

# 神経細胞型ニコチン性アセチルコリン受容体を介した 細胞保護作用と細胞増殖促進作用

奈良県立医科大学薬理学教室

中山 均

## NEURONAL NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR –MEDIATED CYTOPROTECTION AND CELL PROLIFERATION

HITOSHI NAKAYAMA

*Department of Pharmacology, Nara Medical University School of Medicine*

Received April 20, 2007

**Abstract** : 神経細胞型ニコチン性アセチルコリン受容体はおもに神経細胞に発現し、神経伝達および神経伝達の調節に関与している。一方、非神経系組織でも同受容体の発現が近年確認され、神経系とは異なる働きが示唆されている。本稿では神経細胞型ニコチン性アセチルコリン受容体を活性化した時にみられる神経細胞の保護および非神経細胞の増殖、アポトーシス抑制への関与についての最近の知見を紹介し、考察する。

**Key words** : acetylcholine receptor, apoptosis, cell proliferation, neuroprotection, nicotine, nicotinic

### はじめに

今でも、ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)に関する誤解や混乱がしばしば見られる。たとえば、「nAChRはイオンチャネル型受容体で活性化されると一価カチオンの透過性が変わり、脱分極をおこし迅速な神経伝達を担う」。これは骨格筋では正しいが神経細胞ではnAChRの性質の一面に過ぎない。分子神経生物学の初期の筋肉型nAChRに関する成果が目覚しかったためにそれが全てであるかのような誤解を生じたのであろう。脳のnAChRの機能は主に神経終末に存在し、神経伝達物質の放出を調節するサブタイプを中心に研究が進められた。このnAChRに内在するイオンチャネルのカルシウム透過性は極めて高い。脳では脱分極に伴う迅速な神経伝達に直接関与するnAChRの研究はむしろマイナーである。アゴニストであるニコチンの多彩な中枢作用は上記の筋肉型nAChRでは説明できない。各種サブタイプについての知見もムスカリン受容体ほど正確には知られていない。

近年では骨格筋や神経細胞以外の組織・細胞でもnAChRの報告が相次ぎその機能が注目されるようになった。特に、ニコチンの血管内皮細胞や癌細胞の細胞増殖作用が注目される。一方、ニコチンの神経細胞保護作用の報告も増加している。この場合、nAChRが活性化されたのちに短時間でおきる効果と長時間にわたる保護作用は区別する必要がある。短時間の効果の多くは受容体活性化に伴いカルシウムが流入し、いわゆる刺激一分泌連関により神経伝達物質が放出された結果おきる現象である。一方、これより長時間を要する保護作用の機構は不明な点が多い。コリン作動性神経が障害されるアルツハイマー病の治療では、アセチルコリンエステラーゼ(AChE)を阻害するとシナプスのアセチルコリン濃度が高まりnAChRの活性化が高まると想定されているがこれは神経細胞の保護ではない。これとは別に培養細胞では、アルツハイマー病治療薬として用いられるAChE阻害剤がnAChRに直接アゴニストとして作用し、神経細胞を保護する性質があることも近年報告されている。本稿ではこの分野の研究者以外にはあまりなじみのない

nAChR を介した細胞保護作用と細胞増殖作用に関する比較的最近の知見を紹介する。両者の間にはシグナル伝達機構の上での共通点があるように思われるが現段階では明確ではないので個別に扱うことにした。紙面の都合上 nAChR の性質、特に筋肉型と神経細胞型の比較やカルシウムシグナリングに関しては最低限度での記述にとどめたので関心のある方は他の総説を読んでいただきたい<sup>1,2)</sup>。

### 1. 神経細胞型 nAChR の性質

電気器官や筋肉の nAChR の研究に比べて脳や神経節に存在する nAChR の研究は著しく遅れていた。1986 年、ソーク研究所の Patrick と Heinemann のグループが初めて神経細胞型 nAChR  $\alpha 3$  サブユニットのクローニング<sup>3)</sup>に成功してから 2001 年の  $\alpha 10$  サブユニットのクローニング<sup>4)</sup>までの 16 年間に激しいクローニングに関する競争が行われ、神経細胞に発現する 10 種類の  $\alpha$  サブユニット ( $\alpha 2\sim 10$ ) と 3 種類の  $\beta$  サブユニット ( $\beta 2\sim 4$ ) がクローニングされた。 $\alpha$  サブユニットはアゴニスト結合サブユニットとされているが、 $\alpha 5$  だけは例外である。 $\beta$  サブユニットにはアゴニストは結合しないがアゴニストの  $\alpha$  サブユニットへの結合親和性には影響を与える。nAChR 遺伝子のクローニングと平行してそれぞれのサブユニット遺伝子の発現分布と各サブユニットを種々組み合わせるアフリカツメガエルの卵母細胞や培養細胞に発現させ機能解析の研究が進められた。ごく大雑把にみると  $\alpha$  サブユニットに関しては神経節や副腎には  $\alpha 3$  が多く発現しているが、脳では  $\alpha 4$  が多い。一方、 $\alpha 7$  は神経節、脳ともかなりの発現が見られる。これ以外の  $\alpha$  サブユニットの発現は部位により独特のパターンを示す。アフリカツメガエルの発現系では  $\alpha 7\sim 9$  は単独でアゴニスト刺激に対する電氣的応答が得られたが、 $\alpha 2\sim 6$  は  $\alpha$  サブユニットと  $\beta$  サブユニットの複合体を形成した。また、 $\alpha 10$  は  $\alpha 9$  とのみ機能的複合体を形成した。神経細胞型 nAChR も筋肉型と同様に 5 個のサブユニットからなり、各サブユニットは 4 回膜貫通し、中央にイオンチャネルを形成する。クローニングされている全ての  $\alpha$  サブユニットと  $\beta$  サブユニットを組み合わせると潜在的には非常に多くのサブタイプが存在しうるわけであるが、脳の多くの部位では  $\alpha 4\beta 2$ 、神経節では  $\alpha 3\beta 4$  を含むサブタイプが多い。生体におけるマイナーなサブタイプの同定はあまり進んでいない。 $\alpha 7$  が生体でも単独でイオンチャネルを形成するか、 $\beta$  サブユニットとの複合体形成の可能性についてはいまだ決着がつかっていない。従って、本稿では  $\alpha 7$  型 nAChR と記述する。脳の nAChR のなかで機能的に最も

