

喫煙の血管作動性物質と甲状腺ホルモン代謝・作用に及ぼす影響

西川 光重*、稲田 満夫*

はじめに

喫煙は心血管病や動脈硬化の重要な危険因子である。また、喫煙習慣はバセドウ病眼症の頻度や抗甲状腺薬による寛解率に影響する。更に、甲状腺ホルモンは脳機能の維持に重要な役割を果たすこと、また、甲状腺機能低下症の場合、動脈硬化が進展しやすいことが知られている。

そこで、まず、喫煙が血管作動性物質およびその受容体と血小板凝集に及ぼす影響について検討した。次に、ラット培養脳グリア細胞と大動脈中膜、および、培養ヒト甲状腺・血管平滑筋・内皮細胞における、甲状腺ホルモン代謝に及ぼすニコチンの影響について検討した。

目的

動脈硬化は、血管内皮障害を契機とする一連の炎症反応ととらえられている。その成因や危険因子として種々のものが関与しているが、内皮細胞障害に引き続いておこる血小板付着が非常に重要である。また、喫煙は、高血圧、糖尿病、高脂血症などとともに血管病変形成において主要な危険因子の一つである。そこで、血管作動性物質や血小板凝集と喫煙の関係を解明することを最初の目的とした。

甲状腺より分泌されるサイロキシン thyroxine (T_4) は、1 型および 2 型ヨードサイロニン脱ヨード酵素 type 1 および type 2 iodothyronine deiodinase (D1 および D2) による 5' 脱ヨード反応により、活性型ホルモンであるトリヨードサイロニン 3,5,3'-triiodothyronine (T_3) に変換されてその主要

な作用を発現する¹⁾。D1 は、肝臓・腎臓など種々の臓器に発現し、血漿中の T_3 濃度を調節する。一方、D2 は、脳・下垂体・褐色脂肪などの限られた臓器に発現し、局所での T_3 含量を調節する。D2 発現には種差が存在し、ヒト D2 は、甲状腺・心臓・骨格筋・血管平滑筋細胞などにも発現する。

甲状腺ホルモンは、脳機能の維持に重要な役割を果たしており、成長時の甲状腺ホルモンの欠乏は脳の不可逆的障害を引き起こす。また、喫煙習慣のあるバセドウ病患者では、バセドウ病眼症の頻度が高いことや抗甲状腺薬の寛解率が低いことが報告されている。これらより、ニコチンが、脳機能やバセドウ病の発症や経過に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

更に、最近の大規模調査²⁾により、明らかな甲状腺機能低下症のみならず、潜在性の甲状腺機能低下症も、動脈硬化の危険因子になることが示された。甲状腺機能低下症の動脈硬化に対するリスクは、脂質の変化を除外しても残ることより、甲状腺ホルモンの欠乏が動脈硬化の進展に大きく関与する可能性が示唆される。

そこで、喫煙の甲状腺ホルモン代謝と血管平滑筋・血管内皮に及ぼす作用、並びに、脳機能と動脈硬化の進展に甲状腺ホルモンがどのように関与するかを明らかにすることを今回の研究の全体目的とした。

方法

1) 喫煙・ニコチンの実験プロトコール

喫煙者と非喫煙者にピース 1 本を喫煙させ、その前後に、血中ニコチン濃度とともに arginine-vasopressin (AVP) と angiotensin II

* 関西医科大学第 2 内科

(AII)濃度を測定した。同時に、ニコチンの血小板機能に及ぼす影響を検討した。

2) AVP-受容体の全遺伝子構造の決定

AVP-受容体 (AVP-R) の発現調節を解明する目的で、ラットおよびヒト *AVP-R* 全遺伝子を単離し、全遺伝子構築や完全長の cDNA 配列を決定した。

3) 細胞培養法

① ラット脳グリア細胞

新生児 Wistar 系ラットの全脳を細切、ホモジネートし、725 g で遠心分離した。混合グリア細胞を 5% CO₂、95% O₂ でインキュベートした。ニューロン細胞を除去し、DMEM と 15% FBS で 9 日間培養して、実験に供した。

② ヒト甲状腺細胞

手術時に得られた、バセドウ病甲状腺組織を細切後、コラゲナーゼとディスパーゼで酵素処理した。ナイロンフィルターを通した後、10% ウシ胎児血清を含む Ham's F-12 培地で培養した。

