

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461639

研究課題名(和文) 未熟児特有のアミノ酸代謝に基づいた動脈管開存症を軽減しうるアミノ酸輸液組成の検討

研究課題名(英文) Glutamate Promotes Contraction of the Rat Ductus Arteriosus

研究代表者

藤田 秀次郎 (FUJITA, Shujiro)

横浜市立大学・医学研究科・共同研究員

研究者番号：90381516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：未熟児動脈管開存症は、未熟児の生命および発達予後に影響を及ぼす高頻度かつ重大な疾患であるが、動脈管の閉鎖に対するアミノ酸の影響はこれまで明らかでなかった。本研究により、グルタミン酸がノルアドレナリン産生によりラット動脈管収縮を誘発することが明らかとなった。グルタミン酸の投与がヒト超早産児における動脈管開存症の予防に有用となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Patent ductus arteriosus is a frequent and serious disease affecting the life and developmental prognosis of premature infants, but the influence of amino acids on the closure of the ductus arteriosus has not been clarified so far. This study revealed that glutamate induces rat ductus arteriosus contraction due to noradrenaline production. Administration of glutamate may be useful for prevention of patent ductus arteriosus in human premature infants.

研究分野：新生児学

キーワード：動脈管開存症 グルタミン酸 アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、先行研究でヒト超早産児では特定の血清中アミノ酸が極端に低下していること、中でもグルタミン酸がラット動脈管の収縮作用を示すことを明らかにした。これらは、アミノ酸輸液の組成の改良によりヒト未熟児動脈管閉存症発症を低減させる可能性を示唆していた。

2. 研究の目的

グルタミン酸投与が動脈管収縮をきたす機序を明らかにし、超早産児の予後を改善するアミノ酸輸液の組成を検討する。

3. 研究の方法

(1) 血漿中アミノ酸濃度の測定

自動アミノ酸分析装置 (L-8800A、株式会社日立製作所 (東京)) を使用して、在胎 21 日目のラット胎児とヒト早産児の血漿中アミノ酸を分析した。

(2) 免疫組織化学検査と免疫蛍光検査

在胎 21 日目のラット胎児の血液サンプルを、イソフルランで麻酔をかけた後に心臓穿刺経路で入手した。また、書面によるインフォームドコンセントを親から入手した後に 2011 年 8 月から 2014 年 2 月に横浜市立大学附属病院新生児集中治療室に入院した在胎 24 週以上 30 週未満の 27 例の早産児の臍帯動脈血及び日齢 2 での血液サンプルを採取した。これらのラット及びヒト血液サンプルを自動アミノ酸分析装置 (L-8800A、株式会社日立製作所 (東京)) を使用して、血漿中アミノ酸分析を行った。

(3) RNA 単離と定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応

在胎 21 日目のラット胎児の動脈管組織と心臓手術中に採取した大動脈縮窄複合を有するヒト新生児の動脈管組織を、抗 GluR1 抗体と抗チロシンヒドロキシラーゼ抗体を使用して染色した。

RNA 単離、cDNA 作成および定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 分析を実施した。ラット GluR1 (NM_031608.1) (5'-TCCTGTTGACACATCCAATCA-3' と 5'-CCGTTACCTGCCAGTTCTTC-3')、GluR2 (NM_017261.2) (5'-CAGTCACCAATGCTTTCTGC-3' と 5'-TGCTCCTTTGAGGTCAGGTC-3')、GluR3 (NM_001112742.1) (5'-GCTTCGTTTTAGGCGTAGCA-3' と 5'-GCTCCTGAACCGTGTTC-3')、GluR4 (NM_017263.2) (5'-CGATTTGGAGGGCATAAAAA-3' と 5'-AGAGGCATTGAAGACGATGG-3') および NMDA 型サブユニット 1 (NR1) (NM_017010.1) (5'-ACAAGCCCAACGCCATAC-3' と 5'-CCGTGCGAAGGAACTCA-3') のヌクレオチド配列に基づいてプライマーを設計した。各プライマーセットを複数のエクソン間で設計し、PCR 産物をシーケンシングによって確認した。各遺伝子の存在量は 18S 転写産物と比較して測定した。各 PCR サイクルは 95 で

