

脳神経血管機構ネットワークに対する喫煙の有害作用

木村 郁哉

福岡大学薬学部薬学疾患管理学教室 〒814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1

Harmful effects of smoking on neurovascular unit

Ikuya Kimura

Dept. Pharm. Care Health Sci., Fac. Pharm. Sci.

Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

Abstract

Tobacco smoke causes serious health problems such as stroke. Since toxic chemicals are formed during combustion, the tobacco industry's developed heat-not-burn cigarettes which heat tobacco leaves instead of burning to reduce certain toxic chemicals. However, it is controversial whether heat-not-burn tobacco would reduce risk of stroke.

Brain capillaries form a blood-brain barrier (BBB) composed of brain microvascular endothelial cells. The BBB maintains brain homeostasis which are required for proper neuronal function by regulating the movement of circulating molecules between the blood and the brain. Accumulating evidence suggests that BBB hyperpermeability could increase the risk of stroke. BBB permeability is tightly regulated not only by the endothelial cells that form the walls of the blood vessels but also through a series of complex cellular interactions with pericytes. In addition, recent study imply that interactions between endothelial cells and oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) are required for the induction and maintenance of BBB function.

Therefore, we investigate whether nicotine or heat-not-burn tobacco extract induce BBB hyperpermeability through the endothelial cell injury and attenuating the interaction among endothelial cells, pericytes and oligodendrocyte lineage cells.

keywords : Blood-brain barrier, nicotine, heat-not-burn tobacco, endothelial cells

【緒言】

喫煙により身体は4000を超える化合物に暴露される。そのため喫煙は様々な疾患のリスクとなり、厚生労働省の研究班によると2014年度における喫煙により生じる超過医療費は約1兆5000億円にのぼる[1]。脳血管障害は喫煙が発症リスクとされる疾患の一つであり、脳血管障害に起因した超過医療費は全体の約1/4を占める。また、脳血管障害は喫煙者だけの問題ではなく、受動喫煙に起因した死亡者の半数は脳血管障害を原因とする。そのため、医療費の削減および健康被害の回避のためにも喫煙に伴う脳血管障害の発症メカニズムの解明およびその回避方法の探索が強く望まれる。

喫煙により生体が曝露される代表的な有害物質のうち、一酸化炭素やタールはタバコの燃焼により生じる。そこで近年各タバコ会社は、燃焼を必要とせず理論上タバコの燃焼により生じる有害物質を含まない加熱式タバコを製造・販売している。しかし、加熱式タバコの使用においても有害作用が生じるこ

とが示唆されつつある[2-4]。一方で加熱式タバコの販売が開始されてからまだ日が浅く、加熱式タバコの使用による脳血管への影響に関する検討はいまだ皆無であり、脳血管障害を招く喫煙として加熱式タバコ喫煙も含めて考える必要がある。

脳微小血管には、血中由来物質の脳実質への透過を制御する血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) と呼ばれる脳微小血管特異的な構造が存在する。BBB 機能は脳血管障害の発生に先行して低下することから、BBB 機能の低下は脳血管障害易発症状態の形成に関与すると考えられる。BBB の本体は脳血管内皮細胞および細胞間隙に存在する ZO-1, occludin, claudin-5 からなるタイトジャンクションが担い、さらにペリサイトやアストロサイトといった脳血管内皮細胞周囲に存在する細胞との相互作用が BBB の機能維持を行う [5]。加えてこれら BBB 構成細胞は、髄鞘形成を担うオリゴデンドロサイトおよびその前駆細胞 (Oligodendrocyte progenitor cell: OPC)、神経細胞と脳神経血管機構と呼ばれる相互ネットワークを形成し、一つのユニットとして働くことで BBB を含む相互の機能を維持する。従って、加熱式タバコを含む喫煙は脳血管内皮細胞を傷害し、BBB 機能維持を担う脳神経血管機構構成細胞間ネットワークを減弱させることで BBB 機能の低下、すなわち脳血管障害易発症状態を形成することが推察される。

以上を総合し、本研究では脳血管障害の発症メカニズムの解明およびその回避方法の探索を目指して、脳神経血管機構ネットワークにより維持される機構である BBB に着目した。すなわち、BBB 機能を担う脳血管内皮細胞および BBB 機能亢進作用を担う脳神経血管機構構成細胞間ネットワークへの加熱式タバコを含む喫煙の影響の解明を目的とした。

