

## ニコチンの海馬神経細胞に対する作用—その二面性—

鬼頭 昭三\*、新郷 明子\*\*

### はじめに

脳内でアセチルコリン系ニコチン性受容体アゴニストとしてはたらくニコチンが、認知機能を高めることはよく知られた事実である。最近でも、山崎ら<sup>1)</sup>はニコチンが海馬の NMDA 受容体サブタイプの NR2B のチロシンリン酸化を促進することによって記憶能力を高めることを実証している。さらに Rosato-Siri ら<sup>2)</sup>は、ニコチンによる海馬 CA3-CA1 シナプス可塑性の上昇に GABA インターニューロンが関与していることを示しており、Zhana ら<sup>3)</sup>は、ニコチンが  $\beta$  amyloid の沈着を抑えることによってアルツハイマー病に対して有利に働くのは、ニコチンの投与によって海馬 CA1 領域の銅、亜鉛の分布濃度が減少することによると述べている。しかし、ニコチンの海馬神経細胞に対する作用のシグナル伝達系の立場からみたメカニズムについてはよく知られていないのが現状である。この点について著者らは喫煙科学研究財団の助成の下に実験的研究を行ってきた。

### ニコチンの海馬神経細胞に対する有利な作用のメカニズム

我々はニコチンが海馬神経細胞に対して有利に作用する事実に対して、そのメカニズムを明らかにする目的で、基礎神経科学的立場から実験を行い、次の様な結果を得た。

1) ラット海馬の培養神経細胞にカイニン酸と共に各種の量のグルココルチコイドを加えると、グルココルチコイドの用量依存性に培養神

経細胞へのカイニン酸毒性が上昇した。この実験系で、グルココルチコイドの量を一定として、さらにニコチンを加えると、ニコチンの用量依存性にグルココルチコイドによるカイニン酸毒性の増強が抑制された<sup>4)6)</sup>。この抑制はメカミラミンを加えると消失するので、ニコチン性受容体を介するものであることが明らかになった。この実験結果は、ニコチンが海馬神経細胞に対して有利に働く作用の一面を示すものである。

2) ラット海馬の培養神経細胞にニコチンを加え、Fura2 fluorometry によって細胞内  $Ca^{2+}$  濃

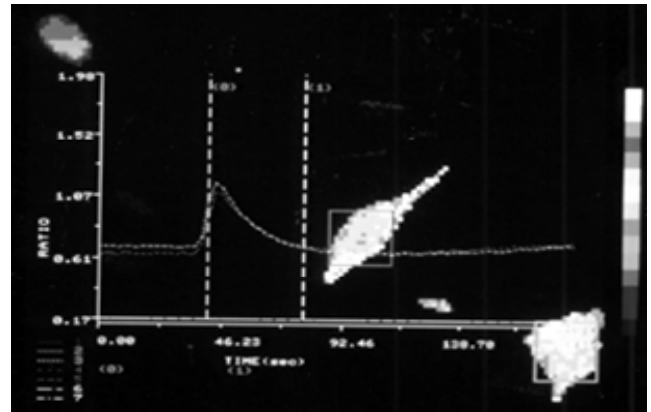


図-1 ニコチンによるラット海馬培養細胞内カルシウムイオン濃度の変動

### AP-1:DNA 結合活性

海馬

大脳皮質

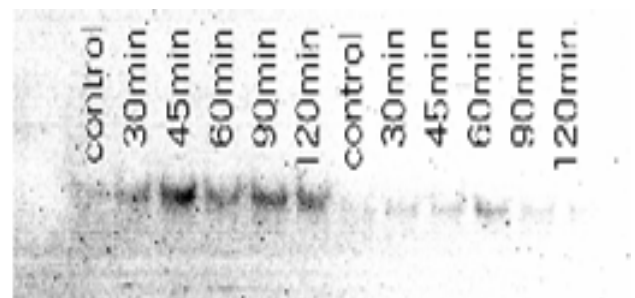


図-2 ニコチンによる AP-1:DNA 結合活性の上昇 (海馬、大脳皮質)

