

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月10日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591205

研究課題名（和文） 出生時の血清浸透圧変化からみた動脈管閉鎖の機序解明

研究課題名（英文） Investigation of the mechanism of ductus arteriosus closure affected by changes in serum osmolality

研究代表者

青木 理加（AOKI RIKA）

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：50542437

研究成果の概要（和文）：超未熟児の生命学的予後や健常発育に多大な影響をおよぼす未熟児動脈管開存症の発症のメカニズムの一つとして、出生後の血清浸透圧の変化の関与に着目し、研究を行った。その結果、本来、新生児が出生後に一過性に低血清浸透圧になっており、その低血清浸透圧が動脈管収縮を促進する一方、高血清浸透圧が動脈管の閉鎖を阻害する危険因子となることが、ラットによる動物実験ならびにヒトにおける臨床研究により明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We assessed the hypothesis that serum hyposmolality promoted closure of the ductus arteriosus (DA). We showed both from human clinical observations and rat experiments that serum hyposmolality augmented DA closure. The results suggest the importance of maintaining the serum osmolality in a proper level for early preterm infants early after birth.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：胎児・新生児医学

キーワード：未熟児医学、動脈管、血清浸透圧、TRPM3

1. 研究開始当初の背景

（1）未熟児新生児医療の分野において救命率が飛躍的に向上した現在においても、未熟児動脈管開存症（PDA）は超・極低出生体重児の生命予後を大きく左右する。内科的治療薬であるPGE合成阻害薬は在胎週数が短いと動脈管の未熟性から効果が得られない場合も多く、投与後の腎機能低下、低血糖、出血傾向などの副作用の出現が懸念される。また、治療効果が得られない場合の外科的治療は超低出生体重児には不可能の場合があり、手

術にいたる場合にも周術期の管理が患児に多大なリスクを与える。これらのことがPDAの治療を困難にしていることから、さらなる治療法の開発が望まれている。

（2）動脈管閉鎖は内的・外的要因の影響を強く受けることで知られているが、血清浸透圧の変化が動脈管の開存あるいは閉鎖に及ぼす影響は、これまでに検討されたことが無い。

(3) 先行実験において以下が明らかであった。

①ラット新生仔の出生前後の血清浸透圧を検討した結果、胎生末期に比べ、生後一過性に浸透圧が低下していた。

②胎生末期のラット動脈管において、低浸透圧を感受する TRPM3 チャンネルの発現が、大動脈に比べて有意に増強していた。

2. 研究の目的

(1) 動脈管閉鎖機序における血清浸透圧低下の役割を解明し、また、その分子生物学的メカニズムを解明する。

(2) PDA の治療において血清浸透圧の管理が治療戦略の一つになり得るかを検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 血管張力測定

①ラット動脈管および大動脈の血管リングモデルを作製し低浸透圧刺激により張力が増強するかを検討した。

②TRPM3 刺激薬、Pregnenolone Sulfate を作用させた際の血管張力の変化を測定した。

(2) 細胞内 Ca イオン濃度測定

①ラット動脈管平滑筋培養細胞において、Fura-2 を用いて低浸透圧刺激を行った際の細胞内 Ca イオン濃度の変化を測定し、大動脈平滑筋培養細胞と比較した。

②siRNA を用いて、動脈管平滑筋培養細胞の TRPM3 の発現を抑制してから、低浸透圧刺激を行った際の、細胞内 Ca 濃度の変化を測定した。

(3) 急速全身凍結法

①TRPM3 刺激薬、Pregnenolone Sulfate を妊娠ラット子宮内において胎仔に皮下注射にて投与し、in vivo で動脈管に対する急性収縮効果を検討した。実体顕微鏡下に動脈管/肺動脈の径比を測定した。

②出生直後のラット新生仔に種々の高濃度食塩水を注射して血清浸透圧を操作し、高浸透圧モデルにおいて動脈管収縮が抑制されるか、同様の方法で検討した。

(4) ヒト早産児における研究

①ヒト新生児の血清浸透圧が周産期にどのように変化するのか、早産児の血清サンプルおよび臨床情報を前方視的に収集し、在胎週数によって生後の血清浸透圧変動に違いがあるかを検討した。

