

学 位 論 文 要 旨

氏名 MD. ZAHORUL ISLAM

題 目 : Study on the pharmacological characteristics of the basilar artery
(脳底動脈の薬理学的特徴に関する研究)

論文要旨 :

The present thesis was designed to study the responsiveness of the mouse basilar artery (MBA) and porcine basilar artery (PBA) to intrinsic vasoactive substances in physiological and some induced pathological conditions.

In MBA, acetylcholine (ACh), bradykinin (BK), noradrenaline (NA), 5-hydroxytryptamine (5-HT), histamine (His) and angiotensin (Ang) II-induced vascular responses were characterized with their related receptor subtypes *in vitro*. Functional studies of the isolated arteries to vasoactive substances were performed by micro-organ-bath system. ACh and BK induced endothelium-dependent relaxation. Atropine (a non-selective muscarinic antagonist) and a nitric oxide (NO) synthase inhibitor, *N* ω -nitro-L-arginine (L-NNA) but not muscarinic M₁, M₂ and M₃ antagonists shifted the concentration-response curve for ACh to the right. B₂ antagonist and L-NNA shifted the concentration-response curve for BK to the right, whereas B₁ antagonist and indomethacin (a cyclooxygenase inhibitor) had no significant effect. NA failed to produce any vasomotor action. His and Ang II induced concentration-dependent contraction. H₁ but not H₂ antagonist shifted the concentration-response curve for His to the right. AT₁ but not AT₂ antagonist shifted the concentration-response curve for Ang II to the right. These results suggest that the H₁ and AT₁ receptor subtypes play an important role in arterial contraction, whereas muscarinic receptors apart from M₁, M₂ and M₃, and B₂ receptors modify these contractions to relaxations.

Methylmercury (MeHg) increased the risk of hypertension and cardiovascular diseases. Therefore, in the subsequent study, I investigated the responsiveness of the MBA to Ang II

and ACh in *in vivo* MeHg exposed mice. Mice were exposed to MeHg (40 ppm) in drinking water for 21 days. Blood pressure was measured in conscious mice by an indirect tail-cuff method. Systolic and mean blood pressures were significantly increased after 2 and 3 weeks of treatment with MeHg, respectively. Ang II-induced contraction in an isolated basilar artery, which is mediated via Rho-kinase activation, was increased in MeHg-treated mice.

ACh-induced relaxation, which is dependent on NO production from the endothelial cells, was decreased in MeHg-treated mice. However, alterations of vascular responses to Ang II and ACh were not observed in the isolated thoracic aorta. Concomitant treatment with tempol, a reactive oxygen species (ROS) scavenger, suppressed MeHg-induced increase in blood pressure, enhanced Ang II-induced contraction and decreased ACh-induced relaxation in MeHg-treated mice. These results suggest that *in vivo* MeHg exposure increases blood pressure and causes alterations in the cerebrovascular reactivity in response to Ang II and ACh through ROS generation in mice.

In PBA, BK induced relaxation and contraction via activation of endothelial B₂ receptors. Previously, NO and prostaglandin (PG) H₂ were suggested the relaxing and contracting factors respectively, but PGH₂ has different functionally active isoforms, including PGD₂, PGE₂ and PGF_{2α}. Therefore, I attempted to quantify NO and specific PG production from cultured porcine basilar arterial endothelial cells (PBAECs). The cultured PBAECs produced NO spontaneously, and BK enhanced this production in a concentration-dependent manner. In a functional study, PGD₂, PGE₂ and PGF_{2α} induced concentration-dependent contractions in isolated PBA rings. The cultured PBAECs produced PGD₂, PGE₂ and PGF_{2α} spontaneously, and BK significantly enhanced the production of PGF_{2α}, but not that of PGD₂ and PGE₂. The B₂, but not B₁, antagonist completely abolished the BK-enhanced production of both NO and PGF_{2α}. These results suggest that BK induces production of NO and PGF_{2α} simultaneously from PBAECs via B₂ receptor activation.

