

## 論文

マウス腹腔内マクロファージにおける  
アセチルコリン受容体の生理的役割の解明<sup>1</sup>藤井 健志    <sup>2</sup>間下 雅士    <sup>3</sup>大東 茉莉奈<sup>1</sup>同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・教授<sup>2</sup>同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・特任助教<sup>3</sup>同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・6年次生The Roles of Acetylcholine Receptors in the Regulation of  
Immune Function in Mouse Macrophage Cells<sup>1</sup>FUJII Takeshi    <sup>2</sup>MASHIMO Masato    <sup>3</sup>DAITO Marina<sup>1</sup>Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Doshisha Women's College of Liberal Arts, Professor<sup>2</sup>Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Doshisha Women's College of Liberal Arts, Assistant Professor<sup>3</sup>Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Doshisha Women's College of Liberal Arts, 6<sup>th</sup> Grader

Keywords: Acetylcholine, Cyclooxygenase-2, Macrophage, Muscarinic receptor, Nicotinic receptor

## 要旨

アセチルコリン (ACh) は、免疫細胞の増殖や分化、サイトカインの放出などの免疫機能を調節している。マクロファージ (M $\phi$ ) は、白血球細胞のひとつに分類され、自然免疫と獲得免疫の両方に関与している。さらに、M $\phi$  は、病原体の感染や生体組織からのシグナルや環境ストレスによって活性化し、炎症性サイトカイン腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) などの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 $\phi$  上の  $\alpha$ 7 型 nAChR は、TNF- $\alpha$  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 $\phi$  における AChR の役割を明らかにしていく目的で、M $\phi$  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 $\phi$  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。マウス腹腔 M $\phi$  細胞を M $\phi$  モデルとして使用した。M $\phi$  細胞において、Toll-like receptor4 (TLR4) アゴニストの lipopolysaccharide (LPS) による活性化は、M $_1$ -M $_3$  サブタイプ mAChR mRNA、および  $\alpha$ 4、 $\alpha$ 7、 $\beta$ 2 サブユニット nAChR mRNA の発現を減少させた。M $\phi$  細胞において、LPS は、COX-2 mRNA の発現を増大させた。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。 $\alpha$ 7 ノックアウトマウスの M $\phi$  細胞において、nAChR の活性化は、LPS による COX-2 mRNA 発現の増大を抑制しなかった。以上の結果より、M $\phi$  の活性化により mAChR および nAChR の発現が減少することが明らかとなった。さらに、M $\phi$  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 $\phi$  の活性化による COX-2 mRNA の発現増大は、 $\alpha$ 7 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

Acetylcholine (ACh) regulates immune functions such as proliferation and differentiation of immune cells and release of cytokines. Macrophages ( $M\phi$ ) are classified as one of white blood cells and are involved in both innate immunity and adaptive immunity. Furthermore,  $M\phi$  is activated by signals of pathogens, signals from living tissues and environmental stress, and produces various physiologically active substances such as the inflammatory cytokine tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), resulting in many inflammatory diseases. It is deeply involved in the pathogenesis of various diseases such as. Muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors (mAChR and nAChR) are expressed in  $M\phi$ . It has been reported that  $\alpha 7$ -type nAChR on  $M\phi$  is involved in the suppression of TNF- $\alpha$  release and the regulation of antigen presenting 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 of  $M\phi$  inflammatory gene expression. Mouse peritoneal  $M\phi$  cells were used as the  $M\phi$  model. In  $M\phi$  cells, activation of Toll-like receptor4 (TLR4) agonist by lipopolysaccharide (LPS) decreased the expression of M1-M5 subtype mAChR mRNA and  $\alpha 4$ ,  $\alpha 7$ ,  $\beta 2$  subunit nAChR mRNA. In  $M\phi$  cells, LPS increased the expression of COX-2 mRNA. nAChR activation suppressed the LPS-induced increase in COX-2 mRNA expression, whereas mAChR activation did not affect LPS-induced increase in COX-2 mRNA expression. In  $M\phi$  cells of  $\alpha 7$  knockout mice, activation of  $\alpha 7$  nAChR did not suppress the increase of COX-2 mRNA expression by LPS. From the above results, it became clear that the expression of mAChR and nAChR is decreased by the activation of  $M\phi$ . Furthermore, it was suggested that the increase in COX-2 mRNA expression due to TLR4-mediated activation of  $M\phi$  was suppressed by the mechanism mediated by  $\alpha 7$  nAChR in the control mechanism of COX-2 expression in  $M\phi$  cells.

