

機関番号：32701  
 研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20580329  
 研究課題名 (和文) 子宮および胎盤における時期特異的な一酸化窒素産生とその調節機構  
 研究課題名 (英文) Age-dependant NO production and its regulation involved in the uterus and placenta of pregnant rat  
 研究代表者  
 滝沢 達也 (TAKIZAWA TATSUYA)  
 麻布大学・獣医学部・教授  
 研究者番号：00247305

## 研究成果の概要 (和文)：

妊娠ラットの子宮内膜と胎盤における一酸化窒素(NO)の産生を解析し、調節機構と役割を調べた。子宮内膜と胎盤ではそれぞれ妊娠 17.5 日と 15.5 日に、主に誘導型の NO 合成酵素に由来する著しい NO 産生ピークが認められた。この NO 産生を阻害すると、子宮内膜では、活性型のカスパーゼ-3、8、9 の発現量と酵素活性が増加し、さらに細胞のアポトーシスが増加したことから、NO は細胞の生存と子宮機能の維持に重要であることが示された。

## 研究成果の概要 (英文)：

NO production and its regulation involved in the uterine endometrium and placenta were examined in pregnant rat. NO productions level peak on gestational day 17.5 ( GD17.5 ) and GD15.5 in the endometrium and placenta, respectively. These NO productions were mainly derived from induced NO synthase in the tissues. Inhibitor of NO production caused apoptosis through typical apoptotic signals in the endometrium on GD17.5, suggesting that an NO peak in the endometrium is essential to cell survival and the maintenance of uterine formation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：動物、発生・分化、スピントラップ・EPR、生体分子

## 1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素 (NO) はラジカルであり、酸素により容易に酸化されるため、生物学的な半減期は長くても数秒以内と考えられている。NO の生物学的作用は極めて多様であるが、NO のこのような性質のため、組織における NO 量を解析することは容易ではなく、

そのため生物学的意義が不明確のまま残されている分野も多い。

妊娠動物においては、NO 酸化物である亜硝酸イオンや硝酸イオンなどの尿中への排泄が著しく増加していることから、妊娠中に NO 産生が増加しているものと考えられてお

り、妊娠維持に NO 産生が関与していると示唆されている。

しかしながら、従来 NO 産生量の指標として広く用いられてきたグリース法を用いた報告によると、ラットの子宮においては、組織片を 24 時間培養し、培養液中の硝酸イオンを測定することにより、採取時の子宮組織における NO 産生量とするという極めて間接的な手法が用いられているのが現状である。そのため、子宮においては、妊娠中期に NO 産生がピークを示すことが示唆されているものの、NO 産生がいつピークを示し、その後の減少がいつから始まるのか、そのタイミングはいつなのか、どのように制御されているのかなどについて、いまだにあいまいな点が多く残されている。また、胎盤については、免疫組織化学や *in situ* ハイブリダイゼーションなどの手法を用いて、NO 産生量の考察を行った報告はあるものの、NO 産生量を直接的に解析した報告は見当たらない。以上のことから、妊娠中に NO が重要な働きをしていることが示唆されているものの、NO 量の解析が容易ではないため、NO 産生量の解析が不十分であり、いまだに子宮や胎盤における NO の作用には不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

妊娠動物における NO の作用を明確にするとの全体構想の下で、まず胎盤と子宮に焦点を絞り、さらに、本研究課題では、申請期間中に、(1) 妊娠中の子宮および胎盤における NO 産生の推移の全体像を把握した上で、(2) NO 産生に寄与する NO 合成酵素 (NOS) アイソフォームを解析し、さらに、(3) NO 産生に寄与する主要な NOS アイソフォームの発現の調節機構を検討し、同時に、(4) NO 産生の役割について検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) サンプリング

妊娠 13 日から 21 日の妊娠ラットから麻酔下で開腹して子宮を取り出し、胎盤と子宮内膜と子宮筋層を分離して、以下の解析に供するために凍結保存した。また、一部の組織片は組織学的解析のためのリン酸緩衝ホルマリン液で固定した。