30 秒間の熱変性、60 で 30 秒間のアニーリングおよび伸長、ならびに 95 で 5 秒間の熱変性から成り、当該サイクルを 40 回実施した。

(4) 急速全身凍結法

全身凍結法を使用してラット胎児 DA 標本の in situ 形態および内径を検査した。ラット母体にイソフルランで麻酔をかけ、在胎 21 日目または 20 日目の子宮内胎児に生理食塩水 (200 μ L)、0.7%グルタミン酸 (200 μ L)、0.7%グルタミン酸 (200 μ L) + 1-ナフチルアセチルスペルミン三塩酸塩 (NASPM、10 μ g) または 0.7%グルタミン酸 (200 μ L) + プラゾシン (1 μ g) を腹腔内注射した。グルタミン酸投与の 15 分前に NASPM またはプラゾシンを注射した。骨格筋緊張、呼吸数およびテールピンチに対する反応の評価によって麻酔の適切性を監視した。グルタミン酸注射の 30 分後にラット胎児を帝王切開によって分娩し、呼吸を開始する前に液体窒素で急速凍結した。凍結標本を顕微鏡下で切片にし、動脈管、肺動脈および大動脈の内径を測定した。動脈管/肺動脈比を使用して in vivo の動脈管収縮を評価した。

(5) 動脈管組織中ノルアドレナリン濃度の測定

LDN から購入した ELISA キットを使用してラット動脈管組織中ノルアドレナリン濃度を測定した。母ラットにイソフルランで麻酔をかけた後に、在胎 21 日目の子宮内胎児に生理食塩水 (200 μ L) または 0.7%グルタミン酸 (200 μ L) を腹腔内注射した。グルタミン酸注射の 30 分後にラット胎児を帝王切開によって分娩し、動脈管組織を単離し、液体窒素で急速凍結した。凍結 DA 組織を 10 mmol/L HCl、1 mmol/L EDTA および 4 mmol/L メタ重亜硫酸ナトリウム含有緩衝液中でホモジナイズし、ELISA 法を使用して分析した。製造業者の指示に従って ELISA 法を実施した。ELISA によって測定されたノルアドレナリン量の値をラット DA 組織サンプル中の総蛋白質量で割り、ラット DA 組織中のノルアドレナリン濃度 (pmol/mg 蛋白質として表現する) を得た。

(6) 統計解析

結果が平均 \pm SD として示されたものを除き、すべての値は 4 回以上の独立した実験の平均 \pm SEM として示した。値として示されているデータについては Kruskal-Wallis 検定を、比として示されているデータについてはカイニ乗検定を使用して分析し、いずれもその後必要に応じて Fisher の最小有意差 post-hoc 検定、Mann-Whitney U 検定または Fisher の正確検定を実施した。Wilcoxon の符号順位検定を使用して出生時と生後 2 日目の間の血漿中グルタミン酸濃度の低下を分析した。複数の群を比較するために一元配置 ANOVA とその後 Bonferroni の調整を使用した。2 群比較のために対応のない Student の両側 t 検定を使用した。P < 0.05 の値を有意とみなした。

4. 研究成果

(1)動脈管におけるグルタミン酸受容体発現
在胎 21 日目に、ラット動脈管における AMPA 型サブユニットおよび NMDA 型サブユニットの存在を検査し、AMPA 型サブユニット間で GluR1、GluR3 および GluR4 が豊富に発現していることを確認した。動脈管では NMDA 型サブユニット NR1 の共通サブユニットが検出されなかったことから、NMDA 受容体が DA で発現していないことが示唆された。次に、在胎日数 19 日 (e19) と 21 日 (e21) に、ラット動脈管および大動脈における GluR1、GluR3 および GluR4 mRNA 発現を定量した。定量的 RT-PCR により、動脈管は脳よりも GluR1 発現が低かったが、e19 と e21 の両方で DA では大動脈よりも GluR1 mRNA 発現レベルが有意に低かったことが明らかになった。DA では大動脈と比較して GluR3 および GluR4 mRNA 発現レベルは大きくなかった。これらのデータにより、GluR1 がラット DA における主要なグルタミン酸受容体サブタイプであることが示唆された。

(2)動脈管の自律神経終末における GluR1 の発現

免疫組織化学検査を実施して動脈管における GluR1 の局在を検査した。ラットおよびヒト DA における中膜および外膜の外層で GluR1 に対する強力な免疫反応が検出された。自律神経終末マーカーであるチロシンヒドロキシラーゼの蛋白質も同様にラットおよびヒト DA の中膜および外膜の外層で検出された。免疫蛍光染色から GluR1 がチロシンヒドロキシラーゼと共局在したことが実証された。これらのデータにより、GluR1 が DA 自律神経終末で発現したことが示唆された。

