

令和元年6月5日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10077

研究課題名(和文) 動脈管筋収縮制御タンパク質のリン酸化解析とメタボロミクス解析

研究課題名(英文) Analyses of Contractile Protein Phosphorylation and Metabolomic Profile of Ductus Arteriosus Exposed to Oxygen

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：成熟胎仔動脈管のヒートショックプロテイン27とトロポミオシン2のリン酸化状態が酸素刺激により変動したことから、これらは酸素感受性収縮機構の一部を形成している可能性がある。メタボロミクス解析は、酸素刺激された動脈管が対照の肺動脈に比べて、酸化ストレスに対する抵抗性をもち、血管収縮状態にあることを示唆した。動脈管はカルニチン・アセチルカルニチンが多く、ミトコンドリアにおける酸化によるアセチルCoA生産、TCAサイクルによるエネルギー産生能が高いと推定された。動脈管におけるエネルギー(ATP)産生能の発達が、生後の血中酸素分圧に上昇に応じる強い平滑筋収縮を可能にしているのではないかと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸素刺激動脈管の筋収縮調節タンパク質トロポミオシン2とHSP27のリン酸化を直接検出できたことは学術的意義の一つである。酸素刺激時の動脈管のメタボローム解析も世界初めての成果である。酸素刺激動脈管にカルニチン・アセチルカルニチンが多く、ミトコンドリアにおけるアセチルCoA生産やTCAサイクルによるエネルギー産生に有利であり、動脈管が収縮状態であることが示された。これらの結果から動脈管におけるエネルギー産生能や筋収縮制御機構の発達が、生後の血中酸素分圧の上昇時の平滑筋収縮を可能にするという結論を導くに至った。動脈管の酸素感受性筋収縮をエネルギー産生面から裏付けられたことは有意義であった。

研究成果の概要(英文)：Oxygen exposure to the mature fetal ductus arteriosus (DA) in vitro modulated phosphorylation of HSP27 and Tropomyosin 2, suggesting these might be involved in the O<sub>2</sub>-induced DA constriction at birth.

Metabolomics was performed in mature fetal DA and pulmonary artery (PA) stimulated by O<sub>2</sub>. Oxidative stress increases ophthalmic acid in conjunction with glutathione consumption. Detection of greater glutathione and lesser ophthalmic acid in the DA indicated DA had more resistibility to oxidative stress. Lactate and adenosine are positive factors for vessel dilation. These were lower in the DA, indicating O<sub>2</sub> induced DA constriction. Higher carnitine and acetylcarnitine in the DA suggested DA mitochondria produced more acetyl-CoA by oxidizing fatty acids. More TCA cycle components in the DA indicated the DA produced more ATP. Taken together, these data suggest that mature DA synthesize ATP efficiently, which make it possible to constrict the DA stimulated by increase of pO<sub>2</sub> at birth.

研究分野：循環器小児科学

キーワード：動脈管 リン酸化 筋収縮制御タンパク質 メタボロミクス カルニチン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 動脈管は胎性期の低酸素状態で開き、生後酸素に反応して収縮する。一方、肺動脈は胎生期低酸素状態で収縮しており、生後血中酸素分圧が上昇すると拡張する。また、臍帯動脈は胎盤や胎児の酸素供給需要に合わせて収縮弛緩する。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。しかし、動脈管と肺動脈の酸素に対する反応の違いや臍帯動脈の収縮弛緩の機序には不明な点が多い。

(2) 血管平滑筋の収縮弛緩は主に  $Ca^{2+}$  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  $Ca^{2+}$  が増加する。また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  $Ca^{2+}$  放出が増加し、細胞内  $Ca^{2+}$  が増加する。成熟した平滑筋では細胞膜から流入する  $Ca^{2+}$  が小胞体に存在するリアノジン受容体を刺激して  $Ca^{2+}$  を放出し、イノシトール 3 リン酸が筋小胞体の  $Ca^{2+}$  放出をうながし細胞内  $Ca^{2+}$  が増加する。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が上昇すると、 $Ca^{2+}$ -カルモジュリン複合体が形成され、ミオシン軽鎖キナーゼを活性化しミオシン調節軽鎖 (LC20) をリン酸化することにより、平滑筋が収縮する。