③ ヒト大動脈血管平滑筋細胞 (HASMC)・ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC)・ヒト大動脈血管内皮細胞 (HAEC)

これらは、クラボウから購入し、5% ウシ胎児血清と種々の増殖因子を含む培地で培養した。

4) 動物

8 週齢の SD ラット雄を使用した。点灯時間は、午前 8 時より午後 8 時とした。ラットより大動脈を摘出後、血管周囲の脂肪組織・外膜を剥離し、中膜を採取した。ニコチンは、osmotic minipump (Alzet, model 2001) を皮下に植え込んで、2 mg/kg bodyweight (BW)/日 の投与量で、7 日間投与した。

5) D1、D2 酵素活性測定

5' 脱ヨード酵素活性は、¹²⁵I-T₄ または ¹²⁵I-rT₃ からの ¹²⁵I の放出反応で測定した。即ち、細胞のホモジネートを 2 nM ¹²⁵I-T₄、20 mM dithiothreitol (DTT)、1 mM propylthiouracil 存在

下でインキュベートし、遊離した ¹²⁵I を γ -カウンターで測定して、D2 による 5' 脱ヨード酵素活性とした。また、細胞ホモジネートを、1 μ M ¹²⁵I-rT₃、10 mM DTT 存在下でインキュベートして、D1 による 5' 脱ヨード酵素活性を測定した。酵素活性は、遊離した ¹²⁵I をホモジネートの蛋白量で補正して求めた。

6) Northern blot 解析

細胞より、TRIzol 試薬を用いて、total RNA を抽出した。抽出した total RNA を agarose gel に泳動後、ナイロン膜に転写した。ヒト D1 および D2 cDNA probe またはラット D2 cRNA probe を用いて hybridization 後、FUJIX BAS 2000 system を用いて D1、D2 mRNA signal を定量した。

結果

1) 喫煙の影響³⁾⁻⁵⁾

喫煙により、血中ニコチンは 5 分以内に頂値 (25 \pm 4 ng/ml) に達し、30 分で前値に復帰した。この時、血中 AVP 濃度、および AII 濃度は有意に上昇した。血小板に結合した AVP・AII も増加した。血中ニコチン濃度と血中および血小板 AVP 濃度の間には正相関が認められた。一方、血小板の受容体結合親和性や受容体数はニコチンの影響を受けなかった。

喫煙直後の血小板の高濃度 AVP による凝集能は、対照に比較して、低下していた。これは AVP-R の急性同種脱感作によるものと考えられた。一方、コラーゲンによる血小板凝集能は、対照より有意に亢進しており、何らかの活性亢進作用が考えられた。

AVP-R 上流域には、cAMP 応答配列、AP1 配列、糖質ステロイド応答配列、NF κ B/EBP 配列が存在し、多彩な転写調節が示唆された。

2) ラット脳グリア細胞における D2 活性⁶⁾

培養グリア細胞には、D2 活性が認められ、その rT₃ に対する Km は 3.9 nM で、Vmax は 17 fmol of I release/mg protein/h であった。グリア