(3)動脈管におけるグルタミン酸に誘発されるノルアドレナリン産生

グルタミン酸をラット胎児に腹腔内投与し、注射の 30 分後に血漿サンプルを採取した。ラット血漿中グルタミン酸濃度の著明な増加が観察された。グルタミン酸投与の 30 分後に動脈管組織を採取し、ELISA を使用して動脈管組織中ノルアドレナリン濃度を測定した。グルタミン酸投与によりラット動脈管組織におけるノルアドレナリン産生の著明な増加が生じた。

(4)グルタミン酸によるラット動脈管収縮

グルタミン酸の腹腔内投与は動脈管収縮を促進したが、この影響は AMPA 受容体アンタゴニストである NASPM によって減衰した。グルタミン酸誘発性動脈管収縮はアドレナリン作動性受容体 1 遮断薬であるプラazosin によっても減衰した。これらのデータにより、グルタミン酸が AMPA 受容体およびノルアドレナリンを通じてラット動脈管収縮を誘発したことが示唆された。

(5)ヒト早産児血漿サンプルにおけるアミノ酸濃度

日齢 2 のアミノ酸投与量は、PDA を発症した超早産児 (在胎 24~27 週)、発症しなかった

超早産児および在胎 28~29 週で誕生したより成熟した早産児とで類似していた。全 3 群において動脈臍帯血サンプルのアミノ酸プロファイルに変化は観察されなかった。しかし、PDA を有する超早産児では PDA を有さない超早産児およびより成熟した早産児よりも日齢 2 の血漿中グルタミン酸濃度が低かった。Wilcoxon の符号順位検定を使用して出生時と生後 2 日目の間の血漿中グルタミン酸濃度の低下を分析したところ、PDA を有さない超早産児 (在胎 24~27 週) とより成熟した早産児 (在胎 28~29 週) で有意な低下が観察された (各々、 $P = 0.31$ と $P = 0.63$)。しかし、PDA を有する超早産児からの血漿サンプルでは、グルタミン酸濃度は出生後低下する傾向にあったが、変化は統計的有意性に到達しなかった (臍帯血: $136.5 \pm 36.5 \mu\text{mol/L}$ 、2 日目: $85.8 \pm 26.5 \mu\text{mol/L}$ 、 $P = 0.06$)。これらのデータは血漿中グルタミン酸濃度と PDA の発生との因果関係を示さないが、ラット DA から入手したデータと併せると、グルタミン酸が DA 収縮を誘発するという我々の仮説を少なくとも部分的に裏付ける。

非経口アミノ酸補給は超早産児に対して幅広く使用されている。新生児に対するアミノ酸投与の影響は検討されているが、各単一アミノ酸の役割は十分には検討されていない。本研究で、我々は早産ラット e20 動脈管においてグルタミン酸が収縮を起こす役割を実証した。DA の収縮性およびリモデリングに関する過去の研究に基づくと、e19~e20 ラットの動脈管はヒト超早産児および極早産児と同様の未成熟性を有すると思われる。アミノグラムデータにより、PDA を有するヒト超早産児では PDA を有さないヒト超早産児よりも 2 日目の血漿中グルタミン酸濃度が低いことが明らかになったが、これは *in vivo* ラット実験の結果を部分的に裏付ける。

グルタミン酸は脳における興奮性神経伝達物質として認識される。加えて、グルタミン酸は抗酸化剤であるグルタチオンの主要な基質であり、 α -ケトグルタル酸を通じてクエン酸回路に入る重要な糖新生基質である。グルタミン酸の複数の役割が広範に研究されているが、ほとんどの研究は神経科学の分野である。我々の知る限りでは、本研究はグルタミン酸が *in vivo* で血管収縮を誘発することを示した初めての研究である。