\* 順心会幸生リハビリテーション病院

\*\*兵庫大学健康科学部



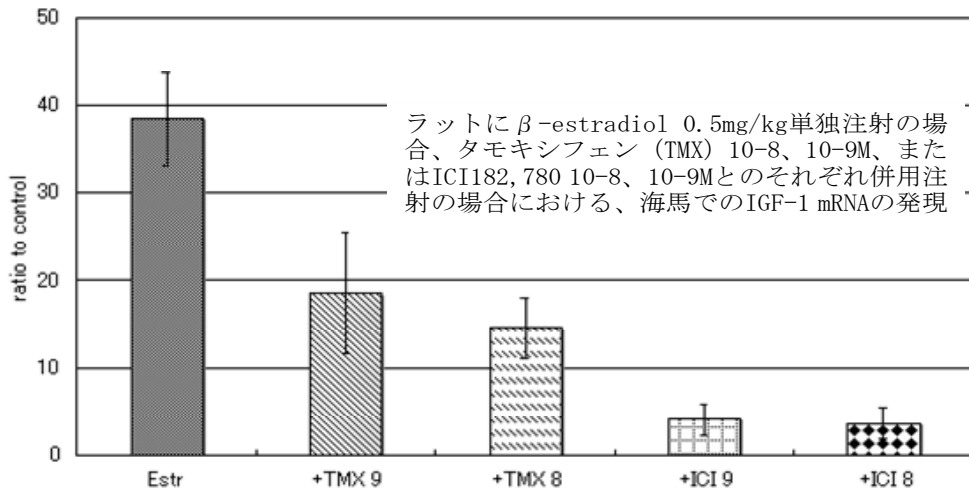


図-5 ラット海馬におけるエストロゲン刺激による IGF-1 mRNA 発現とその抑制

容体としての ER $\alpha$ 、ER $\beta$  受容体の他に、細胞膜にも受容体が存在し、エストロゲンによるノンゲノミックな早い反応を起こすことが知られるようになってきている。我々は、エストロゲンの刺激によって培養海馬神経細胞内で Ca<sup>2+</sup> 濃度、PKA 活性の増加が短い潜時で一過性にみられ、これらの反応が、エストロゲンの細胞膜受容体を介する早い反応であることをそれぞれ fura2 fluorometry、DR2 fluorometry によって明らかにした<sup>12)</sup>。すなわち、estradiol 刺激によっても海馬神経細胞内でこれらのセカンドメッセンジャーの反応に引き続いて、ニコチン刺激の場合と類似のパターンで c-fos mRNA の発現、AP-1:DNA 結合活性の上昇、IGF-1 mRNA の発現などの反応を示すが、エストロゲンによるラット海馬における IGF-1 発現の誘導の程度は、ニコ

チンによるよりも一層著明であった。この IGF-1 mRNA 発現の誘導は、dot blotting、RNA protection assay に加えて、我々によって real time PCR assay によっても確認されている (図-5)<sup>13)</sup>。

#### エストロゲンの海馬神経細胞に対する作用へのニコチンの干渉

このようにニコチンもエストロゲンも共に記憶・学習機能を活性化し、シグナル伝達の立場からも海馬神経細胞に対し同じ方向に働くことが明らかになったわけであるが、ニコチンと estradiol を同時に働かせると、ニコチンは estradiol による IGF-1 mRNA の発現の誘導を抑制するという新たな事実遭遇した (図-6)。すなわち、ニコチンはそれ自体が神経保護作用を

