



Nicotine exposure, mimicked smoking, directly and indirectly enhanced protein kinase C activity in isolated canine basilar artery, resulting in enhancement of arterial contraction

| | |
|-------|--|
| メタデータ | 言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小出, 昌代 メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/10271/304 |

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

| | | | |
|-------|---|---------|-------------|
| 学位記番号 | 医博論第 403号 | 学位授与年月日 | 平成17年 7月22日 |
| 氏名 | 小出昌代 | | |
| 論文題目 | <p>Nicotine exposure, mimicked smoking, directly and indirectly enhanced protein kinase C activity in isolated canine basilar artery, resulting in enhancement of arterial contraction (喫煙を模したニコチン暴露は単離イヌ脳底動脈において直接および間接的にプロテインキナーゼC活性を増強し、その結果、血管収縮を増強した)</p> | | |

博士(医学) 小 出 昌 代

論文題目

Nicotine exposure, mimicked smoking, directly and indirectly enhanced protein kinase C activity in isolated canine basilar artery, resulting in enhancement of arterial contraction

(喫煙を模したニコチン暴露は単離イヌ脳底動脈において直接的および間接的にプロテインキナーゼC活性を増強し、その結果、血管収縮を増強した)

論文の内容の要旨

[はじめに]

脳血管障害のリスクファクターの一つに喫煙が挙げられる。喫煙が生体内脳循環に及ぼす影響については、血管径の減少、脳血流量の減少など血管の収縮を示す報告がある一方で、脳血流量の増加や実際に脳血管の弛緩を観察したとの相反する報告がなされている。喫煙による影響は、タバコ煙中に含まれる様々な化合物が血中に取り込まれ、直接、作用するほか、交感神経系の活性化や局所の物質代謝の変化など二次的反応も関与する。しかし、神経活性化や局所代謝の影響を除いた摘出脳血管を用いた実験においても、タバコ煙中で最も強い薬理作用を有するニコチンを作用させると収縮および弛緩の相反する反応を認めることが報告されている。これら摘出脳血管におけるニコチンの反応は、喫煙時の血中ニコチン濃度と比較し、かなり高い濃度で認められることから、喫煙による脳血管への影響を示唆するものであるかどうか疑問が残る。そこで、本研究では、喫煙時の血中濃度に相当する低濃度ニコチンが脳血管トーン調節に与える影響について、血管平滑筋収縮増強因子の一つであるプロテインキナーゼC (protein kinase C; PKC)を中心に検討を行った。

[材料ならびに方法]

摘出イヌ脳底動脈および培養血管内皮細胞を用いて、以下の検討を行った。ニコチン濃度は慢性喫煙者の喫煙時血中ニコチン濃度に相当する 10^{-6} mol/Lとし(以下、低濃度ニコチンとする)、摘出イヌ脳底動脈には実験開始前1時間、培養血管内皮細胞には実験開始前24時間処置した。正常イヌ脳底動脈リング標本における発生張力を等尺性に測定し、ウリジン三リン酸(uridine triphosphate; UTP)による血管収縮反応およびサブスタンスPによる内皮依存性血管弛緩反応に与える低濃度ニコチンの影響について検討した。PKCは細胞質から細胞膜へ移行し活性化するとされていることから、イヌ脳底動脈膜分画におけるPKC活性を酵素免疫抗体法により測定した。内皮依存性血管弛緩反応において重要な役割を担う一酸化窒素(nitric oxide; NO)産生量を、培養血管内皮細胞およびNO蛍光指示薬[diaminofluorescein-FM diacetate (DAF-FM/DA)]を用いて、可視化、解析した。また、血管内皮細胞とPKC活性および低濃度ニコチンとの関連性を明らかにするため、機械的に血管内皮細胞を除去したイヌ脳底動脈を用い、UTPによる血管収縮反応、NOドナーによる血管弛緩反応およびイヌ脳底動脈膜分画におけるPKC活性を測定した。

[結果]

低濃度ニコチンはイヌ脳底動脈において収縮を引き起こさなかったが、UTPによる血管収縮反応を有意に増強した。イヌ脳底動脈膜分画におけるPKC活性は、UTP刺激により増加し、低濃度ニコチン処置後、UTP刺激することによりさらなる増加を認めた。また、低濃度ニコチン処置のみにおいても有意なPKC活性の上昇を認めた。一方、サブスタンスPによる内皮依存性血管弛緩反応は低濃度ニコチン処置群におい

て有意に減弱した。培養血管内皮細胞におけるサブスタンスP刺激によるNO産生もニコチン処置群において有意に減弱した。しかし、血管内皮細胞除去イヌ脳底動脈リング標本におけるNOドナーによる血管弛緩反応は低濃度ニコチン処置の有無にかかわらず、変化は認められなかった。イヌ脳底動脈膜分画におけるPKC活性は、血管内皮細胞除去によって上昇し、低濃度ニコチン処置によりさらなる上昇を認めた。UTPによる血管収縮反応も同様に、血管内皮細胞除去標本において収縮増強が認められ、低濃度ニコチンを処置することによりさらなる収縮反応の増強が認められた。