【方法】

細胞培養

脳血管内皮細胞およびペリサイトは3週齢 Wistar rat より単離した。また、1-2日齢 Wistar rat より OPC を得て、分化誘導を行うことでオリゴデンドロサイトとした。

BBB 機能の評価

Transwell (24-well type, Costar 3470) インサートの内側に RBEC (5×10^4 cells/well) を播種し、培養した。各薬物処理後または plate に播種したペリサイト、OPC およびオリゴデンドロサイトとの共培養後、Endohm (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) を用いて測定した経内皮電気抵抗値 (transendothelial electronic resistance: TEER) 値および蛍光色素の sodium fluorescein (Na-F) の透過係数を指標として経内皮細胞透過性を測定した。

Ploom TECH® 成分の抽出方法

Ploom TECH® タバコカプセルを分解し、タバコカプセル中のタバコ葉を 1.5 mL tube に回収した。タバコ葉の重量を測定し、タバコ葉 1 mg あたり 3 μ L の水またはグリセロール、プロピレングリコールを加えた。混和後 60°C で 120 分加熱した。加熱後、20,600 \times g、15 分遠心分離することでタバコ葉と上清を分離し、上清を回収して水抽出物、グリセロール抽出物、プロピレングリコール抽出物とした。

タイトジャンクション関連タンパク質および細胞間相互作用関連因子の測定

各細胞培養後または薬物処理後、ウエスタンブロット法により各細胞に発現するタイトジャンクション関連タンパク質および細胞間相互作用関連因子を定量した。

【結果】

1. 脳血管内皮細胞における nAChR の BBB 機能への影響の検討

タバコの主成分であるニコチンおよびその受容体であるニコチン性アセチルコリン受容体 (nicotinic

acetylcholine receptor: nAChR) に着目し, ニコチンまたは nAChR アゴニスト負荷時の脳血管内皮細胞のバリア機能を TEER 値および Na-F 透過係数を指標に測定した。その結果, $\alpha 7$ nAChR アゴニスト負荷により TEER 値の上昇および Na-F 透過係数の低下, タイトジャンクション関連タンパク質の occludin と claudin-5 の発現量が増加した。一方で $\alpha 4\beta 2$ nAChR アゴニストおよび nicotine, multiple nAChR アゴニストのバレニクリン負荷では TEER 値および Na-F 透過係数に変化がなかった。

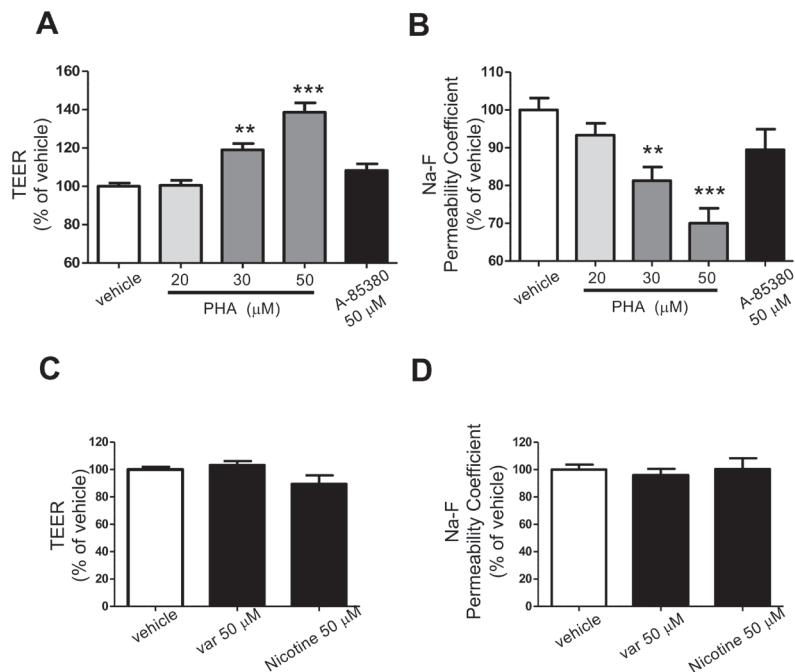


Fig.1 TEER and permeability coefficient of sodium-fluorescein (Na-F) in RBEC monolayers treated with PHA 543613 (PHA), 5-iodo-A-85380 (A-85380), Varenicline (var) and Nicotine.

