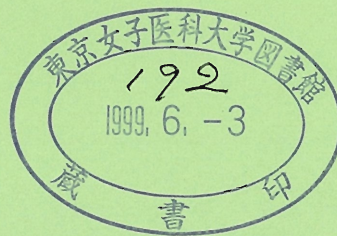


胎生期血管内皮細胞の機能に関する基礎的研究

課題番号 09670845

平成9年度—平成10年度科学研究費補助金（基盤研究C）研究成果報告書



平成11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)



はしがき

本研究では胎仔血管の収縮弛緩における内皮細胞の役割を調べた。体血管（脳動脈、筋への動脈、大動脈など）は低酸素状態で弛緩する。肺血管は逆に低酸素で収縮し、酸素で弛緩する。また動脈管は低酸素で弛緩し、酸素で収縮するので、体血管に近い反応を示す。なぜ酸素の作用が肺血管と体血管および動脈管で逆なのかはわかっていない。

出生後に動脈管は閉鎖する。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が分かっている。本研究は「胎生期血管の内皮細胞が酸素センサーとなって血管収縮弛緩を制御している」という仮説を検討した。

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手)
研究分担者	相羽 純	(東京女子医科大学医学部講師)
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	門間和夫	(東京女子医科大学医学部教授)

研究経費

平成 9年度	2 3 0 0 千円
平成10年度	9 0 0 千円
計	3 2 0 0 千円

研究発表

(1) 学会誌等

Nakanishi T, Gu H, Momma K: Developmental Changes in the Effect of Acidosis on Contraction, Intracellular pH, and Calcium in the Rabbit Mesenteric Small Artery. *Pediatric Research* 42: 750 - 757, 1997

Nakanishi T, Gu H, Momma K: Developmental Changes in the Effect of Acidosis on Contraction, Intracellular pH, and Calcium in the Rabbit Pulmonary Small Artery. *Pediatric Research* (In submission)

(様式 8)

平成9年度科学研究費補助金実績報告書(研究実績報告書)

1. 機関番号 3:2:6:5:3 2. 研究機関名 東京女子医科大学
3. 研究種目名 基盤C 4. 研究期間 平成9年度~平成10年度
5. 課題番号 0:9:6:7:0:8:4:5
6. 研究課題名 胎生期血管内皮細胞の機能に関する基礎的研究
7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
90120013	研究 ナウニシトシ 中西, 敏雄	医学部	助教

8. 研究分担者(所属機関名は、研究代表者の所属機関と異なる場合に記入すること。)

研究者番号	研究分担者名	所属機関名・所属部局名	職名
50277216	研究 オオノ マツミ 太田, 真弓	東京女子医科大学・医学部	助手
80138891	研究 アイバ スミ 相羽, 純	東京女子医科大学・医学部	講師
00180802	研究 ハヤシ フクフクロフ 萩原, 汎久	東京女子医科大学・医学部	助手
50120051	研究 マツ オカルミコ 松岡, 瑠美子	東京女子医科大学・医学部	助手
80075233	研究 モンマ カズオ 門間, 和夫	東京女子医科大学・医学部	教授

9. 研究実績の概要(学術情報センターでデータベース化するため、600字~800字で記入。図、グラフ等は記載しないこと。)

動脈管標本: 「酸素濃度変化→内皮細胞膜電位変化→細胞内Ca濃度変化→内皮由来収縮因子ないし弛緩因子産生放出」の過程が成り立つのかを、動脈管を用いて検討した。

動脈管から1) 内皮細胞を除去しても収縮が起こった。
2) 内皮細胞と内皮下の細胞外マトリックスを除去しても収縮が起こった。
3) 内皮細胞と、細胞外マトリックス、さらに平滑筋細胞、つまり内膜全てを除去すると動脈管収縮は起こらなくなった。