注目されているのは  $\alpha 4\beta 2$  と  $\alpha 7$  型 nAChR である。特に  $\alpha 7$  型 nAChR が注目されるのは主に次の理由による：(1) 神経終末に存在しアゴニスト刺激による神経伝達物質放出に関与する。(2) カルシウムの透過性が非常に高い。NMDA 型グルタミン酸受容体よりカルシウムの透過性が高い。電位依存性カルシウムチャネルを介さなくても直接アゴニスト刺激で細胞内にカルシウムを取り込む。(3) ニコチンに対する親和性が高い。喫煙に際して血中のニコチン濃度は  $0.5 \mu\text{M}$  以下であるが、 $\alpha 7$  型 nAChR はこれ以下の濃度で反応する。ニコチンの中枢作用、特に addiction などではこのタイプが重要な役割を果たすと想定されている。ヒヨコ毛様体神経節や副腎髄質クロマフィン株 PC12 細胞ではニコチン濃度が  $1 \mu\text{M}$  以下では  $\alpha 7$  型 nAChR が、これより濃度が高くなるにつれ  $\alpha 3$  を含むサブタイプが細胞内カルシウムイオン濃度の増加に主要な役割を果たす<sup>5,6)</sup>。 $\alpha 4\beta 2$  に関しては  $\alpha 4$  および  $\beta 2$  遺伝子をノックアウトした実験からも機能解析されているが、 $\alpha 7$  をしのぐ量が存在するわりには機能は明確ではない。最近、骨格筋や脳・神経以外でも神経細胞型ニコチン受容体発現が多く報告されている<sup>7,8)</sup>。

### 2. 神経細胞保護作用

ニコチンが nAChR アゴニストとして多く用いられる理由は、喫煙に伴い最も顕著な薬理作用を示し、体内に取り込まれる主要な成分であること、喫煙の有害性が指摘されていること、血液脳関門を通過しやすいので動物実験に適していることなどが挙げられる。ニコチンは脳の種々の部位の nAChR を活性化して神経伝達物質放出を促進する。放出される神経伝達物質の種類は脳の部位により異なるがこのなかには大脳皮質、海馬、中脳のアセチルコリンや中脳のドーパミンも含まれる。アルツハイマー病やパーキンソン病では大脳皮質や中脳のコリン作動性神経やドーパミン作動性神経が障害を受けて nAChR も減少する。従ってこの部位のアセチルコリンやドーパミン濃度を高めたり、nAChR アゴニストを投与して残存する nAChR を活性化することや持続的に神経活動を高めることにより神経細胞を保護しようとする試みが行われている。保護作用に関する培養系の初期の研究では培養液にグルタミン酸、アミロイド  $\beta$  タンパク質 ( $A\beta$ 、アルツハイマー病モデル)、カルシウムイオノフォア、アラキドン酸、MPTP (パーキンソン病モデル) を添加したり、培養液から血清を除去して細胞死を誘導し、これらに対するニコチンの影響が調べられた。また、動物を用いて *in vivo* の実験も行われた。その結果、比較的細胞死が少ない条件では一定程度のニコチンの保護効果がみられ、

nAChR アンタゴニストはこの保護効果を阻害した。これらの研究は現在ではシグナル伝達機構やアポトーシスの機構の観点から解析されている。また、アルツハイマー病治療薬にはアセチルコリンエステラーゼ阻害作用だけではなく nAChR に直接作用し、グルタミン酸神経毒性やアミロイド神経毒性に対する保護効果が培養細胞系では見出された。Aβ は直接 nAChR に作用することも発見された。

### (1) グルタミン酸(NMDA)神経毒性

Akaike らはラット大脳皮質初代培養細胞を用いて、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸による細胞死をニコチンが抑制し、nAChR 非選択的アンタゴニストであるヘキサメトニウムやメカミルアミンはニコチンの保護作用を阻害することを初めて報告した<sup>9)</sup>。その後、このグルタミン酸神経毒性や虚血性神経毒性に対するニコチンの保護作用はニコチン前処理が必要であることや  $\alpha 7$  型 nAChR に特異的なアンタゴニストである  $\alpha$ -ブンガロトキシシン ( $\alpha$ Bgt) や methyllycaconitine (MLA),  $\alpha 4\beta 2$  に比較的選択的なアンタゴニスト、DH $\beta$ E でも阻害されることが相次いで報告された<sup>10, 11)</sup>。同様な結果がカルシウムイオノフォアによる細胞死でも得られた。ラット大脳皮質の初代培養系でグルタミン酸神経毒性に対する各種 AChE 阻害剤の影響をしらべたところタクリン、ドネペジル、ガランタミンは顕著な保護作用を示したが、その有効濃度は AChE 阻害の有効濃度と大きく異なっていた。また、これらと同等あるいはそれ以上に強力な AChE 阻害剤のなかには保護作用がないものがみられた<sup>12)</sup>。これらの保護作用は 24 時間の前処置を必要とし、DH $\beta$ E および MLA で抑制された。ガランタミンは nAChR アゴニストとしても作用するので AChE 阻害剤のなかには AChE 阻害剤としてではなく nAChR アゴニストとして保護作用を発現する可能性が指摘された。類似した結果が Aβ 神経毒性でも見られる(後述)。アルツハイマー病患者の脳脊髄液に含まれる濃度の Aβ<sub>1-40</sub>, 1-42 をラット大脳皮質初代培養細胞に負荷した後に単独では細胞死を誘導しない低濃度のグルタミン酸を処理すると細胞死が誘導され、この細胞死はニコチンにより抑制された<sup>13)</sup>。 $\alpha 7$  型 nAChR, Src, PI3 キナーゼに対する阻害剤はこのニコチンによる保護効果を阻害した。ニコチンは  $\alpha 7$ -Src-PI3 キナーゼ複合体の形成と Akt のリン酸化を誘導し、Bcl-2 蛋白レベルを上昇させたが、この上昇は PI3 キナーゼ阻害剤により抑制された。これらの結果から、著者らは  $\alpha 7$ , Src, PI3 キナーゼから Akt, Bcl-2 を経る経路がニコチンの保護作用に関与することを提唱した(図 1(a))。

