

論 文

ヒトマクロファージ様細胞株U937細胞における アセチルコリン受容体の生理的役割の検討

¹間 下 雅 士 ²寺 尾 美 帆 子 ³藤 井 健 志

¹同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・特任助教

²同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・6年次生

³同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・教授

Roles of acetylcholine receptors in regulation of immune function in human monocytic cell line U937 Cells.

¹MASHIMO Masato ²TERAO Mihoko ³FUJII Takeshi

¹Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College of Liberal Arts,
Assistant Professor

²Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College of Liberal Arts,
6th Grader

³Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College of Liberal Arts,
Professor

Keywords: Acetylcholine, Cyclooxygenase-2, Muscarinic receptor, Nicotinic receptor, U937 cell line

要旨

白血球の一種マクロファージ (M ϕ) は、自然免疫と獲得免疫の両方に関与する免疫細胞である。さらに、M ϕ は、種々の生理活性物質を産生し、多くの炎症性疾患を始めとする様々な疾患の病態形成に深く関わっている。M ϕ 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。M ϕ 上の α 7型 nAChRは、炎症性サイトカイン腫瘍壊死因子- α の遊離抑制や抗原提示機能の調節に関与していることが報告されている。本研究では、M ϕ におけるAChRの役割を明らかにしていく目的で、M ϕ の活性化がAChRの遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。さらに、M ϕ の炎症性遺伝子発現制御機構におけるAChRの生理的役割を検討した。ヒトマクロファージ様細胞株U937細胞をM ϕ モデルとして使用した。U937細胞において、LPSによる活性化は、M₁、M₃、M₅サブタイプmAChR mRNA、および α 4、 β 2サブユニットnAChR mRNAの発現を増大させた。U937細胞において、LPSは、COX-2 mRNAの発現を増大させた。しかしながら、mAChRあるいはnAChRの活性化だけでは、COX-2 mRNA発現は影響を受けなかった。nAChRの活性化は、LPSによるCOX-2 mRNA発現の増大を抑制したが、mAChRの活性化はLPSによるCOX-2 mRNA発現の増大には影響しなかった。以上の結果より、M ϕ の活性化によりmAChRおよびnAChRの発現が増大することが明らかとなった。さらに、U937細胞におけるCOX-2の発現制御機構において、TLR4を介したM ϕ の活性化によるCOX-2 mRNAの発現増大は、nAChRを介した機構によって抑制されることが示唆された。

Abstract

A type of white blood cells, macrophage (M ϕ) is an immune cell involved in both innate and acquired immunity. Furthermore, M ϕ produces various physiologically active substances and is deeply involved

in the pathogenesis of various diseases including many inflammatory diseases. $M\phi$ s express muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors (mAChR and nAChR). It has been reported that $\alpha 7$ type nAChR on $M\phi$ is involved in reducing the release of pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α and regulating antigen presentation function. In this study, we investigated the effect of $M\phi$ activation on AChR gene expression in order to clarify the role of AChR in $M\phi$. Furthermore, we investigated the physiological role of AChR in the regulation mechanism of inflammatory gene expression of $M\phi$. Human macrophage-like cell line U937 cells were used as an $M\phi$ model. In U937 cells, the presence of LPS increased the expression of M_1 , M_3 , M_5 subtype mAChR mRNA, and $\alpha 4$, $\beta 2$ subunit nAChR. In U937 cells, LPS increased COX-2 mRNA expression. However, activation of mAChR or nAChR alone did not affect COX-2 mRNA expression. nAChR activation suppressed the increase in COX-2 mRNA expression by LPS, whereas mAChR activation did not affect the increase in COX-2 mRNA expression by LPS. From the above results, it was clarified that the expression of mAChR and nAChR increases by $M\phi$ activation. Furthermore, in the COX-2 expression control mechanism in U937 cells, it was suggested that the increase in COX-2 expression due to $M\phi$ activation via TLR4 is suppressed by the mechanism via nAChR.