(3) これまでに胎仔動脈管・肺動脈の筋小胞体の  $Ca^{2+}$  貯蔵・放出に関わる複数の遺伝子の発現量が、血管ごとに胎仔の発達に従って変動することを明らかにした。また、筋タンパク質の収縮の制御を担うリン酸化/脱リン酸化に注目し、家兎胎仔・新生仔の動脈管と主肺動脈におけるミオシン軽鎖のリン酸化の違いを検出した。

(4) 血管平滑筋の収縮制御に関わるリン酸化には、アクチン結合タンパク質であるカルデスモンやカルポニン、低分子量ヒートショックプロテイン (HSP) である HSP20 や HSP27 が関わるのが近年報告されている。カルデスモンはアクチンに結合し、アクチンのミオシンとの結合を妨げ、筋収縮を阻害するが、リン酸化したカルデスモンは収縮を促進する (Huang, et al, Biochemistry, 2003)。酸素による動脈管の収縮は速やかな反応であり、そのシグナルの伝達は、 $Ca^{2+}$  やリン酸化などの翻訳後修飾による。動脈管でこれらのシグナルを受け取るものは、収縮筋を構成・制御するミオシン・アクチン・トロポミオシン・カルデスモン・カルポニンなどである。予備実験から成熟動脈管にはトロポミオシンのアイソフォームの一つが特異的に発現し、カルデスモンも

動脈管に高発現することが判明した (図 1)。動脈管には特異的な平滑筋アイソフォームが存在すると推定される。

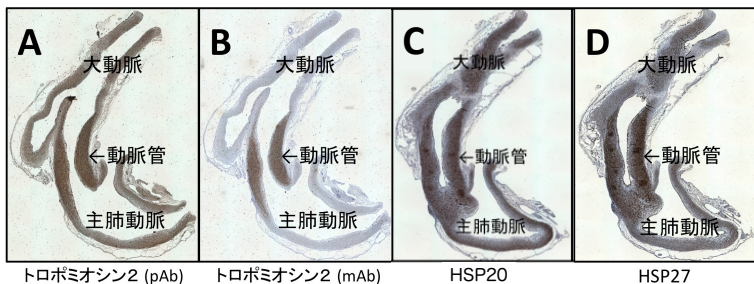


図 1 家兎満期胎仔の動脈管に発現する筋収縮制御タンパク質  
A 筋収縮制御タンパク質の一つであるトロポミオシン 2 をそのポリクローナル抗体で染色。動脈管にやや高い発現。B トロポミオシン 2 のアイソフォーム特異的のモノクローナル抗体で染色。動脈管のみが染色されたことから、動脈管には特異的なアイソフォームが発現する。C HSP20 と D HSP27 は、動脈管に比較的高発現だが血管全体に発現。

(5) HSP は、熱や化学物質などのストレスにより誘導される一群のタンパク質で、分子量 70~110 kDa などの高分子量 HSP と分子量 10~30 kDa の低分子量 HSP に分類される。高分子量 HSP は変性したタンパク質の修復を行うが、低分子量 HSP の機能は未解明な点が多い。低分子量 HSP は、非刺激時には重合体として存在し、ストレスによりリン酸化され二量体に変化する (Lavoie et al, J Biochem Mol Biol, 1993)。HSP20 と HSP27 は、骨格筋や平滑筋に高発現し、アクチンに結合、リン酸化により収縮を調節する (Somara et al, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010)。図 1 に示すように、HSP27 は動脈管に高発現し近隣の血管にも発現することが判明している。酸化ストレスで生じる活性酸素種などの刺激は、p38 MAPK などによるリン酸化を経て HSP27 に伝わる (Stokoe et al, FEBS, 1992, Landry et al, JBC, 1992)。リン酸化 HSP27 は筋収縮を促進する。HSP20 は、環状ヌクレオチド依存キナーゼ (PKA/PKG) によってリン酸化を受け (Beall et al, JBC, 1999)、筋を弛緩する (Jerius et al, J Vasc Surg, 1999)。酸素刺激時の動脈管における HSP20 と HSP27 のリン酸化・脱リン酸化は極めて興味深い。

