

胎盤と子宮における NO 産生の意義と NOS 遺伝子発現調節機構

Expression of nitric oxide synthase isoforms and detection of nitric oxide in rat placenta and uterus during pregnancy

滝沢達也, 神作宜男, 田中和明

麻布大学大学院獣医学研究科

TAKIZAWA Tatsuya, KANSAKU Norio, TANAKA Kazuaki

Graduate School of Veterinary Medicine, Azabu University

Abstract. The NO production level was examined by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy with Fe-N- (dithiocarboxy) sarcosine (DTCS) complex as NO-trapping reagent. The expression of nitric oxide synthase (NOS) isoform was also examined by quantitative reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction (RT-PCR). In the whole uterus, NO production was first detected by EPR spectroscopy on day 13.5 of gestation, and the NO level reached a peak on day 17.5 of gestation, and then significantly decreased through the last few days of gestation, resulting the same level of non-pregnant rats. The NO production in the whole uterus is mostly derived from the decidua through the gestation. In the decidua, the expression of NOS II mRNA as measured by quantitative RT-PCR was stronger than that of NOS III mRNA, and the NOS II mRNA expression pattern was in good agreement with the NO production pattern, whereas NOS III mRNA expression showed no marked changes during gestation except a temporal increase at the term. In addition, NOS isoform expression at the peak of NO production stages (day 17.5) was examined after treatment with RU486, an anti-progesterone reagent, or raloxifene, an anti-estrogen reagent. The expression of the NOS II in the decidua at this stages was significantly decreased by these anti-steroid hormone treatments alone, but not affected by co-treatment of anti-progesterone and anti-estrogen treatment. NOS III expression was not affected by these anti-steroid hormone treatments. The present results indicate that uterine NO production was gestational stage-dependent, and the peak of NO production on day 17.5 was derived from the decidua and decidual NO production were mainly regulated by the expression of NOS II. The expression of NOS II was modified by steroid hormones, suggesting that steroid hormones up-regulate the iNOS expression in the decidua through the gestation to maintained the whole uterine NO production.

1. 目 的

一酸化窒素 (NO) は常温で気体のフリーラジカルである。1987年にNOは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(1, 2)。その後、NOはL-arginineと酸素(O₂)を基質としてNO合成

酵素(nitric oxide synthase: NOS)により産生され、生体内で多様な作用を有していることが明らかになった(3)。

NOは酸化されて亜硝酸塩や硝酸塩になり、これらの尿中への排泄が妊娠期間中に増加することから、NOが妊娠維持に重要な作用を有していることが示唆されている(4)。また、生理的、病態生理学的な

NOの役割の解明には、濃度と分布を明らかにすることが重要と考えられているが、NOが不安定な寿命の短いフリーラジカルであるため解析は困難であり、未解明な点が多数残されている(5, 6)。

近年、ジチオカルバメート鉄錯体であるFe-DTCS (Fe-N-(dithiocarboxy)-sarcosine)を用いて、不安定なNOを安定なNO-Fe-DTCS錯体にトラップした後、電子常磁性共鳴吸収(electron paramagnetic resonance: EPR)装置により解析する方法が報告されている(7, 8)。また、Takizawaら(9)は、Fe-DTCSを用いたスピントラップ-EPR法によりNO産生を検出するだけでなく、定量化できることを報告している。

以上のことから、スピントラップ-EPR法により胎盤と子宮におけるNO産生を解析し、定量的RT-PCR法によりNO産生に寄与するNOSアイソフォームを明らかにすることにより、妊娠期間中の胎盤と子宮におけるNO産生の意義とその調節機構を検討することを目的とした。本研究では、特に子宮におけるNO産生に寄与する脱落膜の寄与に焦点を絞って検討を加えた。

2. 材料と方法

1) 供試動物および妊娠日齢の算定

Crj: Wistar ラット(日本チャールズリバー, 東京)を自家繁殖させて得た10~15週齢のF1動物を用いた。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の正午を妊娠0.5日として起算した。

2) 試薬

ジチオカルバメート鉄錯体としてN-(dithiocarboxy)-sarcosine (DTCS, 同仁化学, 熊本)を用いた。Fe-DTCSの作製はTakizawaら(9)の報告に従った。

3) 電子常磁性共鳴吸収(EPR)法による子宮におけるNO産生の解析

妊娠13.5日から妊娠21.5日のラットの背部にFe-DTCS (500 mg/kg as DTCS)を皮下投与し、30分後にエーテル麻酔下で子宮を取り出した。子宮は、脱落膜と子宮筋層に分離し、それぞれを細切後、石英のEPR試料管へ充填し、ただちに液体窒素で凍結し、

EPR解析に供した。また、NO由来のEPRスペクトルを数値化するために、同時に酸化マンガン(MnO)粉末をEPR解析し、両者のシグナルの高さの比を求めることによりNO-Fe-DTCSのEPRスペクトルを定量化した。

4) 総RNAの抽出と定量的RT-PCR

妊娠13.5日から妊娠21.5日の無処置ラットをエーテル麻酔下で開腹し、上記と同様に子宮筋層と脱落膜を採取し、液体窒素により急速凍結し、RNA抽出まで-80℃で保存した。総RNAの抽出はISOGEN(ニッポンジーン, 富山)を用い、添付のマニュアルに従って実施した。抽出した総RNAは-80℃にて保存した。

定量的RT-PCRは既報(9)に従い実施した。

5) 抗ステロイド剤投与後の子宮脱落膜におけるiNOSmRNAの発現

子宮脱落膜におけるiNOSmRNAの発現に及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RU486と抗エストロジェン剤raloxifeneを用いて、上記と同様な方法により検討した。