Ca濃度測定装置を用い、動脈管組織内細胞内Ca濃度はCa感受性色素fura-2を用い測定した。血管に蛍光色素fura-2をとりこませ、励起光をあて、蛍光の強さから細胞内Ca濃度を測定した。灌流液やバス内液と平衡状態になるガスの酸素濃度を変え、灌流液中の酸素分圧を変化させた。

動脈管から1) 内皮細胞を除去しても細胞内Ca濃度は上昇した。
2) 内皮細胞と内皮下の細胞外マトリックスを除去しても細胞内Ca濃度は上昇した。
3) 内皮細胞と、細胞外マトリックス、さらに平滑筋細胞、つまり内膜全てを除去すると細胞内Ca濃度は上昇しなくなった。

エンドセリン測定: 動脈管組織のエンドセリン濃度測定を酵素免疫法で測定した。

動脈管から1) 内皮細胞を除去するとエンドセリン濃度は上昇しなくなった。
2) 内皮細胞と内皮下の細胞外マトリックスを除去してもエンドセリン濃度は上昇しなくなった。
3) 内皮細胞と、細胞外マトリックス、さらに平滑筋細胞、つまり内膜全てを除去するとエンドセリン濃度は上昇しなくなった。

内皮細胞標本: 内皮細胞は、初代培養内皮細胞(4-7日培養)を用いた。胎生28日(満期は31日)の妊娠家兔を帝王切開し胎仔をとりだした。胎仔から大動脈、肺動脈、動脈管を摘出し、血管から内皮細胞を分離した。培養はカバーグラス上で行い、カバーグラス上の培養細胞をそのまま用いた。

(1) 低酸素状態から酸素を投与した場合、内皮細胞の細胞膜電位は脱分極した。
(2) 低酸素状態から酸素を投与した場合、内皮細胞の細胞内Ca濃度は一過性に上昇した。

以上の実験結果は、動脈管の内皮細胞は酸素濃度変化に反応し、Ca濃度が上昇し、エンドセリンを遊離するが、動脈管の収縮には重要な役割をはたしておらず、動脈管の収縮には別のより重要な機構が存在することを示唆する。

※ 成果の公表を見合わせる必要がある場合は、その理由及び差し控え期間等を記入した資料(A4判縦長横書き1枚)を添付すること。

0. キーワード
- | | | |
|-------------------|-----------------|------------------|
| (1) <u>動脈管</u> | (2) <u>内皮細胞</u> | (3) <u>カルシウム</u> |
| (4) <u>エンドセリン</u> | (5) <u>血管</u> | (6) |
| (7) | (8) | (裏面に続く) |

機関番号

3 | 2 | 6 | 5 | 3

2. 研究機関名 東京女子医科大学

研究種目名

基礎研究 (C)(2)

4. 研究期間 平成9年度~平成10年度

課題番号

0 | 9 | 6 | 7 | 0 | 8 | 4 | 5

研究課題名

胎生期血管内皮細胞の機能に関する基礎的研究

研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
90120013	川研 ナカヨシトシオ 中西 敏雄	医学部	助教授

研究分担者(所属機関名は、研究代表者の所属機関と異なる場合に記入すること。)

研究者番号	研究分担者名	所属機関名・所属部局名	職名
50277216	川研 オオノユミ 大田 真弓	東京女子医科大学・医学部	助手
80138891	川研 アバシ 相羽 純	東京女子医科大学・医学部	講師
00180802	川研 ハギワラフコ 萩原 誠久	東京女子医科大学・医学部	助手
50120051	川研 マツオカルミコ 松岡 瑠美子	東京女子医科大学・医学部	助手
80075233	川研 エンマカズオ 門間 和夫	東京女子医科大学・医学部	教授

研究実績の概要(学術情報センターでデータベース化するため、600字~800字で記入。図、グラフ等は記載しないこと。)

肺動脈標本:胎仔動脈管は酸素で収縮する。胎仔や新生仔の肺動脈は低酸素で収縮するし、アシドーシスで収縮する場合と弛緩する場合がある。本年度は肺動脈がアシドーシスで収縮弛緩する際の、内皮細胞の関与について検討した。