背景・目的

アセチルコリン (ACh) は、中枢および末梢神経系のコリン作動性神経における重要な神経伝達物質である。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きている¹⁻³⁾。

非神経系細胞であるマクロファージ ($M\phi$) は白血球の一種であり、食作用や抗原提示により免疫機能の中心的役割を担っている⁴⁾。 $M\phi$ はまた、種々の生理活性物質を産生し、多くの炎症性疾患を始めとする様々な疾患の病態形成に深く関わっている。

$M\phi$ においても、ACh合成酵素コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) が発現しており、AChを恒常的に産生および放出していることが明らかにされている⁵⁾。さらに、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^{5,6)}、腫瘍壊死因子 (TNF- α) の産生などの免疫応答に関与している^{7,8)}。さらに、 $M\phi$ 上の7 nAChRが抗原提示プロセスに関与していることが明らかになった⁹⁾。しかしながら、未だ詳細は明らかにされていない。

mAChRには M_1 - M_5 mAChRの5種類のサブタイプが存在する¹⁰⁾。 $M\phi$ にはすべてのmAChRサブタイプが発現している⁵⁾。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¹¹⁾。 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¹²⁾。

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¹³⁾。 $M\phi$ には $\alpha 2,4$ - $\alpha 7$ 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⁵⁾。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¹³⁾。

Lipopolysaccharide (LPS) はエンドトキシンとして細胞に作用し、多彩な生物活性を発現するリポ多糖である¹⁴⁾。LPSは、Toll-like-receptor4 (TLR4) を介し $M\phi$ などの細胞を活性化する炎症惹起物質である。TLR4にLPSが結合するとアダプタータンパク質であるミエロイド系分化因子88 (Myeloid Differentiation Protein-88) を介してセリン/スレオニンキナーゼであるIL-1受容体関連キナーゼ (IL-1 Receptor Associating Kinase, IRAK) が活性化される。さらにIRAKの下流にあるアダプタータンパク質TRAF-6 (TNF Receptor-associated Factor-6) を介して、 $I\kappa B$ キナーゼが抑制タンパク質 $I\kappa B$ をリン酸化する。その結果、転写因子NF κB が放出され、細胞質中のNF κB が核へと移行する。核に移行したNF κB は炎症促進性メディエーターのプロモーター部位に結合し、cyclooxygenase-2 (COX-2) を始めとする標的遺伝子の発

現を誘導する¹⁴⁾。

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 ([Ca²⁺]_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^{15,16)}。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^{17,18)}。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¹⁹⁾。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^{20,21)}。しかしながら、Mφ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。

本研究では、ヒトマクロファージ様細胞株U937細胞を用い、LPSの存在がMφにおけるAChR発現へ及ぼす影響およびマクロファージの炎症性遺伝子発現制御機構におけるAChRの生理的役割を検討した。

方法

1. 試薬

Lipopolysaccharide (LPS)、nicotineおよびoxotremorin-M (Oxo-M) はSigma-Aldrich、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、よりそれぞれ購入した。

2. 細胞培養

ヒトマクロファージ様細胞株U937細胞 (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Mφのモデルとして用いた。U937細胞 (1ウェル当たり1×10⁷個) は、7%牛胎子血清 (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培地で37℃、5% CO₂の条件下で培養した。

U937細胞の活性化の目的で、培地にLPS (3-10 μg/mL) を添加し、37℃、5% CO₂の条件下で24時間培養した。なお、TLR4介するMφの活性化機構の時間経過を考慮して、培養時間を24時間と設定した¹⁴⁾。

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^{16,19)}

培養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 mAChR (HA229529) : 5'-TCAGCAAGACAATGACAC TGGAA-3'および

5'-GCTGGATAGCAGGCACACTTGA-3'

M₃ mAChR (HA220733) : 5'-GGCTACGGCTGTGCTACA TCA-3'および

5'-GACTGTCTCTGCTGGTACTGCTG-3'

M₅ mAChR (HA200021) : 5'-CCCAGATCTGAGTGAAG GTCTTG-3'および

5'-GAGATCAGCATGGGTTTCAGTGAGTA-3'

α4 nAChR (HA188413) : 5'-CGGACATCGTCCTCTA CAACAAGT-3'および

5'-AACAGGTGGGCCCTTGGTCA-3'

α7 nAChR (HA164722) : 5'-TGGCCAGATTTGGAAACC AGA-3'および

5'-AGTGTGGAATGTGGCGTCAAAG-3'

α9 nAChR (HA166995) : 5'-AATCATGCCGGCCTCAGA A-3'および

5'-ATCAGGGCCATCGTGGCTA-3'

β2 nAChR (HA100887) : 5'-AGACTCCCATTACCGAC CTTG-3'および

5'-CTATCACACTGACCGCCTGGAC-3'

COX-2 (HA293877) : 5'-AGCCTGAATGTGCCATAAGAC TGA-3'および

5'-AAACCCACAGTGCTTGACACAGA-3'

GAPDH (HA067812) : 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAA C-3'および

5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGGA-3'

GAPDH (MA050371) : 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTG A-3'および

5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'

4. 統計解析

データは、平均値 ± 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、一元配置分散分析 (ANOVA) および事後解析としてのDunnnett'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