グルタミン酸がシナプス前グルタミン酸受容体からのノルアドレナリンの放出を刺激することと、グルタミン酸誘発性ノルアドレナリン放出が N 型および P 型カルシウムチャネルを通じたカルシウム流入と関係することが実証されている。これらの研究で、著者らは海馬シナプトソームからの [3H]-ノルアドレナリンの放出を測定し、グルタミン酸が用量依存的にノルアドレナリン放出を誘発し ($EC_{50} = 5.6 \mu\text{mol/L}$)、 $100 \sim 1,000 \mu\text{mol/L}$ のグルタミン酸によりほぼ最大のノルアド

レナリン誘発が生じることを認めた。本研究では、2,000~3,000 $\mu\text{mol/L}$ の血漿中グルタミン酸濃度の増加によりノルアドレナリン量が増加し、ラット e21 DA における収縮が誘発された。我々の過去の研究に基づくと、この反応の程度はラット e21 DA におけるインドメタシン誘発性最大収縮の反応と同程度である。グルタミン酸を胎児ラットに投与した時の自律神経終末での正確なグルタミン酸濃度はわからない。臨床的に重要な *in vivo* における DA 収縮を誘発する血漿中グルタミン酸濃度の範囲を明らかにするためには、さらなる研究が必要である。グルタミン酸に加えて、本研究により PDA を有するヒト超早産児では PDA を有さないヒト超早産児よりも血漿中チロシン濃度が有意に低いことが示された。チロシンは、カテコールアミン神経終末でドーパミンとノルアドレナリンに変換された後に L-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン (L-DOPA) に変換されるので、他のアミノ酸成分、すなわちチロシンはノルアドレナリン放出に影響を及ぼす可能性があり、さらなる研究のためにグルタミン酸と併せて検討すべきである。

内因性陽イオン透過性チャンネルを有するイオンチャンネル型グルタミン酸受容体ファミリーには3つある。すなわち、NMDA、AMPA およびカイニン酸である。本研究では、カルシウム感受性 AMPA 受容体アンタゴニストである NASPM を使用して、グルタミン酸が AMPA 受容体を通じて DA 収縮に寄与することが実証された。AMPA 受容体の中でも、未熟および成熟ラット DA では大動脈と比較して GluR1 が高度に発現し、ヒトおよびラット DA における中膜および外膜の外層において自律神経終末と共同在した。過去の研究は、AMPA 受容体または GluR1 がノルアドレナリン放出に寄与したことを示唆する。これらの結果と以前の報告に基づいて、我々はおそらく GluR1 が DA 収縮を媒介すると推測する。

以前の観察と一致して、我々のデータによりノルアドレナリン媒介性 DA 収縮が実証された。インドメタシンとのインキュベーションによりノルアドレナリンに対する DA の感受性が10倍増加し、プロスタグランジン E によりノルアドレナリンに対する DA の感受性が減衰したことが実証されている。子宮内に胎盤プロスタグランジン E が豊富にある状態でグルタミン酸誘発性 DA 収縮が減衰する可能性があり、グルタミン酸は出生後のインドメタシン誘発性 DA に対する相乗影響を有する可能性がある。

ヒト胎児における組織学的分析で、超未熟 DA (例、在胎 18~21 週目) の筋壁に多くのアドレナリン作動性神経終末があることが示された。ノルアドレナリンが在胎 20 週目でも DA の著明な収縮を誘発し、収縮影響が α -アドレナリン作動性受容体拮抗薬であるフェノキシベンザミンの投与によって減衰したことも実証されている。これらの以前の結

果とともに我々のデータは、ノルアドレナリン媒介性 DA 収縮がヒト超早産児に当てはまる可能性があることを示唆する。

本研究において、アミノ酸補給を受けたヒト極早産児 (在胎 28~29 週) および PDA を有さないヒト超早産児 (在胎 24~27 週) の血漿中濃度は、各々、 $265.9 \pm 196.7 \mu\text{mol/L}$ と $202.3 \pm 144.8 \mu\text{mol/L}$ であった。Wu らは、30 日目のヒト正規産児 ($n = 16$) において授乳の2時間後に採取した血漿サンプル中のグルタミン酸濃度が $133.7 \pm 51.4 \mu\text{mol/L}$ (95%信頼区間: 24~243 $\mu\text{mol/L}$) であったことを報告した。別の報告では、11 日目のヒト母乳保育正規産児 ($n = 28$) における血漿サンプル中のグルタミン酸濃度が $243 \pm 110 \mu\text{mol/L}$ (95%信頼区間: 76~551 $\mu\text{mol/L}$) であったことが実証された。Clark らは、アミノ酸非経口栄養を 0.5 g/kg/日ずつ最大 3.0 g/kg/日まで連日増加させて投与した極低出生体重児 (488~1,454 g) では、グルタミン酸濃度が 110~376 $\mu\text{mol/L}$ であったことを報告した。我々の研究におけるグルタミン酸濃度は上記の過去の研究と類似していたが、PDA を有するヒト早産児 (在胎 24~27 週) は著明に低いグルタミン酸濃度 $85.8 \pm 26.6 \mu\text{mol/L}$ を示した。