②PDA 発症のリスクが高い未熟な週数群において、PDA 発症例と非発症例において血清浸透圧の変動に違いがあるか、検討した。

③出生直後の血清浸透圧の変化に影響する在胎週数以外の周産期因子（新生児仮死、呼吸障害等）について検討した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

①血管張力測定では 300mOsm/kg より開始して段階的に 220mOsm/kg まで浸透圧を低下させた結果、動脈管では浸透圧を低下させるほど張力が増強するという結果が得られた（図 1）。一方、大動脈では同様の張力の変化が見られなかった（図 2）。また、薬剤を用いて TRPM3 刺激を行うと動脈管では張力の増強が濃度依存性に見られた。

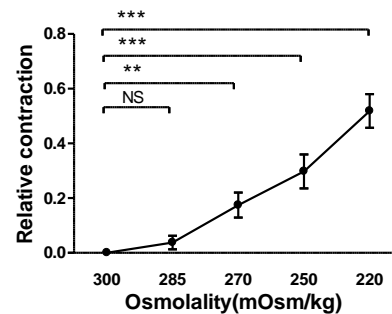


図 1

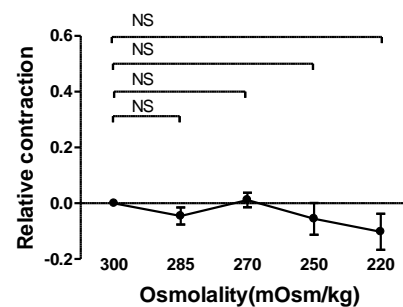


図 2

②細胞内 Ca 濃度 $[Ca_{2+}]_i$ の測定では、低浸透圧刺激により動脈管平滑筋細胞では $[Ca_{2+}]_i$ が上昇したが（図 3）、大動脈平滑筋細胞では変化しなかった。また、この上昇は siRNA を用いて TRPM3 の発現を阻害すると抑制された。

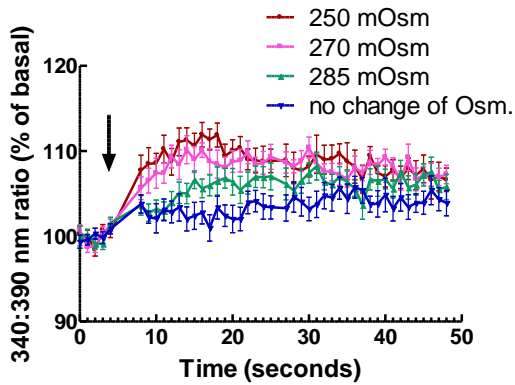


図 3

③急速全身凍結法により、in vivo で TRPM3 刺激薬 Pregnenolone Sulfate を胎仔に投与すると動脈管の急性収縮効果が見られた。また、出生直後に、新生仔を高血清浸透圧にすると、その程度に応じて、動脈管の収縮が阻害された。

④ヒト早産児 63 例における生後血清浸透圧の検討では、血清浸透圧が出生後早期に有意に低下し、その低下の程度が在胎週数に依存していた。後期早期産児では大きく低下し、超早期産児ではほとんど低下がみられないという特徴があった (図 4)。また、超早期産児 28 例についてさらに検討すると、PDA 発症群では、非発症群に比較して、浸透圧の上昇が早期に起きていることから、出生後早期の低血清浸透圧の維持が動脈管閉鎖において重要な役割を果たしている可能性が示唆された (図 5)。