1. U937細胞において、24時間のLPS刺激は、 $G_{q/11}$ に共役しているmAChR mRNAの発現を増大させる
TLR4を介してM ϕ を活性化させるLPSを用いてU937細胞を刺激したところ、M₁、M₃、M₅ サブタイプmAChR mRNAの発現が有意に増大した (図1)。
2. U937細胞において、24時間のLPS刺激は、nAChR mRNAの発現を増加させる

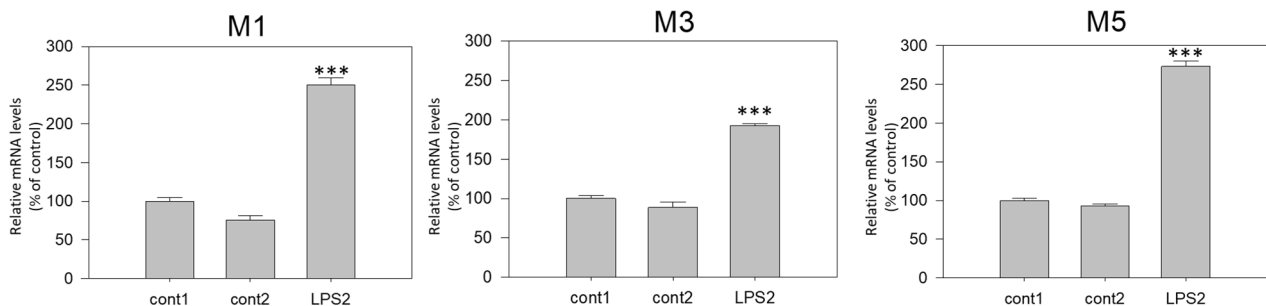


図1 ヒトマクロファージ様細胞株U937細胞において、24時間のLPS刺激は、 $G_{q/11}$ に共役しているmAChR mRNAの発現を増大させる

LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) を投与し、24時間後のM₁、M₃、M₅ 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 (one-way analysis with Dunnnett's Method modified t-test)。

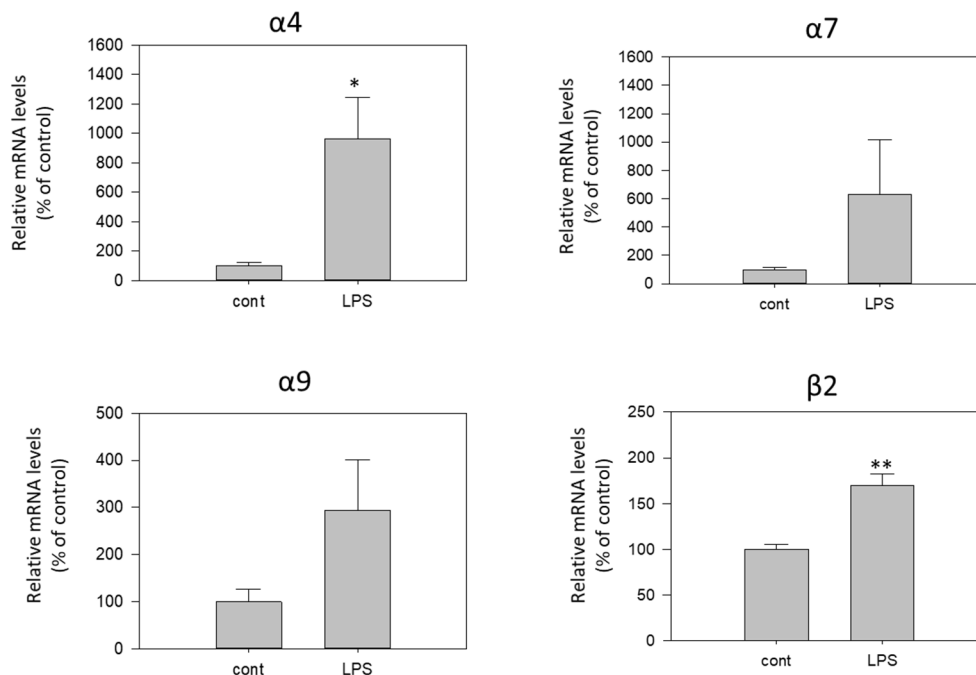


図2 ヒトマクロファージ様細胞株U937細胞において、24時間のLPS刺激は、nAChR mRNAの発現を増大させる

LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) を投与し、24時間後の $\alpha 4$ 、 $\alpha 7$ 、 $\alpha 9$ 、 $\beta 2$ 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。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ vs. Control群 (one-way analysis with Dunnnett's Method modified t-test)。

