぼさなかった(図3A)。

マウス脾臓細胞において、2日間の抗CD3/CD28抗体刺激

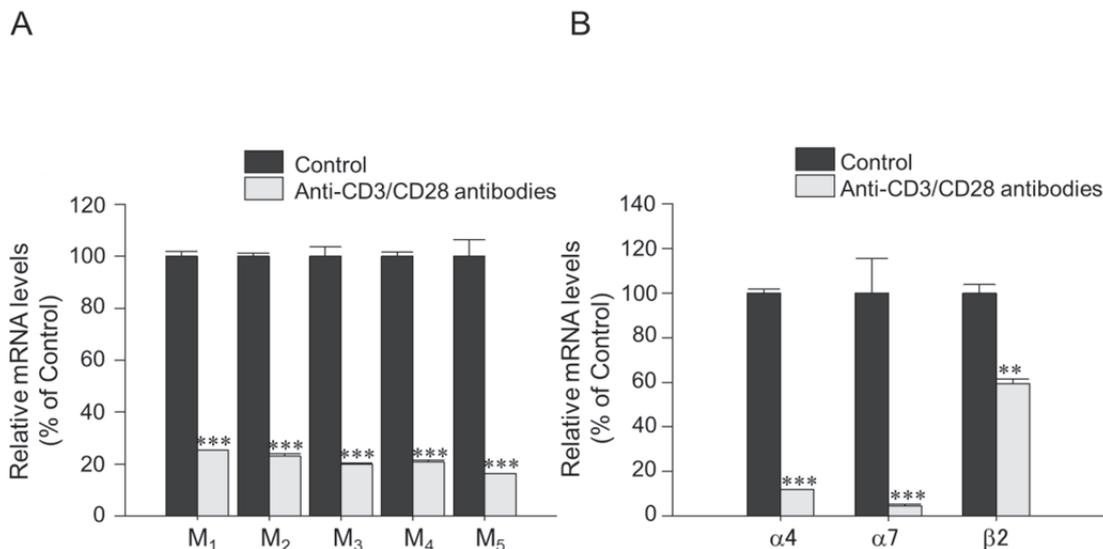


図1 2日間の抗CD3抗体および抗CD28抗体刺激は、マウス脾臓細胞において*mAChR*および*nAChR* mRNAの発現を減少させる

A. 抗CD3抗体 (0.1 μ g/mL) および抗CD28抗体 (1 μ g/mL) を投与し、2日後の*M1-M5 mAChR* mRNAの発現量をreal-time PCR法で測定した。データはMean \pm S.E.M (n = 3) で示した。*** P < 0.001 vs. 各Control群 (Student's t-test)。B. Aと同様にして、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 7$ 、 $\beta 2$ *nAChR* mRNAの発現量を測定した。データはMean \pm S.E.M (n = 3) で示した。*** P < 0.001、** P < 0.01 vs. 各Control群 (Student's t-test)。

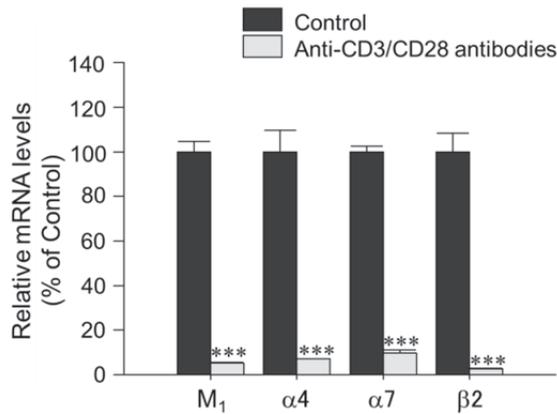


図2 マウスCD4陽性T細胞において、2日間の抗CD3抗体および抗CD28抗体刺激はM₁, mAChR mRNAおよびα4, α7, β2 nAChR mRNAの発現を減少させる

CD4陽性T細胞の分離を行った後、抗CD3抗体 (5 μg/mL) および抗CD28抗体 (1 μg/mL) を投与し、2日後のM₁ mAChRおよびα4, α7, β2 nAChR mRNAの発現量をreal-time PCR法で測定した。データはMean ± S.E.M (n = 3) で示した。***P < 0.001 vs. 各Control群 (Student's t-test)。

はOxo-Mあるいは4BP-TQSによる [Ca²⁺]_i上昇を抑制する。

mAChRはGタンパク共役型の受容体であり、このうちのM₁、M₃、M₅ mAChRはG_qカップリングしており、IP₃シグナリングを介して細胞内Ca²⁺ストアからのCa²⁺の遊離を引き起こす。また、nAChRはCa²⁺透過性のカチオンチャネルである。そこで、T細胞活性化によるmAChRおよびnAChR遺伝子発現の減少は、それぞれのAChRアゴニストによる [Ca²⁺]_i変化に影響を及ぼすのかを検討した。

