

ニコチン受容体の生体内分布・発生・分化とそのダイナミズム (1999-2003)

三須 良實*

本特定研究は、できる限り包括的に研究の進展をはかるため、神経細胞系3グループ、血管系2グループ、血液系としてのリンパ球1グループ、及び内分泌系としての膵ランゲルハンス島における insulin 分泌系1グループから構成し、「ニコチン受容体の生体内分布・発生・分化とそのダイナミズム」のタイトルのもとに、それぞれの実験系に発現あるいは存在する神経型のニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) の subunits の解析、あるいは細胞内情報伝達系の解明、さらに、今後の重要なターゲットの一つになると考えられる nAChR の downregulation あるいは upregulation の機序の解明に直結しうる、生きて機能している nAChR の生体内運命等の諸問題の解明に、糸口を作り、道を開く事を目的とした。

各グループの研究者はそれぞれの研究領域において、すでに、特徴のある優れた業績をあげて来ており、それらを基盤として、本研究を進展させる事ができたため、以下に記載するように、ニコチンあるいは喫煙の諸作用に関して、従来になかった、優れた、また、極めてユニークな成果を達成する事ができた。今後は、それぞれの研究領域において、様々な病態に対する新しい創薬のターゲットになりうる方向性を探索していく必要がある。

川島紘一郎グループはリンパ球に発現する神経型 nAChR サブタイプの同定と生理的役割、及びニコチン・喫煙のリンパ球機能に及ぼす影響を nAChR の機能変化の面から追究する事を目的

とした。

正常ヒト並びに各種培養株リンパ球における多種の神経型 nAChR subunits の発現、T および B 細胞における主として $\alpha 7$ nAChR を介する細胞内 Ca^{2+} シグナルの上昇、c-fos 並びに interleukin-10 等の発現、長期ニコチン曝露 (2-8 週) は T 細胞における種々の nAChR subunits 遺伝子発現の低下のうち、特に $\alpha 7$ nAChR の著明な低下、細胞内 Ca^{2+} シグナル上昇等の著明な downregulation を示す一方、ムスカリン性 AChR を介する細胞内シグナル伝達には影響しない知見、さらに、喫煙による $\alpha 5$ 及び $\alpha 7$ nAChR subunits の遺伝子発現の低下等の重要な知見を示した。

結論として、ニコチンは、主として $\alpha 7$ nAChR を介して Ca^{2+} シグナルを惹起し、短期的には種々の細胞内カスケードの活性化または抑制によりリンパ球機能に影響する一方、長期的には、種々の nAChR 発現の低下を介してリンパ球機能を抑制する方向に作用する可能性を示し、また、 $\alpha 7$ nAChR を遮断または活性化する物質は、免疫機能調節薬としての有用性を持つ可能性、喫煙による $\alpha 7$ nAChR の機能抑制が免疫活性の変化と密接に関連している可能性等を示唆した。

今後の展開として、喫煙者及び非喫煙者の末梢血 T および B 細胞における nAChR subunits 遺伝子発現の種類と量的変化、長期ニコチン投与動物モデル及び免疫異常動物モデルにおけるリンパ系コリン作動系活性の変化・抗体産生能の変化等を検討し、各種免疫異常に対する新規治療薬の開発の方向性を探索するべきであろう。

* 横浜市立大学名誉教授、朋友会しのぶ病院

畠中寛、中山均グループはニコチンの中枢性応答が、神経終末に存在する神経型 nAChR 活性化による神経伝達物質遊離のみでは説明できないとの観点から、PC12h 培養細胞を用い、Ca²⁺ シグナルに続く、外界から核へ刺激を伝達する系としての ERK (p42/44 MAP kinase) リン酸化→転写因子 CREB リン酸化経路、並びに生存シグナル系の PI3 kinase/Akt 経路の活性化過程を各種阻害薬を用いて明らかにする事を目的とした。

