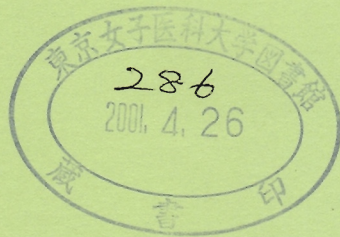


研究課題

動脈管に存在する酸素感受性カリウムチャンネルに関する
分子生物学的研究

(課題番号 11671076)

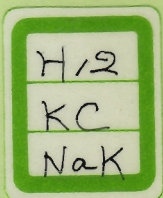
平成11年度—平成12年度 科学研究費補助金 (基盤研究C)
研究成果報告書



平成13年3月

研究代表者 中西敏雄

東京女子医科大学 医学部 助教授



研究課題

動脈管に存在する酸素感受性カリウムチャンネルに関する分子生物学的研究

(課題番号 11671076)

平成11年度－平成12年度 科学研究費補助金 (基盤研究C)
研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 中西敏雄
東京女子医科大学 医学部 助教授

研究組織

研究代表者： 中西敏雄 (東京女子医科大学 医学部 助教授)
研究分担者： 太田真弓 (東京女子医科大学 医学部 助手)
研究分担者： 萩原誠久 (東京女子医科大学 医学部 助教授)
研究分担者： 松岡瑠美子 (東京女子医科大学 医学部 助手)
研究分担者： 相羽 純 (東京女子医科大学 医学部 助手)
研究分担者： 門間和夫 (東京女子医科大学 医学部 教授)

研究経費

平成11年度 2700千円
平成12年度 1200千円

計 3900千円

研究発表

学会誌

1. Wu G, Nakanishi T, Shen J, Momma K. The effect of vitamin A on contraction of the ductus arteriosus in fetal rat. *Pediatric Research* 2001, 49:000-000 (in press)
2. Shen J, Nakanishi T. Developmental changes in voltage-gated potassium channels and ATP-dependent potassium channels in the ductus arteriosus of fetal rat. *Circulation* 2000, 102: Suppl II-425.
3. Katsube Y, Nakanishi T. Effect of hypoxia on Na-Ca exchange in smooth muscle cells of the pulmonary resistance artery in neonates. *Circulation* 2000, 102: Suppl II-427 .
4. Wu G, Nakanishi T. Developmental changes in contractile system of vascular smooth muscle in the ductus arteriosus: modulation by retinoids. *Circulation* 2000, 102: Suppl II-425.

口頭発表

1. Shen J, Nakanishi T. Developmental changes in voltage-gated potassium channels and ATP-dependent potassium channels in the ductus arteriosus of fetal rat. Scientific Meeting of American Heart Association. November 12, 2000.
2. Katsube Y, Nakanishi T. Effect of hypoxia on Na-Ca exchange in smooth muscle cells of the pulmonary resistance artery in neonates. Scientific Meeting of American Heart Association. November 12, 2000.
3. Wu G, Nakanishi T. Developmental changes in contractile system of vascular smooth muscle in the ductus arteriosus: modulation by retinoids. Scientific Meeting of American Heart Association. November 12, 2000.
4. 呉桂栄、中西敏雄：Chick embryo心筋標本に於ける心筋収縮と Ca transientの測定。筋収縮細胞研究会。平成12年12月8日
5. 沈青、中西敏雄：胎仔動脈管に存在するイオンチャンネル。平成12年度生理学研究所研究会。
平成12年11月28日
6. 沈青、中西敏雄：酸素による動脈管収縮に於けるエンドセリンの役割。第36回日本小児循環器学会。平成12年7月7日
7. 勝部康弘、沈青、中西敏雄：家兎末梢肺動脈血管平滑筋細胞に於けるNa-Ca交換輸送の酸素による変化。第36回日本小児循環器学会。平成12年7月7日
8. 酸素による未熟動脈管収縮に於けるATP感受性Kチャンネルの関与。第36回日本小児循環器学会。平成12年7月7日

著書

8. Nakanishi T, Gu H. Developmental changes in contractile system of the vascular smooth muscle cells and the effect of acidosis. in Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease. Futura, 2000, pp297-300.

