

胎盤と子宮などにおける NO 産生の意義と NOS 遺伝子発現調節機構 —妊娠中期胎盤における NO の役割—

*Expression of nitric oxide synthases isoforms and detection of
nitric oxide in rat placenta during pregnancy
— Possible role of NO on vasculogenesis in rat placenta —*

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

Tatsuya Takizawa, Norio Kansaku and Kazuaki Tanaka

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 placenta, NO production was first detected by EPR spectroscopy on day 13.5 of gestation, and the NO level reached a peak on day 15.5 of gestation, and then significantly decreased through the last few days of gestation. 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. In addition, the VEGF mRNA expression in the placenta was examined to clarify the interaction of NO and VEGF in the placenta using continuous L-NAME, NOS inhibitor, infusion model. The VEGF mRNA expression was significantly decreased through the L-NAME treatment. The present results indicate that placental NO production was gestational stage-dependent, and the peak of NO production on day 15.5 was mainly regulated by the expression of NOS II. The expression of VEGF was reduced by L-NAME treatment, suggesting that NO stimulate the VEGF expression in the mid-term placenta.

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。

スピントラップ-EPR 法を用いて、胎盤における NO 産生を解析するとラットにおいては、妊娠 15.5 日に NO 産生がピークを示し、その後、減少すること、この NO 産生は主に iNOS により調節されていることが示されてきた。ガン細胞において NO が血管新生の主要因子である VEGF (Vascular Endothelial growth factor: 血管内皮増殖因子) の発現を誘導することが報告されている (10)。一方、逆に VEGF が NO 産生を誘導するという報告もある (11)。血管の豊富な胎盤において、VEGF と NO との関係については不明である。そこで、本研究では、特に妊娠中期の胎盤においてピークの認められる NO 産生により VEGF の発現が誘導されているとの仮説を立て、その検証を試みた。

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) L-NAME 持続注入モデルの作製

胎盤における VEGFmRNA の発現に及ぼす NO の影響を検討するために、浸透圧ポンプを用いて、

NOS 阻害剤 L-NAME を、6, 12, 18 または 24 時間持続注入 (65 μ g/分) し、妊娠 15.5 日にサンプリングして、スピントラップ-EPR 法により NO 産生量を解析し、同時に定量的 RT-PCR により VEGFmRNA 発現を解析した。

4) スピントラップ-EPR (電子常磁性共鳴吸収) 法による胎盤における NO 産生の解析

妊娠 15.5 日をサンプリング時とし、30 分前のラット背部に 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。胎盤を取り出し、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。

5) 総 RNA の抽出と定量的 RT-PCR

上記と同様に胎盤を採取し、液体窒素により急速凍結し、RNA 抽出まで -80°C 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°C にて保存した。定量的 RT-PCR は既報 (9) に従い実施した。

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

無処置の妊娠 15.5 日の胎盤からは、既に報告されている標準サンプル NO-Fe-DTCS の EPR スペクトルと同じ $g = 2.038$ のところに Takizawa ら (9) の報告と同様な 3 本の超微細構造からなる EPR スペクトルが認められた。

次に、同時に測定した MnO の EPR スペクトルを基に、胎盤における NO-Fe-DTCS 由来の EPR スペクトルを数値化した。NOS 阻害剤 L-NAME を持続注入 (65 μ g/分) すると、注入 6 時間後には NO 産生は無処置群の約 10% にまで減少し、その後、注入 24 時間後まで一貫して NO 産生が抑制されていた。

2) VEGFmRNA の発現—定量的 RT-PCR—

胎盤における NO 産生が完全に抑制されている L-

NAME 注入 6 時間後から 12 時間後にかけて VEGFmRNA の発現は、有意に低下していた。一方、注入 18 時間後から 24 時間後までは、NO 産生レベルは、引き続き完全に抑制されていたにもかかわらず、VEGFmRNA の発現は L-NAME 注入 18 時間後から無処置と同等のレベルに回復し、注入 24 時間後においても無処置群と同様であった。

既に、妊娠 15.5 日の胎盤における NO 産生は主に iNOS により調節されていることを報告している。ラットにおいては、妊娠 15.5 日は胎盤が著しく増大する時期である。その時期に、NOS 阻害剤により NO 産生を抑制すると、VEGFmRNA の発現が有意に減少したことから、この時期の胎盤で産生される NO が VEGFmRNA の発現を誘導している可能性が示唆された。ガン細胞などにおいても、NO が VEGFmRNA を誘導していることが報告されている (10) ので、この時期の胎盤においても、同様の機構が存在していることが示唆される。

NOS 阻害剤により NO 産生を抑制すると、VEGFmRNA 発現が一時的に抑制されたが、その後正常レベルに回復したことは、VEGFmRNA 発現を促進する別の機構が存在する可能性を示唆している。

HIF (Hypoxia inducible factor : 低酸素誘導因子) は、エリスロポエチン遺伝子のプロモーター領域に結合するタンパク質として発見され、低酸素時に分解が抑制されることにより、HIF 制御下の種々の遺伝子発現を誘導することが知られている。VEGF についても、HIF により誘導されることが報告されているので (12)、NO 産生の抑制が長期化すると、VEGFmRNA の発現が正常レベルに回復したのは、HIF を介した反応である可能性が示唆される。これらの詳細な機構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 法により妊娠ラットを用いて、妊娠中期に発現がピークを示す胎盤における NO 産生の役割を検討した。NOS 阻害剤 L-NAME を用いて、一時的に NO 産生を抑制したモデルを作製したところ、NO 産生の低下とともに血管新生の主要因子である VEGF の発現が抑制されたが、その後徐々に回復した。この結果は、胎盤において産生されている NO は VEGF の発現を誘導している可能性を示唆している。

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) Chin et al., Oncogene 15: 437-442, 1997.
- 11) Kroll J and Waltenberger J. BBRC. 252: 743-746, 1998.
- 12) Forsythe JA, et al., Moll. Cell. Biol. 16: 4604-4613, 1996.