

氏名・(本籍)	ふじ わら ひろ き 藤原弘喜(岡山県)			
学位の種類	博士(薬学)			
報告番号	乙第1575号			
学位授与の日付	平成27年3月24日			
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当(論文博士)			
学位論文題目	ラットおよびマウス腸間膜動脈血管床における 血管機能調節機構の血管薬理学的研究			
論文審査委員	(主査)	福岡大学	教授	岩崎克典
	(副査)	福岡大学	教授	片岡泰文
		福岡大学	教授	三島健一
		福岡大学	准教授	道具伸也

内容の要旨

要旨

腹腔に位置する腸間膜血管床は、抵抗血管を多く含む血管床であり、その血流の変化は全身血圧にも影響する。ラット腸間膜動脈の血管緊張度は、血管収縮性の交感神経だけでなく、非アドレナリン・非コリン作動性神経であるカルシトニン遺伝子関連ペプチド(calcitonin gene-related peptide; CGRP)含有神経によっても調節されている。加えて、血管内皮細胞による緊張度調節も受けており、様々な機構によって血管緊張が維持されている。糖尿病や高血圧等の生活習慣病において、これらの血管緊張度調節機構に異常をきたし、高血圧の進展に寄与していることが報告されている。著者は、生活習慣病の成因解明や血管緊張度調節機序の解析を目的とし、ラットおよびマウス腸間膜動脈における血管周囲神経と血管内皮細胞について研究した。本論文は、その成果を三章に分けてまとめたものである。

糖尿病では高血圧を併発する患者が多い事が知られている。人為的に作成した後天的インスリン抵抗性モデルであるフルクトース飲水負荷ラット(FDR)においてもインスリン抵抗性ととも高血圧を発症し、腸間膜動脈において交感神経機能の亢進、CGRP含有神経機能の低下が起ることが報告されている。しかし、インスリン抵抗性(高インスリン血症状態)に長期間暴露された場合の血管機能の変化については十分に明らかにされていない。そこで、第一章では、先天的にインスリン抵抗性に続いて糖尿病を発症するOtsuka Long-Evans Tokushima Fatty(OLETF)ラットを用いて血管周囲神経および血管内皮細胞の機能変化について検討した。OLETFラットでは、FDRと同様にインスリン抵抗性の進展とともに高血圧が認められた。一方、腸間膜動脈灌流標本では、交感神経性血管収縮反応の増大、CGRP含有神経性血管弛緩反応の低下、血管内皮依存性弛緩反応の低下が観察された。加えて血管周囲神経の免疫組織化学的検討では、交感神経分布は変化せず、CGRP含有神経分布の減少が認められた。これらの結果から、インスリン抵抗病態下では、CGRP含有神経機能が減弱するために相対的に交感神経機能が亢

進し、血管緊張度調節機構に異常が生じることで高血圧が進展することが示唆された。

現在、マウスでは病態発現に関与する遺伝子を操作した病態モデルが確立され、それらの血管機能について病態生理学的な研究が行われているが、血圧維持に関与しない大動脈等の大血管を用いた研究のみであり、血圧の維持に重要な抵抗血管を用いた研究は少ない。そこで、第二章では、マウスにおける抵抗血管緊張度調節機構の研究を可能にするために、マウス腸間膜動脈灌流標本を作製し、灌流実験の諸条件を検討した。加えて、ラットと同様に交感神経および CGRP 含有神経による神経支配が存在するか検討した。最初に、灌流速度について検討した。灌流速度を 1~5 mL/min に上昇させるに伴い、灌流圧が上昇し、経壁電気刺激 (PNS) による血管収縮反応も増大したが、4 mL/min 以上の流速では、灌流圧が上下に変動し不安定になった。従って、マウス灌流実験の至適流速は 3 mL/min であると判断した。また、PNS により観察された血管収縮反応は、tetrodotoxin (神経伝達遮断薬) および guanethidine (交感神経遮断薬)、prazosin (アドレナリン $\alpha 1$ 受容体遮断薬) により消失したことから、ラットと同様に交感神経およびアドレナリン $\alpha 1$ 受容体を介して発現していることが明らかとなった。

血管弛緩反応は、あらかじめ灌流圧を上昇させた後で acetylcholine (ACh) および sodium nitropruside (SNP)、PNS、CGRP による弛緩反応を観察した。ACh および SNP により一過性の弛緩反応が、PNS および CGRP により持続した弛緩反応が観察された。PNS による弛緩反応は、tetrodotoxin および capsaicin (CGRP 枯渴薬)、CGRP8-37 (CGRP1 受容体遮断薬) によりほぼ消失したことから、弛緩反応もラットと同様に CGRP 含有神経および CGRP1 受容体を介して発現していることが明らかとなった。さらに、これら両神経の免疫組織化学的検討の結果、血管周囲を網目状に取り巻くように分布していることが確認された。

一方、血管緊張度の調節はこれらの神経だけでなく、血管内皮細胞も関与しているため、第三章では内皮依存性弛緩反応を惹起させる ACh および A23187 (Ca イオノフォア) を用いて検討した。ACh による弛緩反応は、tetraethylammonium (TEA) (K^+ チャネル阻害薬)、18 α -GA (18 α -glycyrrhetic acid) (gap-junction 阻害薬) により抑制されたことから、主に K^+ チャネルおよび gap-junction を介しており、A23187 による弛緩反応は、indomethacin および TEA により抑制されたことから、主に prostanoids および K^+ チャネルを介して生じていることが明らかとなった。従って、マウス腸間膜動脈においてもラットと同様に血管周囲神経および内皮細胞が血管緊張度調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。