### 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・遊離されており、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<sup>1-3)</sup>。

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<sup>4)</sup>。 $M\phi$ は、炎症性サイトカイン腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )をはじめとする種々の生理活性物質を産生し、多くの炎症性疾患における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<sup>5)</sup>。

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<sup>5,6)</sup>、TNF- $\alpha$ の産生などの免疫応答に関与している<sup>7,8)</sup>。さらに、 $M\phi$ 上の $\alpha 7$  nAChRが抗原提示プロセスを抑制することにより、ナイーブ T 細胞の分化を調節していることが明らかになった<sup>9,10)</sup>。

mAChRにはM<sub>1</sub>-M<sub>5</sub> mAChRの5種類のサブタイプが存在する<sup>11)</sup>。 $M\phi$ にはすべてのmAChRサブタイプが発現している<sup>5)</sup>。各mAChRサブタイプはGタンパク共役型受容体である。M<sub>1</sub>、M<sub>3</sub>およびM<sub>5</sub>サブタイプはG<sub>q/11</sub>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<sub>3</sub>)とジアシルグリセロール (DG)を産生する<sup>11)</sup>。IP<sub>3</sub>は細胞内貯蔵からCa<sup>2+</sup>を遊離させ、他方DGはプロテインキナーゼ (PK) Cを活性化する。M<sub>2</sub>およびM<sub>4</sub>サブタイプはG<sub>i/o</sub>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、PKAによるタンパク質のリン酸化を抑制する<sup>12)</sup>。

nAChRサブユニットには、骨格筋型の受容体を構成する $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma$  (成体では $\epsilon$ )、 $\delta$ 、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<sup>13)</sup>。M $\phi$ には $\alpha 2$ 、 $\alpha 4$ - $\alpha 7$ 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<sup>5)</sup>。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ネルを形成する。nAChRの活性化は、膜透過性の $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ および $\text{Ca}^{2+}$ の急速な増大を引き起こす<sup>13)</sup>。Gたんぱく質共役型の $\alpha 7$  nAChRは見つかっているが、その詳細はまだ明らかにされていない<sup>14)</sup>。

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<sup>15)</sup>。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、 $\text{I}\kappa\text{B}$ キナーゼが抑制タンパク質 $\text{I}\kappa\text{B}$ をリン酸化する。その結果、転写因子 $\text{NF}\kappa\text{B}$ が放出され、細胞質中の $\text{NF}\kappa\text{B}$ が核へと移行する。核に移行した $\text{NF}\kappa\text{B}$ 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<sup>15)</sup>。

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 $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 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<sup>16,17)</sup>。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<sup>18,19)</sup>。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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ シグナルを起こす<sup>20)</sup>。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<sup>21,22)</sup>。しかしながら、M $\phi$ 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。

ヒトM $\phi$ 様細胞株U937細胞のnAChRは、TLR4を介したM $\phi$ の活性化によるCOX-2の発現の増加を抑制する

ことを明らかにしている<sup>23)</sup>。本研究では、M $\phi$ におけるAChRの役割を明らかにしていく目的で、C57BL/6マウス腹腔内M $\phi$ 細胞を用い、LPSによる活性化がM $\phi$ におけるAChR発現へ及ぼす影響およびM $\phi$ 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. 実験動物・試薬

実験動物として、C57BL/6マウスおよび $\alpha 7$  nAChR ノックアウト ( $\alpha 7$  nAChR KO) マウスを用いた。C57BL/6マウスは、日本エスエルシー株式会社より購入した。 $\alpha 7$  nAChR KOマウスは、ジャクソン研究所より雌雄各2匹を購入し、自家繁殖した。各実験動物は、飼育環境 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 2\%$ 、明暗サイクル各12時間 (照明8:00~20:00)で飼育した。飼料 (MF、オリエンタル酵母) および飲用水 (水道水) については自由に摂取させた。 $\alpha 7$  nAChR KOマウスの取り扱いについては、同志社女子大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を受けて繁殖・飼育した (承認番号1802001)。動物実験は、「同志社女子大学における動物実験等の実施に関する規程」をはじめとする国内外の各種法令を遵守の上、同志社女子大学動物実験委員会の承認を受けて実施した (承認番号Y19-013、Y19-023)。