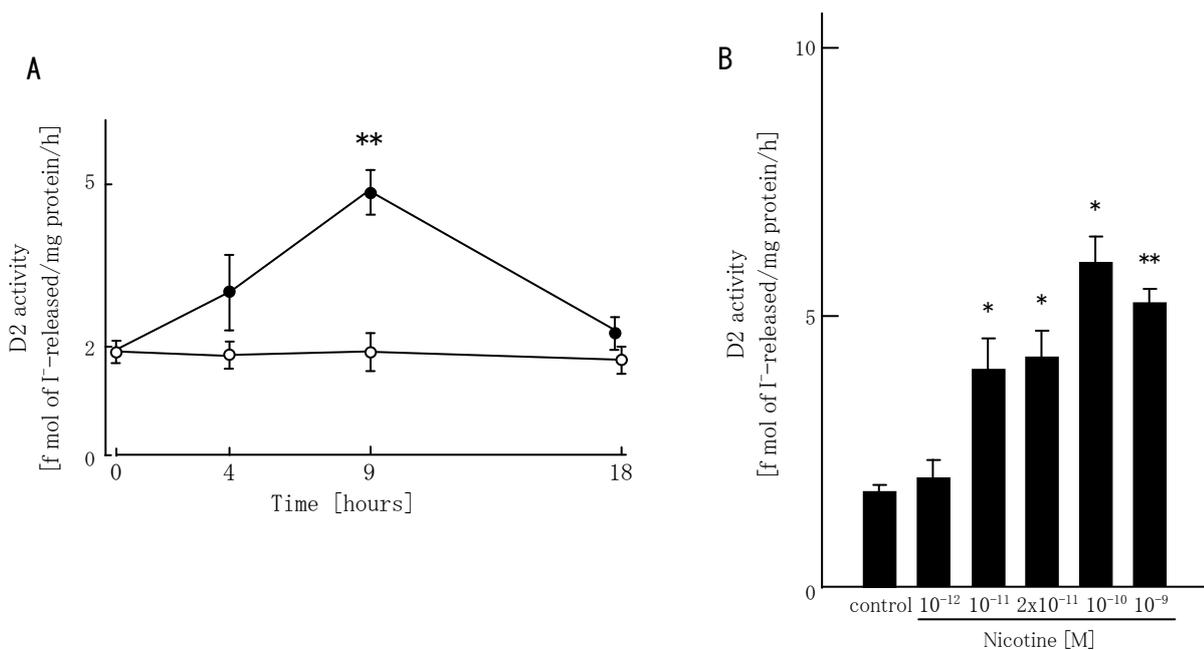


図-1 ラット脳グリア細胞の D2 活性に及ぼすニコチンの影響⁶⁾

A: ●; 10⁻⁸ M ニコチンと共に培養した時の D2 活性と培養時間の関係、○; ニコチンなしのコントロール、B: 10⁻¹²-10⁻⁹ M のニコチンと培養した時の D2 活性 (濃度の影響)

細胞に、10⁻¹⁰ M のニコチンを添加して培養すると、D2 活性は約 3.5 倍に増加した (図-1)。中枢性のニコチン拮抗薬である mecamylamine をニコチンと同時に添加すると、ニコチンによる D2 活性の上昇は完全に抑制された。

3) ヒト甲状腺細胞における D1、D2 mRNA と活性⁷⁾

TSH (1,000 mU/l) 添加により、D2 mRNA レベルは、8 時間後に頂値 (約 4.5 倍) を示した。一方、D1 mRNA レベルは、24 時間後に約 2 倍となった。1 mM dibutyryl cAMP (DBC) 添加により、D2 mRNA レベルは、4 時間後には約 20 倍に増加し、また、D1 mRNA は 24 時間後に約 3 倍に増加した。TSH と DBC は、各々、mRNA レベルと同程度に、D1 と D2 の酵素活性を増加させた。

PKC の activator である 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を、単独で培地に添加しても、D1、D2 mRNA レベルに変化は認めなかった。しかし、TPA は、DBC との同時添加により、上述の DBC による D1 および D2 mRNA レベルの増加を容量依存的に抑制した。

ニコチン (10⁻¹⁰-10⁻⁸ M) の単独、または、1 mM

DBC との同時添加により、培養ヒト甲状腺細胞 D2 mRNA レベルと活性は、有意な変化を示さなかった。

4) ヒト大動脈血管平滑筋細胞における D2 mRNA と活性⁸⁾

HASMC において、platelet derived growth factor (PDGF) および basic fibroblast growth factor (bFGF) を培地に添加すると、D2 mRNA レベルが増加し、6 時間後に頂値 (PDGF; 約 8 倍、bFGF; 約 4 倍) を示した。これらは、mRNA レベルと同程度に、D2 活性を増加させた。PDGF と bFGF による D2 mRNA レベルの増加は、RNA 合成阻害薬である actinomycin D や蛋白合成阻害薬である cycloheximide の同時添加により抑制された。PDGF や bFGF による D2 mRNA レベルの増加は、PD98059、SB203580、SP600125 の同時添加により、25-90% 減少した。ニコチン (10⁻¹⁰-10⁻⁶ M) の培地への添加により、HASMC における D2 mRNA レベル・活性は、有意の変化を示さなかった。