LPSを用いてU937細胞を刺激したところ、 $\alpha 4$ 、 $\beta 2$ nAChR mRNAの発現が有意に増大した(図2)。統計的には有意ではなかったが、 $\alpha 7$ 、 $\alpha 9$ nAChR mRNAについても発現量は増大していた(図2)。

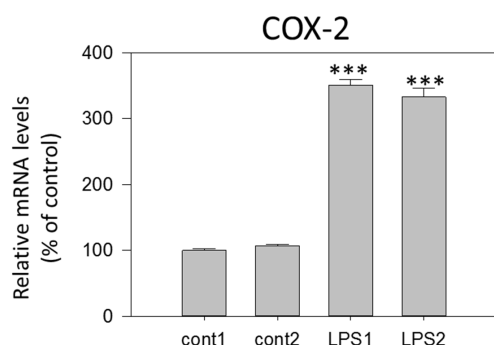


図3 ヒトマクロファージ様細胞株U937細胞において、6時間のLPS刺激は、COX-2 mRNAの発現を増大させる

LPS (1 μ g/mL) を投与し、6時間後のCOX-2 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. Control群 (one-way analysis with Dunnett's Method modified t-test)。

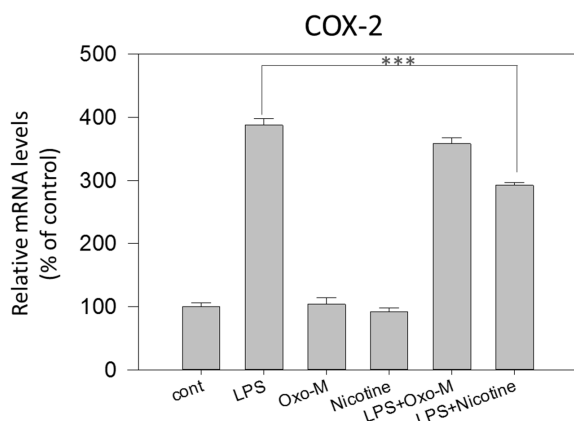


図4 ヒトマクロファージ様細胞株U937細胞において、nicotineによる前処理は、LPS刺激によるCOX-2 mRNAの発現量増大を抑制させる

Nicotine (500 μ M) およびOxo-M (100 μ M) で1時間前処理を行った後、LPS (1 μ g/mL) を投与し、6時間後のCOX-2 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. Control (one-way analysis with Dunnett's Method modified t-test)。

3. U937細胞において、6時間のLPS刺激は、COX-2 mRNAの発現を増大させる

LPSはTLR4を介してM ϕ を活性化し、炎症性遺伝子cyclooxygenase-2 (COX-2) の発現を誘導する¹⁴⁾。マクロファージの炎症性遺伝子発現制御機構におけるAChRの生理的役割を解明する上で、U937細胞がM ϕ のモデル細胞として使えるかどうかを確認するために、U937細胞の活性化がCOX-2の発現に及ぼす影響を検討した。LPSを用いてU937細胞を刺激したところ、6時間後にCOX-2 mRNAの発現量が有意に増大した(図3)。したがって、M ϕ の炎症性遺伝子発現制御機構におけるAChRの生理的役割を解明する上で、U937細胞がモデル細胞として適していることが確認できた。

4. U937細胞において、nicotineによる前処理は、LPS刺激によるCOX-2 mRNAの発現量の増大を抑制する

U937細胞において、炎症性遺伝子COX-2の発現制御機構におけるAChRの生理的役割を検討した。

nAChRおよびmAChRをそれぞれnicotineおよびOxo-Mアゴニストで1時間刺激した後、LPSによりU937細胞を活性化した。活性化の6時間後にCOX-2 mRNAの発現量をreal-time PCR法で測定した。

U937細胞において、Oxo-Mまたはnicotine単独処置は、COX-2のmRNA発現量に影響を及ぼさなかった(図4)。

LPSによるCOX-2 mRNA発現の増大にOxo-M存在下では統計的に有意な影響を及ぼさなかった。他方、nicotineは、LPSによるCOX-2 mRNA発現の増大を統計的に有意に抑制した(図4)。

考察

TLR4を介したLPSによるU937細胞の活性化は、M₁、M₃、M₅ mAChR mRNAの発現を増大させた。さらに、 $\alpha 4$ 、 $\beta 2$ nAChR mRNAの発現についても有意に増大させた。統計的に有意ではなかったが、 $\alpha 7$ 、 $\alpha 9$ nAChR mRNA発現も増大傾向にあった。これらの結果から、TLR4を介したM ϕ の活性化はmAChRおよびnAChRの発現を増大させることが示唆された。これらのAChRは生体内でセカンドメッセンジャーとして作用するCa²⁺の細胞内での上昇に関わっている。したがって、TLR4を介したLPSによるM ϕ の活性化が、mAChRあるいはnAChRを介する細胞内Ca²⁺シグナルに与える影響についても今後検討する必要がある。さらに、今回検討しなかったmAChRサブタイプお

