

ラット胎盤における一酸化窒素 (NO) 産生と
その調節機構

麻布大学大学院獣医学研究科

動物応用科学専攻 博士後期課程 動物工学分野

DA0401 池田義則

ラット胎盤における一酸化窒素 (NO) 産生と
その調節機構

麻布大学大学院獣医学研究科

動物応用科学専攻 博士後期課程 動物工学分野

DA0401 池田義則

目次

	ページ
要約	1
1. 緒論	8
2. ラット胎盤における NO 産生と NOS 遺伝子発現の解析	
2.1. 序論	14
2.2. 材料と方法	18
2.3. 結果	27
2.4. 考察	36
2.5. 小括	39
3. ラット胎盤における NO 産生に及ぼす 抗ステロイド剤の影響	
3.1. 序論	40
3.2. 材料と方法	42
3.3. 結果	44
3.4. 考察	49
3.5. 小括	51
4. ラット胎盤における NO 産生と HIF-1 α との関係	
4.1. 序論	52
4.2. 材料と方法	55
4.3. 結果	60
4.4. 考察	67
4.5. 小括	69

5. ラット胎盤における NO 産生と TNF- α との関係	
5.1. 序論	70
5.2. 材料と方法	72
5.3. 結果	75
5.4. 考察	83
5.5. 小括	86
6. NO が VEGF および GLUT 1 に及ぼす影響	
6.1. 序論	87
6.2. 材料と方法	92
6.3. 結果	95
6.4. 考察	104
6.5. 小括	107
7. 総括	108
8. 謝辞	111
9. 引用文献	112

要約

一酸化窒素 (Nitric Oxide: NO) は生体内で NO 合成酵素 (Nitric Oxide Synthase: NOS) により L-アルギニンと酸素を基質として種々の細胞で産生されており、極めて多様な作用を有している。妊娠中には NO 代謝産物の尿中への排泄が増加することから、妊娠中に NO 産生量が増加していると考えられる。胎盤においても NOS の存在が報告されており、血流量の維持や血栓形成の防止などとの関連が示唆されているが、NO 産生量の解析が困難なこともあり、NO 産生量やその調節機構は不明である。また、胎盤における NO 産生の生物学的役割についても不明な点が多い

以上のことから、本研究では、妊娠ラットを用いて、胎盤における NO 産生とその調節機構を明かにするために、(1) ラット胎盤における NO 産生と NOS アイソフォームの発現、(2) NO 産生に及ぼすステロイドホルモンの影響、(3) NO 産生と低酸素誘導因子 (Hypoxia Inducible Factor: HIF-1 α) との関係、(4) NO 産生と腫瘍壊死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α : TNF- α) との関係、そして (5) NO 産生と血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) およびグルコーストランスポーター1 (Glucose Transporter 1: GLUT 1) との相互作用について、NO 産生を直接測定できるスピントラップ・電子常磁性共鳴吸収 (Electron Paramagnetic Resonance: EPR) 法と NOS 阻害剤 N^G -nitro- L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) による NO 産生抑制モデルラットを用いることにより明らかにした。

(1) ラット胎盤における NO 産生と NOS アイソフォームの発現

ラット胎盤において NOS の存在は報告されているが、NO 産生の解析についての報告は少ない。そこで、スピントラップ剤であるジチオカルバメイト鉄錯体 (Fe-N-(dithiocarboxy)sarcosine : Fe-DTCS) により NO をスピントラップした後、EPR 装置により NO 産生量を解析した。さらに、NO 産生に寄与する NOS アイソフォームを RT-PCR (Reverse Transcribed Polymerase Chain Reaction) により検討した。

妊娠 13 日から 21 日のラット背部に Fe-DTCS(500mg/kg)を皮下投与し、30 分後に胎盤を採取し、EPR 解析に供した。また、妊娠 13 日から 21 日の無処置ラットの胎盤を採取し、RT-PCR を用いて iNOSmRNA および eNOSmRNA の発現について解析した。

胎盤における NO 産生は妊娠 13 日から 21 日まで認められ、妊娠 15 日に著しい高値を示した。次に、NOS アイソフォームを RT-PCR 法により解析すると、iNOSmRNA の発現は妊娠 15 日に高値を示し、NO 産生パターンとよく一致していた。一方、妊娠期間を通じて eNOSmRNA の発現は認められたものの、その発現量はほぼ一定であった。

以上のことから、ラット胎盤における NO 産生パターンと iNOSmRNA の発現パターンがよく一致していたことから、胎盤における NO 産生は主に iNOS により転写レベルで調節されているものと考えられた。また、eNOS は NO 産生に対する寄与が少ないと考えられた。

(2) ラット胎盤における NO 産生におよぼすステロイドホルモンの影響

(1)妊娠 15 日に NO 産生量はピークを示し、この時期の NO 産生は主に iNOS により転写レベルで調節されているものと考えられた。子宮内膜でステロイドホルモンにより NOS アイソフォームの発現が影響されることが報告されていることから、胎盤における NO 産生に及ぼすステロイドホルモンの作用を確かめるため抗ステロイド剤の影響を検討した。

抗プロジェステロン剤 (RU486) または抗エストロジェン剤 (Raloxifene) を妊娠 12 日から 14 日まで、それぞれ 3 日間 (1mg/kg/day) 投与し、iNOSmRNA と eNOSmRNA 発現量を検討したところ、対照群との間に発現量に有意差はなく、抗ステロイド剤の影響は認められなかった。

抗ステロイド剤投与により iNOSmRNA および eNOSmRNA の発現が変化しなかったことから、胎盤におけるこの時期の NOS アイソフォームの発現はステロイドホルモンの影響を受けない可能性が示唆された。

(3) ラット胎盤における NO 産生と低酸素誘導因子 (HIF-1 α) との関係

(2)において妊娠 15 日にピークを示す NO 産生がステロイドホルモンにより調節されない可能性が示されたので、他の因子の関与について検討した。iNOS 遺伝子の転写調節に関与することの知られている HIF-1 と NO 産生との関連を検討した。なお、HIF-1 を構成する 2 量体のうち HIF-1 α について検討した。

妊娠 13 日から 21 日の HIF-1 α mRNA 発現量と HIF-1 α タンパク量を RT-PCR とウエスタンブロットにより解析した。次に、NO 産生のピーク

に当たる妊娠 15 日の胎盤において L-NAME を持続注入し、NO 抑制モデルを作製し、NO 産生量、HIF-1 α タンパク、HIF-1 α mRNA および iNOSmRNA の発現量を解析した。

HIF-1 α mRNA と HIF-1 α タンパクの発現は妊娠 13 日から 21 日まで認められたものの、妊娠時期による有意な変化は認められなかった。次に、L-NAME を持続注入することにより、NO 産生量を減少させる NO 抑制モデルでは、NO 産生量の減少する時期と一致して HIF-1 α タンパクは減少し、その後、L-NAME の注入を停止した 24 時間後には完全に回復した。また、HIF-1 α mRNA および iNOSmRNA の発現量は L-NAME 注入後から持続的に増加した。

HIF-1 α mRNA と HIF-1 α タンパクはラットの胎盤において恒常的に発現している。さらに、NO の産生を抑制すると、HIF-1 α タンパクが減少し、NO 産生の抑制を解除すると HIF-1 α タンパクは急増すること、また、NO 産生が抑制されている時期に HIF-1 α mRNA および iNOSmRNA の発現量が持続的に増加し、HIF-1 が iNOS を介して NO 産生量を制御している可能性が示唆された。

(4) ラット胎盤における NO 産生と TNF- α との関係

ラット胎盤において妊娠 15 日にピークを示す NO は、主に iNOS により調整されており、この時期の iNOS の発現は HIF-1 α を介して誘導されている可能性が示されたが、さらに他の要因の関与も考えられる。そこで、iNOS を誘導することが知られている炎症性サイトカインの一つである

TNF- α との関係について検討した。

NO 産生がピークを示す妊娠 15 日と低値を示す妊娠 21 日のラットにおいて L-NAME による NO 産生抑制モデルを用いて、NO 産生量、HIF-1 α mRNA、iNOSmRNA、TNF- α mRNA および HIF-1 α タンパクの発現を解析した。

妊娠 15 日においては L-NAME 注入により NO 産生を減少させると、NO 産生量の減少と同時に HIF-1 α タンパクは減少し、HIF-1 α mRNA および iNOSmRNA は経時的に増加したが、TNF- α mRNA に変化は認められなかった。一方、妊娠 21 日においては、L-NAME 注入後 NO 産生が減少しても HIF-1 α mRNA、iNOSmRNA、eNOSmRNA、HIF-1 α タンパクの発現に変化は認められなかったが、TNF- α mRNA は対照群に比べて約 5 倍に増加した。

以上のことから、妊娠 15 日の胎盤における iNOS の発現は主に HIF-1 α を介して誘導されており、TNF- α の関与は認められなかった。一方、妊娠 21 日の胎盤においては、HIF-1 α を介した iNOS の誘導機構はほぼ消失し、TNF- α を介して誘導されている可能性が示唆された。

(5) ラット胎盤における NO 産生と VEGF および GLUT 1 との相互作用

胎盤においては主に GLUT 1 を介して細胞内へのグルコースの取込みが行われている。また、VEGF と NO との関係については、NO が VEGF の発現を誘導するという報告と VEGF が NO 産生を促進しているという報告があり、胎盤においては NO と VEGF が相互に作用している可能性がある。さら

に、VEGFとGLUT 1はともにHIF-1の標的遺伝子でもある。そこで、胎盤で産生されるNOの生物学的意義を検討するためにNOとVEGFおよびGLUT 1の相互作用を検討した。

NO産生がピークを示す妊娠15日と低値を示す妊娠21日のラットにおいてL-NAMEによるNO抑制モデルを用いて、経時的にNO産生量、VEGFmRNAおよびGLUT 1mRNAの発現量を解析した

L-NAME注入により妊娠15日のNO産生を減少させると、VEGFmRNAの発現は一時的に減少し、その後、徐々に回復した。また、GLUT 1 mRNAの発現はNO産生量の減少に伴って徐々に増加した。一方、妊娠21日においてはL-NAMEによりNO産生を抑制しても、VEGFmRNAとGLUT 1mRNAの発現に変化は見られなかった。

以上のことから、NO産生量の多い妊娠15日においては、VEGFの発現にはNOが必要であること、GLUT 1の発現にはNO産生抑制時の代償機構が存在していることが示唆された。

以上のことから、(1) ラット胎盤におけるNO産生、iNOSmRNAおよびeNOSmRNAの発現は観察した妊娠13日から21日にかけて恒常的にみられた。NO産生とiNOSmRNAの発現は妊娠15日にピークを示し、iNOSmRNAの発現は、NO産生パターンとよく一致していたことから、この時期のNO産生は主にiNOSにより転写レベルで調節されているものと考えられた。また、eNOSは寄与は少ないと考えられた。

(2) NO産生がピークを示す妊娠15日のラット胎盤において、抗ステロイ

ド剤により NOSmRNA の変化が認められなかったことから、胎盤におけるこの時期の NOS アイソフォームの発現はステロイドホルモンの影響を受けていない可能性が示唆された。

(3) HIF-1 α mRNA と HIF-1 α タンパクはラットの胎盤において恒常的に発現している。さらに、NOS 阻害剤 L-NAME を用いて NO 産生を抑制すると、HIF-1 α タンパクが減少し、NO 産生の抑制を解除すると HIF-1 α タンパクは急増すること、また、NO 産生が抑制されている時期に HIF-1 α mRNA および iNOSmRNA の発現量が持続的に増加していることから、HIF-1 α タンパクが iNOS を介して NO 産生量を制御していると考えられた。

(4) NO 産生が低値を示す妊娠 21 日の胎盤においては、NO 産生を抑制しても HIF-1 α タンパクおよび HIF-1 α mRNA に変動は認められないことから、HIF-1 α を介した iNOS の誘導機構はほぼ消失していると考えられる。一方、NO 産生抑制後に TNF- α mRNA が急増し、iNOSmRNA の発現量が持続的に増加したことから、この時期における NO 産生は TNF- α を介して誘導されていることが示唆された。

(5) NO 産生量の多い妊娠 15 日においては、VEGF の発現には NO が必要である。そして、GLUT 1 の発現には NO 産生抑制時の代償機構が存在していることが示唆された。

1. 緒論

哺乳類のなかで分類学的に最も下等に位置するカモノハシが属する単孔類 *Monothemata* は卵生である。次に続くカンガールなどの有袋類 *Marsupialia* は胎生で卵黄嚢胎盤を持ち卵黄嚢は著しく拡張していて胚を完全に包み子宮壁に密着している。胎子は子宮内面に分泌される栄養分を吸収して発生を続けるが、絨毛膜を持たず子宮内に長く留まることができないため無胎盤類 *Aplacentalia* に分類される。これらより上位に属する大部分の哺乳類は有胎盤類 *Placentalia* である。このように胎盤の有無や種類は哺乳類を特徴づけるものである。

胎盤は母体にとって同種異個体の胎子の成長を維持する重要な器官であり、胚性組織と母体組織が緊密に接着し、胎子の栄養、呼吸および排泄を代償した機能を有している。発生学的に胎盤は、胚盤胞の外壁を成す栄養芽細胞層由来であり、将来、胚になる内部細胞塊とは本質的に異なる。

卵と精子が卵管で受精し、受精卵は卵割を繰り返し3.5日から4日かけて卵管を下降して子宮に到着する。桑実胚が胚盤胞になるころ、子宮内膜上皮はステロイドホルモンの影響により着床の準備を終了し、胚盤胞は子宮内膜の窪みに落ち込む。その部位の子宮内膜において胚盤胞の栄養膜の侵入により胎盤の形成が始まる。

脱落膜形成動物において母体組織は内膜間質細胞がエストロジェンとプロジェステロンの作用により細胞増殖と分化が起こり脱落膜が形成される。脱落膜は着床期や胎盤形成期に母体組織は栄養膜細胞による侵入を受ける。

ラットを含むゲッ歯類は血絨毛迷路胎盤で栄養膜細胞層から生じた栄養膜合胞体細胞が子宮内膜を破壊して母体血管を栄養膜合胞体細胞層の中に取り入れる血絨毛胎盤である。この胎盤は母体血管が栄養膜の中で極めて不規則に走り血管内皮細胞を失うので母体血液は直接に栄養膜の中にできた迷路を通る。この迷路を形成する栄養膜の壁は薄くなり、その壁の中に胎子結合組織と胎子血管が入ってきて胎子血管は栄養膜を介して母体血管に近接する。(江口, 1992)。

このように胎盤は古くから形態学的に研究が行われてきたが、生理学および生化学的には不明の点が多い。胎盤は神経支配を受けていない臓器であるため、胎盤の機能は神経以外のホルモンなどの液性因子により制御されている。近年、胎盤においても一酸化窒素 (NO) が血流調節、血栓形成の防止そして免疫学的応答に関与しているという報告がある (Conrad *et al.*, 1993; Hull *et al.*, 1994; Myatt *et al.*, 1992; Ramsay *et al.*, 1994)。

胎盤と密接な関係にある子宮平滑筋においては、NO の基質である L-アルギニンが妊娠中期の子宮収縮を抑制し、L-アルギニン-NO-cGMP 系が妊娠の維持に関与していることが報告されている (Izumi *et al.*, 1993; Rossell *et al.*, 1998)。一方、L-NAME を投与すると妊娠中期の子宮収縮の抑制を阻害する (Yallampalli *et al.*, 1993)。このことは NO が妊娠中の子宮収縮を抑制し、妊娠の維持、早産防止に重要な役割を果たしていると考えられる。このように妊娠制御に関わる NO の作用についての報告が多数あるが、妊娠は NO のみによって維持されているのではなくステロイドホルモンなど様々な因子との調整により成り立っている。ラットでは L-NAME と少量

の抗プロジェステロン剤投与により早産が引き起こされる (Yallampalli *et al.*, 1996)。子宮筋の eNOSmRNA の発現は妊娠による影響を受けず、iNOSmRNA の発現が妊娠中期に増加し妊娠末期に減少することから (Dong *et al.*, 1996)、妊娠中期の子宮における L-アルギニン-NO-cGMP 系には iNOS が深く関わっていると考えられる。また、受精卵の着床時期や脱落膜の形成に NO が作用している (Barrett *et al.*, 2002)。

NO は、常温で気体のフリーラジカルである。NO を生成する微生物が存在することは古くから知られており (Zumft, 1993)、また、高等な生物との関わりという点では大気汚染の悪玉分子の一つとして NO が注目されてきた。しかし、1987年に独立した二つの研究グループによって、NO は哺乳類の血管壁の内皮細胞で合成され、血管を弛緩させる因子 (内皮細胞由来血管弛緩因子: EDRF) であると報告された (Palmer *et al.*, 1987; Ignarro *et al.*, 1987)。その後、NO は哺乳類の血管内皮細胞、神経細胞、マクロファージなどの細胞で NO 合成酵素 (Nitric Oxide Synthase: NOS) の働きにより L-アルギニンから産生され、血管を拡張して血圧を調節し、中枢神経では神経伝達物質として作用し、免疫系でエフェクター分子として作用していることが明にされてきた (Feldman *et al.*, 1993)。

NOS はその局在、発現様式から構成型 NOS (constitutive NOS: cNOS) と誘導型 NOS (inducible NOS: iNOS) に分類される。さらに発現組織および分子生物学特徴により三種類のアイソフォームに分類される。すなわち、神経型 NOS (neuronal NOS: nNOS, NOS I)、誘導型 NOS (inducible NOS: iNOS, NOS II) そして内皮型 NOS (endothelial NOS: eNOS, NOS III) であ

る (Griffith *et al.*, 1995)。nNOS と eNOS は細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇するとカルモデュリン (CaM) 依存性に直ちに活性化される酵素であり、それぞれ神経組織と血管内皮で構成的に発現していることから cNOS と呼ばれる。一方、誘導型 NOS は Ca^{2+} 非依存性であり、通常は発現していないが、エンドトキシンやインターロイキン- 1β (Interleukin- 1β : IL- 1β)、インターフェロン- 1γ (Interferon- γ : IFN- γ)、腫瘍壊死因子- α (Tumor Necrosis Factor:TNF) などの炎症性サイトカインによって初めて誘導される (Morris *et al.*, 1994) ことから、iNOS と呼ばれる。

NOS により産生される内因性の NO は多くの器官において多様な働きを示している (Marinella *et al.*,1998)。生理的および病態生理的な NO の役割の解明にはその濃度と分布を明かにすることが重要であるが、NO は不安定で寿命の短いフリーラジカルである (Palmer *et al.*, 1987) ため、研究は困難であり未解明な点が多く残されている (Archer, 1993)。

NO はフリーラジカルであるので電子常磁性共鳴吸収 (Electron Paramagnetic Resonance: EPR) 装置でシグナルを観察できるが、気体の NO および液相中の溶存 NO のシグナルを観察するためには特殊な条件を設定する必要があり、シグナルの強度も低い (吉村, 1999)。この不安定で寿命の短いフリーラジカルをスピントラップ試薬を用いて不安定な NO を補足して安定なスピントラップ・NO として観察する方法がスピントラップ EPR である。

ジチオカルバメート鉄錯体の誘導体である Fe-N-(dithiocarboxy)sarcosine (Fe-DTCS) により NO をスピントラップし、NO を検出する方法が報告

されている (Suzuki *et al.*, 1998; Yoshimura *et al.*, 1996)。Takizawa ら (2002) はこの手法により、妊娠 19 日から 21 日のラット胎盤においてかなり多量の NO が産生されていることを報告した。

NO が分娩のシグナルではないかという仮説 (Sladek *et al.*, 1997) もあり、妊娠末期には NO 産生量が急激に減少するのではないかと考えられていたが、妊娠 19 日から 21 日の間で NO 産生量に変動は認められなかった (Takizawa *et al.*, 2002)。

また、NO は多様な作用を有し、血管系においては血管拡張作用のみではなく、血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) を増加させ、血管内皮細胞の浸透性を増進させるという報告がある (Dulak *et al.*, 2000; Jozkowicz *et al.*, 2001)。胎盤は極めて血管に富んだ器官であるので、NO が血管新生に関与しているとするれば、胎盤形成期や発育期における NO 産生量の挙動を検討することは極めて興味深い。

子宮内膜においてはステロイドホルモンにより NOS の発現が調節されているという報告文があることから、胎盤における NO 産生に対する抗ステロイド剤の影響は興味深い。

iNOS 遺伝子の転写調節領域には低酸素誘導因子 (Hypoxia Inducible Factor: HIF-1) 結合部位が存在するが、胎盤における NO 産生への HIF-1 の関与は報告されていない。また、iNOS を誘導することが知られている炎症性サイトカインの一つである腫瘍壊死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α : TNF- α) との関係についての報告はない。

胎盤の形成期や成長時に胎子のために血流量の維持や胎子へのグルコー

スの取込みが必要であり、胎盤においては主にグルコーストランスポー-1 (Glucose Tansprtor 1: GLUT 1) がグルコースの細胞内への取込みを行っている。また、VEGF と NO との関連については、NO が VEGF の発現を誘導するという報告と VEGF が NO 産生を促進しているという報告があり、いずれにしても NO と VEGF は相互作用をしている可能性がある。また、VEGF と GLUT 1 は両者ともに HIF-1 の標的遺伝子であるので、胎盤における NO と VEGF および GLUT 1 の相互作用は興味深い。

以上のことから、本研究では、妊娠ラットを用いて、胎盤における NO 産生とその調節機構を明らかにするために、(1) ラット胎盤における NO 産生と NOS アイソフォームの発現、(2) NO 産生におよぼす抗ステロイド剤の影響、(3) NO 産生と HIF-1 α との関係、(4) NO 産生と TNF- α との関係、そして (5) NO 産生と VEGF および GLUT 1 との相互作用について、スピントラップ・EPR 法や種々の手法を用いて解析した。

2. ラット胎盤における一酸化窒素 (NO) の産生と一酸化窒素合成 (NOS) 遺伝子発現の解析

2.1. 序論

NO は、L-アルギニンを基質として NOS によって生合成されている。NO は分子量が極めて小さく、脂溶性であるため細胞膜を自由に透過し、様々な生理現象に関わっている。生殖生物学分野で NO は排卵を惹起し (Shukovski and Tsafiriri, 1994)、受精の際には低濃度で精子の運動率や生存率を促進する (Zuni *et al.*, 1995)、妊娠初期の子宮内膜着床部位において iNOS と eNOS の発現が増強している (Pucell *et al.*, 1999)、妊娠中期および後期の胎盤における NOS は栄養膜細胞に局在している (Baylis *et al.*, 1999; Lyall *et al.*, 1999)、など NO は妊娠の様々な生理作用に関与している。

胎盤における NO の主な作用としては血流の調節、絨毛間腔での血栓形成の防止、そして、母体免疫作用の抑制などが報告されている (Conrad *et al.*, 1993; Hull *et al.*, 1994; Myatt *et al.*, 1992; Ramsay *et al.*, 1994)。そして、胎盤は non-innervated organ である (Relly and Russel, 1977) ため、胎盤血流量は神経由来の調節を受けず、胎盤で産生される NO が注目され、NO が胎盤の血管に作用して胎盤の血流量を調節している (Ramsay *et al.*, 1994) ことが報告されている。

胎盤の絨毛間腔には母体血液がそそぎ、胎盤は胎子の呼吸と栄養分の吸収および老廃物の排泄の場である。そのため、胎盤絨毛間腔では血栓形成が防止され、常に流動性が保たれていなければならない。

母体と胎子は免疫学的に異物であるにも関わらず、胎子が母体から拒絶されることなく子宮内で発育できることにも NO が関わっている (Gonzalez *et al.*, 2004)。

電子常磁性共鳴吸収 (EPR) 法はマイクロ波と磁場を利用して不対電子をもつ物質 (フリーラジカル) を測定する装置である。電子の一つの軌道には通常 2 個の電子が存在する。2 個の電子スピンは互いに逆向き (右回りと左回り) に回転し、これはパウリの法則とよばれている。このため、おのおのの電子のスピン角運動量の和は打ち消されてしまい、電子スピンに基づく磁性は現れない。しかし、軌道に 1 個の電子のみが存在する場合、つまり、不対電子がある場合は回転する電子スピンによる小磁石が形成され、常磁性の状態となり EPR による観測が可能になる。

周囲に磁場がないとき、不対電子は無秩序に配向しているため右向きと左向きのスピン間にはエネルギー的差はない。そこに磁場を一定方向にかけると電子スピンは磁場の方向を中心軸として歳差運動を生じ、磁場の方向に平行 (β スピン) か逆方向 (α スピン) に小磁石の向きをそろえて、その結果、 α と β スピンによるエネルギー状態に差が生じる。磁場の中で分裂した 2 つのエネルギー状態はゼーマン準位、そしてこの現象をゼーマン分裂とよぶ。

このようなゼーマン分裂が生じている状態の時、この分裂に等しいエネルギー差の電磁波 (マイクロ波) を照射すると、磁場に平行な安定状態にあった β スピンがそのエネルギーを吸収し、その結果、逆平行の不安定な α スピンに反転する現象を EPR により観察することにより EPR スペクト

ルを描くことができる。すなわち、EPR スペクトルは磁場の中に置かれた不対電子が 2 つの準位に分裂し、その分裂に等しいエネルギー差の電磁波を吸収した時に観察される。通常、目的試料と標準試料 (MnO) を全く同じ条件で EPR スペクトルを測定すれば、それを比較する相対的定量法として用いることができる (桜井, 2003)。

NO もフリーラジカルであるため EPR でシグナルを観察できるが、NO は不安定で寿命が短いため測定は困難であった。そこで、スピントラップ法を用いることにより不安定なラジカルを安定な化合物に補足し、安定なラジカルに変換することにより、EPR 法を用いた測定が可能となってきた。スピントラップ試薬の一つとして NO に高親和性の鉄化合物 (鉄錯体) がある。鉄錯体は NO をトラップすると安定な NO-鉄 (II) 錯体となる。この鉄錯体にトラップされた NO も不対電子をもっているために EPR により測定できる。近年、ジチオカルバメート鉄錯体の誘導体である Fe-N-(dithiocarboxy)sarcosine (Fe-DTCS) をスピントラップ剤として用いて、EPR 装置により NO を検出する方法が報告されている (Suzuki *et al.*, 1998; Yoshimura *et al.*, 1996)。また、Takizawa ら (2002) は、NO 産生を検出するだけでなく、NO 量を定量できることを報告している。

Fe-DTCS は NO をトラップして安定な NO-鉄錯体 (Fe-DTCS 錯体) を形成する。この Fe-DTCS 錯体は明瞭な 3 本の EPR スペクトルを示す。DTCS の鉄錯体は水に良く溶けるので血液によって生体内の隅々まで運ばれるため組織内の NO 測定に適している (吉村, 1999)。

本章では前述したスピントラップ・EPR 法を用いて妊娠 13 日、15 日、

17日、19日および21日のラット胎盤を用いてNO産生量を解析した。また、得られたEPRスペクトルが胎盤のNOS由来であることを確認するために、NOS阻害剤である N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)を注入後のNO産生を解析した。さらに、NO産生に寄与するNOSアイソフォームを明らかにするためにiNOSmRNAおよびeNOSmRNAの発現を検討した。

2.2. 材料と方法

2.2.1. 供試動物および飼育環境

Crj:Wistar ラット（日本チャールス・リバー，横浜）を自家繁殖させて得た 10 から 15 週齢の F1 動物を用いた。動物は室温 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、 $55 \pm 10\%$ 、換気回数 15 回/時間（オールフレッシュ方式）に設定した一定の明暗周期の生物科学総合研究所で飼育し、固形飼料（CE-2，日本クレア，東京）および水道水を自由に摂取させた。妊娠動物を得るために雌雄ラットを一晩同居させ、翌日膈スミア内に精子が認められた日を妊娠 0 日として起算し、妊娠満期は 21 日とした。飼育には $263 \times 425 \times 178$ mm のポリカーボネート製ケージを用い、交配中は 3 匹ずつ、妊娠確認後は 1 匹飼育とした。

2.2.2. 試薬の調製

(1) 試薬

スピントラップ剤の調製には、*N*-(dithiocarboxy)sarcosine (DTCS, 和光純薬, 大阪)、塩化鉄 (III) (和光純薬, 大阪) を用いた。NOS 阻害剤として *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME, 和光純薬, 大阪)、NO ドナーとして (4-methyl-2-[hydroxyimino]-5-nitro-6-methoxy-3-hexenamide (NOR1, 同仁, 熊本) を用い、Dimethyl Sulfoxide (DMSO, 和光純薬, 大阪) を NOR1 の溶媒とした。

(2) スピントラップ剤の調製

ジチオカルバメート鉄錯体として DTCS と FeCl_3 から Fe-DTCS 錯体を

作製して用いた。30 分以上窒素ガスをバブリングして溶存酸素を低下させたリン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.2~7.4, 0.01M) に FeCl_3 を 20.1mg/mL の濃度になるように溶解し、窒素ガスで 20 分以上バブリングした (Fe 液)。次に DTCS をリン酸緩衝生理食塩水で 100mg/mL になるように溶解した (DTCS 液)。Fe 液と DTCS 液のモル比が 3:1 になるように等量ずつ混和した。

2.2.3. NO-Fe-DTCS の標準サンプルの解析

スピントラップ剤には Fe-DTCS を用いた。NO ドナーには、10mg の NOR1 を 100 μ L の DMSO に溶解したものを使用した。Fe-DTCS に DMSO で溶解した NOR1 を加えて NO-Fe-DTCS の標準サンプルを作製し、EPR 測定に供した。