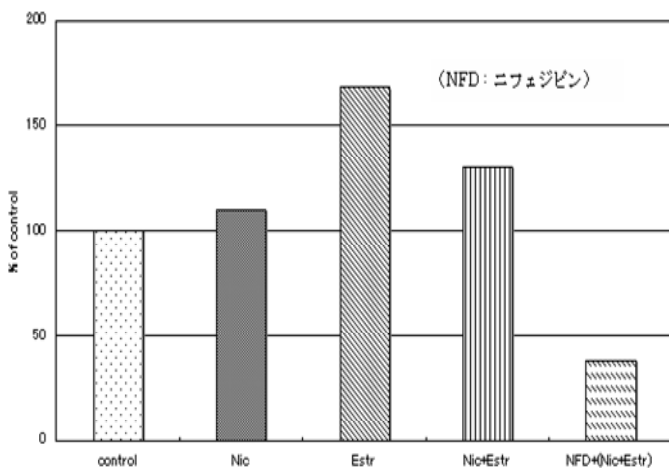


図-6 ニコチン、エストロゲンによる海馬での IGF-1 mRNA 発現

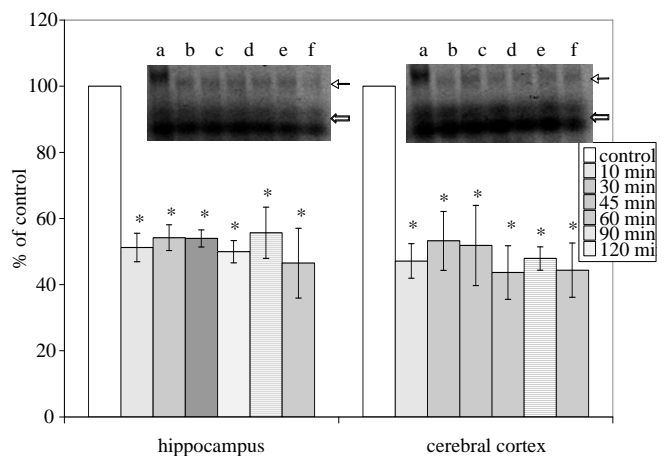


図-7 ニコチンによる ERE:DNA 結合活性の抑制

発揮すると共に、エストロゲンの神経保護作用に対して抑制を加えると考えられる。これらのメカニズムは、さらに詳細に *in vivo* および *in vitro* の実験系により検討された。ラットにニコチン 1 mg/kg を全身投与し、海馬、大脳皮質についてエストロゲン応答エレメント (ERE) 結合をゲルシフトアッセイによって観察した結果、海馬で 10 分以内に ERE 結合活性は原値の約 50% に低下し、この低下は 120 分に至っても見られ、24 時間後には原値に復していた。大脳皮質においても、ほぼ同程度の ERE 結合活性の低下が見られた (図-7)。このニコチンによる ERE 結合活性の低下は、ニコチン注射に先立って 3 mg/kg のメカミラミン、あるいは 64 mg/kg のニフェジピンを腹腔内注射することにより、いずれの場合にも完全に抑えられた。また、ニコチン注射に先立って、hsp90 阻害剤のゲルダナマイシン 3 mg/kg を注射した場合にも、ニコチンによる ERE 結合活性の低下は抑制された<sup>13)14)</sup>。

このニコチンによる ERE 結合活性の抑制のメカニズムについてさらに検討を加えた。ラットにニコチンを全身投与すると海馬で Raf-1、p-Raf、p-MAPK の免疫活性の増加がみられた。また、海馬で細胞質内 hsp90 の免疫活性は 30 分後にピークを持つ増加がみられ、120 分後には原値に復した。核については、60 分後にピークを持つ増加を示した。hsp90 がエストロゲン受容体の活性化に及ぼす作用はリガンド結合反応よりも下流の時点で働くことが推定されている。

以上の結果をまとめると、ニコチンによる細胞内  $Ca^{2+}$  の上昇を介して、MAP キナーゼカスケードが活性化され、その結果として hsp90 のアップレギュレーションを来とし、このアップレギュレートされた hsp90 がエストロゲン受容体:DNA コンプレックスを解離させることが、ニコチンが ERE 結合活性を抑制する現象の具体的メカニズムであり、このことによってニコチンはエストロゲンによる IGF-1 mRNA の発現を抑制することが明らかになった<sup>15)</sup>。さらに不死化さ