はじめに

動脈管は胎生期には開存しているが、生後閉鎖し、やがて消失する血管で、臨床的に重要であることはもちろん、生物学的にも興味ある血管である。出生後の動脈管の閉鎖機序は、血中の酸素濃度の上昇が関与していることは分かっているが、それ以上の詳しい機序については不明の点が多い。一般に血管のトーンスは静止膜電位に依存するが、その膜電位は主にカリウム (K) チャンネルによって制御されている。以前我々は、酸素による動脈管の収縮機序を調べ、低酸素は動脈管のKチャンネルを開き、膜を過分極させ動脈管を弛緩させる、酸素はKチャンネルを閉じ膜を脱分極させ、Caチャンネルを開き細胞外から内へのCa流入を増加させ収縮をおこすことを示した。本研究は、Kチャンネルが酸素で閉じ低酸素で開口する機序を解明することを目的として施行した。

成果

1) 動脈管平滑筋Kチャンネル

胎生29日の胎仔家兎から動脈管平滑筋細胞を単離し、Kチャンネルの電気生理学的研究を行った。電位固定パッチクランプ法にてK電流を測定した。動脈管には酸素にて閉じ、低酸素にて開口するK電流が存在することが分かった。それと同時に、ATP感受性K電流も、動脈管には、肺動脈に比して多いことが分かった。低酸素でATPが低い状態ではKチャンネルが開き、動脈管は弛緩すると推測された。

2) 動脈管Kチャンネルの遺伝子発現

ラット動脈管から単離したmRNAの動脈管における発現量と、他の血管（大動脈、肺動脈）での発現量を、RT-PCR法にて比較した。酸素にて開口するKチャンネルであるKV 2.1とKV9.3の発現は、肺動脈に比し動脈管で少ないことが分かった。

3) 未熟胎仔におけるATP感受性Kチャンネルの発現

胎生21日のラット胎仔から摘出した動脈管は、酸素で収縮する。ところが、胎生19日のラット胎仔から摘出した動脈管は、酸素で収縮しない。ATP感受性Kチャンネルの阻害剤であるグリベンクラマイドを摘出動脈管に投与すると、21日胎仔動脈管では収縮するが、19日胎仔動脈管では収縮しない。動脈管から単離した平滑筋細胞でATP感受性Kチャンネル電流を測定すると、21日胎仔では19日胎仔にくらべ、ATP感受性Kチャンネル電流は大きかった。胎仔発達とともにATP感受性Kチャンネルが増加する。成熟胎仔では、出生と呼吸開始にともなって、血中酸素濃度が上昇し組織ATP濃度が上昇し、ATP感受性Kチャンネルが閉じることで動脈管の収縮が促されると推測される。

結論

動脈管においては、ATP感受性Kチャンネルが酸素センサーとして重要な役割をはたす。

成果概要 1 . Developmental Changes in Contractile System of the Ductus Arteriosus: Modulation by Retinoids.

Retinoic acid (RA) may play a role in inducing smooth muscle differentiation in the ductus arteriosus (DA) and its process may be important for ductal closure after birth. Oxygen (O_2) increases the intracellular Ca concentration ($[Ca]_i$) of the smooth muscle cells and causes contraction of the DA in the mature fetus, but not in the premature fetus. This study was designed to investigate developmental changes in the contractile system of the ductus arteriosus and the effect of maternal administration of RA on developmental changes in the contractile system of the ductus arteriosus.

Methods: Retinyl palmitate (1 mg /Kg) was injected into pregnant rats one or two days before the experiment and the DA was isolated from the fetus at 19, 20 or 21 days of gestation (term 21 days). The fetus at 19 days of gestation served as a model of premature fetus. The force of isometric contraction of the DA and $[Ca]_i$, using fura-2, were measured. Contraction of the DA was induced by changing the anoxic solution to an oxygenated solution. The size of the intracellular Ca pool was examined using caffeine in the Ca^{2+} - and Na^{+} -free solution. Maximal contraction by membrane depolarization was induced by 120 mM KCl.