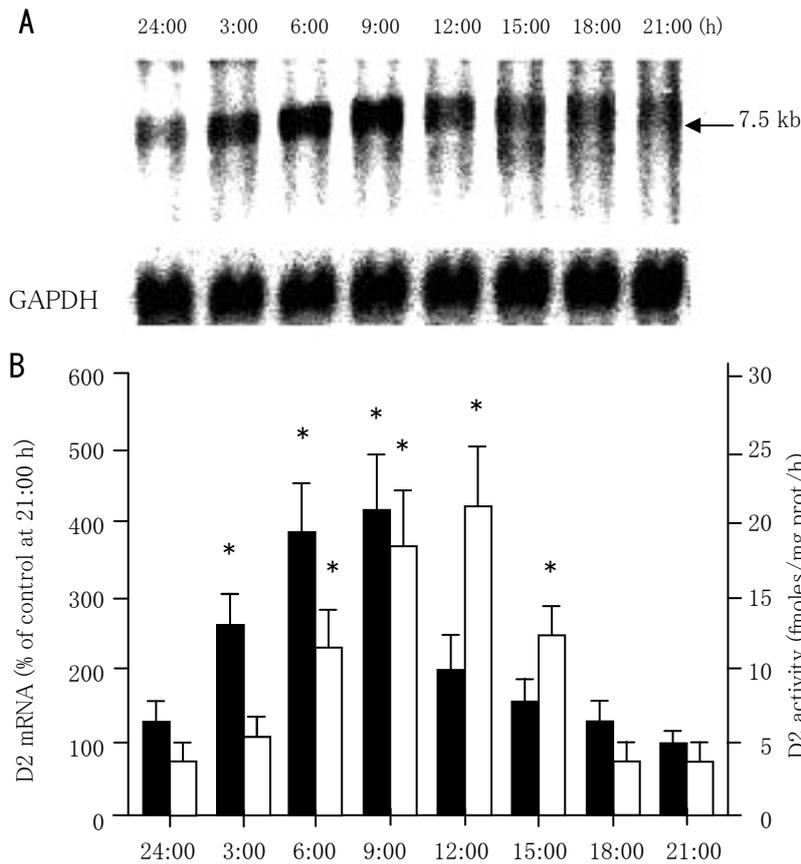


図-2 ラット大動脈中膜の D2 mRNA と D2 活性の日内リズム⁹⁾

A: 各時刻における D2 mRNA と GAPDH mRNA のノザンブロットィング

B: 各時刻における D2 mRNA 発現と D2 活性 (黒カラム; D2 mRNA、白カラム; D2 活性)

5) ヒト臍帯静脈血管内皮細胞・ヒト大動脈血管内皮細胞における D2 mRNA と活性

HUVEC および HAEC に、D2 活性が発現し、Northern blot にて D2 mRNA シグナルを確認した。HUVEC と HAEC における D2 活性と mRNA レベルは HASMC の約 10% であった。1 mM DBC の添加により、HUVEC と HAEC の D2 活性と mRNA レベルは約 2 倍に増加した。ニコチン (10^{-10} - 10^{-8} M) の単独、または、1 mM DBC との同時添加により、HUVEC と HAEC における D2 活性と mRNA レベルは有意の変化を示さなかった。

6) ラット大動脈中膜における D2 活性と mRNA⁹⁾

① ラット大動脈中膜のホモジネートを $^{125}\text{I-T}_4$ とインキュベートすると、 $^{125}\text{I}^-$ の有意の遊離を認め、その K_m 値などからラット大動脈中膜に D2 活性が発現することが明らかにされた。

② D2 酵素活性及び D2 mRNA の日内リズムを検討した。D2 活性は、午後 3 時より午前 3 時までは低値を示し、正午に頂値を示した。正午の D2 活性は、午後 6 時の D2 活性の約 6 倍高値を示した。一方、D2 mRNA は、午後 3 時より深夜午前 0 時までには低値を示し、午前 9 時に頂値を示した。午前 9 時の D2 mRNA は、午後 6 時の D2 mRNA の約 6 倍高値を示した (図-2)。

③ ニコチン (2 mg/kg BW) を単回皮下投与し、大動脈中膜の D2 活性を測定した。ニコチンの単回投与により、D2 活性は、有意な差を示さなかった。

④ AII (100 $\mu\text{g}/300$ g BW) 又は、生理食塩水を午後 3 時に単回皮下投与後、大動脈を摘出し、中膜 D2 活性を測定した。大動脈中膜 D2 活性は、8 時間後に約 2 倍に増加した。

