

ニコチンの免疫系細胞に及ぼす作用に関する研究の 展開と問題点

川島 紘一郎*

はじめに

ニコチン性受容体 (nAChR) の生体機能調節に関して、最近いくつかの大きな進展があった。免疫系細胞を中心に非神経性細胞における nAChR の役割について考えてみることにする。nAChR は、5 個のサブユニットで構成されており、 Na^+ または Ca^{2+} に対して透過性の高いイオンチャネルを形成している。nAChR は、大きく筋肉型と神経型に分類されている。筋肉型 nAChR は、 $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ または $(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$ サブユニットで構成されている。哺乳類の神経型 nAChR は、 $\alpha 2$ - $\alpha 7$ 、 $\alpha 9$ 、 $\alpha 10$ 、 $\beta 2$ - $\beta 4$ の 11 種類のサブユニットの複雑な組み合わせで構成されている。 $\alpha 7$ サブユニットは、単独で 5 量体を形成し、 Ca^{2+} に対して透過性の高い nAChR を形成している。

免疫系細胞上の nAChR への作用が従来から想定されていた物質は、副交感神経終末に由来するアセチルコリン (ACh) と喫煙等により摂取されるニコチンである。ところが最近、リンパ球を含む非神経性細胞も ACh を産生することが証明された¹⁾⁻³⁾。さらに、新規内因性ペプチド secreted mammalian leukocyte antigen 6/urokinase-type plasminogen activator receptor-related protein (SLURP)-1 および -2 が、ケラチノサイトにおいて nAChR のリガンドとして働き、様々な生理作用に関与している可能性が明らかになってきた⁴⁾⁵⁾。

迷走神経刺激が、細菌内毒素 (LPS) を用いた敗血症モデルにおいて、致命的ショックから動物を保護することが報告されている⁶⁾。そのメ

カニズムとして、副交感神経終末から遊離された ACh がマクロファージ上の $\alpha 7$ nAChR を刺激して、TNF- α の放出を阻害した結果であるとの説が提唱されている⁷⁾。Tracey⁸⁾ は、この反応系を「The inflammatory reflex」とよぶことを提唱している。

非神経性細胞による ACh 産生と 免疫細胞における役割

Fujii ら⁹⁾ は、T リンパ球がコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) により、ACh を産生することを発見した。これがきっかけとなって、ケラチノサイト、血管内皮細胞、消化管および気道粘膜上皮細胞、あるいは膀胱上皮細胞などの様々な非神経性細胞においても ChAT による ACh 産生が証明されてきた²⁾。これらの細胞で産生・遊離された ACh は、オートクラインあるいはパラクライン的に、自己または極めて周辺に存在する細胞上に存在する nAChR およびムスカリン受容体に作用して、細胞機能を変化させることが明らかとなってきた (図-1)¹⁾⁻³⁾。T リンパ球における ACh 産生は、抗原提示反応において増強される可能性が明らかになってきた¹⁰⁾¹¹⁾。nAChR $\alpha 4$ 、 $\alpha 7$ あるいは $\beta 2$ サブユニットのノックアウト (KO) マウスにおける免疫前の血清 IgG 濃度は、野生型に比較して低下していた¹²⁾。ところが、horse cytochrome *c* で免疫すると、nAChR $\alpha 4$ あるいは $\beta 2$ サブユニット KO マウスにおける血清 IgG 抗体濃度は、野生型と比較すると逆に上昇した。これらの実験結果から、 $\alpha 4$ および $\beta 2$ サブユニットは、免疫反応において抗体産生を抑制する方向に働いている可能性が