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。

各種蛍光色素標識抗体は、eBioscienceより購入した。

### 2. 細胞培養

C57BL/6マウスの腹腔内M $\phi$ をM $\phi$ 細胞のモデルとして用いた。M $\phi$ 細胞 (1ウェル当たり $1 \times 10^7$ 個) は10%牛胎子血清 (FBS)、100units/mLペニシリン、100 $\mu\text{g}$ /mLストレプトマイシンおよび50mM2-メルカプトエタノールを含むRPMI1640培地で $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ の条件下で培養した。

M $\phi$ 細胞の活性化の目的で、培地にLPS (3-10 $\mu\text{g}$ /mL)を添加し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ の条件下で24時間培養した。なお、TLR4介するM $\phi$ 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<sup>14)</sup>。

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<sup>16,19)</sup>

培養プレートより細胞を回収し、トータル RNA をゼパゾール RNA II Super で抽出した。トータル RNA (1  $\mu$ g) 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。

M<sub>1</sub> mAChR (MA148382) :

5'-AGGGATGCGCAAACCTGGTA-3' および  
5'-AGGTACAGGGTAAGACCTGGGTGA-3'

M<sub>2</sub> mAChR (MA150542) :

5'-TTAAAGTCAACCGCCACCTTCAG-3' および  
5'-CCAAAGGCCAGTAGCCAATCA-3'

M<sub>3</sub> mAChR (MA132011) :

5'-TGCTGAGCAGATGGACCAAGA-3' および  
5'-CGGCAGCTTGAGTACAATGGAA-3'

M<sub>4</sub> mAChR (MA158173) :

5'-CGTAACCAGGTGCGCAAGAA-3' および  
5'-ATGACATTGTAGGGTGTCCAGGTG-3'

M<sub>5</sub> mAChR (MA155275) :

5'-ATTGGCAAGGCAACAGCAAG-3' および  
5'-AGGGACTCAGAATGGCAGATGAC-3'

$\alpha$ 4 nAChR (MA107515) :

5'-TACGTGGCTCCAACCACAAGAA-3' および  
5'-CTGTCAGGAGCATCCCAGCA-3'

$\alpha$ 7 nAChR (MA153004) :

5'-ACTATGGCCTCAACCTGCTCATTC-3' および  
5'-CTGGCATGATCTCAGCCACAA-3'

$\beta$ 2 nAChR (MA069798) :

5'-TGCGAAGTGAAGATGATGACCAG-3' および  
5'-ACATGCCAATGGTCCCAAAGA-3'

COX-2 (MA026840) :

5'-GGCACTGGTGGATGCCTTC-3' および  
5'-AAGGGCTGTAGGCGCATCTC-3'

GAPDH (MA050371) :

5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3' および  
5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'

### 4. フローサイトメトリー

0.1% Bovine Serum Albumin (BSA) を含む Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) で置換したのち、C57BL/6マウスの腹腔内マクロファージを以下の蛍光色素標識抗体 (FITC 標識 - 抗 B220 抗体 (クローン No.RA3-6B2)、FITC 標識 - 抗 CD3 抗体 (145-2C11)、APC 標識 - 抗 CD4 抗体 (RM4-5)、APC 標識 - 抗 CD11c 抗体 (N418)、PE 標識 - 抗 CD11b 抗体 (M1/70)) で染色した。測定は CytoFlex (バックマン・コールター社製) で行った。

### 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 14, Systat Software) を用いて行った。各群間の有意差検定については、2 群間の比較の場合は Student's t-検定、3 群以上の場合は、一元配置あるいは二元配置分散分析 (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

1. C57BL/6マウス腹腔から得られた細胞の半数は M $\phi$  である

C57BL/6マウスの腹腔内から細胞を採取し、そこに含まれている M $\phi$  の収率を調べた。1 匹の C57BL/6マウスから約  $2.0 \times 10^7$  cells の細胞を採取できた。フローサイトメトリー法で含まれている細胞種を検討したところ、M $\phi$  である CD11b 細胞が約 45%、樹状細胞である CD11c 細胞が約 3%、T 細胞である CD3 細胞が約 15% (うち、ヘルパー T 細胞である CD4 細胞は約 5%)、B 細胞である B220 細胞が約 2% であった (図 1)。