### (2) 一酸化窒素(NO)の産生量の解析

組織における NO の産生量を解析するために、サンプリングの 30 分前に、NO の補足剤としてジチオカルバメート鉄錯体である Fe-DTCS を用いたスピントラップ・電子常磁性共鳴吸収(EPR)法により、子宮と胎盤の組織に局限した NO 産生量を解析した。標準物質として酸化マンガンの EPR シグナルを用いて、定量化した。

### (4) 一酸化窒素合成酵素 (NOS) 遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR にて測定した

組織片から総 RNA を抽出し、cDNA を合成し、定量的 RT-PCR 法により、*NOS-2, -3* 遺伝子の mRNA 量を解析した。

### (5) 組織におけるカスパーゼ-3、-8、-9 の酵素活性の測定

凍結組織片をホモジナイズした後、上清中のカスパーゼ-3、-8、-9 酵素活性を解析した。

### (6) アポトーシス陽性細胞の検出

ホルマリン固定した後、組織標本を作製し、タネル法によりアポトーシス陽性細胞を観察した。

### (7) DNA 合成細胞の検出

NO の細胞増殖に及ぼす影響を検討するために、サンプリングの 60 分前にチミジンの類似体であるブロモデオキシウリジン (Br-

DU) を腹腔内に投与した。サンプリングした組織片をホルマリン液固定した後、組織標本を作成した。BrDU を細胞核内に取り込んだ細胞を DNA 合成細胞として定量的に評価した。

#### 4. 研究成果

(1) ラットの胎盤における NO 産生の検出  
ジチオカルバメート鉄錯体である Fe-DTCS を一酸化窒素(NO)の捕捉剤としたスピントラップ・EPR 法により、妊娠ラットを用いて、ラットの胎盤に局限した NO 産生量を解析した。また、同時に NO 産生に寄与する一酸化窒素合成酵素(NOS)遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR にて測定した。その結果、胎盤における NO 産生は、今回解析した妊娠 13.5〜21.5 日を通じて認められ、妊娠 15.5 日に著しい高値を示した。その後、妊娠末期の 19.5〜21.5 日には NO 産生が有意に減少していた。同部位の一酸化窒素合成酵素遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR にて測定したところ、NOS-3 の mRNA には時期を通じて変化がなかったが、NOS-2 の mRNA 発現は、NO 産生量と非常に良く一致していた。

NOS-2 の発現は転写レベルで調節されていること、また、同じモル数の NOS-2 および NOS-3 から産生される NO を比較すると NOS-2 は NOS-3 の約 1000 倍であることなどから、本研究で得られた胎盤における NO 産生には NOS-3 も関与しているものの、NOS-2 の寄与が遥かに大きいことが明らかになった。

従来から妊娠中の子宮などでは NO が産生されているものの、NO が不安定であるため、産生量の変動などの詳細は不明であった。スピントラップ・EPR 法を用いることにより、組織で産生されている NO 量を定量的に解析できることを示した本研究により、今後の胎盤機能の解析や

NO の役割について基盤的な情報を提供するだけでなく、他の組織などでの NO の関与についての研究への展開が大いに期待できることを示した。

#### (2) 子宮内膜における NO 産生とその発現調節

ジチオカルバメート鉄錯体である Fe-DTCS を一酸化窒素(NO)の捕捉剤としたスピントラップ・電子常磁性共鳴吸収法により、ラットの子宮内膜および子宮筋層に局限した NO 産生量を解析した。また、一酸化窒素合成酵素(NOS)遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR にて測定した。

子宮内膜と筋層における NO 産生は、妊娠 13.5〜21.5 日を通じて認められ、子宮内膜では妊娠 17.5 日に、妊娠 13.5 日と比較して約 5 倍著しく増加し、その後、妊娠末期に向けて有意に減少していた。一方、子宮筋層では妊娠 17.5 日に高値を示したものの、妊娠 13.5 日や妊娠 21.5 日と比べて約 2 倍以内であった。