2.2.4. L-NAME 投与液の調製と浸透圧ポンプの作製

NOS 阻害剤として L-NAME を用いた。使用直前に L-NAME を秤量し、生理食塩水に溶解し、浸透圧ポンプ (Alzet MINI-OSMOTIC PUMP MODEL 2001D, 室町機械, 東京) に充填した。L-NAME の注入速度は、30 μ g/min あるいは 65 μ g/min とした。なお、浸透圧ポンプに L-NAME 溶液を充填する時には Alzet 社のマニュアルに従い、充填前後の重量を測定して 200 μ L 以上入っていることを確認した。

2.2.5. 電子常磁性共鳴吸収 (EPR) 装置による解析

NO のシグナルを検出、解析するため、電子常磁性共鳴吸収 (EPR) 装置 (JES-TE3X, 日本電子株式会社, 東京) を用いた。EPR 装置の測定条件は、Temperature 77.00K, Microwave Power 10.00mW, Modulation 100kHz 0.32mT, Center Field 320.0mT, Sweep Width 10.0mT, Sweep Time 4.0 min, Time Constant 0.30 sec で行った。また、EPR 解析の際に、同時に酸化マンガン (MnO) の粉末の EPR スペクトルを測定し、NO-Fe-DTCS のシグナルの高さと MnO のシグナルの高さを求めた。

2.2.6. 実験デザインとサンプリング

胎盤の採取が可能な妊娠 13 日、15 日、17 日、19 日および 21 日のラットを用いた。作製したスピントラップ剤 (Fe-DTCS 液) は用時調製とした。サンプリングする時刻を 12 時と決め、その 30 分前に Fe-DTCS (500mg/kg) をラット背部に皮下投与した。サンプリングはラットにエーテル麻酔を施して開腹した後、子宮全体を取り出し、子宮壁を切開して胎盤を採取した。眼科剪刀を用いてサンプルを細切し、石英の EPR 試料管へ最低 0.5g 充填した。EPR 試料管の最下部から液体窒素にゆっくりと浸しながら凍結し、EPR 解析に供した。

RNA 抽出用には無処置の母体ラットから上記と同様に胎盤を摘出し、個別にサンプルチューブに入れ、液体窒素により急速凍結し、RNA 抽出まで -80°C で保存した。

2.2.7. L-NAME 注入後のラット胎盤における NO 産生量の解析

EPR 装置により得られた NO の EPR スペクトルが胎盤の NOS 由来であることを確認するために、L-NAME を浸透圧ポンプにより持続注入し、24 時間後の NO 産生量を解析した。L-NAME の注入速度が 30 μ g/min および 65 μ g/min となるように濃度を調整した浸透圧ポンプをサンプリングの 24 時間前である妊娠 14 日の 12 時にラットの背部皮下に埋め込んだ。胎盤の摘出から EPR 測定までの方法は前述と同様である。

2.2.8. NO 産生に寄与する NOS アイソフォームの解析

(1) 試薬等の調製

1) 電気泳動用緩衝液 (TAE)

電気泳動用緩衝液は、トリスヒドロキシメチルアミン (和光純薬、大阪) 4.8g、EDTA (和光純薬、大阪) 0.74g、酢酸 (和光純薬、大阪) 1.14mL に超純水を加え 1000mL にフィルアップして作製した。

2) 電気泳動用アガロースゲル

電気泳動用のゲルは、Agarose STANDARD 01 (プロテックメディカル、東京) 0.6g を TAE(40mL)に溶解して 1.5%アガロースゲルを作製した。

(2) 総 RNA 抽出法

サンプル 50mg に対し 2mL の ISOGEN (ニッポンジーン、東京) を加え、ホモジナイズした。15 秒のホモジナイズを氷冷しながら 4~5 回、目

視により固形物がなくなるまで行った。2.0mL のマイクロチューブに移し換え、4°C、15,000rpm で 10 分間遠心し、上層を取り、室温で 5 分間放置した。それにクロロホルム（和光純薬、大阪）を加え 15 秒懸濁した（ISOGEN1mL につきクロロホルム 0.2mL）。2~3 分室温で放置し、4°C、15,000rpm で 15 分間遠心した後、再び上層を取りその上層と同量のクロロホルムを加えた。15 秒懸濁して、2~3 分室温で放置した。4°C、15,000rpm で 15 分間遠心した後、上層を滅菌チューブに取り上層と同量のイソプロピルアルコール（和光純薬、大阪）を入れ、軽く転倒混和後、5~10 分間室温で放置した。その後、4°C、15,000rpm で 10 分間遠心を行った。ペレットを落とさないように上清を捨て、水分を取り除き、75%エタノールを 1mL 加えリンスした。4°C、10,000rpm で 5 分間遠心を行った。ペレットを落とさないように上清を捨て、軽く乾燥後、DEPC 処理水を 100 μ L 加え、RNA を溶解し、-80°Cにて保存した。

(3) RNA の定量

分光光度計 BioSpec-1600（島津製作所、京都）を用いて、RNA 量を測定した。

(4) DNA の除去

抽出した総 RNA に混入している DNA を DNase 処理により除去した。RNA の濃度を測定し、5 μ g に対し 10 \times DNase (RT Grade) buffer 2（ニッポンジーン、東京）を 2.5 μ L、Deoxyribonuclease 0.5 μ L 加え、DEPC 滅

菌水を加えて $25\mu\text{L}$ とした。 37°C で 15 分間インキュベートした後、反応停止液 $2.5\mu\text{L}$ を加え、 70°C で 10 分間インキュベートし反応を止め、 -80°C で保存した。

(5) First Strand cDNA 合成

RNA サンプルとプライマーの混合液 (total RNA $5.5\mu\text{L}$ 、oligo(dT)₁₂₋₁₈ $1\mu\text{L}$ 、DEPC 処理水 $6\mu\text{L}$) を作製した。混合液は 70°C で 10 分間インキュベートし、氷水上に 2 分間以上おいた。この混合液に $5\times$ First Strand buffer を $4\mu\text{L}$ 、 20mM dNTP mix を $0.5\mu\text{L}$ 、 0.1M DTT を $2\mu\text{L}$ 、逆転写酵素 (Super Script III、invitrogen、東京) を $1\mu\text{L}$ 加え、チューブの内容物をよくピペッティングした。 50°C 、50 分間インキュベートした後、 70°C 、15 分間インキュベートし反応を止めた。氷水上で 2 分間以上おき、スピンドウンして反応液をチューブの底に集めた。 2unit RNase H (invitrogen、東京) を加え、 37°C 、20 分間インキュベートした。 -30°C で保存するか、そのまま PCR に用いた。

(6) PCR

1) PCR 試薬調製

PCR 反応液は以下の組成とした。 $10\times$ PCR buffer を $20\mu\text{L}$ 、 2.5mM dNTP mixture を $16\mu\text{L}$ (最終濃度、 0.2mM)、Forward Primer ($5\mu\text{M}$)、Reverse Primer ($5\mu\text{M}$) を各 $4\mu\text{L}$ (最終濃度、 $0.2\mu\text{M}$)、TaqDNA ポリメラーゼ (Takara、大津) を $1\mu\text{L}$ 入れ ($2.5\text{U}/100\mu\text{L}$)、DEPC 処理滅菌水 $142\mu\text{L}$ を加えた PCR

反応液を 19 μ L に分注し cDNA を 1 μ L 加え、PCR 反応を行った。

ハウスキーピング遺伝子の一つで解糖系の主要酵素である Glyceraldehyde-3-mono phosphate dehydrogenase(GAPDH)をコードしている GAPDH 遺伝子に特異的なプライマーを内部標準として用いて実施した。プライマーの配列は表 1 に示した。これらのプライマーの合成はテキサスジェノミクスジャパン（東京）に依頼し、作製した。

2) PCR 反応条件

PCR 反応は、最初の熱変性を 94°C で 5 分間した後に、各プライマーに対して、PCR 産物が指数関数的に増幅をしているサイクル数の範囲を決定するために、プールした cDNA サンプルを用いて、それぞれにおいて、16~34 サイクルで PCR 反応を行った。各プライマーによる PCR 産物が指数関数的に増幅することが確認できたサイクル数の範囲を求め、さらに PCR 反応液に加えた cDNA 量に比例して PCR 産物が増幅していることを確認した。PCR 増幅には Gene Amp PCR System 2400 装置 (Perkin Elmer, Yokohama) を用いた。各プライマーによる PCR 反応条件を表 2 に示した。

3) PCR 産物の半定量的解析

PCR 反応後、PCR 産物を 1.5%アガロースゲルを用いて、TAE バッファーで 100V、約 40 分間電気泳動した。そして TAE バッファーで 1000 倍希釈した SYBR Green I 溶液 (BMA 50513, Rockland USA) で 30 分間染色した。染色後イメージアナライザー装置 (FLA-2000, 島津製作所, 京都) に

より染色したアガロースゲルをスキャンし、取り込んだ画像は画像処理ソフト MacBas v2.5 (富士フイルム, 東京) を用いて、PCR 産物量を数値化した。iNOSmRNA、eNOSmRNA の発現レベルは各サンプルごとに GAPDHmRNA 発現量を 100 として相対的な発現レベルを示した。

2.2.9. 統計学的処理

得られたデータから平均、標準誤差を求め、一元配置分散分析を用いて統計学的に処理し、Scheffes' test を用いて有意差を求め、 $P < 0.05$ のとき有意差ありとした。

表 1. 各プライマー配列

遺伝子	配列 (5' to 3')	PCR 産物の塩基数
iNOS	TTCACGACACCCTTCACCACAA CCATCCTCCTGCCCACTTCCTC	912
eNOS	TCCCGAGCATCAAATACCT TGGGCAGCATCACCTACGA	373
GAPDH-1	TGAAGGTCGGTGTCAACGGATTTGHC CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC	950

表 2. 各プライマーの PCR 反応条件

遺伝子	変性反応	アーニリング	伸長反応	サイクル数
iNOS	94°C (1min)	62°C (1min)	72°C (1min)	30
eNOS	94°C (1min)	60°C (1min)	72°C (1min)	30
GAPDH-1	94°C (1min)	60°C (1min)	72°C (1min)	20

2.3. 結果

2.3.1. NO-Fe-DTCS の標準シグナル

はじめに、EPR 解析で得られたスペクトルが NO-Fe-DTCS のシグナルであることを確認した。NO ドナーである NOR-1 を用いて *in vitro* で作製した NO-Fe-DTCS の標準サンプルの EPR スペクトルを図 1.A に示した。この標準物質の EPR スペクトルでは Yoshimura ら (1996) および Takizawa ら (2002) と同様なベースラインに対して線対称の 3 本の超微細構造が認められ、このシグナルが NO-Fe-DTCS の EPR スペクトルであることが確認された。

図 1.B に示した妊娠 15 日の胎盤の EPR スペクトルでは、標準サンプルと同じ場所に 3 本の超微細構造が認められ、この胎盤由来の EPR スペクトルは NO-Fe-DTCS と同一であることが確認された。さらに、L-NAME を浸透圧ポンプにより 24 時間持続注入 ($65 \mu\text{g}/\text{min}$) 後の EPR スペクトルを図 1.C に示した。図 1.C では図 1.A と図 1.B で認められた NO-Fe-DTCS のシグナルであるベースラインに対して線対称の 3 本の超微細構造が消失し、Cu-DTCS のシグナル (Suzuki *et al.*, 1998) が認められた。

以上のことから図 1.B に示した妊娠 15 日ラットの胎盤の EPR 解析により検出された NO-Fe-DTCS のシグナルは胎盤の NOS 由来であることが確認された。

2.3.2. 胎盤における NO-Fe-DTCS シグナルの定量的解析

(1) 定量的解析方法

EPR における NO-Fe-DTCS の定量は、NO-Fe-DTCS シグナルの高さと Mn2 シグナルの高さの比を求めて行った。両者のシグナルを図 2 に示した。ここで、Mn2 のシグナルは、同時に測定している標準物質の酸化マンガン(MnO)で観察される 6 本のシグナルを、高磁場から順に並べた時の 2 番目のシグナルを示している。しかし、EPR 解析時に液体窒素の酸素含有量が増加すると、スペクトル全体が右下がりになりやすく、それにともない Mn2 シグナルの高さに対する NO-Fe-DTCS シグナルの高さが変わってくるため、ベースとなる Mn2 シグナルの高さと NO-Fe-DTCS シグナルの高さを比較した際に、若干の誤差が生じる。この誤差を補正するために、Mn2 と Mn4 のシグナルの中心を直線で結び、これをベースラインとし、NO-Fe-DTCS シグナルの 2 つの頂点からベースラインに対して垂直に直線を引き(x、y)、その 2 つの直線の長さの合計値(a)を NO-Fe-DTCS シグナルの高さとした。そして、補正した NO-Fe-DTCS シグナルの高さ(a)と Mn2 シグナルの高さ(b)との比(a/b)を最終的な NO の産生量とした(図 2)。

(2) 胎盤における NO 産生量

妊娠 13 日から 21 日における胎盤における NO 産生量を図 3 と表 3 に示した。胎盤における NO 産生は観察した妊娠 13 日から 21 日まで認められ、妊娠 15 日にピークを示した。

(3) NOS 阻害剤 L-NAME 注入時の NO 産生量

L-NAME 注入時の NO 産生量を図 4 と表 4 に示した。その L-NAME の注入によって NO 産生量は濃度依存的に有意に減少した。

2.3.3. 胎盤における iNOSmRNA と eNOSmRNA の発現量の解析

妊娠 13 日、15 日、17 日、19 日、21 日の胎盤における iNOSmRNA と eNOSmRNA の発現量を解析し、NO 産生に寄与する NOS アイソフォームを検討した。実験に際しては、PCR 産物が指数関数的に増幅しているサイクル数を予備実験で確認した。さらにそれぞれの PCR 反応液中加入した cDNA 量に比例して PCR 産物が増幅されていることも予備実験で確認した。結果は、図 5、表 5 および図 6 に示した。

胎盤における iNOSmRNA の発現は妊娠 13 日から認められ、妊娠 15 日にピークを示し、その後、妊娠 21 日まで徐々に減少した。一方、eNOSmRNA の発現は、妊娠 21 日で僅かに減少するものの妊娠 13 日から妊娠 21 日までほとんど変化せずほぼ一定であった。

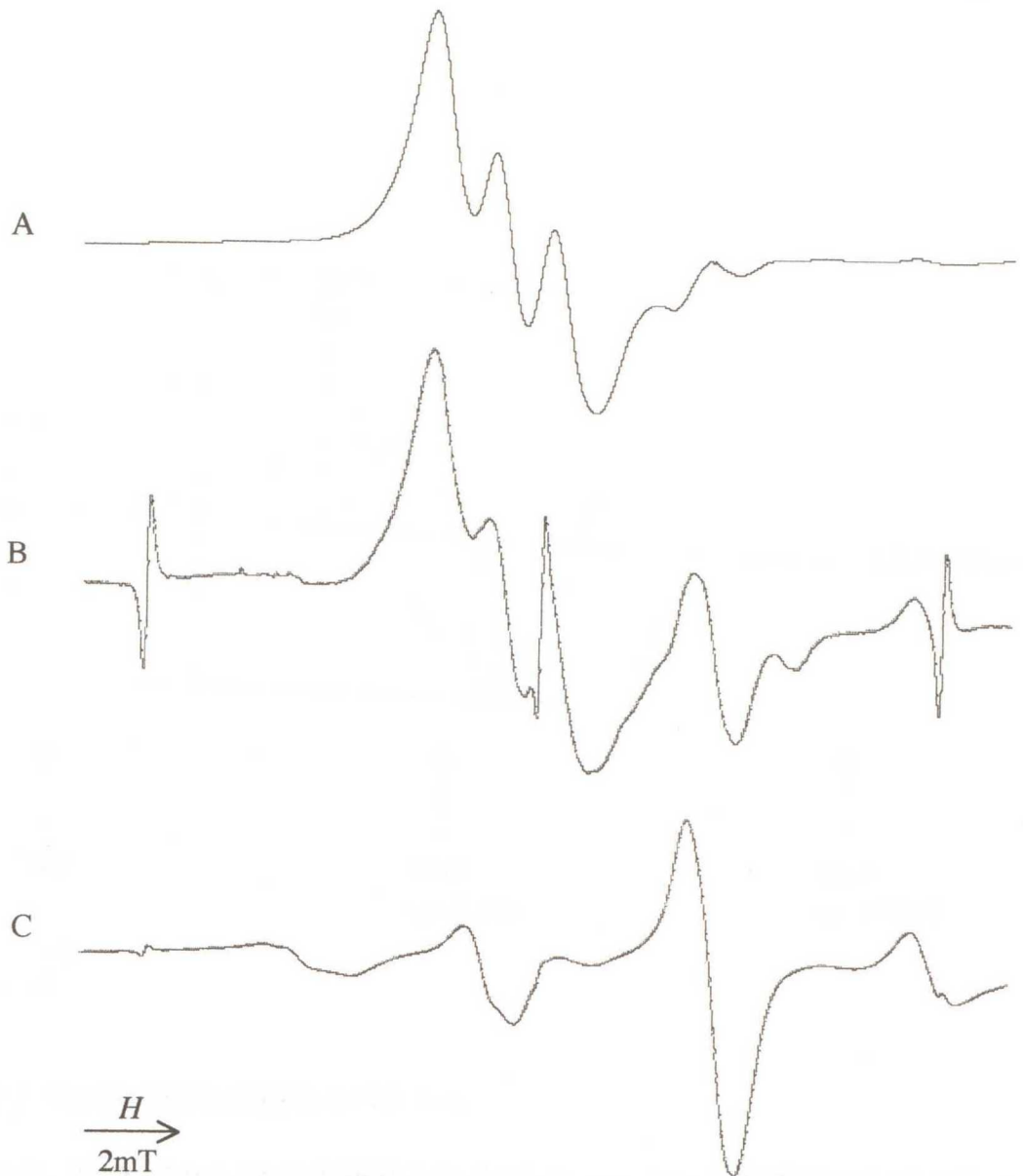


図1. EPRスペクトル

- A: NOR1とFe-DTCSを用いて作成したNO-Fe-DTCSの標準EPRスペクトル
 B: Fe-DTCS投与(500mg/kg)30分後の妊娠15日の無処置ラット胎盤のEPRスペクトル
 C: L-NAME(65 μ g/min)を24時間持続注入した後、Fe-DTCS投与(500mg/kg)30分後の妊娠15日のラット胎盤のEPRスペクトル

測定条件

Temperature 77.00K、Microwave Power 10.00mW、
 Modulation 100kHz 0.32mT、Center Field 320.0mT、
 Sweep Width 10.0mT、Sweep Time 4.0min、
 Time Constant 0.30sec

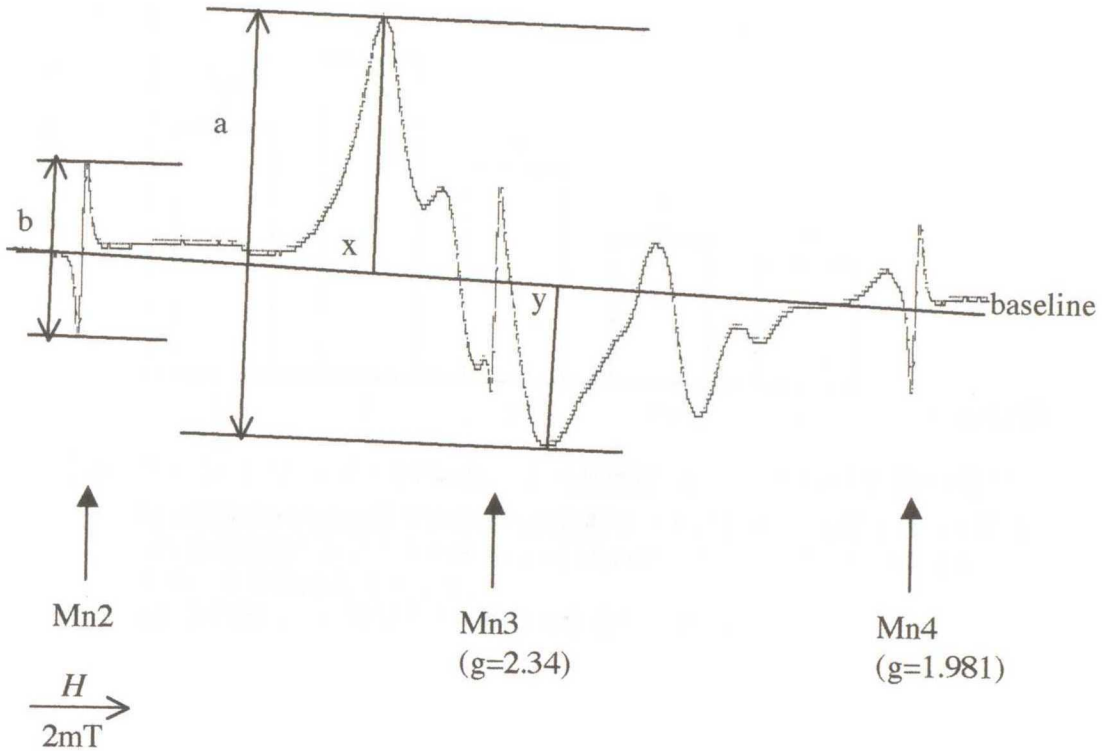


図2. NO-Fe-DTCSのEPRスペクトル

Mn2、Mn3、Mn4: MnOの観察される5本のシグナルを高磁場から順に並べたときの2、3、4番目のシグナルを示す。

a: NO-Fe-DTCS由来のシグナルの高さ

b: MnO由来のシグナルの高さ

x,y: NO-Fe-DTCS由来のシグナルの2つの頂点からベースラインに対してして垂直に引いた直線の長さ
(x+y):垂直に引いた直線の長さの合計(a=x+y)

測定条件

Temperature 77.00K、Microwave Power 10.00mW、
Modulation 100kHz 0.32mT、Center Field 320.0mT、
Sweep Width 10.0mT、Sweep Time 4.0min、
Time Constant 0.30sec

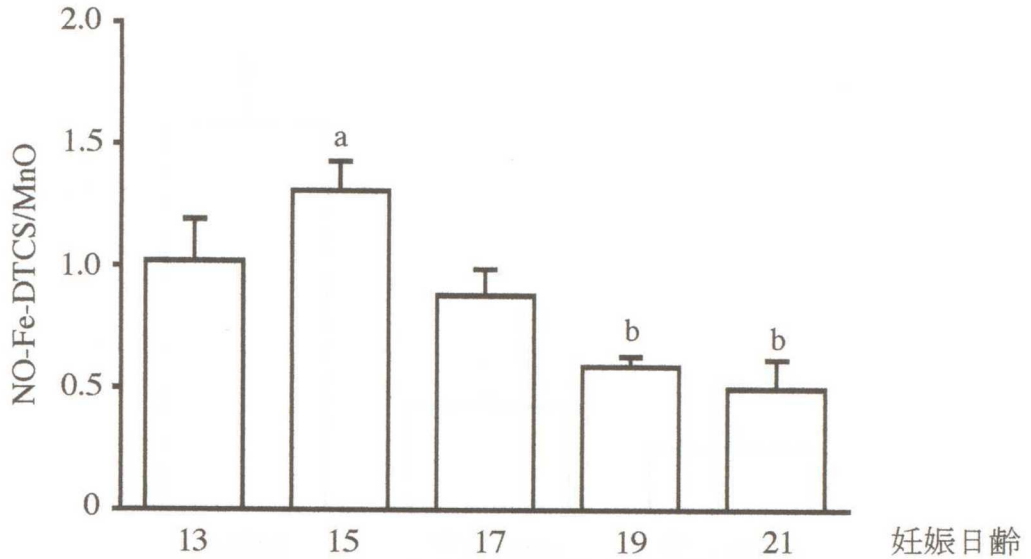


図3. スピントラップ・EPR法による胎盤におけるNO産生量の変化

Fe-DTCS(500mg/kg)投与30分後の無処置ラットにおけるNO産生量の平均は、NO-Fe-DTCSのシグナルの高さ(α)とMnOのシグナルの高さ(β)の比 α/β から求め、平均値 \pm S.E.で示した。

a,b; 各胎齢ごとに異なる文字間で有意差あり($P<0.05$)。

表3. スピントラップ・EPR法による胎盤におけるNO産生量の変化

妊娠日齢	13	15	17	19	21
平均	1.02	1.31 ^a	0.88	0.59 ^b	0.50 ^b
S.E.	0.17	0.12	0.11	0.04	0.12
例数	5	5	5	5	5

Fe-DTCS(500mg/kg)投与30分後の無処置ラットにおけるNO産生量の平均は、NO-Fe-DTCSのシグナルの高さ(α)とMnOのシグナルの高さ(β)の比 α/β から求め、平均値 \pm S.E.で示した。

a,b; 各胎齢ごとに異なる文字間で有意差あり($P<0.05$)。

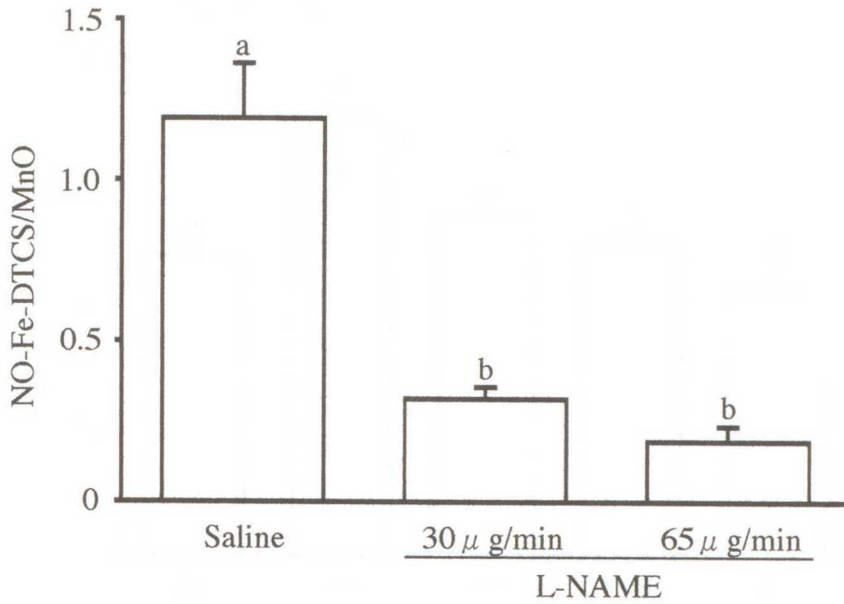


図4. NOS阻害剤L-NAMEを持続注入24hr後の胎盤におけるNO産生量の解析

NO産生量の値は、NO-Fe-DTCSのシグナルの高さ(α)とMnOのシグナルの高さ(β)の比 α/β から求め、平均値 \pm S.E.で示した。a,b; 異なる文字間で有意差あり($P<0.05$)。

表4. L-NAMEを持続注入後24hrの胎盤におけるNO産生量の解析

	Saline	L-NAME	
		30 μ g/min	65 μ g/min
平均	1.30 ^a	0.37 ^b	0.21 ^b
S.E.	0.11	0.06	0.05
例数	5	5	5

NO産生量の値は、NO-Fe-DTCSのシグナルの高さ(α)とMnOのシグナルの高さ(β)の比 α/β から求め、平均値 \pm S.E.で示した。a,b; 異なる文字間で有意差あり($P<0.05$)。