nAChR 活性化によるグルタミン酸神経毒性の軽減を細胞内シグナリングの観点からみたときの一番の難点はニコチンもグルタミン酸(NMDA)も共に細胞内カルシウム濃度を上げることにある。NMDA による細胞死にもニコチンによる保護作用も共に細胞外からのカルシウム流入を必要とし、ニコチンを添加しても NMDA による細胞内カルシウムレベルの増加は影響を受けなかった<sup>14)</sup>。カルシウム流入経路が異なるとその下流の細胞内シグナリングが異なったり、活性化されるシグナル経路は細胞の種類によっても異なることもある。ヒヨコ網様体神経節ではニコチン受容体刺激で転写因子 CREB がリン酸化されて活性化されるが、高カリウム脱分極刺激をすると電位依存性カルシウムチャネルからのカルシウム流入によりカルシウム依存性フォスファターゼ、カルシニューリン経路も活性化されるので CREB リン酸化は持続しなかった(図 2)<sup>15)</sup>。一方、nAChR を刺激しても細胞内カルシウムレベルは増加するが、この下流では MEK/ERK 経路が活性化され、この経路を介しての CREB リン酸化は持続した。PC12 細胞ではニコチン刺激でも、高カリウム脱分極刺激でも CREB リン酸化は持続しなかった<sup>9)</sup>。PC12 細胞ではニコチン刺激で流入したカルシウムにより EGF 受容体 (EGFR) が transactivation された。EGFR の活性化を起点として Ras-MAP キナーゼカスケードと PI3 キナーゼ-Akt 経路が分岐、共に活性化される(図 1(b))。このようなニコチン受容体刺激に伴う transactivation を介しての神経保護作用はこれまでは報告されていないが、ラット海馬のスライス実験ではニコチンによる NMDA 神経毒性の抑制には Ras-MAP キナーゼカスケードと PI3 キナーゼの関与が報告されている<sup>17)</sup>。ドパミン受容体活性化に伴う EGFR の transactivation による細胞保護作用は近年注目されている。

### (2) Aβ 神経毒性

#### ① Aβ の $\alpha 7$ 型 nAChR への作用

Aβ は脳の  $\alpha 7$  型 nAChR の活性を抑制する<sup>18-21)</sup>。しかし、Ab が  $\alpha 7$  型 nAChR に結合すると MAP キナーゼの一種 ERK が活性化されるなどその作用機構や生理的意義は不明な点が多い。ラット海馬ニューロンにおいて、Aβ は  $\alpha 7$  型 nAChR のアセチルコリンに対する電氣的応答を低濃度で可逆的、特異的に抑制した<sup>19, 20)</sup>。一方、培養海馬スライスでは、Aβ は単独で ERK リン酸化を促進したが、この促進効果は  $\alpha 7$  型 nAChR のアンタゴニストにより抑制された<sup>21)</sup>。また、Aβ は単独で  $\alpha 7$  型 nAChR のアゴニストとしても作用する<sup>22)</sup>。このように Aβ は  $\alpha 7$

型 nAChR を直接阻害する一方で、 $\alpha 7$  型 nAChR を介して ERK リン酸化経路を活性化し、ERK の下流でタウ蛋白のリン酸化を促進した<sup>23)</sup>。

② A $\beta$  神経毒性とニコチン

ラット大脳皮質初代培養細胞に A $\beta$  を添加すると細胞死が誘導される。ニコチンはこの細胞死を抑制し、この保護作用には  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 7$  型 nAChR が関与した<sup>24, 25)</sup>。一方、NMDA 神経毒性に対するニコチンの保護作用には  $\alpha 7$  型 nAChR が関与するが A $\beta$  25-35 による細胞死抑制には  $\alpha 4\beta 2$  が関与する報告もある<sup>26)</sup>。TNF $\alpha$  も NMDA や A $\beta$  神経毒性に対し単独で保護効果を持つ。TNF $\alpha$  とニコチンを共存させたときは A $\beta$  毒性には各々単独のときと同程度の保護効果を示すが<sup>8)</sup>、NMDA 毒性に対しては保護効果が消失した。ceramide でも TNF $\alpha$  と同様な結果が得られた。 $\alpha 4\beta 2$  と  $\alpha 7$  型 nAChR ではその下流で異なるシ

グナル伝達機構が働くことも考えられている。PC12 細胞や海馬の培養細胞に A $\beta$  を添加すると caspase-3 が活性化された<sup>27, 28)</sup>。ニコチンは caspase-3 活性化と A $\beta$  と  $\alpha 7$  型 nAChR の結合を抑制した<sup>27)</sup>。A $\beta$  神経毒性に対するニコチンの保護作用において  $\alpha 7$  型 nAChR と Janus kinase 2 (JAK2) が複合体を形成し、JAK2 が活性化されたのちに PI3 キナーゼ /Akt が活性化されることが提唱された。

ヒト neuroblastoma SH-SY5Y 細胞は A $\beta$ 25-35 で細胞死が誘導される。この細胞死に対する 3 種類のアセチルコリンエステラーゼ阻害剤 (ドネベジル, ガランタミン, リバスタグミン) とニコチンの影響をしらべた<sup>29)</sup>。これら 4 種類の薬剤は全て A $\beta$ 25-35 による細胞死に対して保護作用を示し、この保護作用には 24 時間の前処理を必要とした。ドネベジル, ガランタミン, ニコチンの保護作用は MLA で阻害されたが<sup>8)</sup>、DH $\beta$ E は影響しなかった。メ