〔考察〕

喫煙を模した低濃度ニコチンは、イヌ脳底動脈においてPKC活性化し、UTPによる血管収縮反応を増強した。また、低濃度ニコチンは血管内皮細胞におけるNO産生量を減少させ、サブスタンスPによる内皮依存性血管弛緩反応を減弱させた。血管内皮細胞の除去により、イヌ脳底動脈におけるPKC活性は上昇し、血管収縮反応は増強された。この結果より、低濃度ニコチンによる血管内皮細胞機能低下がイヌ脳底動脈におけるPKC活性を上昇させ、血管収縮反応を増強すると考えられた(間接的経路)。さらに、血管内皮細胞除去標本に低濃度ニコチンを作用させることにより、イヌ脳底動脈におけるPKC活性はさらに上昇し、血管収縮反応もさらなる増強を認めた。この結果より、低濃度ニコチンは血管平滑筋細胞へ直接作用し、血管収縮反応を増強すると考えられた(直接的経路)。これらの結果より、低濃度ニコチンそのものは収縮を引き起こさないものの、間接的および直接的経路によりPKC活性を上昇させ、生体内における血管収縮反応を増強することが示唆された。

〔結論〕

喫煙を模した低濃度ニコチンは、間接的および直接的にPKC活性を上昇させて生体内における血管収縮反応を増強し、脳血管障害のリスクファクターとなるものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

脳血管障害のリスクファクターの一つに喫煙が挙げられる。喫煙による影響は、タバコ煙中に含まれる様々な化合物が作用すると考えられるが、その中で最も強い薬理作用を有するニコチンの脳血管に対する作用においては、収縮および弛緩といった相反する作用が報告がされている。そこで、申請者はニコチンの脳血管トーン調節に与える影響について、血管平滑筋収縮増強因子の一つであるプロテインキナーゼC(protein kinase C; PKC)を中心に検討を行った。

摘出イヌ脳底動脈および人培養血管内皮細胞を用いて、以下の検討を行った。ニコチン濃度は慢性喫煙者の喫煙時血中ニコチン濃度に相当する 10^{-6} mol/Lを用いた。正常イヌ脳底動脈リング標本における発生張力を等尺性に測定し、ウリジン三リン酸(uridine triphosphate; UTP)による血管収縮反応およびサブスタンスPによる内皮依存性血管弛緩反応に与えるニコチンの影響について検討した。イヌ脳底動脈膜分画におけるPKC活性を酵素免疫抗体法により測定した。一酸化窒素(nitric oxide; NO)産生量を、培養血管内皮細胞およびNO蛍光指示薬[diaminofluorescein-FM diacetate (DAF-FM/DA)]を用いて、可視化、解析した。また、血管内皮細胞とPKC活性およびニコチンとの関連性を明らかにするため、機械的に血管内皮細胞を除去したイヌ脳底動脈を用い、UTPによる血管収縮反応、NOドナーによる血管弛緩反応およびイヌ脳底動脈膜分画におけるPKC活性を測定した。

以下の結果を得た。

- 1) ニコチンはイヌ脳底動脈において収縮を引き起こさなかったが、UTPによる血管収縮反応を有意に増強した。
- 2) イヌ脳底動脈膜分画におけるPKC活性は、UTP刺激により増加し、ニコチン処置後、UTP刺激することによりさらなる増加を認めた。
- 3) サブスタンスPによる内皮依存性血管弛緩反応はニコチン処置群において有意に減弱した。培養血管内皮細胞におけるサブスタンスP刺激によるNO産生もニコチン処置群において有意に減弱した。
- 4) 血管内皮細胞除去イヌ脳底動脈リング標本におけるNOドナーによる血管弛緩反応はニコチン処置の有無にかかわらず、変化は認められなかった。
- 5) イヌ脳底動脈膜分画におけるPKC活性は、血管内皮細胞除去によって上昇し、ニコチン処置によりさらなる上昇を認めた。UTPによる血管収縮反応も同様に、血管内皮細胞除去標本において収縮増強が認められ、ニコチンを処置することによりさらなる収縮反応の増強が認められた。

申請者は、UTPによる血管収縮におけるニコチンによる増強作用は2つのメカニズムにより引き起こされることを証明した。1つは、ニコチンによる血管内皮でのNO産生低下が血管平滑筋細胞のPKC活性を上昇させ、血管収縮反応を増強すること。もう1つは、ニコチンが血管平滑筋細胞のPKC活性を上昇させ、血管収縮反応を増強することである。

審査委員会は、ニコチンが血管平滑筋細胞のPKC活性を間接的および直接的に上昇させ血管収縮反応を増強することを証明したことを高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) イヌの血管を研究に用いた理由について
- 2) イヌと人の血管反応の違いについて
- 3) 血管収縮および拡張反応を測定する機器について
- 4) UTPによる血管収縮作用のメカニズムについて
- 5) PKCの活性化の測定方法について
- 6) ニコチンによる血管収縮反応について
- 7) PKC活性と血管収縮について
- 8) ニコチンによるPKC活性上昇のメカニズムについて
- 9) ニコチンによるNO産生抑制作用について
- 10) ニコチンによる平滑筋細胞内Ca²⁺濃度の変化について
- 12) この研究から治療法の応用について

これらの質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点もよく把握しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 梅村和夫
副査 浦野哲盟 副査 宮嶋裕明