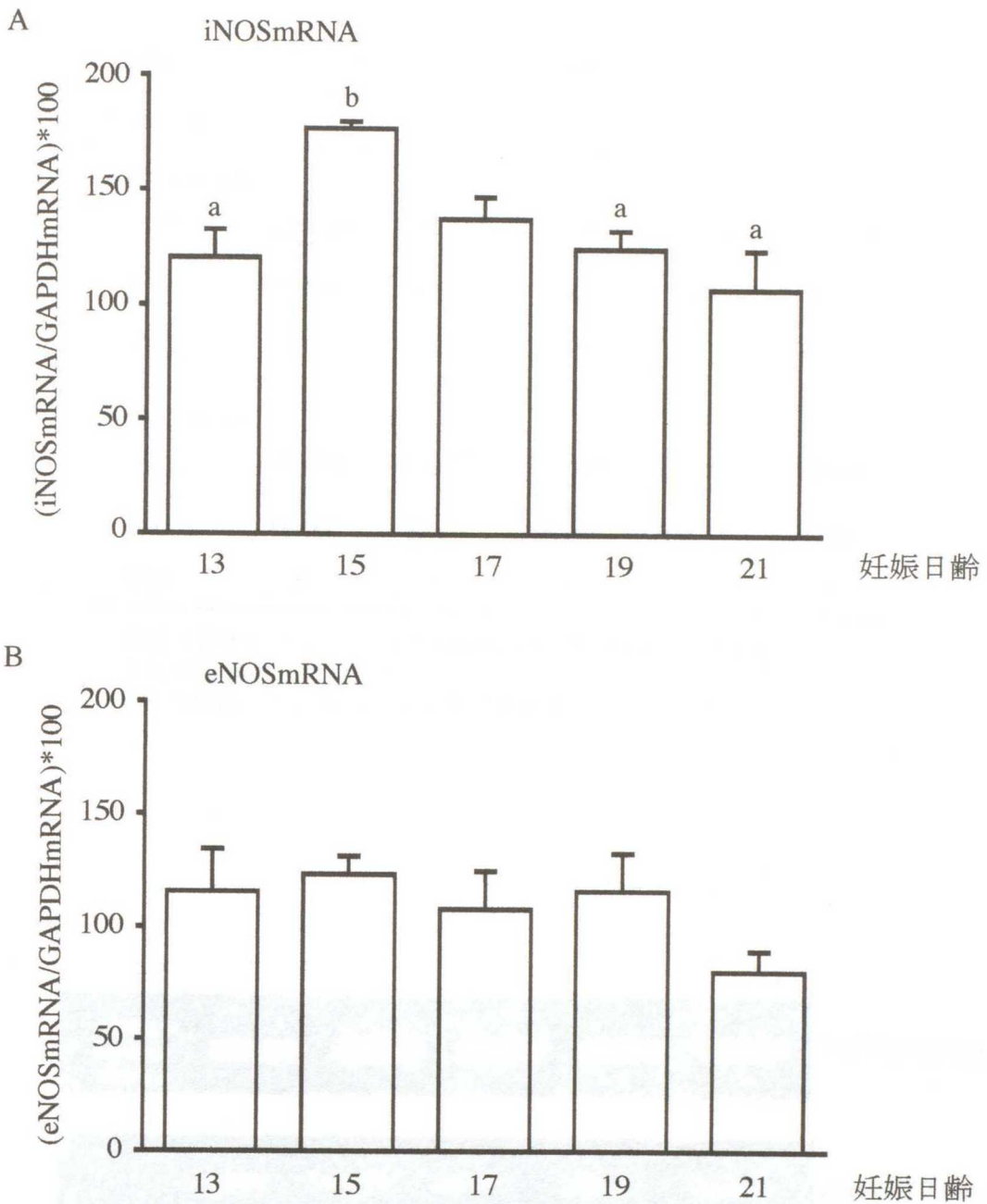


図5. 胎盤におけるRT-PCRによるiNOSmRNAとeNOSmRNAの発現量の変化

A: iNOSmRNAの発現量

B: eNOSmRNAの発現量

グラフは各サンプルごとの(NOSmRNA/GAPDHmRNA)*100を求め、平均値±S.E.で示した。

a,b; 各胎齢ごとに異なる文字間で有意差あり(P<0.05)。

表5. 胎盤におけるRT-PCRによるNOSmRNAの発現量の変化

妊娠日齢	13	15	17	19	21
iNOSmRNA					
平均	120.30 ^a	176.63 ^b	137.50	124.76 ^a	107.08 ^a
S.E.	12.19	3.21	9.52	7.94	16.99
例数	5	5	5	5	5
eNOSmRNA					
平均	115.36	123.17	107.94	116.01	80.13
S.E.	18.92	8.05	16.91	16.74	9.26
例数	5	5	5	5	5

数値は各サンプルごとの(NOSmRNA/GAPDHmRNA)*100を求め平均値±S.E.で示した。

a,b; 各胎齢ごとに異なる文字間で有意差あり(P<0.05)。

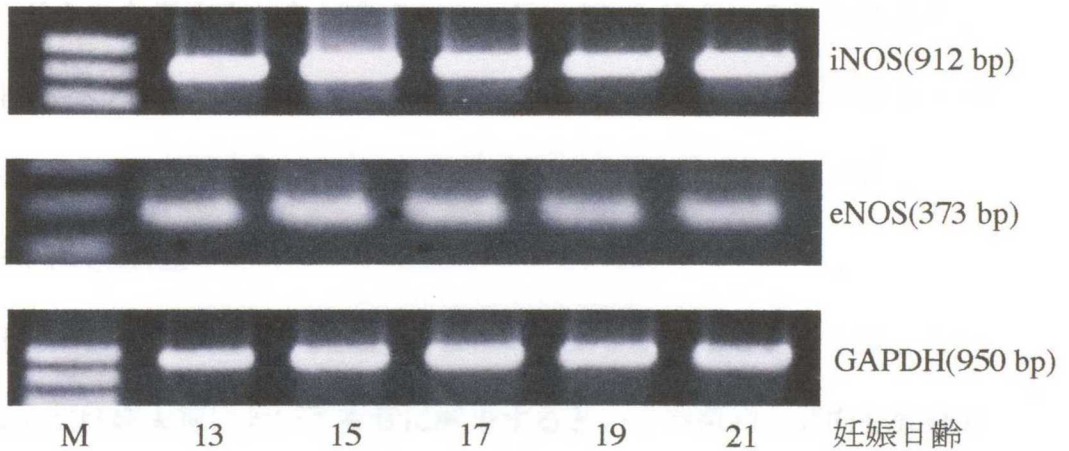


図6. 胎盤におけるRT-PCRによるiNOS、eNOS、GAPDH発現のPCR産物のアガロース電気泳動像
M:DNAサイズマーカー

2.4. 考察

免疫組織化学的手法や生化学的手法を用いて、胎盤における NOS の発現の程度や局在は報告されている (Myatt *et al.*, 1997; Morris *et al.*, 1993)。しかし、これらの報告で NO 産生量を論じることは間接的であり、問題点が多い。本章では Takizawa ら (2002) の報告に従い、妊娠 13 日から 21 日のラットを用いて、Fe-DTCS を NO トラップ試薬として用いたスピントラップ・EPR 法により胎盤における NO 産生を直接解析した。また、この NO 産生に寄与している NOS アイソフォームを調べるために半定量的 RT-PCR を用いて iNOSmRNA と eNOSmRNA の発現を検討した。

スピントラップ・EPR 法によりラット胎盤における NO 産生を観察すると妊娠 13 日から妊娠 21 日で NO 産生が証明された。本実験で観察された EPR による NO シグナルは吉村 (1996) や Takizawa ら (2002) の実験結果と一致していること、また、標準シグナルとの比較からも NO-FeDTCS 由来のシグナルと考えられた。さらに、L-NAME を注入することによりこの EPR スペクトルはほとんど消失したことから、この EPR スペクトルが胎盤由来の NO をトラップした NO-Fe-DTCS 由来のシグナルであることが明らかにされた。

本研究により NO 産生が妊娠 15 日にピークを示すこと、そして、この NO 産生が妊娠末期において有意に減少するという特徴的な傾向を直接的に明らかにした。胎盤における NOS の存在は今までに数多く報告されている (Myatt *et al.*, 1997; Morris *et al.*, 1993; Thanda *et al.*, 1996) が、妊娠期間を通して胎盤における NO 産生を定量的に解析した報告はなく、本実験

は妊娠期間を通してラット胎盤における NO 産生の変動を明らかにした最初の報告である。

さらに、この NO 産生に寄与する NOS アイソフォームの発現を調べた結果、妊娠 15 日の iNOSmRNA の発現は他に比べて有意に増加し、妊娠末期に減少するという NO 産生パターンと一致していた。一方、eNOSmRNA の発現は妊娠末期に若干減少するものの妊娠期間を通して有意な変化はなかった。

iNOS の発現は、サイトカインや他の因子により転写レベルで調節されていて iNOS からの NO 産生量が多い (Fostermann *et al.*, 1998)。また、iNOSmRNA の発現から、NO 産生までにはある程度の時間が必要である。Suzuki ら (1998) によれば LPS により iNOS を誘導されたラットでは血中の NO レベルは LPS 投与約 7 時間後にピークに達している。一方、eNOS は細胞内に構成酵素として存在し、化学的刺激や物理的刺激により細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇するとカルモジュリン依存的に速やかに活性化されるが eNOS からの NO 産生量は少ない (Fosterman, *et al.*, 1998)。また、1 モルの iNOS は 1 モルの eNOS に比べて 2000 倍以上の NO を産生する (吉村, 1996) ことも考慮すると、妊娠 15 日に観察された NO 産生のピークは主に iNOS 由来によるものと考えられる。

妊娠 15 日の胎盤における NO 産生が妊娠末期に比べて約 2.6 倍もあり、妊娠中期の NO 産生量が極めて高いことが示された。妊娠中期においてラット胎子と胎盤は著しく成長することは、胎盤における旺盛な血流量の増加を必要とする。ラット胎盤は迷路層と基底層により構成されており、双

方とも血管系が著しく豊富である (Bridgeman 1948; 1949)。胎盤の栄養膜細胞もしくは血管内皮細胞で産生された NO がオートクラインあるいはパラクライン的に胎盤の血管平滑筋を弛緩させている可能性が考えられる。また、妊娠を通じて胎盤における血栓形成の防止と母体の免疫抑制にも他の因子との相互作用により NO が関与していることは十分考えられるもののさらに検討が必要である。

2.5. 小括

妊娠 13 日から妊娠 21 日のラット胎盤における NO 産生量をスピントラップ・EPR 法を用いて解析した。胎盤における NO 産生は妊娠 13 日から認められ、15 日にピークを示し、その後 21 日まで漸減した。

胎盤における NOS 遺伝子発現を RT-PCR 法により解析すると、iNOSmRNA の発現は、妊娠 13 日から認められ、15 日にピークを示し、その後 21 日まで漸減した。この iNOSmRNA の発現はスピントラップ・EPR 法により解析した NO 産生量と相関があった。一方、eNOSmRNA の発現は妊娠 13 日から 19 日まで変動せずほぼ一定であり、その後 21 日に減少する傾向が認められた。以上のことから、妊娠 15 日にピークを示す胎盤における NO 産生は、主に iNOS によるものであると考えられた。

3. 胎盤における NO 産生におよぼすステロイドホルモンの影響

3.1. 序 論

ゲッ歯類では受精卵の着床前に卵巣性ステロイドホルモンであるプロジェステロンとエストロジェンの作用で子宮内膜の間質細胞が活性化されて脱落膜の形成が準備される。

プロジェステロンは主に卵巣の顆粒層細胞および黄体細胞で産生される。また、エストロジェンは卵巣の顆粒層細胞および胎盤の絨毛細胞で産生される。しかし、両者とも胎盤での産生量は動物種により大きく異なり、ラットの胎盤ではほとんど産生されず（高橋, 2003）、胎盤におけるプロジェステロンとエストロジェンは母体から供給されることになる。

妊娠時のプロジェステロンは妊娠黄体の活性化に伴い、妊娠 3 日から増加し、5 日に一度ピークに達し、7 日まで下降した後、15 日に再度増加し最大のピークを迎える。これが 19 日まで続き、その後速やかに減少し、分娩に至る（Sanyal, 1978）。一方、エストロジェンは妊娠 4 日に着床の引き金となるサージを示し、その後は低いレベルに維持されていて、妊娠 20 日から 21 日の妊娠末期にかけて急激な上昇を示す（Shaiki, 1971）。

このようにプロジェステロンとエストロジェンは着床、胎盤形成期そして妊娠の維持に重要な役割を果たしている。

ラット妊娠中期には血中プロジェステロン濃度が高くなり、妊娠 15 日にピークとなる。このピークは妊娠 15 日にピークを示した胎盤の NO 産生と iNOSmRNA の発現のピークとよく一致している。子宮における NO

産生がステロイドホルモンの影響を受けていることはグリース法において示されており、また、ラット子宮の妊娠 18 日において、抗プロジェステロン剤投与により iNOSmRNA の発現は減少し、抗エストロジェンプロジェステロン剤投与により iNOSmRNA の発現は増加している (Dong *et al.*, 1998)。

以上のことから本実験では、胎盤における iNOS 発現の調節機構を調べるため、まず、ステロイドホルモンに焦点をあて、NO 産生がピークとなる妊娠 15 日の胎盤の NOS 発現におよぼすステロイドホルモンの影響を検討するために、抗プロジェステロン剤である RU486 と抗エストロジェン剤である raloxifene を用いて検討した。

3.2. 材料と方法

3.2.1. 供試動物および飼育環境

2.2.1.に示したものと同様である。

3.2.2. 抗ステロイド剤の調製

抗プロジェステロン剤として RU486(Sigma-Aldrich, USA)を 1mg/mL になるように sesame oil に溶解した。また、胎盤において抗エストロジェン作用を持っている raloxifene(中外, 東京)を 1mg/mL になるように滅菌した生理食塩水に溶解した。

3.2.3. 実験デザイン —抗ステロイド剤の投与とサンプリング—

RU486 と raloxifene の投与量はいずれも 1mg/kg/day とし、RU486 は妊娠 12 日から 14 日に頸背部皮下に 3 日間連続投与し、raloxifene は妊娠 12 日から 14 日に 3 日間連続経口投与した。いずれも最終投与日の翌日、妊娠 15 日の 12 時に、胎盤を採取し、iNOSmRNA と eNOSmRNA の発現の解析に供した。サンプリング方法の詳細は 2.2.6 と同様である。

3.2.4. iNOSmRNA と eNOSmRNA の発現量の検討

3.2.8.と同様の方法で iNOSmRNA、eNOSmRNA 発現の解析を行った。プライマーの配列と PCR の反応条件は表 1 および表 2 に示した。

3.3. 統計学的処理

得られたデータから平均、標準誤差を求め、Student の t テストを用いて統計学的に処理し、有意差を求め、 $P < 0.05$ のとき有意差ありとした。

3.4. 結 果

抗プロジェステロン剤 RU486 または、抗エストロジェン剤 raloxifene 投与後の妊娠 15 日の胎盤における iNOSmRNA および eNOSmRNA をそれぞれ図 7、表 6、図 8、表 7、図 9、表 8、および図 10、表 9 に示した。

妊娠 12~14 日の 12 時に RU486 または raloxifene を 3 日連続投与しても、妊娠 15 日の胎盤における iNOSmRNA および eNOSmRNA の発現は対照群（溶媒投与）と比較して変化しなかった。

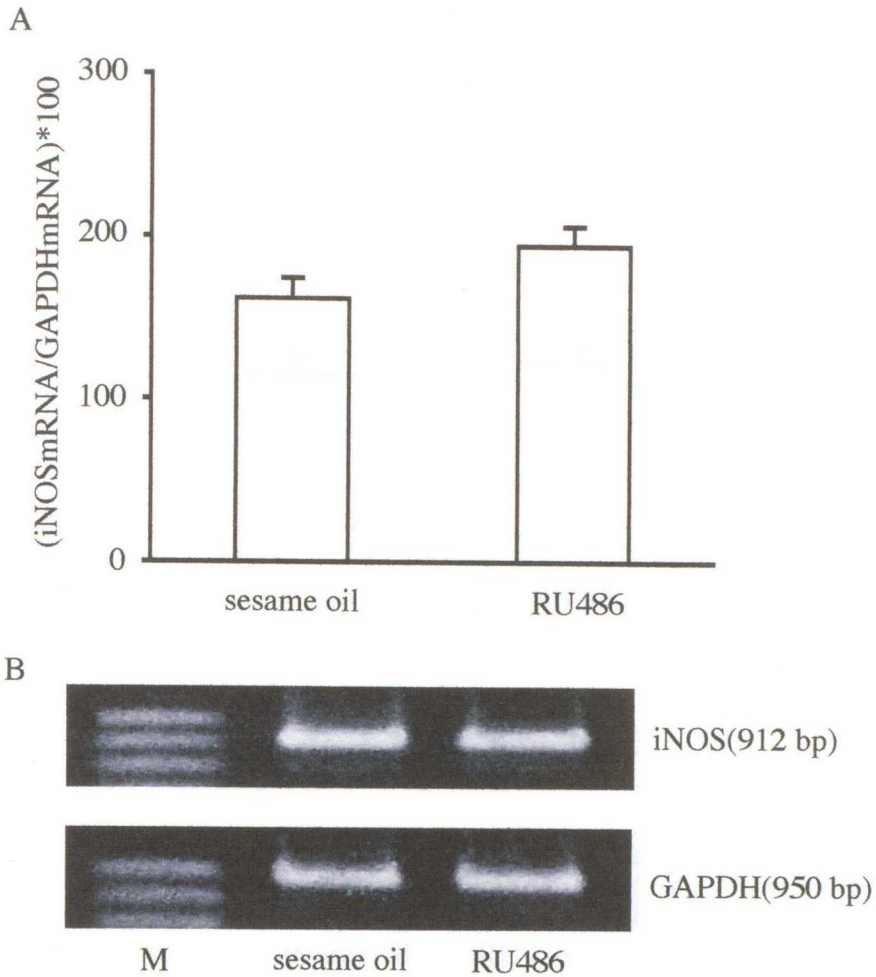


図7. 胎盤におけるRU486投与後のRT-PCRによるiNOSmRNAの発現量の変化

A: グラフは各サンプルごとの(iNOSmRNA/GAPDHmRNA)*100を求め、平均値±S.E.で示した。
 B: iNOSmRとGAPDH発現のPCR産物のアガロース電気泳動像
 M: DNAサイズマーカー

表6. 胎盤におけるRU486投与後のRT-PCRによるiNOSmRNAの発現量の変化

	sesame oil	RU486
平均	161.78	194.79
S.E.	12.35	12.07
例数	5	5

数値は各サンプルごとの(iNOSmRNA/GAPDHmRNA)*100を求め、平均値±S.E.で示した。

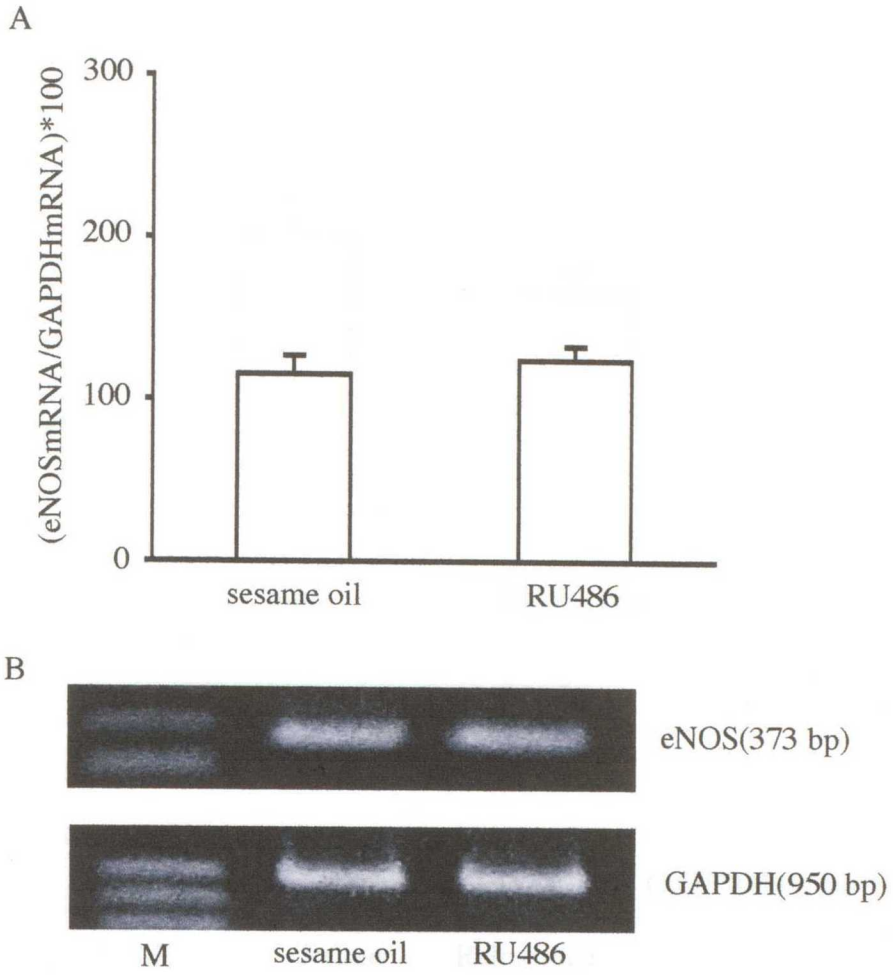


図8. 胎盤におけるRU486投与後のRT-PCRによる
eNOSmRNAの発現量の変化

A: グラフは各サンプルごとの(eNOSmRNA/GAPDHmRNA)*100
を求め、平均±S.E.で示した。

B: eNOSmRNAとGAPDH発現のPCR産物のアガロース電気泳動像
M:DNAサイズマーカー

表7. 胎盤におけるRU486投与後のRT-PCRによる
eNOSmRNAの発現量の変化

	sesame oil	RU486
平均	115.36	124.52
S.E.	11.38	8.62
例数	5	5

数値は各サンプルごとの(eNOSmRNA/GAPDHmRNA)*100
を求め、平均±S.E.で示した。

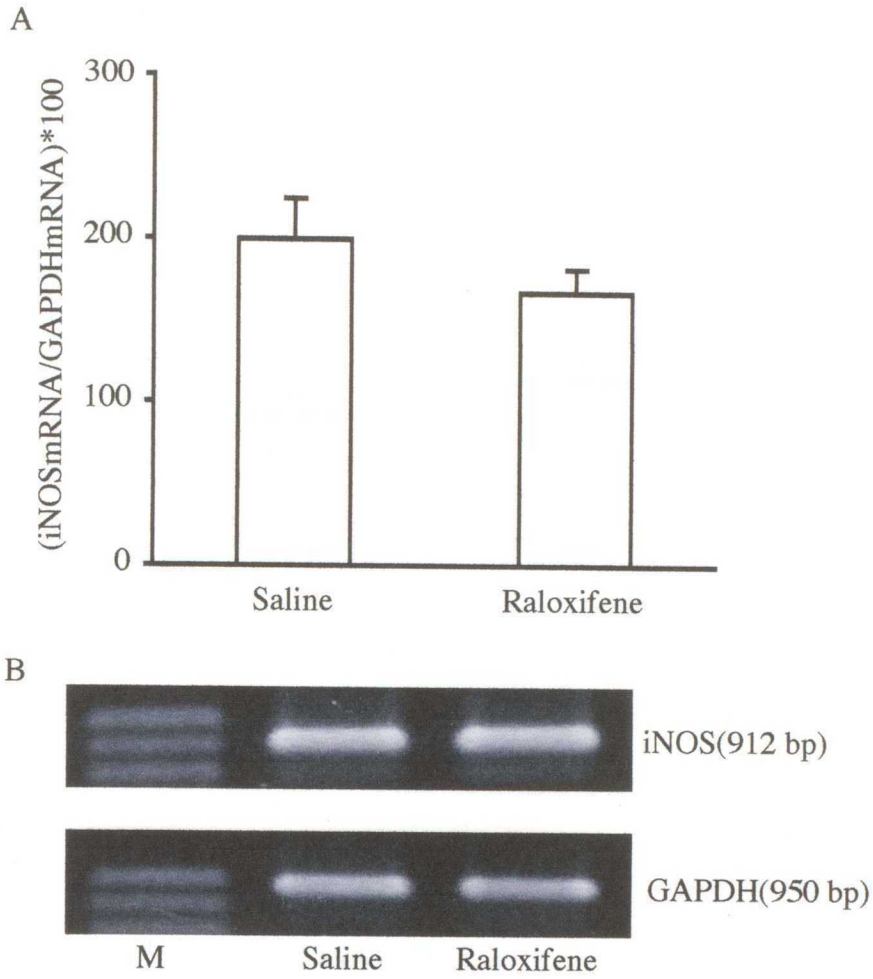


図9. 胎盤におけるRaloxifene投与後のRT-PCRによるiNOSmRNAの発現量の変化

A: グラフは各サンプルごとの(iNOSmRNA/GAPDHmRNA)*100を求め、平均値±S.E.で示した。

B: iNOSmRNAとGAPDH発現のPCR産物のアガロース電気泳動像
M:DNAサイズマーカー

表8. 胎盤におけるRaloxifene投与後のRT-PCRによるiNOSmRNAの発現量の変化

	Saline	Raloxifene
平均	199.69	167.04
S.E.	24.50	14.89
例数	5	5

数値は各サンプルごとの(iNOSmRNA/GAPDHmRNA)*100を求め、平均±S.E.で示した。

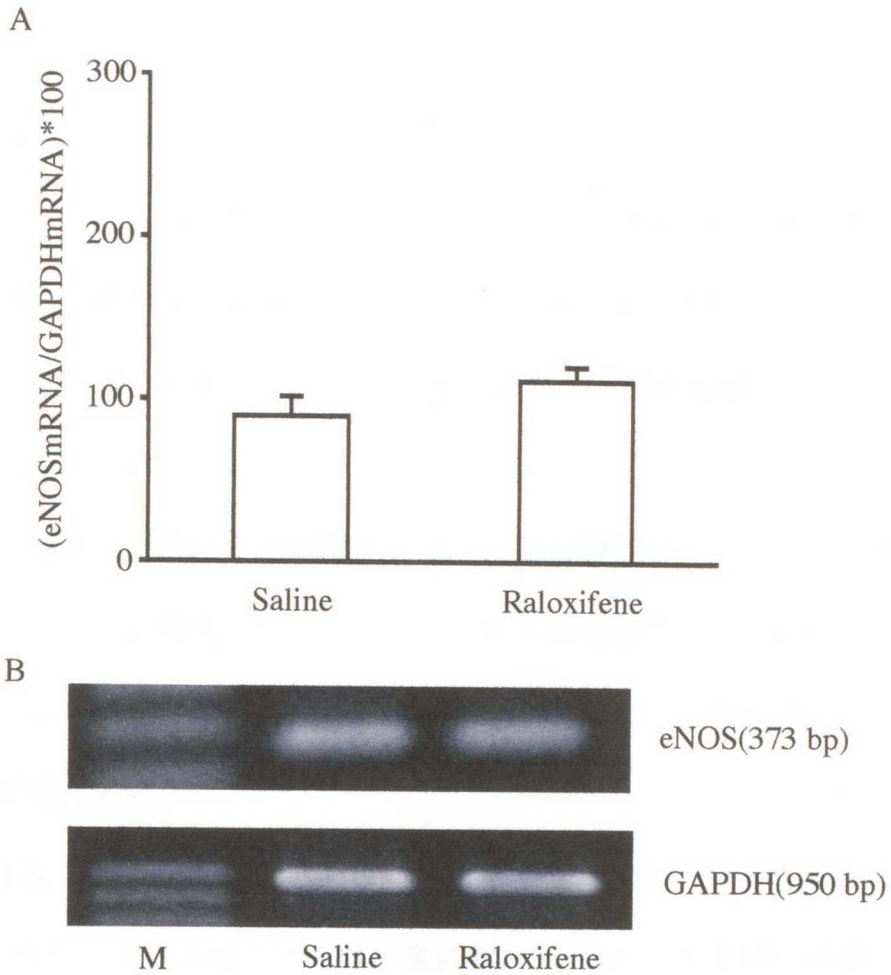


図10. 胎盤におけるRaloxifene投与後のRT-PCRによるeNOSmRNAの発現量の変化

A: グラフは各サンプルごとの(eNOSmRNA/GAPDHmRNA)*100を求め、平均値±S.E.で示した。
 B: eNOSmRNAとGAPDH発現のPCR産物のアガロース電気泳動像
 M:DNAサイズマーカー

表9. 胎盤におけるRaloxifene投与後のRT-PCRによるeNOSmRNAの発現量の変化

	Saline	Raloxifene
平均	89.67	111.69
S.E.	11.93	8.72
例数	5	5

数値は各サンプルごとの(eNOSmRNA/GAPDHmRNA)*100を求め、平均値±S.E.で示した。

3.5. 考察

妊娠ラットにおいて血中プロジェステロン値は妊娠 13 日から 17 日にピークに達し、その後、分娩時まで漸減する (Sanyal, 1978)。この血中プロジェステロン値は前章で述べた NO 産生量および iNOSmRNA 発現量のパターンと良く一致する。

ラット胎盤は迷路層と基底層からなり、基底層はステロイドホルモン合成の場であり、胎盤性プロジェステロンを生成分泌する。しかし、この胎盤性プロジェステロンは卵巣プロジェステロンに比べて産生量は非常に少ない (高橋, 2003)。

プロジェステロンは子宮における NO 産生を調節している (Ogando *et al.*, 2003)。また、エストロジェンは子宮において iNOS の発現を阻害している (Yallampalli *et al.*, 1994) という報告があり、生殖器官においてはステロイドホルモンが NO の産生に非常に深く関与している。

胎盤と密接な関係にある脱落膜における NO 産生と iNOSmRNA の発現は妊娠 17 日にピークを示し、本実験と同様な方法で抗プロジェステロン剤 RU486 を投与することにより iNOSmRNA の発現は有意に減少する (森, 2006)。また RU486 10mg/rat を投与後の子宮体部における iNOSmRNA の発現は有意に減少し、(Dong *et al.*, 1998) 抗エストロジェン剤 Raloxifene を投与すると同様に iNOSmRNA の発現は有意に減少する (森, 2006)。以上のことから、ラット脱落膜における iNOS を介する NO 産生にはプロジェステロンとエストロジェンが深く関与していることが示されている。

脱落膜と密接に関与しているにもかかわらず、胎盤における NO 産生と

iNOSmRNA の発現ピークにあたる妊娠 15 日において抗プロジェステロン剤 RU486 と抗エストロジェン剤 Raloxifene により、森 (2006) と同様に処置しても iNOSmRNA と eNOSmRNA の発現に変化は見られなかった。

これらことから、胎盤におけるこの時期の NOS アイソフォームの発現はステロイドホルモンの影響を受けていない可能性が示唆された。ラット胎盤では他の動物種に比べてプロジェステロンとエストロジェンの産生が非常に少ない (高橋, 2003) ため、直接的に NO 産生の調節にプロジェステロンとエストロジェンが関与していないことが想像される。そして、ラット胎盤において妊娠 15 日にピークを示す NO 産生にはプロジェステロンやエストロジェンのステロイドホルモン以外に他の因子が関与していることが示唆されるが、さらに検討は必要である。