この結果から、C57BL/6マウスの腹腔から得られた細胞の半数は M $\phi$  であることが示唆された。

2. C57BL/6マウス腹腔内 M $\phi$  において、24 時間の LPS 刺激は、nAChR および mAChR mRNA 発現を減少させる

C57BL/6マウス腹腔内 M $\phi$  において、M $\phi$  の活性化が nAChR および mAChR の発現に及ぼす影響を検討した。LPS (10 g/mL) を用いて C57BL/6マウス腹腔内 M $\phi$  を活性化したところ、 $\alpha$ 4、 $\alpha$ 7、 $\beta$ 2 nAChR mRNA および M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>、M<sub>3</sub>、M<sub>4</sub>、M<sub>5</sub> mAChR mRNA の発現が

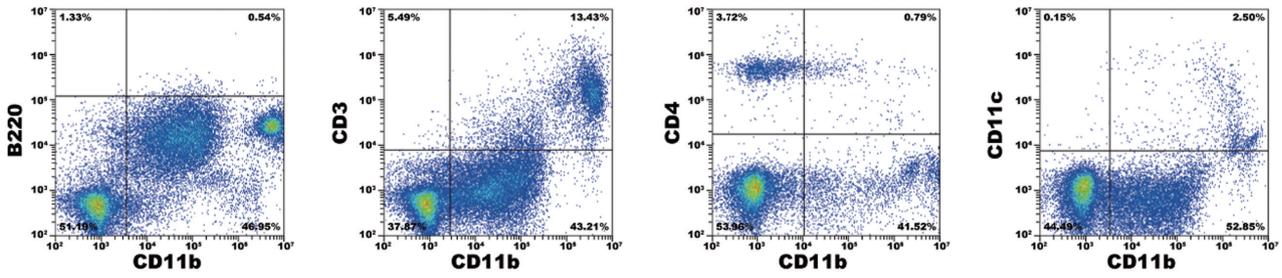


図1 C57BL/6マウスの腹腔から得られた細胞の半数はマクロファージである

C57BL/6マウスの腹腔から得られた細胞を、蛍光色素標識抗体（FITC 標識-抗 B220抗体、FITC 標識-抗 CD3抗体、APC 標識-抗 CD4抗体、APC 標識-抗 CD11c 抗体、PE 標識-抗 CD11b 抗体）で染色し、フローサイトメトリー法で測定した。