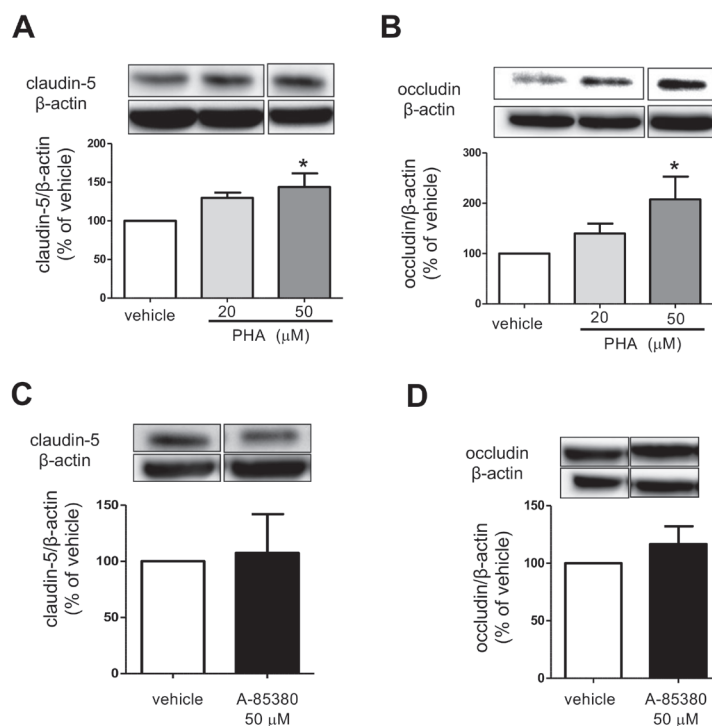


Fig.2 Effect of $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nAChR stimulation on TJ protein expression in RBECs

2. Ploom TECH®の使用がBBBに与える影響の検討

加熱式タバコの使用がBBB機能に与える影響の解明を目指して、日本たばこ産業が製造・販売する加熱式タバコであるPloom TECH®を用いて、Ploom TECH®喫煙BBB機能へ与える影響について検討を行った。Ploom TECH®は水、グリセロール、プロピレングリコールからなる専用のリキッドによりタバコ葉からその成分を抽出するデバイスである。そのため水、グリセロール、プロピレングリコールそれぞれによるタバコ葉抽出物を作製し、各タバコ葉抽出物処理時の脳血管内皮細胞のバリア機能をTEER値、Na-F透過係数を指標に測定した。各抽出物は、脳血管内皮細胞の細胞生存率を低下させることなくTEER値の低下およびNa-F透過係数の上昇作用を示した。さらに、各抽出物処理は脳血管内皮細胞におけるclaudin-5の発現量を低下させた。この時の各タバコ葉抽出物は従来の紙巻きタバコにおいて有害と考えられる物質の含有量が極めて低かった。

Table.1 Concentrations of Nicotine, Acrolein, Formaldehyde, Acenaphthylene, Benzaldehyde in extraction of Ploom TECH

	Water extract	Glycerol extract	Propylene glycol extract
Nicotine	3300	2600	1700
Acrolein	N.D	N.D	N.D
Formaldehyde	0.6	1	1
Acenaphthylene	N.D	N.D	N.D
Benzaldehyde	N.D	N.D	N.D

