



Title	Nicotine inhibits estrogen response element binding in the rat brain
Author(s)	新郷, 明子
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46044">https://hdl.handle.net/11094/46044</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 <sup>しん</sup>新 <sup>ごう</sup>郷 <sup>あき</sup>明 <sup>こ</sup>子

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 8 9 4 7 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 16 年 6 月 23 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学 位 論 文 名 Nicotine inhibits estrogen response element binding in the rat brain  
(ラット脳におけるエストロゲン応答配列結合に対するニコチンによる抑制)

論 文 審 査 委 員 (主査)  
教 授 遠山 正彌

(副査)  
教 授 武田 雅俊 教 授 三木 直正

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔目 的〕

estrogen が記憶・学習促進作用をもち、傷害された神経細胞に対しては修復系として働くことから、アルツハイマー病などの神経疾患に対して発症抑制、症状緩和などを目的とした応用が検討されている。nicotine も記憶・認知能促進作用があることが知られている。一方、喫煙女性では非喫煙女性に比して閉経が有意に早期であることも知られ、このことは nicotine が estrogen 作用に対して抑制的に働くことが理由として考えられるが、その機構は明らかではない。

従来の実験より、ラットに nicotine を全身投与すると、海馬・大脳皮質で AP-1 および CREB 結合能が上昇し、IGF-1 mRNA が誘導され、さらにこれらの反応は nifedipine の併用投与によって抑制されることを確認している。また、ラット海馬培養神経細胞に nicotine を加えると細胞内 Ca ion 濃度の一過性上昇が見られることをも認めている。このような Ca ion 濃度の上昇、AP-1 および CREB 結合能の上昇、IGF-1 mRNA 発現の誘導は、17 $\beta$  estradiol の投与によっても確認しており、その反応程度は nicotine によるものよりも大きかった。即ち、nicotine と estradiol は神経細胞に対して同方向に働き、IGF-1 の誘導を介して有利に働くと考えられる。しかし、nicotine と estradiol を同時投与すると、その結果は相加的なものではなく、抑制されたものであった。

本論文では、nicotine が estrogen の神経細胞に対する作用を抑制するという機構を検討することを目的とした。

### 〔方法ならびに成績〕

#### 方法

##### ● 核タンパク抽出

Wistar 系雄性ラット（6 週齢）に nicotine 1 mg/kg を腹腔内投与し、10、30、45、60、90、120 分、24 時間後に sacrifice した。Nicotine 投与に先立ち、mecamylamine 3 mg/kg 或いは nifedipine 64 mg/kg を投与した動物も併せて作製した。sacrifice 後、海馬と大脳皮質から核タンパクを抽出した。

##### ● gel shift assay

核タンパク (5  $\mu$ g) を estrogen response element (ERE) の consensus sequence を含む FITC 標識 oligonucleotide probe と共に、25°C で 30.5 分間反応させた。その後、PAGE によって分離し、DNA-タンパク結合を検出した。

得られた結果は平均値と標準偏差をもって表し、student *t*-test により検定を行った。

#### 成績

nicotine を全身投与したラットの海馬において、ERE 結合能は 10 分以内に原値の約 50% に低下し、これは 120 分に至っても持続した。大脳皮質においてもほぼ同程度の低下が見られた。この nicotine による低下は、予めの mecamlamine 或いは nifedipine の投与により、完全に解除された。

#### 〔総括〕

ラットに nicotine を全身投与した後、海馬・大脳皮質における ERE 結合能を gel shift assay によって経時的に観察した。nicotine は、この結合能を即時的且つ著明に抑制し、その抑制は 120 分に至るまで継続し、24 時間後には原値に復していた。nicotine によるこの低下は、予めの mecamlamine 或いは nifedipine の投与によって解除された。

海馬、大脳皮質における nicotine によるこのような ERE 結合能低下の詳細な機構は、今後の検討課題である。その後の継続実験で、nicotine 投与により Raf-1、リン酸化 Raf-1、リン酸化 Erk1/2 発現の一過性の上昇に続き、hsp90 の上昇を確認している。また、nicotine 投与に先立ち、hsp90 inhibitor の geldanamycin を前投与した場合にも nicotine による ERE 結合能低下の抑制を認めている。このことから、nicotine が Ca ion の流入を介して MAP kinase cascade を亢進させ、結果として hsp90 を up-regulate し、この hsp90 が estrogen 受容体と DNA の結合に影響を与える可能性が考えられる。また、nicotine が estrogen 受容体のリガンド結合能に影響を与えたり、estrogen 受容体の発現そのものに作用することも考えられる。

神経細胞に対して nicotine は、単独では estrogen と同方向の作用を示しながらも、同時投与では estrogen の作用を抑制する。この機構の少なくとも一部は、nicotine が ERE 結合能を抑えることによって estrogen の作用に対し negative に働く結果である。

### 論文審査の結果の要旨

申請者は、エストロゲンがラット海馬において IGF-1m RNA を誘導することによって神経保護作用を発揮する、この作用がニコチンによって抑制されるとする自らの実験結果を基にして、そのメカニズムを明らかにするための研究を行った。その結果、次のような成績を得た。1. ラットにニコチンを投与すると、海馬で、ERE 結合活性が迅速に、かつ著明に低下し、120 分後に至っても持続していた。この ERE 結合活性はメカミラミンあるいはニフェジピンによって解除された。2. この実験条件下で海馬細胞質内 hsp90 は 30 分後にピークを持つ増加を示した。3. このニコチンによって誘導された hsp90 には estrogen 受容体が結合していることを確認した。

申請者は、これらの結果からニコチンが ERE 結合活性を低下させるのは、ニコチンによって up-regulate された hsp90 が、estrogen 受容体と ERE との結合を阻害するためとしている。この論文について審査を行った結果、論文審査担当者は本論文が博士（医学）の学位授与に値すると判断した。