

機関番号：35413

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591917

研究課題名(和文) 炎症による子宮平滑筋イオンチャンネルの発現亢進と早産誘発機序に関する研究

研究課題名(英文) Study on the expression of ion channels in inflammation-induced uterine smooth muscle elucidating the mechanisms of preterm delivery.

研究代表者

山岡 薫 (YAMAOKA KAORU)

広島国際大学・保健医療学部・教授

研究者番号：10200586

研究成果の概要(和文)：

ラットの妊娠子宮において、妊娠日齢に応じてATP感受性非特異性陽イオンチャンネル(NSCC)のうちP2X4とP2X7のmRNAおよび蛋白レベルでの高発現が認められた。ラット妊娠子宮の子宮平滑筋細胞におけるNSCC電流と、P2X7をCOS7細胞に再構成した時に得られる電流の比較から、ラット子宮平滑筋のNSCC電流はP2X7受容体が機能的主体となって運んでいることが示唆された。この受容体はCa²⁺を流入させ、陣痛の引き金となることが考えられる。本研究においてはLPS(lipopolysaccharide)を用いた炎症を伴う早産モデルでP2X7受容体の発現が著明に亢進することが示され、炎症を誘因とするこの受容体の機能亢進が早産の発生機序のひとつである可能性が考えられた。これらの成果は今後の早産の発症機序の解明、予防法ならびに治療法の開発に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：

In pregnant rat myometrium, P2X4 and P2X7 receptors, one of ATP-sensitive non-selective cation channels (NSCC), were suggested to be highly expressed by the quantitative evaluation of mRNA and proteins. NSCC currents observed in freshly isolated cells from pregnant rat myometrium resembles to those from COS7 cells where P2X7 receptors were transfected, indicating P2X7 receptor in rat myometrium play a major role in conducting NSCC currents. It may be suggested that Ca²⁺ influx through P2X7 may trigger labor contraction. In uterus of inflammatory model rats induced by application of LPS (lipopolysaccharide), P2X7 receptors were highly expressed. Thus, these results indicate that stimulation of P2X7 receptor expression in rat myometrium induced by inflammation may lead to preterm delivery. Further study on this subject should contribute to the elucidation of precise mechanisms of preterm delivery as well as development of new therapies and new technologies of prevention against preterm delivery.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	1,700,000	510,000	2,210,000
平成21年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成22年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物系医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学産婦人科学・産科学

キーワード：ATP受容体、P2X7チャンネル、子宮平滑筋、早産、周産期医学、パッチクランプ

1. 研究開始当初の背景

近年の早産の増加傾向は、出産年齢の高齢化や、合併症妊婦の増加が背景にあるがその直接的原因は不明である。しかし、これらの妊婦には頸管炎や絨毛羊膜炎などを合併することが多く、子宮の炎症と早産の関連が指摘されている。我々は子宮収縮の引き金となる、 Ca^{2+} 流入の役割を担う経路として、非選択性陽イオンチャンネル(NSCC)を指摘してきた。またNSCCがP2XまたはTrpチャンネル分子で構成されることを示した。したがって本研究では炎症が陣痛を引き起こすメカニズムとして、子宮の炎症とNSCCチャンネルとの関係を明らかにするとともに、陣痛や早産に関わるイオンチャンネル分子を同定する。

2. 研究の目的

子宮平滑筋細胞における非選択性陽イオンチャンネル(NSCC)の妊娠時期における発現量と様式の推移を検討し、陣痛と関連しているNSCCの種類を特定する。また炎症と早産の関連性を検討するために、炎症モデルとしてLPS処理炎症ラット群と対照ラット群間で各NSCCの発現量を比較し、炎症処理にて発現亢進するNSCCを同定する。さらに炎症モデルラットの子宮平滑筋から単離した平滑筋細胞から、NSCC電流を記録し電流量を計測することによりNSCCが機能的にも炎症に関連することを示す。

3. 研究の方法

①P2X、TrpC、connexin43発現の妊娠期間による推移

各妊娠期間（妊娠15日、19日、22日、分娩中、分娩後3日）の妊娠および非妊娠ラット子宮筋からTrizol試薬によりmRNAを抽出し、cDNAライブラリーを作成し、P2X、Trpおよびconnexin43のmRNAの発現量を定量した。同時に上記核タンパクの発現量もWestern blot法により測定した。

