

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 24 年 4 月 25 日現在

機関番号：32653  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2010～2011  
 課題番号：22791040  
 研究課題名（和文） 静脈管や臍帯動脈が酸素を感受して収縮弛緩する機序、小胞体と Rho キナーゼの役割  
 研究課題名（英文） Analysis of constriction mechanisms in response to oxygen in the ductus venosus and umbilical vessels - The role of sarcoplasmic reticulum and Rho kinases -  
 研究代表者  
 竹内 大二（TAKEUCHI DAIJI）  
 東京女子医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：40328456

研究成果の概要（和文）：臍帯動静脈の収縮弛緩に関する遺伝子の発現変動を解析した。Rho パスウェイでは RhoB>A、Rho キナーゼ 1>>2 であったが、胎仔の発達に伴う発現変動はわずかで、動静脈間の差も少なかった。筋小胞体および収縮タンパク質は、発達に伴って発現は概ね増加した。筋小胞体の Ca 濃度制御タンパク質の発現変動や血管による違いは大きかった。胎仔の臍帯動静脈の筋小胞体は、発達段階および血管ごとに異なる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Gene expression related to vascular constriction/dilation in rabbit umbilical arteries and veins was analyzed by real-time quantitative PCR. Expression levels of RhoB and Rho kinase 1 in the umbilical vessels were higher than those of RhoA and Rho kinase 2, respectively. Expression levels of Rho pathway genes in umbilical vessels during fetal development were relatively stable. Gene expression related to the regulation/storage of Ca<sup>2+</sup> in the sarcoplasmic reticulum (SR) and the contraction proteins was increased as fetal development. Expression levels of the SR Ca<sup>2+</sup> regulation/storage protein genes varied among these umbilical vessels. Since the content and constitution of SR proteins involved in Ca<sup>2+</sup> regulation varied during fetal development, the SR activity of the Ca<sup>2+</sup> release/storage might be differ according to the umbilical vessel and the developmental stage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：臍帯動脈，静脈管，酸素，Rho キナーゼ，Ca

1. 研究開始当初の背景

(1) 臍帯動脈は、胎盤や胎児の酸素供給

需要にあわせて収縮弛緩している。静脈管は生後、血中の酸素濃度上昇に伴い収縮し閉鎖

する。臍帯動脈や静脈管が酸素濃度の変化に応じて収縮弛緩する機序を調べることは、胎児の発育不全や胎盤機能不全を治療するうえでも必須の知識であるが、この方面の基礎的研究はきわめて少ない。

(2) 血管平滑筋の収縮弛緩は血管抵抗を制御し、胎児の発育や心機能に大きな影響を与える。血管平滑筋の収縮弛緩はカルシウム (Ca) イオンによって媒介される。膜が脱分極すると細胞外から細胞内へ流入する Ca 電流が増加する。また細胞膜に存在する交感神経や副交感神経受容体が刺激されると刺激伝達系によりシグナルが小胞体に伝達され、小胞体からの Ca 放出が増加し、細胞内 Ca イオンが増加することで収縮がもたらされる。成熟した平滑筋では、細胞膜から流入する Ca が小胞体に存在するリアノジン受容体を刺激し Ca を放出したり、イノシトール 3 磷酸が筋小胞体よりの Ca 放出をうながしたりして、細胞内 Ca 濃度が上昇して平滑筋収縮が起こることが知られている。小胞体にはリアノジン受容体、Ca-ATPase, カルセクエストリン, ホスホランバンなどの Ca 結合タンパク質があり、Ca と結合して小胞体からの Ca 放出や Ca 取り込みを制御している。

(3) 血管平滑筋の収縮は、細胞内 Ca 濃度増加とは別に、Ca に対する感受性増加によっても制御されている。即ち、GTP 結合蛋白 (GTP-Rho A や GTP-Rho B) は Rho キナーゼを活性化し、Rho キナーゼの活性化はミオシン軽鎖フォスファターゼをリン酸化し、結果的にその活性を落とすことで、ミオシン軽鎖はリン酸化され、Ca に対する感受性が上がり、収縮がうながされる。

(4) 臍帯血管や静脈管の平滑筋細胞の収縮機構の研究はない。臍帯血管や静脈管の平滑筋細胞の収縮機構について、とくに、小胞体からの Ca 放出機構の発達と機能を調べ、