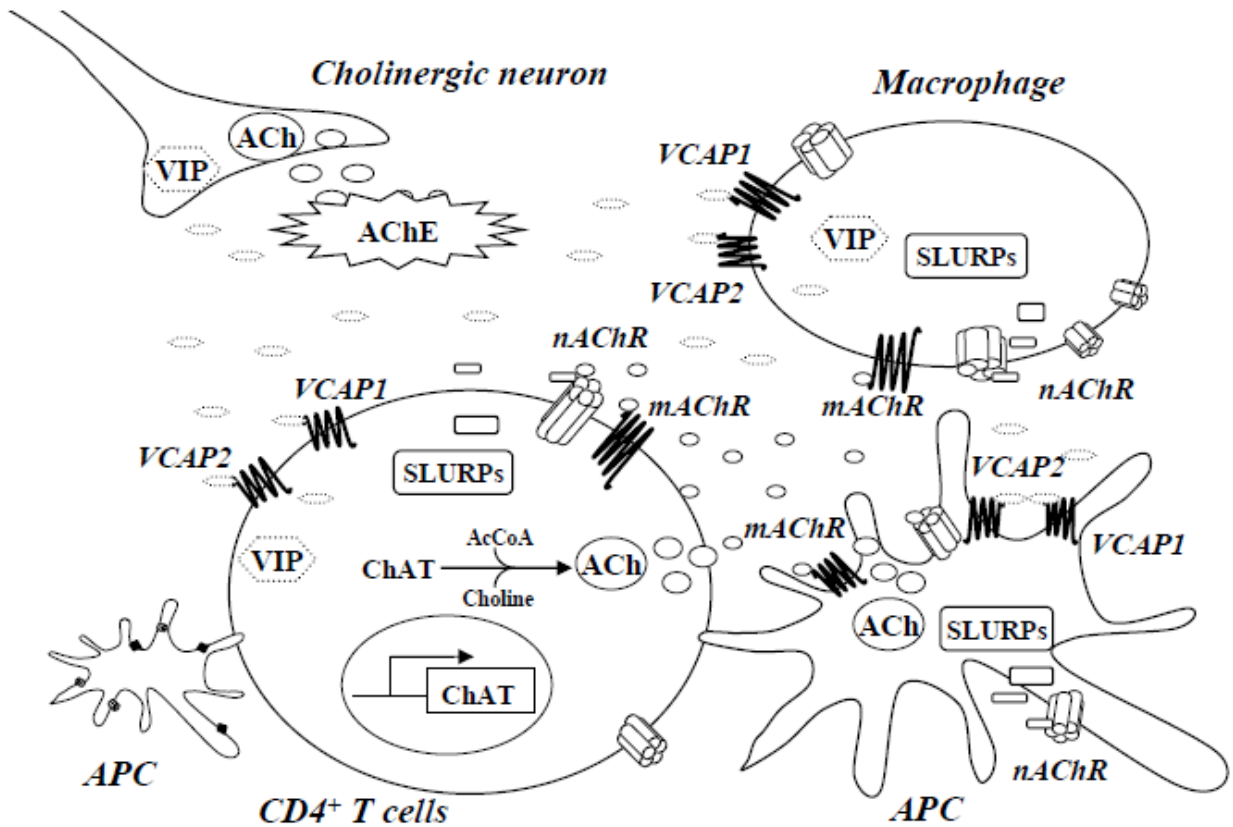


図-1 抗原提示反応時および副交感神経刺激時において免疫関連細胞の活性に影響を及ぼすコリン作動系構成要素の係わりを示す模式図

ACh: アセチルコリン、AcCoA: アセチルコエンザイム A、AChE: アセチルコリンエステラーゼ、APC: 抗原提示細胞、ChAT: コリンアセチルトランスフェラーゼ、mAChR: ムスカリン性受容体、nAChR: ニコチン性受容体、SLURP: secreted mammalian leukocyte antigen 6/urokinase-type plasminogen activator receptor-related protein、VCAP: vasoactive intestinal polypeptide (VIP) 受容体

