

学位論文の要旨

学位の種類	博 士	氏 名	高橋 賢伍
学位論文題目			
Thrombin-Induced Responses Via Protease-Activated Receptor 1 Blocked by the Endothelium on Isolated Porcine Retina Arterioles (豚摘出網膜動脈におけるプロテイナーゼ活性型受容体 1 を介したトロンビン起因性の反応は血管内皮によりブロックされる)			
共 著 者 名			
大前 恒明、大野 晋治、神谷 隆行、ターナー 晶、吉田 晃敏 未掲載 (Current Eye Research in press)			
研 究 目 的			
<p>トロンビンはフィブリノゲンをフィブリンにすることで血液凝固反応に寄与する蛋白質分解酵素である。トロンビンの血管系に対する反応については様々な報告がある。冠動脈及び肺動脈では血管拡張反応を、脳動脈においては血管収縮反応を、そして、腎間葉動脈においては低濃度で血管拡張反応、高濃度で血管収縮反応といった2層性の血管反応を示すことが報告¹⁾されている。このように、トロンビンは臓器特異的な血管反応を示す。</p> <p>一方、トロンビンは、ウシの網膜動脈を収縮させることが報告²⁾されており。加えて、様々な眼疾患において、硝子体中トロンビン濃度が上昇していることが報告されている。また、トロンビンによる血管反応は血管内皮もしくは血管平滑筋に発現しているプロテイナーゼ活性型受容体 (PAR) を介して起こることが報告されていることから、血中もしくは硝子体中トロンビン濃</p>			

度の上昇は、PAR を介して、様々眼疾患の病態に関与していることが示唆される。しかしながら、トロンビンの PAR を介した、網膜動脈への作用は未解明である。

生理的な状態において、血液は血管内腔を流れているため、トロンビンは血管内皮にしか直接作用することができない。トロンビンは培養血管内皮細胞において、一酸化窒素(NO)やプロスタサイクリン(PGI₂)といった血管拡張因子を産生することが報告されているが、以前の網膜動脈におけるトロンビンの収縮反応は血管外腔からの投与で行われており、血管内腔からのトロンビンの作用と血管外腔からのトロンビンの作用は異なることが示唆される。

そこで我々は、摘出血管を用いてトロンビンの網膜動脈への作用とその機序を検討した。

材 料 ・ 方 法

1. 実験動物

実験にはブタ (週齢 16-24 週、体重 25-35 kg) の眼球を用いた。

2. 実験方法

ブタを屠殺後、速やかに眼球を摘出し、網膜から網膜動脈を剥離し、その両端にピペット挿入後、結紮する。ピペットを介し摘出した血管に生理的圧をかけ、基礎緊張を確認後、各種薬剤を血管外腔もしくは血管内腔に投与し、血管径の変化をビデオカメラ付き顕微鏡で測定した。

3. トロンビンの網膜動脈への作用

a) 網膜動脈への影響

トロンビン (0.001-20 mU/ml) を投与し、網膜動脈の反応性の評価をした。

b) 血管外腔投与と血管内腔投与の比較

トロンビン (5 mU/ml) を血管外腔投与、血管内腔投与、そして、内皮剥離した網膜動脈へ内腔投与し、網膜動脈への反応を比較した。

c) 網膜動脈への反応における PAR の関与

PAR-1、PAR-2、及び、PAR-4 の各阻害薬とトロンビンの特異的な阻害薬である Hirudin を前投与し、網膜動脈への反応を比較した。

d) 内皮及び内皮由来血管拡張因子 (EDRF) の関与

内皮を剥離した網膜動脈へのトロンビンの反応、また、EDRF (NO、PGI₂、内皮由来過分極因子(EDHF)) の関与を各阻害薬前投与し比較した。

e) プロテインキナーゼ C(PKC)及び Rho キナーゼ(ROCK)の関与

PKC 及び ROCK の阻害薬を前投与し、網膜動脈への反応を比較した。

4. 統計学的処理

データはいずれも平均 ± 標準誤差で示した。各群間の各濃度における比較には Multiple t tests を行なった。同一群間の比較には反復分散分析 (one-way ANOVA for repeated measurements) 後、Bonferroni multiple range test を行なった。危険率 5%未満を統計学的有意とした。