れた海馬神経細胞である分化 H19-7 細胞を用いた我々の実験により、ニコチンは海馬神経細胞で IGF-1 の発現を誘導すると共に、ER $\alpha$  の発現に抑制をかけることが分かった<sup>16)</sup>。IGF-1 の発現は、ニコチン性受容体  $\alpha 7$  サブタイプアンタゴニストの methyllycaconitine (MLA)、プロテインキナーゼ A 阻害剤の H7、または MAP キナーゼ阻害剤の PD98059 によって抑制された。ER $\alpha$  発現の抑制はメカミラミンによっては抑制されるが、MLA、H7、PD98059 によっては影響を受けないことも明らかになった。

### エストロゲンの存在が海馬神経細胞にとって重要である訳

エストロゲンの海馬神経細胞に対する記憶・学習機能促進作用、神経栄養因子様作用は脳の機能維持の上で雌雄、男女を問わず重要である。ヒトについていえば、成人期においては体内のエストロゲンの総量は、女性では周期的変動があるものの、基本的には男女の間で大差がない。女性の閉経期以後では同年齢の男女の間では、むしろ女性よりも男性の方が体内の女性ホルモンの量が多いことがわかっている<sup>17)</sup>。これはテストステロンが脂肪細胞や神経細胞でアロマターゼの作用によって、エストロゲンに変換されること、男性の体内のテストステロンの量の加齢による変化は、女性の閉経期以降におけるエストロゲンの体内量の減少のように急激でないことによる。さらに最近では、雌雄を問わず海馬神経細胞の中で卵巣と同様にコレステロールからエストロゲンが生合成され、神経細胞に対してパラクリン的に働くことが明らかになっている<sup>18)19)</sup>。

成熟脳における神経細胞の多くは、分裂終了細胞と考えられているが、脳室下帯、海馬歯状回などの特殊の部位では生涯を通じて神経細胞の新生が行われていることが知られており、これらの部位での神経細胞の新生能の活性度が加齢に伴う記憶・学習機能の維持、脳老化の進行度と深い関係があることが知られている。最近の研究でも海馬で新生された神経細胞のうち、

学習行為などを通して新しい情報がインプットされた新生神経細胞が選択的に生き延び、このことがさらなる神経回路網の形成を促進するという事実が指摘されている<sup>20)</sup>。この点でも、エストロゲンは重要な役割を演じている。何故ならばエストロゲンは IGF-1 の発現を誘導するという作用を通して、神経前駆細胞が成熟神経細胞に分化する上で細胞の増殖と分化という、一見逆方向ともとられる現象を共に促進することが出来るからである。このようにエストロゲンの海馬神経細胞に対する作用は非常に重要なものであるが、我々のこれまでの研究で、ニコチンそれ自体はエストロゲンと類似の情報伝達機構を通して神経細胞に対して有利に働きながら、このニコチンよりも海馬神経細胞に対して重要な作用を持つエストロゲンの作用を抑制するという、ニコチンの作用の二面性が明らかとなった。

### 海馬神経細胞の新生とニコチン

それでは海馬における神経細胞新生に対してニコチンはどのような影響を及ぼすであろうか？このことを明らかにするため以下の実験を行った。

Wistar系雄性ラットに2週間にわたって、PBS、ニコチン 0.1 mg/kg、0.5 mg/kg、または 1 mg/kg を注射した。これら4群それぞれのラットにつ