示唆された。

ニコチン 2.1 mg/kg を 1 日 2 回 6 週間に亘って皮下投与したマウスにおいて、卵白アルブミンに対する血清抗体濃度の低下傾向と単核白血球 (MNLs) における IFN- γ 産生増大が認められた。また、脾臓 MNLs における nAChR $\alpha 5$ サブユニットの遺伝子発現の低下も見られた。これらの結果は、長期間のニコチン投与は nAChR $\alpha 5$ サブユニット発現に影響を及ぼし、Th1 優位を引き起こすなどして抗体産生に影響を及ぼす可能性を示唆するものである¹³⁾。

新規内因性ペプチド系 nAChR リガンド SLURPs と免疫細胞

ヒト血中あるいは尿中に存在する SLURP-1 は、計算上の分子量が 8843 Da のペプチドである。10 個の cysteine 残基が存在するため、分子内で 5 個のジスルフィド結合を形成して複雑な立体構造をしている¹⁴⁾。一方、SLURP-2 は、蛋白質構成アミノ酸配列において SLURP-1 と約 30% 程度のホモロジーを示し、同様に 10 個の cysteine 残基をもっている¹⁵⁾。

皮膚病の一種 Mal de Meleda 患者において、SLURP-1 を構成するアミノ酸に変異が発見され、SLURP-1 を介するケラチノサイト機能調節異常が病因となっている可能性が示唆されている¹⁶⁾。 $\alpha 7$ nAChR を発現する *Xenopus oocyte* に SLURP-1

を作用させたところ、単独ではなんら変化を引き起こさなかった¹⁶⁾。しかしながら、さらに ACh を加えたところ、ACh による電流を増強した。これらの結果より、SLURP-1 は、 $\alpha 7$ nAChR に対してアロステリック・リガンドとして作用し、ACh の反応を増強している可能性が考えられている。Arredondo ら⁴⁾は、1) ケラチノサイトに SLURP-1 が発現していること、2) $\alpha 7$ nAChR を発現するケラチノサイトにおいて、SLURP-1 が [³H]epibatidine 結合部位よりも [³H]nicotine 結合部位に対してより高い親和性を示すこと、3) SLURP-1 は、ケラチノサイトにおいて caspases 3 および 8 活性の増強を引き起こし、ケラチン化とアポトーシスを促進することを発見した。

SLURP-2 は、乾癬患者の過剰増殖している皮膚で、正常皮膚よりも数倍も濃度が高いことが報告されている。Arredondo ら⁵⁾は、1) ケラチノサイトが SLURP-2 を発現していること、2) ケラチノサイトにおいて、SLURP-2 は、SLURP-1 とは逆に、[³H]nicotine 結合部位よりも [³H]epibatidine 結合部位に対してより高い親和性を示すこと、3) SLURP-2 は、ケラチノサイトの増殖を促進し、アポトーシスを防止することなどを明らかにした。これらの SLURP-2 の作用は、 α -bungarotoxin (α -BTX) よりも mecamylamine によってより効果的に阻害された。以上の結果から、SLURP-2 は、 $\alpha 3$ nAChR において ACh と競合してケラチノサイトの分化を遅延させ、アポトーシスを防止するものと考えられている。

Yoshikawa ら¹⁷⁾は、SLURP-1 および SLURP-2 遺伝子が、胸腺や脾臓などの免疫関連組織、MNLs、骨髄由来樹状細胞および腹腔滲出マクロファージにも発現していることを発見した。これらの結果は、SLURPs が、nAChR を発現している免疫関連細胞の機能調節にも関与している可能性を示唆するものである (図-1)。興味深い今後の研究課題の一つとなるものと考えられる。