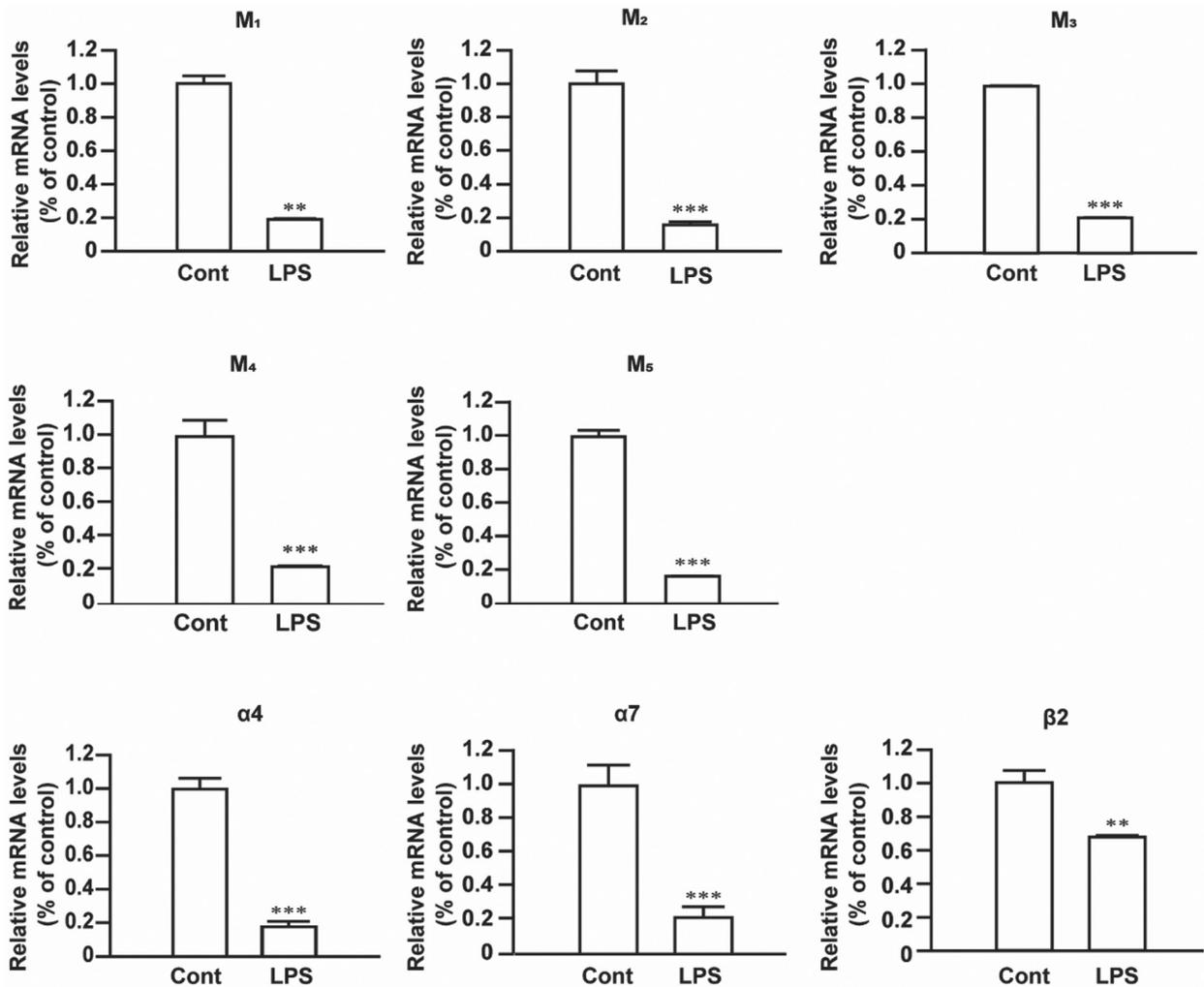


図2 C57BL/6マウス腹腔内マクロファージにおいて、24時間のLPS刺激は、nAChR および mAChR mRNA の発現を減少させる

LPS (10 $\mu$ g/mL) を投与し、24時間後の $\alpha$ 4、 $\alpha$ 7、 $\beta$ 2 nAChR mRNA および M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>、M<sub>3</sub>、M<sub>4</sub>、M<sub>5</sub> 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。\*\* $P$  < 0.01、\*\*\* $P$  < 0.001 vs. Control 群 (Student's t-test)。

減少した (図2)。この結果から、TLR4を介した M $\phi$  の活性化は nAChR および mAChR の発現量を減少させることが示唆された。

3. C57BL/6マウス腹腔内 M $\phi$  において、nicotine は LPS による COX-2 mRNA の発現上昇を抑制する

LPS は TLR4 を介して M $\phi$  を活性化し、炎症性遺伝子 cyclooxygenase-2 (COX-2) の発現を誘導する<sup>15)</sup>。C57BL/6マウス腹腔内 M $\phi$  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 をそれぞれのアゴニスト nicotine (500 M) および Oxo-M (100 M) で1時間刺激を行った後、LPS (10 g/mL) は COX-2 mRNA の発現を増加させた。なお、nicotine (500 M) および Oxo-M (100 M) の単独では、COX-2 mRNA 発現には影響を与えなかった (データは示していない)。nicotine による nAChR の活性化は、LPS による COX-2 mRNA の発現上昇を抑制した。しかしながら、Oxo-M による mAChR の活性化は LPS による COX-2 mRNA の発現上昇に影響を及ぼさなかった (図3)。これらの結果から、マウス腹腔内 M $\phi$  における TLR4 を介した M $\phi$  の活性化による COX-2 の発現の増加は、nAChR を介した機構によって抑制されることが示唆された。

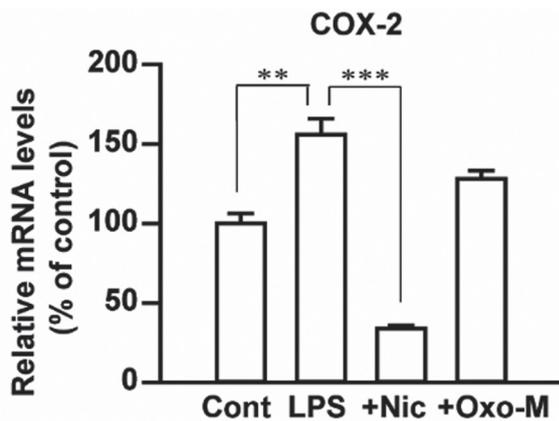


図3 C57BL/6マウス腹腔内マクロファージにおいて、nicotine は LPS による COX-2 mRNA の発現上昇を抑制する

Nicotine (500 M) および Oxo-M (100 M) で1時間前処理を行った後、LPS (10 $\mu$ g/mL) を投与し、24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) \*\* $P$  < 0.01 vs. control \*\*\* $P$  < 0.001 vs. LPS (one-way ANOVA with Tukey's modified t-test)。