NOS の発現を定量的 RT-PCR で解析すると、子宮内膜および筋層のいずれにおいても NOS-3mRNA には時期を通じて変化がなかったが、NOS-2mRNA 発現は、NO 産生量と非常に良く一致していたことなどから、胎盤と同様に子宮内膜と筋層における NO 産生には NOS-3 も関与しているものの、NOS-2 の寄与が大きいことが明らかになった。

#### (3) 子宮内膜における NO 産生の役割

スピントラップ・EPR法により、ラットの子宮内膜における NO 産生量を解析すると、妊娠 17.5 日に著しい高値を示すことから、その役割を NOS 阻害剤であり NOS の基質である L-アルギニンの類似体である L-NAME を用いて検討した。

L-NAMEを妊娠ラットに持続注入すると、妊娠17.5日の子宮内膜のNO産生量は著しく減少した。その時、子宮内膜におけるカスパーゼ-3、-8、-9の酵素活性も組織における発現量も減少した。さらに子宮内膜の間質細胞においてアポトーシス陽性細胞が著しく増加したことから、子宮内膜で産生されているNOは間質細胞の生存に必要であることが示唆された。その経路にはカスパーゼ-8を介する経路が主体であることを明らかにした。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4件)

- ① Inukai N., Uchida M., Miyazaki Y., Suzuki T., Yoshikawa H., Tanaka K., Morita H. and Takizawa T. Nitric Oxide Production and its contribution to hepatocyte proliferation in normal juvenile rats. *J. Vet. Med. Sci.* 査読あり、72(7): 861-867, 2010.
- ② Suzuki T., Nagamatsu C., Kushima T., Miyakoshi R., Tanaka K., Morita H. Sakaue M. and Takizawa T. : Apoptosis caused by an inhibitor of NO production in the decidua of rat from mid-gestation. *Exp.Bio.Med* (Maywood), 査読あり、235(4):455-462, 2010.
- ③ Suzuki T., C. Mori, H. Yoshikawa, Y. Miyazaki, N. Kansaku, K. Tanaka, H. Morita and T. Takizawa. Changes in NO production and expression of NOS isoforms in the rat uterus during pregnancy. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読あり、73(10):2163-2166, 2009.
- ④ Suzuki T. Ikeda Y. Yoshikawa H., Tanaka K., Morita H., Yamamoto M. and Takizawa T. Gestational changes in production of NO and expression of NOS mRNA isoforms in the rat placenta. *J. Vet. Med. Sci.*, 査読あり、71(4): 495-498, 2009.

〔学会発表〕(計 4件)

- ①宮腰 隆、吉川宏、宮崎陽子、田中和明、滝沢達也。ラットを用いた肝部分切除後の一酸化窒素(NO)の役割。2010年12月8日、日本生化学会、神戸ポートアイランド
- ②西村朋夏、久島貴広、鈴木武人、宮崎陽子、田中和明、滝沢達也。ラット胎盤における血管新生因子に及ぼす一酸化窒素(NO)の役割。2010年9月18日、日本獣医学会、帯広畜産大学
- ③久島貴広、池田義則、宮崎陽子、田中和明、滝沢達也。ラット胎盤における一酸化窒素(NO)産生とその役割。2009年10月23日、日本生化学会、神戸ポートアイランド
- ④久島貴広、永松千明、鈴木武人、田中和明、滝沢達也。ラット脱落膜におけるアポトーシスに及ぼす一酸化窒素(NO)の役割、2009年9月26日、日本獣医学会、鳥取市

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

滝沢達也 (TAKIZAWA TATSUYA)  
麻布大学・獣医学部・教授  
研究者番号：00247305

##### (2) 研究分担者

田中和明 (TANAKA KAZUAKI)  
麻布大学・獣医学部・准教授  
研究者番号：50345873

森田英利 (MORITA HIDETOSHI)  
麻布大学・獣医学部・教授  
研究者番号：70257294

##### (3) 研究協力者

鈴木武人 (SUZUKI TAKEHITO)  
麻布大学・獣医学部・講師  
研究者番号：90532052