(6) 外部からの刺激により組織や細胞の代謝が動くと、代謝産物の種類や濃度が変動する。メタボローム解析では、質量分析法を用いてこの変化を測定し解析することにより、作用機序の解明に利用することができる。Archer SL らは、動脈管の酸素感受性について、「血液中の酸素濃度の変化により、動脈管平滑筋細胞でミトコンドリアの分裂が生じ、電子伝達系複合体 1 の活性が増加し、 $NAD^+/NADH$ ,  $NADP^+/NADPH$  の酸化還元状態 (濃度平衡) が変わり、活性酸素種を生み出す。これによりイオンチャネルやトランスポーターや細胞内カルシウム濃度が変化し、結果として動脈管の収縮が生じる (Dunham-Snary KJ, Archer SL et al, 2015) とした。」動脈管における酸素刺激を、酸化ストレスマーカー (グルタチオン, オフタルミン酸) の変動として検出できるのか、血管拡張性因子であるアドレナリン、ヒスタミン、乳酸、アデノシンは低下するのか、血管収縮性因子であるカテコールアミン、セロトニンなどは増加するのか、これらに疑問に対す

る証拠と作用機序の解明における手がかりをメタボローム解析から得たい。

## 2. 研究の目的

動脈管は酸素で収縮する。動脈管における酸素シグナル伝達機構を明らかにすることが本研究の最終目的である。血管平滑筋の収縮はアクチン/ミオシンの結合により生じ、アクチン結合タンパク質であるカルデスモンやカルポニン、低分子量 HSP である HSP20 や HSP27 は、刺激によりリン酸化によりアクチンとミオシン結合を制御して、平滑筋を収縮・弛緩させる。動脈管では酸素を感受してこれらタンパク質群のリン酸化が変化し、酸素感受性収縮機構を形成している可能性がある。又、酸素による刺激は動脈管の全代謝に影響を与え、生後の収縮、動脈管中膜のアポトーシスや動脈管索へのリモデリングを導いている可能性がある。本研究では動脈管筋収縮制御タンパク質群のリン酸化と全代謝変化を酸素感受性収縮の視点から研究する。

## 3. 研究の方法

(1) ラット胎仔及び新生仔の動脈管と肺動脈における、筋収縮制御タンパク質及び HSP20/27 のリン酸化の検討

① 血管試料の採取 妊娠 21 日 (成熟)、19 日 (未熟) 胎仔、生後 1 日目の新生仔ラットから動脈管などを冷生理的食塩液中で顕微鏡下速やかに採取し、血液などを除去し、窒素 (95% N<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>) 又は酸素 (95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>) 飽和 Krebs-Henseleit 緩衝液 (in mM: NaCl 118; KCl 5; CaCl<sub>2</sub> 1.5; MgCl<sub>2</sub> 1; glucose 6; NaHCO<sub>3</sub> 24; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.436; pH 7.4) 中 37°C 30 分間培養した。

(Nakanishi T. et al. Circulation Research, 1993) 処理した血管試料は、液体窒素で急速凍結し-80°Cで保存した。

② タンパク質試料の調製 凍結保存した血管試料から、全 RNA 抽出後、冷アセトン沈殿によりタンパク質を回収した。これらの組織試料から、7M 尿素、4% CHAPS を含む HEPES 緩衝液、pH8.6 (+脱リン酸化阻害剤ならびにプロテアーゼ阻害剤) によりタンパク質を可溶化した。ブラッドフォードウルトラ (Expedeon) を用い、ウシ血清アルブミンを標準としてタンパク質濃度を測定し、SDS-PAGE やフォスタグ電気泳動用試料とした。