Results: In both the control fetus (CF) and the fetus treated with retinoids (RF), high KCl caused significant contraction and increases in $[Ca]_i$ in all age groups ($n=6$) and the maximal contraction and increases in $[Ca]_i$ in the RF were similar to those in the CF. O_2 caused DA contraction and increases in $[Ca]_i$ in the CF at 20 and 21 days, but not at 19 days of gestation. In the RF, O_2 caused contraction and increases in $[Ca]_i$ in all age groups and the degree of contraction and increases in $[Ca]_i$ were significantly greater than in the CF ($n=12$). The caffeine-induced contraction and increases in $[Ca]_i$ were similar in the CF and RF, at 19 days of gestation.

These data suggest that 1) the contractile system, including membrane depolarization, $[Ca]_i$ increase, and its activation of contractile proteins, is already functioning in the premature fetus, but the O_2 -sensing mechanism is underdeveloped, 2) RA accelerates the development of the O_2 -sensing mechanism of the DA.

成果概要 2 . Voltage dependent K Channels (KV) mRNA Expression and O₂-sensitive K currents in the Ductus Arteriosus, Pulmonary Artery, and Aorta in the Fetal Rat

Oxygen (O₂) causes contraction of smooth muscle cells (SMC) in the ductus arteriosus (DA) and relaxation in the pulmonary artery (PA).

The mechanism of this difference is not known, but voltage-gated, O₂-sensitive K channels have been implicated. In the PA, Kv 1.2, Kv1.5, Kv2.1, and/or KV3.1 may open with O₂. An alpha-subunit Kv9.3 enhances the O₂-sensitivity of Kv2.1 and beta-subunits may also modulate gating properties of the alpha-subunits. The present study evaluated if the expression of mRNA and O₂-sensitivity of the K channels in the DA are different from those in the PA.

Methods:

The DA, main PA, and aorta (AO) were isolated from the fetal rat at 21-days of gestation (term: 22 days). mRNA levels of Kv alpha-subunits (Kv1.2, Kv1.5, Kv2.1, Kv9.3) and beta-subunits (Kvbeta1.1, Kvbeta2, Kvbeta3) were estimated, using RT-PCR and by quantifying the PCR products. O₂-sensitive K currents were measured, using isolated SMC and patch-clamp techniques.

Results:

Under hypoxic conditions (PO₂ 35 mmHg), K currents sensitive to 4-aminopyridine, a blocker of Kv, were present in all vessels studied. O₂ (PO₂ 150 mmHg) caused increases in the K currents in the PA (n=6), but not in the DA and AO (n=6). No significant differences in the levels of mRNA of Kv 1.2, 1.3, 1.5 and 2.1, nor in the levels of beta-subunits among DA, PA, and AO (n=7) were observed. However, mRNA levels of Kv9.3 in the DA and Ao were significantly lower (46±4% and 66~8% of that in PA, respectively) than in the PA.

Conclusion:

There is no significant differences in the mRNA expression of Kv beta-subunits among the fetal vessels. Decreased expression of Kv 9.3 in the DA may reduce the O₂-sensitivity of Kv 2.1, which in turn may contribute to the response of the DA to O₂, which is different from that in the PA.

成果概要 3 . Developmental Changes in Voltage-gated K Channels and ATP-dependent K Channels in the Ductus Arteriosus of Fetal Rat

The ductus arteriosus (DA) constricts after birth when blood O₂ levels increase in mature newborns. However, constriction does not often occur in premature newborns. Its mechanism is unknown. As an O₂ sensor of DA, O₂-sensitive K_v and KATP have been implicated and these ion channels may be underdeveloped in premature newborns. The purpose of the present study was to investigate development of these ion channels in the smooth muscle cells of the DA.