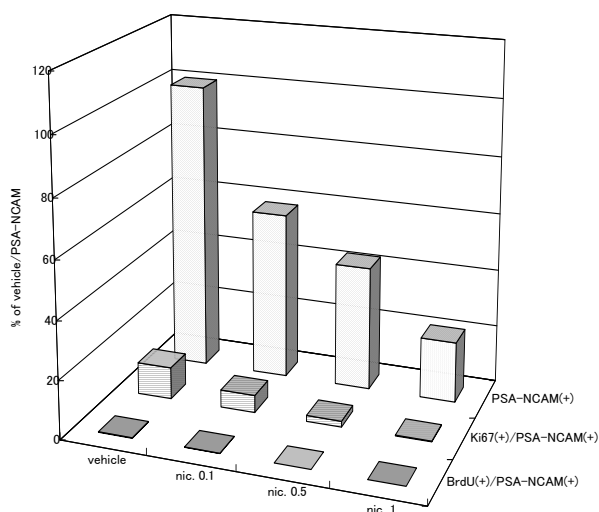


図-8 ニコチン投与と海馬における PSA-NCAM、Ki67、BrdU の陽性細胞数

いてその後、BrdU 50 mg/kg を連続 4 日間注射した。Hippocampal formation の連続垂直断面について PSA-NCAM、NeuN または GFAP を免疫組織化学的染色によって検出し、細胞分裂マーカーである BrdU または Ki67 との重染色をそれぞれについて行った。歯状回の顆粒細胞層及び多形細胞層を中心として免疫反応陽性の細胞の数を算定し、PSA-NCAM 陽性細胞、NeuN 陽性細胞、GFAP 陽性細胞、BrdU 陽性細胞、Ki67 陽性細胞の数の相互関係を検討した。

図-8でPBS注射ラットでのPSA-NCAM(+)細胞の数を100とした場合における比率をニコチンの投与量に従って示した。PSA-NCAM(+)細胞、BrdU(+)/PSA-NCAM(+)、およびKi67(+)/PSA-NCAM(+)細胞ともに、ニコチンの用量依存性に減少している状態が明らかである。

次の図-9では、PBS注射ラットでのNeuN(+)細胞の数を100とした場合における比率をニコチンの投与量に従って示した。NeuN(+)細胞、BrdU(+)/NeuN(+)、およびKi67(+)/NeuN(+)細胞ともに、ニコチンの用量依存性に減少している状態が明らかである。図-10ではPBS注射ラットでのGFAP(+)細胞の数を100とした場合における比率をニコチンの投与量に従って示した。GFAP(+)細胞、BrdU(+)/GFAP(+)、およびKi67(+)/GFAP(+)細胞ともに、0.1 mg/kg および 0.5 mg/kg のニコチンではコントロールに比して有

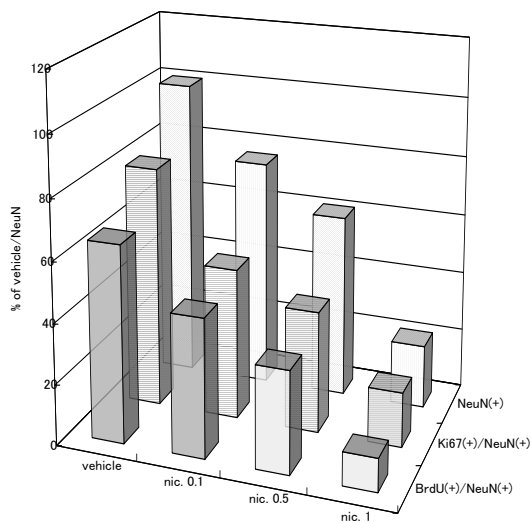


図-9 ニコチン投与と海馬における NeuN、Ki67、BrdU の陽性細胞数

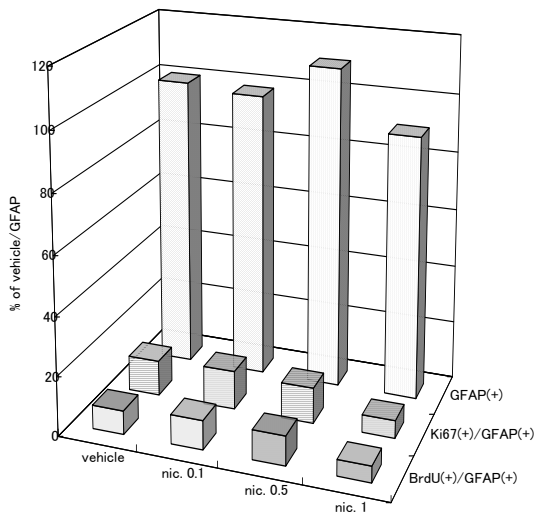


図-10 ニコチン投与と海馬における GFAP、Ki67、BrdU の陽性細胞数

意の変化は認められない。ニコチン 1 mg/kg で、はじめて GFAP(+) 細胞、BrdU(+)/GFAP(+), および Ki67(+)/GFAP(+) 細胞のいずれにおいても、軽度の減少がみられた。