The Inflammatory Reflex と問題点

敗血症発症時には、マクロファージなどの免疫系細胞から大量の TNF- α などの炎症促進性サイトカインが放出され、致命的経過をたどることが知られている。マクロファージを LPS で刺激すると、大量の TNF- α が放出される。ところが、ニコチンを共存させると LPS による TNF- α の放出が抑制される。腸に外科的処置を施して作製した敗血症モデルに、ニコチンを前投与しておくことで死亡率を低下させる。ニコチンの代わりに、迷走神経節前線維を電気刺激したところ、敗血症モデルの死亡率を低下させた⁶⁾。ところが、nAChR $\alpha 7$ サブユニット KO マウスにおいては、迷走神経刺激による死亡率の抑制は見られなかった⁷⁾。これらの結果から、ニコチンあるいは迷走神経刺激は、マクロファージなどの $\alpha 7$ nAChR 刺激を介して TNF- α 放出を抑制して死亡率を低下させたものと考えられている。生体内では、TNF- α や IL-1 などの炎症促進性サイトカインは、1) 求心性迷走神経の刺激、あるいは 2) 中枢神経系への直接作用を介して、迷走神経運動核の興奮を引き起こす。その結果として、遠心性迷走神経を興奮させ、副交感神経終末からの ACh 放出を引き起こす。Tracey⁸⁾は、こうして副交感神経終末から放出された ACh がマクロファージ上の $\alpha 7$ nAChR に作用して、抗炎症作用を発現するループが存在すると考えて、「The inflammatory reflex」説を提唱した。大変魅力的な仮説で、状況証拠は整っているように思われる。しかしながら、幾つかの重要な証明すべき問題点が存在する。最も大きな問題点は、副交感神経がマクロファージとシナプスを形成している証拠がないことである。副交感神経終末周辺には、高い活性をもつアセチルコリンエステラーゼ (AChE) やコリンエステラーゼ (ChE) が存在するために、ACh は数ミリ秒のうちに分解されてしまう。したがって、副交感神経終末から放出された ACh がマクロファージ上の $\alpha 7$ nAChR に到達できる可能性はほとんどないと言わざるを得ない。

Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) は、副交感神経終末に ACh と共存しており、副

交感神経刺激により ACh と共に放出される (図-1)¹⁸⁾。静脈内投与した VIP は、半減期約 0.6 分で血中より組織へ速やかに分布する¹⁹⁾。例えば肺などの組織からは、VIP は半減期約 3 分で消失する。この半減期は、ミリ秒単位といわれる ACh と比較すれば遥かに長い。VIP は、Gs 蛋白質に共役した VPAC1 あるいは VPAC2 に結合して、細胞内 cAMP 濃度を上昇させる。これらの作用を介して、免疫細胞の機能抑制を引き起こす²⁰⁾。また神経細胞においては、リガンドの nAChR に対する親和性を上昇させる²¹⁾。MNLs およびマクロファージには VIP 遺伝子の発現が認められている。また MNLs、樹状細胞およびマクロファージにも、VPAC1 および VPAC2 のいずれの遺伝子も発現している。これらの知見を踏まえると、「The inflammatory reflex」において、副交感神経終末から遊離された ACh が直接マクロファージ上の nAChR に作用すると考えるよりも、副交感神経終末から遊離された VIP がマクロファージ上の VPAC1 または VPAC2 に作用し、リンパ球や樹状細胞から放出された ACh の nAChR に対する親和性を上昇させて抗炎症作用を発現すると考えるほうがより合理的であろう²²⁾。

ニコチンの生体機能に及ぼす作用の検討 における問題点

ニコチンの生体機能に及ぼす作用に関して、

これまで数多くの研究が、様々な実験条件下において実施され、様々な結果が報告されてきた。それぞれの実験結果は、それぞれの実験条件下においては正しいものと考えられる。しかしながら、それらの結果を喫煙との関連において解釈する場合には、多くの制約がある。第一の問題点は、nAChR が脱感作を起こしやすい点である。特に *in vitro* の実験では、nAChR の脱感作は避けることのできない問題で、喫煙とニコチンの作用を関連づける際には注意を要する。*In vitro* の実験において、ごく初期に観察される作用は、その標本におけるニコチンのもつ薬理作用のレパトリーの一部を示していると考えられる。第二の問題点は、実験に用いるニコチンの用量または濃度の問題である。喫煙により肺から吸収されたニコチンは、動脈血によって作用部位に到達し、広範に分布する。したがって、動脈血と静脈血におけるニコチン濃度には、大きな差があるものと考えられる。報告されている血中ニコチン濃度は、大部分が静脈血のデータである。最高濃度に到達していると考えられる煙が肺胞中に存在する時点での動脈血ニコチン濃度は、まだ報告されていない。このように、実験には、どの程度の用量または濃度を用いるべきかに関して、いまだ不明な点が多い。第三の問題点は、急性実験と慢性実験の問題である。喫煙との関連を研究する場合には、慢性実験の