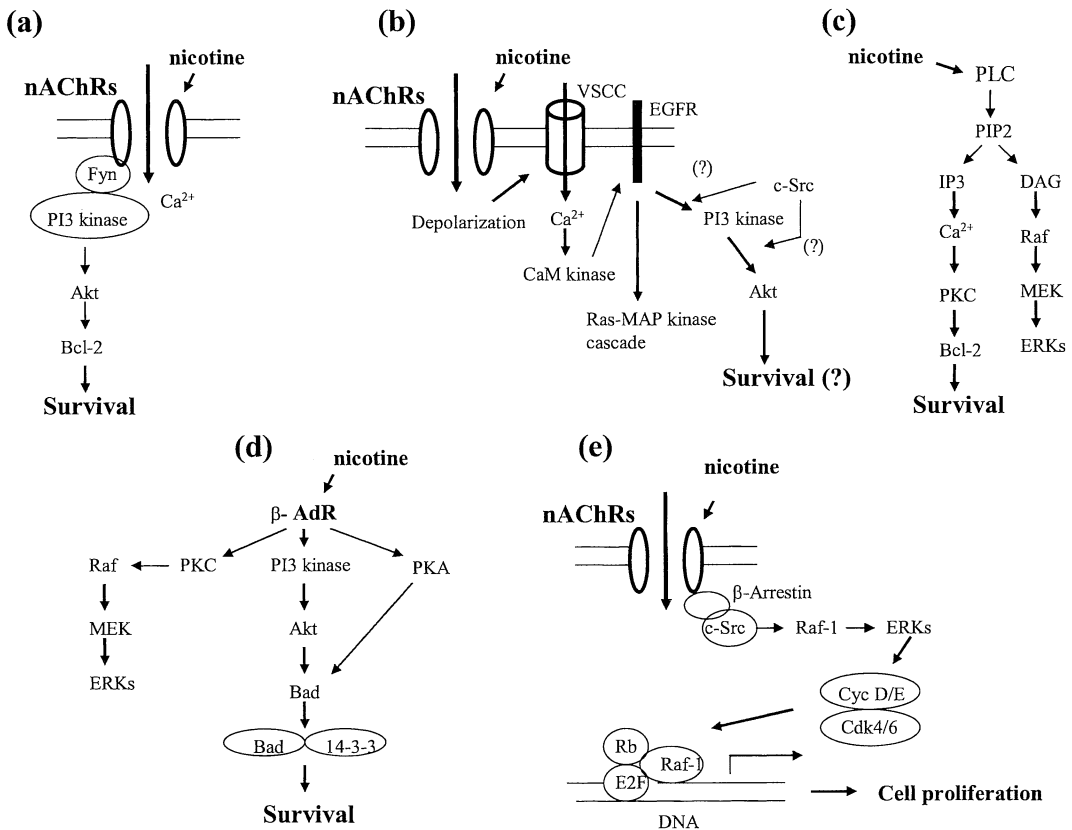


図 1. ニコチン刺激による細胞内シグナル伝達機構とその機能。  
 (a), (b), (c), (d), (e) はそれぞれ文献 13), 16), 46), 47), 50) の文献を参考に一部改変した。VSCC: 電位依存性カルシウムチャネル, PLC: ホスホリパーゼ C,  $\beta$ -AdR:  $\beta$  アドレナリン受容体

カミルアミンはドネベジル、ガラタミン、ニコチンの保護作用を阻害したが、リバスチグミンには影響しなかった。PI3キナーゼ阻害剤はドネベジル、ガラタミン、ニコチンの保護作用を阻害したがリバスチグミンには効果がなかった。また、Bcl-2の阻害剤HA14-1は4種類の薬剤全ての保護作用を抑制した。SH-SY5Y細胞でもこれらコリンエステラーゼ阻害剤のアセチルコリン阻害のIC50とAβ毒性に対する保護効果が見られる濃度の間には大きな相違が見られた。著者らはドネベジル、ガラタミンは直接nAChRアゴニストとして保護効果を発現すると推定している。

Aβによる細胞死には酸化ストレスが関与することが知られているが、ニコチンが酸化ストレスにおける活性酸素の生成を抑制する機構が提唱されている。ラット海馬の培養細胞にAβ25-35、1-40を負荷すると活性酸素の生成が促進した<sup>28)</sup>。ニコチンはこの活性酸素の生成を抑制し、メカミルアミンはニコチンの効果を阻害した。ニコチン単独では細胞内カルシウム濃度を非常にわずかに増やしたが、Aβ単独では3~4倍増化した。ニコチンはAβによる細胞内カルシウムの増加やDNA断片化を顕著に抑制した。細胞内カルシウムが顕著に増加するとホスホリパーゼ2を活性化し、その結果アラキドン酸レベルを上げ、フリーラジカルの生成が促進されることが知られている。しかし、nAChR刺激でこれらの系が活性化されるかは疑問である。一方、細胞内カルシウムの上昇はカルシニューリンを活性化し、その結果ミトコンドリアからのcytochrome c流出およびcaspase系の活性化を誘導しアポトーシスを促進する例も知られている。Aβによる細胞内カルシウムレベルの上昇がニコチンによるカルシウムレベルの上昇よりはるかに大きく、ニコチンはAβによるカルシウムレベルの上昇を下げ、カルシウムホメオスタシの維持に機能するとしてもその機構に関しては不明である。

### (3) アラキドン酸毒性

脊髄運動ニューロン培養系にアラキドン酸を添加するとcytochrome cの流出、caspase-3, 8, 9の活性化およびDNA断片化が促進され細胞死が誘導された。ニコチンはこれら全てを抑制した<sup>30, 31)</sup>。また、αBgtおよびメカミルアミンはニコチンの効果を阻害したが、Bcl-2のレベルは変わらなかった<sup>31)</sup>。

### (4) MPTP とパーキンソン病モデル

パーキンソン病モデルとしてMPTPを動物に投与する実験が行われている。MPTPはモノアミノキシダー

ゼにより毒性のあるMPPに代謝される。生成したMPPはドパミン作動性神経のドパミントランスポーターによりドパミン作動性神経に取り込まれ、ミトコンドリアに蓄積し、ミトコンドリアのcomplex 1を阻害する。その結果、ATPの生成が阻害されドパミン作動性神経が障害を受ける。また、電子伝達系が阻害された結果ヒドロキシラジカル生成が増加することもドパミン作動性神経の障害を促進する。特にドパミンは酵素的にも非酵素的にも酸化されやすく酸化ストレスを誘発しやすい。ニコチンはMPTP毒性に対し毒性を促進する報告と軽減する報告がある。

*In vitro*の実験(Fe<sup>3+</sup>/EDTA+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)ではニコチンはヒドロキシラジカルの生成・蓄積を抑制したが、ニコチンを連続投与してからMPTPを投与する際に、ニコチン濃度が高いと毒性が増強された<sup>32)</sup>。高濃度のニコチンがnAChRを過剰に刺激した結果、毒性が増強されたと説明されている。一方、チロシン水酸化酵素を指標にした別の報告では線条体のMPTPで障害を受けたドパミン神経(神経終末)に対しては、ニコチンは影響を与えないが、黒質のドパミン神経の細胞体部分にはニコチンは保護的に作用した<sup>33)</sup>。飲水からニコチンを長期摂取させて神経細胞を保護する試みや、nAChRサブタイプのアゴニスト結合活性や長期抑制を指標としたシナプスの可塑性についても検討され、部位、サブタイプの種類によっても異なるが、一定程度の保護効果がみられた<sup>34-37)</sup>。

ニコチンは一過性にFGF-1, BDNFの発現を上げMPTPに対する保護作用を発揮する例もある<sup>38)</sup>。

ニコチンおよびその主要な代謝物コチニンをマウスに1週間投与したのち、MPTPを急性投与し、黒質線条体、腹側被蓋野のドパミン神経障害をチロシン水酸化酵素を指標にしらべたところニコチンには黒質のドパミン神経に対して部分的に保護効果があるが、コチニンにはなかった<sup>39)</sup>。このようにMPTPによるドパミン神経障害に対してニコチンは一定程度の保護作用があることが報告されているがその機構に関してはほとんど明らかにされていない。

### (5) その他

ラット脊髄運動ニューロンを培養し、血清を除去すると細胞死が誘導される。ニコチンはα7型nAChRを活性化しこの細胞死を部分的に抑制した<sup>40)</sup>が、電位依存性カルシウムチャネルは全く関与しなかった。

PC12細胞をNGFで分化させたのち、培養液からNGFと血清を除去した際にみられる細胞死に対するnAChRアゴニスト(GTS-21)とカルシウムの影響を解析した<sup>41)</sup>。GTS-21はNGFと血清除去による細胞死を抑制し、α7