また、Rho キナーゼによる Ca 感受性制御の機構を調べ、それらの過程に対する酸素の影響を検討することが本研究の最終目的である。

(5) 臍帯血管や静脈管の興奮、収縮連関、特に小胞体の Ca 制御の特色を調べることは、胎児や新生児の心不全を治療するうえでも必須の知識であるにもかかわらず、国内外で、従来まったく同類の研究は無い。これらの血管の酸素感受性の機序に関してもまったく研究されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、臍帯動脈や静脈管が酸素濃度の変化に応じて収縮弛緩する機序を明らかにするため、未熟・成熟胎仔の臍帯動静脈血管における収縮機構、特に、Rho パスウェイ、筋小胞体の Ca 制御機構、筋収縮タンパク質の機能的発達について明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 血管試料の採取

妊娠30日(満期)、妊娠27日(早期)、妊娠21日(超早期)の家兎胎児および家兎新生仔(生後2日)を取り出し直ち

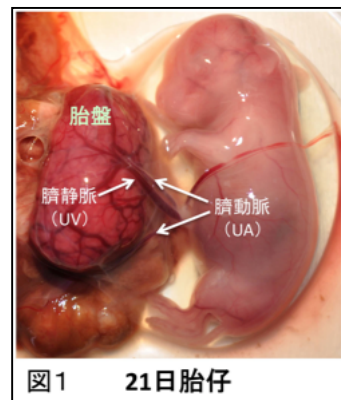


図1 21日胎仔

した。図1および2に示したように、体外の臍帯動脈 (UA)、臍帯静脈 (UV)、腹腔内臍帯動脈 (IUA)、腹腔内臍帯表脈 (IUVA) 及び静脈管 (DV) を可及的速やか

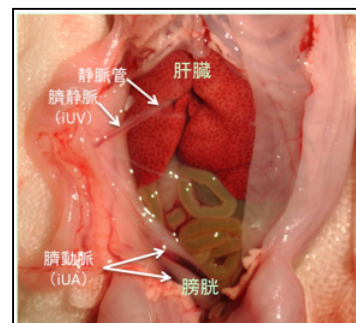


図2 30日胎仔

採取し、実体顕微鏡下氷冷生理食塩液中で血液成分などの付着をできる限り除去し、RNAlater液中で-20℃に保存し分析試料とした。

### (2) リアルタイムPCRによる血管の収縮弛緩に関する遺伝子の発現変動解析

採取した組織試料から RNeasy mini (Qiagen) を用いて total RNA を抽出し、DNaseI 処理後、逆転写反応により cDNA 試料を調製した。得られた胎仔・新生仔の各血管試料の cDNA を測定試料として、リアルタイム PCR 法によりターゲット遺伝子の発現 (mRNA) の定量を行った。ターゲット遺伝子の一部を含むプラスミドをスタンダードとして段階希釈し標準曲線を作製して絶対定量を行った。内部標準としてリボソーマル 18S を用いた。結果の表示は、「ターゲット遺伝子の cDNA のコピー数 / 18S cDNA のコピー数 x 10<sup>6</sup>」とした。

### (3) 蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動法 (2D-DIGE) による発現量の変動解析

RNA抽出後の組織溶解液をアセトン沈殿しタンパク質を抽出した。7Mウレア、2Mチオウレア、4%CHAPS、10mM HEPES, pH 8.6、プロテアーゼ阻害剤 (Complete, Roche Molecular Biochemicals) を含む可溶化用緩衝液によりタンパク質を可溶化した。各組織抽出タンパク質試料25 μgを適宜それぞれIC-3-0su又はIC-5-0Su (いずれも同仁化学研究所) を用いて戸田らの蛍光標識法<sup>1)</sup>に準拠し蛍光標識した。蛍光標識後、適宜IC-3とIC-5標識の血管タンパク質試料を混和し、アセトン沈殿し再度8Mウレア、65 mM dithiothreitol、4%CHAPS、1% Ampholyte (pH3-10, Invitrogen)を含む1

次元電気泳動用可溶化液を用いてタンパク質を可溶化した。1次元目は、等電点 (ZOOM Strips pH3-10 NL, Invitrogen)、2次元目は10% SDS-PAGE (NuPAGE 10% Bis-Tris Gel IPG Well, Invitrogen) の二次元電気泳動を行った。