成果並びに結論として、ニコチン 1 μM は α7 subunit を介して極めて軽度の Ca²⁺ シグナルを示したにすぎなかった。一方、100 μM は解析可能な Ca²⁺ シグナルを示し、一過性にリン酸化を促進、細胞内シグナル伝達経路として、神経細胞の樹状突起あるいは細胞体に存在すると想定される、非 α7 subunit (α3β4 または α3β4α5) 活性化→L-型電位依存性 Ca²⁺ チャネル→カルモジュリン (CaM) kinase II → epidermal growth factor 受容体 (EGFR) → Ras-MAP kinase カスケード→ERK リン酸化→CREB リン酸化の過程をたどる事、一方また、PI3 kinase/Akt 経路をも活性化するが、この経路は ERK リン酸化経路と初期過程は同じだが、EGFR の下流で分岐する事、tyrosine kinase 活性の有る Src は EGFR の下流でニコチンの Akt リン酸化作用を調節する事、さらに、ニコチンは α7 その他の subunits の活性化を介して、小胞体ストレスを誘導する tunicamycin の神経細胞死を保護、一方この作用は PI3 kinase 阻害薬では抑制されない等の結果を示した。

今後の展開としては、一過性にすぎないニコチンによる ERK、CREB、Akt リン酸化とニコチンの薬理作用とをどのように関連させるのか、より変化分の大きい持続的な系をターゲットにするべきであろう。例えば、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体活性化による長期増強の際の Ca²⁺ 流入が細胞内シグナル伝達の増強、持続に変換されうる系に、ニコチンが関与しうるかどうかな等の検討が必要であろう。また、PC12h 培養株を用いているが、脳のニューロンとは異なる点から、得られる成果には自ずと限

界が有り、今後は初代培養脳細胞系をはじめ、脳のニューロンを用いて、細胞内シグナル伝達機構の多様性等を検討するべきであろう。さらに、小胞体ストレスそのものによる神経細胞死をニコチンが保護するのか等を含めて、ニコチンの tunicamycin 誘起神経細胞死保護作用の機序を明確にする必要がある。

石川義弘グループは神経型 nAChR の生体内分布・発生に影響を及ぼす細胞内セカンドメッセンジャー系のうち、cAMP シグナルを中心とし、特に神経細胞膜内における cAMP 産生酵素のアデニル酸シクラーゼサブタイプの発現・分布と nAChR サブタイプの発現・分布との物理的・機能的関連について検討する事を目的とした。

PC12 細胞の細胞膜 light vesicle fractions の内、カベオリン分画に相当する flotilin 分画の 4-6 fractions に、局在性に α7 subunit 及びアデニル酸シクラーゼ 6 型が共存し、免疫沈降実験から、両系は、物理的に共役している事、また、ニコチン 10⁻⁵-10⁻⁴ M が用量依存性に Ca²⁺ シグナル増幅を介して forskolin 刺激による cAMP 生成を抑制し、この抑制が α7 nAChR 拮抗活性を有する α-bungarotoxin により拮抗され、また methyl-β-cyclodextrin を用いたコレステロール枯渇により消失した知見から、両系は機能的にも共役しているとの知見を示した。さらに 5 型アデニル酸シクラーゼ欠損モデルを作成、線条体限局性の同酵素活性の減少、ドパミン誘起の各種行動薬理学的応答として、協調運動能、自発運動能等の低下を示した。

結論として、従来想定されていた均一的な膜内分布の概念と異なって、α7 nAChR と 6 型アデニル酸シクラーゼは物理的にも機能的にも密接に共役し、細胞膜内でも強い局在性を示し、ニコチンは α7 nAChR 刺激→Ca²⁺ 流入→6 型アデニル酸シクラーゼの活性調節を介して cAMP 生成を抑制、中枢機能に重要な役割を果たすと示唆した。