生後3日の新生仔、生後6カ月の成獣家兎を用いた。新生仔、成獣家兎から径100・300umの肺動脈を単離し、血管が発生する張力、細胞内カルシウム濃度[Ca_i]、細胞内pH(pHi)を測定した。血管標本を倒立顕微鏡のステージに作ったバスの上におき灌流した。細胞内Ca濃度はCa感受性色素fura-2を用い測定した。血管に蛍光色素fura-2をとりこませ、励起光をあて、蛍光の強さから細胞内Ca濃度を測定した。細胞内pHは水素イオン感受性色素BCECFを用い測定した。

あらかじめ高KClで収縮させた血管では、アシドーシスで胎仔新生仔では収縮、成獣では弛緩した。[Ca_i]は一過性に低下後上昇、pHiは低下したが、その変化に年齢差はなかった。内皮細胞の有無で血管収縮、[Ca_i]、pHiに有意差はなかった。

イノシトール代謝を亢進させ筋小胞体でのCa代謝を活性化するPhorbol esterをあらかじめ投与し収縮させた血管では、アシドーシスで新生仔では収縮、成獣ともに収縮したが、成獣では大きく収縮したのに対し新生仔での収縮は小さかった。pHiの変化に年齢差はなかったが、Caの増加は成獣の方が大であった。内皮細胞の有無で血管収縮、[Ca_i]、pHiに有意差はなかった。

[結論] 今回の実験条件では、アシドーシスによる肺動脈の収縮に内皮細胞が有意に関わっている所見は得られなかった。

※ 成果の公表を見合わせる必要がある場合は、その理由及び差し控え期間等を記入した資料(A4判縦長横書き1枚)を添付すること。

キーワード

(1) 肺動脈	(2) 内皮細胞	(3) カルシウム
(4) pH	(5) 血管	(6)
(7)	(8)	(裏面に続く)

1. 研究機関番号 3:2:6:5:3 2. 研究機関名 東京女子医科大学
 3. 研究種目名 基盤研究(C)(2) 4. 研究期間 平成9年度~平成10年度
 5. 課題番号 0:9:6:7:0:8:4:5
 6. 研究課題名 胎生期血管内皮細胞の機能に関する基礎的研究
 7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
90120013	川野 ナシトシオ 中西 叙雄	医学部	助教授

8. 研究分担者 (所属機関名は、研究代表者の所属機関と異なる場合に記入すること)

研究者番号	研究分担者名	所属機関名・所属部局名	職名
50277216	川野 オキヲ マツミ 大西 直弓	東京女子医科大学・医学部	助手
80138891	川野 アイバ スミ 相羽 純	東京女子医科大学・医学部	講師
00180802	川野 ハギ フラ ブロウ 萩原 弘久	東京女子医科大学・医学部	助手
50120051	川野 ムツ オカル ミコ 松岡 瑞美子	東京女子医科大学・医学部	助手
80075233	川野 ヒシマ カズオ 門間 和夫	東京女子医科大学・医学部	教授

9. 研究成果の概要 (当該研究期間のまとめ、600字~800字、図、グラフ等は記載しないこと)

I. 動脈管：動脈管から1) 内皮細胞を除去しても収縮が起こった。2) 内皮細胞と内皮下の細胞外マトリックスを除去しても収縮が起こった。3) 内皮細胞と、細胞外マトリックス、さらに平滑筋細胞、つまり内膜全てを除去すると動脈管収縮は起こらなくなった。また動脈管から1) 内皮細胞を除去しても細胞内Ca濃度は上昇した。2) 内皮細胞と内皮下の細胞外マトリックスを除去しても細胞内Ca濃度は上昇した。3) 内皮細胞と内膜全てを除去すると細胞内Ca濃度は上昇しなくなった。以上の実験結果は、動脈管の内皮細胞は酸素濃度変化に反応し、Ca濃度が上昇し、エンドセリンを遊離するが、動脈管の収縮には重要な役割をはたしておらず、動脈管の収縮には別のより重要な機構が存在することを示唆する。