3. 結果と考察

1) EPRスペクトルによるNO産生量の定量的解析

Fe-DTCSとNOR1(同仁化学)から作製した標準サンプルNO-Fe-DTCSのEPRスペクトルを求めると、 $g = 2.038$ のところにTakizawaら(9)の報告と同様な3本の超微細構造よりなるEPRスペクトルが認められた。妊娠17.5日の子宮をEPR解析すると、標準サンプルと同じ $g = 2.038$ の部位に、同様なEPRスペクトルが認められたことより、妊娠17.5日のラット子宮においてNOが産生されていると考えられた。

次に、同時に測定したMnOのEPRスペクトルを基に、子宮におけるNO-Fe-DTCS由来のEPRスペクトルを数値化した。子宮においては、妊娠13.5日から21.5日までNO産生が認められ、妊娠17.5日に産生ピークを示した。また、子宮を脱落膜と子宮筋層に分けてNO産生を解析すると、妊娠15.5, 17.5, 19.5日においては、脱落膜におけるNO産生は子宮筋層のNO産生の約2から3倍であり、妊娠期間を通

じた NO 産生パターンも子宮全体の NO 産生パターンと良く一致していた。一方、子宮筋層における NO 産生はどの時期も低値であり、変動幅も小さかった。以上のことから、子宮で産生されている NO はその大半が脱落膜由来と考えられた。

2) 定量的 RT-PCR

妊娠 13.5 日から妊娠 21.5 日の脱落膜において、iNOSmRNA と eNOSmRNA の発現が認められた。iNOSmRNA の発現は、妊娠 17.5 日にピークを示し、その後漸減した。この産生パターンは子宮全体における NO 産生パターンと良く一致していた。eNOSmRNA の発現は妊娠 13.5 日から妊娠 19.5 日までほぼ一定であり、その後妊娠 21.5 日に急増していた。

また、脱落膜における iNOSmRNA の発現は、抗プロゲステロン剤 RU486 と抗エストロゲン剤 raloxifene 剤により、いずれも有意に抑制されたが、eNOSmRNA の発現は影響を受けなかった。

eNOS は細胞内の構成要素であり、刺激因子により細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇すると、カルモデュリン依存性にただちに活性化され、タンパク質 1 モルあたりの NO 産生量は小さい (10)。一方、iNOS 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おり、1 モルあたりの NO 産生量は多い。また iNOSmRNA の発現から NO 産生まである程度の時間が必要であり、Suzuki ら (7) は LPS により iNOS を誘導させたラットにおいては、血中の NO レベルは LPS 投与約 7 時間後にピークに達したと報告している。本実験では NOS タンパク質の発現量の比較はしていないが、NO 産生量は NOS タンパク質 1 モルあたり iNOS でもっとも多く、eNOS でもっとも少ないこと、さらに妊娠 17.5 日の子宮脱落膜における iNOSmRNA の発現が eNOSmRNA の発現よりも多いことから、妊娠 17.5 日をピークとする子宮脱落膜における NO 産生には、eNOS も関与しているものの、iNOS の寄与が大きいものと考えられた。

また、抗プロゲステロン剤 RU486 を事前に処置することにより脱落膜における iNOSmRNA の発現が強く抑制されることから、プロゲステロンにより脱落膜における iNOS が調節されている可能性が強く示唆された。しかしながら、抗プロゲステロン

剤 RU486 と抗エストロゲン剤 raloxifene 剤を単独投与すると、脱落膜における iNOSmRNA の発現は強く抑制されるが、両者を併用投与すると、抑制は解除されることから、脱落膜における iNOSmRNA の発現に及ぼすステロイドホルモンの関与については、さらに検討が必要である。

4. 要 約

妊娠の維持と調節機構に NO が重要な役割を有していることが示唆されているが、NO は不安定なフリーラジカルであるため、解析が困難であった。近年、ジチオカルバメート鉄錯体である Fe-DTCS (Fe-N-(dithiocarboxy)-sarcosine) を用いて、不安定な NO を安定な NO-Fe-DTCS 錯体にトラップした後、電子常磁性共鳴吸収 (electron paramagnetic resonance: EPR) 装置により解析することにより、NO 産生を検出し、定量化できることが報告されている。本研究では、このスピントラップ-EPR 法により子宮における NO 産生を解析し、定量的 RT-PCR 法により NO 産生に寄与する NOS アイソフォームを明らかにすることにより、子宮における NO 産生の調節機構を検討した。

文 献

- 1) Palmer R. M. J., Ferrige A. G. and Moncada S. Nature 327: 524-526, 1987.
- 2) Ignarro L. J., Buga G. M., Wood K. S. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 9265-9269, 1987.
- 3) Marletta M. A. Trends Biochem. Sci. 14 : 488-492, 1989.
- 4) Rosselli M., Keller P. J. and Dubey R. K. Hum. Reprod. Update 4: 3-24, 1998.
- 5) Archer S. FASEB. J. 7: 349-360, 1993.
- 6) 吉村哲彦 ファルマシア 29: 990-993, 1993.
- 7) Suzuki Y., Fujii S., Numagami Y., Tominaga T., Yoshimoto T. and Yoshimura T. Fre. Rad. Res. 28: 293-299, 1998.
- 8) Yoshimura T., Yokoyama H., Fujii S., Takayama F., Oikawa K. and Kamada H. Nat. Biotechnol. 14: 992-994, 1996.
- 9) Takizawa T., Yoshikawa H., Yamada M, and Morita H. Am. J. Physiol. 282: C762-C767, 2002.
- 10) Forstermann U., Boissel J. P. and Kleinert H. FASEB. J. 12: 773-790, 1998.