今後の展開として、アデニル酸シクラーゼとの共役のなかった α5、β2 subunits 等の細胞膜

内局在性 (9-13 fractions) がどのような神経機能制御と関連するか、cAMP シグナルと nAChR シグナルのクロストークの意義を明確にするため、5 型アデニル酸シクラーゼ欠損動物等を用いて、線条体に標的を絞り、nAChR シグナルに及ぼす影響、さらに、各種脳変性疾患、脳虚血における脳神経細胞アポトーシス制御機構等について、このクロストークの果たす役割をアルツハイマー病等の予防あるいは治療に関連させ得る方向性をめざして検索する事が肝要であろう。

安田浩一郎グループはラット単離膵ランゲルハンス島 β 細胞における神経型 nAChR subunits の発現、nAChR 刺激が insulin 分泌に及ぼす影響、ならびにその作用機序を検討する事を目的とした。ラット単離ランゲルハンス島において、少なくとも、4 種の $\alpha 2$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 7$ subunits、3 種の $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ subunits が発現、ニコチンの低濃度 10^{-7} 及び 10^{-6} M は Ca^{2+} シグナル増加を介して、insulin 分泌を促進、この促進は、 α -bungarotoxin により拮抗され、また、糖尿病ラットにおいては、正常ラットに比し、反応性は残るものの減弱を示した。ニコチンの低濃度は phosphodiesterase 阻害薬の存在のいかんに関わらず、cAMP 生成に無作用であった。一方、高濃度ニコチン 10^{-4} M は Ca^{2+} シグナルに無効果、cAMP 生成を減少する結果、insulin 分泌を抑制し、この抑制も α -bungarotoxin により拮抗された。

結論として、低濃度ニコチンは主として $\alpha 7$ nAChR を刺激して、 Ca^{2+} シグナルを上昇し、insulin 分泌を促進、一方、高濃度ニコチンは $\alpha 7$ nAChR を刺激して、cAMP 生成を減少する結果、insulin 分泌を抑制するとした。

今後の展開として、ランゲルハンス島 β 細胞に発現する他の nAChR subunits の役割を検討するとともに、細胞内 Ca^{2+} シグナル系と cAMP 生成調節系の 2 系の直接のターゲットとなる分子を検索、ニコチンとの親和性の違いと相互の関連について検討を進め、従来の糖尿病治療薬と

は異なる insulin 分泌調節薬の開発につなげ、2 型糖尿病治療への応用を検討したいとした。

岡村富夫グループはイヌ脳及び末梢血管を用いて経壁電気刺激に対する弛緩及び収縮応答に一致するニコチン誘起弛緩及び収縮応答の作用機構を血管支配神経との関連において検討すると共に、関与する神経型 nAChR のサブタイプを薬理的に解析する事を目的とした。

ニコチンの摘出脳動脈弛緩作用は β -遮断薬、CGRP 除神経薬のカプサイシン、tetrodotoxin (TTX) 及び Ca^{2+} 拮抗薬により抑制されず、CaM 拮抗薬、 Ca^{2+} -CaM 依存性 protein kinase II 阻害薬、NO 合成酵素阻害薬、hexamethonium、mecamylamine により抑制され、ニコチンが窒素酸化物を遊離すると共に、組織内 cGMP 含量を増加した知見から、その機序はニコチンが nAChR を介して、内皮非依存性に NO 神経に作用し、活動電位の発生を伴わずに流入した Ca^{2+} が $CaM \rightarrow Ca^{2+}$ 依存性 CaM protein kinase II \rightarrow NO 合成酵素 \rightarrow NO 放出 \rightarrow グアニル酸シクラーゼ \rightarrow cGMP 生成の系を活性化する事によるとした。関与する nAChR は、作動薬強度順位がエピバチジン $>$ ニコチン $>$ アナトキシン-a $>>$ シチシンとなる一方、 $\alpha 4\beta 2$ サブタイプ選択性作動薬の RJR2403 は弛緩を示さず、また、拮抗薬遮断活性順位は $\alpha 3\beta 4$ サブタイプ選択性の neosurugatoxin が最強、 $\alpha 7$ サブタイプ選択性の α -conotoxin IMI と α -bungarotoxin は拮抗を示さない等の知見から $\alpha 3\beta 4$ サブタイプと判定した。さらに、ニコチンは生体位脳底動脈をも弛緩した。他方、末梢動脈系においては、同様にニコチンは $\alpha 3\beta 4$ nAChR を刺激して交感神経からノルアドレナリン、NO 神経から窒素酸化物 (NO) を遊離し、この両物質の拮抗的二重支配のバランスにより収縮あるいは弛緩の動脈応答性が定まり、多くの場合、ノルアドレナリン性収縮神経が優位である事を示した。

