

氏名(本籍)	池田 義 則 (埼玉県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	甲第32号
学位授与年月日	平成19年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	ラット胎盤における一酸化窒素(NO)産生とその調節機構
論文審査委員	(主査) 滝 沢 達 也 (副査) 代 田 欣 二 山 本 雅 子

論 文 内 容 の 要 旨

一酸化窒素(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産生が増加していると考えられる。

胎盤においてもNOSの存在は報告されており、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の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アイソフォーム発現の解析、(2)NO産生に及ぼすステロイドホルモンの影響、(3)NO産生に及ぼす低酸素誘導因子(Hypoxia Inducible Factor-1 α : HIF-1 α)と腫瘍壊死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α : TNF- α)の関与、(4)NOが血管内皮増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF)とグルコーストランスポーター1(Glucose Transporter1: GLUT 1)に及ぼす影響について、NO産生を直接測定できるスピントラップ・EPR法とNOS阻害剤L-NAMEを用いた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アイソフォーム発現の解析

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)を用いてNOをスピントラップした後、電子常磁性共鳴吸収(Electron Paramagnetic Resonance: 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アイソフォームの発現をRT-PCR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解析を行うと、胎盤におけるNO産生は妊娠13日から21日まで認められた。次に、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の発現を解析すると、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、eNOSmRNAの発現は妊娠期間を通じて認められたものの、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、NO産生に対するeNOSの寄与は少ないと考えられた。

(2) ラット胎盤におけるNO産生に及ぼすステロイドホルモンの影響

(1) においてラット胎盤におけるNO産生をスピントラップ・EPR法により解析すると、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。子宮内膜においてはステロイドホルモンによりNOSの発現が影響されることから、胎盤におけるNO産生に及ぼすステロイドホルモンの影響を抗ステロイド剤を用いて検討した。

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) ラット胎盤におけるNO産生に及ぼすHIF-1 α およびTNF- α の関与

(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ていない可能性が示され、他の因子の関与が考えられた。そこで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と炎症性サイトカインの一つであるTNF- α の関与について検討した。なお、HIF-1については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、HIF-1 α タンパク量およびTNF- α mRNAをRT-PCRとウエスタンブロットにより解析した。次に、NO産生のピークを示す妊娠15日とNO産生が最も低値を示す妊娠21日のラットにNOS阻害剤L-NAMEを持続注入するNO産生抑制モデルを作製し、その後、胎盤中のNO産生量、HIF-1 α タンパク量、HIF-1 α mRNA、iNOSmRNAおよびTNF- α mRNAの発現量を解析した。

HIF-1 α mRNA発現、HIF-1 α タンパク量、TNF- α mRNA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、NO産生がピークにあたる妊娠15日のラットにNOS阻害剤L-NAMEを持続注入することにより、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の発現量はL-NAME注入後から持続的に増加した。しかし、TNF- α mRNA発現量に変化は認められなかった。

一方、NO産生が最も低値を示す妊娠21日では、NO産生を減少させてもHIF-1 α タンパク量およびHIF-1 α mRNAの発現に変化は認められなかった。しかし、TNF- α mRNAの発現は対照群に比べて約5倍に増加し、iNOSmRNAの発現も増加していた。

以上のことからHIF-1 α mRNAとHIF-1 α タンパクおよびTNF- α mRNAはラットの胎盤において恒常的に発現している。また、NO産生がピークを示す妊娠15日の胎盤では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 タンパクは回復すること、さらに、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がiNOSを介してNO産生を制御している可能性が示唆された。一方、NO産生が最も低値を示す妊娠21日においては、L-NAME注入後NO産生が減少してもHIF-1 α タンパク量およびHIF-1 α mRNAの発現に変化は認められなかったが、TNF- α mRNA発現量が急増し、また、iNOSmRNAも増加したことから、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、iNOSはTNF- α を介して誘導されている可能性が示唆された。

(4) VEGFおよびGLUT1に及ぼすNOの影響

胎盤においては主にGLUT1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。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GLUT1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がVEGFおよびGLUT1に及ぼす影響を検討した。

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産生を抑制し、その後、経時的にNO産生量、VEGFmRNAおよびGLUT1mRNAの発現量を解析した

L-NAME注入により妊娠15日のNO産生を抑制させると、VEGFmRNAの発現量は一時的に減少し、その後、徐々に回復した。また、GLUT1 mRNAの発現量は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NO産生を抑制しても、VEGFmRNAとGLUT1mRNAの発現量に変化は見られなかった。

以上のことから、NO産生がピークを示す妊娠15日においては、NO産生を抑制するとVEGFの発現が減少することから、NOがこの時期の胎盤におけるVEGF発現を促進していること、GLUT1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。

以上の結果からラット胎盤におけるNOの産生は妊娠15日にピークを示し、このNO産生は主にiNOSにより調節されているものと考えられた。そして、胎盤におけるこの時期のNOS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された。さらに、NO産生がピークを示す妊娠15日ではHIF-1がiNOSを介してNO産生量を制御していると考えられた。また、NO産生が低値を示す妊娠21日では、TNF- α を介して誘導されていることが示唆された。また、NO産生量の多い妊娠15日に