③ フォスタグ電気泳動によるリン酸化タンパク質の分離 フォスタグ電気泳動では、リン酸化のレベルに応じてリン酸化/非リン酸化フォームを分離することができる。HSP20, HSP27, トロポミオシン 2 のリン酸化の検出のためのフォスタグ電気泳動ゲルは、それぞれ 12, 10, 10% アクリルアミド (アクリルアミド:ビスアクリルアミド = 29:1) に、50 μmol/L フォスタグ、100 μmol/L MnCl<sub>2</sub> を混和して泳動当日に調製した。泳動後のゲルを、10 mmol/L EDTA を含むブロッキング緩衝液で 10 分間インキュベートして Mn<sup>2+</sup> イオンを除き、ブロッキングを 1 時間行った。3% スキムミルクを含む TBST 緩衝液でブロットをブロッキングし、抗 HSP20, HSP27 又はトロポミオシン 2 マウス抗血清と反応させた。二次抗体として抗マウス IgG-HRP を用い、ケミルミネッセンス反応により検出した。

④ 抗体の調製 フォスタグ親和性電気泳動後のウェスタンブロットの検出などの目的で抗体を調製した。組織試料から全 RNA を抽出、オリゴ dT プライマーを用いた逆転写反応により cDNA を調製し、ターゲット遺伝子 (HSP20, HSP27, トロポミオシン 2) のタンパク質コード領域をクローニングした。10x ヒスチジンタグを N 末端につけた融合タンパク質となるように大腸菌発現 pET19b ベクターに挿入し、抗原タンパク質を発現・精製した。これをマウスに免疫しポリクローナル抗体 (抗血清) を調製した。抗原タンパク質に対する反応を ELISA により検討し、高抗体価を確かめ、全採血し抗血清を得た。

⑤ 組織試料の免疫染色 血管組織は、4%パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝液 (Wako) で固定した。これをパラフィン包埋し、薄切切片 (4 μm) を作製した。脱パラフィン後、98°C 45 分間賦活化 (イムノセイバー) し、内在性のペルオキシダーゼ活性を阻害するために 0.3%過酸化水素液処理を 30 分間行った。馬血清を含むリン酸緩衝生理的食塩水 (PBS) を用いてブロッキング後、抗 HSP20, HSP27, トロポミオシン 2 抗体を一次抗体として、VECTASTAIN Elite ABC Mouse IgG Kit を用いてペルオキシダーゼ (DAB) 染色を行った。その後、ヘマトキシリンカウンター染色し、脱水・透徹、封入した。

### (2) 動脈管酸素刺激時のメタボロミクス解析

① 血管組織の調製 麻酔死させた妊娠 21 日目 (満期) の母ラット 6 腹から計 66 匹の成熟胎仔の動脈管及び肺動脈を冷生理的食塩液中で顕微鏡下速やかに採取した動脈管 (計 29.9 mg) 及び主肺動脈 (計 28 mg)。95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> ガス飽和した Krebs-Henseleit 緩衝液中に採取した血管試料を入れ、37°C 30 分間の酸素刺激を与えた。これらの試料は、液体窒素で急速凍結し-80°Cで保存した。

② メタボロミクス解析 キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) のカチオンモード、アニオンモードにより、水溶性イオン性物質の同定と定量を行った。CE-MS はエネルギー代謝などによって変動する水溶性イオン性物質の分離に有効な手法である。本測定は、ヒュ