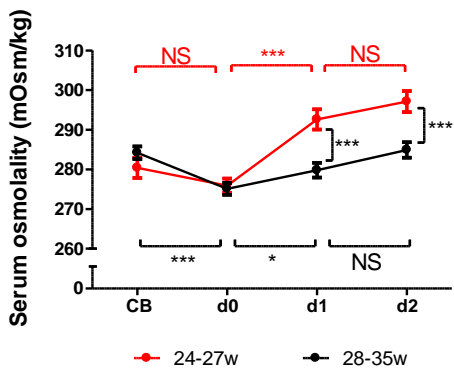


図 4

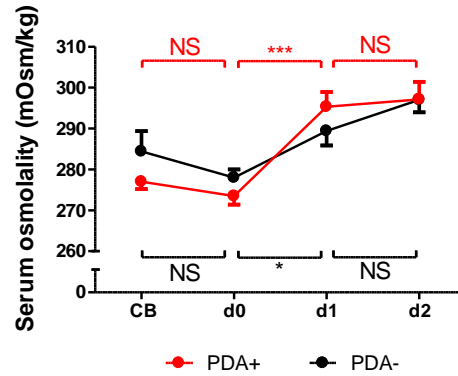


図 5

(2) 得られた成果の位置づけとインパクト
この研究は、出生後の生理的な低血清浸透圧が動脈管閉鎖において重要であることを、動物実験、ヒト臨床研究の両方から、初めて明らかに示したものである。

(3) 今後の展望

今後、臨床において、この研究成果を役立てることが重要と考えられる。PDA の発症を予防し、症候化に至らないようにするために血清浸透圧を出生直後よりモニタリングすることや、PDA の治療が必要な症例に対して、PGE 合成阻害剤による治療を、より効果的に行うため、輸液療法や加湿方法などを工夫して患児の血清浸透圧を積極的に管理することを新たに治療戦略に加えることが大切であると考えられる。得られた結果は近日中に論文として公表し、未熟児動脈管開存症の発症予防および治療の戦略として内外で広く提唱して行く予定である。

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)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 青木理加、動脈管収縮における出生後低血清浸透圧の役割、第 90 回日本生理学会大会、2013 年 03 月 28 日、タワーホール船堀 (東京都)
- ② Aoki R, Plasma Hypoosmolality after Birth Promotes Closure of the Ductus Arteriosus. AHA Basic Cardiovascular Science 2012 Scientific sessions, 2012 年 07 月 24 日, Hilton New Orleans Riverside (New Orleans, USA)
- ③ 青木理加、動脈管閉鎖における低浸透圧センサー-Transient Receptor Potential Melastatin 3 (TRPM3) チャンネルの役割、2011 生理研研究会 心血管イオンチャネル・トランスポーター研究の新展開、2011 年 11 月 30 日、生理研研究所 (愛知

- 県)
- ④ 青木理加、動脈管収縮における出生後の血清浸透圧低下の役割、第 56 回日本未熟児新生児学会、2011 年 11 月 14 日、東京国際フォーラム（東京都）
 - ⑤ 青木理加、生後の血清浸透圧低下が動脈管収縮に及ぼす作用の検討、第 2 回 Molecular Cardiovascular Conference II、2011 年 9 月 3 日、キロロ ホテルピアノ（北海道）
 - ⑥ 青木理加、ラット動脈管閉鎖における低浸透圧センサー Transient Receptor Potential Melastatin 3 (TRPM3) チャンネルの役割、第 55 回日本未熟児新生児学会、2010 年 11 月 7 日、神戸国際会議場（兵庫県）
 - ⑦ Aoki R, The Role of Transient Receptor Potential Melastatin-Related Channel M3 (TRPM3) in rat Ductus Arteriosus, The 3rd Congress of Asia-Pacific Pediatric Cardiac Society, 2010 年 7 月 7 日, シェラトングランデ東京ベイホテル（千葉県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 理加 (AOKI RIKA)
横浜市立大学・医学研究科・客員研究員
研究者番号：50542437

(2) 研究分担者

横山 詩子 (YOKOYAMA UTAKO)
横浜市立大学・医学部・講師
研究者番号：70404994
南沢 享 (MINAMISAWA SUSUMU)
横浜市立大学・医学研究科・客員教授
研究者番号：40257332

(3) 連携研究者

該当無し

(4) 研究協力者

関 和男 (SEKI KAZUO)
横浜市立大学・市民総合医療センター・准教授
研究者番号：50236072