

喫煙あるいはニコチンの末梢作用の修飾因子と その分子機構に関する研究 (1995-1999)

中尾 一和*

本特定研究は、喫煙あるいはニコチンの末梢作用の修飾因子とその分子機構を解明することを目的とした。喫煙あるいはニコチンの末梢作用は、多岐に渡るが、できるだけ包括的に研究を進めるため、本研究は呼吸器系、心血管系、糖代謝、骨代謝、及び末梢でのニコチン代謝の領域を対象とした。さらに、近年、大きく進展したプロスタノイド研究の領域を加えた。また、方法的には、分子生物学的、分子遺伝学的方法及び発生工学的方法を用い、分子機序の解明を目指すとともに、個体レベルでの解析を可能とし、研究者間の協同研究を推進することを目的とした。

各研究者は各々の領域において、すでに、特徴のある研究成果をあげており、それを土台にして本特定研究を進めることができたため、以下に示すように、喫煙（ニコチン）の末梢作用の修飾因子の分子機構に関して、従来になかったユニークな成果を達成することができた。本研究において、喫煙（ニコチン）の末梢作用の発現に関与する多くの分子、遺伝子が解明されたが、今後、それらの生体における喫煙の影響を検討することが課題になると考えられる。

本研究において、呼吸器疾患に対する喫煙の影響を検討するため、肺上皮細胞の遺伝子発現に対するニコチンの効果を解析した。遺伝子発現を differential display 法にて解析した結果、ニコチンが複数の遺伝子の発現を制御している

可能性が示された。更に肺由来の種々の上皮細胞において、*proGRP*、*GRPR*、*HBD-1*、*-2*、*CFTR*、*nAChR- α 5*、*- α 7* 各遺伝子の mRNA 発現と、これらに対するニコチンの影響を検討した。まず、SCLC 細胞における *proGRP* 遺伝子発現はニコチン刺激で亢進し、さらに同遺伝子の promoter 活性が、SCLC 細胞特異的 enhancer 領域を介して転写レベルで upregulate されることを明らかにした。また、気道・肺胞上皮、SCLC 細胞における *GRPR* 遺伝子の発現もニコチン投与により増強されることから、ニコチン曝露が GRP-GRPR 系を介して肺上皮細胞の分化・増殖のみならず、発がんにも関わりうるということが推測される。さらに、ニコチンが気道上皮細胞における *HBD-1*、*-2* 両遺伝子の転写亢進を通じ、気道感染防御機構をも制御しうるということが示唆される。一方、ニコチンにより気道上皮細胞の *CFTR* 遺伝子発現も調節される可能性が示され、気道分泌および CF、DPB などの気道疾患の病態に示唆を与える。最後に、これらのニコチンの作用は主に肺上皮細胞上の *nAChR- α 5*、*- α 7* を介して細胞内にシグナル伝達されるが、*nAChR- α 5*、*- α 7* 自身の発現もニコチンにより制御されうることは、ニコチンの細胞内での作用機序の解明に重要である。（吉村邦彦）

喫煙は心血管系疾患と密接に関連するため、本研究において、血管系の機能と形態調節に重要な役割を担う ET-1 と eNOS の遺伝子発現に対する喫煙、ニコチンの影響を検討した。その結果、急性喫煙曝露（30分）により、腎臓、心臓、

* 京都大学大学院医学研究科

肺組織中 ET-1 mRNA 発現量は有意に増加し、特に心臓における発現は慢性曝露後および washout 後にも持続して認められた。ET-1 は血管平滑筋、心筋の収縮と細胞増殖を促進し、心肥大などをもたらす事が報告されている事から、喫煙による心血管系障害には ET-1 の発現亢進が関与する事が示唆された。しかし、喫煙の主成分であるニコチンの投与は、組織中 ET-1、eNOS mRNA 発現量には有意な影響を与えなかった事から、ET-1 mRNA の発現には CO やタールなど他の成分が関与する事が示唆された。一方、心血管系組織における HO/CO 系の存在が報告された事から、高血圧ラットで HO-1 を誘導した所、血圧非依存性に心臓組織中 cGMP 含量の増加と心筋重量の減少を認め、喫煙による CO の増加は心血管系の機能と形態に対して多様な修飾作用を示す事が示唆された。(成瀬光栄)

