

子宮内発育遅延における胎児臓器の一酸化
窒素合成酵素の遺伝子発現に関する研究

課題番号 08671934

平成8年度～平成9年度科学研究費補助金
(基盤研究C(2)) 研究成果報告書

平成10年3月

研究代表者 高木耕一郎
(東京女子医科大学医学部 助教授)



はしがき

研究組織

研究代表者：高木耕一郎（東京女子医科大学医学部助教授）

研究分担者：村岡光恵（東京女子医科大学医学部講師）

研究分担者：酒井啓治（東京女子医科大学医学部助手）

研究経費

平成8年度	700千円
平成9年度	1200千円
計	1900千円

研究発表

(1) 学会誌等

高木耕一郎；胎児胎盤循環とエンドセリン ペリネイタルケア vol.15, No.10, 869-875, 1996

(2) 口頭発表

Zang, Y, He WR, Takagi K, Kuroshima A, Takeda Y: Chronic hypoxia increases both preproendothelin-1 and nitric oxide synthase (eNOS) mRNA levels in the rat placenta. 日産婦誌第49巻 suppl. S 528, 1997

(3) 出版物

高木耕一郎；胎児仮死、「ハイリスク妊婦の周産期管理」武田佳彦、中林正雄編 p. 143, 永井書店、東京、1997

研究報告

「目的」

胎児慢性低酸素症では胎児と胎盤とをひとつのユニットとした特有の循環系の適応現象の結果、子宮内胎児発育遅延(IUGR)という特殊な病態が形成される。すなわち、胎児慢性低酸素症により血流再分配機構、あるいは **brain sparing effect** が作動し、胎児の脳への血流量を増加させることによって、脳への酸素供給の減少は最小限にとどめられると考えられている。一方、脳血流量の増加と引換えに、胎児の肝臓、腎臓、皮膚などへの血流量は減少する。神経系による循環調節系が未発達である胎児・胎盤での血流再分配の調節機構は、神経系を中心とする成人の調節機構とは異なり、**arginine-vasopressin** などの液性因子の関与が示唆されてきたが、その詳細は不明である。エンドセリンや一酸化窒素 (NO) を中心とする血管作動制物質は、ともに強力な血管作動性物質であること、また、両者とも酸素分圧の変化が重要な産生調節因子であることから、胎児慢性低酸素症・子宮内発育遅延の病態形成に深く関与する可能性が考えられる。これまで、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞を用いたインビトロ実験では、血管内皮細胞が低酸素負荷に対して、強力な血管収縮性ペプチドであるエンドセリンを産生する一方、血管拡張作用を有する NO の合成酵素の一つである eNOS の遺伝子発現の低下が報告されている。本研究では、胎児慢性低酸素症によって生ずる子宮内発育遅延の際にみられる、胎児胎盤臓器への血流の再分配機構の解明を目的として、慢性低酸素症のラット胎仔の胎盤、脳、肝、腎における **preproendothelin-1(ppET)**、ならびに eNOS の遺伝子発現を検討した。

「方法」

1) 動物ならびに組織の処理

妊娠 18 日の **Sprague-Dawley** ラットをネンブタール麻酔下に開腹し、左右の両子宮角に同等数の胎仔が存在することを確認した後に、左右一方の子宮角の子宮動脈を結紮し、胎児慢性低酸素負荷とした。一部のラットは代謝ケージ中で飼育し、24 時間毎に尿を採取し、NO 代謝物の測定に供した。手術後、妊娠 21 日に再度、麻酔下に開腹し、子宮を摘出した後、胎仔、胎盤を取り出した。胎仔は氷冷した生理食塩水中に置き、速やかに脳、肝、腎を摘出し、それぞれの湿重量を測定した後、これらを液体窒素で凍結し、 -80°C の冷凍庫に保存した。

2) 尿中 NO 代謝物の測定

3) RNA の抽出、RT-PCR, competitive PCR

胎仔諸臓器を **Sonic waring blender** を用いてホモゲナイズし、**Quiagen** 社の **RNeasy midi kit** を用いて total RNA を抽出した。逆転写酵素を用いて complementary DNA を作製し、ラット ppET、ラット e-NOS、ラット GAPDH 遺伝子に相補的なプライマーによる

polymerase chain reaction(PCR)により、それぞれの cDNA を増幅し、1%アガロースミニゲルによる電気泳動の後、臭化エシジウムにより染色を行い、UV ライトによる遺伝子産物の検出を行った。cDNA の定量には両端にそれぞれのプライマーを持ち、塩基サイズの異なる mimic DNA を合成し、サンプル cDNA と混合して PCR を行うことにより、プライマーがサンプル cDNA と mimic DNA との競合的結合の程度によってサンプル cDNA 量を測定した。