ーマン・メタボローム・テクノロジー株式会社に委託した。前処理として、各血管試料に対し 600  $\mu$ L の 50%アセトニトリル水溶液 (v/v) (内部標準物質濃度: 20  $\mu$ M) を加え、冷却下にて破砕機を用いて破砕 (1,500 rpm, 120 秒, 2 回) し、さらに 600  $\mu$ L の 50%アセトニトリル水溶液 (v/v) を加えた。組織破砕後、遠心分離 (2,300 x g, 4 $^{\circ}$ C, 5 分) を行った。遠心分離後、上層を限外ろ過チューブ (ウルトラフリーMC PLHCC, HMT, 遠心式フィルターユニット, 5 kDa) に 400  $\mu$ L 移し取った。これを遠心 (9,100 x g, 4 $^{\circ}$ C, 120 分) し、限外ろ過処理を行った。ろ液を乾固させ、再び 25  $\mu$ L の Milli-Q 水に溶解して測定に供した。

#### 4. 研究成果

(1) ラット胎仔及び新生仔の動脈管と肺動脈における、筋収縮制御タンパク質及び HSP20/27 のリン酸化の検討

フォスタグ電気泳動法を用いて、酸素又は窒素曝露したラット胎仔動脈管/主肺動脈、胎仔や成獣の下行大動脈 (対照) における、低分子量 HSP20、27、筋収縮制御タンパク質の一つであるトロポミオシン 2 のリン酸化状態を検討した。図 2 に結果を示した。

HSP20 では、胎仔 (E19, E21) 及び新生仔 (NB) の動脈管、主肺動脈、下行大動脈にリン酸化を示すシフトは検出されなかった。成獣の下行大動脈には上方にシフトしたバンド (矢印) のみが検出され、胎仔とは異なりリン酸化が進んでいることを示唆した。満期胎仔動脈管と主肺動脈を酸素 (O2) や窒素 (N2) 処理した場合にもリン酸化シフトは検出されなかった。

HSP27 は、全血管試料に見られる基底状態のバンドに加えて、血管種により特徴的なシフトが観察された。ほぼすべての動脈管試料には、2 つの薄い濃度のシフトバンド ( $\blacktriangleleft$ ) 試料にみられたが、肺動脈と大動脈には観察されなかった。また、酸素や窒素処理した満期胎仔 (E21) 動脈管と主肺動脈にはさらに上方にシフトした複数のバンド ( $\blacktriangleleft$ ) が検出された。大動脈では胎仔、新生仔、成獣共にシフトバンドは観察されなかった。酸素・窒素曝露によりリン酸化状態が変化することや、動脈管におけるリン酸化シフトの存在など、動脈管において HSP27 は役割を持つのかもかもしれない。

トロポミオシン 2 は、胎仔 (E19, E21) 及び新生仔の肺動脈や大動脈では基底状態のバンド ( $\bullet$ ) のみ観察されたが、胎仔 (E19, E21) 動脈管にはわずかながらリン酸化シフト ( $\circ$ ) が観察された。酸素処理後の満期胎仔動脈管には、さらに泳動が遅れた薄い濃度のバンド ( $\triangle$ ) があり、主肺動脈にはこのバンドはみられなかった。一方、窒素処理後の満期胎仔動脈管では上方にシフトしたバンド ( $\triangle$ ) のみであり、肺動脈では二つのシフトバンド ( $\triangle$ ,  $\circ$ ) があり、基底状態のバンド ( $\bullet$ ) はみられなかった。胎仔と新生仔の大動脈には、基底状態のバンド ( $\bullet$ ) のみだったが、成獣ではリン酸化された事を示すバンド ( $\triangle$ ) のみであった。このように胎仔動脈管や肺動脈のトロポミオシン 2 は、酸素や窒素処理により基底状態に比べてリン酸化状態が亢進することが判明した。満期胎仔動脈管と肺動脈のリン酸化のパターンは、酸素・窒素曝露の前後で共に異なっており、これらのリン酸化の亢進は酸素感受性や血管の収縮制御に関連があると考えられた。