### (4) 質量分析用試料の調製と測定

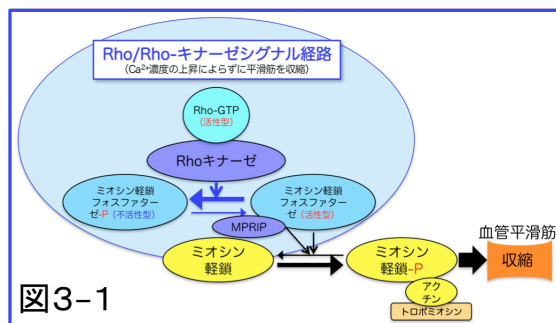
二次元電気泳動法により分離されたタンパク質スポットを EXQuest Spot Cutter (BioRad) を用いて切り出し、洗浄、ジチオスレイトールによる還元処理、ヨードアセトアミドによるアルキル化処理後、ゲル内トリプシン消化し、ZipTip (Millipore) を用いて脱塩し濃縮して、測定用試料とした。マトリックスには、α-cyano-4-hydroxycinamic acid を用い、ターゲットには、MTP AnchorChip 600/484 を用いた。Autoflex II MALDI-TOF/TOF-MS (ブルカー・ダルトニクス) により質量分析を行った。検索ソフト MASCOT を用いたペプチドフィンガープリンティング法によりタンパク質を帰属した。

## 4. 研究成果

(1) 定量PCR法による血管の収縮弛緩に関する遺伝子の発現変動解析

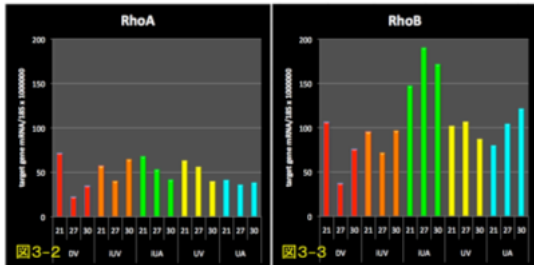
### ① Rhoパスウェイ

Rhoパスウェイを図3-1に示した。



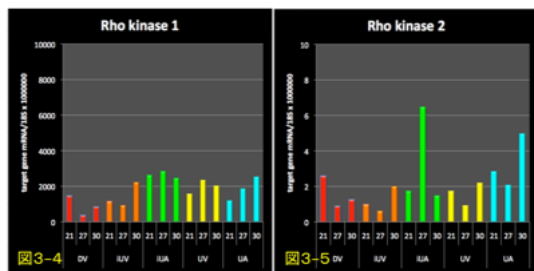
- RhoA (図3-2) とRhoB (図3-3)

静脈管と体内外の臍帯動脈において、胎仔の発達に伴うRhoAとBの発現変動は小さかった。また、発現量は、RhoBがRhoAより2～3倍高かった。



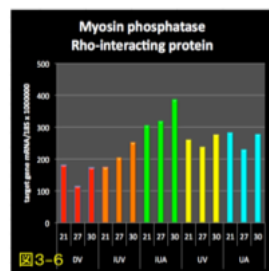
- Rhoキナーゼ 1 (図3-4) と 2 (図3-5)

静脈管と体内外の臍帯動脈において、胎仔の発達に伴うRho キナーゼ 1 と 2 の発現変動は小さかった。発現量は、Rhoキナーゼ 1 がRho キナーゼ 2より100倍程度高かった。



- ミオシンフォスファターゼ-Rho 相互作用タンパク質 (MPRIIP) (図3-6)

静脈管と体内外の臍帯動脈において、胎仔の発達に伴うMPRIIPの発現変動は全般に小さかった。



② 筋小胞体

筋小胞体から放出されたCaが、細胞内Ca濃度を上昇させ、カルモジュリン-Ca複合体を形成しミオシンキナーゼの活性化を促して血管平滑筋を収縮させるパスウェイを図4-1に示

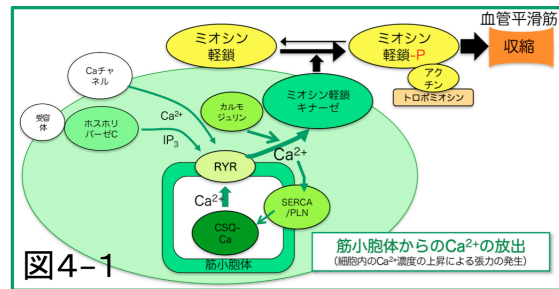
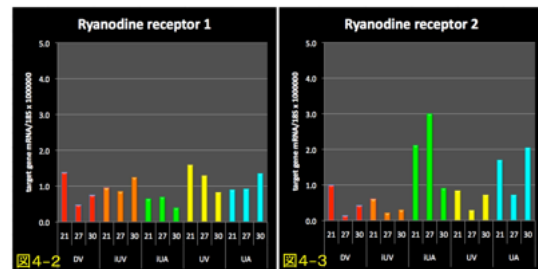