4.  $\alpha$ 7 nAChR-KO マウス腹腔内 M $\phi$  において、nicotine は LPS による COX-2 mRNA の発現上昇を抑制しない。

C57BL/6マウスおよび $\alpha$ 7 nAChR-KO マウス腹腔内 M $\phi$  において、炎症性遺伝子 COX-2 の発現制御機構における $\alpha$ 7 nAChR の生理的役割を検討した。nAChR を nicotine (1 mM) で1時間前処理を行った後、LPS (10 g/mL) を用いて C57BL/6マウスおよび $\alpha$ 7 nAChR-KO マウス腹腔内 M $\phi$  を刺激し、24時間後に COX-2 mRNA の発現量を測定した。 $\alpha$ 7 nAChR-KO マウス腹腔内 M $\phi$  において、nicotine による nAChR の活性化は、LPS による COX-2 mRNA の発現上昇を抑制しなかった (図4)。これらの結果から、マウス腹腔内 M $\phi$  における TLR4 を介した M $\phi$  の活性化による COX-2 の発現の増加は、 $\alpha$ 7 nAChR を介した機構によって抑制されることが示唆された。

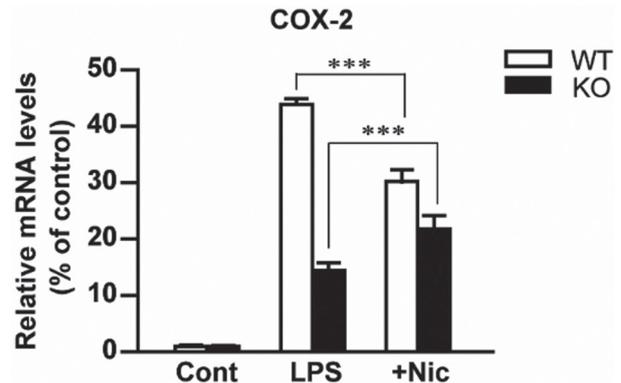


図4  $\alpha$ 7 nAChR-KO マウス腹腔内マクロファージにおいて、nicotine は LPS による COX-2 mRNA の発現上昇を抑制しない

Nicotine (1mM) で1時間前処理を行った後、LPS (10 $\mu$ g/mL) を投与し、24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 (two-way ANOVA with Tukey's modified t-test)。

## 考察

TLR4を介した LPS による M $\phi$  細胞の活性化は、M $_1$ -M $_5$  mAChR mRNA の発現を抑制した。さらに、 $\alpha$ 4、 $\alpha$ 7、 $\beta$ 2 nAChR mRNA の発現についても有意に抑制した。これらの結果から、TLR4を介した M $\phi$  の活性化は mAChR および nAChR の発現量を抑制することが示唆

された。以前にヒト M $\phi$  系細胞株 U937細胞において、LPS による活性化は AChR mRNA 発現を増大させることを報告している<sup>23)</sup>。相対する作用であるが、マウスとヒトの種差が影響している可能性より、腫瘍細胞 (U937細胞) と正常プライマリー細胞 (マウス腹腔 M $\phi$  細胞) の性質の差によるものではないかと考えている。この点については引き続き検討する予定である。さらに、今回検討しなかった 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 M $\phi$  の活性化は、マウス腹腔 M $\phi$  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 M $\phi$  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、マウス腹腔 M $\phi$  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、M $\phi$  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、M $\phi$  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。

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、M $\phi$  活性化に伴う COX-2 mRNA 発現機構は  $\alpha 7$  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、M $\phi$  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, No.20-25) 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 H, 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  $\alpha 7$  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  $\alpha 7$  nAChRs in Antigen-Presenting Cells and CD4<sup>+</sup> T Cells in the Regulation of T Cell Differentiation. *Front Immunol* (2019) 10: 1102.
- 10) Mashimo M, Fujii T, Ono S, Moriwaki Y, Misawa H, Kawashima K. Minireview: Divergent roles of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors expressed on antigen-presenting cells and CD4<sup>+</sup>

- T cells in the regulation of T cell differentiation. *Int Immunopharmacol*. 82: 106306.
- 11) 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) de Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, et al. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol* (2005) 6: 844-851.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 間下雅士、寺尾美帆子、藤井健志. 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. 同志社女子大学学術研究年報 (2019) 70 : 13-19.