3.6. 小 括

NOS 発現の調節機構を検討する一環として、NOSmRNA の発現におよぼすステロイドホルモンの影響について検討した。抗プロジェステロン剤 (RU486) または抗エストロジェン剤 (raloxifene) を妊娠 12~14 日にそれぞれ 1mg/kg/day、3 日間連続投与し、妊娠 15 日の胎盤における NOSmRNA 発現を RT-PCR により解析した。RU486 と raloxifene はどちらも妊娠 15 日の胎盤における iNOSmRNA および eNOSmRNA 発現には影響を与えなかった。

以上のことから、妊娠 15 日にピークを示す胎盤における NO 産生に寄与する iNOS の発現についてはプロジェステロンおよびエストロジェンは関与していない可能性が示唆され、他の因子が関与しているものと考えられた。

4. ラット胎盤における NO 産生と低酸素誘導因子 (HIF-1 α) との関係

4.1. 序 論

前章までに記したように、ラット胎盤における NO 産生をスピントラップ剤 (Fe-DTCS) を用いて電子常磁性共鳴吸収 (EPR) 装置により解析すると、妊娠 15 日に NO 産生量はピークを示した。RT-PCR 解析によりこの時期の NO 産生は主に iNOS により転写レベルで調節されているものと考えられた。

前章において妊娠 15 日にピークを示す胎盤における NO 産生に寄与する iNOS の発現については、抗プロジェステロン剤 RU486 および抗エストロジェン raloxifene はどちらも妊娠 15 日の胎盤における iNOSmRNA および eNOSmRNA 発現には影響を及ぼさなかったことから、プロジェステロンおよびエストロジェンはこの時期の NOS 発現には関与せず、他の因子の関与が考えられた。

ラットの妊娠中期において胎子と胎盤は急激に成長する。そして、この時期胎盤は一時的に低酸素状態に陥る可能性がある。そのため、低酸素誘導因子 (HIF-1) が NO 産生を制御している可能性がある。

低酸素誘導因子 (Hypoxia-inducible factor-1: HIF-1) は、誘導型の HIF-1 α と構成型の HIF-1 β からなるヘテロ 2 量体の転写因子であり、エリスロポエチン遺伝子のプロモーター領域に結合し、低酸素下でエリスロポエチン遺伝子の転写を促進する転写調節因子として初めて報告された (Semenza, 1994)。その後、他の様々な遺伝子の発現調節にこの HIF-1 が関与してい

ることが報告された (Semenza, 2001)。HIF-1 の DNA への結合性は 1%の酸素濃度で認められ、20%の酸素濃度では認められない (Wang *et al.*, 1993; 1995)。

iNOS 遺伝子のプロモーター領域には低酸素応答配列 (Hypoxia Response Element: HRE) が存在し、血管の緊張性を調整する際に、iNOS タンパクの発現を促進し、NO 産生を誘導することが報告されている (Melillo *et al.*, 1995)。事実、ウシ肺動脈内皮細胞を用いた実験では低酸素で HIF-1 α mRNA の発現が増加し、また、iNOS のプロモーター活性も増加したことから、HIF-1 を介して iNOS mRNA の発現が上方制御されている (Palmer, *et al.*, 1998)。

HIF-1 のサブユニットである HIF-1 α と HIF-1 β の mRNA はともに正常な酸素濃度のときにも発現が認められ、HIF-1 β タンパクは恒常的に発現していることが知られているが、一方、HIF-1 α タンパクは低酸素状態の時には検出されるが、正常な酸素圧へと変化させるとユビキチン-プロテアソーム系により速やかに分解され消失する (Suffer *et al.*, 2000; Hung *et al.*, 1998; Kullio *et al.*, 1999; Salced and Cavo 1997)。ユビキチン・プロテアソーム系では、まず分解するべきタンパク質にユビキチンという小さな標識が数珠状に結合し、このユビキチン鎖が目印となって、プロテアソームという分解酵素複合体により選択的に分解される。このため、正常な酸素圧における HIF-1 α タンパクの生物学的半減期は 5 分以下と報告されている (Yu *et al.*, 1998; Jowell *et al.*, 2001)。

HIF-1 α タンパクに関する研究はヒト培養細胞 (Huang *et al.*, 1996) やマ

ウスを用いた実験 (Stroka *et al.*, 2001) においては HIF-1 α タンパクは低酸素状態の時に検出され、その後、正常な酸素濃度へと変化させると消失することが報告されている。

これらのことから、本章では、まず、妊娠 13 日から 21 日までの胎盤における HIF-1 α mRNA の発現と HIF-1 α タンパクの発現を解析した。次に、胎盤における NOS 発現が HIF-1 により誘導されているのであれば、NO 産生を抑制した時に iNOS の発現が上方制御をされ、HIF-1 α mRNA、HIF-1 α タンパクおよび iNOSmRNA の発現に変動が生じると仮説して、NOS 阻害剤 L-NAME の持続注入による NO 産生抑制モデルラットを作製して NO と HIF-1 α の関係を解析した。

4.2. 材料と方法

4.2.1. 供試動物および飼育環境

2.2.1.に示したものと同様である。

4.2.2. L-NAME 投与液の調製と浸透圧ポンプの作製

3.2.4.に示したものと同様であるが、L-NAME の注入速度は 65 μ g/min とした。

4.2.3. NO 産生抑制モデルラットの作製とサンプリング

妊娠 15 日の 12 時をサンプリング時刻と決め、サンプリングの 6、12、24 時間前に浸透圧ポンプをラット頸背部皮下に埋め込んだ。また、NO 産生の抑制を解除、すなわち L-NAME を充填した浸透圧ポンプを取り出した 24 および 48 時間後にもサンプリングを行った。対照群として 24 時間生理食塩水持続注入群を用いた。なお、L-NAME の注入量は予備実験の結果に基づいて決定した。

サンプリングおよび NO 産生量の解析は 2.2.6.と同様である。

4.2.4. 遺伝子発現量の検討

2.2.8.と同様の方法で検討した。

プライマーの配列と PCR の反応条件は表 10 および表 11 に示した。なお、HIF-1 α の PCR 産物の塩基数は少ないため、ハウスキーピング遺伝子の GAPDH も PCR 産物の塩基数は少ないプライマーを作製し、GAPDH-2

として本実験に使用した。また、PCR 産物の塩基数の多いプライマーは GAPDH-1 とした。

4.2.5. ウェスタンブロット解析

Zhang ら (1996) の方法に準じて約 0.5g の胎盤を採取してサンプルチューブに入れて速やかに液体窒素で凍結し、-80°C に保存した。陽性対照として Powell ら (2002) による方法で作出した虚血再還流モデルのラット精巣から抽出した HIF-1 α タンパクを用いた。

1) タンパク抽出

1 mL のタンパク抽出緩衝液 (10mM HEPES pH 7.9, 10mM KCl, 0.1mM EDTA, 0.1 mM EGATA, 1 mM dithiothreitol(DTT), 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 0.1% (vol/vol) leupeptin) を胎盤の入ったサンプルチューブに入れてホモジナイザーでホモジナイズした。ついで、20 μ L の 10% Nonidet P-40 (NP40)を加えて 15 分間氷上に放置した。さらにホモジナイズし、遠心分離後 (1000x g , 5 min) 上層を捨てた。下層部に 0.5% NP40 加タンパク抽出緩衝液 1mL を加えて上層部が透明になるまで 3~5 回洗浄した (1000x g , 5 min)。タンパク懸濁液 (20 mM HEPES(pH 7.9), 400mM NaCl, 1.0 mM EDTA, 1.0 mM EGATA, 1.0mM DTT, 1.0 mM PMSF, 10% glycerol and 0.1% (vol/vol) leupeptin.) 200 μ L を加えた後、さらに、4 M KCl を 20 μ L 加えて 30 分間氷上に放置した。その後、遠心分離 (5 min at 12000x g at 4°C) し、上層を得て-80°C に保存した。

2) タンパク濃度測定

タンパク濃度はBCAプロテインアッセイキット (PIRCE, Rockford, IL) を用いてウシ血清アルブミンを標準物質として測定した。アプライに用いたサンプルは5 μ g/10 μ Lになるように調整した。

3) ポリアクリルアミド電気泳動および転写

7%ポリアクリルアミドゲルを作製し、電気泳動装置 (マリソル, 東京) に装着し、サンプルをアプライし、同時に分子量マーカー (第一化学薬品, 東京) を電気泳動した。電気泳動終了後、転写装置 (アトー, 東京) を用いてゲル中のタンパクを immunu-blot PVDF (BIO-RAD, Richmond, CA, USA) に転写した。

4) 一次抗体反応、二次抗体反応およびバンドの可視化

メンブレンをスキムミルク (和光純薬, 大阪) でブロッキングして洗浄後、抗 HIF-1 α 抗体 (Novus Biologicals, Littleton, CO) を一次抗体として用いた。洗浄後、HRP 抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA) を二次抗体として用いた。ジアミノベンジチン試薬キット (ナカライテスク, 京都) を用いて可視化した。

5) ウェスタンブロットの定量的解析

可視化したバンドをイメージアナライザー装置 (FLA-2000, 島津, 京都) により取込み、画像処理ソフト MacBass (富士フイルム, v2.5, 東京)

を用いて数値化した。HIF-1 α タンパクの発現は本実験と同様に抽出した妊娠 13 日から 21 日の無処置ラット胎盤から得られたタンパクをプールタンパクとして、これを 100 として相対的発現レベルを示した。

4.2.7. 統計学的処理

得られたデータから平均、標準誤差を求め、一元位置分散分析を用いて統計学的に処理し、Scheffes' test を用いて有意差を求め、 $P < 0.05$ のとき有意差ありとした。

表 10. 各プライマー配列

遺伝子	配列(5' to 3')	PCR 産物の塩基数
iNOS	TTCACGACACCCTTCACCACAA CCATCCTCCTGCCCACTTCCTC	912
HIF-1 α	TGCTTGGTGCTGATTTGTGA GGTCAGATGATCAGAGTCCA	209
GAPDH-1	TGAAGGTCGGTGTCAACGGATTTGHC CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC	950
GAPDH-2	CACCACCCTGTTGCTGTA TATGATGACATCAAGAAGGTGG	219

表 11. 各プライマーの PCR 反応条件

遺伝子	変性反応	アーニリング	伸長反応	サイクル数
iNOS	94°C (1min)	62°C (1min)	72°C (1min)	30
HIF-1 α	94°C (1min)	60°C (1min)	68°C (2min)	26
GAPDH-1	94°C (1min)	60°C (1min)	72°C (1min)	20
GAPDH-2	94°C (1min)	60°C (1min)	72°C (1min)	20

4.3. 結果

4.3.1. 胎盤における HIF-1 α mRNA と HIF-1 α タンパクの発現

HIF-1 α mRNA と HIF-1 α タンパクの結果を図 11、表 12 および図 12、表 13 に示した。HIF-1 α mRNA と HIF-1 α タンパクの発現は妊娠 13 日から 21 日まで認められ、HIF-1 α mRNA の発現は、有意差はないものの妊娠 15 日にゆるやかなピークを示し、NO 産生と iNOSmRNA の発現と同様のパターンを示した。

4.3.2. L-NAME 持続注入モデルの NO 産生量、HIF-1 α タンパク、

HIF-1 α mRNA および iNOSmRNA の発現量

L-NAME 持続注入モデルにおける NO 産生量、HIF-1 α タンパク、iNOSmRNA および HIF-1 α mRNA の結果を図 13、表 14、図 14、表 15、図 15、表 16 および図 16、表 17 に示した。L-NAME を持続注入することにより、妊娠 15 日の NO 産生量を減少させると、NO 産生量の減少する時期と一致して HIF-1 α タンパクは減少し、その後、L-NAME の注入を停止した 24 時間後には完全に回復した。また、HIF-1 α mRNA および iNOSmRNA の発現は L-NAME 注入後から NO 産生が抑制されているときに持続的に増加した。

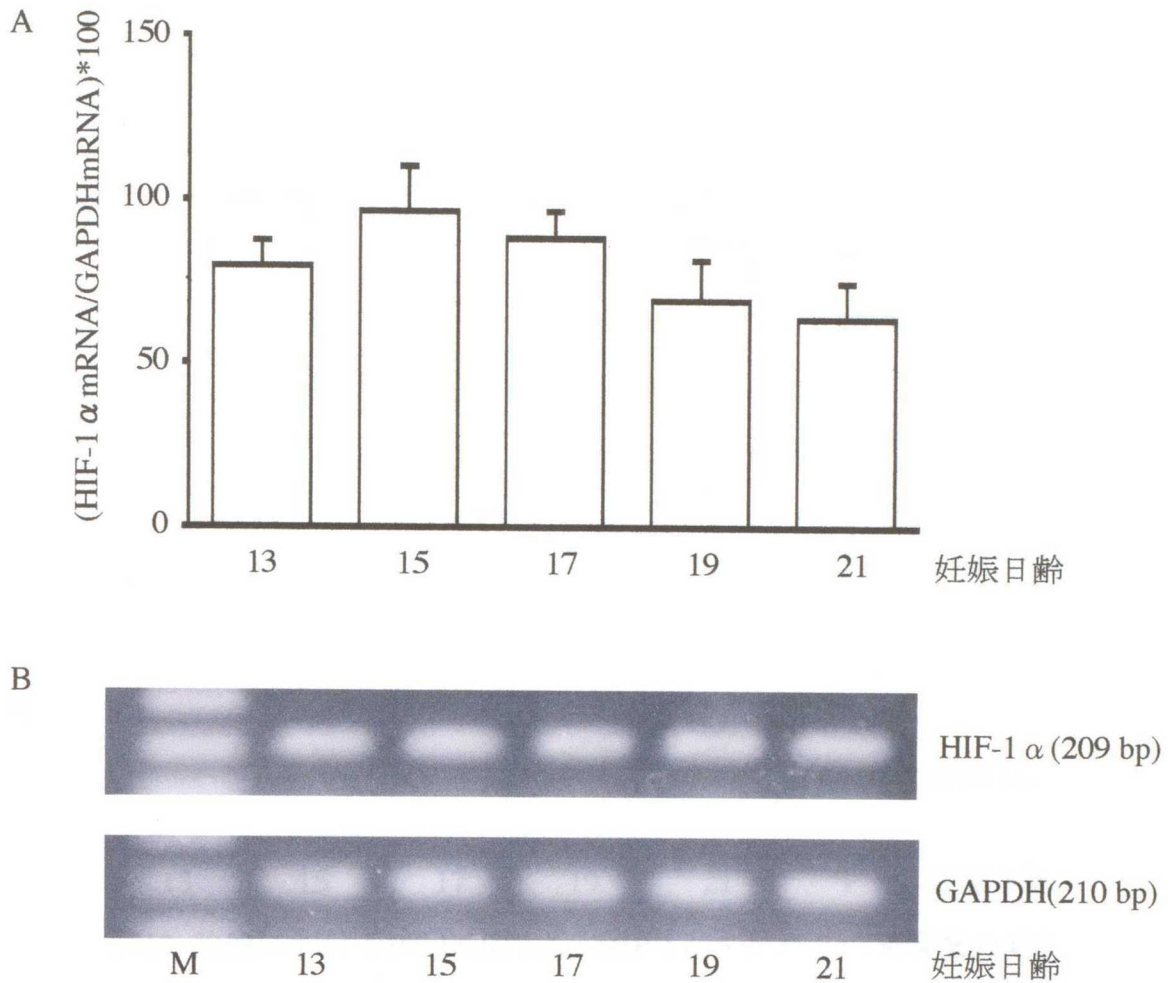


図11. 胎盤におけるRT-PCRによるHIF-1 α mRNAの発現量の変化

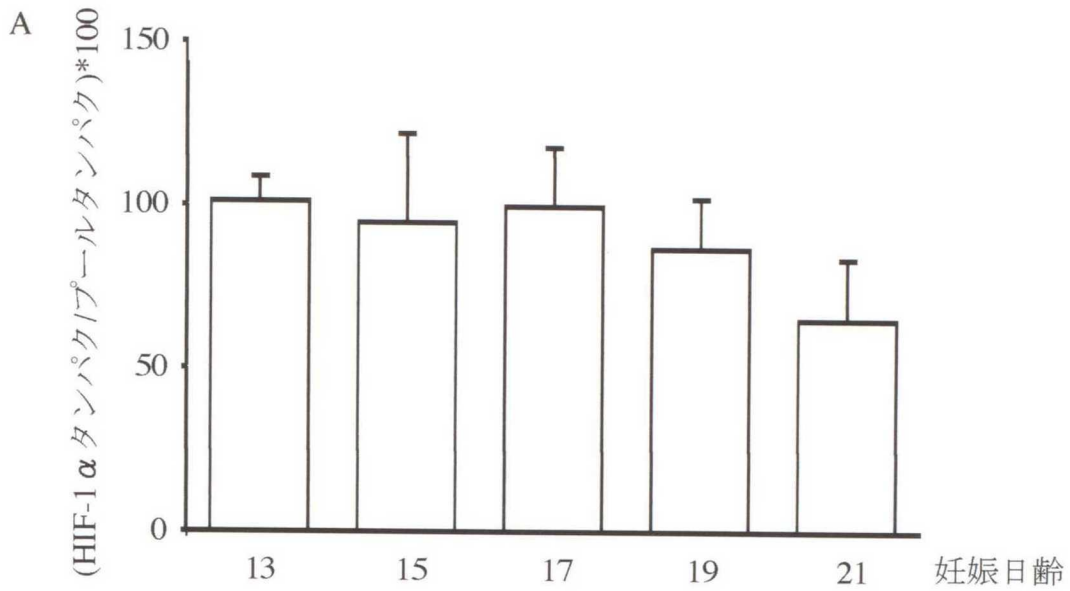
A: グラフは各サンプルごとの(HIF-1 α mRNA / GAPDH mRNA) * 100を求め、平均値 \pm S.E.で示した。

B: HIF-1 α とGAPDH発現のPCR産物のアガロース電気泳動像
M: DNAサイズマーカー

表12. 胎盤におけるRT-PCRによるHIF-1 α mRNAの発現の変化

妊娠日齢	13	15	17	19	21
平均	79.70	96.61	88.26	69.31	63.92
S.E.	7.72	13.71	8.08	12.21	10.95
例数	5	5	5	5	5

数値は各サンプルごとの(HIF-1 α mRNA / GAPDH mRNA) * 100を求め、平均値 \pm S.E.で示した。



B



図12. 胎盤におけるRT-PCRによるHIF-1 α タンパクの発現量の変化

A: グラフは各サンプルごとの(HIF-1 α タンパク/プールのタンパク)*100を求め、平均値 \pm S.E.で示した。

B: HIF-1 α タンパクのウエスタンブロット
P:陽性対照

表13. 胎盤におけるウエスタンブロットによるHIF-1タンパクの発現量の変化

妊娠日齢	13	15	17	19	21
平均	101.06	94.58	99.67	86.72	64.98
S.E.	7.61	27.28	18.34	15.25	18.79
例数	5	5	5	5	5

数値は各サンプルごとの(HIF-1 α タンパク/プールのタンパク)*100を求め、平均値 \pm S.E.で示した。

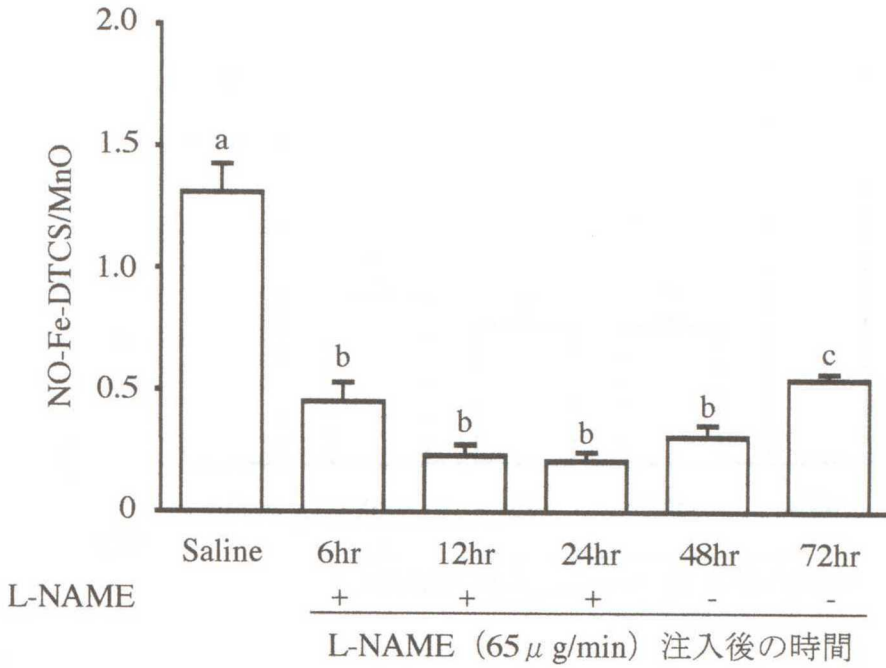


図13. 妊娠15日の胎盤におけるL-NAME注入後のNO産生量の変化

NO産生量の値は、NO-Fe-DTCSのシグナルの高さ(α)とMnOのシグナルの高さ(β)の比 α/β を求め、平均値+S.E.で示した。

a,b,c; 異なる文字間で有意差あり(P<0.05)。

L-NAME(-)はL-NAME24時間注入後、L-NAMEの除去を示す。

表14. 妊娠15日の胎盤におけるL-NAME注入後のNO産生量の変化

	L-NAME (65 μ g/min) 注入後の時間					
	Saline	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr
平均	1.31 ^a	0.45 ^b	0.23 ^b	0.21 ^b	0.31 ^b	0.68 ^c
S.E.	0.12	0.08	0.05	0.04	0.05	0.01
例数	5	5	5	5	5	5
L-NAME		+	+	+	-	-

NO産生量の値は、NO-Fe-DTCSのシグナルの高さ(α)とMnOのシグナルの高さ(β)の比 α/β を求め、平均値+S.E.で示した。

a,b,c; 異なる文字間で有意差あり(P<0.05)。

L-NAME(-)はL-NAME24時間注入後、L-NAMEの除去を示す。

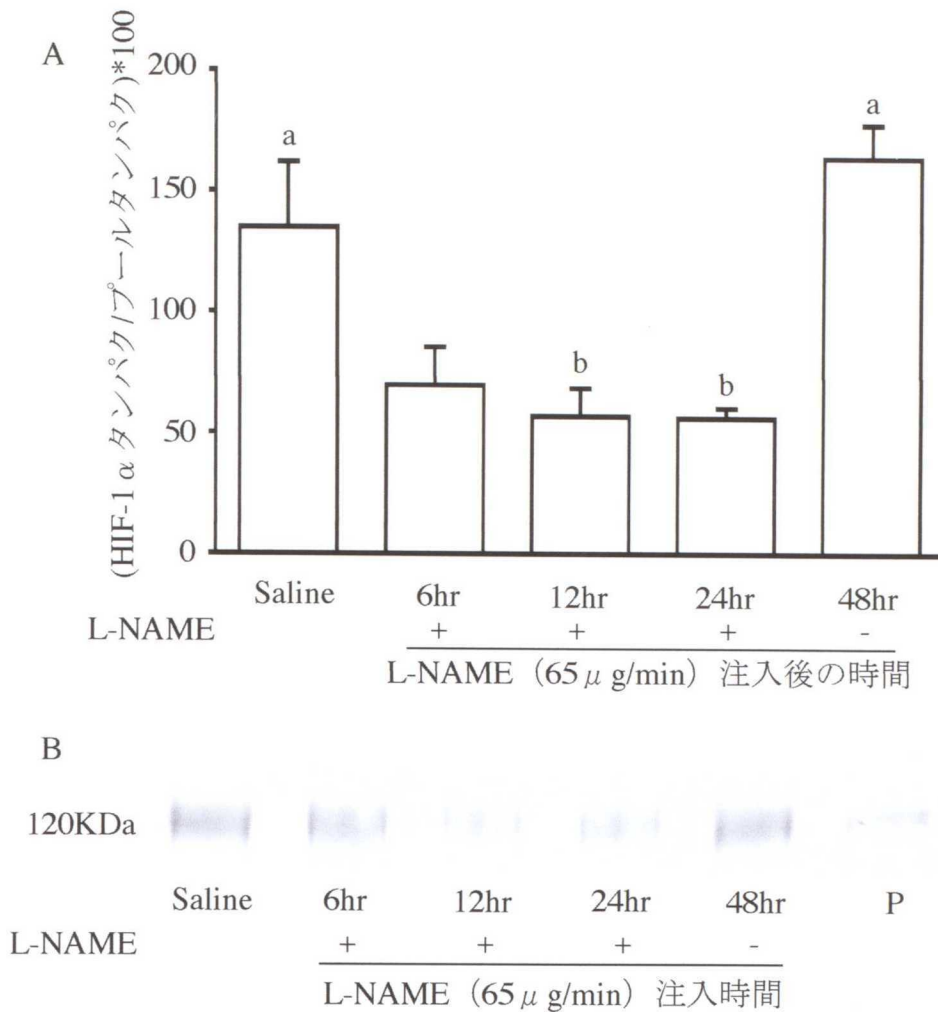


図14. 妊娠15日の胎盤におけるL-NAME注入後のHIF-1 α タンパク発現量の変化

- A: グラフは各サンプルごとの(HIF-1タンパク/プールタンパク)*100を求め、
 平均値+S.E.で示した。a,b;異なる文字間で有意差あり(P<0.05)。
 L-NAME(-)はL-NAME24時間注入後、L-NAMEの除去を示す。
- B: HIF-1 α タンパクのウエスタンブロット
 P:陽性対照、L-NAME(-)はL-NAME24時間注入後、L-NAMEの除去を示す。

表15. 妊娠15日の胎盤におけるL-NAME注入後のHIF-1 α タンパク発現量の変化

	L-NAME (65 μ g/min) 注入後の時間				
	Saline	6hr	12hr	24hr	48hr
平均	111.73 ^a	69.65	57.07 ^b	56.30 ^b	163.86 ^a
S.E.	24.96	15.63	11.27	3.91	13.82
例数	5	5	5	5	5
L-NAME	-	+	+	+	-

数値は各サンプルごとの(HIF-1タンパク/プールタンパク)*100を求め、
 平均値+S.E.で示した。a,b;異なる文字間で有意差あり(P<0.05)。
 L-NAME(-)はL-NAME24時間注入後、L-NAMEの除去を示す。

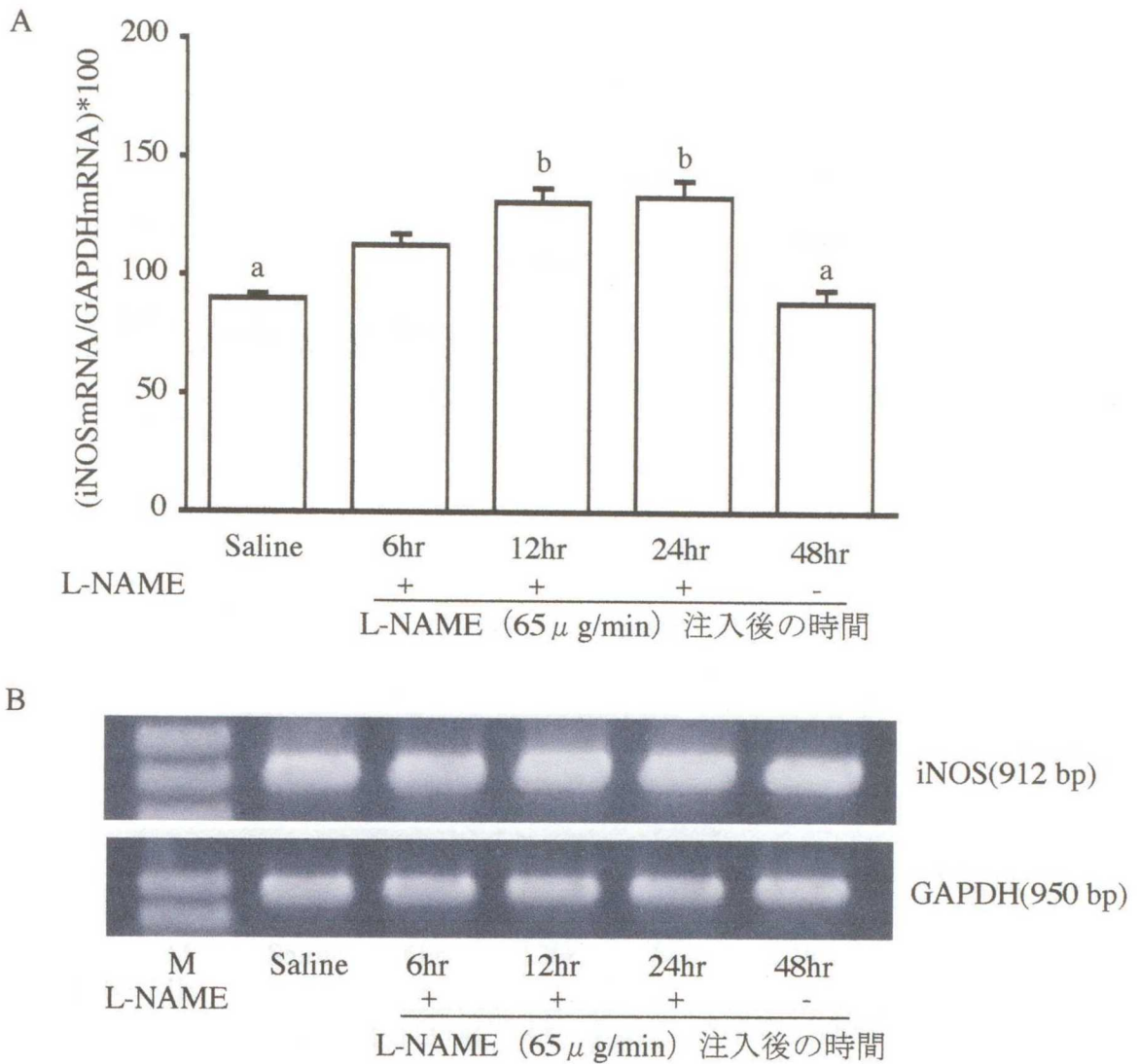


図15.妊娠15日の胎盤におけるL-NAME注入後のiNOSmRN発現量の変化

- A: グラフは各サンプルごとの(iNOSmRNA/GAPDHmRNA)*100を求め、
 平均値 \pm S.E.で示した。a,b;異なる文字間で有意差あり(P<0.05)。
 L-NAME(-)はL-NAME24時間注入後、L-NAMEの除去を示す。
- B: iNOS,GAPDH発現のPCR産物のアガロース電気泳動像
 M:DNAサイズマーカー
 L-NAME(-)はL-NAME24時間注入後、L-NAMEの除去を示す

