

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15537

研究課題名(和文)胎生期肺小動脈及び動脈管における酸素感知機構獲得の分子機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of oxygen-sensing molecular mechanisms on fetal pulmonary artery and ductus arteriosus

研究代表者

赤池 徹 (AKAIKE, Toru)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：20647101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、酸素濃度の変化によりラット肺小動脈及び動脈管平滑筋細胞の遺伝子発現がどのように変化するかをDNAマイクロアレイ法で調査した。それぞれの平滑筋細胞を低酸素状態で48時間培養後に正常酸素状態で24時間培養した群で発現の変化した遺伝子を調査した。肺小動脈及び動脈管平滑筋細胞で、酸素濃度の上昇により、transmembrane protein 104やolfactory receptor 1262の発現が優位に上昇し、ankyrin repeat domain 37の発現が優位に低下した。今後、肺小動脈や動脈管において、今回の研究で得られた遺伝子の機能を調査していく。

研究成果の概要(英文)：In this study, we determined what factors dominantly expressed by an increase of oxygen concentration expressed in fetal rat pulmonary arterial and ductus arteriosus smooth muscle cells. Fetal rat pulmonary arterial and ductus arteriosus smooth muscle cells incubated under hypoxia for 48hours, and then incubated under normoxia for 24hours. The total RNA was extracted from these cells and was exhaustively gene-analyzed. DNA microarray revealed that transmembrane protein 104 and olfactory receptor 1262 were up-regulated by an increase of oxygen concentration in fetal rat pulmonary arterial and ductus arteriosus smooth muscle cells. And ankyrin repeat domain 37 was down-regulated by an increase of oxygen concentration in fetal rat pulmonary arterial and ductus arteriosus smooth muscle cells. We will continue to investigate the molecular mechanism of these gene factors.

研究分野：小児循環器学

キーワード：肺動脈 動脈管

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む哺乳動物は、母胎からの出生により劇的な環境変化に曝される。胎生期において、酸素供給は、肺からでなく、母体血中から胎盤を介して行われるため、胎児の血中酸素濃度は低い。出生後、肺呼吸の開始に伴い、新生児の血中酸素濃度は急激に上昇する。この酸素濃度の上昇により、肺小動脈は拡張し、胎生期に主肺動脈から下行大動脈へのバイパス血管として働く動脈管は収縮する。ヒトを含む哺乳動物は、胎内環境から胎外環境への変化を瞬時に感知し、各器官を適応させる。出生直後の環境変化に速やかに適応するためには、これらの血管において、胎生期から既に酸素感受性を促す変化が生じていることが推測される。

酸素が肺小動脈に与える影響については、低酸素が肺血管を収縮させる分子機構や、平滑筋細胞の遊走や増殖を促進し、肺高血圧症を誘発することがこれまで報告されている。しかし、出生前後の酸素濃度の変化が、肺小動脈の構造変化に及ぼす影響については殆ど報告されていない。また、動脈管については、酸素濃度の変化が血管の構造に与える影響を研究した報告は少なく、動脈管内腔の低酸素化が血管構造の構築に重要であるという報告と、酸素濃度の上昇が動脈管平滑筋細胞遊走を促進するという報告しかない。したがって、肺小動脈と動脈管が、出生前後に血管の機能や構造を成熟させて、酸素濃度の変化を感知する機構を獲得すること及びその分子機序はいまだ不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究では、胎生後期ラット肺小動脈平滑筋細胞培養技術を開発し、生理学的手法や細胞生物学的手法を用いて、胎生期から新生児期の血中酸素濃度の変化が、肺小動脈及び動脈管の血管機能や構造を成熟させ、酸素感知機構を獲得する分子機序を明らかにすることを最終目標とする。

### 3. 研究の方法

妊娠ラットをイソフルレン吸入麻酔下で帝王切開し、在胎 21 日の胎仔を摘出する。肺呼吸が開始される前に、胎仔を断頭により安楽死させ、速やかに左肺小動脈を摘出する。10 匹程度の肺小動脈を集めた後、肺小動脈を collagenase/dispase、elastase、trypsin inhibitor、collagenase II、bovine serum albumin を含む HBSS 溶液で酵素処理をして、細胞培養用プレートに撒き、37 度 CO<sub>2</sub> 濃度 5% インキュベータで培養した。肺小動脈平滑筋細胞が 60~70% 位の密度になったら、平滑筋細胞を継代し、4~5 継代目の平滑筋細胞を実験に使用した。細胞培養液は 2~3 日ごとに交換した。採取した平滑筋細胞の確認に

は、肺動脈平滑筋細胞特異的マーカーは存在しないため、 $\alpha$ -smooth muscle actin 抗体 (平滑筋細胞マーカー) と vimentin 抗体 (線維芽細胞マーカー) で肺小動脈平滑筋細胞を共染色し、 $\alpha$ -smooth muscle actin 抗体のみ染色していることを確認した。