型 nAChR に依存した細胞内カルシウムの上昇が必要であることが示唆された。GTS-21 と共に細胞内からのカルシウム放出に関与する IP3 チャンネル阻害剤、リアノジン受容体、ホスホリパーゼ C 阻害剤を加えても GTS-21 の保護作用は減少したので細胞外からのカルシウムの流入と連動した細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出も関与する可能性がある。

ツニカマイシンはタンパク質への糖鎖の付加を抑制し、小胞体内で不良タンパク質を蓄積、小胞体ストレスによる細胞死を誘導する。小胞体ストレスは原因の異なる種々の神経変性疾患に共通にみられるストレスとして注目されている。PC12 細胞にツニカマイシンを負荷し、細胞死を誘導した。このツニカマイシン誘導細胞死はニコチンにより抑制され、nAChR アンタゴニストはこのニコチンによる保護作用を阻害した<sup>42)</sup>。

### 3. ニコチンの癌細胞に対する作用

嘗て、タバコ煙に含まれる発癌物質が検索された際にニコチンの発ガン作用も検討されたことがあった。主にベンツピレン等の前駆型癌原物質がチトクローム P-450 により強力な癌原物質に代謝されることが注目されたが、ニコチンによる発癌性は確認されなかった。しかし、近年、ニコチンが直接細胞増殖を促進することや肺癌細胞における cisplatin 誘導性アポトーシスを抑制することが相次いで報告され、新たにニコチンと癌の関係にスポットライトが当てられている。

Wright らは 3T3, WEHI-164, COS7, Du-145, FADU, ヒト肺癌細胞 (A427, H661) などの種々の細胞に紫外線を照射することによって生じる DNA 断片化をニコチンが抑制することを報告した<sup>43)</sup>。さらに、TNF やカルシウムイオノフォアによるアポトーシスもニコチンが抑制した。しかし、非特異的 nAChR アンタゴニストはこれらアポトーシス抑制作用に効果がなかった。また、アポトーシスの抑制に用いたニコチンの濃度は通常 nAChR 刺激で使われる濃度よりかなり高かった。これらの結果から既知の nAChR を介さずにニコチンが保護作用をもつ可能性が指摘された。一方、ニコチンは 2 種類のオピオイド (モルヒネとメサドン) による小細胞肺癌細胞 (NCI-N417) と非小細胞肺癌細胞 (NCI-H157) のアポトーシスを抑制し、nAChR 非特異的アンタゴニストはこのニコチンの保護効果を阻害した<sup>44)</sup>。しかし、ニコチンやアンタゴニストは単独ではアポトーシスを誘導しないにもかかわらず両者を同時添加するとアポトーシスが誘導され、nAChR を介した単純な機構とは異なる可能性もある。モルヒネは PKC 活性を下げるが、ニコチンは PKC

活性を上げるので PKC の関与する機構や ERK, Bcl-2 の関与も示唆された<sup>45)</sup>。

Deng の研究室からニコチンが Bcl-2 ファミリー (生存促進型の Bcl-2 とアポトーシス促進型の Bax, Bad) に影響を与える重要な発見が相次いだ<sup>46-48)</sup>。ニコチンは培養小細胞肺癌細胞 (NCI-H89) における cisplatin および VP-16 誘導アポトーシスを抑制した<sup>46)</sup>。この条件でニコチンは Bcl-2 リン酸化を促進し、リン酸化部位は Ser70 が示唆された。PKC, ホスホリパーゼ C, MEK 阻害剤はニコチンによるアポトーシス抑制作用と Bcl-2 リン酸化を顕著に阻害したがヘキサメトニウムは全く効果がみられなかった。ニコチンは Bcl-2 と Bax の結合を促進し、ホスホリパーゼ C の阻害剤はこのニコチンによる Bcl-2/Bax 結合促進作用を抑制した。これらの結果を総合し、Mai らは図 1 (c) のシグナル伝達機構による生存機構を提唱した。

肺癌細胞には Bcl-2 の発現量が非常に低いものが多いと見られる。そこで Bcl-2 以外の Bcl-2 ファミリーが検討された。Bad は特定部位がリン酸化された状態では細胞質の 14-3-3 タンパク質などと結合しているが、脱リン酸化されると 14-3-3 タンパク質と解離しミトコンドリアに移行してアポトーシスを誘導する。ニコチンは低濃度で肺癌細胞 (A549) の cisplatin 誘導アポトーシスを抑制し、Bad のリン酸化を促進した<sup>47)</sup>。さらに、ニコチンは Bad と 14-3-3 タンパク質の会合を促進した。阻害剤および siRNA 実験から PI3 キナーゼ-Akt 経路が Bax のリン酸化に関与する結果が得られたので、Akt のターゲットが Bax と推定された。さらに、MEK/ERK, PKA もニコチンによる Bad リン酸化に関与する結果が得られた。問題は PI3 キナーゼ-Akt 活性化までの経路である。特にニコチンの作用点が明確ではない。小細胞肺癌細胞には  $\alpha 7$  型 nAChR が発現し、nAChR アゴニスト刺激により細胞内カルシウム濃度が上昇した<sup>49)</sup>。このカルシウム上昇は nAChR とカルシウムチャンネルが関与した。しかし、Xin と Deng の報告ではニコチン刺激による Bad リン酸化は  $\alpha$ Bgt により阻害されず  $\beta$ -アドレナリン受容体アンタゴニスト、プロプラノロールにより完全に抑制された。彼らは  $\beta$ -アドレナリン受容体から PI3 キナーゼ/Akt 経路, PKA 経路, PKC/Raf/MEK/ERK 経路が分岐することを提唱している (図 1(d))。興味深いことにニコチン刺激による Bad リン酸化も  $\alpha$ Bgt により阻害されずプロプラノロールにより完全に抑制された<sup>49)</sup>。