「成績」

1) 妊娠ラットの片側子宮動脈結紮が胎仔・胎盤発育に及ぼす影響 (表 1)

片側子宮動脈結紮を行った側の胎仔体重は非結紮側子宮の胎仔の 53.6%の値を示した。また、胎仔臓器重量では脳重量は結紮側と非結紮側とで差を認めなかったが、肝、腎では結紮側は非結紮側の約 50%の低値を示した(p<0.01)。胎盤重量も胎仔体重と同様に結紮側は非結紮側の約 65%の値を示した。

Weight (g)	Sham operation (n=26)	Uterine artery ligation(n=7)	p
Body weight	5.59±0.04	3.00±0.07	<0.001
Placenta	0.49±0.05	0.32±0.04	<0.001
Brain	0.13±0.02	0.13±0.02	N.S.
Kidney	0.046±0.004	0.029±0.002	<0.001
Liver	0.310±0.024	0.145±0.002	<0.001

表 1 片側子宮動脈結紮による胎仔・胎盤重量、胎仔臓器重量の変化
(mean +/- SEM)

2) 妊娠ラットの片側子宮動脈結紮が母獣のNO産生に及ぼす影響

母獣の尿中NO代謝物は対照群 (n = 8) で開腹前の Day 17 から Day 20 にかけて 140%に増加した。一方、子宮動脈片側結紮動物では結紮前に比して 66%に減少した (図 1)。

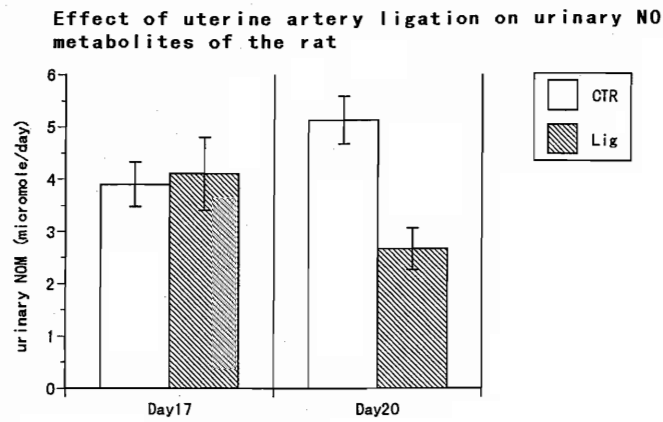


図 1

3) 胎仔諸臓器、胎盤での ppET、eNOS mRNA レベル

GAPDH を内部標準とした ppET, eNOS mRNA の相対的な発現を妊娠 Day 21 の非結紮側胎仔臓器で検討した。ppET mRNA 発現は脳、腎、胎盤でそれぞれ、0.21、0.20、0.36 と胎盤で最も高く、肝では検出感度以下であった。また、eNOS mRNA の発現では脳、腎、胎盤で 0.008、0.01、0.05 であり、肝における発現は測定感度以下であった。また、脳、腎、胎盤での eNOS mRNA は ppET の約 10%であった。