プロスタグランジン (PG) やトロンボキサンからなるプロスタノイドは、体内の様々な場所で刺激に応じて合成され、発熱、痛み、炎症、アレルギー、血栓、睡眠、胃酸分泌、排卵、黄体退縮など多彩な生理作用を発揮する。プロスタノイドには 8 種類の受容体があり、プロスタノイドはこれらの受容体に働いて作用を発揮する。しかしながら、各々の作用がどのプロスタノイド受容体に働くことにより発現されているのか、また、これらの作用が生理的および病態生理的条件下においてどの程度の重要性を持つのかは、必ずしも明らかではない。我々は、プロスタノイド受容体として初めて TX 受容体のクローニングに成功し、ついで薬理的に同定されていた 8 種類の受容体の全てのクローンを得た。ついで、8 種類全ての受容体についてノックアウト (KO) マウスを作製した。これら KO マウスの解析により、EP₂ 受容体は受精に関与し、EP₃ 受容体は発熱反応に働き、EP₄ 受容体は動脈管閉鎖の血管リモデリングに働き、FP 受容体は陣痛発来のはきかねとして働き、IP 受容体は血栓防御や痛みの伝達に働くことを明らかにした。今後、喫煙作用発現におけるプロスタノイド受容体の関与をそれらのマウスを用いて解明する

ことが課題である。(成宮周)

動脈硬化発症進展の分子機構を解明するうえで、血管を構成する重要な細胞である血管内皮細胞とその内層に位置する血管平滑筋細胞との相互関係を理解することは不可欠である。本研究において 1) 内皮細胞由来の血管平滑筋細胞遊走因子を同定、2) 血管のトーンスを決定する重要な因子の一つである一酸化窒素合成酵素 (eNOS) 遺伝子発現の機序をその遺伝子多型との関係から研究し、その上でニコチンの平滑筋細胞遊走因子の作用に及ぼす効果、さらには eNOS 遺伝子の発現調節、eNOS 酵素活性に及ぼすニコチンの作用を検討した。血管内皮細胞由来の血管平滑筋細胞遊走因子は内皮細胞培養上清 146 μ より精製した結果、それは heparin binding epidermal growth factor-like factor (HB-EGF) であった。この HB-EGF の平滑筋細胞遊走活性にニコチンは抑制的に働いた。eNOS 遺伝子発現を 5' 転写調節領域を用いたリポーター遺伝子で検討すると、ニコチンは eNOS 遺伝子発現に影響を与えなかった。また、ニコチンは eNOS の酵素活性を 20% 低下させた。

ニコチンは血管平滑筋細胞の遊走活性を抑制することから、この作用に関しては動脈硬化の進展に抑制的に働くこと示唆された。しかし、動脈硬化進展に抑制的に働く eNOS 遺伝子の発現は抑制しないもののその酵素活性は 20% 減少させ、動脈硬化進展に促進的に働くことが示唆された。今後、ニコチンの動脈硬化発症進展におよぼす統合的な効果の検討が必要と思われる。(斎藤能彦)

本研究において、ナトリウム利尿ペプチド受容体の発現に及ぼすニコチンの影響を様々な培養細胞・組織で調べ、ナトリウム利尿ペプチドとその受容体を介したニコチンの末梢作用を明らかにすることを目的とした。

1) ニコチンは、血管内皮細胞の形態を著しく変化させるとともに cGMP 産生に関わるタイプの受容体 (グアニル酸シクラーゼ) の発現量を上昇させた。これらの効果は、平滑筋細胞では見られなかった。これらの結果からニコチンは

血管内皮細胞を介して血管に作用していることが示唆された。ラット副腎由来 PC-12 細胞を用いた実験からは、ニコチンがナトリウム利尿ペプチドシステムを介してカテコールアミン分泌を調節している可能性が示唆された。

2) ニコチンは、骨芽細胞株 ROB-C26 細胞の骨分化・石灰化を促進し、MC3T3-E1 細胞では抑制したが、これらの効果はナトリウム利尿ペプチドシステムを介していない可能性が示唆された。また、破骨細胞ではニコチンによる分化・活性化の抑制が観察されたが、ナトリウム利尿ペプチドシステムの関与は未だ不明である。

3) 最後に、喫煙ラットを用いてナトリウム利尿ペプチド受容体が豊富に存在する肺に焦点を絞り PCR 法で各受容体の発現量を調べたところ、長期間ニコチンに曝露されるとネガティブフィードバック機構が働いて A 型受容体量を減弱させて cGMP 産生を抑制する可能性が示唆された。

ニコチンはナトリウム利尿ペプチドシステムを介して血圧調節、肺機能調節に関与している可能性が示唆された。(広瀬茂久)

喫煙はインスリン抵抗性をもたらすことにより 2 型糖尿病の誘因になることが示されている。喫煙 (ニコチン) によるインスリン抵抗性の分子的機序の解明のため、基礎的研究として、インスリンシグナル伝達経路を構成する MAP キナーゼと糖輸送との関連を 3T3L1 脂肪細胞を用いて検討するとともに、3T3L1 脂肪細胞の分化過程において糖輸送担体 (GLUT4) のトランスロケーションを指標としたインスリン応答性の発生 (獲得) を検討した。その結果、MAP キナーゼの恒常的活性化は糖輸送担体 (GLUT1, GLUT4) の細胞内局在を修飾することによりインスリン抵抗性のひとつの原因になることが示唆された。また、脂肪細胞分化の早期において、インスリン応答性は発生し、それは、転写因子である PPAR γ 、C/EBP α の発現より先行し、成熟脂肪細胞の表現型の獲得と分離可能であることを示し、インスリン感受性の決定に関与する分子を同定できる系を確立することができた。脂肪細胞を用いた検討では、ニコチンはインスリンに

