

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580413

研究課題名(和文)胎盤における一酸化窒素産生制御とニトロシル化タンパク質の関与

研究課題名(英文) Involvement of s-nitrosylation on the effect of nitric oxide and its production in rat placenta

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ラット胎盤における血管内皮細胞増殖因子(VEGF)発現に及ぼすNOの影響を検討した。NOS阻害剤L-NAME投与後のNO産生を解析した。NO産生はL-NAMEにより対照群の約15%に減少した。VEGF発現はNOS阻害6時間では減少し、24時間では回復した。また、低酸素誘導因子(HIF)-1と誘導型NOSの発現は増加した。組織片培養ではiNOS誘導剤であるリボ多糖により増加したVEGF発現はL-NAMEとの併用により減少した。これらの結果は、in vivoとin vitroでNOはVEGF発現を誘導し、NO産生はHIF-1aを介したVEGFとの相互作用により維持されている可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：We examined the role of nitric oxide (NO) in vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the rat placenta. A nitric oxide synthase (NOS) inhibitor, L-NAME was constantly infused into pregnant rats 6-24 h before sacrifice on gestational day (GD) 15.5. NO production declined to about 15% of the control level as monitored by NO trapping and electron paramagnetic resonance spectroscopy. VEGF expression was temporally decreased by L-NAME, but recovered to normal levels after 24 h of treatment, whereas hypoxia inducible factor (HIF)-1 α and inducible NOS (iNOS) expression increased. VEGF expression decreased significantly in placental explants after 6 h of co-treatment with L-NAME and lipopolysaccharide, an iNOS inducer. These results indicate that NO induce VEGF expression in vivo and in vitro in the rat placenta, suggesting that peaked NO production was maintained by a reciprocal relationship between NO and VEGF via HIF-1 α .

研究分野：農学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：一酸化窒素(NO) S-ニトロシル化 子宮・胎盤 スピントラップ・EPR ラット

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素 (NO) は容易に酸化されるため半減期は短く、組織における NO 産生量を解析することは容易ではないため、不明のまま残されている部分も多い。妊娠中は NO 産生が増加することから、妊娠維持に NO が関与し、その異常は子癩前症などの疾病と関連することが明らかになっている。これまでの研究により、子宮・胎盤における NO 産生の全体像が明らかになりつつあり、またいくつかの NO 産生の役割も明らかにされてきた。しかしながら、まだ不明な点が残されている。

最大の課題として NO 合成酵素 (NOS) 遺伝子の発現調節機構が挙げられる。ラット子宮においてはステロイドホルモンにより NOS 発現が主に調節されている。一方、胎盤においては、別の因子群により NOS 発現が調節されていることが明らかになりつつあるが、その候補因子の同定は未だなされていない。NOS により産生された NO が様々なタンパク質のシステイン残基のチオール基と結合し、S-ニトロシル化することにより、そのタンパク質の性質を修飾することが報告されている。当初、S-ニトロシル化は、誘導型 NOS 由来の比較的多量の NO 産生時に生じる現象と考えられ、敗血症などにおいて研究が進められていた。しかし、近年、内皮型 NOS や神経型 NOS 由来の比較的小量の NO によっても S-ニトロシル化が生じることが明らかになり、NOS により産生される NO すべてに共通する修飾機構であると理解されてきた。胎盤における NO 産生において、ステロイドホルモンに代わる NOS 誘導の候補因子の一つである低酸素誘導因子 (HIF-1) は、化学的に NO を放出する NO 供与体により S-ニトロシル化されると、酸素によるユビキチン化が抑制され、HIF-1a の安定性が増強されることも報告された。これらのことから NO によるタンパク質の修飾が、NOS の発現自体に関与している可能性が予想されている。また、HIF-1 により誘導を受ける遺伝子群には誘導型 NOS や血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) も含まれ、さらに NOS と VEGF との相互作用も報告されている。

2. 研究の目的

代表者らは子宮・胎盤における一酸化窒素 (NO) 産生を直接解析し、同時に NO 合成酵素 (NOS) の発現を検討してきた。しかし、NO 産生の解析が困難なことから NO 産生の調節について不明な点が残されていた。子宮・胎盤における NO 産生の調節やその作用発現に S-ニトロシル化や低酸素誘導因子 HIF-1 が関与しているとの仮説の下に、HIF-1 との相互作用が報告されている血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) と NO 産生との関与

を検討する。

3. 研究の方法

胎盤における NO 産生およびその作用を検討するために、NOS 阻害モデルを用いて、NOS 阻害時の誘導型 NOS の発現、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、低酸素誘導因子 (HIF-1) などの発現を経時的に解析した。また、胎盤からの組織片培養法を確立し、平常時およびリポ多糖での誘導時の NOS 発現及び HIF-1a 発現と VEGF 発現を検討した。さらに、チオール基をピオチンと置換することにより、S-ニトロシル化を検出するピオチンスイッチ法を用いて、S-ニトロシル化タンパク質を検出した。

4. 研究成果

NO 産生のピークが認められる妊娠 15.5 日のラット胎盤を用いて、NOS 阻害剤 L-NAME による NOS 阻害モデルを作製した。NOS 阻害モデルにおける NO 産生をモニターすると、NOS 阻害群では、対照群の約 15% に低下していることが確認された。さらに、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) 遺伝子と HIF-1a 遺伝子の発現は、NOS 阻害後いずれも経時的に有意に増加した。一方、VEGF 遺伝子発現は、一過性に有意に減少したのち、正常レベルに回復した。