経腸栄養を受けた健康なヒト早産児においてグルタミン酸濃度はヒト早産児、極早産児および超早産児で類似していたのに対して、過去の研究は疾患状態におけるアミノグラムの結果の変化を実証した。Oladipo らは、集中治療中の新生児および敗血症、呼吸窮迫、心機能不全/心臓奇形または消化管合併症を含む診断を有する新生児では合併症のない出生歴を有する新生児よりも血漿中グルタミン酸濃度が有意に低かったことを報告した。しかし、ヒトアミノグラム分析において PDA の存在に焦点を合わせた研究はないようである。我々のデータは、PDA を有するヒト超早産児または PDA を有さないヒト超早産児における血漿中グルタミン酸濃度は出生まで同じように維持されるが、PDA を有するヒト超早産児におけるグルタミン酸濃度のみが出生後低下したことを示唆した。PDA を有するヒト超早産児においてアミノ酸摂取量に差がないにもかかわらず出生後期間中にグルタミン酸濃度が低下する機序はわからない。しかし、我々の *in vitro* 実験のデータにより、適切な濃度に維持されるグルタミン酸補給がヒト早産児における DA 収縮を促進する可能性があることが示唆された。過去の報告で数回のアミノ酸非経口補給によりヒト早産児におけるグルタミン酸濃度が著明に増加したことが確認されたので、グルタミン酸媒介性 DA 収縮の戦略は実現可能である。

アミノ酸混合液の組成は市販の溶液間で変動する。注目すべきことに、グルタミン酸濃度は他の成分と比較して著しく差がある。グルタミン酸濃度は、Pleamin-P では 0.8 g/L、

Troph-Amine 10%では 5.0 g/L、Aminosyn-PF 10%では 8.2 g/L、Prinene 10%では 10.0 g/Lであった。本研究では Pleamin-P を使用したが、これは我々の国で早産児に対して使用可能な唯一のアミノ酸液であり、他と比較してグルタミン酸の濃度が低い。体重増加、窒素出納および窒素蓄積の速度について Aminosyn-PF と Troph-Amine の間に有意差は認められなかった。我々の知る限りでは、PDA の発生に対する各アミノ酸液の影響は報告されていない。しばしば PDA を有する超早産児に対するより良いアミノ酸組成を探すためにはさらなる研究が必要である。

外因性グルタミン酸の潜在的毒性については、きわめて高用量のグルタミン酸により急性神経障害が誘発されることを示唆した過去の報告で検討されているが、ヒトにおける新しいエビデンスでは重篤な有害事象がないことが示唆されている。高頻度で PDA を有する超早産児では特に、生後循環適応におけるアミノ酸、すなわちグルタミンの組成の重要性を再検討する必要がある。

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)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Shujiro Fujita, MD; Utako Yokoyama, MD, PhD; Ryo Ishiwata; Rika Aoki, MD; Kenji Nagao, PhD; Daiki Masukawa; Masanari Umemura, MD, PhD; Takayuki Fujita, MD, PhD; Shiho Iwasaki, MD, PhD; Shigeru Nishimaki, MD, PhD; Kazuo Seki, MD, PhD; Shuichi Ito, MD, PhD; Yoshio Goshima, MD, PhD; Toshihide Asou, MD, PhD; Munetaka Masuda, MD, PhD; Yoshihiro Ishikawa, MD, PhD

Glutamate Promotes Contraction of the Rat Ductus Arteriosus

Circulation Journal 査読あり

11 巻、2016 年、2388-2396

DOI: <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-16-0649>

〔学会発表〕(計 件)

〔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

藤田 秀次郎 (FUJITA, Shujiro)
横浜市立大学・医学研究科・共同研究員
研究者番号：90381516

(2) 研究分担者

横山 詩子 (YOKOYAMA, Utako)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号：70404994

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()