これらの結果はニコチンが、成熟脳において

も神経細胞の新生が行われているとされている海馬歯状回の細胞に対して、神経新生に伴う可塑性のマーカーともいえるべき PSA-NCAM 陽性細胞の数、神経細胞のマーカーである NeuN 陽性細胞の数をともに用量依存的に減少させる一方で、アストログリアのマーカーである GFAP 陽性細胞の数に対しては影響が少ない事を示している。

細胞周期 S 期 DNA 合成時におけるマーカーである BrdU、またはすべての活動性細胞周期に発現している Ki67 と、PSA-NCAM、NeuN、GFAP それぞれとの重染色の結果では、これらの細胞分裂のマーカーと PSA-NCAM または、NeuN とが共に陽性の重染色像を示した細胞の数はニコチンの用量依存的に減少した。これらの細胞分裂マーカー陽性で且つ、GFAP 陽性の細胞の数についてはニコチン 0.1 mg/kg、ニコチン 0.5 mg/kg では全く影響が無く、ニコチン 1 mg/kg ではじめて有意の減少を示した。この実験で算定した

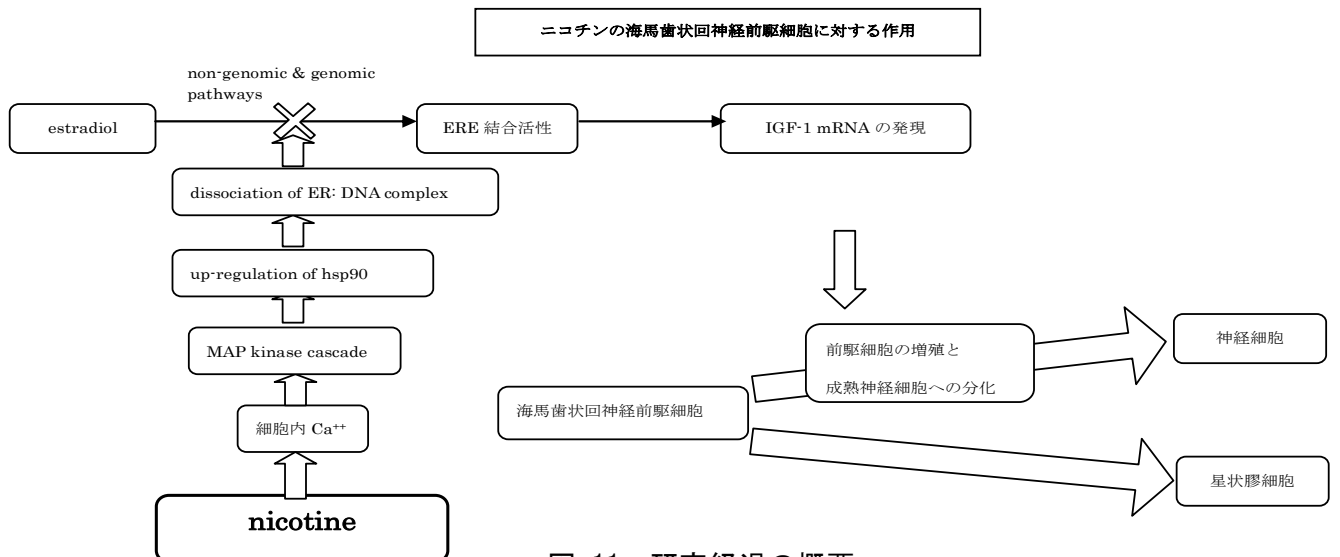
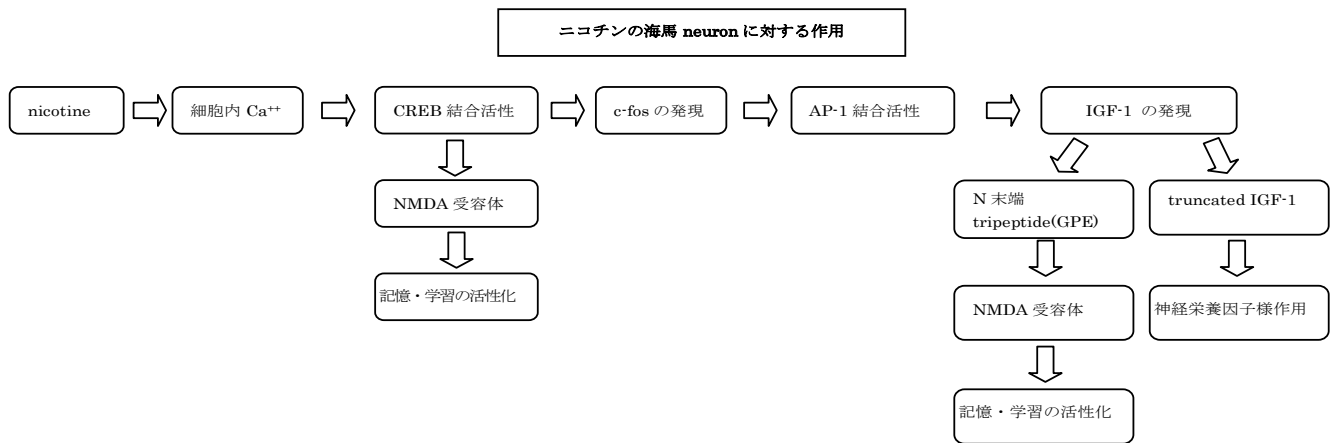