結論として、ニコチンは血管壁に存在する支配神経終末に存在する $\alpha 3\beta 4$ nAChR に作用し、神経伝達物質の遊離を介して血管緊張を変化さ

せ、生理的な支配神経の分布から、頭蓋内の動脈を拡張させ、多くの末梢動脈を収縮させるとした。

今後の展開として、薬理的解析に留まらずに、方法論的多様性をめざすべきであろう。また、ニコチン性作動薬の臓器選択的な循環調節の可能性、nAChR 機能の加齢、老化、あるいは血管系各種病態における変動の可能性等を探索すべきであろう。

川崎博己グループはラット腸間膜動脈抵抗血管には交感神経のみならず、強力な血管弛緩活性を示す CGRP を伝達物質とする CGRP 神経が高密度に分布している所見から、ニコチンが神経型 nAChR を介して、血管周囲神経、特に CGRP 神経に作用を及ぼす結果として血管弛緩作用を起こすのではないかと想定し、この仮説を神経薬理的に検討する事を目的とした。

ニコチン 1-100 μM は濃度依存性、血管内皮非依存性の血管拡張作用を示し、この作用は、nAChR 拮抗薬、交感神経除神経、同ニューロン遮断薬、カプサイシンによる CGRP 神経の除神経、CGRP 受容体拮抗薬で抑制される等の知見から、ニコチンの拡張作用には交感神経と CGRP 神経両者の存在が必要であると判断した。同拡張作用は交感神経から遊離されるカテコールアミン、ニューロペプチド Y、ATP、アデノシン、グルタミン酸等の受容体拮抗薬では抑制されず、一方、CGRP 神経上に分布するバニロイド受容体の拮抗薬により抑制された知見から、同作動物質として酸（プロトン）を想定、ニコチン拡張作用がプロトンポンプ阻害薬のオメプラゾールにより抑制されるとの新しい知見を示した。さらに、プロトン (HCl) 0.01 N は拡張作用を示し、この作用はバニロイド受容体拮抗薬及びカプサイシン処理により遮断されるとの知見を示した。

結論として、ニコチンは交感神経終末に存在する nAChR を刺激して、プロトンを放出する可能性が高く、このプロトンが CGRP 神経上のバニロイド受容体を刺激して、CGRP を遊離し、CGRP

が抵抗血管を拡張するとの、全く新しいユニークな仮説を提起した。

今後の展開としては、手段をつくして、プロトン伝達物質説を実証する必要がある。特に、プロトンが交感神経由来である事を示す必要がある。また、関与する nAChR のサブタイプを検討する要あり。さらに、ニコチン→nAChR→交感神経→CGRP 神経→CGRP 遊離→血管拡張の系の機能の変動が、例えば、高血圧の発症及び維持に関与しているのかどうか等を含めて、新しい nAChR の分布・分化とそのダイナミズムの研究が、新規創薬の開発の可能性をも含めて、さらに、進展する方向性を探索すべきであろう。

赤池昭紀グループは、従来から、ニコチン性 ACh 神経系がグルタミン酸神経毒性に対して保護作用を発現すると提唱してきたが、神経型 nAChR が中枢神経系諸部位におけるニューロン生存機構に果たす役割を明らかにするため、大脳皮質及び中脳の培養ニューロン系を用いて、nAChR の神経保護作用の機序を解析すると共に、中枢性 ACh esterase (AChE) 阻害薬の神経保護作用機序を解明する事を目的とした。