成 績

1. 網膜動脈への影響

トロンピンは網膜動脈を 0.001 mU/ml から濃度依存性に 5 mU/ml で最大約 50 %の血管収縮を示し、5 mU/ml から 20 mU/ml まで濃度依存性に血管弛緩反応が得られた。

2. 血管外腔投与と血管内腔投与の比較

トロンピン (5 mU/ml) の外腔投与では約 50 %の血管収縮を示したが、内腔投与では、血管径の変化は示さなかった。しかしながら、内皮を剥離した網膜動脈への内腔投与においては、外腔投与と同様に約 50 %の血管収縮を示した。

3. PAR の関与

トロンピンによる血管収縮は PAR-1 の阻害薬 RWJ56110 及びトロンピンの非選択的阻害薬である Hirudin により、それぞれ有意に抑制された。PAR-2 の阻害薬 FSLLRY-NH₂、及び PAR-4 の阻害薬 tcY-NH₂ はトロンピンの血管収縮及び弛緩反応に影響を与えなかった。

4. 内皮及び EDRF の関与

血管内皮の剥離後、トロンピンによる網膜動脈の弛緩反応は有意に抑制された。また、トロンピンによる血管弛緩は、NO 合成阻酵素阻害薬である L-NAME の前投与により、有意に抑制されたが、PGI₂、EDHF の阻害薬である indomethacin、apamin+charybdtoxin の前投与は影響を与えなかった。

5. PKC 及び ROCK の関与

トロンピンによる血管収縮は PKC の阻害薬 Gø-6983 により有意に抑制された。また、トロンピン (5 mU/ml) による血管収縮は、内皮非依存性拡張薬である sodium nitroprusside 前投与群に比較して、ROCK の阻害薬である H1152 前投与群で有意に抑制された。

考 案

本研究により、トロンピンは低濃度 (5 mU/ml \leq) で血管収縮を高濃度で (5 mU/ml $>$) で血管を弛緩させることが明らかとなった。トロンピンによる血管収縮反応は PAR-1 阻害薬の RWJ56110 により有意に抑制されたことから、トロンピンは PAR-1 を介し血管収縮反応を示すことが示唆された。また、PKC の阻害薬である G δ -6983 及び ROCK の阻害薬である H1152 で有意に血管収縮を阻害したことから、トロンピンの血管収縮反応は PKC 及び ROCK を介することが示唆された。

トロンピンによる血管弛緩反応は血管内皮剥離により抑制されたことから、血管内皮依存性経路の存在が示唆され、内皮依存性経路としては NO 合成酵素阻害薬である L-NAME の前投与により、有意に抑制されたことから、NO が関与していると考えられた。

トロンピン (5 mU/ml) は血管内腔投与においては血管収縮反応を示さなかったが、血管内皮剥離後に血管内腔投与した場合には、トロンピン (5 mU/ml) を血管外腔投与した場合と同等の血管収縮反応を示した。このことから、トロンピンの収縮反応は、内皮により阻害されていることが示唆された。

正常血液中トロンピン濃度は 5.5 ± 1.1 mU/ml であることが報告³⁾されている。今回我々はトロンピンが 5 mU/ml において網膜動脈を最も収縮させることを明らかにした。しかし、血管内腔からでは、その反応は起こらないことも明らかにした。また、様々な眼疾患において、硝子体中トロンピン濃度の上昇が報告されており、トロンピンが眼疾患の病態に関与していることが示唆される。今回我々はトロンピンの網膜動脈に対する反応のメカニズムを明らかにした。今後、トロンピンを介した眼疾患の病態について明らかにし、新規治療法の開発について、さらなる検討を行いたい。