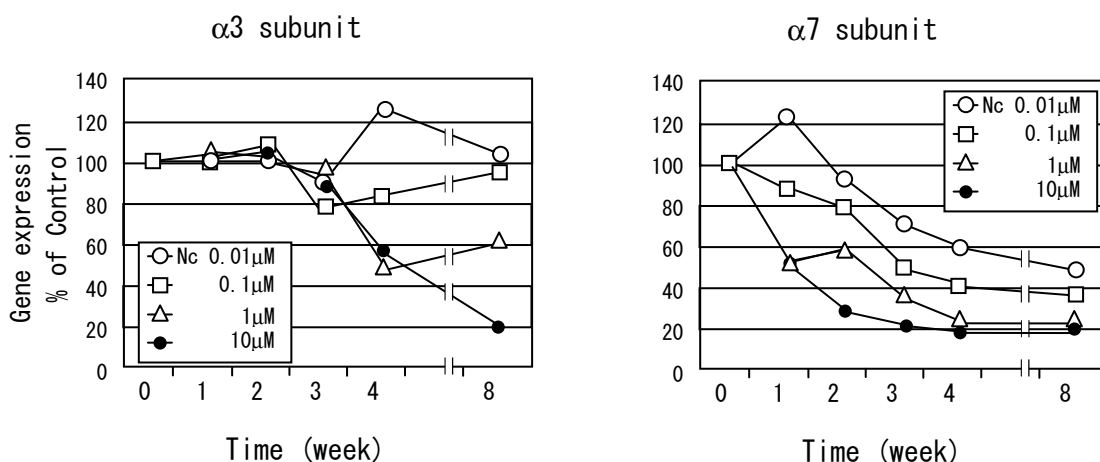


図-2 ヒト T 細胞系白血病細胞株 CCRF-CEM における長期ニコチン曝露の nAChR α3 および α7 サブユニット遺伝子発現に及ぼす影響

方が望ましい。しかしながら、どの程度の期間に亘って、どのような投与方法でニコチン投与を継続すべきかなどを考慮しなくてはならない。基礎実験では、これらの悩ましい問題を十分に考慮して、慎重に計画を立案する必要がある。因みに、*in vitro*の実験結果ではあるが、ニコチンのリンパ球におけるnAChRサブユニット遺伝子発現に及ぼす作用が、処置時間、ニコチン濃度により異なることを示すデータを紹介する(図-2)³⁾。nAChRサブユニット遺伝子発現が、短期間の処置では増強傾向を示す場合がある。しかし長期間処置した場合には、遺伝子発現は低下する場合が多い。

SLURPsのようなnAChRに対する新規リガンドの発見は、我々が現時点でもっているnAChRの生体機能制御に果たす役割に関する知識の範囲をさらに拡大させるものである。今回は、話題を免疫関連細胞に限定した。しかしながら、nAChRは多くの非神経性細胞にも発現している。今後、血管内皮細胞上のnAChRが血管新生に果たしている役割が注目されるものと考えられる。