Methods:

DA was isolated from the fetal rat at 19 or 21 days of gestation (term: 22 days). The force of isometric contraction of intact rings was measured. K_v and KATP currents were measured using single smooth muscle cells and patch clamp techniques. The DA contraction and K currents were measured by changing solution from an anoxic (PO₂ 35 mmHg) to an oxygenated solution (PO₂ 150 mmHg) or to a solution containing K_v channel inhibitor 4-aminopyridine (4AP, 5mM), KATP channel opener pinacidil (300uM), or the KATP blocker glybenclamide (Glyb, 4 uM).

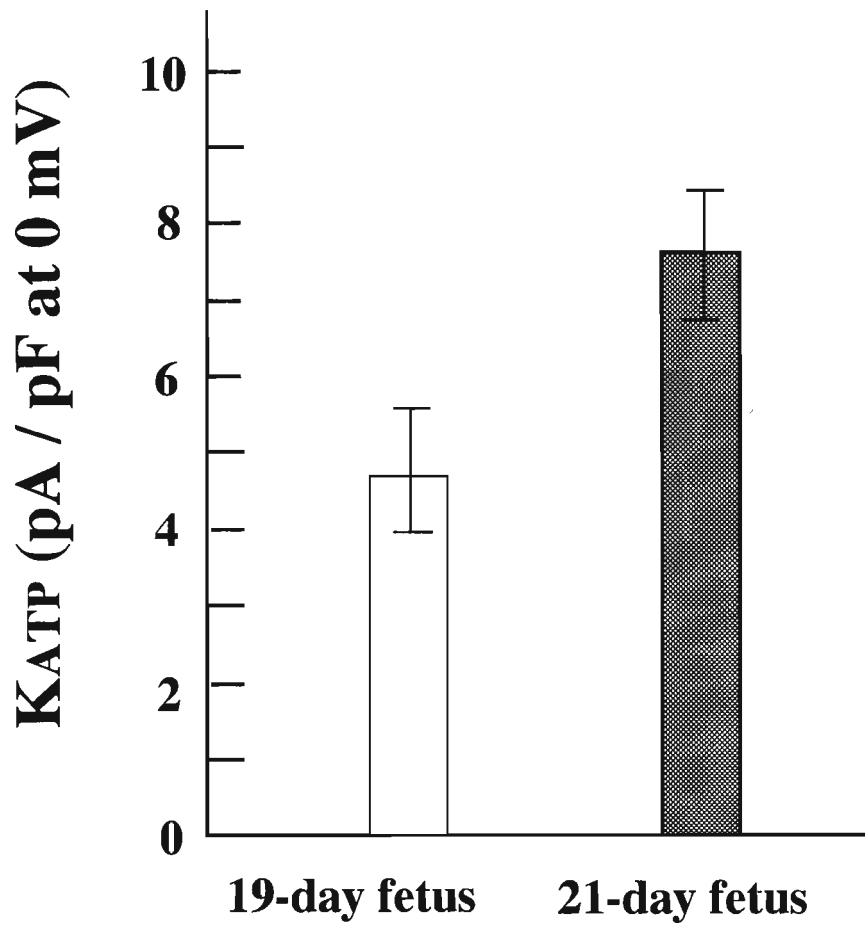
Results:

O₂, 4AP, and Glyb caused significant contraction in the mature (21 day) fetus. In the premature (19 day) fetus, O₂ and Glyb did not induce significant contraction and only 4AP caused contraction.

In the DA, O₂ and Glyb caused contraction in the mature fetus, but not in the premature fetus. In the PA, O₂ and Glyb did not cause contraction. KATP, activated by pinacidil and inhibited by Glyb, was detected only in the DA, but not in the PA. KATP in the DA of mature fetus (7.5 ± 0.9 pA/pF at 0 mV, n=7) was greater than in the DA of premature fetus (4.7 ± 1.0 pA/pF, n=17).

Conclusions:

1) O₂-sensitive K channels, which closes with O₂, and KATP are underdeveloped in the premature F, 2) in addition to O₂-sensitive K_v, KATP may also be important as an O₂-sensor in the DA, 3) K_v, which is not inhibited by O₂, is present in the DA both in the premature and mature fetus.



成果

Pediatric Research 2001年6月号に掲載予定の論文