サブタイプ非選択的mAChRアゴニストoxotremorine-M (Oxo-M, 300 μM) は、無処置の脾臓細胞において [Ca²⁺]_i上昇を引き起こした (図4)。あらかじめ抗CD3抗体および抗CD28抗体で刺激した脾臓細胞においては、control群と比較してOxo-M (300 μM) による [Ca²⁺]_i上昇が有意に抑制された (図4)。

nAChRアゴニスト4BP-TQS (10 μM) は、無処置の脾臓細胞において [Ca²⁺]_i上昇を引き起こした (図5)。あらかじめ抗CD3抗体および抗CD28抗体で刺激した脾臓細胞においては、control群と比較して4BP-TQS (10 μM) による [Ca²⁺]_i上昇が有意に抑制された (図5)。

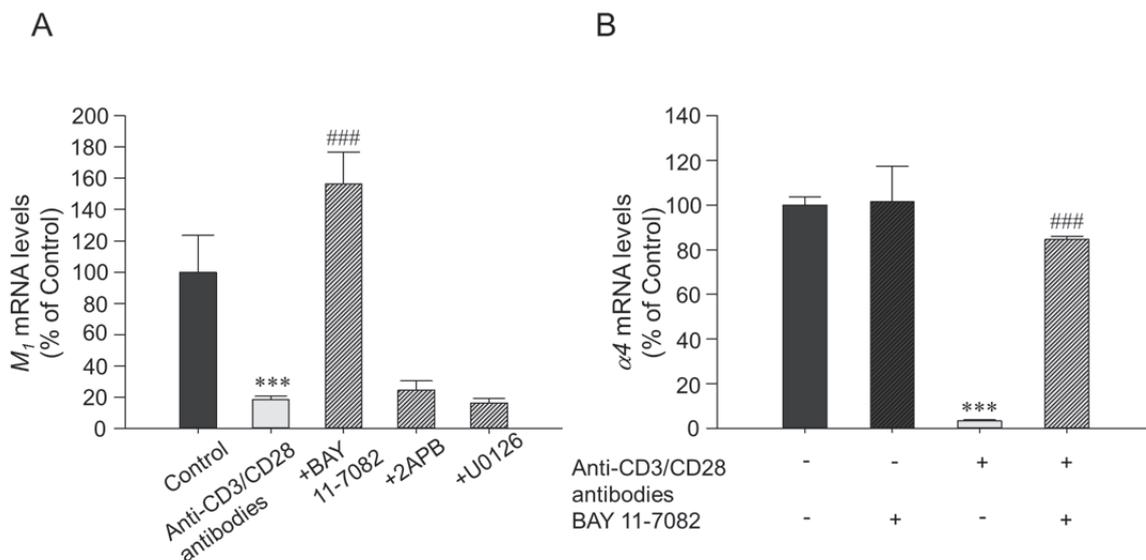


図3 2日間の抗CD3抗体および抗CD28抗体刺激におけるマウス脾臓細胞のM₁ mAChRおよびα4 nAChR mRNAの減少は、NF-κBを介する

A. BAY 11-7082 (10 μM)、2APB (10 μM) あるいはU0126 (10 μM) の存在下、抗CD3抗体 (0.1 μg/mL) および抗CD28抗体 (1 μg/mL) を投与し、2日後のM₁ mAChR mRNAの発現量をreal-time PCR法で測定した。データはMean ± S.E.M (n = 3) で示した。***P < 0.001 vs. Control群、###P < 0.001 vs. 抗CD3/CD28抗体刺激群 (one-way ANOVA with *post hoc* Tukey's modified t-test)。B. BAY 11-7082 (10 μM) の存在下、抗CD3抗体 (0.1 μg/mL) および抗CD28抗体 (1 μg/mL) を投与し、2日後のα4 nAChR mRNAの発現量をreal-time PCR法で測定した。データはMean ± S.E.M (n = 3) で示した。***P < 0.001 vs. Control群、###P < 0.001 vs. 抗CD3/CD28抗体群 (one-way ANOVA with *post hoc* Tukey's modified t-test)。

