

氏名	キ 紀 アサヒ 旭
学位(専攻分野)	博 士 (人間・環境学)
学位記番号	人 博 第 399 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	人 間 ・ 環 境 学 研 究 科 相 関 環 境 学 専 攻
学位論文題目	Study on the pharmacological nature of nicotine as a risk factor of subarachnoid hemorrhage (クモ膜下出血の危険因子であるニコチンの薬理学的性質に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 倉 橋 和 義 准 教 授 津 田 謹 輔 教 授 小 松 賢 志

### 論 文 内 容 の 要 旨

厚生労働省の報告書(2004年)によると、喫煙者のクモ膜下出血発症率は、非喫煙者よりも男性の場合3.6倍、女性の場合2.7倍高い。同様に、非喫煙者と比べ、喫煙本数が1日20本以下では2.8、20本以上では5.2倍、クモ膜下出血を発症する危険性が高いという報告もある。さらに、喫煙はクモ膜下出血に続いて起こる脳動脈攣縮を増悪させることが知られている。タバコ煙中には約4,000種類の化合物が含まれると報告されている。それらの中で、ニコチンは依存性と中毒性があり、そのうえ動脈を収縮させ、血圧を上昇させるため、喫煙による悪影響の主たる要因であると考えられる。しかしながら、ニコチンがクモ膜下出血を発症させる機構および脳動脈攣縮を増悪させる機構の詳細は依然不明である。そこで、遺伝子レベルでの研究を展望すれば、取扱が比較的容易なラットのような小動物が有利であることから、申請者はラット脳底動脈を用いてニコチンとクモ膜下出血との関係を明らかにする研究を企画した。

本論文は第一部と第二部から構成され、第一部ではラットの脳底動脈におけるニコチン収縮の薬理学的性質を明らかにした。外径20~300 $\mu$ mと極めて細い脳底動脈の標本作製方法を確立するには困難を極めたが、以下のような工夫を重ねて、これを実現した。ペントバルビタールナトリウム麻酔下で全脳を摘出し、次に実体顕微鏡下で径120 $\mu$ mの鍼灸針を脳底動脈に挿入し、その鍼灸針ごとラット脳底動脈を脳から切り取った。次に、脳底動脈を約0.5mm幅および約1cm長さに切り、短冊状標本を作製した。この標本を用いて、脳底動脈の張力変化を、トランスデューサを介し電気信号に変換した後、増幅して記録した。続いて、種々の薬物の効果を、薬物無処置時のニコチン反応を100%とし、薬物処置後のニコチン反応と比較して、%変化として評価した。

多くの動脈作動性物質が誘発する動脈の弛緩あるいは収縮反応は、作動性物質が内皮細胞を刺激した結果遊離する内皮細胞由来の因子によって誘起されることが示されている。申請者は、ニコチン収縮が内皮細胞依存性かどうかを、化学的内皮細胞除去剤を用いて検討した。その結果、これによる処置はニコチン収縮を90%以上消失させ、これは内皮細胞依存性であることを確かめた。次に、この収縮に関与するニコチン受容体の亜型について検討した。すなわち、これまで報告されている3種類の亜型(骨格筋型、交感神経節型および中枢神経型)の受容体拮抗薬の影響を検討した結果、中枢神経型および骨格筋型のニコチン受容体を介することを明らかにした。また、動脈作動性物質により誘発される収縮あるいは弛緩反応には、Ca<sup>2+</sup>チャンネルおよびK<sup>+</sup>チャンネルなどの関与が報告されている。そこでCa<sup>2+</sup>チャンネル拮抗薬およびK<sup>+</sup>チャンネル開口薬の影響を検討し、このニコチン収縮にCa<sup>2+</sup>チャンネルの活性化が関与することを明らかにした。これまで申請者の研究グループは、種々の動脈における内皮細胞依存性収縮では、細胞膜リン脂質から生成するアラキドン酸代謝産物が、動脈収縮因子として機能することを報告してきた。申請者は新たな課題として、ニコチン収縮にそれらの関与する可能性を検討した。その結果、この内皮細胞依存性のニコチン収縮は、ホスホリパーゼ(PLCおよびiPLA<sub>2</sub>)により細胞膜リン脂質から切り出されたアラキドン酸のシクロオキシゲナーゼ(COX-2)およびリポオキシゲナーゼ(5-LOX)代謝産物であるプロスタグランジン(PGs)およびロイコトリエン(LTB<sub>4</sub>)によって誘起されることを世界に先駆け明らかにした。

第二部では、第一部で明らかにしたラット脳底動脈のニコチン収縮の薬理的性質に対する実験的クモ膜下出血の影響を検討した。実験的クモ膜下出血モデルは、自家血を大槽内に注入し作製した。この出血1時間後、脳底動脈は正常ラットの脳底動脈径の約50%まで攣縮し、これを攣縮期標本とした。さらに、出血1週間後の脳底動脈は、ほぼ正常の動脈径に回復し、これを回復期標本とした。また、Ca<sup>2+</sup>チャンネル活性は攣縮期標本では減弱し、回復期標本では影響されなかった。一方、K<sup>+</sup>チャンネル活性は両標本において増大した。PLC活性は両標本においてそれぞれ増大し、cPLA<sub>2</sub>活性は両標本においてそれぞれ減弱した。iPLA<sub>2</sub>活性は、攣縮期標本では減弱し、回復期標本では影響なかった。一方sPLA<sub>2</sub>およびCOX-2活性は、攣縮期標本では影響なく、回復期標本では増大した。これらの結果から、申請者はラット脳底動脈におけるニコチン収縮が、内皮細胞のニコチン受容体刺激、Ca<sup>2+</sup>チャンネル活性化および膜情報伝達過程においてCOX-2ならびに5-LOX活性化にともなうPGsおよびLTB<sub>4</sub>などによる収縮であることを明らかにした。さらに、クモ膜下出血後の経過時間、すなわち攣縮期であるか攣縮回復期であるかによって、このニコチン収縮過程に対する影響が異なることを明らかにした。その違いはクモ膜下出血発症、脳動脈攣縮および攣縮回復に関連する可能性を示し、脳循環障害の機序解明および治療薬開発に資するものと考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