次に、採取した胎生 21 日ラット肺小動脈平滑筋細胞と動脈管平滑筋細胞を用いて、それぞれの平滑筋細胞を O<sub>2</sub> 濃度 5% の低酸素状態のインキュベータにいれ、48 時間培養した。その後インキュベータの O<sub>2</sub> 濃度を 21% の正常酸素状態にかえて、24 時間培養した。その後平滑筋細胞を回収し、RNA を抽出した。対照は O<sub>2</sub> 濃度 5% の低酸素状態のインキュベータで 72 時間培養した平滑筋細胞を用いた。それぞれの平滑筋細胞から抽出した RNA を用い、DNA マイクロアレイ法により、網羅的遺伝子発現解析を行った。

### 4. 研究成果

DNA マイクロアレイ法により得られた結果から、O<sub>2</sub> 濃度 5% の低酸素状態の平滑筋細胞と比べ、出生時の酸素濃度の変化を模した O<sub>2</sub> 濃度 5% の低酸素状態から 21% の正常酸素状態に変化させた平滑筋細胞で 1.5 倍以上の変化をきたした遺伝子を抽出した。

胎生 21 日ラット動脈管平滑筋細胞で変化の見られた遺伝子の一覧は図 1 のとおりである。

Gene Symbol	GeneName	ratio
Olr1262	olfactory receptor 1262	2.25
Trim42	tripartite motif-containing 42	2.13
Tmem104	transmembrane protein 104	1.98
Etv3	ets variant 3	1.94
Lrrc74	leucine rich repeat containing 74	1.79
Vom1r30	vomerinasal 1 receptor 30	1.72
Gal3st4	galactose-3-O-sulfotransferase 4	1.64
Vom1r37	vomerinasal 1 receptor 37	1.60
Cd3d	CD3 molecule, delta	1.58
Csn1s1	casein alpha s1	1.56
Pth2	parathyroid hormone 2	1.56
Zfp958	zinc finger protein 958	1.54
Slc16a3	solute carrier family 16, member 3	-2.03
Tp53i3	tumor protein p53 inducible protein 3	-1.77
Eid3	EP300 interacting inhibitor of differentiation 3	-1.72
Tfr2	transferrin receptor 2	-1.65
Nudcd3	NudC domain containing 3	-1.63
Exoc3l2	exocyst complex component 3-like 2	-1.57
Ankrd37	ankyrin repeat domain 37	-1.57

図 1 動脈管平滑筋細胞で酸素濃度の上昇により発現量が変化した遺伝子

変化をきたした遺伝子は、Tmem104、Gal3st4 や Slc16a3 などの細胞膜の構成する因子が多かった。また、G タンパク質共役型受容体シグナル伝達経路に關与する Olr1262、Vom1r30 や Vom1r37 などが多かった。

酸素濃度の上昇により、動脈管平滑筋細胞内で生成される過酸化水素が、細胞膜に存在する電位依存性カリウムチャネルを不活化し、細胞膜脱分極を惹起し、動脈管を収縮させることが明らかになっている。しかしながら、どのような機序で過酸化水素を感知するのかという点は明らかでない。本実験で得られた細胞膜の構成因子が過酸化水素の感知機構に關与しているかどうかを今後検討していく必要がある。

また、動脈管の収縮には、prostaglandin E<sub>2</sub> や thromboxane A<sub>2</sub> の G タンパク質共役型受容体が関与していることが明らかになっている。本実験で得られた因子が、これらのシグナル伝達に関与しているのか、また、新たなシグナル伝達経路に関与するのかどうかを今後検討していく。

胎生 21 日ラット肺小動脈平滑筋細胞で変化の見られた遺伝子の一覧は図 2 のとおりである。

Gene Symbol	GeneName	ratio
Vom1r37	vomerolnasal 1 receptor 37	1.95
Olr1262	olfactory receptor 1262	1.91
Pole	polymerase, epsilon, catalytic subunit	1.68
Tmem104	transmembrane protein 104	1.66
Galr3	galanin receptor 3	1.56
Nhlrc4	NHL repeat containing 4	1.56
Krtap14	keratin associated protein 14	-1.82
Aldoc	aldolase C, fructose-bisphosphate	-1.76
Ankrd37	ankyrin repeat domain 37	-1.58
Serping1	serpin peptidase inhibitor, clade G, member 1	-1.56
Slc16a4	solute carrier family 16, member 4	-1.55
Tspy26	testis specific protein, Y-linked 26	-1.52

図 2 肺小動脈平滑筋細胞で酸素濃度の上昇により発現量が変化した遺伝子

変化をきたした遺伝子は、動脈管平滑筋細胞と同様に、Tmem104 や Slc16a4 などの細胞膜の構成する因子が多かった。また、G タンパク質共役型受容体シグナル伝達経路に関与する Olr1262 や Vom1r37 などが多かった。