II. 肺動脈：肺動脈がアシドーシスで収縮弛緩する際の、内皮細胞の関与について検討した。径100・300umの肺動脈を単離し、血管が発生する張力、細胞内カルシウム濃度[Ca]_i、細胞内pH (pHi)を測定した。あらかじめ高KClで収縮させた血管では、アシドーシスで胎仔新生仔では収縮、成獣では弛緩した。[Ca]_iは一過性に低下後上昇、pHiは低下したが、その変化に年齢差はなかった。内皮細胞の有無で血管収縮、[Ca]_i、pHiに有意差はなかった。イノシトール代謝を亢進させ筋小胞体でのCa代謝を活性化するPhorbol esterをあらかじめ投与し収縮させた血管では、アシドーシスで新生仔では収縮、成獣ともに収縮したが、成獣では大きく収縮したのに対し新生仔での収縮は小さかった。pHiの変化に年齢差はなかったが、Caの増加は成獣の方が大であった。内皮細胞の有無で血管収縮、[Ca]_i、pHiに有意差はなかった。アシドーシスによる肺動脈の収縮に内皮細胞が有意に関わっている所見は得られなかった。

10. キーワード

- (1) 肺動脈 (2) 内皮細胞 (3) カルシウム
 (4) pH (5) 血管 (6) 動脈管
 (7) (8) (裏面に続く)

研究成果

1. 酸素による動脈管収縮の機序

—内膜の役割—

要旨

酸素による動脈管の収縮の機序、特に内膜の役割について研究を行った。胎生30日の胎仔家兎から動脈管を摘出し、その収縮張力を測定した。動脈管にCa感受性蛍光色素を負荷し、細胞内Ca濃度の変化を推定した。内膜の存在する動脈管では、酸素投与に伴い動脈管は収縮し、細胞内Ca濃度は上昇した。細胞外Caが無いときは酸素による動脈管の収縮は起こらなかった。内膜を除去した動脈管では酸素投与に伴う動脈管収縮はみられず、細胞内Ca濃度上昇も認められなかった。内膜の存在する動脈管ではATP感受性Kチャネル開放の遮断薬glybenclamideは低酸素下でも動脈管収縮を起こし、細胞内Ca上昇も認められた。内膜を除去した動脈管では、glybenclamideによる動脈管収縮はみられず、細胞内Ca上昇も認められなかった。これらの結果は、1) 低酸素は動脈管のATPを減らし膜を過分極させ動脈管を弛緩させる、2) 酸素はATPを増加させ膜を脱分極させCaチャ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、3) 酸素のセンサーは内膜にあることを示唆する。

Abstract

The present study investigated the role of the endothelium in O₂-induced ductal contraction. The force of isometric contraction and [Ca]ⁱ of the ductus arteriosus isolated from fetal rabbits at 30 days of gestation (term 31 days) were measured. The ductus arteriosus was initially superfused with hypoxic control solutions and contraction was induced by application of oxygenated solutions. In the intima-intact ductus, O₂ induced contraction and it was associated with increases in [Ca]ⁱ. In the absence of the endothelium, both the O₂-induced contraction and increases in [Ca]ⁱ were observed. In the absence of the intima, both the O₂-induced contraction and increases in [Ca]ⁱ were eliminated. These data suggest that the intima is essential for the O₂-induced contraction, [Ca]ⁱ rise, and endothelin production of the ductus arteriosus. However, the endothelium is not an oxygen sensor for the closure of the ductus arteriosus.