よる糖輸送に影響を与えず、また、MAP キナーゼの活性化にも影響を与えなかった。今後、個体レベルで、ニコチン (喫煙) のインスリン抵抗性に与える影響、機序を明らかにすることが課題と考えられる。(吉政康直)

体内に摂取されたニコチンは、主として肝代謝を受けた後に体外排泄されるが、一部は未変化体として尿中排泄されるため、腎尿細管における分泌・再吸収過程がニコチンの体内動態に深く関与している。本研究において、尿細管上皮細胞におけるニコチン輸送機構並びにニコチン-薬物間相互作用の解析と共に、クローン化有機カチオントランスポータとの相互作用を検討した。

腎刷子縁膜小胞における有機カチオン輸送系とニコチンとの相互作用について検討した結果、ニコチンはプロトン/有機カチオン交換輸送系に対して阻害作用を有すること、一方ニコチンの刷子縁膜透過は、TEA 輸送を媒介するプロトン/有機カチオン交換輸送系とは別の特殊輸送系によって制御されていることが示唆された。LLC-PK1 細胞におけるニコチンの輸送特性を調べた結果、側底膜側から頂側膜側へ pH 依存的に経細胞輸送された。さらに、種々の阻害剤に対する感受性の相違から、LLC-PK1 細胞の側底膜並びに頂側膜におけるニコチン輸送は、TEA を認識する有機カチオン輸送系とは機能的・構造的に異なる輸送系によって媒介されていることが示唆された。ニコチンは有機カチオントランスポータ rOCT1 及び rOCT2 に対して強い阻害的相互作用を有するものの、ニコチン自身は輸送されなかった。一方ニコチンの尿細管蓄積に伴って、両トランスポータの基質となるカチオン性薬物の腎排泄に影響を受ける可能性が示唆された。(乾賢一)

喫煙あるいはニコチンが骨粗鬆症の危険因子であるかどうかは未だ明らかではなく、従来ニコチンの骨代謝に及ぼす影響に関して、包括的にまたその分子機構に踏み込んで研究した報告はなかった。本研究において、ニコチンの骨代謝における基本的過程である軟骨による骨の成

長・骨形成・骨吸収に対する効果を検討した。マウス胎仔長管骨器官培養系を確立し、これを用いてナトリウム利尿ペプチドが軟骨の成長因子であることを解明したが、この系において軟骨の成長に対してニコチンは特に作用を及ぼさなかった。骨形成を司る骨芽細胞機能を、マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞を用いて検討し、ニコチンは細胞増殖をやや抑制し、分化を促進することを示した。骨吸収を司る破骨細胞形成過程を、マウス骨芽細胞・骨髄（または脾細胞）の共存培養系を用いて検討し、PGE₂ 及

び炎症性サイトカインによる破骨細胞形成が、PGE 受容体 EP₄ サブタイプを介して起こることを明らかにした。しかし、ニコチンは破骨細胞形成に対して影響を与えず、また破骨細胞形成の key molecule である osteoclast differentiation factor 発現にも影響しなかった。ニコチンは少なくとも直接的には骨代謝に毒性を発揮しないことが示された。（田中清）

総括検討会発表課題

(1999 年 12 月 3 日 開催)

発表課題名	機関	発表研究者
慢性呼吸器疾患における肺細胞のリモデリングとニコチンの影響に関する分子生物学的解析	東京慈恵会医科大学	吉村 邦彦
喫煙が血管壁エンドセリンおよび一酸化窒素合成酵素の遺伝子発現におよぼす影響	東京女子医科大学	成瀬 光栄
受容体欠損マウスを用いた作用発現におけるプロスタノイドの関与の検討	京都大学	成宮 周
動脈硬化発症進展機序に及ぼすニコチンの末梢作用の研究	京都大学	斎藤 能彦
降圧作用を有するナトリウム利尿ペプチド受容体発現に及ぼすニコチンの影響	東京工業大学	広瀬 茂久
糖尿病及び糖尿病性合併症の発症に及ぼす喫煙の影響とその修飾因子と分子機構に関する研究	京都大学	吉政 康直
ニコチンの細胞膜輸送と薬物相互作用に関する研究	京都大学	乾 賢一
骨代謝に及ぼす喫煙の影響及びその修飾因子とその分子機構に関する基礎的・臨床的研究	京都大学	田中 清