このように Deng のグループの肺癌細胞を用いたニコチンと Bcl-2 ファミリーに関する報告ではニコチンの

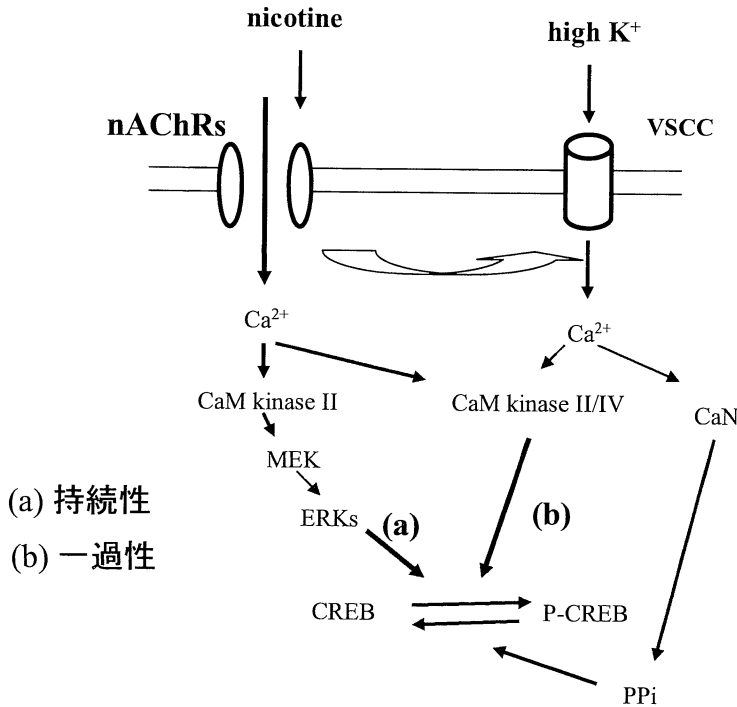


図 2. ヒヨコ毛様態神経節におけるニコチンおよび高カリウム脱分極刺激に伴う細胞内カルシウムシグナル伝達機構の相違。  
文献 15) を一部改変した。VSCC: 電位依存性カルシウムチャンネル, CaN: カルシニューリン

最初の作用点が明確ではない。確かにプロプラノロールはこれらシグナル分子のリン酸化を抑制するが、 $\beta$ -アドレナリン受容体がニコチンの直接の作用点であることを必ずしも意味しない。nAChR 活性化後に transactivation で  $\beta$ -アドレナリン受容体が活性化される可能性がある。彼らの論文では nAChR アンタゴニストは効果がなかったと報告されているが、肺がん細胞の増殖に関する nAChR の関与に関しては異なる結果も報告されている。Dasgupta らは小細胞肺がん細胞と非小細胞肺がん細胞への BrdU の取り込みはニコチンで著しく促進し、nAChR アンタゴニストで抑制されることを報告した<sup>50)</sup>。免疫沈降、ウエスタンブロット、siRNA、阻害剤実験を組み合わせると図 1(e) の経路を提唱した。目新しいところは nAChR 活性化に伴い nAChR,  $\beta$ -arrestin, c-Src の複合体が形成され、そこから細胞内シグナル伝達経路が活性化されることにある。

最近、胃がん細胞でもニコチンが  $\beta$ -アドレナリン受容体の活性化を介してその増殖を促進することが報告され

た<sup>51)</sup>。肺がん細胞では cisplatin および VP-16 を用いてアポトーシスを誘導し、それに対するニコチンの抑制作用を解析しているが、胃がん細胞に対する実験はニコチンの細胞増殖促進作用の観点から進められた。Shin らはマウスに gastric adeno carcinoma cell line を移植し、飲水にニコチンを加えた実験で高濃度のニコチンにより胃がん細胞の増殖と COX-2, リン酸化 ERK (P-ERK), VEGF レベルの上昇を報告した<sup>52)</sup>。培養細胞系でも同様な現象が確認された。さらに阻害剤を用いた実験からニコチン  $\rightarrow$  ERK  $\rightarrow$  COX2  $\rightarrow$  PG の経路を経て細胞増殖が促進されることが提唱された。その後、培養細胞を用いてさらに詳しくシグナル経路を解析し、PKC  $\rightarrow$  ERK  $\rightarrow$  AP-1  $\rightarrow$  COX-2 を付け加えた (Shin et al., 2007)。ニコチンの作用する受容体については  $\alpha$ Bgt, アテノロール ( $\beta$ 1 アドレナリン受容体アンタゴニスト), ICI 118,551 ( $\beta$ 2-アドレナリン受容体アンタゴニスト) を用いたところ、 $\alpha$ Bgt のみ効果がなく、 $\beta$ 1,  $\beta$ 2 アドレナリン受容体アンタゴニストはニコチン刺激による細胞増殖, PKC, P-ERK,

COX-2, PEG2 レベルの上昇の全てを抑制した。

#### 4. ニコチンによる血管内皮細胞の増殖促進

ニコチンは極めて低い濃度 (0.1~100 nM) でウシ肺動脈血管内皮細胞の DNA 合成と細胞増殖を促進するが、 $\mu\text{M}$  のオーダーになると逆に抑制した<sup>53)</sup>。この促進効果は血清や PDECGF でさらに促進され、ヘキサメトニウムで抑制された。ヒト冠状動脈内皮細胞に対しては 10 nM で細胞増殖を促進し、低酸素による細胞死を抑制した<sup>54)</sup>。また、ニコチンにより VEGF 添加した際と同様なキャピラリ状のネットワークの形成が観察された。さらにマウス後肢大腿部結紮実験でニコチンおよび高親和性 nAChR アゴニスト epibatidine は血管新生を誘導しメカミルアミン、ヘキサメトニウムはこれを抑制した。ヒト血管内皮細胞には  $\alpha 3, \alpha 5, \beta 2, \beta 4$  の発現がみられるので神経節同様に主に  $\alpha 3$  型 nAChR が機能していることが推定される<sup>55)</sup>。 $\alpha 3$  型 nAChR は一般にアゴニストに対する親和性は比較的低いとされているので、血管内皮細胞の細胞増殖を非常に低い濃度で促進する機構は興味深い。

#### おわりに

細胞の生死、増殖、分化をカルシウムが制御することは良く知られている。従って、本稿で扱った nAChR を介した細胞内カルシウムレベルの増加により細胞のアポトーシスの抑制や細胞増殖の促進がおきること自体は不思議なこととはいえないかもしれないが、現実にはそう容易なことではない。また、受容体を介して制御することは薬で直接受容体の下流のシグナル伝達経路を制御することとは異なる意義がある。今後の発展が待たれる。