Key Words: ductus arteriosus, endothelium, intracellular Ca concentration

胎児期には動脈管は開存しており出生後まもなく閉じるが、出生後の動脈管閉鎖の機序は呼吸開始による血液酸素分圧の増加によるものとされている。酸素に対するセンサーが内膜に存在するのか、平滑筋細胞に存在するのか、未だ明らかでない（図1）。我々は、以前、動脈管の収縮において、内膜が酸素による動脈管収縮に於いて重要な役割を果たしていることを報告した。本研究ではさらに、内膜の中でも内皮細胞の役割について研究したので報告する。

方法

胎仔家兎から摘出した動脈管をRing状に切断した標本を使い実験を行った。胎生30日（満期は31日）の妊娠家兎を帝王切開し、胎仔を分娩させた。娩出直後にウサギ胎仔の胸腔から心臓—大血管組織を切り取った。この大動脈—動脈管—肺動脈の組織をroom airで飽和したHepes液の中に置き、実体顕微鏡を使い動脈管周辺の軟部組織を取り除き動脈管を大動脈、肺動脈から切断した。内膜を様々な方法で除去した後、動脈管収縮の有無を検討した。内膜を除去した動脈管を実験に用いる際には、先端鋭利なピンセットで内膜を顕微鏡下で中膜よりはがした。内皮細胞のみを除去する際には、径0.22 mmのステンレス線にて動脈管内面を軽くこすった。実験終了後、標本をホルマリンに入れ、hematoxylin and eosin 染色及びelastic-van Gieson 染色し、光顕にて内膜除去を確認した。

動脈管の標本を顕微鏡台の上に置いたtissue bath の中に置いた。2本の細いステンレス線（径0.22mm）で作製したフックを動脈管の内腔にいれ、一方はtissue bath の壁に付けたフックにかけ、もう一方のフックは張力トランスジューサにかけた。2本のフックにかかる動脈管短軸方向の力を測定し。

溶液：コントロールの灌流液（Krebs-Henseleit 液、K-H液と略）の組成はNaCl, 118 mM; KCl, 5 mM; CaCl₂, 1.5 mM; glucose, 6 mM; MgCl₂, 1 mM; NaHCO₃, 24 mM; NaH₂PO₄, 0.436 mMである。この液は95% N₂-5% CO₂でガス化し、pHは7.4であった。酸素投与の実験では95% O₂-5% CO₂で飽和した液を用いた。コントロール液の PO₂ は22-25 mmHgで酸素化溶液のPO₂ は660-690 mmHgであった。PCO₂ は両液とも35-42 mmHgであった。Hepes 液の組成は NaCl, 142 mM; KCl, 5 mM; CaCl₂, 1.5

mM; glucose, 6 mM; MgCl₂, 1 mM; Hepes, 5 mM (1 M NaOHで pH 7.4) である。Hepes 液は100% N₂ (コントロール) または100% O₂で飽和した。

動脈管を収縮させるため高KCl 液 (50 mM KCl) を時に用いたが、その際にはK-H 液またはHepes 液の NaCl を KCl と交換し、最終的に KCl の濃度を50 mM となるようにした。Fura-2/AM, fura-2は同仁化学より購入した。

標本：動脈管標本を倒立顕微鏡 (Nikon, TMD) 上のバスの上にのせ固定し、バスをローラーポンプを用いて 3 ml/分の流量で灌流した。液温は37°Cに維持した。

蛍光測定： 蛍光色素のAM体はacetoxymethyl ester で細胞内へ入るが細胞内 esteraseで分解され free form となり細胞外へでにくくなる。Ca感受性蛍光色素 fura-2のエステルフura-2/AM の1 mM液を100ulに 25% cremophor 25 ul を加え攪拌後、20 ml のHepes液に溶解した。その液に動脈管を3-5時間留置することでfura-2を細胞内に loadした。その後60分蛍光色素を含まない液で灌流し細胞外の蛍光色素を流しさった。

蛍光測定装置はSpex社製 (New Jersey, USA, 輸入元, 西進商事) のものを持ちいた。450wのキセノンランプを光源とし、モノクロメーターで紫外線を取りだした。回転する Chopperで2つの波長の励起光を交互に顕微鏡にいった。動脈管表面に340と380 nm の励起光をあて、蛍光を505 nm のバンドパスフィルターを通し、光電子増倍管 (浜松フォトニクス R928) で測定することで細胞内Ca濃度を測定した。測定は1秒間、5秒おきに行った。全ての実験でfura-2 を load しない動脈管を用意し、fura-2 の load と同じ条件下において自家蛍光を測定し、それをひいて蛍光比をもとめた。