表16.妊娠15日の胎盤におけるL-NAME注入後のiNOSmRN発現量の変化

	Saline	L-NAME (65 μ g/min) 注入後の時間			
		6hr	12hr	24hr	48hr
平均	180.29 ^a	224.54	261.62 ^b	267.00 ^b	177.62 ^a
S.E.	4.01	9.82	12.68	13.51	11.11
例数	5	5	5	5	5
L-NAME		+	+	+	-

数値は各サンプルごとの(iNOSmRNA/GAPDHmRNA)*100を求め、
 平均値 \pm S.E.で示した。a,b;異なる文字間で有意差あり(P<0.05)。
 L-NAME(-)はL-NAME24時間注入後、L-NAMEの除去を示す。

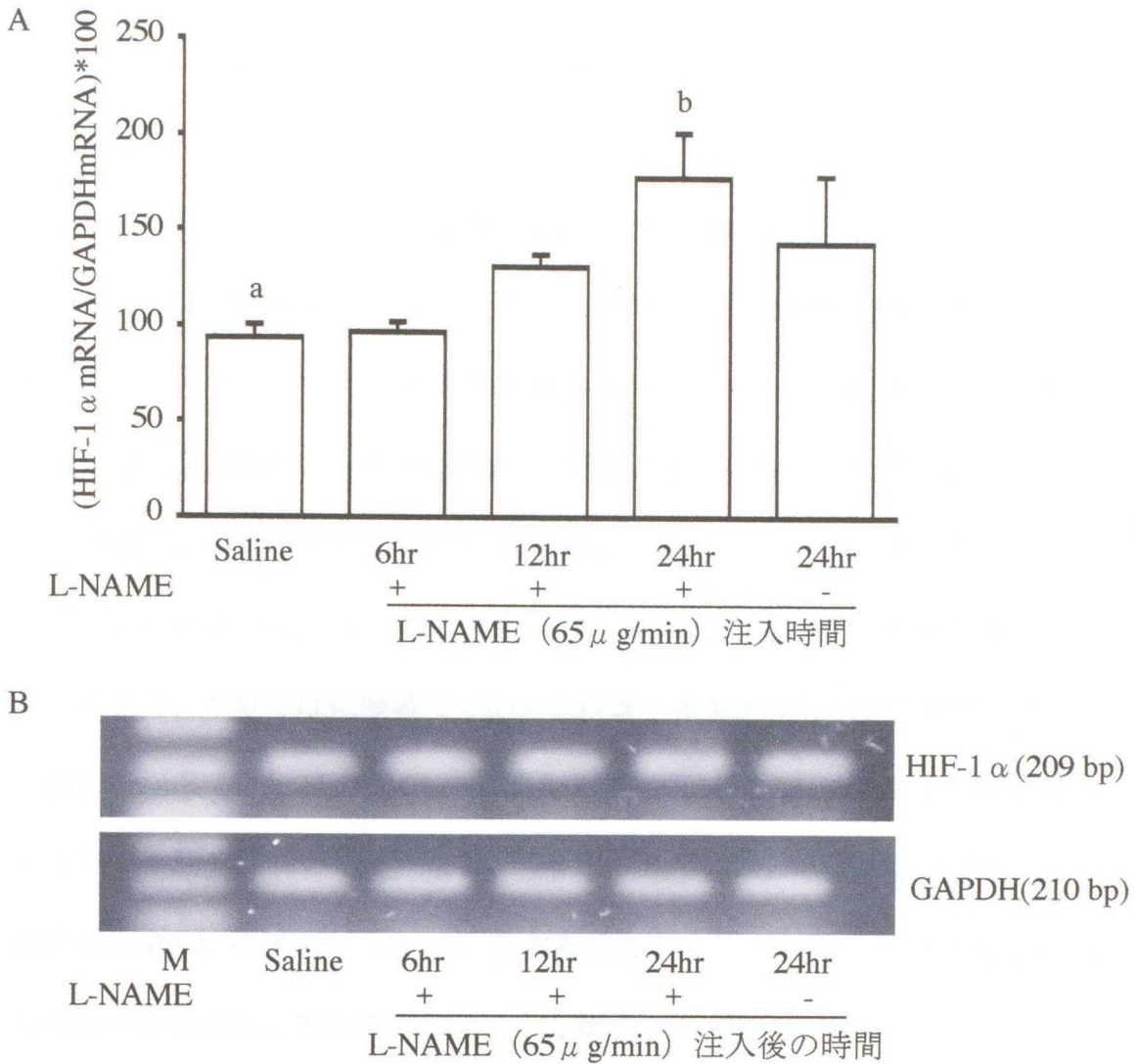


図16.妊娠15日の胎盤におけるのL-NAME注入後HIF1 α mRNA 発現量 の変化

- A: グラフは各サンプルごとの(HIF-1 α mRNA/(GAPDHmRNA)*100を求め、
 平均値 \pm S.E.で示した。a,b;異なる文字間で有意差あり(P<0.05)。
 L-NAME(-)はL-NAME24時間注入後、L-NAMEの除去を示す。
- B: HIF1 α とGAPDH発現のPCR産物のアガロース電気泳動像
 M:DNAサイズマーカー
 L-NAME(-)はL-NAME24時間注入後、L-NAMEの除去を示す。

表17.妊娠15日の胎盤におけるのL-NAME注入後HIF1 α mRNA 発現量 の変化

	Saline	L-NAME (65 μ g/min) 注入後の時間			
		6hr	12hr	24hr	24hr
平均	93.21 ^a	96.66	130.81	177.63 ^b	143.33
S.E.	7.35	5.08	6.60	23.06	34.95
例数	5	5	5	5	5
L-NAME		+	+	+	-

数値は各サンプルごとの(HIF-1 α mRNA/(GAPDHmRNA)*100を求め、
 平均値 \pm S.E.で示した。 a,b;異なる文字間で有意差あり(P<0.05)。
 L-NAME(-)はL-NAME24時間注入後、L-NAMEの除去を示す。

4.4. 考察

前章までに記したように、胎盤における NO 産生は妊娠 15 日にピークを示し、主に iNOS に由来すると考えられた。この iNOS 発現を誘導する因子としてステロイドホルモンの影響を検討したところ、抗ステロイド剤により iNOSmRNA と eNOSmRNA の発現は変化しなかったことから、ラット胎盤においては妊娠 15 日の NO 産生にはプロジェステロンやエストロジェンの影響は受けず、他の因子により調節されていることが示唆された。そこで、本章では低酸素で iNOS を誘導する HIF-1 について検討した。

HIF-1 α mRNA と HIF-1 α タンパクは観察した妊娠 13 日から 21 日を通してラット胎盤において検出され、恒常的に発現していることが示された。HIF-1 α mRNA の発現パターンに有意差はないものの妊娠 15 日にゆるやかなピークを示し、NO 産生パターンと類似していた。

次に、NOS 阻害剤 L-NAME を注入することにより作製した NO 産生抑制モデルを用いてラット胎盤における NO 産生と HIF-1 α の関係を検討した。L-NAME 注入により NO 産生を抑制すると、HIF-1 α タンパクは NO 産生量の減少と同様に急激に減少し、L-NAME を充填した浸透圧ポンプをラット体内から除去して NO 産生の抑制を解除すると、HIF-1 α タンパクは急増し正常値に回復し、この時 NO 産生も回復傾向にあった。このことは NO 産生と HIF-1 α タンパクの発現に直接的な関係があることを示唆している。

NO 産生が抑制されると、NO 産生を促進するために HIF-1 α が HIF-1 β と結合して二量体を形成し HIF-1 として iNOS 遺伝子のプロモーター領域

の HRE に結合することにより、通常のタンパク抽出法により抽出される細胞質内の HIF-1 α が消費されたと推測される。また、NO 産生が抑制されている時期に HIF-1 α mRNA および iNOS mRNA の発現量が持続的に増加した。HIF-1 α mRNA の発現の増加は HIF-1 α タンパクが減少した結果ホメオスタシスを維持するために起こったものと考えられる。また、iNOS mRNA の発現量の増加は HIF-1 による iNOS の転写促進が起こったためと示唆される。以上のことから、ラット胎盤における NO 産生がピークを示す妊娠 15 日においては、HIF-1 による iNOS 産生調節を介して NO 産生量が制御されている可能性が示唆された。

マウス胎盤における低酸素状態は妊娠 11 日頃までとされている (Mitchell *et al.*, 1968)。しかし、Das ら (1998) によるとラット栄養膜細胞株を用いた報告によると、18%の酸素分圧でも HIF-1 の標的遺伝子である GLUT-1 の発現を誘導していることから、Wang ら (1993) が報告する極端な低酸素状態でなくても HIF-1 を介した誘導が起こることが考えられる。

4.5. 小括

ラットの胎盤において HIF-1 α mRNA と HIF-1 α タンパクは恒常的に発現していた。さらに、NO 産生がピークを示す妊娠 15 日に L-NAME を用いて NO の産生を抑制すると、HIF-1 α タンパクが減少し、NO 産生の抑制を解除すると HIF-1 α タンパクは急増した。また、NO 産生が抑制されている時期には HIF-1 α mRNA および iNOS mRNA の発現量が持続的に増加していた。以上のことから、NO 産生がピークを示す妊娠 15 日には HIF-1 が iNOS を介して NO 産生量を制御している可能性が示唆された。

5. ラット胎盤における NO 産生と TNF- α との関係

5.1. 序 論

4 章に記したように、妊娠 15 日にピークを示す NO 産生は主に低酸素状態下で iNOS 遺伝子を転写誘導する HIF-1 による可能性が示された。しかし、iNOS 遺伝子を転写誘導する因子は他にも報告されている。例えば、リポ多糖体 (Lipopolysaccharide: LPS) をラットに投与すると、約 7 時間後に NO 産生はピークを迎える (Suzuki *et al.*, 1998)。また、TNF- α 、IL-1 β や IFN- γ も NO 産生を転写レベルで調節していることが知られている (Nothan, 1992)。事実、iNOS 遺伝子のプロモーター領域には転写因子 NF- κ B 結合領域があることが報告されている (Xie *et al.*, 1993)。

NO は生体内で様々な生理反応を示す物質であり (Moncada *et al.*, 1993)、血管平滑筋弛緩作用を初めとして神経情報伝達、感染防御、免疫反応の制御などに関与している (Moncada *et al.*, 1991)。iNOS 発現は炎症反応や細菌、真菌、ウイルスなどの病原菌によって誘導される。LPS や炎症性サイトカイン類によって活性化されたマクロファージからの iNOS が NO を産生して病原菌の破壊に関与している。また、エンドトキシンショック時には IL-1 β や TNF- α が循環不全の原因として深く関与し (Thiemerman *et al.*, 1993)、iNOS より産生された NO がショックの原因となっている。

TNF- α は発見当初、抗腫瘍作用が期待されたが、現在は炎症や免疫に関わる因子として注目されている。TNF- α と TNF- β は共に糖タンパクであり、同一の受容体を介し生物活性は類似している。また、アミノ酸の相

同姓から TNF ファミリーと呼ばれている。TNF- α は他の炎症性サイトカイン、IL-1 β や IFN- γ と同様、NF- κ B を活性化し炎症および免疫に関わる遺伝子の発現に関わっている (Moncada *et al.*, 1991)。さらに、TNF- α は主に活性化されたマクロファージから産生される。血管内皮細胞、平滑筋細胞、クッパー細胞、グリア細胞においても産生される (Robbins *et al.*, 1987; Chung *et al.*, 1990; Keshav *et al.*, 1990; Barath *et al.*, 1990)。また、胎盤の栄養膜細胞に TNF- α mRNA の局在が報告されている (Yelavarthi *et al.*, 1991)。

TNF- α をノックアウトするとマクロファージ貪食能や NO 産生の低下が認められている (Mario *et al.*, 1997)。また、卵巣顆粒膜細胞由来の細胞は培養条件下で炎症性サイトカイン TNF- α 、IL-1 β 、INF- γ の添加により iNOS 遺伝子の発現が誘導された (Matsumi *et al.*, 1998)。さらに、ウシ子宮内膜間質細胞において TNF- α が NO 産生を誘導し、この NO が PGE2 や PGF2 α の産生を刺激することが報告されている (Woclawek-Potocka *et al.*, 2004)。

以上のことから、ラット胎盤における NO 産生に関わる TNF- α の関与を 3 章と同様に NO 産生抑制モデルラットを用いて、NO 産生抑制時の TNF- α mRNA の変動を観察することにより NO と TNF- α の相互作用を検討した。

5.2. 材料と方法

5.2.1. 供試動物および飼育環境

2.2.1.に示したものと同様である。

5.2.2. NO 産生抑制モデルラットの作製とサンプリング

妊娠 15 日におけるモデルラットの作製は 4.2.3.と同様である。

妊娠 21 日については 12 時をサンプリング時刻と決め、サンプリングの 6、12、24 時間前に浸透圧ポンプをラット頸背部皮下に埋め込んだ。対照群として生理食塩水を 24 時間持続注入した。しかし、NO 産生の検討は対照群と L-NAME 注入 24 時間群のみとした。

NO 産生量の解析方法は 2.2.と同様である。

5.2.3. 遺伝子発現量の検討

2.2.8.と同様の方法により L-NAME を持続注入後の TNF- α mRNA の発現を検討した。

プライマーの配列と PCR の反応条件は表 5.1 および表 5.2 に示した。

5.2.4. ウェスタンブロット解析

4.2.5.と同様の方法により解析した。

5.2.5. 統計学的処理

得られたデータから平均、標準誤差を求め、一元位置分散分析を用いて

統計学的に処理し、Scheffes' test を用いて有意差を求め、 $P < 0.05$ のとき有意差ありとした。

表 18. 各プライマー配列

遺伝子	配列(5' to 3')	PCR 産物の塩基数
iNOS	TTCACGACACCCTTCACCACAA CCATCCTCCTGCCCACTTCCTC	912
HIF-1 α	TGCTTGGTGCTGATTTGTGA GGTCAGATGATCAGAGTCCA	209
TNF- α	TGGCCCAGACCCTCACACTC GATTTGCCATTTTCATACCAGGAG	715
GAPDH-1	TGAAGGTCGGTGTCAACGGATTTGHC CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC	950
GAPDH-2	CACCACCCTGTTGCTGTA TATGATGACATCAAGAAGGTGG	219

表 19. 各プライマーの PCR 反応条件

遺伝子	変性反応	アーニリング	伸長反応	サイクル数
iNOS	94°C (1min)	62°C (1min)	72°C (1min)	30
HIF-1 α	94°C (1min)	60°C (1min)	68°C (2min)	26
TNF- α	94°C (1min)	59°C (1min)	72°C (1min)	32
GAPDH-1	94°C (1min)	60°C (1min)	72°C (1min)	20
GAPDH-2	94°C (1min)	60°C (1min)	72°C (1min)	20

6.3. 結果

6.3.1. 胎盤における TNF- α mRNA の発現量

妊娠 13 日から 21 日の TNF- α mRNA の発現を図 17 および表 20 に示した。TNF- α mRNA の発現は観察した妊娠 13 日から 21 日を通して認められ、有意差はないが妊娠 21 日に減少傾向を示した。

6.3.2. 妊娠 15 日における L-NAME 持続注入モデルの TNF- α mRNA の発現量

妊娠 15 日において L-NAME 注入による TNF- α mRNA の発現を図 18、表 21 に示した。妊娠 15 日においては L-NAME 注入により NO 産生を減少させても、TNF- α mRNA の発現に変化は認められなかった。

6.3.3. 妊娠 21 日における NO 産生量、TNF- α mRNA、iNOSmRNA、HIF-1 α mRNA および HIF-1 α タンパクの発現量

妊娠 21 日において L-NAME 注入による NO 産生、TNF- α mRNA、iNOSmRNA、HIF-1 α mRNA および HIF-1 α タンパクの発現を図 19、表 22、図 20、表 23、図 21、表 24、図 22、表 25 および図 23、表 26、に示した。妊娠 21 日においては、L-NAME 注入後 NO 産生が減少すると、TNF- α mRNA の発現は L-NAME 注入 6 時間後および 12 時間後で対照群に比べて約 5 倍に増加した。iNOSmRNA の発現は L-NAME 注入後 6 時間後に増加し、12 時間後まで持続した。しかし、HIF-1 α mRNA と HIF-1 α タンパクの発現に変化は認められなかった。

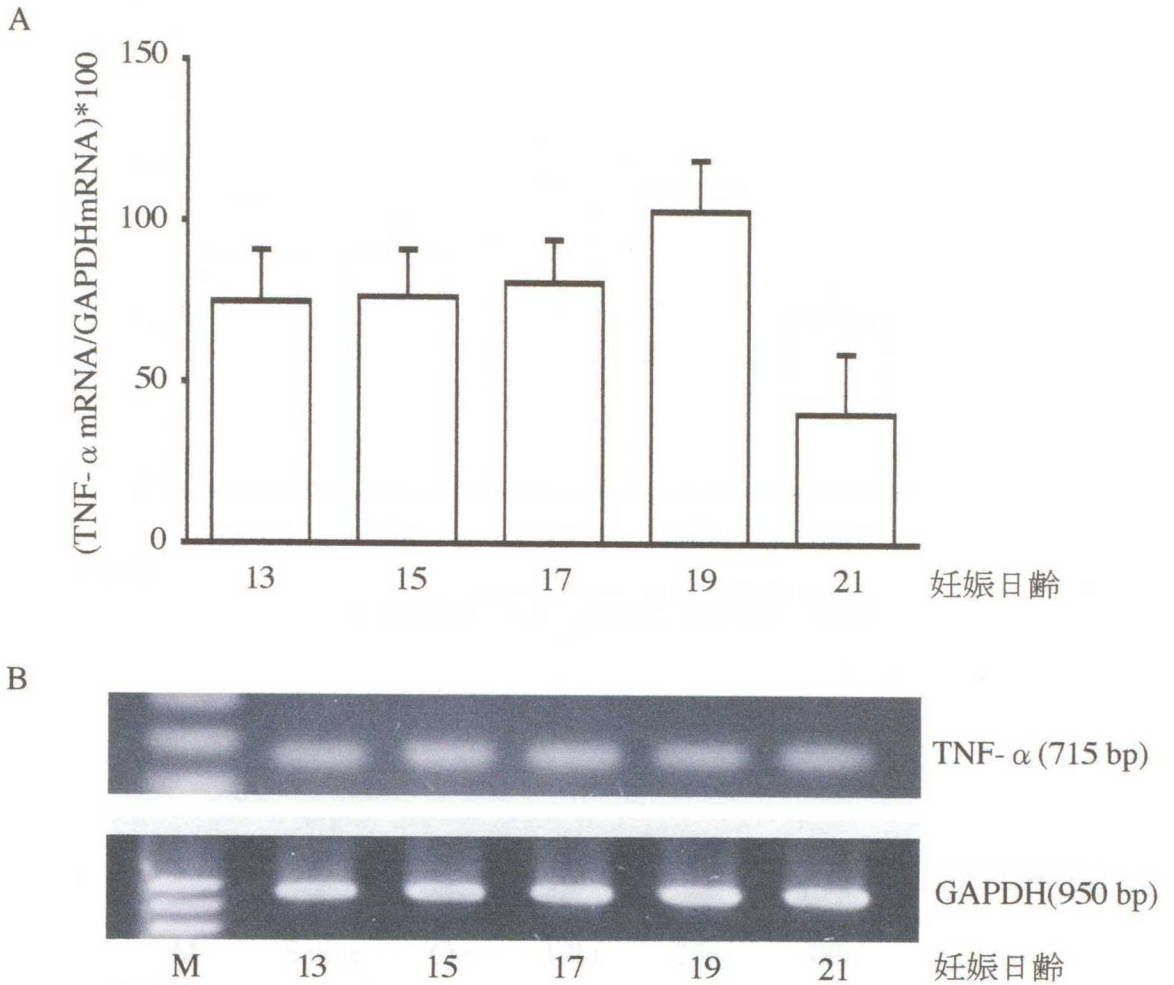


図17. 胎盤におけるRT-PCRによるTNF- α mRNAの発現量の変化

グラフは各サンプルごとの(TNF- α mRNA/(GAPDHmRNA)*100を求め、
平均値 \pm S.E.で示した。

TNF- α とGAPDH発現のPCR産物のアガロース電気泳動像

M:DNAサイズマーカー

表20. 胎盤におけるRT-PCRによるTNF- α mRNAの発現量の変化

妊娠日齢	13	15	17	19	21
平均	74.99	76.56	80.98	100.30	46.38
S.E.	15.85	14.49	13.21	15.80	18.98
例数	5	5	5	5	5

数値は各サンプルごとの(TNF- α mRNA/(GAPDHmRNA)*100を求め、
平均値 \pm S.E.で示した。

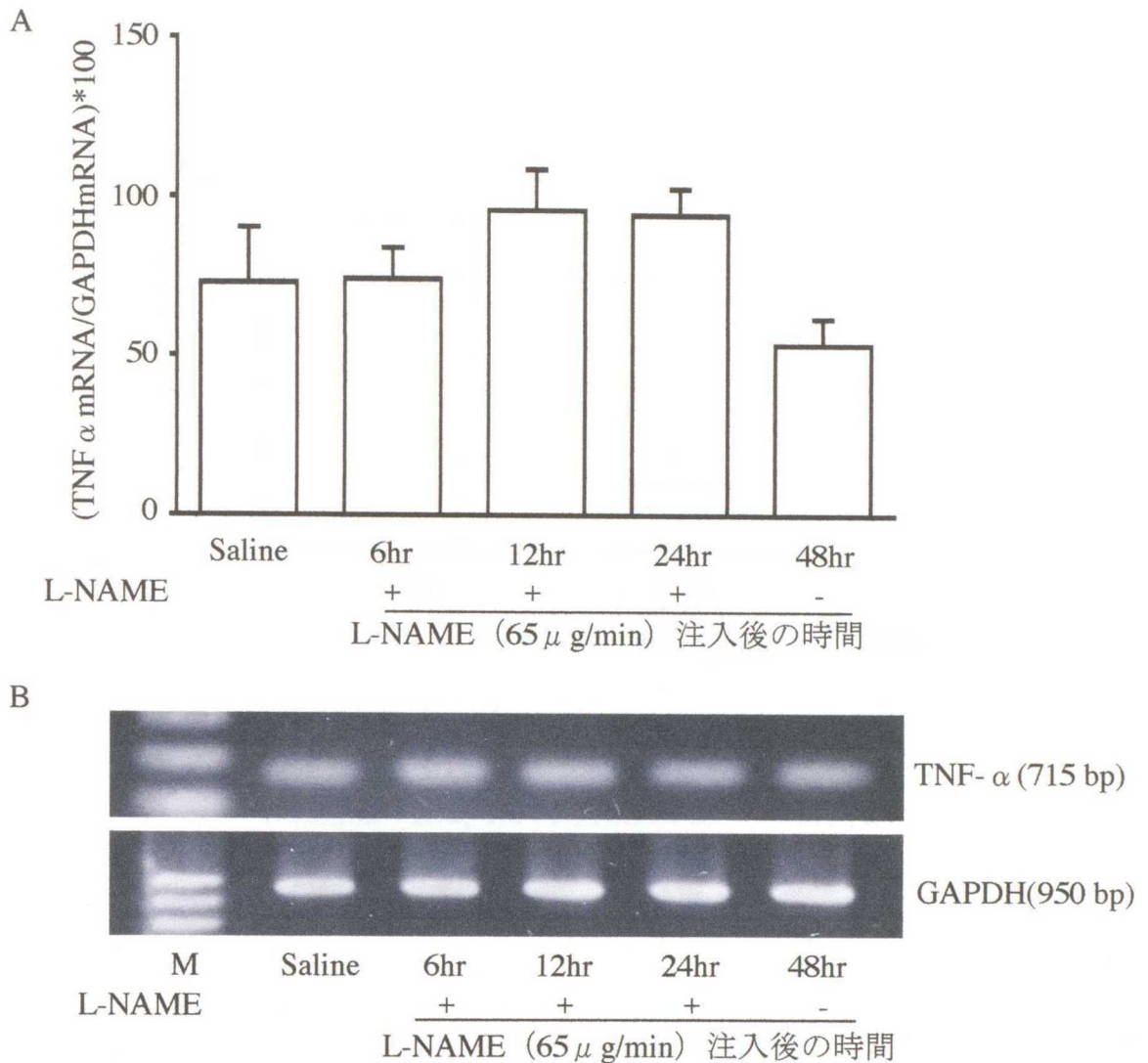


図18. 妊娠15日の胎盤におけるL-NAME注入後のTNF α mRNA発現量の変化

A: グラフは各サンプルごとの(TNF- α mRNA/(GAPDHmRNA)*100を求め、
 平均値 \pm S.E.で示した。

L-NAME(-)はL-NAME24時間注入後、L-NAMEの除去を示す。

B: TNF- α とGAPDH発現のPCR産物のアガロース電気泳動像

M:DNAサイズマーカー

L-NAME(-)はL-NAME24時間注入後、L-NAMEの除去を示す。

表21. 妊娠15日の胎盤におけるL-NAME注入後のTNF α mRNA発現量の変化

	Saline	L-NAME (65 μ g/min) 注入後の時間			
		6hr	12hr	24hr	48hr
平均	72.85	74.14	95.69	94.18	53.60
S.E.	17.35	9.67	12.99	8.36	8.23
例数	5	5	5	5	5
L-NAME		+	+	+	-