⑤ AII (100 $\mu\text{g}/300$ g BW/24 h) 又は、生理

食塩水を osmotic pump を用いて持続皮下投与後、大動脈を摘出し、中膜 D2 活性を測定した。中膜 D2 活性は、A II の持続投与 4~8 日後、約 2 倍に増加した。

⑥ A II type 1 受容体拮抗薬である olmesartan (10 mg/kg BW/日) 又は、CMC を 7 日間経口投与後、大動脈を摘出し、中膜 D2 活性を測定した。中膜 D2 活性は、olmesartan 投与により 50% 以下に低下した。

⑦ ニコチン (2 mg/kg BW/日×7 日間) 又は、生理食塩水を osmotic pump を用いて持続投与後、A II (100 µg/300 g BW) 又は、生理食塩水を午後 3 時に単回皮下投与し、8h 後に大動脈を摘出し、中膜 D2 活性を測定した。ラット大動脈中膜 D2 活性は、ニコチンの持続投与の有無に関係無く、8 時間後、約 2 倍に増加した。

考 察

喫煙による血中ニコチン上昇時に、血中の AVP、A II とともに血小板の AVP と A II 結合も上昇することが明らかにされた。また、AVP-R の上流域には、多彩な転写調節のあることも示した。これらより、喫煙により増加した血中 AVP・A II は、血小板でもこれらの受容体結合をも増加させ、コラーゲンによる血小板凝集能を亢進させると考えられた。また、これらの受容体発現は糖質ステロイドをはじめ、多彩な調節を受けることが明らかになった³⁾⁻⁵⁾。

我々は、これまでに、D1 と D2 の発現調節機構およびこれらの生理的意義の解明の研究に従事してきた。そして、今回、ラット脳グリア細胞に D2 活性が存在し、ニコチンが、この D2 活性を増加させ、ニコチン性受容体の阻害薬で抑制されることを示した⁶⁾。このことは、ニコチンが中枢性ニコチン性受容体を介して D2 活性を上昇させることで脳機能に影響しうることを示している。

また、ヒト甲状腺に D1 と D2 が発現し、TSH や DBC の添加により、D1 と D2 の mRNA 発現と活性が増加することを明らかにした⁷⁾。TSH と DBC の添加による、D1・D2 活性の増加は、各々

の mRNA の増加と、ほぼ同じであったことより、TSH および DBC は、主に、cAMP を介して、翻訳前のレベルで、D1・D2 活性を増加させると考えられた。TSH と DBC の、D2 mRNA の発現に及ぼす効果は、D1 よりも速く、また、より大であった。これは、ヒト D2 遺伝子のプロモーター上に存在する cAMP 応答領域による可能性が考えられた。また、抑制実験結果より、phospholipase C からの PKC 経路が、TSH による PKA 経路による D1 および D2 遺伝子発現増加を抑制する可能性が考えられた⁷⁾。

ヒト大動脈平滑筋細胞に D2 が発現し、PDGF と bFGF により、D2 の活性と mRNA が増加することも明らかにした⁸⁾。この増加反応は、*de novo* の蛋白合成を介して、D2 mRNA を増加させると考えられた。更に、これらは、主に、MAP kinase の ERK 経路を介して D2 mRNA を増加させること、また、p38 および JNK の経路も関与している可能性が示された。これらより、D2 活性増加による細胞内 T_3 濃度の増加が、PDGF と bFGF の血管平滑筋に対する作用に、関与している可能性が考えられた⁸⁾。

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞、および、ヒト大動脈内皮細胞にも D2 が発現し、DBC によって D2 の活性と mRNA が増加することが明らかにされた。DBC は、主に、cAMP を介して、翻訳前のレベルで、D2 活性を増加させると考えられた。カテコラミンなど、内皮細胞内の cAMP 含量を増加させる因子は、内皮細胞の D2 活性増加を介し、血管における T_3 作用を増強している可能性が考えられた。