比 = (340nmでの試料の蛍光 - 340nmの自家蛍光) / (380nmの蛍光 - 380nmの自家蛍光)。

実験計画

内膜のある Ring状動脈管、または内膜のない Ring状動脈管を37°C、低酸素条件下のK-H 液の中で30分安定させた。この時間内に静止張力を300-600 mg (平均400 mg) に調整した。細胞内 Ca 濃度測定の実験では、コントロール低酸素液から酸素化液に変え蛍光の変化をみた。

結果

1. 無処置の動脈管

内膜の存在する動脈管では、外液中の PO₂ の増加は動脈管の収縮をもたらし細胞内Ca濃度の増加をきたした。動脈管の中膜 (平滑筋層) は2層からなり、平滑筋の走行方向は異なっていた。その内腔側に1層の内皮細胞を含む内膜が存在した (図2)。

2. 内皮細胞除去動脈管

内皮細胞のみを除去した動脈管 (図3) では、酸素による動脈管収縮が認められ、細胞内Ca濃度増加も認められた (図4)。

3. 内膜-中膜の一部を除去した動脈管

内膜—中膜の一部を除去した動脈管（図5、6）では、酸素による動脈管収縮が認められず、細胞内Ca濃度増加も認められなかった（図7）。しかし、50 mM KClは動脈管収縮と細胞内Ca濃度増加をもたらした。

考案

我々は以前、酸素により引き起こされる動脈管の収縮は細胞内Ca濃度の増加によるものであること、細胞外Caなしには細胞内Ca増加や動脈管の収縮は起こらないこと、酸素による動脈管の収縮には細胞外から内へのCa流入が必要であることを示した。また、酸素が動脈管内膜の組織のセンサーを刺激しセンサーが平滑筋細胞にシグナルを送る可能性が高いことを示したが、内膜の内皮細胞の役割については未だ不明であった。

今回の研究は、動脈管における酸素のセンサーは内皮細胞ではないことを示した。酸素センサーは内皮細胞より内側の内膜内に、または中膜の内腔側にあることを今回の研究は示唆するが、センサーの細胞は特定できなかった。内膜には内皮、平滑筋細胞、間質細胞、Extracellular matrixなどが存在する。センサーが内皮細胞である可能性は否定されたが、内膜—中膜のその中のどの細胞がシグナルを出すか、今後の研究が必要である。

文献

1. Toshio Nakanishi, Hong Gu, Nobuhisa Hagiwara, Kazuo Momma. Mechanisms of oxygen-induced contraction of ductus arteriosus isolated from the fetal rabbit. *Circulation Research* 72:1218-1228, 1993.