数値は各サンプルごとの(TNF- α mRNA/(GAPDHmRNA)*100を求め、
 平均値 \pm S.E.で示した。

L-NAME(-)はL-NAME24時間注入後、L-NAMEの除去を示す。

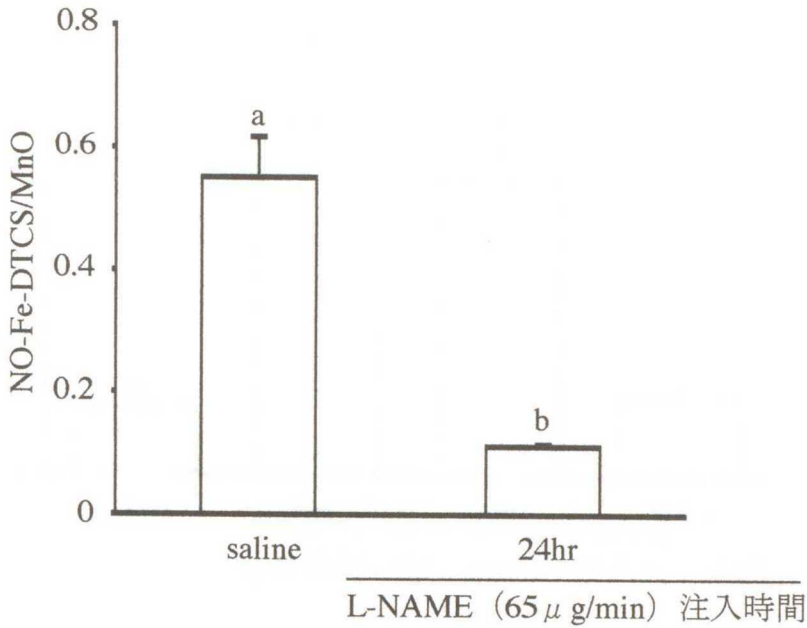


図19. 妊娠21日の胎盤におけるL-NAME注入後のNO産生量の変化

NO産生量の値は、NO-Fe-DTCSのシグナルの高さ(α)とMnOのシグナルの高さ(β)の比 α/β から求め、平均値 \pm S.E.で示した。

a,b; 異なる文字間で有意差あり($P<0.05$)。

表22. 妊娠21日の胎盤におけるL-NAME注入後のNO産生量の変化

	salinel	24hr
平均	0.55	0.11
S.E.	0.07	0
例数	5	2

NO産生量の値は、NO-Fe-DTCSのシグナルの高さ(α)とMnOのシグナルの高さ(β)の比 α/β から求め、平均値 \pm S.E.で示した。

a,b; 異なる文字間で有意差あり($P<0.05$)。

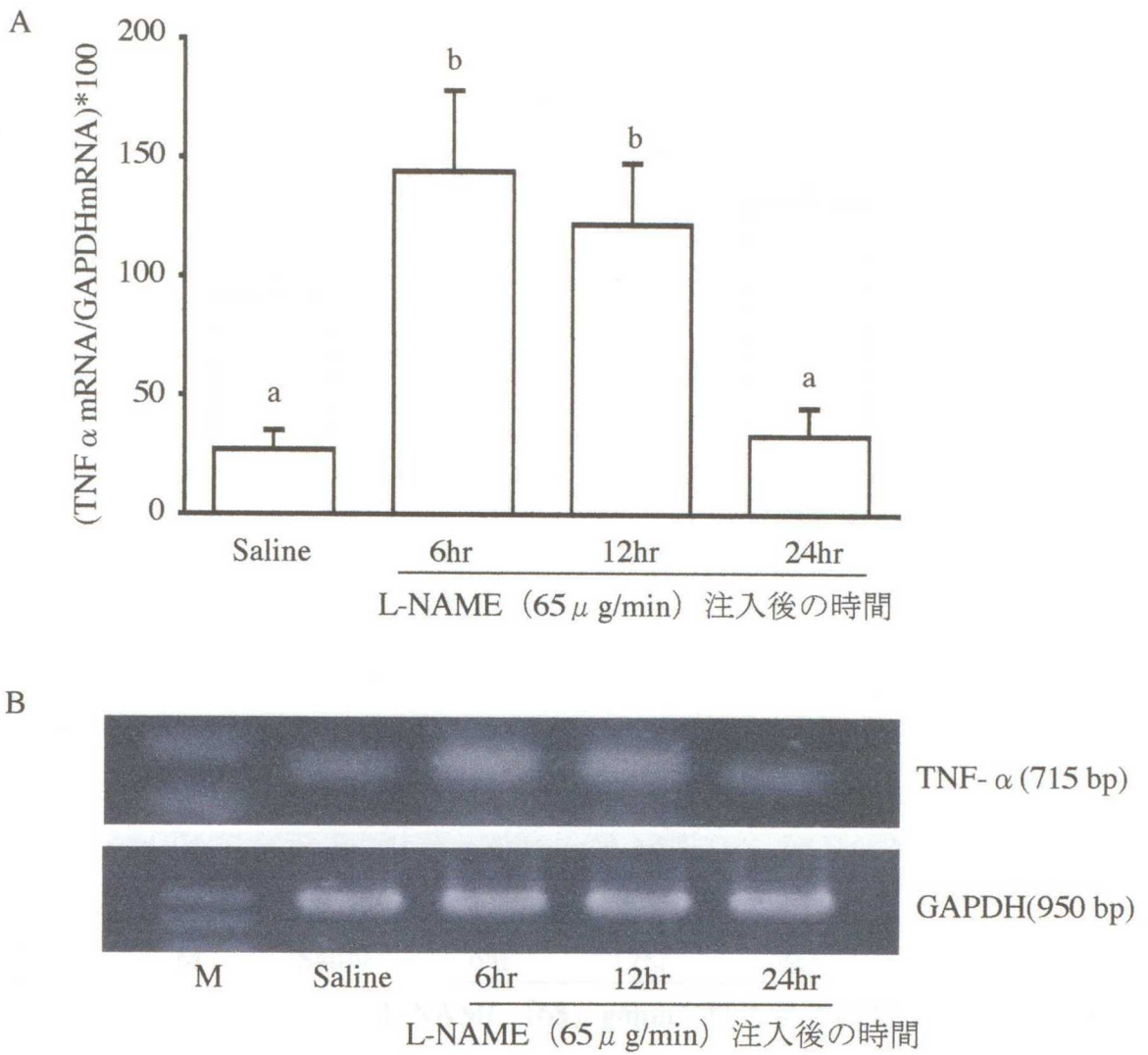


図20. 妊娠21日の胎盤におけるL-NAME注入後のTNF α mRNA発現量の変化

A: グラフは各サンプルごとの(TNF α mRNA/GAPDH mRNA)*100を求め、
 平均値 \pm S.E.で示した。a,b; 異なる文字間で有意差あり(P<0.05)。
 B: TNF α とGAPDH発現のPCR産物のアガロース電気泳動像
 M:DNAサイズマーカー

表23. 妊娠21日の胎盤におけるL-NAME注入後のTNF α mRNA発現量の変化

	Saline	L-NAME (65 μ g/min) 注入後の時間		
		6hr	12hr	24hr
平均	26.80 ^a	144.03 ^b	121.75 ^b	33.32 ^a
S.E.	7.35	5.08	6.60	23.06
例数	5	5	5	5

グラフは各サンプルごとの(TNF α mRNA/GAPDH mRNA)*100を求め、
 平均値 \pm S.E.で示した。a,b; 異なる文字間で有意差あり(P<0.05)。

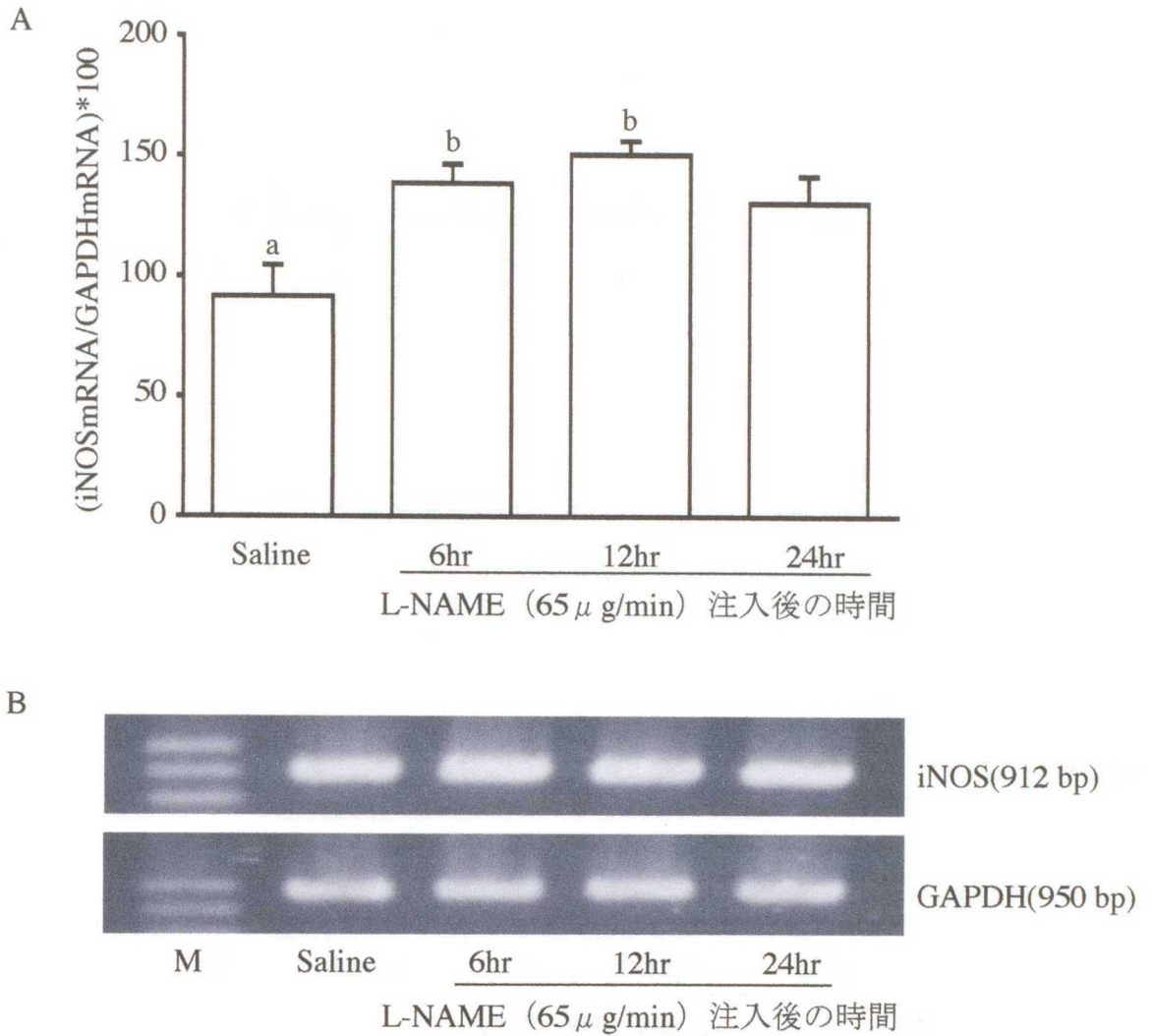


図21. 妊娠21日の胎盤におけるL-NAME注入後のiNOSmRNA発現量の変化

- A: グラフは各サンプルごとの(iNOSmRNA/GAPDHmRNA)*100を求め、
 平均値 \pm S.E.で示した。 a,b;異なる文字間で有意差あり(P<0.05)。
 B: iNOSとGAPDH発現のPCR産物のアガロース電気泳動像
 M:DNAサイズマーカー

表24. L-NAME注入後の妊娠21日の胎盤におけるiNOSmRNA発現量の変化

	L-NAME (65 μ g/min) 注入後の時間			
	Saline	6hr	12hr	24hr
平均	91.65 ^a	138.70 ^b	150.75 ^b	130.85
S.E.	12.84	8.08	5.65	11.12
例数	5	5	5	5

数値は各サンプルごとの(iNOSmRNA/GAPDHmRNA)*100を求め、
 平均値 \pm S.E.で示した。 a,b;異なる文字間で有意差あり(P<0.05)。

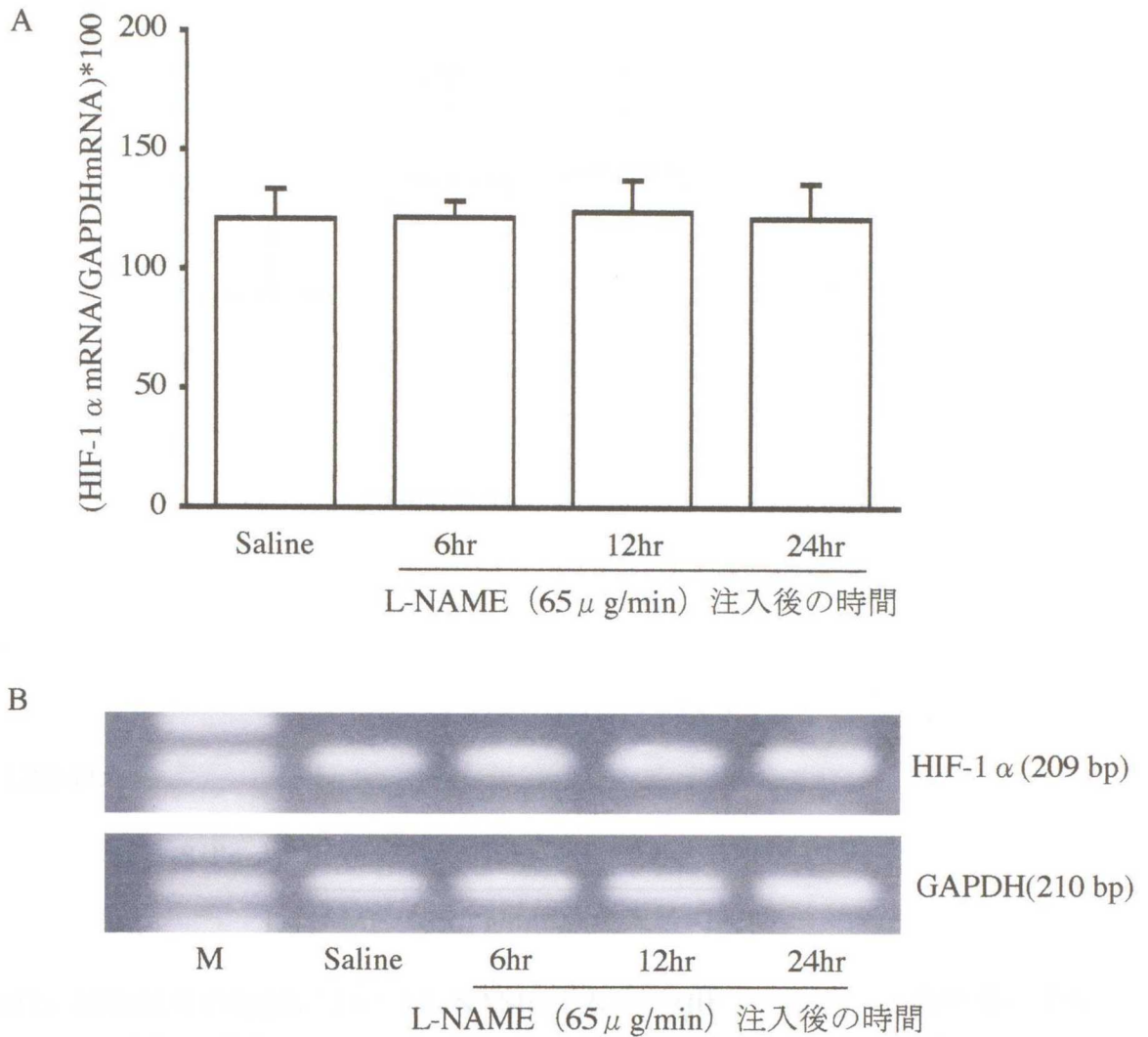


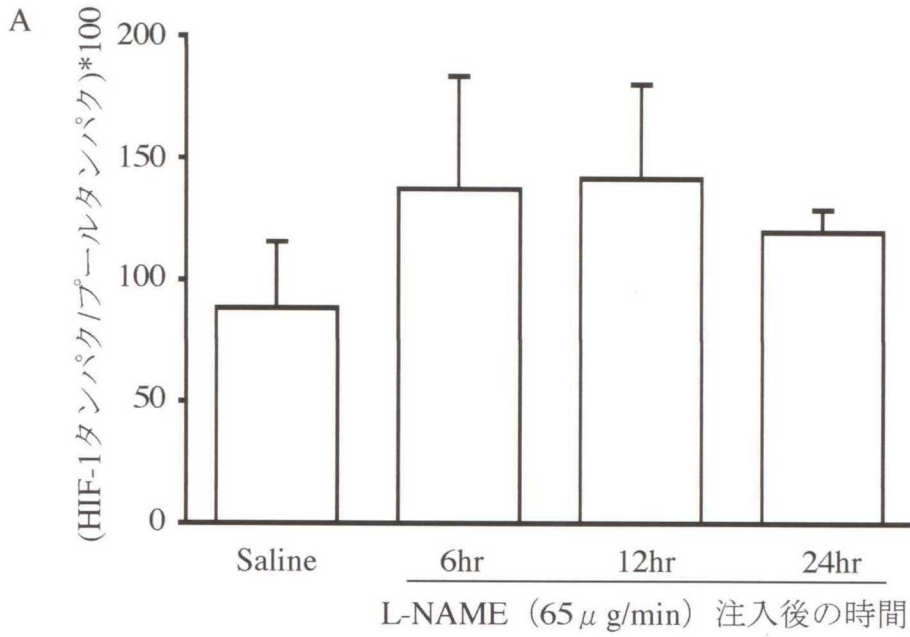
図22. 妊娠21日の胎盤におけるL-NAME注入後のHIF-1 α mRNA発現量の変化

- A: グラフは各サンプルごとの(HIF-1 α mRNA/GAPDHmRNA)*100を求め、
 平均値 \pm S.E.で示した。
 B: HIF-1 α とGAPDH発現のPCR産物のアガロース電気泳動像
 M:DNAサイズマーカー

表25.妊娠21日の胎盤におけるL-NAME注入後のHIF-1 α mRNA発現量の変化

	L-NAME (65 μ g/min) 注入後の時間			
	Saline	6hr	12hr	24hr
平均	120,86	121.72	124.24	121.39
S.E.	12.54	6.96	13.13	15.00
例数	5	5	5	5

数値は各サンプルごとの(HIF-1 α mRNA/GAPDHmRNA)*100を求め、
 平均値 \pm S.E.で示した。



B

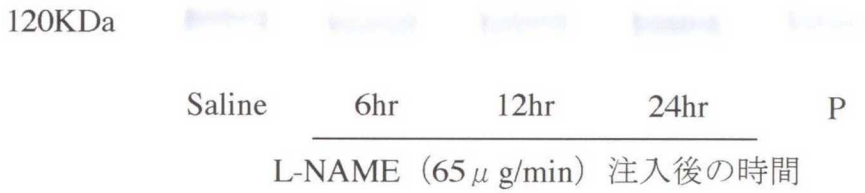


図23. 妊娠21日の胎盤におけるL-NAME注入後のHIF-1 α タンパク発現量の変化

- A: グラフは各サンプルごとの(HIF-1タンパク/プールタンパク)*100を求め、
 平均値 \pm S.E.で示した。
 B: HIF-1 α のタンパクのウエスタンブロット
 P:陽性対照

表26. 妊娠21日の胎盤におけるL-NAME注入後のHIF-1 α タンパク発現量の変化

	L-NAME (65 μ g/min) 注入後の時間			
	Saline	6hr	12hr	24hr
平均	88.22	137.04	141.41	119.56
S.E.	27.04	46.27	38.56	9.32
例数	4	4	4	4

数値は各サンプルごとの(HIF-1タンパク/プールタンパク)*100を求め、
 平均値 \pm S.E.で示した。

5.4. 考察

4章においてラット胎盤においては妊娠 15 日にピークを示す NO 産生は、HIF-1 が iNOS 遺伝子を介して転写誘導していることが示唆された。しかし、胎盤における iNOS 遺伝子を転写誘導する因子は他にも考えられることから、TNF- α と NO の関係について検討した。

TNF- α は IL-1 β や IFN- γ と同様に炎症性のサイトカインであり、NF- κ B を活性化して炎症および免疫に関わる遺伝子の発現に関与している。そして、肝細胞ではこれらのサイトカイン類が NOS の発現を誘導している (Geller *et al.*, 1993)。また、ラット顆粒膜細胞では TNF- α は IL-1 β や IFN- γ と同様に iNOS 遺伝子の発現を誘導している (Matsumani *et al.*, 1998)。さらに、ウシ子宮内膜細胞でも TNF- α が NO 産生を誘導しているという報告がある (Woclawek-Potocka *et al.*, 2004)。

脱落膜において、NO 産生は卵巣から分泌されるステロイドホルモンによる内分泌的調節とサイトカイン類や成長因子によるオートクラインあるいはパラクライン作用の局所的調節を受けている可能性が示唆されている (森 2006)。胎盤では 3 章においてステロイドホルモンによる影響は否定され、サイトカイン類や成長因子類による局所的調節によって NO 産生が調節されている可能性があると考えられた。

本章では NO 産生がピークを示す妊娠 15 日に L-NAME により NO 産生を抑制しても TNF- α mRNA の発現に変化は認められなかった。しかし、NO 産生が最も低値を示す妊娠 21 日に、同様に L-NAME により NO 産生を抑制すると、注入 6 時間後の TNF- α mRNA の発現は対照群に比べて約

5 倍になり、12 時間後まで持続し、その後、通常レベルに戻った。このことは L-NAME により胎盤の NO 産生が抑制されたことにより、胎盤において種々の必須の作用を有している NO 産生を生理的レベルに戻すために、胎盤に存在するマクロファージ等から過剰の TNF- α が発現された可能性が考えられる。このように、4 章で示した妊娠 15 日に認められた HIF-1 α を介した iNOS の誘導機構は妊娠 21 日ではほぼ消失し、TNF- α を介して誘導されている可能性が示唆された。

無処置ラットを用いて TNF- α mRNA の発現を解析すると TNF- α は胎盤において恒常的に発現しており、有意差はないものの妊娠末期に減少していることから TNF- α と妊娠維持の関係が示唆される。妊娠中期の脱落膜において NK 細胞が増加し、この NK 細胞から放出される TNF- α が胎盤の形成に重要な役割を果たしている (Guimond *et al.*, 1998)。そして、NK 細胞欠如マウスでは胎盤の発育が悪く脱落膜の血管壁の肥厚や血栓の形成が認められ、妊娠 12 日から 14 日で流産を起こすという報告がある (Guimond *et al.*, 1997)。正常マウスの子宮においては NK 細胞が iNOS の発現を誘導して NO 産生を促進していると考えられている (Hunt *et al.*, 1997)。しかし、TNF- α が胎盤を傷害して流産を引き起こすという報告もある (Yui *et al.*, 1994; Silen *et al.*, 1989)。

このように胎盤における TNF- α の役割については不明な点も多いが、妊娠 21 日では炎症性のサイトカインの一つとして TNF- α が胎盤における NO 産生に寄与している可能性が示された。妊娠末期には母体と胎子の接点の場である胎盤では TNF- α がオートクラインあるいはパラクライン的

に作用して NO 産生に寄与しているものと考えられた。

5.5. 小括

ラット胎盤における TNF- α mRNA は観察した妊娠 13 日から 21 日を通じて発現し、妊娠末期の妊娠 21 日に低値を示す傾向にあった。

NO 産生がピークを示す妊娠 15 日の胎盤においては NOS 阻害剤 L-NAME を用いて NO 産生を抑制しても TNF- α mRNA*i*NOS の発現には変化が認められなかった。一方、妊娠 21 日の胎盤においては、同様に L-NAME を用いて NO 産生を抑制すると、TNF- α mRNA の発現が 5 倍に急増した。しかし、HIF-1 α mRNA および HIF-1 α タンパクの発現には変化がなかったことから、4 章で示した妊娠 15 日に認められた HIF-1 α を介した iNOS の誘導機構は妊娠 21 日ではほぼ消失し、TNF- α を介して誘導されている可能性が示唆された。

6. NO が VEGF および GLUT 1 に及ぼす影響

6.1. 序 論

前章までで明らかにしたように、胎盤における NO 産生のは妊娠 15 日にピークを示した。また、NO 産生パターンは RT-PCR 解析による iNOSmRNA の発現パターンと良く一致したことから、iNOS が妊娠中期の胎盤における NO 産生の主役であると考えられた。さらに、妊娠中期の iNOS 発現の誘導因子の一つは HIF-1 であり、一方、妊娠 21 日では TNF- α が一因と考えられた。

胎盤は血管が豊富な組織であり、ラットでは迷路層と基底層からなっている。血管系の構築は、おもに胎生前期の血管形成とそれに引き続く狭義の血管新生（既存の血管から新しい血管枝の新生）の 2 つの機構によるものである（Carmeliet, 2000）。血管透過性因子（Vascular Permeability Factor: VPF）はガン細胞の培養上清から初めて分離され（Senger *et al.*, 1983）、血管内皮増殖因子（Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF）は内皮細胞に直接働き、血管新生を誘導する因子として報告された（Ferrara *et al.*, 1992）。その後、分子生物学的解析の結果 VEGF と VPF は同一の因子であることが、明らかになった（Ferrara *et al.*, 1992; Senger *et al.*, 1993）。

ラットにおいては VEGF 遺伝子からは、alternative splicing により 6 つのアイソフォームが作られることが報告されている（Burchardt *et al.*, 1999）。VEGF のアイソフォームそれぞれの特徴として、VEGF₁₂₀ はエクソン 6 および 7 を含まず、ヘパリンあるいは細胞外基質に結合することができな

い。これにエクソン 7 の 44 個のアミノ酸が加わった VEGF164 にはヘパリン結合能がある。VEGF164 はエクソン 6 が加わったもので、このエクソン 6 のなかにはもう一つのヘパリン結合部位がある。これにより、VEGF164 も細胞外基質への結合能を有する。VEGF188 は他の 2 つのアイソフォームよりもヘパリンやヘパラン硫酸に対する高い結合能を有する。VEGF188 は細胞膜表面あるいは細胞外基質に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンに捕捉されるため、VEGF120 や VEGF164 などに比べ *in vivo* における単独の生理活性は低い。一方、分泌型の VEGF120 や VEGF164 は血管内皮細胞の増殖を促し、*in vivo* における血管新生を誘導する。いずれのアイソフォームもシグナルペプチドをもち、糖鎖修飾を受けて分泌される (図 24)。

血管新生の主要因子である VEGF と NO との関連については、NO ドナーを用いた研究により NO がガン細胞において VEGF の発現を誘導している (Chin *et al.*, 1997) という報告や、ラット血管平滑筋において NO が VEGF を誘導するという報告 (Dulak *et al.*, 2000) がある。一方、VEGF が内皮細胞の VEGF 受容体-2 (KDR/Flk-1) を介して eNOS と iNOS のタンパクレベルを増加させ、NO 産生を促進するという報告 (Kroll and Waltenberger 1998) がある。組織やモデルによりどちらが誘導因子であるかは様々であるが、いずれにしても血管新生については、NO と VEGF は相互に関与していると考えられ、血管新生における NO と VEGF の相互作用についても報告されている (Kimura *et al.*, 2003)。また、VEGF 遺伝子のプロモーター領域には HRE があり (Iyer *et al.*, 1998)、血管新生においては HIF-1 が

VEGF 遺伝子の転写を誘導することも報告されている (Forsythe *et al.*, 1996)。

胎盤は母体と胎子をつなぐ唯一の器官であり、胎子の発育に必要な栄養分は胎盤を介して供給されている。グルコースは胎子の発育に必須であり、エネルギー源および生体成分の原料として使われている。グルコースの細胞内への取込みにおいては糖輸送体 (グルコーストランスポーター) が重要な役割を果たしている。グルコーストランスポーターにはグルコースを能動的に取込む Na⁺依存型糖輸送体 (SGLT ファミリー) と促進拡散型糖輸送体 (GLUT ファミリー) がある (Baldwin *et al.*, 1993; Mueckler *et al.*, 1994)。SGLT ファミリーは食物中のグルコースの吸収等に関与していると言われている (Takata, 1996)。GLUT ファミリーは現在 6 種類のアイソフォームが知られていて、GLUT-1、2、3、4、5 および 7 がある (Baldwin *et al.*, 1993)。GLUT 1 は GLUT ファミリーの中で最初に同定された因子である (Mueckler *et al.*, 1985)。糖輸送体は血液-組織関門を形成する細胞の細胞膜に極めて多量に存在し、これら関門部における糖の輸送に大きな役割を果たしている (Takata *et al.*, 1997)。

ラット胎盤においても GLUT 1 が発現していて、抗 GLUT 1 抗体を用いた免疫組織化学的解析により、母体血側栄養膜合胞体細胞と胎子血管内皮に隣接する栄養膜栄養膜細胞に GLUT 1 が局在していることが明らかにされている (Takata *et al.*, 1990, Takata *et al.*, 1997)。そして、GLUT 1 も HIF-1 の標的遺伝子であり、低酸素によって誘導されることが報告されている (Iyer *et al.*, 1998)。

以上のことから、胎盤における NO 産生が、血管新生因子のひとつである VEGF、そして、グルコース輸送に重要な GLUT 1 の発現と相互に関連している可能性を検討するため、定量的 RT-PCR 法を用いて、妊娠 13 日～21 日のラット胎盤における VEGF mRNA と GLUT 1 mRNA の発現を解析した。さらに、NO 産生がピークにあたる妊娠 15 日および NO 産生が最も少ない妊娠 21 日に L-NAME を用いて、NO 産生抑制モデルラットを製作し、NO と VEGF および GLUT-1 との関係を検討した。

VEGF120	エクソン1~5	8		
VEGF164	エクソン1~5	7	8	
VEGF188	エクソン1~5	6a	7	8

図 24. VEGFアイソフォーム

VEGF遺伝子からはalternative splicingにより、異なるサイズのアイソフォームが作られる。それぞれのVEGFサブタイプにおける最も大きな違いは、ヘパリンあるいはヘパラン硫酸プロテオグリカンに対応する結合能の違いにある。

6.2. 材料と方法

6.2.1. 供試動物および飼育環境

2.2.1.に示したものと同様である。

6.2.2. NO 産生抑制モデルラットの作製

4.2.3.に示したものと同様である。

6.2.3. EPR 装置による NO 産生の解析

2.2.5.に示したものと同様である。

6.2.4. 遺伝子発現の解析

2.2.8 に示したものと同様である。

VEGF プライマーは VEGF120、VEGF164、VEGF188 の共通部分であるエクソン 1 から 5 の一部の塩基配列を用いた VEGF-1、アイソフォーム VEGF120、VEGF164、VEGF188 を識別が可能な VEGF-2 を予備実験で検討し、定量性に優れた VEGF-1 を本実験に用いた。

プライマーの配列と PCR の反応条件は表 27 および表 28 に示した。

6.2.5. ラット胎盤重量の測定

本実験で用いた同系統の Crj : Wistar ラットを用いて妊娠 13 日、15 日、17 日、19 日、21 日の胎盤の重量を測定した。母体数は各妊娠日 4 例とし、各母体の胎盤数（胎子数）は 6 から 15 例であった。

6.2.6. 統計学的処理

得られたデータから平均、標準誤差を求め、一元位置分散分析を用いて統計学的に処理し、Scheffes' test を用いて有意差を求め、 $P < 0.05$ のとき有意差ありとした。

表 27. 各プライマー配列

遺伝子	配列 (5' to 3')	PCR 産物の塩基数
VEGF-1	ACTGGACCCTGGCTTTACTGCTGTA CGCATGATCTGCATAGTGACGTTGC	295
GLUT 1	TGCAGTTCGGCTATAACACC CATGTATGTGGGGGAGGTGT	372
GAPDH-1	TGAAGGTCGGTGTCAACGGATTTGHC CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC	950

表 28. 各プライマーの PCR 反応条件

遺伝子	変性反応	アーニリング	伸長反応	サイクル数
VEGF-1	94°C (1min)	62.5°C (1min)	72°C (1min)	20
GLUT 1	94°C (1min)	56°C (30sec)	72°C (45sec)	20
GAPDH-1	94°C (1min)	60°C (1min)	72°C (1min)	20