本研究で確立したマウス腸間膜動脈灌流実験を様々な病態モデルマウスに応用することにより、糖尿病や高血圧等の生活習慣病の成因解明や血管緊張度調節機序の解析、新規治療薬開発に貢献できると考えられる。

審査の結果の要旨

腸間膜血管床は、抵抗血管を多く含む血管床であり、その血流の変化は全身血圧にも影響する。ラット腸間膜動脈の血管緊張度は、血管収縮性の交感神経だけでなく、非アドレナリン・非コリン作動性神経であるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene-related peptide; CGRP) 含有神経によっても調節されていることが明らかにされている。現在、マウスでも病態発現に関与する遺伝子を操作した病態モデルが確立され、それらの血管機能について病態生理学的な研究が行われているが、大血管を用い

た研究のみであり、血圧の維持に重要な抵抗血管を用いた研究は少ない。そこで、本研究ではマウスにおける抵抗血管緊張度調節機構の研究を可能にするために、マウス腸間膜動脈灌流標本を作製し、灌流実験の諸条件を検討した。その結果灌流速度を1～5mL/minに上昇させるに伴い、灌流圧が上昇し、経壁電気刺激(PNS)による血管収縮反応が増大したが、4 mL/min以上の流速では、灌流圧が上下に変動し不安定になった。従って、マウス灌流実験の至適流速は3 mL/minであると判断した。また、PNSにより観察された血管収縮反応は、tetrodotoxin(神経伝達遮断薬)およびguanethidine(交感神経遮断薬)、prazosin(アドレナリン α 1受容体遮断薬)により消失したことから、ラットと同様にアドレナリン α 1受容体を介して発現していることが分かった。血管弛緩反応は、あらかじめ灌流圧を上昇させた後でacetylcholine(ACh)およびsodium nitroprusside(SNP)、PNS、CGRPによる弛緩反応を観察した。AChおよびSNPにより一過性の弛緩反応が、PNSおよびCGRPにより持続した弛緩反応が観察された。PNSによる弛緩反応は、tetrodotoxinおよびcapsaicin(CGRP枯渴薬)、CGRP8-37(CGRP1受容体遮断薬)によりほぼ消失したことから、弛緩反応もラットと同様にCGRP含有神経およびCGRP1受容体を介して発現していることが分かった。さらに、これらの両神経の免疫組織化学的検討の結果、血管周囲を網目状に取り巻くように分布していることが確認された。一方、血管緊張度の調節はこれらの神経だけでなく、血管内皮細胞も関与しているため、内皮依存性弛緩反応を惹起させるAChおよびA23187(Caイオノフォア)を用いて検討した。AChによる弛緩反応は、tetraethylammonium(TEA)(K⁺チャンネル阻害薬)、18 α -GA(18 α -glycyrrhetic acid)(gap-junction阻害薬)により抑制されたことから、主にK⁺チャンネルおよびgap-junctionを介しているおり、A23187による弛緩反応は、indomethacinおよびTEAにより抑制されたことから、主にprostanoidsおよびK⁺チャンネルを介して生じていることが明らかとなった。従って、マウス腸間膜動脈においてもラットと同様血管周囲神経および内皮細胞が血管緊張度調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。

次に、インスリン抵抗性における血管周囲神経と内皮細胞の機能変化について検討した。糖尿病では高血圧を併発する患者が多い事が知られている。人為的に作成したインスリン抵抗性モデルであるフルクトース飲水負荷ラット(FDR)においてもインスリン抵抗性ともに高血圧を発症し、腸間膜動脈において交感神経機能の亢進、CGRP含有神経機能の低下が起ることが報告されている。しかし、インスリン抵抗性(高インスリン血症状態)に長期間暴露された場合の血管機能の変化については十分に明らかにされていない。そこで、先天的にインスリン抵抗性に続いて糖尿病を発症するOtsuka Long-Evans Tokushima Fatty(OLETF)ラットを用いて血管周囲神経および血管内皮細胞の機能変化について検討した。OLETFラットでは、FDRと同様にインスリン抵抗性の進展とともに高血圧が認められた。一方、腸間膜動脈灌流標本では、交感神経性血管収縮反応の増大、CGRP含有神経性血管弛緩反応の低下、血管内皮依存性弛緩反応の低下が観察された。加えて血管周囲神経の免疫組織化学的検討では、交感神経分布は変化せず、CGRP含有神経分布の減少が認められた。これらの結果から、インスリン抵抗病態下では、CGRP含有神経機能が減弱するために、相対的に交感神経機能が亢進することで高血圧の進展に寄与しており、血管緊張度調節機構に異常が生じていることが明らかとなった。以上、本研究で確立したマウス腸間膜動脈灌流実験を様々な病態モデルマウスに応用することにより、糖尿病や高血圧等の生活習慣病の成因解明や血管緊張度調節機序の解析、新規治療薬開発に有用であると考えられる。

上記の内容に関して、その独創性・新規性、論文投稿、さらには公聴会での質疑に対する能力を鑑みたと上で、本論文は本学薬学研究科の博士学位論文として認定出来ると判断した。