図4-1

した。

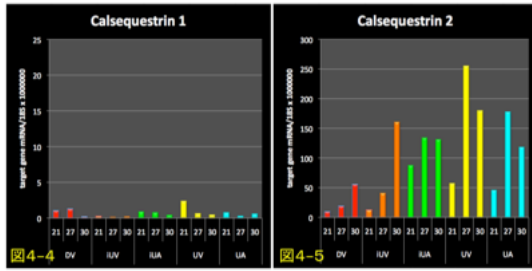
- リアノジン受容体1 (図4-2) と 2 (図4-3)

静脈管、IUV及びUVではリアノジン受容体1 (骨格筋型) がリアノジン受容体2 (心筋型) よりやや高い発現を示したが、IUAとUAでは、リアノジン受容体2の方がやや高い発現を示した。いずれの臍帯動脈においても胎仔の発達に伴うリアノジン受容体の発現量の変動は小さかった。



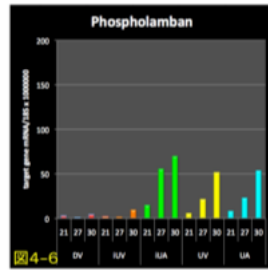
- カルセクエストリン1 (図4-4) と 2 (図4-5)

Caを貯蔵するカルセクエストリンの発現量は、カルセクエストリン2 (心筋型) がカルセクエストリン1 (骨格筋型) より50倍程度高かった。カルセクエストリン1の発現量は5臍帯血管で胎仔の発達に伴って減少を示し、カルセクエストリン2は、静脈管とIUVでは発達に伴って増加し、IUA, UV, UAでは27日でピークを示し、30日で減少した。静脈管とIUVのカルセクエストリン2の発現は胎仔の発達に伴って大きく増加した。UVとUAにおけるカルセクエストリン2の発現も妊娠27日をピークとして大きく増減した。



- ホスホランバン (図4-6)

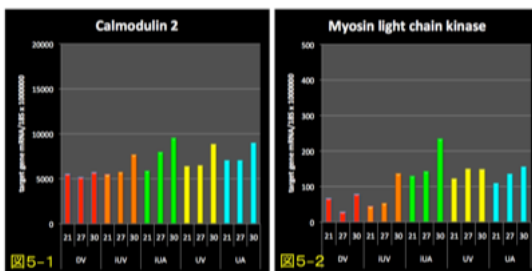
ホスホランバンの発現量は胎仔の発達に伴って、すべての臍帯動静脈で増加傾向を示した。静脈管とIUVでは低発現であり、IUA, UV, UAでは、一般に発現が高く、満期胎仔で最も高発現を示した。



③ 収縮タンパク質とそのリン酸化に関わるタンパク質

- カルモジュリン2 (図5-1)

カルモジュリン2の発現は、胎仔の成熟に伴う変動は小さいが、発達に伴っていずれの臍帯動静脈でも増加傾向を示した。Rhoパスイエイや筋小胞体の遺伝子群に比べて、発現量の絶対量が多い。



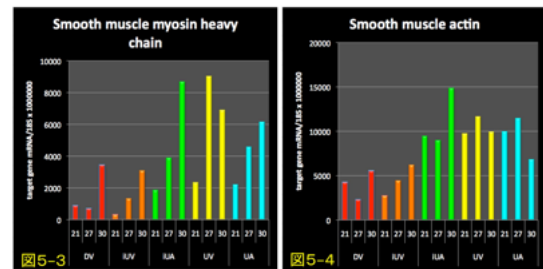
- ミオシン軽鎖キナーゼ (図5-2)

ミオシン軽鎖キナーゼは、胎仔の発達に伴っていずれの臍帯動静脈でも増加傾向を示した。カルモジュリン2の発現量と相関性の高い変動パターンを示した。また、カルモジュリンの数はミオシンキナーゼのおよそ50倍あ

り、細胞内のCaイオン濃度の増減を敏感にミオシン軽鎖キナーゼに伝達するシステムであると思われた。

- ミオシン重鎖 (図5-3)

ミオシン重鎖の発現は、発達に伴い増加する傾向を示した。特にIUAやUAなど動脈で顕著に増加した。平滑筋ミオシン重鎖および平滑筋アクチンでは、発達に伴い増加した。



- 平滑筋アクチン (図5-4)