肺小動脈は、動脈管と異なり、酸素濃度の低下により、収縮する。低酸素により肺小動脈平滑筋細胞内で生成される活性酸素が、細胞膜に存在する電位依存性カリウムチャンネルを不活化し、細胞膜脱分極を惹起し、肺小動脈を収縮させることが明らかになっている。動脈管と同様に、どのような機序で活性酸素を感知するのかという点は明らかでない。また、肺小動脈の拡張には、prostaglandin I<sub>2</sub> や endothelin の G タンパク質共役型受容体が関与していることが明らかになっている。

動脈管と肺小動脈は酸素濃度上昇により、電位依存性カリウムチャンネルがその変化を感知し、それぞれ収縮と拡張を引き起こす。また、G タンパク質共役型受容体シグナル伝達経路も、別の経路で動脈管と肺小動脈の収縮と拡張に関与している。しかしながら、今回の実験から酸素濃度の上昇により、まったく正反対の発現変化をする遺伝子は同定できなかった。酸素濃度の上昇により、Tmem104 や Vom1r37 は、動脈管と肺小動脈で共に発現が上昇している。これらの因子が、平滑筋の収縮や拡張に関与しているのか、酸素感知機構の成熟に関与しているのかを今後検討していく必要がある。

また、動脈管平滑筋細胞と肺小動脈平滑筋細胞においては、酸素濃度の上昇により、正反対に発現が変化する因子は同定できなかったが、それぞれの内皮細胞や他の隣接する細胞間での相互作用が正反対である可能性もあるため、実際に in vivo での機能的変化にどのような役割をするのかを検討

していく必要がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Akaike T, Du N, Lu G, Minamisawa S, Wang Y, Ruan H. A Sarcoplasmic Reticulum Localized Protein Phosphatase Regulates Phospholamban Phosphorylation and Promotes Ischemia Reperfusion Injury in Heart. *JACC Basic Transl Sci*. 2017 Apr. 2(2):160-80. (査読有)  
DOI:org/10.1016/j.jacbts.2016.12.002

Ito K, Hongo K, Date T, Ikegami M, Hano H, Owada M, Morimoto S, Kashiwagi Y, Katoh D, Yoshino T, Yoshii A, Kimura H, Nagoshi T, Kajimura I, Kusakari Y, Akaike T, Minamisawa S, Ogawa K, Minai K, Ogawa T, Kawai M, Yajima J, Matsuo S, Yamane T, Taniguchi I, Morimoto S, Yoshimura M. Tissue thrombin is associated with the pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 2017 Feb 1;228:821-827. (査読有)  
DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.11.176

Kusakari Y, Urashima T, Shimura D, Amemiya E, Miyasaka G, Yokota S, Fujimoto Y, Akaike T, Inoue T, Minamisawa S. Impairment of Excitation-Contraction Coupling in Right Ventricular Hypertrophied Muscle with Fibrosis Induced by Pulmonary Artery Banding. *PLoS One*. 2017 Jan 9;12(1):e0169564. (査読有)  
DOI: org/10.1371/journal.pone.0169564

赤池 徹, 南沢 享. 動脈管閉鎖のメカニズム - 分子機序に基づく治療への再考 - . 日本小児科学会雑誌. 第 120 巻; 第 10 号. 1444-1452 頁. 2016 年 10 月 (査読有)

[学会発表](計 5 件)

赤池 徹, 南沢 享. 鳥類の動脈管閉鎖におけるインドメタシンの作用. 第 95 回日本生理学会大会, 2018 年 3 月 28-30 日. サポートホール高松.

Sakuma T, Akaike T, Minamisawa S. Prostaglandin E<sub>2</sub> receptor EP4 inhibition constricts the rat ductus arteriosus. The 8<sup>th</sup> TAKAO International Symposium on Molecular Mechanism of Cardiopulmonary Disease, Matsue, Japan, October 6<sup>th</sup>-8<sup>th</sup>,

2017.

Akaike T, Minamisawa S. Inhibition of Cyclooxygenase Contracts Chicken Ductus Arteriosus. The 8<sup>th</sup> TAKAO International Symposium on Molecular Mechanism of Cardiopulmonary Disease, Matsue, Japan, October 6<sup>th</sup>-8<sup>th</sup>, 2017.

岸 渕安也名, 赤池 徹, 南沢 享. ゲンタマイシンによる新生仔ラット動脈管閉鎖への影響. 第 94 回日本生理学会大会, 2017年3月28~30日. アクトシティ浜松.

Akaike T, Minamisawa S. A sarcoplasmic Reticulum Localized Protein Phosphatase Targets Phospholamban Threonine-17 Phosphorylation and Regulates Ischemia-Reperfusion Injury. 第 33 回国際心臓研究学会日本部会 (ISHR2016), 2016年12月16~17日. 東京コンベンションホール.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

赤池 徹 (AKAIKE, Toru)  
東京慈恵会医科大学・医学部・講師  
研究者番号： 25860885

### (2) 研究分担者

南沢 享 (MINAMISAWA, Susumu)  
東京慈恵会医科大学・医学部・教授  
研究者番号： 40257332