

Title	Nicotine restores endothelial dysfunction caused by excess sFlt1 and sEng in an in vitro model of preeclamptic vascular endothelium: a possible therapeutic role of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) agonists for preeclampsia
Author(s)	味村, 和哉
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/73501">http://hdl.handle.net/11094/73501</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 味村 和哉	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 大阪大学教授 木村 正
	副 査 大阪大学教授 木蘭 恵一
	副 査 大阪大学教授 坂田 泰史
<p><b>論文審査の結果の要旨</b></p> <p>妊娠高血圧症候群（以下Preeclampsia）の発症には可溶性fms様チロシンキナーゼ1（sFlt1）とエンドグリン（sEng）がそれぞれ血管内皮成長因子（VEGF）・胎盤成長因子（PlGF）や形質転換増殖因子-β1（TGF-β1）を阻害し血管内皮障害を起こすことが関わっている。一方、Preeclampsiaを減少させる要因として唯一喫煙が知られる。この研究の目的は煙草の主成分であるニコチンが血管内皮障害を改善するという仮説を調べることである。ヒト臍帯血管内皮細胞（HUVEC）を用いてwound healing assayとTube formation assayを行い、sFlt1やsEng（100ng/ml）投与下においてニコチンを喫煙者に平均的に見られる濃度（<math>1 \times 10^{-6}</math>から<math>1 \times 10^{-8}</math>M）を加え評価したところ、ニコチンはsFlt1とsEngが減少させたHUVECの遊走能・管腔形成能を回復させた。また、ELISA法にてニコチンはHUVECのPlGF産生を有意に増加させた。この研究は喫煙者においてpreeclampsiaが減少する一つの原因を示した。Preeclampsiaの治療にニコチンを直接用いることはできないが、Preeclampsiaの発症機序解明および今後の治療薬開発に寄与しており学位論文に値する。</p>	

論 文 内 容 の 要 旨  
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	味村 和哉
論文題名 Title	Nicotine restores endothelial dysfunction caused by excess sFlt1 and sEng in an in vitro model of preeclamptic vascular endothelium: a possible therapeutic role of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) agonists for preeclampsia(妊娠高血圧腎症のin vitro血管内皮モデルにおいて、過剰なsFlt1とsEngによる血管内皮障害をニコチンが改善する：妊娠高血圧腎症に対するニコチンアセチルコリン受容体(nAChR)の治療的役割の可能性)
論文内容の要旨	
<p>〔目的(Purpose)〕</p> <p>妊娠高血圧症候群(以下HDP)の発症には、胎盤の発生過程において栄養膜細胞層のらせん動脈への侵入不全を原因とする子宮胎盤血液還流の減少が関わっているとされる。その結果、全身性の血管内皮障害を起こす胎盤性の可溶性抗血管新生因子が過剰に放出される。最も関連のある抗血管新生因子は可溶性fms様チロシンキナーゼ1(sFlt1)とエンドグリン(sEng)である。sFlt1は血管内皮成長因子(VEGF)や胎盤成長因子(PlGF)などの前血管新生分子に拮抗する。sEngは形質転換増殖因子-β1(TGF-β1)のシグナリングを阻害し、血管新生や血管内皮のNO産生を抑制する。一方、HDPのリスクを減少させる要因として唯一喫煙が知られている。煙草の主要成分であるニコチンは一般的な喫煙者における血清濃度で、血管新生作用を持つと報告された。ニコチンは内皮細胞のニコチンアセチルコリン受容体(nAChRs)を介してVEGFなどの血管新生因子を分泌する。この研究の目的はニコチンがsFlt1やsEngレベルの上昇に対して内皮細胞における血管新生作用を持つという仮説を調べることである。</p> <p>〔方法(Methods)〕</p> <p>ヒト臍帯血管内皮細胞(HUVEC)を正常産分娩時に採取した臍帯静脈からトリプシン処理により分離培養した。まず、HUVECをコンフルエントにまで培養し、starvationを加えた後に、プラスチックチップで一本のwoundを形成、16時間のちにHUVECが遊走してくることでwoundが修復されるwoundエリアの縮小率を測定した(Wound healing assay)。0.1%FBSを含むM199にニコチンを喫煙者に平均的に見られる濃度(<math>1 \times 10^{-9}</math>から<math>1 \times 10^{-6}</math>M)を加えたものを投与した。次にsFlt1やsEng(ともに100ng/ml)を投与しHDPの母体血管内皮モデルと想定し、そこにニコチン(<math>1 \times 10^{-6}</math>M)を加え効果を判定した。次に、Growth factor reduced Matrigel(Becton Dickinson製)をコーティングさせたウェルに、starvationを加えたHUVEC(<math>2 \times 10^4</math>個/ウェル)を播き管腔形成を行った。8時間のちに、形成された管腔の長さを測定した(Tube formation assay)。Wound healing assayと同様の濃度のニコチン、sFlt1、sEngを加え効果を判定した。最後に、starvationを加えたHUVECにニコチン(<math>1 \times 10^{-9}</math>から<math>1 \times 10^{-6}</math>M)を加え24時間培養後にVEGF、PlGF、TGF-β1の濃度をELISA法にて測定した。</p> <p>〔成績(Results)〕</p> <p>Wound healing assayではニコチンは濃度依存性に(<math>1 \times 10^{-9}</math>から<math>1 \times 10^{-6}</math>Mにおいて)HUVECの細胞遊走を促進した。対照的にsFlt1とsEngはHUVECの運動性を阻害した。しかし、ニコチンを加えることで、sFlt1とsEngが減少させたHUVECの運動性は回復した。Tube formation assayではHUVECはマトリゲル内で微小管腔を数時間で形成した。ニコチンはこの毛細血管様構造の数をさらに増加させた。対照的にsFlt1とsEngは有意に管腔形成を阻害した。しかし、ニコチンを加えると、sFlt1とsEngが阻害した管腔形成を回復させた。また、HUVECのPlGF産生は、ニコチンを<math>1 \times 10^{-6}</math>M加え24時間培養することで有意に増加した。TGF-β1濃度の増加は認めなかった。またHUVEC培養上清ではVEGFは検出しなかった。</p> <p>〔総括(Conclusion)〕</p> <p>この実験で、ニコチンが過剰なsFlt1やsEngによる血管内皮機能障害を改善することを示した。今回我々は血管新生や抗血管新生効果を調べるために2つのin vitroアッセイを用いた。Wound healing assayは、内皮細胞の遊走能とある程度は増殖能を評価するために用いた。Tube formation assayは、内皮細胞の管腔形成能を評価するために用いた。我々の主な発見の一つは、HUVECにsFlt1やsEngを加えることで、in vitroにおけるHDPの血管内皮モデルとして再現できたことである。また対照的に、ニコチンは生理的濃度もしくはそれ以下でsFlt1やsEngが阻害したHUVECの遊走や管腔形成をニコチンは回復した。HDPモデルにおいてニコチンに血管新生作用があることが示された。またこれらのニコチンによる血管新生作用は、HUVECのPlGF産成増加によることが今回示された。このPlGFが母体血管内においてsFlt1を拮抗することで症状を緩和させている可能性が考えられた。</p>	