#### 文 献

- 1) 中山 均：アセチルコリンのニコチン受容体。細胞膜の受容体(高柳一成編著)pp. 55-69. 南山堂, 東京 1998.
- 2) Dajas-Bailador, F. and Wonnacott, S. : Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signaling. *Trend Pharmacol. Sci.* **25**: 317-324, 2004.
- 3) Boulter, J., Evans, K., Goldman, D., Martin, G., Treco, D., Heinemann, S. and Patrick, J. : Isolation of a cDNA clone coding for a possible neuronal nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha$ -subunit. *Nature* **319** : 368-374, 1986.
- 4) Elgoyhen, A.B., Vetter, D.E., Katz, E., Rothlin, C.V., Heinemann, S.F. and Boulter, J. :  $\alpha 10$  : adeterminant no nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc. Natl. Acad. USA* **98** : 3501-3506, 2001.
- 5) Vijayaraghavan, S., Pugh, P.C., Zhang, Z., Rathouz, M.M. and Berg, D.K. : nicotinic receptors that bind  $\alpha$ -bungarotoxin on neurons raise intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$ . *Neuron* **8** : 353-362, 1992.
- 6) Nakayama, H., Numakawa, T., Ikeuchi, T. and Hatanaka, H. : Nicotine-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase and CREB in PC12h cells. *J. Neurochem.* **79** : 489-498, 2001.
- 7) Kawashima, K. and Fujii, T. : Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. *Frontier BioSci.* **9** : 2063-2085, 2004.
- 8) Gahring, L.C. and Rogers, S.W. : Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneuronal cells. *AAPS J.* **7** : E885-894, 2006.
- 9) Akaike, A., Tamura, Y., Yokota T., Shimohama, S., and Kimura, J. : Nicotine-induced protection of cultured cortical neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate cytotoxicity. *Brain Res.* **644** : 181-187, 1994.
- 10) Kaneko, S., Maeda, T., Kume, T., Kochiyama, H., Akaike, A., Shimohama, S. and Kimura J. : Nicotine protects cultured cortical neurons against glutamate-induced cytotoxicity via  $\alpha 7$ -neuronal receptors and neuronal CNS receptors. *Brain Res.* **765** : 135-140, 1997.
- 11) Shimohama, S., Greenwald, D.L., Shafron, D.H., Akaike, A., Maeda, T., Kaneko, S., Kimura, J., Simpkins, C.E., Day, A.L. and Meyer, E.M. : Nicotinic  $\alpha 7$  receptors protect against glutamate neurotoxicity and neuronal ischemic damage. *Brain Res.* **779** : 359-363, 1998.
- 12) Takada, Y., Yonezawa, A., Kume, T., Katsuki, H., Kaneko, S., Sugimoto, H. and Akaike, A. : Nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection by donepezil against glutamate neurotoxicity in rat cortical neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **306** : 772-777, 2003.



- 13) Kihara, T., Shimohama, S., Sawada, H., Honda, K., Nakamizo, T., Shibasaki, H., Kume, T. and Akaike, A. : Alpha 7 nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block A beta-amyloid-induced neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* **276** : 13541-13546, 2001.
- 14) Dajas-Bailador, F. , Lima, P.A. and Wonnacott, S. : The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subtype mediates nicotine protection against NMDA excitotoxicity in primary hippocampal cultures through a Ca(2+) dependent mechanism. *Neuropharmacol.* **39** : 2799-27807, 2000.
- 15) Chang, K. T. and Berg, D. K. : Voltage-gated channels block nicotinic regulation of CREB phosphorylation and gene expression in neurons. *Neuron* **32** : 855-865, 2001.
- 16) Nakayama, H., Numakawa, T. and Ikeuchi, T. : Nicotine-induced phosphorylation of Akt through epidermal growth factor receptor and Src in PC12 cells. *J. Neurochem.* **83** : 1372-1379, 2002.
- 17) Ferchmin, P.A., Perez, D., Eterovic, V.A. and Vellis, J.de : Nicotinic receptors differentially regulate N-methyl-D-aspartate damage in acute hippocampal slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **305** : 1071-1078, 2003.
- 18) Wang, H.-Y., Lee, D. H. S., D'Andrea, M. R., Peterson, P. A., Shank, R. P. and Reitz, A. : b-Amyloid<sub>1-42</sub> binds to  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. *J. Biol. Chem.* **275** : 5626-5632, 2000.
- 19) Pettit, D. L., Shao, Z. and Yakel, J. L. :  $\beta$ -Amyloid<sub>1-42</sub> peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice. *J. Neurosci.* **21** : RC120 1-5, 2001.
- 20) Liu, Q.-S., Kawai, H. and Berg, D. : b-amiloid peptide blocks the response of  $\alpha 7$ -containing nicotinic receptors on hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** : 4734-4739, 2001.
- 21) Dineley, K. T., Westerman, M., Bui, D., Bell, K., Ashe, H. and Sweatt, J. D. :  $\beta$ -Amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors: *In vitro* and *in vivo* mechanisms related to Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **21**: 4125-4133, 2001.
- 22) Dineley, K. T., Bell, K.A., Bui, D. and Sweatt, J.D.:  $\beta$ -amiloid peptide activates  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors expressed in xenopus oocytes. *J. Biol. Chem.* **277** : 25056-25061, 2002.
- 23) Wang, H.-Y., Li, W., Benedetti, N. J. and Lee, D. H. S. :  $\alpha 7$  Nicotinic acetylcholine receptors mediate  $\beta$ -amiloid peptide-induced tau protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **278**: 31547-31553, 2003.
- 24) Kihara, T., Shimohama, S., Sawada, H., Kimura, J., Kume, T., Kochiyama, H., Maeda, T. and Akaike, A. Nicotinic receptor stimulation protects neurons against beta-amyloid toxicity. *Ann. Neurol.* **42** : 159-163, 1997.
- 25) Kihara, T., Shimohama, S., Urushitani, M., Sawada, H., Kimura, J., Kume, T., Maeda, T. and Akaike, A. : Stimulation of  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptors inhibits  $\beta$ -amyloid toxicity. *Brain Res.* **792** : 331-334, 1998.
- 26) Gahring, L.C., Meyer, E. and Rogers, S.W. : Nicotine-induced neuroprotection against N-methyl-D.aspartic acid or  $\beta$ -amyloid peptide occur through independent mechanisms distinguished by pro-inflammatory cytokines. *J. Neurochem.* **87** : 1125-1136, 2003.
- 27) Shaw, S., Bencherif, M. and Marrero, M.B. : Janus kinase 2, an early target of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection against A $\beta$ -81-429 amyloid. *J. Biol. Chem.* **277**: 44920-44924, 2002.
- 28) Liu Q and Zhao B. : Nicotine attenuates beta-amyloid peptide-induced neurotoxicity, free radical and calcium accumulation in hippocampal neuronal cultures. *Br. J. Pharmacol.* **141** : 746-54, 2004.
- 29) Arias, E., Gallego-Sandin, S. Villarroya, M., Garcia, A. G. and Lopez, M. G. : Unequal neuroprotection afforded by the acetylcholinesterase inhibitors galantamine, donepezil, and rivastigmine in SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of nicotinic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **315**: 1346-1353, 2005.