図-11 研究経過の概要

BrdU(+) 細胞はすべて Ki67(+) を示していた。アポトーシス進行中の細胞では、BrdU 陽性であっても Ki67 に対しては陰性であることが知られているので、本実験の条件下では、アポトーシスの進行過程にある細胞は僅少であるといえる。これらのことから、ニコチンは神経細胞の分裂、新生に対して用量依存的な抑制をかけることが示された。また、ニコチンは少なくとも直接的には神経細胞死を促進させるものではないことも分かった<sup>21)22)</sup>。

### ニコチンの海馬神経細胞に対する作用の 二面性

ニコチンの神経細胞に対する作用には、成熟細胞に対する有利な面と、幼若細胞に対する不利な面の両方が存在する事が明らかになった。この不利な面はニコチンがエストロゲンの作用を抑制することによることが大きいと考えることができる。以上の実験経過をフローチャートにしたものが図-11 である。

これらの研究を通して、我々はニコチンの海馬神経細胞に対する作用を、神経細胞に対して神経栄養因子として働いたり、認知機能を高めたりするプラスの面と、同様に神経細胞に対して有利な効果を持つエストロゲンの作用を抑制し、さらには、このエストロゲン抑制作用の結果として、発生途上の神経細胞に対して、その成熟神経細胞への分化を抑止するという意味でのマイナスの面の両面にわけて、そのメカニズムを明らかにした。

本研究は喫煙科学研究財団からの研究助成によってなされたものであり、深謝する。

### 文 献

- 1) Yamazaki Y, Jia Y, Niu R, Sumikawa K. Nicotine exposure *in vivo* induces long-lasting enhancement of NMDA receptor-mediated currents in the hippocampus. *Eur J Neurosci* 2006; 23: 1819-28.
- 2) Rosato-Siri MD, Cattaneo A, Cherubini E. Nicotine-induced enhancement of synaptic plasticity at CA3-CA1 synapses requires GABAergic interneurons in adult anti-NGF mice. *J Physiol* 2006; 576: 361-77. Epub 2006