喫煙者に脳循環障害、心循環障害ならびに肺がん患者が多いことはよく知られている。最近喫煙人口は減少してきているが、その健康障害は現在でも大きな社会問題である。国内外の報告によると、喫煙者におけるクモ膜下出血発症率は、非喫煙者よりも2.7~5.2倍高い。さらに、喫煙はクモ膜下出血に続いておこる脳動脈攣縮を増悪させることが知られている。タバコ煙中には数千の化合物が含まれ、中でもニコチンは依存性および中毒性があり、そのうえ動脈を収縮させ血圧を上昇させることから喫煙による悪影響の主たる要因であると考えられる。しかしながら、ニコチンがクモ膜下出血を発症させる機構、および脳動脈攣縮を増悪させる機構の詳細は依然不明である。そこで申請者は、動物実験モデルの確立が病態生理の解明ならびに治療薬開発に重要であるとの観点から、ラット脳底動脈を用いてニコチンとクモ膜下出血との関係を明らかにする研究を企画した。ラットのような小動物は遺伝子操作が比較的容易なためモデル動物として重要性が増しており、このようなモデル研究が脳循環障害の機序解明と治療薬開発に資する可能性が高くなると予想される。申請者が小動物を用いて企画したこのような方向での研究は、先見性のあるものと評価できる。

論文の第一部では、申請者の研究グループがこれまで実施してきた、種々の動脈作動物質についての内皮細胞依存性収縮の薬理学的研究に立脚し、ラット脳底動脈のニコチン収縮に内皮細胞由来の因子が関与することを論述している。これまでニコチンの作用点は神経終末部と考えられてきたが、この研究結果はニコチンの新たな作用機序を提案するものであり、脳循環系病態生理学に対する重要な貢献の一つと評価できる。申請者は、次に内皮細胞におけるニコチン受容体の亜型について検討し、ニコチン収縮は中枢神経型および骨格筋型の両ニコチン受容体を介する収縮であることを明らかにした。さらにこのニコチン受容体刺激がCa<sub>v</sub><sup>2+</sup>チャンネルの活性化に関連することを示した。特に、末梢動脈とは異なり脳底動脈では、中枢神経型のニコチン受容体が骨格筋型のニコチン受容体よりも約100倍親和性が高いという結果は、クモ膜下出血および攣縮との関連において今後の展開が期待される。これまで申請者の属する研究グループは、種々の動脈作動物質による刺激時の内皮細胞由来の収縮因子を解明してきたが、ラット脳底動脈のニコチン刺激については未解明であった。申請者は、この刺激で生じる内皮細胞から遊離する動脈収縮因子について検討し、この収縮因子が、内皮細胞膜リン脂質からホスホリパーゼ (PLCおよびiPLA<sub>2</sub>) により切り出されるアラキドン酸のシクロオキシゲナーゼ (COX-2) ならびにリポオキシゲナーゼ (5-LOX) による代謝産物であるプロスタグランジン (PGs) およびロイコトリエン (LTB<sub>4</sub>) であることを明らかにした。これらのアラキドン酸代謝産物が炎症性因子ならびに免疫性因子であることを考えると、申請者が今回明らかにした事実は、それらが脳循環障害因子として作用する可能性を示唆するもので、クモ膜下出血発症機序を考える上で極めて重要である。

第二部では、第一部で明らかにしたラット脳底動脈における内皮細胞依存性ニコチン収縮の薬理学的特徴のいずれに実験的クモ膜下出血が影響するかを検討している。申請者は、この検討からクモ膜下出血発症などに関連する機構を明らかにしようと企画した。本論文では、実験的クモ膜下出血1時間後の脳底動脈は、正常ラットの脳底動脈径の約50%まで攣縮し、

これを攣縮期標本として使用した。また実験的クモ膜下出血1週間後の脳底動脈は、ほぼ正常の動脈径に回復し、これを回復期標本として使用した。攣縮期標本ではCa<sup>2+</sup>チャンネル活性およびiPLA<sub>2</sub>活性は減弱し、回復期標本ではsPLA<sub>2</sub>およびCOX-2活性は増大した。また、両標本でK<sup>+</sup>チャンネル活性およびPLC活性は増大し、cPLA<sub>2</sub>活性は減弱した。すなわち、ニコチン収縮過程に対する影響がクモ膜下出血後の経過時間により異なることを世界に先駆け明らかにした点は高く評価できる。

申請者の研究グループがこれまで実施してきた、ストレス関連因子であるバソプレシンの内皮細胞依存性収縮反応の薬理学的研究に加えて、今回申請者はニコチン収縮反応に内皮細胞由来の新たな因子が関与することを明らかにした。この研究結果は脳循環系病態生理学に対する重要な貢献の一つと評価できる。さらにニコチン収縮過程に対する影響がクモ膜下出血後の経過時間により異なることは、クモ膜下出血発症、攣縮期および攣縮回復期などに関連する可能性があり、それらの病態解明の端緒になるものと期待される。

以上のように、本学位申請論文はラットによるクモ膜下出血発症、脳動脈攣縮期および脳動脈攣縮回復期モデルの確立に道を拓き、その研究成果は学会発表と学術論文を通して国内外の研究者に高く評価されている。

よって本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成20年1月9日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。