Ang II is known to promote vascular disease and hypertension by its effect on vascular endothelium and affect vascular activity to endothelial dependent vasoactive substances. Hence, this study also evaluated the effect of intravenous infusion of Ang II (200 ng. kg⁻¹ min⁻¹ for 14 days) on the basilar arterial responsiveness to the endothelium-dependent agonist, in microminipig (MMPig). BK-induced relaxation was abolished and contraction was significantly enhanced in isolated basilar artery from Ang II-infused MMPig. Then the PBAECs were cultured and stimulated with Ang II (10⁻⁷ M) or vehicle for 48 hours. BK-induced NO production was significantly decreased but PGF_{2α} production was increased in Ang II stimulated PBAECs. These results suggest that the decreased NO and increased PGF_{2α} productions from the endothelial cells are the causes of altered BK response of the isolated basilar artery in Ang II treated MMPig.

In conclusion, *in vivo* exposure of MeHg and Ang II cause endothelial dysfunction of the MBA and PBA respectively. The endothelium-derived NO is decreased and the Rho-kinase activity of the vascular smooth muscle is augmented in MeHg exposed mice. On the other hand, the production of BK-induced endothelium-derived NO (relaxing factor) is decreased and endothelium-derived PGF_{2α} (contracting factor) is increased by Ang II in PBAECs. ROS generation might play an important role in the dysfunction of the endothelial cells caused by MeHg and Ang II exposed mice and MMPig.

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	Md. Zahorul Islam
審 査 委 員	主 査： 鹿児島大学 教授 宮本 篤
	副 査： 山口大学 教授 佐藤 晃一
	副 査： 鹿児島大学 教授 三好 宣彰
	副 査： 鹿児島大学 准教授 白石 光也
	副 査： 鹿児島大学 准教授 川口 博明
題 目	Study on the pharmacological characteristics of the basilar artery (脳底動脈の薬理学的特徴に関する研究)
審査結果の要旨：	
<p>脳底動脈は延髄腹面を走行し生命維持に必須である延髄に血液を供給すると共に脳血流量の維持および調節に関与している。実験動物の中でマウスは使用数が最も多い動物であり、ブタはヒトに比較的類似点が多くまた動物愛護的観点からイヌやサルに代わる非げっ歯類の実験動物として今後多くの利用が見込まれる。本研究はこの2つの動物から摘出した脳底動脈の血管作動物質に対する正常時の反応性および特性を明らかにした後、その応用として実験的に病態モデルを作成し、先に調べた正常反応にどのような影響を及ぼすかを、非観血式血圧計、血管張力測定法および細胞培養法を用いて検証し、脳血管の機能評価を行った。</p> <p>第1章では、摘出マウス脳底動脈の血管作動物質に対する反応性を明らかにした。すなわちアンジオテンシン(Ang) IIはAT₁受容体を介して、ヒスタミン(His)はH₁受容体を介して収縮反応を起こしたが、セロトニン(5-HT)はサンプルの75%では無反応であり、残りの25%で収縮反応を示した。その程度をKCl (60 mM)反応を100%として比較すると、Ang II (58%) > His (42%) > 5-HT (18%)であった。一方、ブラジキニン(BK)は内皮細胞上のB₂受容体を介して、アセチルコリン(ACh)は内皮細胞上のM₁, M₂およびM₃以外の受容体を介して弛緩反応を起こした。その程度をU-46619 (10⁻⁷ M)による前収縮とニトロプルシドナトリウム (10⁻⁴ M)による最大弛緩反応の差を100%として比較すると、BK (66%) > ACh (46%)であった。これらの結果を既に報告されている他の動物と比較すると、マウス脳底動脈は、Ang IIが血管作動物質の中で一番強い収縮反応を起こすこと、またBKとAChが共に強い弛緩反応を起こすことが大きな特徴であることがわかった。</p> <p>第2章では、マウスにメチル水銀(MeHg; 40 ppm)を含む飲料水を21日間自由飲水させ、そ</p>	