ラット新生児中脳切片において、高濃度 K^+ 慢性処置による持続性脱分極はドパミンニューロンの NMDA 神経毒性に対する抵抗性を増大、一方、TTX 及び nicardipine の慢性投与は毒性発現、forskolin 及び膜透過性 cAMP アナログは TTX 及び nicardipine の毒性を抑制、nAChR 拮抗薬の hexamethonium 及び mecamlamine の単独投与は無作用、一方、ニコチン 1-10 μM 慢性投与はドパミンニューロン数を増加した。培養中脳細胞において、ニコチン 1-100 μM はグルタミン酸神経毒性を著明に抑制、培養大脳皮質ニューロンにおいて、ニコチン 10 μM は適度、一過性に、 Ca^{2+} を流入し、この作用は $\alpha 4\beta 2$ nAChR の選択的拮抗薬 dihydro- β -erythroidine 及び α -bungarotoxin により拮抗され、また、同ニューロンに $\alpha 4$ 及び $\alpha 7$ subunits の発現が確認された。これらの知見はニューロン生存には神経活動に伴う適度な Ca^{2+} 流入と cAMP 産生が重要な

役割を果たしており、持続的な $\alpha 4$ 及び $\alpha 7$ nAChR 刺激も神経活動性ニューロンの生存を促進する作用がある事を示している。一方、アルツハイマー病治療作用のある donepezil、tacrine、galanthamine はグルタミン酸神経毒性を抑制、この神経保護作用は AChE 阻害活性とは相関せず、donepezil、galanthamine の保護作用は dihydro- β -erythroindine 及び $\alpha 7$ nAChR 選択性拮抗薬 methyllycaconitine により拮抗された。3 種の中枢性 AChE 阻害薬の 4 日間投与は $\alpha 4$ 及び $\alpha 7$ subunits 発現細胞数、免疫染色性を増加して nAChR の upregulation を生じ、その作用には nAChR のタンパクレベルの制御が重要な役割を果たす事が示唆された。

結論として、神経型 nAChR 刺激は、細胞内への適度な Ca^{2+} 流入を持続的に誘起し、cAMP 系等の細胞内情報伝達系を賦活する結果としてニューロン生存を促進し、さらに、中枢性 AChE 阻害

薬は、内在性 ACh を介さず、直接あるいは間接的に nAChR を刺激する事により神経細胞死保護作用を発現するとした。

今後の展開として、神経型 nAChR を介する神経細胞死保護作用機構のさらなる解析から中枢性 ACh 神経系の新たな生理機能の解明、新規創薬ターゲットの発見に至る発展をはかるべきであろう。アルツハイマー病治療薬の中枢性 nAChR を介する神経保護作用機構のさらなる解明から、nAChR、ニューロン生存を標的とする新規アルツハイマー病治療の方向性を探索するべきであろう。さらに、nAChR・イオンチャネルの制御機構を分子レベルで解析する事により、nAChR が作動薬非存在下においても神経細胞死保護活性等を示す可能性を証明するとともに、nAChR の upregulation の作用機構をも解明する必要がある。

総括検討会発表課題

(2004 年 1 月 16 日 開催)

発表課題名	機関	発表研究者
リンパ球に発現するニコチン受容体サブユニットの遺伝子的解析と機能の検討	共立薬科大学	川島紘一郎
神経細胞におけるニコチン刺激に伴う細胞内シグナル伝達機構	奈良県立医科大学	中山 均
セカンドメッセンジャー及びリン酸化の果たす役割	横浜市立大学	石川 義弘
膵ランゲルハンス島におけるニコチン受容体の発現調節と膵内分泌機構の関連	京都大学	安田浩一郎
ニコチンの血管作用—特に血管支配神経機能との関連について—	滋賀医科大学	岡村 富夫
ペプチド作動性血管拡張性神経機能に及ぼすニコチンの影響	岡山大学	川崎 博己
神経細胞の死と再生におけるニコチン受容体の役割	京都大学	赤池 昭紀