- 30) **Garrido, R., Malecki, A., Hennig, B. and Toborek, M.** : Nicotine attenuates arachidonic acid-induced neurotoxicity in cultured spinal cord neurons. *Brain Res.* **861**: 59-68, 2000.
- 31) **Garrido, R., Mattson, M.P., Hennig, B. and Toborek, M.** : Nicotine protects against arachidonic-acid-induced caspase activation, cytochrome c release and apoptosis of cultured spinal cord neurons. *J. Neurochem.* **76** : 1395-1403, 2001.
- 32) **Ferger, B., Spratt, C.D., Earl, C.D., Teismann, P., Oertel, W.H. and Kuschinsky, K.** : Effects of nicotine on hydroxy free radical formation in vitro and on MPTP-induced neurotoxicity in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **358** : 351-359, 1998.
- 33) **Parain, K., Hapdey, C., Rousselet, E., Marchand, V., Dumery, B. and Hirsch, E.C.** : Cigarette smoke and nicotine protect dopaminergic neurons against the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine parkinsonian toxin. *Brain Res.* **984** : 224-232, 2003.
- 34) **McCallum, S.E., Parameswaran, N., Perez, X.A., Bao, S., McIntosh, J.M., Grady, S.R. and Quik, M.** : Compensation in pre-synaptic dopaminergic function following nigrostriatal damage in primates. *J. Neurochem.* **96** : 960-972, 2006.
- 35) **Quik, M., Chen, L., Parameswaran, N., Xie, X., Laangston, J.W. and McCallum, S.E.** : Chronic oral nicotine normalizes dopaminergic function and synaptic plasticity in 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-lesioned primates. *J. Neurosci.* **26** : 4681-4689, 2006.
- 36) **Quik, M., Chen, L., Parameswaran, N., McCallum, S.E., Bordia, T., Bao, S., McCormack, A., Kim, A., Tyndale, R.F., Laangston, J.W. and Monte, D.A.D.** : Chronic oral nicotine treatment protects against striatal degeneration in MPTP-treated primates. *J. Neurochem.* **98** : 1866-1875, 2006.
- 37) **Bordia, T., Parameswaran, N., Fan, H., Langston, J.W., McIntosh, J.M. and Quik, M.** : Partial recovery of striatal nicotinic receptors in 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP)-lesioned monkeys with chronic oral nicotine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **319** : 285-292, 2006.
- 38) **Maggio, R., Riva, M., Vaglini, F., Fornai, F., Molteni, R., Armogida, M., Racagni, G. and Corsini, G.U.** : Nicotine prevents experimental Parkinsonism in rodents and induces striatal increase of neurotrophic factors. *J. Neurochem.* **71**: 2439-2446, 1998.
- 39) **Parain, K., Marchand, V., Dumery, B. and Hirsch, E.** : Nicotine, but not cotinine, partially protects dopaminergic neurons against MPTP-induced degeneration in mice. *Brain Res* **890** : 347-350, 2001.
- 40) **Messi, M. L., Renganathan, M., Grigorenko, E. and Delbono, O.** : Activation of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor promotes survival of spinal cord motoneurons. *FEBS Lett.* **411** : 32-38, 1997.
- 41) **Ren, K., Puig, V., Papke, R.L., Itoh, Y., Hughes, J.A. and Meyer, E.M.** : Multiple calcium channels and kinases mediate  $\alpha 7$  nicotinic receptor neuroprotection in PCD12 cells. *J. Neurochem.* **94** : 926-933, 2005.
- 42) **Utsumi, T., Shimoke, K., Kishi, S., Sasaya, H., Ikeuchi, T. and Nakayama, H.** : Protective effect of nicotine on tunicamycin-induced apoptosis of PC12 cells. *Neurosci. Lett.* **370**, 244-247, 2004.
- 43) **Wright, S.C., Zhong, J., Zheng, H. and Larrick, J.W.** : Nicotine inhibition of apoptosis suggests a role in tumor promotion. *FASEB J.* **7** : 1045-1051, 1993.
- 44) **Maneckjee, R. and Minna, J.D.** : Opioids induce while nicotine suppresses apoptosis in human lung cancer cells. *Cell Growth Diff.* **5** : 1033-1040, 1994.
- 45) **Heusch, W. L. and Maneckjee, R.** : Signaling pathway involved in nicotine regulation of apoptosis of human lung cancer cells. **19** : 551-556, 1998.
- 46) **Mai, H., May, W.S., Gao, F., Jin, Z. and Deng, X.** : A functional role for nicotine in Bcl-2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **278** : 1886-1891, 2003.

- 47) **Jin, Z., Gao, F., Flagg, T. and Deng, X.** : Nicotine induces multi-site phosphorylation of Bad in association with suppression of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279** : 23837-44, 2004.
- 48) **Xin, M. and Deng, X.** Nicotine inactivation of the proapoptotic function of Bax through phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **280** : 10781-10789, 2005.
- 49) **Schuller, H.M., Jull, B.A.J., Sheppard, B.J. and Plummer, H.K.** : Interaction of tobacco-specific toxicants with the neuronal  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor and its associated mitogenic signal transduction pathway: potential role in lung carcinogenesis and pediatric lung disorders. *Eur. J. Pharmacol.* **393** : 265-277, 2000.
- 50) **Dasgupta, P., Rastogi, S., Pillai, S., Ordonez-Ercan, D., Morris, M., Haura, E. and Chellappan, S.** : Nicotine induces cell proliferation by  $\beta$ -arrestin-mediated activation of Src and Rb-Raf-1 pathways. *J. Clin. Invest.* **116** : 2208-2217, 2006.
- 51) **Shin, V.Y., Wu, W.K.K., Chu, K.M., Koo, M.W.L., Wong, H.P.S., Lam, E.K.Y., Tai, E.K.K. and Cho, C.H.** : Functional role of  $\beta$ -adrenergic receptors in the mitogenic action of nicotine on gastric cancer cells. *Toxicol. Sci.* **96** : 21-29, 2007.
- 52) **Shin, V.Y., Wu, W.K.K., Ye, Y-N., So, W.H.L., Koo, M.W.L., Liu, E.S.L., Luo, J.-C. and Cho, C.H.** : Nicotine promotes gastric tumor growth and neovascularization by activating extracellular signal-regulated kinase and cyclooxygenase-2. *Carcinogenesis* **25** : 2487-2495, 2004.
- 53) **Villablanca, A.C.** : Nicotine stimulates DNA synthesis and proliferation in vascular endothelial cells in vitro. *J. Appl. physiol.* **84** : 2089-2098, 1998.
- 54) **Heeschen, C., Jang, J.J., Weis, M., Pathak, A., Kaji, S., Hu, R.S., Tsao, P.S., Johnson, F.L. and Cooke, J.P.** : Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nature* **7** : 833-839, 2001.
- 55) **Macklin, K.D., Maus, A.D.J., Pereira, E.F.R. and Albuquerque, E.X.** : Human vascular endothelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *J. Pharm. Exp. Ther.* **287** : 435-439, 1998.