結 論

1. トロンピンは低濃度 (5 mU/ml \leq) で網膜動脈を収縮させ、高濃度で (5 mU/ml $>$) で弛緩させる。
2. トロンピンの網膜動脈における血管収縮反応は PAR-1 を介しており、PKC 及び ROCK が関与している。
3. トロンピンの網膜動脈における血管弛緩反応は内皮依存性で、NO の産生が関与している。
4. トロンピンによる血管内腔投与による血管収縮反応は、血管内皮により阻害される。




引 用 文 献

1. Hirano K. The roles of proteinase-activated receptors in the vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:27-36.
2. Nyborg NC, Nielsen PJ. Thrombin contracts isolated bovine retinal small arteries in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:2307-13.
3. Stief TW. Specific determination of plasmatic thrombin activity. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 2006;12:324-9.

参 考 文 献

1. Ono S, Nagaoka T, Omae T, et al. Beraprost sodium, a stable prostacyclin analogue, elicits dilation of isolated porcine retinal arterioles: roles of eNOS and potassium channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:5752-9.
2. Potts LB, Ren Y, Lu G, et al. Constriction of retinal arterioles to endothelin-1: requisite role of rho kinase independent of protein kinase C and L-type calcium channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:2904-12.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	高橋 賢伍
審査委員長 廣川 博之 			
審査委員 高井 章 			
審査委員 奥村 利勝 			
<h3>学 位 論 文 題 目</h3> <p>Thrombin-Induced Responses Via Protease-Activated Receptor 1 Blocked by the Endothelium on Isolated Porcine Retinal Arterioles</p> <p>(豚摘出網膜動脈におけるプロテイナーゼ活性型受容体1を介したトロンビン起因性の反応は血管内皮によりブロックされる)</p> <p>掲載雑誌：Current Eye Research に掲載予定</p>			
<p>血液凝固反応に寄与するトロンビンは、プロテイナーゼ活性型受容体 (PAR) を介し、臓器特異的な血管収縮・拡張といった血管反応を示す。また、増殖糖尿病網膜症、増殖硝子体網膜症などで硝子体中トロンビン濃度が上昇していることから、トロンビンのこれら疾患への関与が示唆されている。しかしながら、これまで、トロンビンの PAR を介した網膜動脈への作用は明らかにされてこなかった。</p> <p>学位論文提出者は、トロンビンが培養血管内皮細胞で一酸化窒素 (NO) やプロスタサイクリン (PGI₂) などの血管拡張因子を産生することに着目し、摘出血管を用いて、トロンビンを血管の内腔と外側からの投与に分けることにより、網膜動脈への作用とその機序を検討した。</p>			

トロンビンの血管外側投与では低濃度 (5 mU/ml \leq) で網膜動脈を収縮させ、高濃度 (5 mU/ml \geq) で弛緩させるが、内腔投与では血管反応が認められなかった。しかしながら、内皮を剥離すると内腔投与でも血管は収縮し、外側投与での弛緩反応は抑制された。低濃度外側投与による血管収縮反応は PAR-1 阻害薬 (RWJ56110) により抑制され、さらに、プロテインキナーゼ C (PKC) 阻害薬 (Gö-6983) や Rho キナーゼ (ROCK) 阻害薬 (H1152) により抑制された。また、高濃度外側投与による血管弛緩反応は NO 合成阻害薬 (L-NAME) により抑制されたが、PGI₂ 阻害薬 (indomethacin) に影響されなかった。

以上の研究結果は、トロンビンによる網膜動脈収縮反応が PAR-1 を介して生じ、PKC や ROCK が関与していること、そして、弛緩反応が内皮依存性で、eNOS が関与していることを示す新知見である。

本論文は増殖糖尿病網膜症や増殖硝子体網膜症など難治性眼疾患の病態解明に繋がる極めて重要な論文であるといえる。

論文内容と関連領域についての各審査委員による諮問に対しても適切な解答が得られ、提出者はこの領域において十分な知識を有することが示された。

以上から、本審査委員会は本論文が博士 (医学) の学位に値するものであると判定した。