②炎症モデル動物を使用した実験

炎症モデルとして妊娠18日にendotoxinであるlipopolysaccharide(LPS; 0.2mg/kg)を腹腔内投与し、6時間後に子宮を摘出し上記と同様の方法により各NSCCの発現をリアルタイムPCRによりmRNAレベルにて定量測定し、対照群動物との比較を行った。

③P2X7チャンネルの再構成系への発現実験

妊娠19日ラット子宮筋において強発現したP2X7チャンネルをクローニングしCOS-7培養細胞に導入した。24-36時間の培養後単離させたCOS-7細胞からパッチクランプ法により電流を記録した。

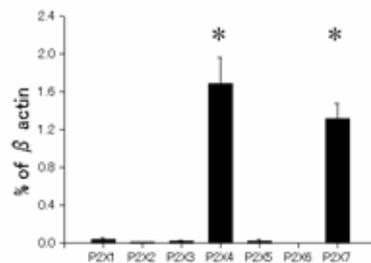
4. 研究成果

①妊娠ラット子宮におけるP2X受容体の発現様式と妊娠性変化

妊娠ラット子宮平滑筋におけるP2X受容体

mRNAの妊娠性変化をリアルタイムRT-PCRで測定し、妊娠中のNSCCの生理的な発現変化について検討を行った。妊娠19日齢、分娩中のラット子宮を摘出後、Trizol®で子宮平滑筋mRNAを抽出しDNase処理後にreverse transcriptase反応によりcDNAを作成した。P2X受容体mRNAの発現変化をP2X1-P2X7の7つのサブタイプのTaqMan probe®を用いreal-time PCR (ABI 7300)で測定した。その結果、分娩時を含め妊娠経過中ではP2X4・P2X7が他のサブタイプと比べ強い発現を認め(図1)、妊娠19日齢の発現量と比較して分娩時にP2X4は1.9倍、P2X7は3.2倍に発現が亢進していた。

(図1)



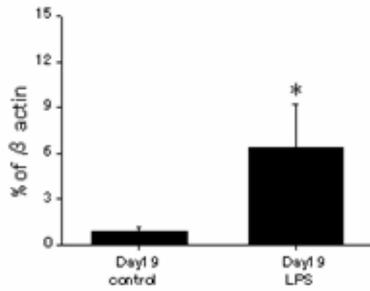
続いて早産モデルとして抗プロゲステロン剤であるmifepristone (1mg)の投与と炎症モデルとしてLPS(0.2mg/kg)の投与を行い、妊娠19日齢に子宮平滑筋を摘出し、P2X4、P2X7の発現変化について検討を行った。生理食塩水を投与したものをcontrol群とし、炎症の評価はCyclooxygenase-2 (COX-2)mRNAの発現を調べることで行った。

mifepristone投与によりP2X4は2.1倍、P2X7は4.1倍と発現が亢進しており、分娩時の発現量とほぼ同等の結果であった。

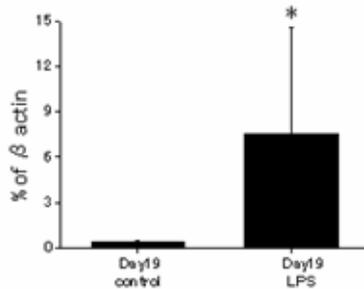
また炎症モデルとしてのLPS投与群においてもP2X4mRNAは7.4倍、P2X7mRNAは18.6倍といずれもcontrol群と比べて発現の有意な亢進を認めた(図2)。

(図 2)

1) P2X4



2) P2X7



今回 妊娠ラット子宮平滑筋では P2X4, P2X7 が強い発現を認めたことから、これらの NSCC が陣痛時の子宮収縮に関与している可能性が示唆された。P2X4, P2X7 の発現はいずれも妊娠中期から徐々に発現が亢進しており他の妊娠関連蛋白である GapJunction やオキシトシン受容体のように分娩直前に著増するものとは発現様式が異なっており独自の発現メカニズムにより発現がコントロールされていると考えられた。抗プロゲステロン剤の投与により分娩時と同程度に発現増加していることよりこれらの受容体はホルモン依存性の発現調節がなされているものと考えられた。また P2X4, P2X7 は LPS 投与で子宮平滑筋に炎症を誘発する事で正常分娩時よりも発現が著明に亢進していたことから、早産と自然陣痛ではその子宮収縮亢進のメカニズムに違いがある可能性が考えられた。P2X4, P2X7 が炎症に由来する早産時の子宮収縮の亢進に関与している可能性が示唆された。