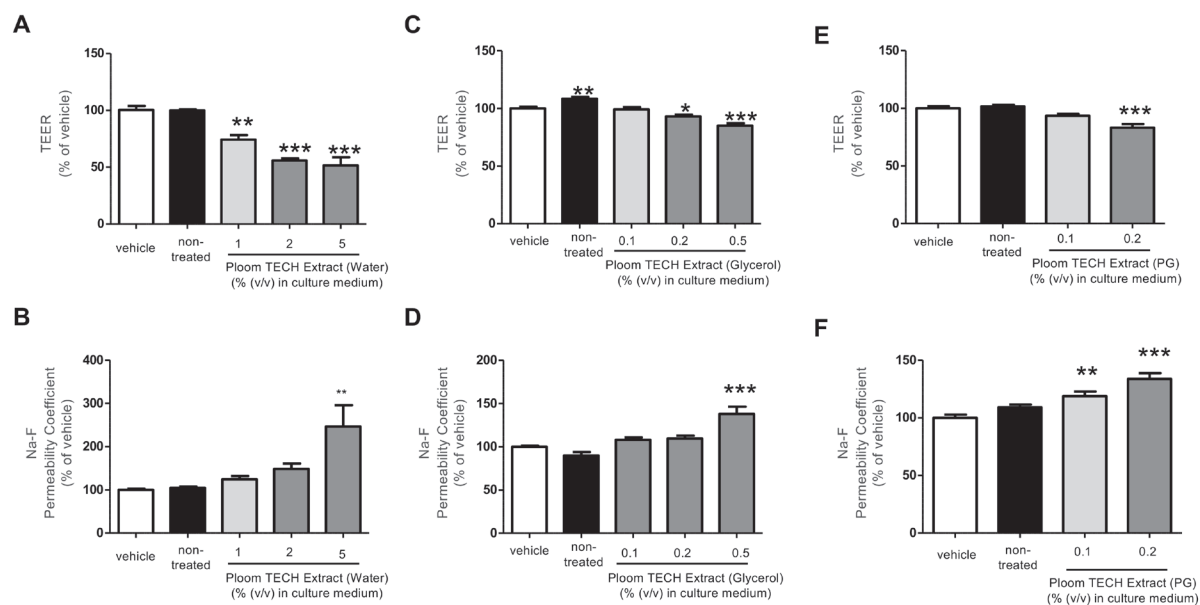


Fig.3 TEER and permeability coefficient of sodium-fluorescein in RBEC monolayers treated with the indicated concentration of water, glycerol, propylene glycol (PG) extract of Ploom TECH

3. 脳血管内皮細胞-ペリサイト間のPDGF-BB/PDGFR β を介した細胞間相互作用の検討

胎生期において脳血管内皮細胞はPDGF-BBを分泌し、その受容体PDGFR β を発現するペリサイトを脳血管内皮細胞周囲へと遊走させる[6]。そしてPDGF-BBまたはPDGFR β のKOマウスではBBB機能不全となることから[7]、脳血管内皮細胞-ペリサイト細胞間のPDGF-BB/PDGFR β シグナルはBBB形成に必須と考えられる。そこで、加熱式タバコの使用を含む喫煙がBBB機能に与える影響の解明を目指して、脳血管内皮細胞-ペリサイト細胞間のPDGF-BB/PDGFR β シグナルに着目した。すなわち、脳血管内皮細胞-ペリサイト細胞間のPDGF-BB/PDGFR β シグナルのBBB機能維持機構への関与およびニコチン、Ploom TECH[®]抽出物のPDGF-BB/PDGFR β シグナルへの影響について検討を行った。脳血管内皮細胞単独群と比較して、脳血管内皮細胞-ペリサイト共培養群ではNa-F透過係数が低下し、このBBB機能亢進作用はAG 1296 (PDGFR阻害剤)により減弱した。ニコチンはペリサイトによるBBB機能亢進作用に影響を与えない一方、Ploom TECH[®]抽出物は脳血管内皮細胞のPDGF-BB産生量を低下させた。