の期間中の全身血圧を計測した上で、21 日目に胸大動脈と脳底動脈を摘出し Ang II の収縮反応と ACh の弛緩反応にどのような影響を及ぼすか検討した。全身血圧は MeHg 飲用開始後 14 日目から有意に上昇し 21 日目には平均で 15 mmHg 程高くなった。また、脳底動脈の反応は Ang II の収縮反応が 20%程有意に上昇した一方で、ACh の弛緩反応は 15%程有意に減少したが、胸大動脈の反応には差は認められなかった。また、Rho キナーゼ阻害薬である Y27632 (3 μ M) の存在下では Ang II における収縮反応の上昇が消失したことから、MeHg が Rho キナーゼ活性の亢進を引き起こしていることが示唆された。これら MeHg 暴露による影響は活性酸素スカベンジャーである 4-hydroxy-tempol (2 mM) の同時飲水によりほぼ正常値まで回復した。以上より、MeHg 暴露による血圧上昇、Ang II 収縮の増強および ACh 弛緩反応の抑制には MeHg による活性酸素の増大が強く関与していることが示唆された。また、MeHg による血管反応異常におけるシグナル伝達機構の一端が明らかとなった。

第 3 章では、ブタ脳底動脈に BK を適用すると内皮細胞上の B₂ 受容体を介して弛緩反応とそれに続く収縮反応が起き、それぞれ一酸化窒素 (NO) とプロスタグランジン (PG)H₂ の関与が既に示唆されているため、培養内皮細胞を用いて関与する物質の定量を試みた。PGH₂ は代謝されると PGI₂, PGD₂, PGE₂, PGF_{2 α} および トロンボキサン (TX)A₂ になる可能性があるため、どの PG が BK の収縮反応に関与しているかを特定した。NO 産生量は BK 処置により濃度および処置時間に依存して増大し、その増大は B₂ 拮抗薬である HOE-140 (10⁻⁷ M) および NO 合成阻害剤である L-NNA (10⁻⁴ M) 処置により完全に抑制された。一方、BK の収縮反応に関しては、PGI₂ は弛緩因子であるため、また TXA₂ は以前の報告で既に可能性が除外されていたため候補としては PGD₂, PGE₂ および PGF_{2 α} となった。BK で培養脳底動脈内皮細胞に処置すると、PGD₂ および PGE₂ の産生量は影響を受けなかったが、PGF_{2 α} の産生量は有意に増大し、その増大は HOE-140 (10⁻⁷ M) で完全に抑制された。以上より、BK 処置により生じる弛緩および収縮反応はそれぞれ NO および PGF_{2 α} であることが実証された。

第 4 章では、6-8 ヶ月齢でも体重 10kg 前後にしかない超小型のマウロミニブタに、Ang II を 200 ng/kg/min で 2 週間静脈内投与し、投与中の全身血圧および投与終了後に脳底動脈を摘出し血管作動物質に対する血管反応性を検討した。その結果、全身血圧は投与 1 日目から有意に上昇し、投与終了時まで上昇分 (Δ 10-20 mmHg) を維持続けた。また脳底動脈の血管作動物質に対する反応は BK で特に著しい影響を受け、すなわち 2 相性反応の最初の弛緩反応が消失して収縮に転じ、後方の収縮反応はさらに増大した。この結果を培養細胞で検証するため、Ang II を前処置した内皮細胞と無処置の内皮細胞に BK を処置し NO および PGF_{2 α} の産生量を検討した。Ang II の前処置により NO の産生量は有意に減少し、一方 PGF_{2 α} の産生量は有意に増大した。この結果は、Ang II の処置による血圧上昇および BK 反応の弛緩反応消失と収縮反応の増大が、内皮細胞から産生される NO 産生量の減少および PGF_{2 α} 産生量の増大により引き起こされた可能性を示唆している。

本研究により、マウスおよびブタ脳底動脈の正常時の血管反応性およびその特性が明らかになると共に、この実験系が病態モデルを作成して検証しようとする場合の新たな脳血管の機能評価方法になり得ることを実証した。

以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位論文として十分に値する内容であることを認める。