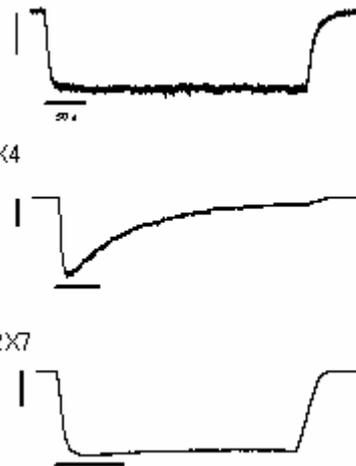
②子宮 P2X 受容体の電気生理学的性質

妊娠ラット子宮筋からクローニングした P2X 受容体遺伝子を培養細胞に発現させ、その電流と子宮筋 ATP 受容体電流を比較した。妊娠 19 日ラット子宮筋より作成した cDNA ライブラリーで P2X4 および P2X7 受容体をクローニングし COS-7 培養細胞に導入した。24-36 時間の培養後単離させた COS-7 細胞からパッチ

クランプ法により電流を記録した。各遺伝子を導入した COS-7 細胞に ATP を投与すると電流が濃度依存性に活性化されたが、P2X4 受容体電流が徐々に減衰するのに対し、P2X7 受容体電流は減衰せず、子宮 ATP 受容体電流と同様な矩形電流であった (図 3)。

(図 3)

ATP-induced currents in myometrial cells



P2X7 チャンネルは各種アゴニストの効果も (BzATP >> ATP > α β -MeATP > 2MeSATP > UTP > GTP > ADP) 同じであり、P2 阻害剤スラミンと P2X 特異的阻害剤 PPADS、特に P2X7 受容体の特異的阻害剤である A438079 に対して特に高い感受性を示した。イオン透過性も K > Cs > Li > Na であり、子宮平滑筋 ATP 受容体の透過性と一致していた (Table 1)。

(Table 1) 子宮平滑筋 ATP 受容体電流と P2X7 受容体電流の性質の比較

	子宮平滑筋 ATP 受容体	P2X7 受容体
イオン透過性	K ⁺ > Cs ⁺ > Li ⁺ > Na ⁺	K ⁺ > Cs ⁺ > Li ⁺ > Na ⁺
脱感作現象	none	none
促進剤	Bz-ATP >> ATP > α β -MeATP > 2-MeSATP > UTP > GTP > ADP	Bz-ATP >> ATP > α β -MeATP > 2-MeSATP > UTP > GTP > ADP
阻害剤	A438079 > suramin, PPADS	A438079 > suramin, PPADS

P2X7 受容体電流は子宮平滑筋細胞で観察される ATP 受容体電流と性質が一致することより、P2X7 受容体は子宮平滑筋 ATP 受容体の主体と考えられ、早産との関連と早産治療薬で

あるマグネシウム製剤の作用点である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Urabe S, Miyoshi H, Yamaoka, K. and Kudo, Y. Enhanced expression of P2X4 and P2X7 purinergic receptors in the myometrium of pregnant rats in preterm delivery models. . Reproductive Sciences; 2009, 16, 1186-92

2. Miyoshi, H. Yamaoka, K. Urabe, S. Kodama, M. and Kudo, Y. Functional expression of purinergic P2X7 receptors in pregnant rat myometrium. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol; 2010, 298, 1117-24

〔学会発表〕(計3件)

1. 三好博史、
硫酸マグネシウムの薬理作用
第60回日本産科婦人科学会総会 平成
20年4月12日

2. 占部 智、三好博史、島筒里香子、藤原久也、工藤美樹
妊娠ラット炎症モデルにおける子宮平滑筋非選択性陽イオンチャンネルの発現と早産との関連についての検討
第60回日本産科婦人科学会総会 平成
20年4月15日

3. 三好博史, 占部 智, 谷川美穂, 島筒里香子, 藤原久也, 工藤美樹 妊娠ラット子宮平滑筋細胞において主として機能しているATP受容体はP2X7チャンネルである
第61回日本産科婦人科学会総会 平成
21年4月3日

6. 研究組織

(1)研究代表者

平成20~21年度

三好 博史(MIYOSHI HIROSHI)

研究者番号: 40294590

平成22年度

山岡 薫(YAMAOKA KAORU)

研究者番号: 10200586

(2)研究分担者

平成20~21年度

山岡 薫(YAMAOKA KAORU)

研究者番号: 10200586