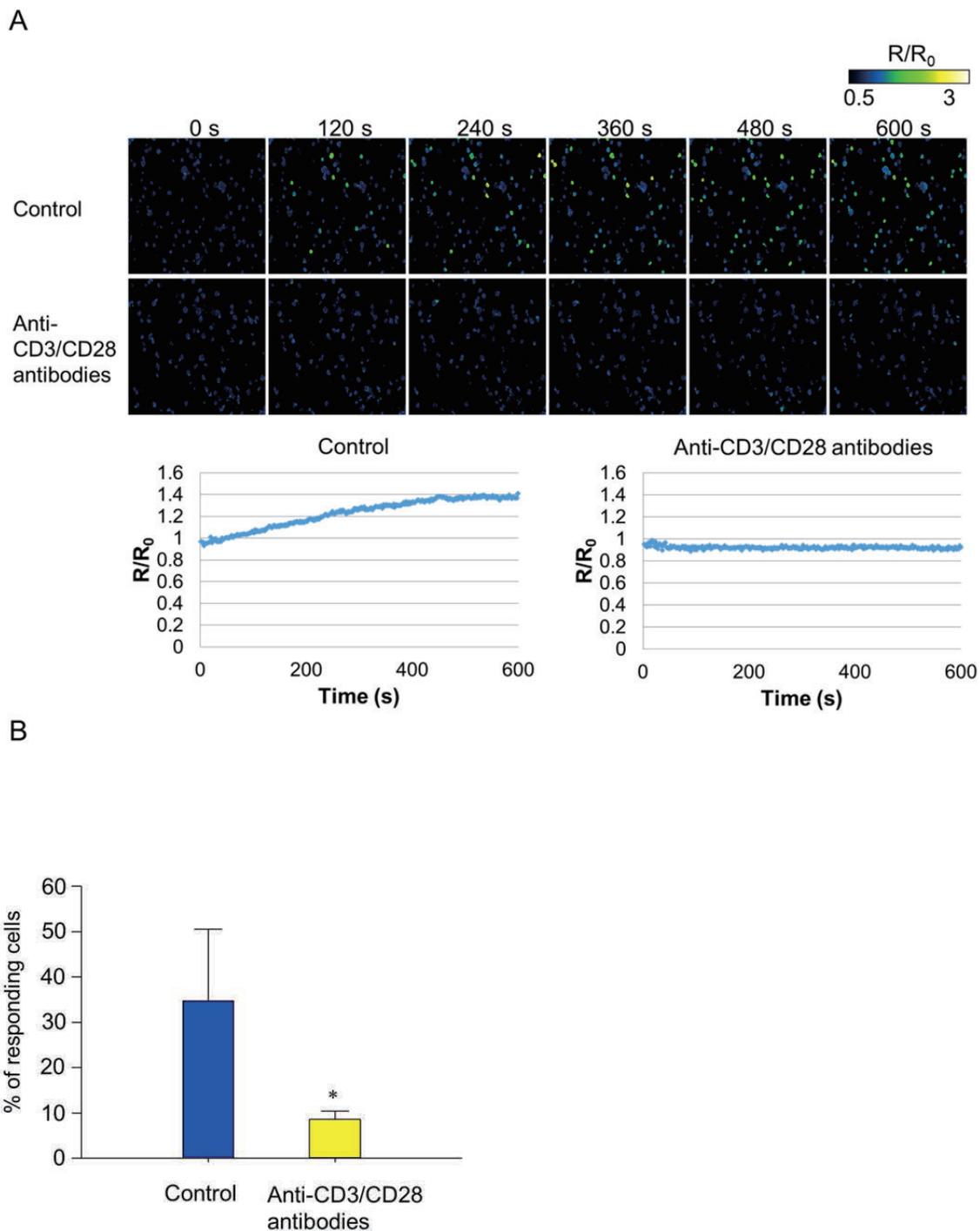


図4 マウス脾臓細胞において、2日間の抗CD3抗体および抗CD28抗体刺激はmAChRを介する $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制する
 A. 抗CD3抗体 ($0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$) および抗CD28抗体 ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) を投与し、2日後にOxo-M ($300 \mu\text{M}$) 添加時の $[Ca^{2+}]_i$ 変化を観察した。340 nmおよび380 nmの励起光によって得られる510 nmの蛍光を観察し、その比 ($R_{340/380}$) を算出した。 R/R_0 画像は、スケールで調整した擬似カラーで表す。画像は、2秒間隔、10分間で取得した。
 B. $[Ca^{2+}]_i$ レスポンスを起こした細胞の割合を示す。データはMean \pm S.E.M ($n = 3$) で示した。* $P < 0.05$ vs. Control群 (Student's t-test)。