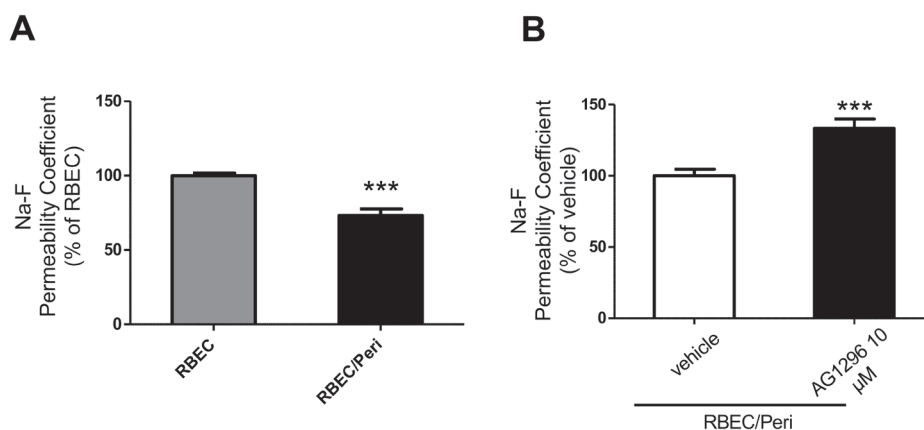


Fig.4 Permeability coefficient of sodium-fluorescein in RBEC monolayers and RBEC-Pericyte co-culture and permeability coefficient of sodium-fluorescein in RBEC-Pericyte co-culture with AG 1296 (PDGFR inhibitor).

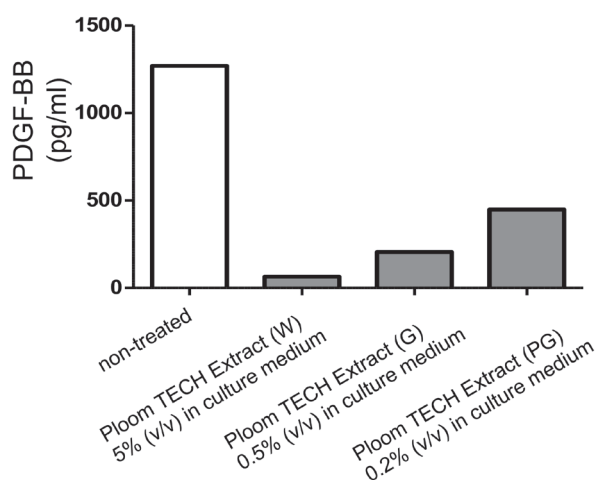


Fig.5 Concentrations of PDGF-BB in RBEC-conditioned medium treated with each ploom tech extract.

4. 脳血管内皮細胞-オリゴデンドロサイト系細胞のPDGF-BB/PDGFR α を介した細胞間相互作用の検討

近年、髄鞘形成を担うオリゴデンドロサイトおよびその前駆細胞であるOPCもBBB機能亢進作用を担う可能性が示されている。そこで、脳血管内皮細胞-OPC、脳血管内皮細胞-オリゴデンドロサイト間の細胞間相互作用を介したBBB機能亢進作用の有無について検討した。さらに、脳血管内皮細胞が産生するPDGF-BBの受容体の一つであり、OPC特異的な細胞マーカーとして用いられるPDGFR α に着目し、BBB機能亢進作用を担う細胞間相互作用におけるPDGF-BB/PDGFR α signalingの関与、さらにこの細胞間相互作用へのニコチンの影響を検討した。脳血管内皮細胞-OPC、オリゴデンドロサイト共培養系それぞれTEER値の上昇およびNa-F透過係数の低下が生じた。さらに脳血管内皮細胞-OPC共培養系においてAG1296 (PDGFR阻害剤) 負荷はOPCとの共培養による作用を減弱した。各細胞との共培養により生じる作用に対してニコチンは影響を与えなかった。

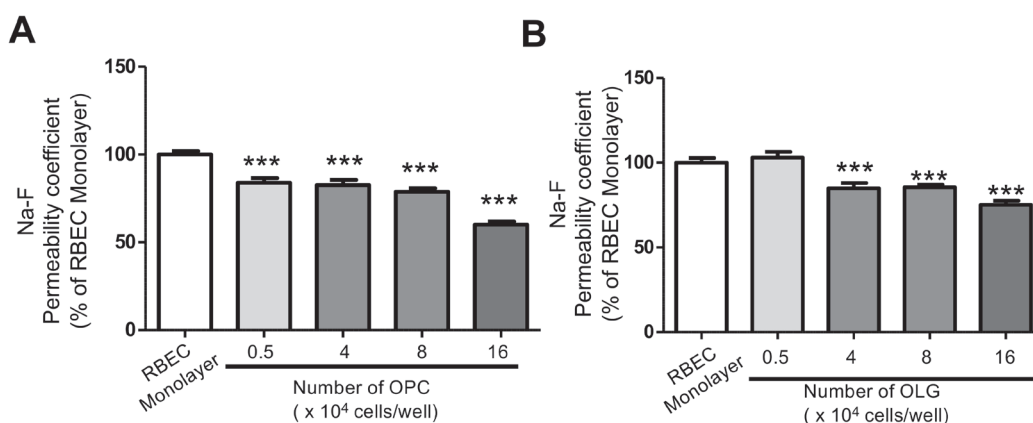


Fig.6 Permeability coefficient of sodium-fluorescein in RBEC monolayers and RBEC/OPC or RBEC/OLG co-culture.