- Jun 27.
- 3) Zhang J, Liu Q, Chen Q, Liu NQ, Li FL, Lu ZB, Qin C, Zhu H, Huang YY, He W, Zhao BL. Nicotine attenuates beta-amyloid-induced neurotoxicity by regulating metal homeostasis. *FASEB J* 2006; 20: 1212-4.
- 4) Semba J, Miyoshi R, Kito S. Nicotine protects against the dexamethasone potentiation of kainic acid-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 1996; 35: 335-8.
- 5) Kito S, Semba J, Miyoshi R, Furutsu M, Ando A, Shimada L. A cytoprotective effect of nicotine on hippocampal neurons. *Soc for Neurosci Abstr* 1993; 19, 772. 15.
- 6) 鬼頭昭三、新郷明子、三好理絵、中村敏一、対馬敏夫. グルココルチコイドの海馬ニューロンに対する毒性のニコチンによる修飾. 平成7年度喫煙科学研究財団研究年報 1995; 742-8.
- 7) 鬼頭昭三、新郷明子、三好理絵. Neuronにおける nicotine-estrogen 機能相関に関する研究. 平成8年度喫煙科学研究財団研究年報 1997; 628-32.
- 8) 鬼頭昭三、新郷明子. Neuronにおける nicotine-estrogen 機能相関に関する研究. 平成9年度喫煙科学研究財団研究年報 1998; 638-43.
- 9) 新郷明子、鬼頭昭三. 脳内 IGF-1 mRNA 発現とニコチン-エストロゲン機能相関. *医学と生物学* 1998; 137: 167-72.
- 10) Sara VR, Carlsson-Skwirut C, Drakenberg K, Giacobini MB, Hakansson L, Mirmiran M, Nordberg A, Olson L, Reinecke M, Stahlbom PA, Sandberg Nordqvist AC. The biological role of truncated insulin-like growth factor-1 and the tripeptide GPE in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 692: 183-91.
- 11) 新郷明子、鬼頭昭三. インスリン様成長因子の生理的意義と臨床応用. *日本農芸化学会誌* 1998; 72(2): 175-9.
- 12) Shingo A, Kito S. Estrogen induces elevation of cAMP-dependent protein kinase activity in immortalized hippocampal neurons: imaging in living cells. *J Neural Transm* 2002; 109: 171-4.
- 13) Shingo A, Yonezawa M, Sakurai K, Kito S. Nicotine inhibits estrogen response element binding in the rat brain. *J Neural Transm* 2000; 107: 1491-5.
- 14) 新郷明子、鬼頭昭三. エストロゲンによる脳内 Insulin-like Growth Factor-1 mRNA 発現に対するカイニン酸、ニコチンの影響. *医学と生物学* 2005; 149: 225-31.
- 15) 鬼頭昭三、新郷明子、米澤摩耶. 何故、nicotine は海馬 neuron に対して有利に働くか? -*in vitro* 実験的研究-. 平成13年度喫煙科学研究財団研究年報 2002; 678-82.

- 16) 鬼頭昭三、新郷明子、米澤摩耶、櫻井香織. 何故、nicotine は海馬 neuron に対して有利に働くか? -*in vitro* 実験的研究-. 平成 12 年度喫煙科学研究財団年報 2001; 682-7.
- 17) 鬼頭昭三. 脳を活性化する性ホルモン. 講談社 2003.
- 18) Kretz O, Fester L, Wehrenberg U, Zhou L, Brauckmann S, Zhao S, Prange-Kiel J, Naumann T, Jarry H, Frotscher M, Rune GM. Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J Neurosci* 2004; 24: 5913-21.
- 19) Mukai H, Takata N, Ishii HT, Tanabe N, Hojo Y, Furukawa A, Kimoto T, Kawato S. Hippocampal synthesis of estrogens and androgens which are paracrine modulators of synaptic plasticity: synaptocrinology. *Neuroscience* 2006; 138: 757-64.
- 20) Tashiro A, Sandler VM, Toni N, Zhao C, Gage FH. NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature* 2006; 442: 929-33. Epub 2006 Aug 13.
- 21) Shingo A, Kito S. Effects of nicotine on neurogenesis and plasticity of hippocampal neurons. *J Neural Transm* 2005; 112: 1475-8.
- 22) 鬼頭昭三、新郷明子. 海馬細胞の発生、可塑性に与えるニコチンの影響. 平成 17 年度喫煙科学研究財団研究年報 2006; 592-7.