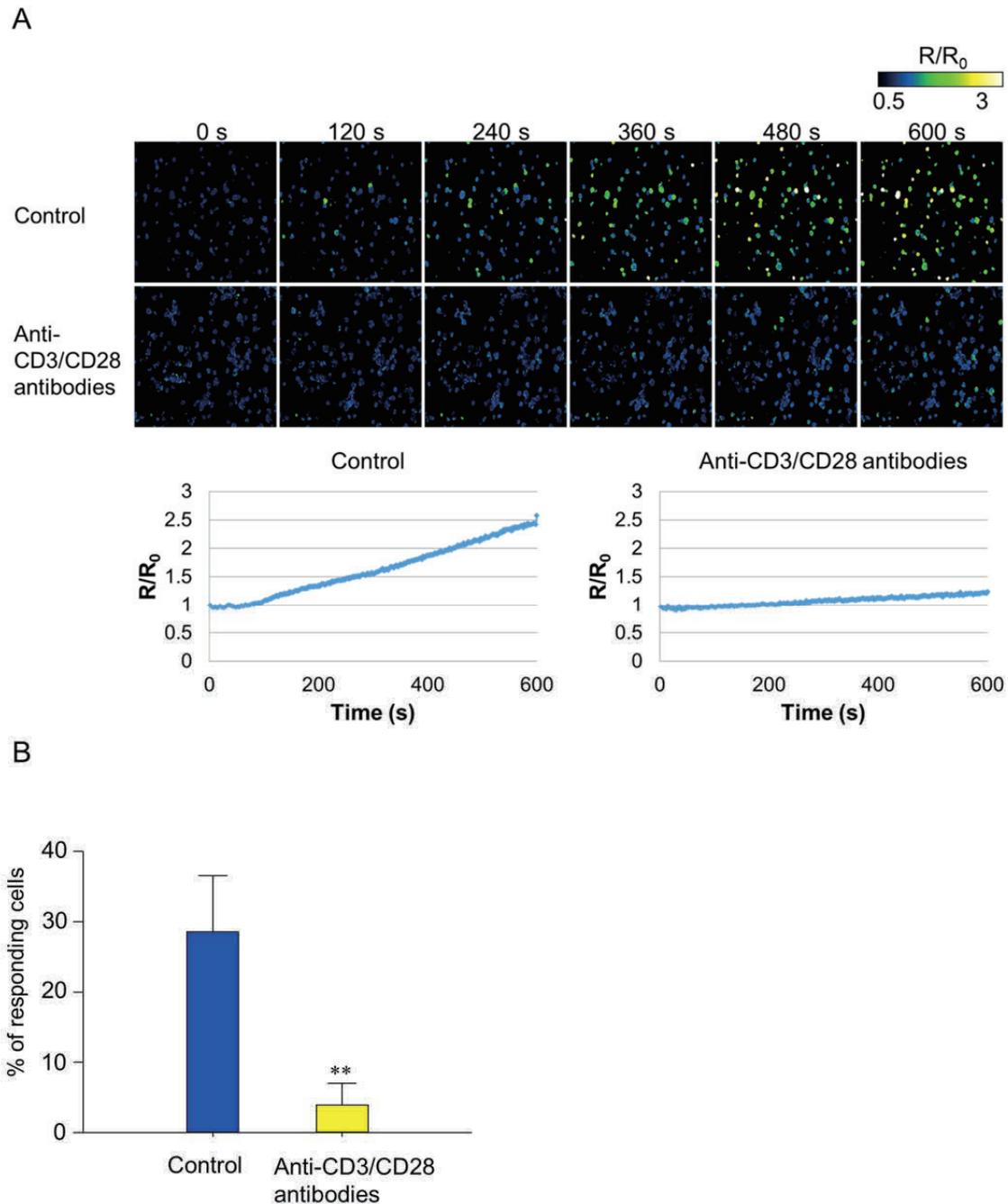


図5 マウス脾臓細胞において、2日間の抗CD3抗体および抗CD28抗体刺激はnAChRを介する $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制する

A. 抗CD3抗体 ($0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$) および抗CD28抗体 ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) を投与し、2日後に4BP-TQS ($10 \mu\text{M}$) 添加時の $[Ca^{2+}]_i$ 変化を観察した。340 nmおよび380 nmの励起光によって得られる510 nmの蛍光を観察し、その比 (R_{340}/R_{380}) を算出した。R/R0画像は、スケールで調整した擬似カラーで表す。画像は、2秒間隔、10分間で取得した。B. $[Ca^{2+}]_i$ レスポンスを起こした細胞の割合を示す。データはMean \pm S.E.M (n = 3) で示した。** $P < 0.01$ vs. Control群 (Student's t-test)。