4) 子宮動脈結紮による胎仔臓器、胎盤 ppET, eNOS mRNA の変化

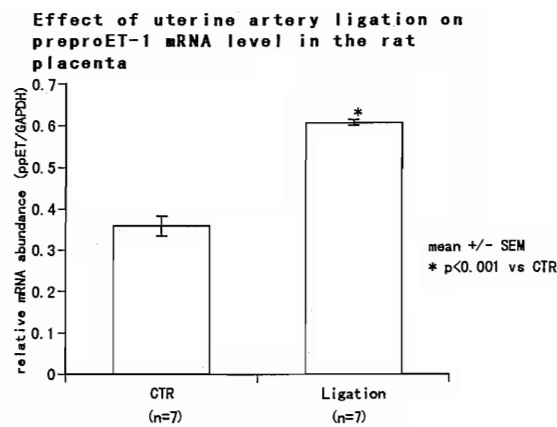


図 2

Effect of uterine artery ligation on ppET mRNA in the rat fetal kidney

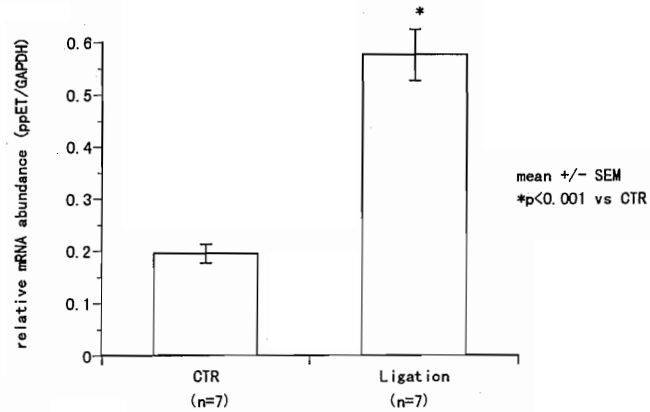


図 3

Effect of uterine artery ligation on ppET mRNA abundance in the fetal brain

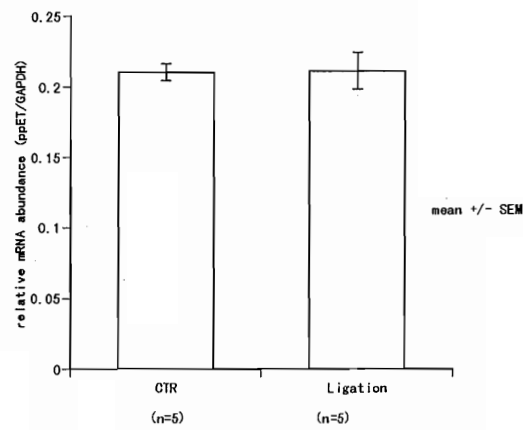


図 4

ppET mRNA は、子宮動脈結紮側では胎盤、胎仔腎において非結紮側のそれぞれ、1.7倍、3倍の増加を認めしたが、脳では両者間に差を認めなかった (図2、図3、図4)。eNOS mRNA は結紮側で胎盤においてのみ、33%の増加を認めしたが、胎仔腎、脳では差を認めなかった (図5、図6)。

Effect of uterine artery ligation on eNOS mRNA level in the rat placenta

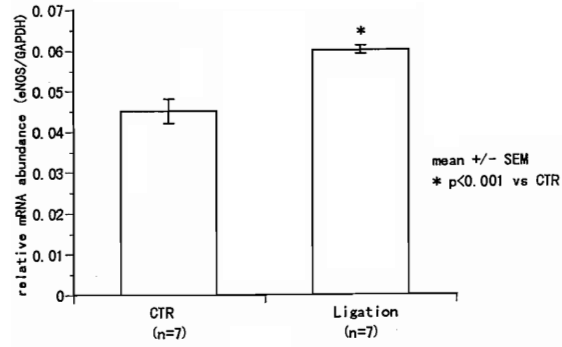


图 5

Effect of uterine artery ligation on eNOS mRNA in the rat fetal kidney

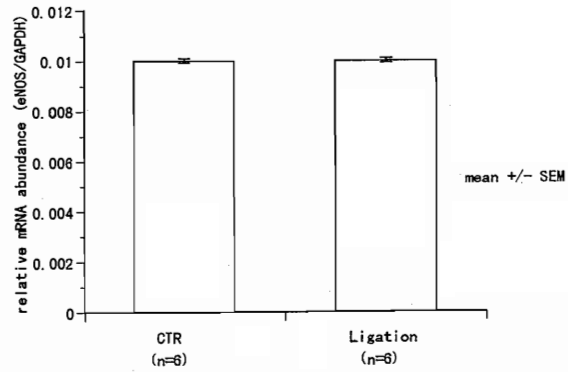


图 6

「考察」

本研究では血管内皮細胞の産生する血管拡張因子である NO の子宮内発育遅延 (IUGR) における動態を解明することを目的とした。まず、諸家の報告と同様、妊娠の進行とともに母獣の尿中の NO 代謝物は増加し、この増加は子宮動脈結紮によって抑制されることから、子宮胎盤循環の障害に関連して NO 産生が低下すると考えられる。妊娠による NO 産生の増加の一因として、母獣の全身循環系の血管内皮細胞の eNOS が、エストロゲンにより活性化されることが報告されている。子宮動脈結紮が母獣の血漿 estradiol, progesterone 値に及ぼす影響については、子宮動脈結紮動物の血漿 estradiol 値は対照の値との間に差を認めないことから、子宮動脈結紮による母体尿中 NO 代謝物の減少は、母体全身循環での NO 産生の減少というよりは、子宮・胎盤循環における NO 産生低下によると考えられる (データ未公開)。子宮胎盤循環における NO 産生の母地としては、子宮筋、脱落膜、胎盤が考えられる。今回の検討では子宮筋、脱落膜での検討は行っていないため、これら組織での NO 産生低下が母獣尿中 NO 代謝物の低下に関与している可能性は否定出来ない。しかし、mRNA レベルで検討するかぎり、胎盤での eNOS mRNA は子宮動脈結紮側で軽度ながら増加を示した。この増加が低酸素負荷による増加であるかについては明らかではない。In vitro におけるヒト臍帯血管内皮細胞培養系の実験では、低酸素負荷により、ppET の mRNA は増加するが、反対に eNOS mRNA は低下するとの報告がある。この差が何に起因するかは明らかではないが、成熟ラットを低酸素状態に暴露した際の肺の eNOS mRNA の変化は今回の実験結果と同様、低酸素負荷により増加することが報告されていることから、in vivo と in vitro との何らかの条件設定の差に起因するものであると推察される。また、NO 産生は血管内皮細胞上に存在する endothelin 受容体を介する経路も存在することから、低酸素負荷により局所的に増加した ET によって eNOS 遺伝子発現が亢進した可能性も考えられる。