おいては、NOがVEGFの発現を促進していること、および、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された。

論文審査の結果の要旨

一酸化窒素 (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産生が増加していると考えられる。

胎盤においてもNOSの存在は報告されており、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の役割についても不明な点が多い。

これらの背景から、本論文では、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ことを目的として、NO産生を直接測定できるスピントラップ・EPR法とNOS阻害剤L-NAMEを用いたNO産生抑制モデルを用いて検討している。

(1) ラット胎盤におけるNO産生とNOSアイソフォーム発現の解析

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が少ないため、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) を用いてNOをスピントラップした後、電子常磁性共鳴吸収 (Electron Paramagnetic Resonance: EPR) 装置によりNO産生量を解析し、さらに、NO産生に寄与するNOSアイソフォームの発現をRT-PCRにより検討している。

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解析を行うと、胎盤におけるNO産生は妊娠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日まで減少した。次に、無処置ラットの胎盤のiNOSmRNAおよびeNOSmRNAの発現を解析すると、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、eNOSmRNAの発現は妊娠期間を通じて認められたものの、その発現量はほぼ一定であったとの結果を得ている。

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、また、NO産生に対するeNOSの寄与は少ないものと推論している。

(2) NO産生に及ぼすステロイドホルモンの影響

子宮内膜においてはステロイドホルモンによりNOSの発現が影響されることから、胎盤におけるNO産生に及ぼすステロイドホルモンの影響を抗ステロイド剤を用いて検討している。

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、抗ステロイド剤の影響は認められなかったことから、胎盤におけるこの時期のNOSの発現はステロイドホルモンの影響を受けていないことを明らかにしている。

(3) NO産生に及ぼす低酸素誘導因子 (Hypoxia Inducible Factor: HIF-1 α) と腫瘍壊死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α : TNF- α) の関与

(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ていない可能性が示されたことから、他の因子として、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と炎症性サイトカインの一つであるTNF- α の関与について検討している。

妊娠13日から21日のHIF-1 α mRNA発現量、HIF-1 α タンパク量およびTNF- α mRNA発現量を解析することにより、HIF-1 α mRNA発現、HIF-1 α タンパク量、TNF- α mRNA発現は妊娠13日から21日まで認められたことから、HIF-1 α mRNAとHIF-1 α タンパクおよびTNF- α mRNAはラットの胎盤において恒常的に発現している。次に、NO産生のピークを示す妊娠15日とNO産生が最も低値を示す妊娠21日のラットにNOS阻害剤L-NAMEを持続注入し、NO産生を抑制した後の胎盤中のNO産生量、HIF-1 α タンパク量、HIF-1 α mRNA、iNOSmRNAおよびTNF- α mRNAの発現量を解析することによりNO産生に及ぼすHIF-1 α とTNF- α の関与を検討している。

NO産生がピークを示す妊娠15日の胎盤では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 タンパクは回復すること、さらに、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がiNOSを介してNO産生量を制御していると推論している。一方、NO産生が最も低値を示す妊娠21日においては、L-NAME注入後NO産生が減少してもHIF-1 α タンパク量およびHIF-1 α mRNAの発現に変化は認められなかったが、TNF- α mRNA発現量が急増し、また、iNOSmRNAも増加したことから、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、iNOSはTNF- α を介して誘導されていると推論している。

(4) NOが血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) とグルコーストランスポーター1 (Glucose Transporter 1: GLUT 1) に及ぼす影響

胎盤では主にGLUT1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。さらに、VEGFとGLUT1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がVEGFおよびGLUT1に及ぼす影響を検討している。

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GLUT1mRNAの発現量を解析している。

L-NAME注入により妊娠15日のNO産生を抑制させると、VEGFmRNAの発現量は一時的に減少し、その後、徐々に回復した。また、GLUT1 mRNAの発現量は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NO産生を抑制しても、VEGFmRNAとGLUT1mRNAの発現量に変化は見られなかった。これらのことから、NO産生がピークを示す妊娠15日では、VEGFの発現にはNOが必要であることから、NOがこの時期の胎盤におけるVEGF発現を促進していること、GLUT1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を明らかにしている。

このように本論文はラット胎盤におけるNOの産生は妊娠15日にピークを示し、このNO産生は主にiNOSにより産生されていることを明らかにした。そして、胎盤におけるこの時期のNOS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を見だし、さらに、NO産生がピークを示す妊娠15日ではHIF-1がiNOSを介してNO産生を制御していること、また、NO産生が低値を示す妊娠21日では、TNF- α を介して誘導されていることを明らかにした。また、NO産生量のピークとなる妊娠15日においては、VEGFの発現にはNOが必要であること、および、GLUT1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を明らかにしている。

このように本論文は多方面からの研究方法を駆使し、その結果に多くの新知見を得ている。したがって、本論文は動物応用科学の発展に貢献するところ大であり、博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと判定した。