6.3. 結果

6.3.1. Crj : Wistar ラット胎盤の重量変化

妊娠13日から21日のCrj : Wistarラットの胎盤の重量変化を図25と表29に示した。胎盤重量は各妊娠日で有意に増加し、その変化は妊娠15日から19日で最も大きかった。

6.3.2. 胎盤におけるVEGFmRNAとGLUT 1 mRNAの発現量の解析結果

妊娠13日から21日のVEGFmRNAとGLUT 1 mRNAの発現を図26、表30、および図27、表31に示した。VEGFmRNAとGLUT 1 mRNAの発現は観察した妊娠13日から21日を通して認められ、妊娠後期に有意に増加して胎盤重量の増加と良く一致した。

6.3.3. 妊娠 15 日における L-NAME 持続注入モデルの VEGFmRNA と

GLUT 1 mRNA の発現量

妊娠15日においてL-NAME注入によるNO産生、VEGFmRNAおよびGLUT 1 mRNAの発現を図28、表32および図29、表33に示した。妊娠15日においてL-NAME注入によりNO産生を減少させると、同時にVEGFmRNAの発現も一時的に減少したが、その後、24時間後には回復した。また、GLUT 1 mRNAの発現はNO産生量の減少させた期間中、徐々に増加した。

6.3.4. 妊娠 21 日における L-NAME 持続注入モデルの VEGFmRNA と

GLUT 1 mRNA の発現量

妊娠15日においてL-NAME注入によるNO産生、VEGFmRNAおよびGLUT 1 mRNAの発現を図30、表34および図31、表35に示した。妊娠21日においては、同様にL-NAMEによりNO産生を抑制してもVEGFmRNAとGLUT 1mRNAの発現に変化は認められなかった。

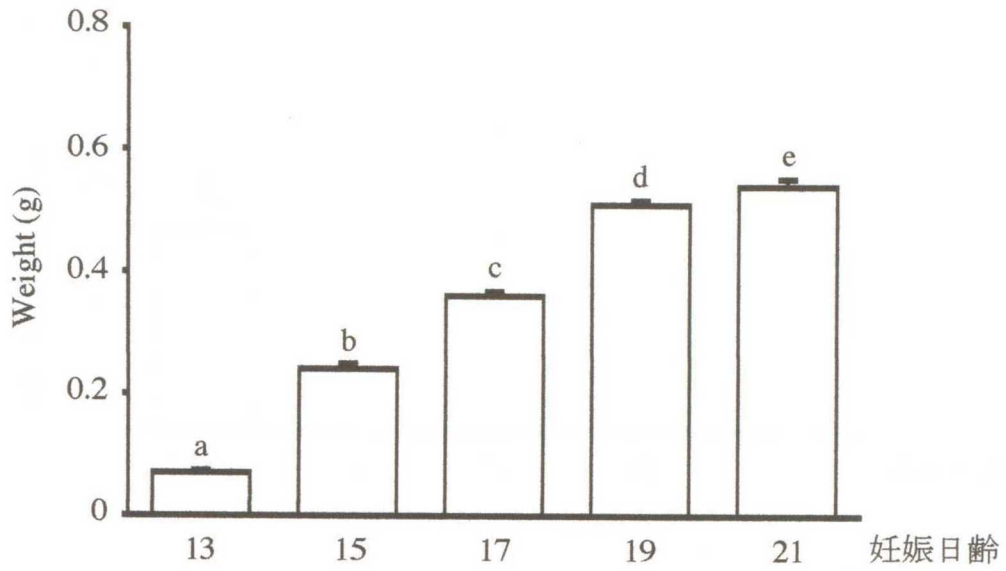


図25. CrJ:Wistarラットの胎盤重量変化

a,b,c,d,e;各胎齢ごとに異なる文字間で有意差あり ($P < 0.05$)。

表29. CrJ:Wistarラットの胎盤重量変化

妊娠日齢	13	15	17	19	21
平均 (g)	0.07 ^a	0.24 ^b	0.36 ^c	0.51 ^d	0.54 ^e
S.E.	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01
例数	4 (66)	4 (33)	4 (47)	4 (57)	4 (52)

例数は母体数、括弧内は胎盤数を示す。

a,b,c,d,e;各胎齢ごとに異なる文字間で有意差あり ($P < 0.05$)。

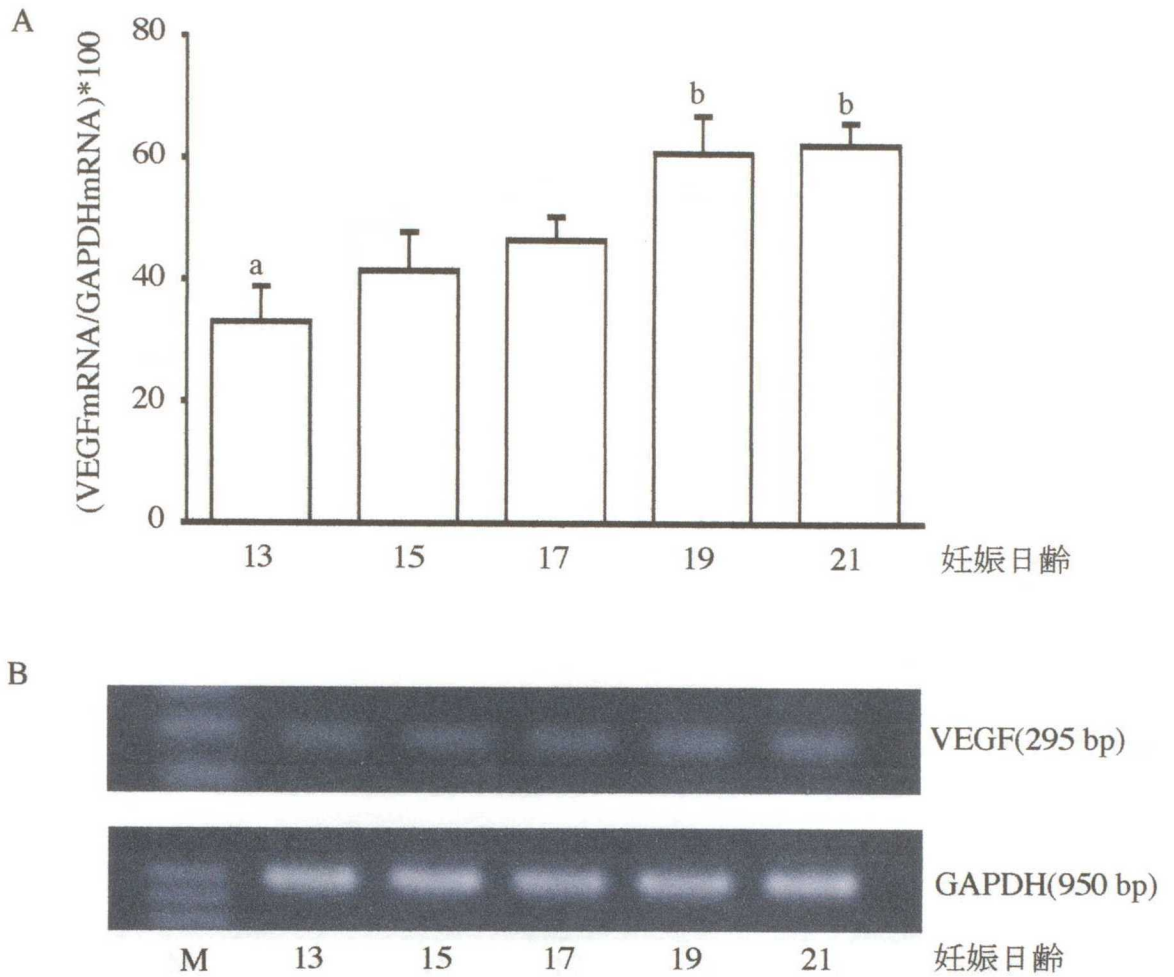


図26. 胎盤におけるRT-PCRによるVEGFmRNAの発現量の変化

- A: グラフは各サンプルごとの(VEGFmRNA /GAPDHmRNA)*100を求め、平均値±S.Eで示した。
 a,b;各胎齢ごとに異なる文字間で有意差あり(P<0.05)。
 B: VEGFとGAPDH発現のPCR産物のアガロース電気泳動像
 M:DNAサイズマーカー

表30. 胎盤におけるRT-PCRによるVEGFmRNAの発現量の変化

妊娠日齢	13	15	17	19	21
平均	32.94 ^a	41.40	46.50	60.82 ^b	62.31 ^b
S.E.	5.87	6.32	3.81	6.18	3.65
例数	5	5	5	5	5

数値は各サンプルごとの(VEGFmRNA /GAPDHmRNA)*100を求め、平均値±S.Eで示した。
 a,b;各胎齢ごとに異なる文字間で有意差あり(P<0.05)。

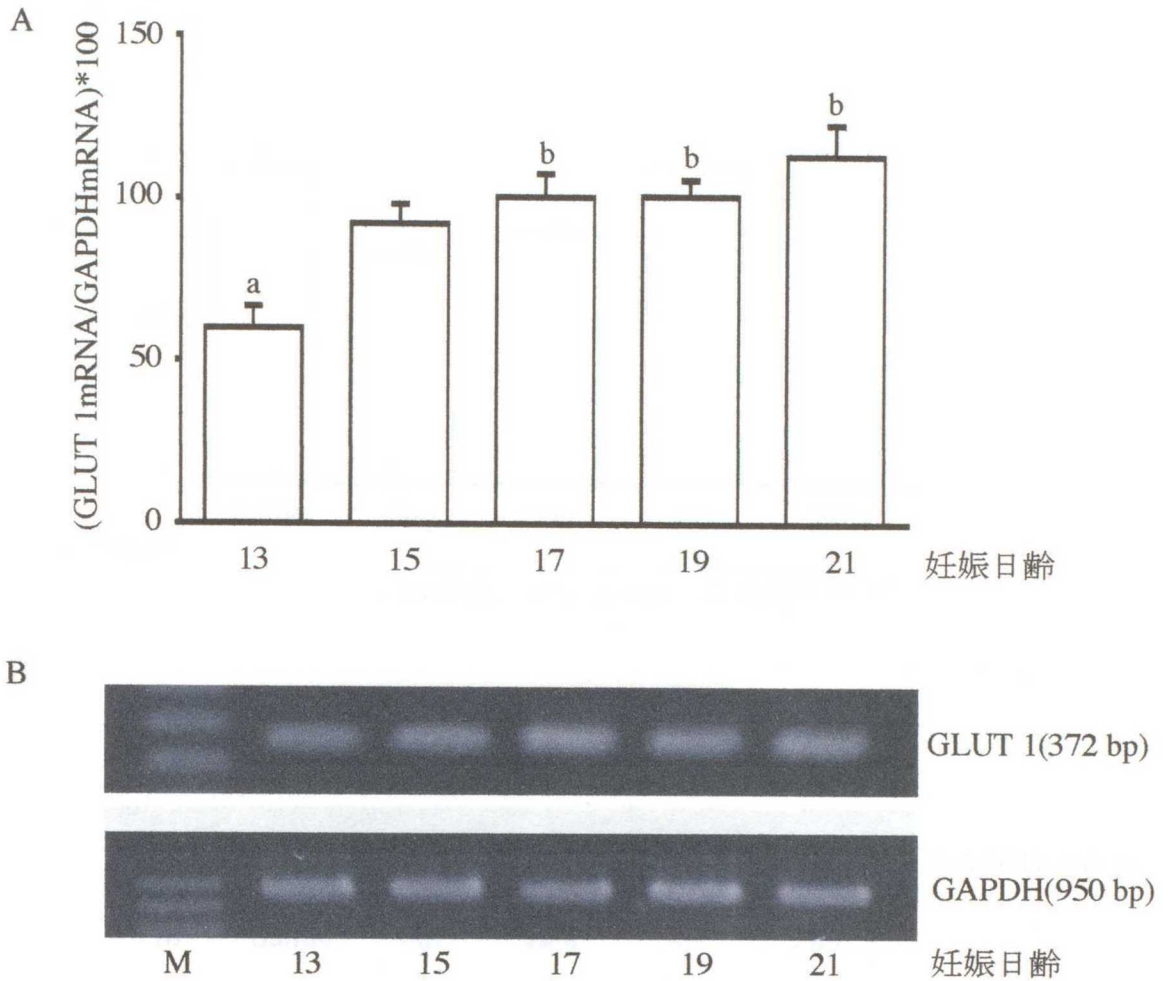


図27. 胎盤におけるRT-PCRによるGLUT 1mRNAの発現の変化

- A: グラフは各サンプルごとの(GLUT 1mRNA /GAPDHmRNA)*100を求め、平均値±S.Eで示した。
a,b;各胎齢ごとに異なる文字間で有意差あり(P<0.05)。
B: GLUT 1とGAPDH発現のPCR産物のアガロース電気泳動像
M:DNAサイズマーカー

表31. 胎盤におけるRT-PCRによるGLUT 1mRNAの発現の変化

妊娠日齢	13	15	17	19	21
平均	59.98 ^a	92.22	100.63 ^b	101.02 ^b	113.44 ^b
S.E.	6.68	6.15	7.09	4.81	9.77
例数	5	5	5	5	5

数値は各サンプルごとの(GLUT 1mRNA /GAPDHmRNA)*100を求め、平均値±S.Eで示した。
a,b;各胎齢ごとに異なる文字間で有意差あり(P<0.05)。

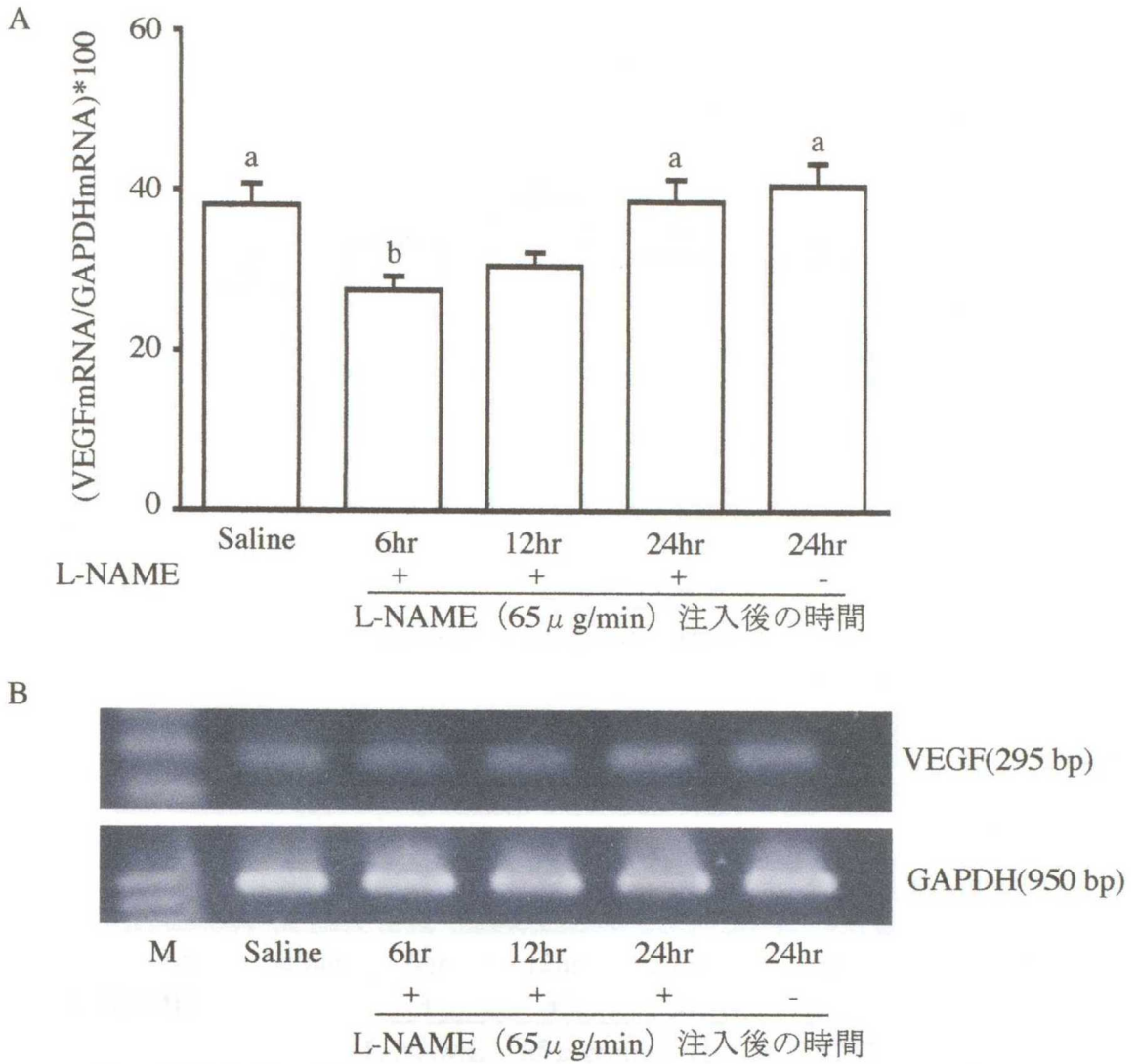


図28. L-NAME注入後の妊娠15日の胎盤におけるVEGFmRNA発現量の変化

- A: グラフは各サンプルごと; の(VEGFmRNA/GAPDHmRNA)*100を求め、平均+S.E.で示した。a,b異なる文字間で有意差あり(P<0.05)。L-NAME(-)はL-NAME24時間注入後、L-NAMEの除去を示す。
- B: VEGFとGAPDH発現のPCR産物のアガロース電気泳動像
M:DNAサイズマーカー
L-NAME(-)はL-NAME24時間注入後、L-NAMEの除去を示す。

表32. L-NAME注入後の妊娠15日の胎盤におけるVEGFmRNA発現量の変化

	Saline	L-NAME (65 μg/min) 注入後の時間			
		6hr	12hr	24hr	24hr
平均	38.12 ^a	27.55 ^b	30.52	38.66 ^a	40.80 ^a
S.E.	2.64	1.72	1.78	2.87	2.74
例数	5	5	5	5	5
L-NAME		+	+	+	-

数値は各サンプルごとの(VEGFmRNA/GAPDHmRNA)*100を求め、平均+S.E.で示した。a,b; 異なる文字間で有意差あり(P<0.05)。L-NAME(-)はL-NAME24時間注入後、L-NAMEの除去を示す。

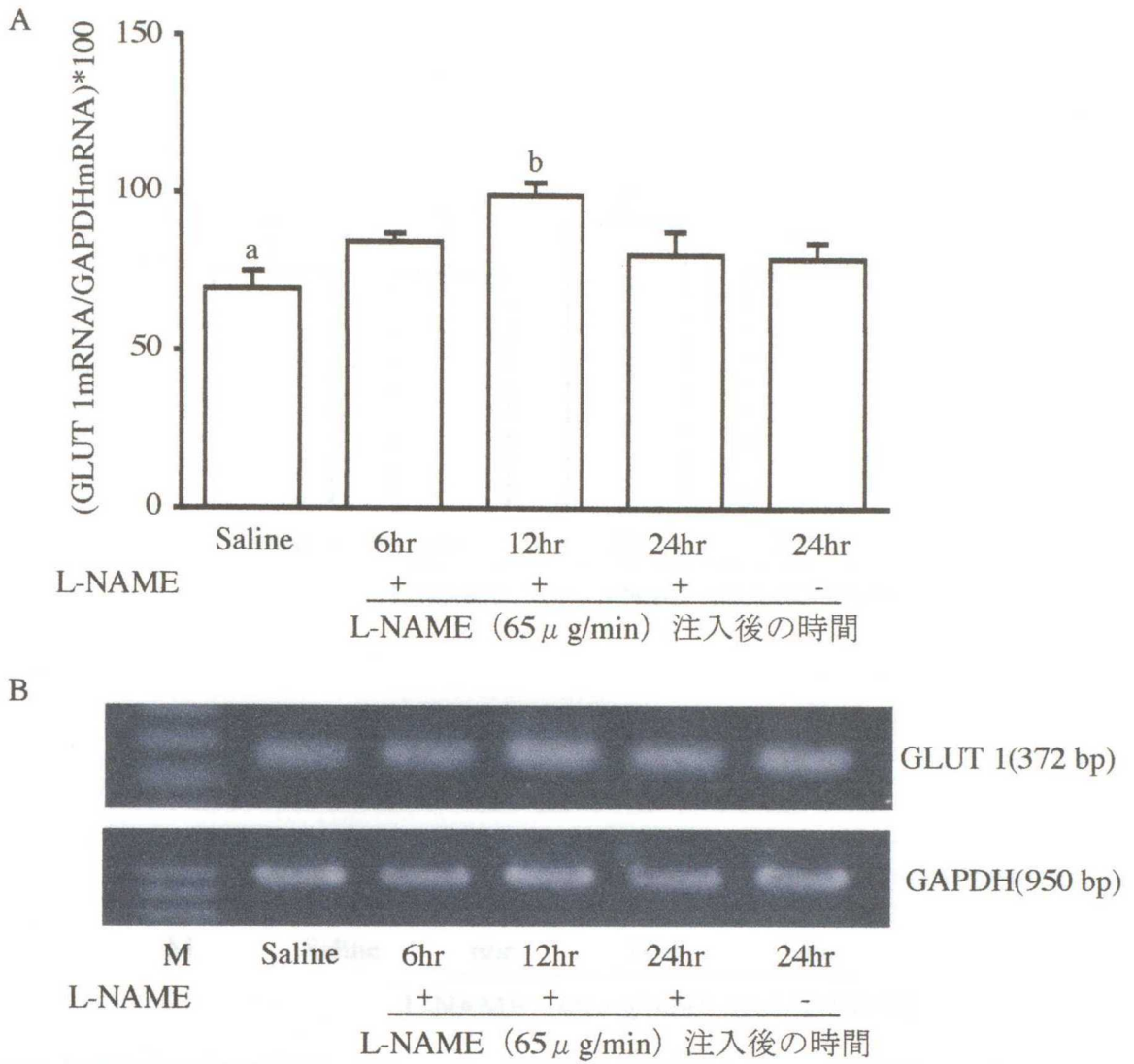


図29. 妊娠15日の胎盤におけるL-NAME注入後のGLUT 1mRNA発現量の変化

- A: グラフは各サンプルごとの(GLUT 1mRNA/GAPDHmRNA)*100を求め、
 平均値+S.E.で示した。 a,b; 異なる文字間で有意差あり(P<0.05)。
 L-NAME(-)はL-NAME24時間注入後、L-NAMEの除去を示す。
- B: GLUT 1とGAPDH発現のPCR産物のアガロース電気泳動像
 M:DNAサイズマーカー
 L-NAME(-)はL-NAME24時間注入後、L-NAMEの除去を示す。

表33. 妊娠15日の胎盤におけるL-NAME注入後のGLUT 1mRNA発現量の変化

	Saline	L-NAME (65 μ g/min) 注入後の時間			
		6hr	12hr	24hr	24hr
平均	69.39 ^a	84.48	99.18 ^b	80.48	79.10
S.E.	5.70	2.65	4.24	7.54	5.23
例数	5	5	5	5	5
L-NAME		+	+	+	-

数値は各サンプルごとの(GLUT 1mRNA/GAPDHmRNA)*100を求め、
 平均値+S.E.で示した。 a,b; 異なる文字間で有意差あり(P<0.05)。
 L-NAME(-)はL-NAME24時間注入後、L-NAMEの除去を示す。

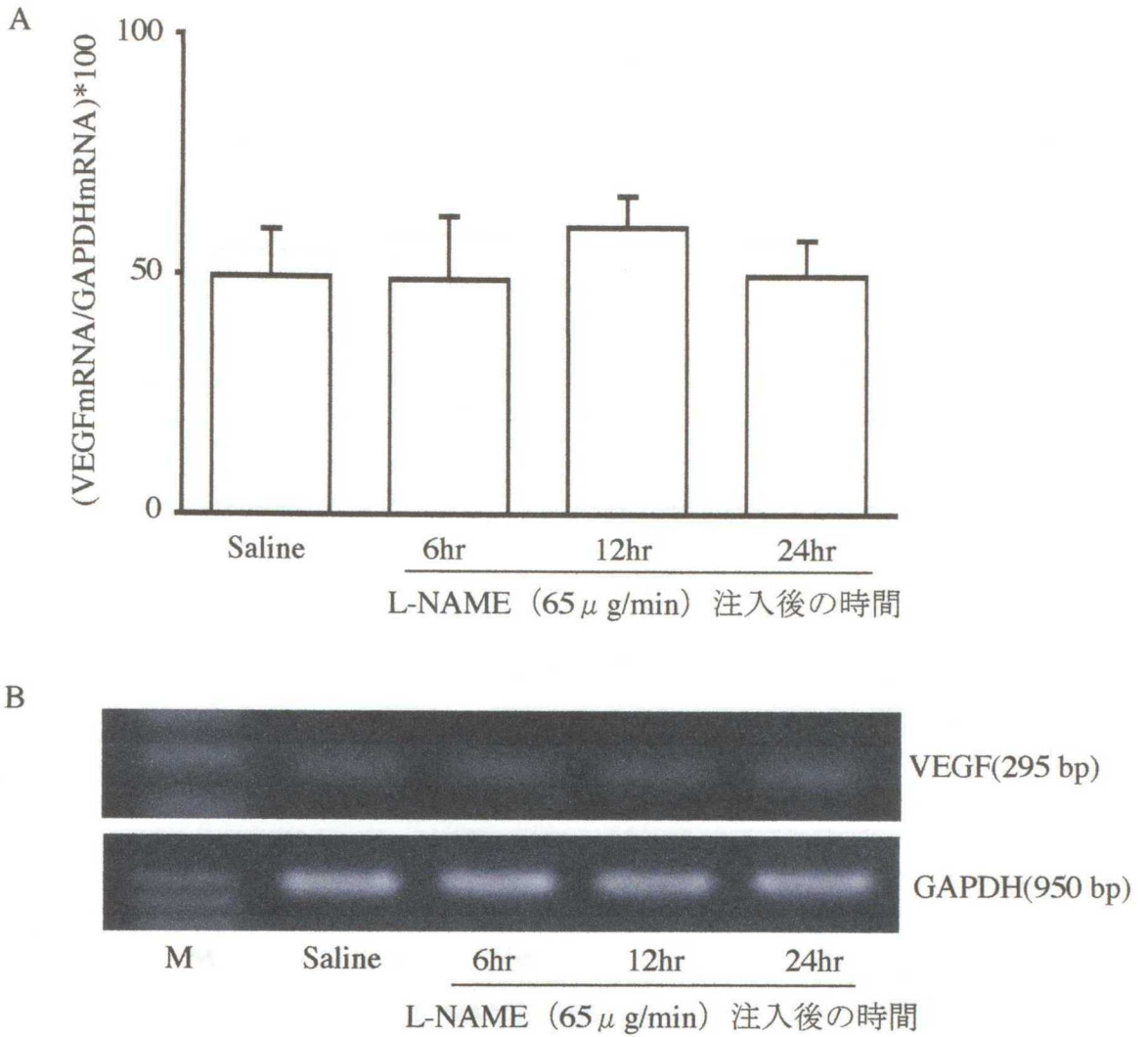


図30. 妊娠21日の胎盤におけるL-NAME注入後のVEGFmRNA発現量の変化

- A: グラフは各サンプルごとの(VEGFmRNA/GAPDHmRNA)*100を求め、
 平均値 \pm S.E.で示した。
 B: VEGFとGAPDH発現のPCR産物のアガロース電気泳動像
 M:DNAサイズマーカー

表34. 妊娠21日の胎盤におけるL-NAME注入後のVEGFmRNA発現量の変化

	Saline	L-NAME (65 μ g/min) 注入時間		
		6hr	12hr	24hr
平均	49.62	48.96	60.13	49.73
S.E.	9.80	13.34	6.32	7.61
例数	5	5	5	5