次に、ラット胎盤を用いた組織片培養により、経時的に iNOS、HIF-1a、VEGF 遺伝子の発現を解析した。胎盤組織片培養にリポ多糖を添加することにより iNOS 遺伝子発現が著しく増加し、また、VEGF 遺伝子発現も同時に増加していた。さらに、NOS 阻害剤を併用すると、リポ多糖により促進された VEGF 遺伝子発現の増加は完全に抑制された。

これらの結果から、NO は *in vivo* と *in vitro* において、ラット胎盤における VEGF 発現を誘導していることが示された。HIF-1 は、iNOS と VEGF の転写誘導因子でもあり、また、VEGF も iNOS と HIF-1 を誘導することが報告されていることから、これらの結果は、妊娠中期にピークが認められる胎盤における NO 産生は、HIF-1a を介した VEGF と NO との相互作用により維持されていることが示唆された。

また、NO-ピオチンスイッチ法を用いて、胎盤における S-ニトロシル化タンパク質の検出を試みた結果、S-ニトロシル化されたタンパク質が多数検出された。しかし、特異的な挙動を示すタンパク質を検出することはできなかった。一方、子宮内膜においては、NOS

阻害モデルにおいて、アポトーシス関連因子のS-ニトロシル化が検出され、NO産生と関連する因子を検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4件)

Abe H, Ishikawa W, Kushima T, Nishimura T, Mori C, Onuki A, Suzuki T, Ishii Y, Kansaku N, Miyazaki Y, Tanaka K, Morita H and Takizawa T. Nitric oxide induces vascular endothelial growth factor expression in the rat placenta *in vivo* and *in vitro*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2013, 77(5):971-6.

Suzuki T, Uchida M, Takeda Y, Mori C, Onuki A, Miyazaki Y, Onda K, Ushikoshi S, Shitori K, Tanaka K, Morita H and Takizawa T. Aqueous extracts of *Rhizopus oryzae* induce nitric oxide production in rat hepatocyte cell line RLN-10. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2013, 77(7):1384-9.

Kurihara Y, Suzuki T, Sakaue M, Murayama O, Miyazaki Y, Onuki A, Aoki T, Saito M, Fujii Y, Hisasune M, Tanaka K and Takizawa T. Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, decreases proliferation of and induces specific neurogenic differentiation of canine adipose tissue-derived stem cells *J. Vet. Med. Sci.* 2014, 76(1):15-23.

Watanabe M, Tanaka K, Takizawa T, Segawa K, Neo S, Tsuchiya R, Murata M, Murakami M and Hisasue M. Characterization of canine tetranucleotide microsatellite marker located in the first intron of the tumor necrosis factor alpha gene. *J. Vet. Med. Sci.* 2014, 76(1): 119-22.

〔学会発表〕(計 9件)

イヌ脂肪組織由来間葉系幹細胞の細胞増殖および多分化能に及ぼすヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の影響. 栗原康弘、中岡優希、藤井祐輝、藤田雄大、宮崎陽子、田中和明、滝沢達也. 日本獣医学会学術集会、2011年9月

ラット子宮におけるカスパーゼカスケードと細胞増殖に及ぼす一酸化窒素(NO)の影響. 石川亘、宮崎陽子、鈴木武人、田中和明、滝沢達也. 日本獣医学会学術集会、2011年9月

Rhizopus oryzae 水抽出物の肝障害抑制効果の検討. 桐山真里奈、松田啓介、岸川正

剛、牛越設男、滝沢達也、福岡秀雄、入来常徳、猪股智夫、鈴木武人. 日本獣医学会学術集会、2011年9月

ラット胎盤における NOS 発現に及ぼす低酸素の影響と低酸素誘導調節因子. 阿部秀明、本間智秋、宮崎陽子、鈴木武人、田中和明、滝沢達也. 日本獣医学会学術集会、2011年9月

ラット脂肪組織由来間葉系幹細胞の神経細胞分化に及ぼすバルプロ酸の影響と一酸化窒素の関与. 大久保巧、宮崎陽子、田中和明、滝沢達也. 日本生化学会総会、2012年12月

ラット脂肪組織由来間葉系幹細胞の神経細胞分化に及ぼすヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の影響その2. 藤井祐輝、藤田雄大、宮崎陽子、田中和明、滝沢達也. 日本生化学会総会、2012年12月

ラット脂肪組織由来間葉系幹細胞の神経細胞分化に及ぼすヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の影響 その1. 藤田雄大、藤井祐輝、宮崎陽子、田中和明、滝沢達也. 日本生化学会総会、2012年12月

バルプロ酸によるラット脂肪組織由来間葉系幹細胞の神経細胞分化の促進とその分子メカニズム. 藤田雄大、藤井祐輝、鈴木武人、宮崎陽子、田中和明、滝沢達也. 日本獣医学会学術集会、2013年9月

ラット脂肪組織由来間葉系幹細胞の神経細胞分化に及ぼすバルプロ酸の影響と一酸化窒素合成酵素の関与. 大久保巧、宮崎陽子、鈴木武人、田中和明、滝沢達也. 日本獣医学会学術集会、2013年9月

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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)連携研究者

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