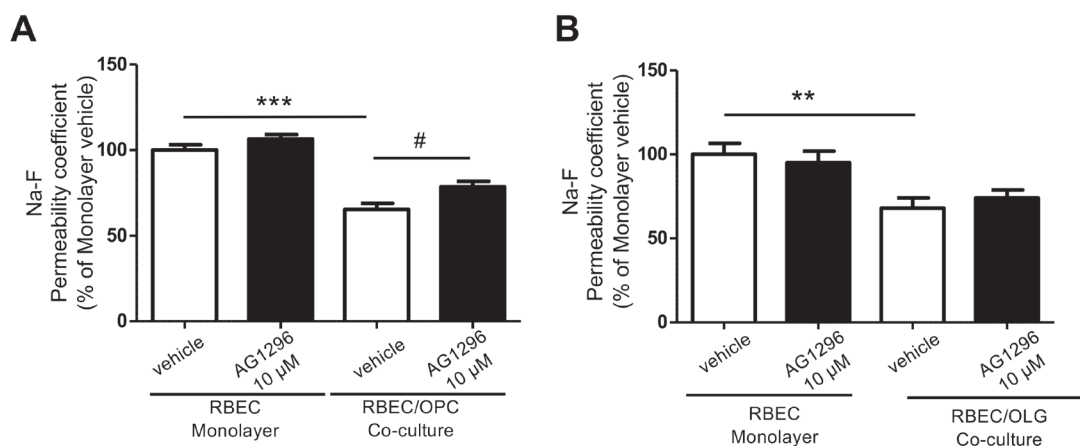


Fig.7 Permeability coefficient of sodium-fluorescein in RBEC monolayers and RBEC/OPC or RBEC/OLG co-culture treated with AG 1296 (PDGFR inhibitor).

【考察】

1. 脳血管内皮細胞における nAChR の BBB 機能への影響の検討

血管内皮細胞の $\alpha 7$ nAChR の活性化が claudin-5 および occludin の発現量を増加させ BBB 機能を亢進する一方で、 $\alpha 4\beta 2$ nAChR の活性化は BBB 機能に影響を与えないことを明らかにした。さらに、広く nAChR を活性化させるバレニクリンおよびニコチンでは BBB 機能に影響を与えないことから、 $\alpha 7$ nAChR の作用は他の nAChR により減弱する可能性があることを明らかにした。

2. Ploom TECH[®] の使用が BBB に与える影響の検討

各溶媒によるタバコ葉抽出物は脳血管内皮細胞のタイトジャンクション関連タンパク質の発現量を減少させることで、BBB 機能を低下させることを明らかにした。さらに、このタバコ葉抽出物中には従来の紙巻きタバコにおける有害物質として考えられるアクロレイン、ホルムアルデヒド、アセナフタレン、ベンズアルデヒドの含有量が極めて低かったことから、Ploom TECH[®] タバコカプセル中のタバコ葉にはこれら以外の BBB 機能障害因子が存在する可能性があることを明らかにした。また、本結果より Ploom TECH[®] の使用により紙巻きタバコ使用時と比べて既知の有害物質への曝露量が減少したとしても、BBB 機能低下のリスクが存在することが示唆される。以上、Ploom TECH[®] の使用は脳血管内皮細胞のタイトジャンクション関連タンパク質の発現量を減少させ、BBB 機能を低下させることで脳血管障害を惹起しうることを明らかにした。