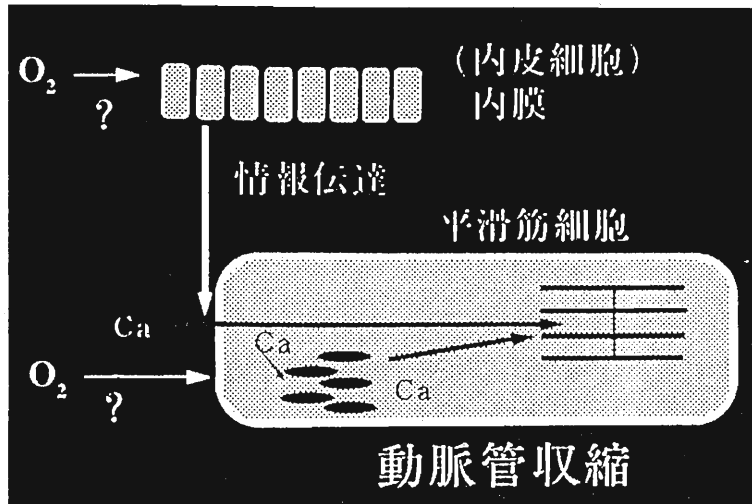


図1：酸素に対するセンサーが内膜に存在するのか、平滑筋細胞に存在するのか、未だ明らかでない。

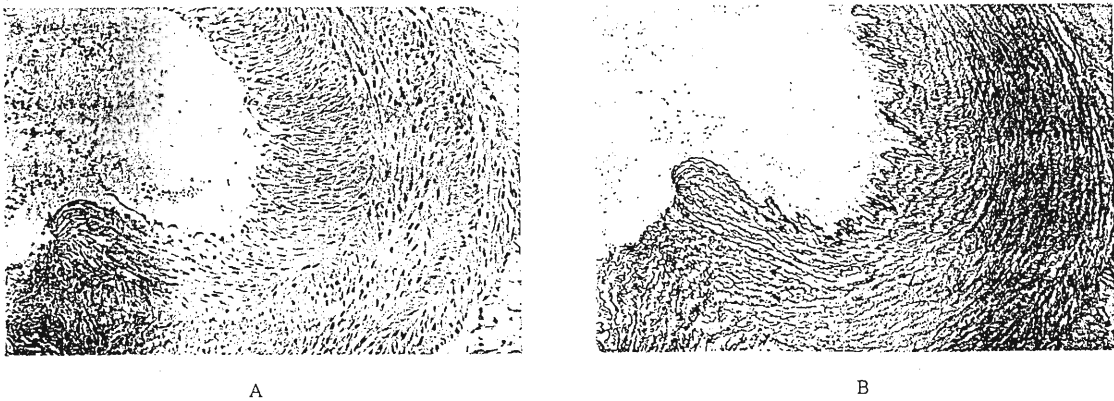


図2：内膜の存在する動脈管。A: hematoxylin and eosin 染色, B: elastic-van Gieson 染色。動脈管の中膜（平滑筋層）は2層からなり、平滑筋の走行方向は異なっていた。その内腔側に1層の内皮細胞を含む内膜が存在した。

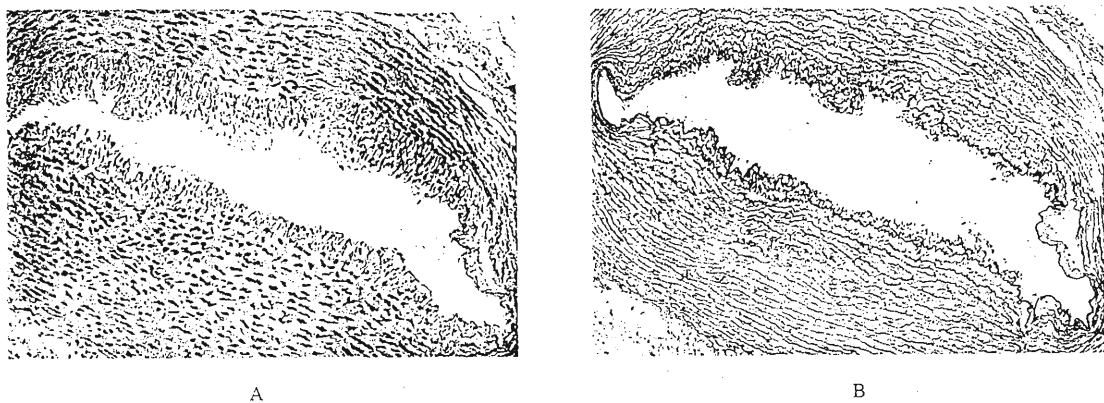


図3：内皮細胞除去動脈管。A: hematoxylin and eosin 染色, B: elastic-van Gieson 染色。内皮細胞のみを除去した動脈管では、内弾性板およびその付近の組織は残存していた。