考察

抗CD3抗体および抗CD28抗体によるT細胞活性化は、AChRのうちの調べた M_1 - M_5 *mAChR* mRNAおよび $\alpha 4$ 、 $\alpha 7$ 、 $\beta 2$ *nAChR* mRNAのすべてにおいて、遺伝子の発現を減少させた。さらに、脾臓細胞から単離されたCD4陽性T細胞においても同様の結果が得られた。これらの結果から、T細胞の活性化によりT細胞自体のAChRの遺伝子発現が低下することが明らかとなった。

T細胞の抗CD3抗体および抗CD28抗体刺激によりNF- κ B、MAPKおよびIP₃受容体を介してシグナル伝達される。NF- κ B阻害剤BAY 11-7082により*mAChR*および*nAChR* mRNA発現の減少が抑制された。これらの結果から、NF- κ BがT細胞活性化による種々のAChRの減少に関与していることが明らかとなった。IP₃およびMAPKもTCRを介するT細胞活性化に伴う*AChR* mRNA発現の低下には関与している²⁰⁾。しかしながら、本研究ではIP₃受容体遮断薬2APBおよびMAPK阻害薬U0126は、抗CD3抗体および抗CD28抗体刺激によるAChR mRNA発現の低下には影響を及ぼさなかった。したがって、抗CD3抗体および抗CD28抗体によるT細胞活性化経路では、*AChR* mRNA発現の抑制機構には、NF- κ Bが中心的な役割を果たしている可能性が示唆された。

抗CD3抗体および抗CD28抗体の存在下で二日間培養した脾臓細胞において、サブタイプ非選択的*mAChR*アゴニストOxo-Mおよび*nAChR*アゴニスト4BP-TQSによる[Ca²⁺]_i上昇は、control群と比較して有意に抑制された。今回、受容体タンパク質の発現量の検討は行っていないが、遺伝子の発現量は低下していた。したがって、これらの[Ca²⁺]_i上昇の低下は、TCRを介した活性化によりOxo-Mや4BP-TQSが作用する*mAChR*および*nAChR*数が減少したことにより、引き起こされたものと考えられる。

今回の研究では*nAChR*については、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 7$ および $\beta 2$ の3つのサブユニットしか検討していないが、他のサブユニットについても同様に発現が減少し、AChの反応性が低下するか、今後検討する必要があると考えられる。

以上の結果より、抗CD3抗体および抗CD28抗体によるT細胞活性化は、NF- κ Bを介して*mAChR*および*nAChR*の発現を減少させ、T細胞におけるAChに対する反応性を低下させることが明らかとなった。T細胞が分化することにより、*mAChR*あるいは*nAChR*を介した細胞障害性の増強や細胞分裂促進などの生理作用が低下するのではないかと考えられる。

謝辞

本研究の一部は、同志社女子大学研究奨励金（奨励No.18-27）による補助金を用いて行われた。著者らについて、何ら開示すべき利益相反はない。

参考文献

- 1) Grando SA, Kawashima K, Kirkpatrick CJ, Wessler I. Recent progress in understanding the non-neuronal cholinergic system in humans. *Life Sci* (2007) 80: 2181-2185.
- 2) Kawashima K, Fujii T. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: Overview of non-neuronal cholinergic systems and their biological significance. *J Pharmacol Sci* (2008) 106: 167-173.
- 3) Wessler I, Kirkpatrick CJ. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol* (2008) 154: 1558-1571.
- 4) Kawashima K, Fujii T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Ther* (2000) 86: 29-48.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, Brann MR. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* (1987) 237: 527-532.
- 8) Hulme EC, Birdsall NJM, Buckley NJ. Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (1990) 30: 633-673.
- 9) Felder CC. Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J* (1995) 9: 619-625.
- 10) 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.

- 11) 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: 127-34.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) Kaneda T, Kitamura Y, Nomura Y. Presence of m3 subtype muscarinic acetylcholine receptors and receptor-mediated increases in the cytoplasmic concentration of Ca^{2+} in Jurkat, a human leukemic helper T lymphocyte line. *Mol Pharmacol* (1993) 43: 356-364.
- 16) 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.
- 17) 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 M_1 and M_5 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *J Neuroimmunol* (2007) 188: 80-85.
- 18) 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* (2007) 189: 69-74.
- 19) Fujii T, Watanabe Y, Inoue T, Kawashima K. Up-regulation of mRNA encoding the M_5 muscarinic acetylcholine receptor in human T- and B-lymphocytes during immunological responses. *Neurochem Res* (2003) 28: 423-429.