3. 脳血管内皮細胞-ペリサイト間の PDGF-BB/PDGFR β を介した細胞間相互作用の検討

ニコチンは BBB 機能に影響を与えない一方で、各溶媒で抽出した Ploom TECH[®] タバコ葉抽出物により脳血管内皮細胞の PDGF-BB 産生能が低下することを明らかにした。これらのことから、ニコチンは脳血管内皮細胞-ペリサイト間の細胞間相互作用に影響を与えない一方で、Ploom TECH[®] の使用は脳血管内皮細胞における PDGF-BB 産生能を低下させ、PDGF-BB/PDGFR β signaling を減弱することで BBB 機能低下を誘導することが示唆される。

4. 脳血管内皮細胞-オリゴデンドロサイト系細胞の PDGF-BB/PDGFR α を介した細胞間相互作用の検討

脳血管内皮細胞-OPC 間および脳血管内皮細胞-オリゴデンドロサイト間に BBB 機能亢進作用を担う細胞間相互作用が存在し、ニコチンはこれらの細胞間相互作用に関与しないことを明らかにした。さらに、OPC による BBB 機能亢進作用は脳血管内皮細胞-OPC 間の PDGF-BB/PDGFR α signaling が担う可能性が示唆された。第3章より、Ploom TECH[®] タバコ葉抽出物中により脳血管内皮細胞の PDGF-BB 産生能が低下することから、Ploom TECH[®] の使用は PDGF-BB/PDGFR α signaling を減弱させることで BBB 機能の低下を誘導する可能性がある。

【総括】

以上を総合し、本研究はペリサイトや OPC、オリゴデンドロサイトといった脳血管内皮細胞周囲に存在する脳神経血管機構構成細胞との PDGF-BB/PDGFR signaling を含む細胞間相互作用が BBB 機能亢進作用を担うことを明らかにした。そして喫煙により曝露される化合物のうち、少なくともニコチンは脳血管内皮細胞のバリア機能および脳神経血管機構構成細胞間の PDGF-BB/PDGFR signaling を介した相互作用に影響を与えないことが示唆された。一方、Ploom TECH[®] の使用において脳血管内皮細胞の障害および PDGF-BB/PDGFR signaling を介した BBB 機能亢進作用を担う脳神経血管機構ネットワークの減弱が生

じ, BBB機能が低下する可能性が明らかとなった。今後, *in vivo*におけるPloom TECH®喫煙によっても同様の作用が再現されるかを検討する必要がある。

【参考文献】

- [1] 厚生労働省. 受動喫煙防止等のたばこ対策の推進に関する研究, (2016).
- [2] T. Aokage, K. Tsukahara, Y. Fukuda, F. Tokioka, A. Taniguchi, *Respiratory Medicine Case Reports* Heat-not-burn cigarettes induce fulminant acute eosinophilic pneumonia requiring extracorporeal membrane oxygenation, *Respir. Med. Case Reports*. 26 (2019) 87–90. doi: 10.1016/j.rmcr.2018.12.002.
- [3] N.J. Leigh, P.L. Tran, R.J.O. Connor, M.L. Goniewicz, Cytotoxic effects of heated tobacco products (HTP) on human bronchial epithelial cells, *Tob. Control*. 27 (2018) s26–s29. doi:10.1136/tobaccocontrol-2018-054317.
- [4] P. Nabavizadeh, J. Liu, C.M. Havel, S. Ibrahim, R. Derakhshandeh, P.J. Iii, M.L. Springer, Vascular endothelial function is impaired by aerosol from a single IQOS HeatStick to the same extent as by cigarette smoke, *Tob. Control*. 27 (2018) s13–s19. doi: 10.1136/tobaccocontrol-2018-054325.
- [5] S.M. Stamatovic, A.M. Johnson, R.F. Keep, A. V. Andjelkovic, Junctional proteins of the blood-brain barrier: New insights into function and dysfunction, *Tissue Barriers*. 4 (2016). doi: 10.1080/21688370.2016.1154641.
- [6] R. Daneman, L. Zhou, A.A. Kebede, B.A. Barres, Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis., *Nature*. 468 (2010) 562–566. doi: 10.1038/nature09513.
- [7] P. Lindahl, B.R. Johansson, P. Leveén, C. Betsholtz, Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice, *Science* (80-.). 277 (1997) 242–245. doi: 10.1126/science.277.5323.242.