文 献

- 1) Kawashima K, Fujii T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Ther* 2000; 86: 29-48.
- 2) Grando SA, Kawashima K, Wessler I. Introduction: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Life Sci* 2003; 72: 2009-12.
- 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: 2063-85.
- 4) Arredondo J, Chernyavsky AI, Webber RJ, Grando SA. Biological effects of SLURP-1 on human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2005; 125: 1236-41.
- 5) Arredondo J, Chernyavsky AI, Jolkovsky DL, Webber RJ, Grando SA. SLURP-2: a novel cholinergic signaling peptide in human mucocutaneous epithelium. *J Cell Physiol* 2006; 208: 238-45.
- 6) Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000; 405: 458-62.
- 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 alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003; 421: 384-8.
- 8) Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002; 420: 853-9.
- 9) Fujii T, Yamada S, Misawa H, Tajima S, Fujimoto K, Suzuki T, Kawashima K. Expression of choline acetyltransferase mRNA and protein in T-lymphocytes. *Proc Japan Acad* 1995; 71B: 231-5.
- 10) Fujii T, Tsuchiya T, Yamada S, Fujimoto K, Suzuki T, Kasahara T, Kawashima K. Localization and synthesis of acetylcholine in human leukemic T-cell lines. *J Neurosci Res* 1996; 44: 66-72.
- 11) Fujii T, Ushiyama N, Hosonuma K, Suenaga A, Kawashima K. Effects of human antithymocyte globulin on acetylcholine synthesis, its release and choline acetyltransferase transcription in a human leukemic T-cell line. *J Neuroimmunol* 2002; 128: 1-8.
- 12) Skok M, Grailhe R, Changeux JP. Nicotinic receptors regulate B lymphocyte activation and immune response. *Eur J Pharmacol* 2005; 517: 246-51.
- 13) 川島紘一郎、三澤日出巳、森脇康博. 喫煙とニコチンのリンパ球機能と免疫活性に及ぼす影響の分子薬理的検討. 平成 17 年度喫煙科学研究財団年報 2005; 213-7.
- 14) Adermann K, Wattler F, Wattler S, Heine G, Meyer M, Forssmann WG, Nehls M. Structural and phylogenetic characterization of human SLURP-1, the first secreted mammalian member of the Ly-6/uPAR protein superfamily. *Protein Sci* 1999; 8: 810-9.
- 15) Tsuji H, Okamoto K, Matsuzaka Y, Iizuka H, Tamiya G, Inoko H. SLURP-2, a novel member of the human Ly-6 superfamily that is up-regulated in psoriasis vulgaris. *Genomics* 2003; 81: 26-33.
- 16) Fischer J, Bouadjar B, Heilig R, Huber M, Lefevre C, Jobard F, Macari F, Bakija-Konsuo A, Ait-Belkacem F, Weissenbach J, Lathrop M, Hohl D, Prud'homme JF. Mutations in the gene encoding SLURP-1 in Mal de Meleda. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 875-80.
- 17) Yoshikawa K, Fujii Y, Moriwaki Y, Kawashima K. SLURP-1 and SLURP-2 gene expression patterns in C57BL/6J mice. *J Pharmacol Sci* 2006; 100 (Suppl I): 100P.
- 18) Lundberg JM, Anggard A, Emson P, Fahrenkrug J, Hokfelt T. Vasoactive intestinal polypeptide and cholinergic mechanisms in

cat nasal mucosa: studies on choline acetyltransferase and release of vasoactive intestinal polypeptide. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78: 5255-9.

- 19) Refai E, Jonsson C, Andersson M, Jacobsson H, Larsson S, Kogner P, Hassan M. Biodistribution of liposomal ¹³¹I-VIP in rat using gamma counter. Nucl Med Biol 1999; 26: 931-6.
- 20) Delgado M, Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Leceta J, Ganea D, Gomariz RP. PACAP in immunity and inflammation. Ann N Y Acad Sci 2003; 992: 141-57.
- 21) Liu DM, Cuevas J, Adams DJ. VIP and PACAP potentiation of nicotinic ACh-evoked currents in rat parasympathetic neurons is mediated by G-protein activation. Eur J Neurosci 2000; 12: 2243-51.
- 22) Kawashima K, Yoshikawa K, Fujii YX, Moriwaki Y. Gene expression for cholinergic components in murine immune cells and their biological roles. The Second International Symposium on Non-neuronal Acetylcholine. Abstract Book. 2006; p26.