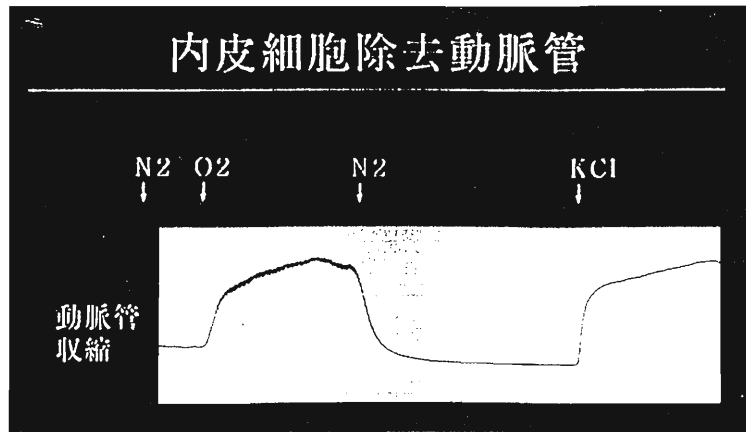


図4：内皮細胞除去動脈管。内皮細胞のみを除去した動脈管では、酸素による動脈管収縮が認められ、細胞内Ca濃度増加も認められた

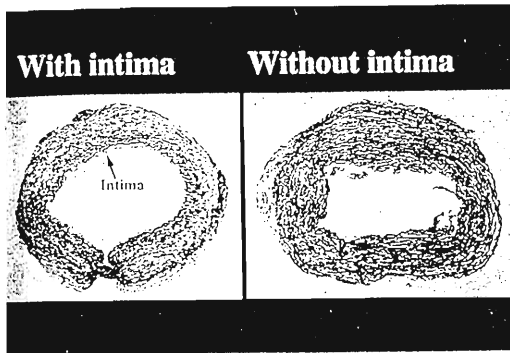


図5：内膜除去動脈管。左図：内膜存在動脈管、右図：内膜除去動脈管。

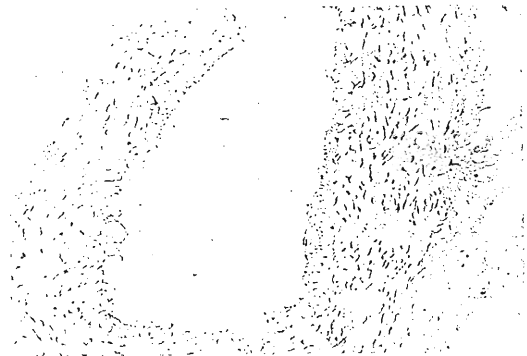


図6：内膜除去動脈管。内膜-中膜の一部が除去されている。

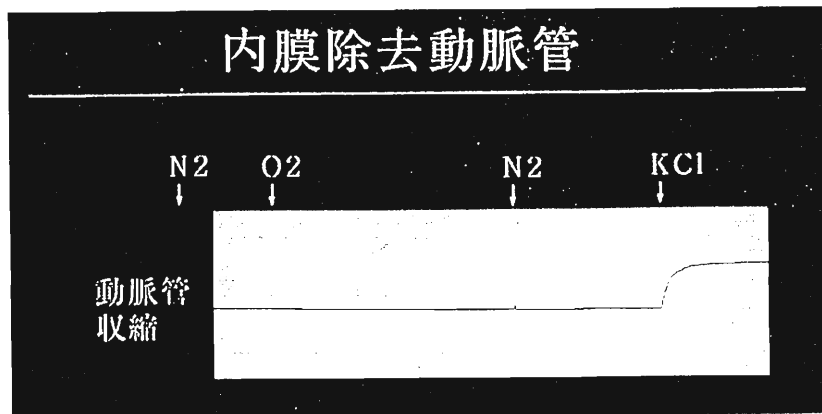


図7：内膜除去動脈管。内膜-中膜の一部を除去した動脈管では、酸素による動脈管収縮が認められず、細胞内Ca濃度増加も認められなかった。しかし、50 mM KClは動脈管収縮と細胞内Ca濃度増加をもたらした。