グラフは各サンプルごとの(VEGFmRNA/GAPDHmRNA)*100を求め、
 平均値 \pm S.E.で示した。

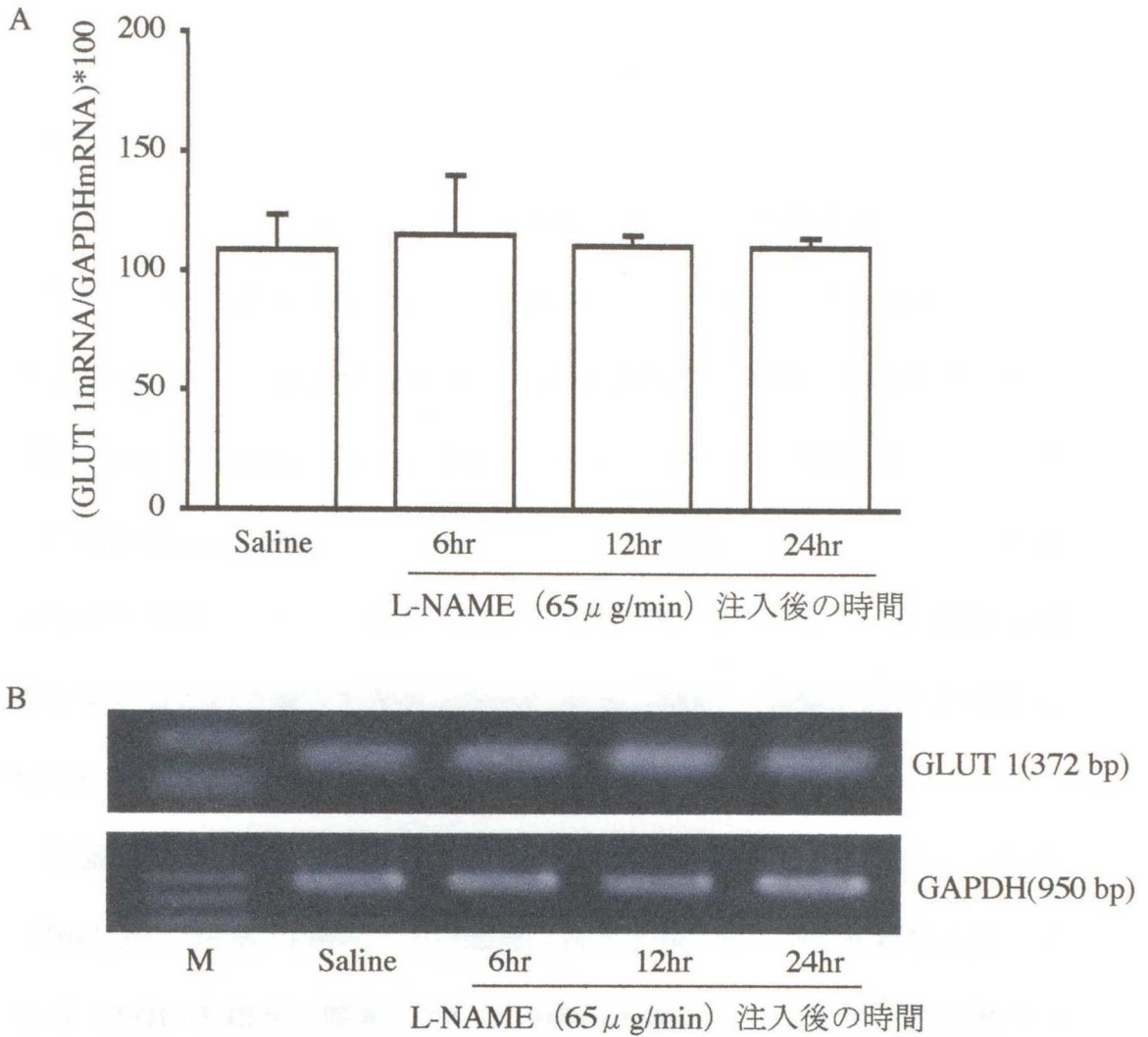


図31. 妊娠21日の胎盤におけるL-NAME注入後のGLUT 1mRNA発現量の変化

- A: グラフは各サンプルごとの(GLUT 1mRNA/GAPDHmRNA)*100を求め、
 平均値 \pm S.E.で示した。
 B: GLUT 1とGAPDH発のPCR産物のアガロース電気泳動像
 M:DNAサイズマーカー

表35. 妊娠21日の胎盤におけるL-NAME注入後のGLUT 1mRNA発現量の変化

	Saline	L-NAME (65 μ g/min) 注入後の時間		
		6hr	12hr	24hr
平均	108.68	114.96	110.49	110.21
S.E.	14.48	25.01	4.33	3.87
例数	5	5	5	5

数値は各サンプルごとの(GLUT 1mRNA/GAPDHmRNA)*100を求め、
 平均値 \pm S.E.で示した。

6.4. 考察

前章までに記したように、ラット胎盤における NO 産生量のピークを示す妊娠 15 日においては、HIF-1 が iNOS を介して NO 産生を制御していることが示された。VEGF 遺伝子も iNOS 遺伝子と同様に低酸素応答配列 (Hypoxia Response Element: HRE) を有し HIF-1 の 標的遺伝子である (Forythe *et al.*, 1996)。また、VEGF と NO との関連については、NO が VEGF の発現を誘導するという報告 (Chin *et al.*, 1991) と VEGF が NO 産生を促進しているという報告があり (Dulak *et al.*, 2000)、胎盤において NO と VEGF は相互に作用をしている可能性がある。

胎盤は血管が豊富な組織であり、ラットでは迷路層と基底層からなる (Bridgman, 1948; 1949)。この胎盤における NO 産生が血管新生に深く関わる VEGF と相互に関連している可能性を検討した。まず、無処置ラットの妊娠 13 日から妊娠 21 の胎盤における VEGFmRNA の発現を検討した結果、VEGFmRNA の発現は妊娠 13 日から認められ、妊娠 21 日まで持続的に増加した。この発現パターンはこの実験に用いた同系統のラット胎盤の重量の増加と同様であった。すなわち、妊娠が進むにつれて胎盤は重量を増し、同時に VEGFmRNA も増加した。ことから、本実験結果は、母体と胎子にとって重要な器官である胎盤において血管新生に VEGF が深く関与していることを示していると考えられる。

次に、胎盤における NO 産生を L-NAME で抑制した時の VEGFmRNA の発現の変化を検討した。L-NAME 注入 6 時間後以降から 24 時間後の観察期間を通じて NO 産生は大幅に抑制されていた。その時、VEGFmRNA

は L-NEME 注入 6 時間後に一時的に有意に減少し、L-NAME 注入 12 時間後においては有意でないものの低い値を示し、24 時間後には回復していた。この結果は VEGFmRNA の発現には NO が必要であり、L-NAME 注入後に NO が急激に減少したために、注入開始 6 時間後には VEGFmRNA の発現が減少したことを示している。これはラット胸部大動脈平滑筋細胞において NO が VEGF の発現を誘導するという報告 (Dulak *et al.*, 2000) と一致する。また、NO 産生の抑制により VEGFmRNA の発現が一時的に減少し、その後、NO 抑制が継続しているにもかかわらず、VEGFmRNA の発現が回復したことは VEGFmRNA の発現に NO 以外の何か他の因子が関与していることを示唆している。

GLUT-1 遺伝子も iNOS 遺伝子や VEGF 遺伝子と同様に HRE を有し、HIF-1 の標的遺伝子である (Semenza *et al.*, 2001)。

無処置ラットの胎盤において胎盤重量の増加に伴い、GLUT 1mRNA の発現が増加した。さらに、胎盤における GLUT 1 は母体から胎子の発育成長に重要なグルコースを供給する唯一の経路である。この二つのことを考えると GLUT 1 は胎子の発育成長に必須であることに加えて胎盤の成長にも必要であることを示唆している。

次に、L-NAME を用いて胎盤における NO 産生を抑制すると GLUT 1mRNA の発現が持続的に増加した。これは、4 章で示したように L-NAME によって減少した NO を増加させるために HIF-1 が動員された。この HIF-1 が iNOS と GLUT 1 が同じ栄養膜合胞体細胞に発現していることから、iNOS 遺伝子のプロモーター領域にある HRE に結合するだけでなく GLUT 1 遺

伝子のプロモーター領域の HRE にも結合して GLUT 1mRNA の発現が持続的に増加したことが考えられる。しかし、NO と直接関係があるのか、他の因子が代償的に働いている可能性も十分考えられる。

以上のことから妊娠 15 日における NO と VEGF および GLUT 1 の関係から胎盤の成長過程において母体と胎盤と胎子の関係を維持するために血管新生、血流量の維持そしてグルコースの供給のためにこれらの因子が必要であることが示唆された。一方、妊娠 21 日においては NOS 阻害剤 L-NAME を用いて胎盤における NO 産生を抑制しても VEGFmRNA および GLUT 1mRNA の発現に何ら変化が認められなかったことから、分娩を前にしてもはや血管新生やグルコースの供給がそれほど重要でなく、NO と VEGF および GLUT 1 の相互関係が維持されていない可能性が示唆された。この結果は妊娠末期において胎盤はその機能をほとんど停止していることと一致している。

ラット胎盤においては血管新生とグルコースの供給は NO を介した VEGF や GLUT 1 が直接的、間接的に関与して胎盤を健全に保ち妊娠が維持されている可能性が示唆された。しかし、本研究では NO 産生を抑制したときの VEGF と GLUT 1 を見ているだけであり、VEGF と GLUT 1 を動かした後の NO 産生を検討する必要がある。

6.5. 小括

胎盤における NO 産生の生物学意義を検討するため、NO 産生がピークを示す妊娠 15 日と低値を示す妊娠 21 日のラットを用いて NOS 阻害剤 L-NAME を持続注入し、NO 抑制モデルを作製し、経時的に NO 産生量、VEGFmRNA および GLUT 1mRNA の発現量を RT-PCR を用いて解析した。

妊娠15日においてL-NAME注入によりNO産生を減少させると、同時に VEGFmRNA の発現も一時的に減少したが、その後、24時間後には回復した。また、NO産生量を抑制した期間中、GLUT 1 mRNA の発現は徐々に増加した。一方、妊娠21日においては、同様にL-NAMEによりNO産生を抑制しても VEGFmRNA と GLUT 1mRNA の発現に変化は認められなかった。

以上のことから、NO 産生量の多い妊娠 15 日においては、VEGF の発現には NO が必要であること、また、GLUT 1 の発現には NO 産生抑制時の代償機構が存在していることが示唆された。

7. 総括

妊娠 13 日から妊娠 21 日のラット胎盤における NO 産生量をスピントラップ・EPR 法を用いて解析した。胎盤における NO 産生は妊娠 13 日から認められ、15 日にピークを示し、その後 21 日まで漸減した。

胎盤における NOS 遺伝子発現を RT-PCR 法により解析すると、iNOSmRNA の発現は、妊娠 13 日から認められ、15 日にピークを示し、その後 21 日まで漸減した。この iNOSmRNA の発現パターンはスピントラップ・EPR 法により解析した NO 産生パターンとよく一致した。一方、eNOSmRNA の発現は妊娠 13 日から 19 日まで変動せずほぼ一定であり、その後 21 日に減少する傾向が認められた。以上のことから、妊娠 15 日にピークを示す胎盤における NO 産生は主に iNOS に由来すると考えられた。

NOS 発現の調節機構を検討する一環として、NOSmRNA の発現におよぼすステロイドホルモンの影響について検討した。抗プロジェステロン剤 (RU486) または抗エストロジェン剤 (raloxifene) を妊娠 12~14 日にそれぞれ 1mg/kg/day、3 日間連続投与し、妊娠 15 日の胎盤における NOSmRNA 発現を RT-PCR により解析した。RU486 と raloxifene はどちらも妊娠 15 日の胎盤における iNOSmRNA および eNOSmRNA 発現に影響を与えなかった。以上のことから、妊娠 15 日にピークを示す胎盤における NO 産生に寄与する iNOS の発現についてはプロジェステロンおよびエストロジェンは関与していない可能性が示唆され、他の因子が関与していることが考えられた。

ラットの胎盤において HIF-1 α mRNA と HIF-1 α タンパクは恒常的に発現していた。さらに、NO 産生がピークを示す妊娠 15 日に NOS 阻害剤 L-NAME を用いて NO の産生を抑制すると、HIF-1 α タンパクが減少し、NO 産生の抑制を解除すると HIF-1 α タンパクは急増した。また、NO 産生が抑制されている時期に HIF-1 α mRNA および iNOS mRNA の発現量が持続的に増加した。これらことから、NO 産生がピークを示す妊娠 15 日には HIF-1 が iNOS の産生調節を介して NO 産生を制御していると考えられた。そして、NO 産生が最も低値を示す妊娠 21 日においては NO 産生を抑制しても HIF-1 α mRNA と HIF-1 α タンパクの発現には変化がなく、一方、TNF- α mRNA の発現と iNOS mRNA の発現は増加した。以上のことから、妊娠 21 日には HIF-1 による iNOS を介する NO 産生の制御機構は消失して、TNF- α により iNOS を介する NO 産生の制御機構が働いている可能性が示唆された。

胎盤における NO の役割をみるために、NO 産生がピークを示す妊娠 15 日と低値を示す妊娠 21 日のラットを用いて、L-NAME を持続注入し、NO 産生を抑制して、VEGF mRNA および GLUT-1 mRNA の発現量を RT-PCR を用いて解析した。妊娠 15 日においては L-NAME 注入により NO 産生は有意に減少し、同時に VEGF mRNA の発現も一時的に減少したが、その後、徐々に回復した。一方、GLUT 1 mRNA の発現は NO 産生量の減少にともなって徐々に増加した。妊娠 21 日においては L-NAME により NO 産生を抑制しても VEGF mRNA と GLUT 1 mRNA の発現に変化は見られなかった。以上のことから、NO 産生量の多い妊娠 15 日においては、VEGF の発現に

は NO が必要であること、GLUT 1 の発現には NO 産生抑制時の代償機構が存在していることが示唆された。

以上のことから、胎盤における NO 産生とその調節機構は複雑で十分に解明されていないが、本研究でこの NO 産生とその調節機構をある程度解き明かすことでできた。ラット胎盤における NO とそれを取り囲む HIF-1 α 、TNF- α 、VEGF そして GLUT 1 など様々な因子との関係が明らかになった。今後は *in vitro* の実験で精査する必要があると思われる。

8. 謝辞

本研究を遂行するにあたり指導教員および主査として多大なるご指導を頂いた麻布大学獣医学部動物工学研究室教授滝沢達也博士に心から感謝いたします。博士後期課程の3年間の短い期間でしたが、学問への接し方を学び、深く感謝します。

同研究室講師田中和明博士には、実験方法や研究室のゼミで多くのご指導とご助言を頂きましたことを心より感謝いたします。

学位審査の副査をお引き受け頂いた生物科学総合研究所所長・教授代田欣二博士、解剖学第2研究室教授山本雅子博士ならびに、食品科学研究室助教授森田英利博士には論文の御校閲と貴重な御助言を賜り、深くお礼を申し上げます。

食品科学研究室共同研究員吉川宏博士には、EPR 解析に関してのご指導とご助言を頂き、心より感謝いたします。

最後に本研究に協力して下さった動物工学研究室内の学生にお礼を申し上げます。

9. 引用文献

Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J.* 7: 349-360, 1993.

Baldwin SA. Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport protein. *Biochem. Biophys. Acta.* 1154: 17-49, 1993.

Barath P, Fishbein MC, Cao J, Berenson J, Helfant RH and Forrester JS. Tumor necrosis factor gene expression in human vascular intimal smooth muscle cells detected by in situ hybridization. *Am. J. Pathol.* 137: 503-, 1990.

Baylis SA, Strijbos PJLM, Sandra A, Russell RJ, Rijhsinghani A, Charies IG and Weiner CP. Temporal expression of inducible nitric oxide synthase in mouse and human. *Molecular Human Reproduction* 5 : 277-286, 1999.

Bridgeman J. A morphological study of the development of the placenta of the rat I. *J. Morphology.* 83: 61-86, 1948.

Bridgeman J. A morphological study of the development of the placenta of the rat II. *J. Morphology.* 84: 195-224, 1949.

Burchardt M, Burchardt T, Chen MW, Shabsigh A, de la Taille A, Buttyan R and Shabsigh R. Expression of messenger ribonucleic acid splice variants for vascular endothelial growth factor in the penis of adult rats and humans. *Biol.Reprod.* 60: 2: 398-404, 1999.

Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-395, 2000.

Chin K, Kurashima Y, Ogura T, Tajiri H, Yoshida S and Esumi H. Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* 15: 4: 437-442, 1997.

Chung IY and Benveniste EN. Tumor necrosis factor- α production by astrocytes: induction by lipopolysaccharide, IFN- γ , and IL-1 β . *J. Immunol.* 144: 2999-3007, 1990.

Conrad KP, Joffe GM, Kruszyna H, Kruszyna R, Rochelle LG, Smith RP, Chavez JE and Mosher MD. Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. *FASEB J.* 7: 566-571. 1993.

Das UG, Sadiq HF, Soares MJ, Hay WW and Devaskar SU. Time-dependent physiological regulation of rodent and ovine placental glucose transporter (GLUT-1) protein. *Am. J. Physiol. Reg. Integ. Comp. Physiol.* 274: R339-R347, 1998.

Dong Y-L, Fang L, Gangula P.R and Yallampalli C. Regulation of inducible nitric oxide synthase messenger ribonucleic acid expression in pregnant rat uterus. *Biol. Reprod.* 59: 933-940, 1998.

Dulak J, Jozkowcz A, Dembinska-Kiec A, Guevara I, Zdzienicka A, Zmudzinska-Grochot D, Florek I, Wojtowicz A, Szuba A and Cooke JP. Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 659-666, 2000.

江口保暢. 新版家畜発生学 文永堂, p61-65, 1992

Feldman PL Griffith OW and Stuehr DJ. The surprising life of nitric oxide. *Chem. Eng. News.* 20: 26-38, 1993.

Ferrara N and Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 18: 4-25, 1997.

Forsythe JA, Jiang BH, Lyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD and Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 16: 4604-4613, 1996.

Fosterman U, Boissel JP and Kleinert H. Expression control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS II). *FASEB J.* 12: 773-790, 1998.

Geller D, Nussler AK, Slivio M, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Wang SC, Simmons RL and Billiar TR. Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 522-526, 1993.

Gonzalez A, Lopez AS, Alegre E, Alcazar JL and Lopez-Moratalla N. Does nitric oxide play a role in maternal tolerance towards the foetus? *J. Physiol. Biochem.* 60: 227-38, 2004.

Griffith OW and Stahr DJ. Nitric oxide synthase: Properties and catalytic mechanism. *An Rev, Physiol.* 57: 707-736, 1995.

Guimond M.J, Luross J.A, Wang B, Terhort C, Danial S and Croy S. Absence of natural killer cell during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in TgE26 mice. *Biol. Reprod.* 56: 169-179, 1997.

Guimond MJ, Wang B and Croy BA. Engraftment of bone marrow from severe combined immunodeficient (SCID) mice reverses the reproductive deficits in natural killer cell-deficient tg epsilon 26 mice. *J Exp Med.* 187: 217-23, 1998.

Hull AD, White CR and Pearce WJ. Endothelium-derived relaxing factor and cyclic GMP-dependent vasorelaxation in human chorionic plate arteries. *Placenta.* 15: 365-375, 1994.

Hung LE, Arary Z, Livingston DM and Bunn F. Activation of hypoxia inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its α subunit. *J. Biol. Chem.* 271: 32253-32259, 1996.

Hung LE, Gu J, Schau M and Bun FC. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 7987-7992, 1998.

Hunt JS, Miller L, Vassmer D and Croy BA. Expression of the inducible nitric oxide synthase gene in mouse uterine leukocytes and potential relationships with uterine function during pregnancy. *Biol. Reprod.* 57: 827-836, 1997.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE and Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 9265-9269, 1987.

Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY and Semenza GL. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes. Dev.* 12: 149-162, 1998.

Izumi H, Yallampalli C and Garfield RE. Gestation changes in L-arginine-induced relaxation of pregnant rat and human myometrial smooth muscle. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 169:1327-1337, 1993.

Jozkowitz A, Cooke PJ, Guevara I, Huk I, Funovics P, Pachnger O, Weidinger F and Dulak J. Genetic augmentation of nitric oxide synthase increases the vascular generation of VEGF. *Cardiovascular Res.* 51: 773-783, 2001.

Jwell UR, Kvietikava I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH and Gassman M. Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J.* 15: 1313-1314, 2000.

Kallio P.J, Wilson W.J, O'Breien S Makino Y and Poelliger L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 α by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 274: 6519-6522, 1999.

Keshav S, Lawson L, Chung LP, Stein M, Perry VH and Gordon S. Tumor necrosis factor mRNA located to Paneth cells of normal murine intestinal epithelium by in situ hybridization. *I. Exp. Med.* 171: 327-331, 1990.

Kimura H, Weisz A, Kurashima Y, Hashimoto K, Ogura T, D'Acqisto F, Addeo R, Makuuchi M and Esumi H. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcription regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood.* 95: 189-197, 2000.

Kroll J and Waltenberger J. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 252: 3: 743-746, 1998.

Lyall F, Bulner JN, Kelly H, Duffie E and Robson SC. Human trophoblast invasion and spiral artery transformation. *Am. J. Pathol* 154: 1105-1114, 1999.

Marino MW, Dunn A, Grail D, Inglese M, Noguchi Y, Richards E, Jungblith A, Wada H, Moore M, Williamson B, Basu S and Old L. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 8093-8098, 1997.

Matsumi H. Yano T. Koji T. Ogura T, Tsutsumi O, Taketani Y and Esumi H. Expression and localization of inducible nitricoxide synthase in the rat ovary. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243: 67-72, 1998.

Melillo G, Musso T, Sica A, Taylor LS, Cox GW and Varesio L. A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J. Exp. Med.* 182: 6: 1683-1693, 1995.

Mitchell JA and Yochin JM. Intrauterine oxygenation during the estrous cycle in the rat: Its relation to uterine respiration and vascular activity. *Endocrinology*. 83: 701-705, 1968.

Moncada S, Palmer PMJ and Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142, 1991.

森. ラット子宮における一酸化窒素 (NO) 産生と NO 合成酵素 (NOS) アイソフォームの発現およびその調節機構. 41-42, 2006.

Morris NH, Eaton B.M and Sooranna SR. NO synthase activity in placenta bed and tissues from normotensive pregnant women. *Lancet*. 342: 679-680, 1993.

Morris SM, Jr and Billiar TR. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am.J.Physiol.* 266: 6 Pt 1: E829-39, 1994.

Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE and Lodish HF. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science*. 229: 941-945, 1985.

Mueckler M. Facilitative glucose transporters. *Eur. J. Biochem.* 219: 713-725, 1994.

Myatt L, Brewer AS, Langdon G and Brockman DE. Attenuation of the vasoconstrictor effects of thromboxane and endothelin by nitric oxide in the human fetal-placental circulation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 166: 224-230, 1992

Myatt L, Eis AL and Brokman DE. Inducible (type II) nitric oxide synthase in human placental villous of normotensive, pre-eclamptic and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Placenta*. 18: 261-268, 1997.

Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6: 3051-3064, 1992.

Ogando D, Farina M, Riberio ML, Martinez SP, Cella M, Rettor V and Franchi A. Steroid hormones augment nitric oxide synthase activity and expression in rat uterus. *Reprod. Fertil. Devel.* 15: 269-274, 2003.

Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH and Johns RA. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am. J. Physiol.* 274: 2 Pt 1: L212-9, 1998.

Palmer RMJ, Ferrige AG and Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 327: 522-526, 1987.

Powell JD, Elshtein R, Forest DJ and Palladino MA. Stimulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) protein in the adult rat testis following ischemic injury occurs without an increase in HIF- messenger RNA expression. *Biol. Reprod.* 67 : 995-1002, 2002.

Purcell TL, Given R, Chwalisz K and Garfield RE. Nitric oxide synthase distribution during implantation in the mouse. *Mol. Hum. Reprod.* 5: 467-475, 1999.

Ramsay B, de Belder A, Campbell S, Moncada S and Martin JF. A nitric oxide donor improves uterine artery diastolic blood flow in normal early pregnancy and in women at high risk of pre-eclampsia. *Eur. J. Clin. Invest.* 24: 76-78, 1994.

Reilly FD and Russell PT. Neurohistochemical evidence supporting an absence of adrenergic and cholinergic innervation in the human placenta and umbilical cord. *Anat. Rec.* 188: 277-286, 1997.

Robbins DS, Shirazi Y, Drysdale B.E, Leiberman A, Shin HS and Shin ML. Production of cytotoxic factor for oligodendrocytes by stimulated astrocytes. *J. Immunol.* 139: 2593-2597, 1987.

Rosselli M, Kellor PJ and Duboy RK. Release of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum. Reprod. Update.* 4: 3-24, 1998.

桜井弘. EPR の技法-バイオサイエンスの電子スピン共鳴-日本学会出版センター, p18-19, 2003.

Salceda S. and Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 α protein is rapidly degraded by ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions *J. Biol. Chem.* 272: 22642-22647, 1997.

Sanyal MK. Secretion of progesterone during gestation in the rat. *J. Endocrinol.* 79: 2: 179-190, 1978.

Semenza GL. Regulation of erythropoietin production. New insights into molecular mechanisms of oxygen homeostasis. *Hematol.Oncol.Clin.North Am.* 8: 5: 863-884, 1994.

Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor-1: control of oxygen homeostasis in health and disease. *Prdiatic. Res.*49: 614-617, 2001.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS and Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 219: 4587: 983-985, 1983.

Senger DR, Van de Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM and Dvorak HF. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev.* 12: 3-4: 303-324, 1993.

Shaikh AA. Estrone and estradiol levels in the ovarian venous blood from rats the estrous cycle and pregnancy. *Biol. Reprod.* 5: 207-307, 1971.

Shukovski L and Tsafiriri A. The involvement of nitric oxide in the ovulatory process in the rat. *Endocrinology*. 135: 2287-2290, 1994.

Silen ML, Firpo A, Morgello S, Lowry SF and Francust T. Interleukin-1 α and tumor necrosis α cause placental injury in the rat. *Am. J. Pathol.* 135: 239-244, 1989.

Sladek SM, Ronald R, Magness RP and Conrad KP. Nitric oxide and pregnancy. *Am. J. Physiol. Reg. Integ. Comp. Physiol.* 272: R441-R463, 1997.

Stroka DM, Burkhardt T, Desbaillets I, Wenger RH, Neil DA, Bauer C, Gassmann M and Candinas D. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J.* 15: 13: 2445-2453, 2001.

Sutter CH, Langher E and Semenza GL. Hypoxia inducible factor -1 α protein expression is controlled by oxygen regulated ubiquitination that is disrupted by deletion and missense mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 4748-4753, 2000.

Suzuki Y, Fujii S, Numagami Y, Tominaga T, Yoshimoto T and Yoshimura T. In vivo nitric oxide detection in the septic rat brain by electron paramagnetic resonance. *Free Radic. Res.* 28: 3: 293-299, 1998.

高橋迪雄. 哺乳類の生殖生物学 学窓社, p132-134, 203.

Takizawa T, Yoshikawa H, Yamada M and Morita H. Expression of nitric oxide synthase isoforms and detection of nitric oxide in rat placenta. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 282: C762-C767, 2002

Takata K, Kasahara T, Kasahara M, Ezaki O and Hirano H. Erythrocyte/HepG2-type glucose transporter is concentrated in cells of blood-tissue barriers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173: 67-73, 1990.

Takata K. Glucose transporters in the transepithelial transport of glucose. *J. Electron. Microsc.* 45: 275-285, 1996.

Takata K, Fujikura K and Shin B. Ultrastructure of the rodent placental labyrinth: a site of barrier and transport. *J. Reprod. Dev.* 43: 13-24, 1997.

Thanda M, Saheki S, Kitagawa H, Yano J, and Matsuura S. Gestational changes in nitric oxide synthase activity in the rat placenta. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 22: 267-273, 1996.

Thiemermann C, Wuc C, Szabo C, Perrett M and Vane JR. Role of tumor necrosis factor in the induction of nitric oxide synthase in rat model of endotoxin shock. *Br. J. Pharmacol.* 110: 177-182, 1993.

Wang GL and Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 268: 29: 21513-21518, 1993.

Wang GL, Jiang B-H, Rue EA and Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 92 : 5510-5514, 1995

Woclawek-Potocka I, Deptula K, Bah MM, Lee H.Y, Okuda K and Skarzynski DJ. Effects of nitric oxide and tumor necrosis factor- α on production of prostaglandin F₂ α and E₂ in bovine endometrial cells. *J. Reprod. Dev.* 50: 333-340, 2004.

Xie QW, Whisnant R and Nathan C. Promotor of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducible by interferon- γ and bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 177: 1779-1784, 1993.

Yallampalli C, Buhimschi I, Chwalisz K, Garfield RE and Dong Y-L. Preterm birth in rats produce by the synergistic action of a nitric oxide inhibitor (NG-nitro-L-arginine methyl ester) and an antiprogesterin (onapristone). *Am. J. Obstet. Gynecol.* 175:207-212, 1996.

Yallapalli C, Byam-Smith M, Nelson SO and Gafield RE. Steroid hormone modulate the production of nitric oxide and cGMP in the uterus. *Endocrinology.* 134 : 1971-1974, 1994.

Yallampalli C, Izumi H, Byam-Smith M and Garfield RE. An L-arginine-nitric oxide –cyclic guanosine monophosphate system exists in the uterus and inhibits contractility during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 170:175-185, 1993.

Yelavarthi KK, Chen H-L, Yang Y, Cowley BD, Fiahback JL and Hunt JS. Tumor necrosis factor α mRNA and protein in the rat uterine and placental cells. *J. Immunol.* 146: 3840-3848, 1991.

吉村哲彦. NO 一酸化窒素-宇宙から細胞まで- 共立出版, p81-84, 1999.

吉村哲彦. NO 一酸化窒素-宇宙から細胞まで- 共立出版, p90-91, 1999.

Yoshimura T, Yokoyama H, Fujii S, Takayama F, Oikawa K and Kamada H. In vivo EPR detection and imaging of endogenous nitric oxide in lipopolysaccharide-treated mice. *Nat. Biotechnol.* 14: 8: 992-994, 1996.

Yu AY, Fraid M.G, Shimoda L.A, Wieher CM, Stenmark K and Semenza G-L. Temporal, spatial and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *Am. J. Physiol. Lung, Cell. Mol. Physiol.* 275: L818-L826, 1998.

Yui J, Gracia-lloret M, Wegmann TG and Guilbert LJ. Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta.* 15: 819-835, 1994.

Zhang X, Huang CJ, Nazarian R, Ritchie T, de Vellis JS and Noble EP. Isolation of nuclear proteins from human brains. *BioTechniques*. 22 : 848-850, 1996.

Zini A, Lamirande E.D and Gagnon C. Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation in vitro. *J. Andro*. 16: 424-431, 1995.

Zumft WG. The biological role of nitric oxide in bacteria. *Arch. Microbio*. 160: 253-264, 1993.