よびnAChRサブユニットのmRNA発現に及ぼす影響についても今後検討したい。

TLR4を介したLPSによるMφの活性化は、U937細胞においても、炎症性遺伝子COX-2 mRNAの発現を増大させた。この結果からMφの炎症性遺伝子発現制御機構におけるAChRの生理的役割を解明する上で、U937細胞がモデル細胞として適していることが確認できた。

Oxo-Mあるいはnicotineの単独処置では、COX-2 mRNAに対して統計的に有意な影響を及ぼさなかったことから、mAChRあるいはnAChRからのシグナルのみでは、MφにおけるCOX-2の発現制御機構に影響を及ぼさないことが示唆された。

LPSによるCOX-2のmRNA発現量の増大に対して、Oxo-Mは影響を与えず、nicotineは統計的に有意に減少させた。これらの結果から、Mφにおける炎症性遺伝子COX-2の発現制御機構において、mAChRからのシグナルは影響を及ぼさないこと、nAChRを介した機構によって抑制されることが示唆された。

マクロファージと他の血球細胞種との間において、発現しているACh受容体の種類はほぼ同じであることが明らかになっている。しかしながら、他の血球細胞種に比較して、マクロファージにおけるmAChRあるいはnAChRの発現量は少ないことが明らかになっている。さらに、各血球細胞種の活性化によるAChR発現の変化の細胞内メカニズムに関与している分子が異なっている⁵⁾。今後は、これらの点にも着目して検討を進めていきたいと考えている。

以上の結果より、TLR4を介する細胞内シグナルは、mAChRあるいはnAChRを介する細胞内シグナル伝達機構に影響を及ぼす可能性が明らかとなった。他方、Mφ活性化に伴うCOX-2 mRNA発現機構はnAChRを介して一部影響を受けていることが明らかとなった。今後は、Mφ機能に及ぼすmAChRおよびnAChRの果たしている役割についてさらに検討したい。

謝辞

本研究の一部は、同志社女子大学研究奨励金(奨励No.19-31)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) 大森喜弘. リポ多糖によるマクロファージの炎症性遺伝子の発現制御機構. *日本咀嚼学会雑誌* (2001-2002) 11: 13-20.
- 5) Kawashima K, Yoshikawa K, Fujii YX, Moriwaki Y, Misawa H. Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells. *Life Sci* (2007) 80: 2314-2319.
- 6) Sato KZ, Fujii T, Watanabe Y, Yamada S, Ando T, Fujimoto K, Kawashima K. Diversity of mRNA expression for muscarinic acetylcholine receptor subtypes and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in human mononuclear leukocytes and leukemic cell line. *Neurosci Lett* (1999) 266: 17-20.
- 7) Wang H1, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* (2003) 421:384-388.
- 8) Tracy KJ. The inflammatory reflex. *Nature* (2002) 420: 853-859.
- 9) Mashimo M, Komori M, Matsui YY, Murase MX, Fujii T, Takeshima S, Okuyama H, Ono S, Moriwaki Y, Misawa H, Kawashima K. Distinct Roles of α 7 nAChRs in Antigen-Presenting Cells and CD4+ T Cells in the Regulation of T Cell Differentiation. *Front Immunol* (2019) 10:1102.
- 10) Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, Brann MR. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* (1987) 237:527-532.
- 11) Hulme EC, Birdsall NJM, Buckley NJ. Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (1990) 30:633-673.
- 12) Felder CC. Muscarinic acetylcholine receptors: signal

- transduction through multiple effectors. *FASEB J* (1995) 9:619-625.
- 13) Liu W, Su KA. Review on the Receptor-ligand Molecular Interactions in the Nicotinic Receptor Signaling Systems. *Pak J Biol Sci* (2018) 21: 51-66.
- 14) Rafiee L, Hajhashemi V, Javanmard SH. Fluvoxamine inhibits some inflammatory genes expression in LPS/stimulated human endothelial cells, U937 macrophages, and carrageenan-induced paw edema in rat. *Iran J Basic Med Sci* (2016) 19: 977-984.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 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 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.
- 21) 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 alpha7 subunit gene knockout mice. *J Neuroimmunol* (2007) 189:69-74.