次に胎仔臓器における eNOS 遺伝子発現をみると、検討し得た胎仔の腎、脳では、子宮動脈結紮による影響は認められなかった。胎仔の諸臓器での eNOS の動態については、室月らはヒツジを用いた実験によって酵素活性と遺伝子発現から検討している¹⁾。すなわち、羊胎仔の慢性低酸素症モデルを用いて、胎仔臓器の NOS 活性を ¹⁴C-L-arginine から ¹⁴C-L-citrullin への変換で検討すると、心筋、肺、胎盤では変化がなく、脳では 30% の活性低下を示すが、eNOS mRNA は低酸素負荷の影響を認めなかったとしている。今回の検討では NOS の酵素活性の検討は行っていないが、本研究では eNOS mRNA の変化は胎盤で軽度の増加を示したものの、その他の臓器での変化は室月らの成績と一致している。したがって、ラット、ヒツジともに in vivo では eNOS の遺伝子レベルでの変動は顕著でないと考えられる。

一方、これら臓器での ppET 遺伝子発現は臓器重量の減少とは対称的に増加していた。したがって子宮動脈結紮による胎児慢性低酸素症モデルでは、発育抑制の強い胎盤、腎と

「考察」

本研究では血管内皮細胞の産生する血管拡張因子である NO の子宮内発育遅延 (IUGR) における動態を解明することを目的とした。まず、諸家の報告と同様、妊娠の進行とともに母獣の尿中の NO 代謝物は増加し、この増加は子宮動脈結紮によって抑制されることから、子宮胎盤循環の障害に関連して NO 産生が低下すると考えられる。妊娠による NO 産生の増加の一因として、母獣の全身循環系の血管内皮細胞の eNOS が、エストロゲンにより活性化されることが報告されている。子宮動脈結紮が母獣の血漿 estradiol, progesterone 値に及ぼす影響については、子宮動脈結紮動物の血漿 estradiol 値は対照の値との間に差を認めないことから、子宮動脈結紮による母体尿中 NO 代謝物の減少は、母体全身循環での NO 産生の減少というよりは、子宮・胎盤循環における NO 産生低下によると考えられる (データ未公開)。子宮胎盤循環における NO 産生の母地としては、子宮筋、脱落膜、胎盤が考えられる。今回の検討では子宮筋、脱落膜での検討は行っていないため、これら組織での NO 産生低下が母獣尿中 NO 代謝物の低下に関与している可能性は否定出来ない。しかし、mRNA レベルで検討するに限り、胎盤での eNOS mRNA は子宮動脈結紮側で軽度ながら増加を示した。この増加が低酸素負荷による増加であるかについては明らかではない。In vitro におけるヒト臍帯血管内皮細胞培養系の実験では、低酸素負荷により、ppET の mRNA は増加するが、反対に eNOS mRNA は低下するとの報告がある。この差が何に起因するかは明らかではないが、成熟ラットを低酸素状態に暴露した際の肺の eNOS mRNA の変化は今回の実験結果と同様、低酸素負荷により増加することが報告されていることから、in vivo と in vitro との何らかの条件設定の差に起因するものであると推察される。また、NO 産生は血管内皮細胞上に存在する endothelin 受容体を介する経路も存在することから、低酸素負荷により局所的に増加した ET によって eNOS 遺伝子発現が亢進した可能性も考えられる。

次に胎仔臓器における eNOS 遺伝子発現をみると、検討し得た胎仔の腎、脳では、子宮動脈結紮による影響は認められなかった。胎仔の諸臓器での eNOS の動態については、室月らはヒツジを用いた実験によって酵素活性と遺伝子発現から検討している¹⁾。すなわち、羊胎仔の慢性低酸素症モデルを用いて、胎仔臓器の NOS 活性を ¹⁴C-L-arginine から ¹⁴C-L-citrullin への変換で検討すると、心筋、肺、胎盤では変化がなく、脳では 30% の活性低下を示すが、eNOS mRNA は低酸素負荷の影響を認めなかったとしている。今回の検討では NOS の酵素活性の検討は行っていないが、本研究では eNOS mRNA の変化は胎盤で軽度の増加を示したものの、その他の臓器での変化は室月らの成績と一致している。したがって、ラット、ヒツジともに in vivo では eNOS の遺伝子レベルでの変動は顕著でないと考えられる。

一方、これら臓器での ppET 遺伝子発現は臓器重量の減少とは対称的に増加していた。したがって子宮動脈結紮による胎児慢性低酸素症モデルでは、発育抑制の強い胎盤、腎と