アクチンの発現は、胎仔の発達に伴って増加する傾向を示した。平滑筋ミオシン重鎖と相関性のある発現パターンを示した。

(2) 蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動法による発現変動解析 (図6-1~6)

臍帯動静脈の未熟期に高発現する7タンパク質を帰属した(図6-6)。分子量の大きい順にヒートショックプロテイン(HSP)90β、HSP90α、HSP70(GRP78)、プロテインイソメラーゼ(PDI)前駆体、PDIA3前駆体、HSP47、PDIA6であった。いずれもタンパク質の正しい折りたたみ構造の獲得を助けるシャペロン機能を持つタンパク質であった。また、臍帯動静脈の成熟期に高発現する2タンパク質α-fetoprotein(AFP)とtransgelin(SM22)を帰属した。AFPは胎仔のアルブミンと考えられる糖タンパク質である。SM22は平滑筋に高発現するアクチン結合タンパク質の一つ



であり、細胞の形状の変化や形質転換に関係することから、臍帯動脈の収縮制御に寄与すると考えられる。

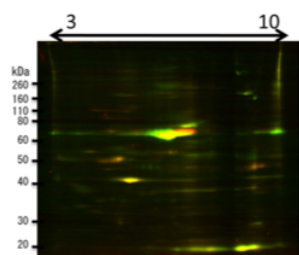


図6-1 静脈管 21日/30日

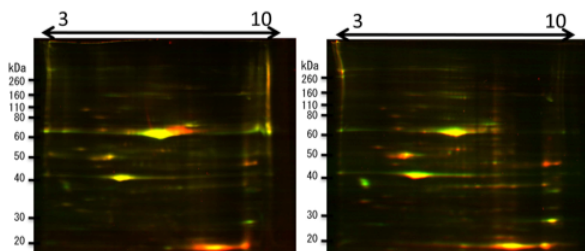


図6-2 体内臍帯静脈 21日/30日

図6-3 体外臍帯静脈 21日/30日

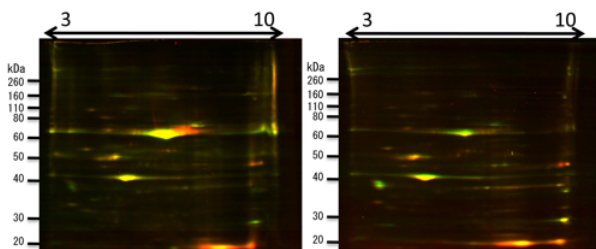


図6-4 体内臍帯動脈 21日/30日

図6-5 体外臍帯動脈 21日/30日

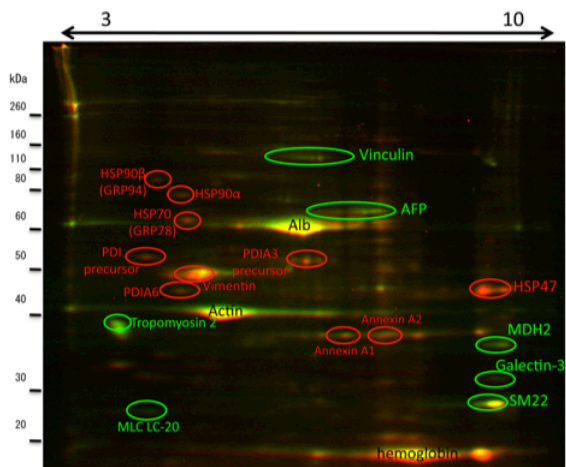


図6-6 体外臍帯静脈 21日/30日

HSP: heat shock protein, PDI: protein disiomerase, AFP: α-fetoprotein, MDH2: mitochondrial malate dehydrogenase, MLC: Myosin light chain, SM22: transgelin

ャペロン群の発現が高く、タンパク質の合成が活発であることが容易に推定されるが、酸化還元に関係して機能する *PDI* など多機能なタンパク質が多いことから、臍帯動脈のみならず胎仔の成熟に重要な役割を担っていると考えられる。胎仔の成熟期において *SM22* の増加が見られたことから、この時期の臍帯動脈の収縮制御が盛んであると推定される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① 中西敏雄, 羽山恵美子, 勝部康弘. 胎児血管の収縮制御システムの発現変動解析 (財)日本心臓血圧研究振興会 (平成二十三年度研究業績集) 26, 2012. (掲載確定)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹内 大二 (TAKEUCHI DAIJI)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号: 40328456

本研究により、未熟臍帯動脈では分子シ