ラット大動脈中膜に D2 活性が発現することをはじめて明らかにし、この D2 活性に日内リズムが存在することを明らかにした⁹⁾。D2 活性の日内リズムは、ラット松果体・ハーダー腺に存在する事が報告されている。松果体・ハーダー腺に発現する D2 活性及び D2 mRNA については、消灯の signal が、 β -アドレナリン受容体を刺激して、D2 の転写亢進を介して、酵素活性を増加すると考えられている。一方、ラット大動脈中膜の D2 活性の日内リズムは、正午に頂

値を示していることより、消灯による影響とは考え難い。中膜 D2 活性の日内リズムに約 3 時間先行して、D2 mRNA レベルの増加が認められたことより、D2 活性の日内リズムは、主として、転写レベルで調節されている可能性が考えられた。ラット大動脈中膜の D2 活性の日内リズムを惹起する因子の解明は、更に、検討を要する課題である。

A II は、強い血管収縮作用を有するとともに、血圧及び血管生理作用に重要な役割を果たしている。A II は、大動脈中膜 D2 活性の発現を増加することが明らかにされた。A II は、血管中膜の D2 活性の増加を介し、局所の T_3 濃度を増加させ、血管における T_3 作用を増強させる可能性が示唆された。

ラットにニコチンを持続皮下投与したモデルを用いて、ニコチンが A II の作用に及ぼす影響を検討した。このモデルにおいて、ニコチンは、A II の大動脈中膜の D2 活性の増加に対し、有意な変化を示さなかった。

ニコチンは、培養ラット脳グリア細胞の D2 活性を増加させた⁶⁾。しかし、ヒト甲状腺細胞、血管平滑筋細胞、および内皮細胞の D2 活性や mRNA レベルには影響を及ぼさなかった。また、*in vivo* 投与も、ラット大動脈中膜 D2 活性には影響を及ぼさなかった。ニコチンのこの作用の違いは、ヒトとラットの種族差によるものか、あるいは、脳グリア細胞と甲状腺、血管平滑筋や内皮細胞の臓器・部位の違いによる可能性がある。いずれにせよ、ニコチンは、臓器およびある種の条件によっては、D2 発現に影響することが明らかで、喫煙が、甲状腺ホルモン代謝の変動を介して、生体に影響する可能性があり、今後、更なる検討を要すると考えられた。

文 献

- 1) Bianco AC, Salvatore D, Gereben B et al. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 2002; 23: 38-89.
- 2) Hak AE, Pols HA, Visser TJ et al. Subclinical hypothyroidism is an independent risk

factor for atherosclerosis and myocardial infarction in elderly women: the Rotterdam Study. *Ann Intern Med* 2000; 132: 270-8.

- 3) Murasawa S, Matsubara H, Kijima K, Maruyama K, Mori Y, Inada M. Structure of the V1a vasopressin receptor gene and characterization of its promoter region and complete cDNA sequence of the 3'-end. *J Biol Chem* 1995; 270: 20042-50.
- 4) Murasawa S, Matsubara H, Kizima K, Maruyama K, Mori Y, Inada M. Glucocorticoids regulate V1a vasopressin receptor expression by increasing mRNA stability in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1995; 26: 665-9.
- 5) Murasawa S, Matsubara H, Kanasaki M, Kijima K, Maruyama K, Nio Y, Okubo N, Tsukaguchi H, Mori Y, Inada M. Characterization of glucocorticoid response element of rat angiotensin II type 1A receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 209: 833-40.
- 6) Gondou A, Toyoda N, Nishikawa M et al. Effect of nicotine on type 2 deiodinase activity in cultured rat glial cells. *Endocr J* 1999; 46: 107-12.
- 7) Imai Y, Toyoda N, Maeda A, Kadobayashi T, Fangzheng G, Kuma K, Nishikawa M, Iwasaka T. Type 2 iodothyronine deiodinase expression is upregulated by the protein kinase A-dependent pathway and is downregulated by the protein kinase C-dependent pathway in cultured human thyroid cells. *Thyroid* 2001; 11: 899-907.
- 8) Maeda A, Toyoda N, Yasuzawa-Amano S, Iwasaka T, Nishikawa M. Type 2 deiodinase expression is stimulated by growth factors in human vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 200: 111-7.
- 9) Yasuzawa-Amano S, Toyoda N, Maeda A, Kosaki A, Mori Y, Iwasaka T, Nishikawa M. Expression and regulation of type 2 iodothyronine deiodinase in rat aorta media. *Endocrinology* 2004; 145: 5638-45.