本研究において胎仔動脈管の HSP20, HSP27, トロポミオシン 2 タンパク質のリン酸化と酸素感受性について検討したが、HSP27 とトロポミオシン 2 のリン酸化は酸素刺激により変動することが明らかとなった。動脈管では酸素を感受してこれらタンパク質群のリン酸化が変化し、酸素感受性収縮機構の一部を形成している可能性があると考えられた。

(2) 動脈管酸素刺激時のメタボロミクス解析

① メタボロミクス解析 高濃度酸素ガス曝露したラット満期胎仔血管 2 試料 (動脈管, 主肺動脈) の CE-TOFMS による測定の結果、161 (カチオン 77, アニオン 84) のピークが検出された。肺動脈に対して動脈管において、目的ピークの面積値を内部標準物質の面積値 (x 試料量) で除した相対面積値の比が 2 以上を示したものは、カルニチン, グルタミン, イセチオン酸, トルイル酸, パントテン酸であった。1.5 以上 2 未満を示したものは、ヒポタウリン, アセチルアスパラギン酸, 還元型 NADPH, アセチルカルニチン, スペルミジンであった。(図 3 にカルニチンに関係する代謝産物のメタボロミクス解析結果を示した。)

カルニチンは、脂質を燃焼してエネルギーを産生する際に、脂肪酸をミトコンドリア内部に運搬

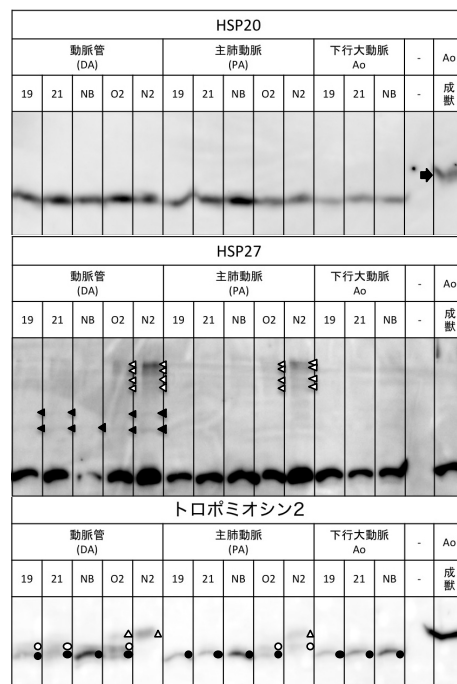


図 2 フォスタグ電気泳動法によるラット胎仔及び新生児の動脈管・肺動脈・大動脈における HSP20, HSP27, トロポミオシン 2 のリン酸化状態の解析

する。脂肪酸は  $\beta$  酸化を受け酢酸にまで分解され、その際生成したアセチル CoA がクエン酸回路を通じてエネルギーに転換される。アセチル CoA などのアシル CoA はカルニチンと結合しアシルカルニチンへと転換される。アシルカルニチンはミトコンドリア内部に運搬され、アシル CoA へと転換される。フリー体のカルニチンは細胞質に戻る。また、パントテン酸は CoA 合成に用いられる。本研究の結果から、高酸素処理時の満期胎仔の動脈管は、同処理の肺動脈に比べて、アセチル CoA を中心としたエネルギー産生能が高いことが推定される。TCA サイクルに属する代謝物も全般に肺動脈に比べて動脈管で高く、酸素処理動脈管では全般にエネルギー合成が盛んであると推定された。

② 動脈管メタボロミクスの結果から、高濃度酸素曝露条件の動脈管には主肺動脈に比べてカルニチン、パントテン酸が豊富に存在することが判明した。これらはいずれも補酵素 CoA の産生に寄与する。例えば、カルニチンによる脂肪酸のミトコンドリアへの輸送反応には、一連の酵素反応が必須である。I アシル CoA は、ミトコンドリア外膜に存在する酵素カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ (CPT-1) の作用により、カルニチンと結合し、アシルカルニチンに転換される。II このアシルカルニチンはミトコンドリア外膜に存在する酵素カルニチン-アシルカルニチントランスロカーゼ (CACT) によりミトコンドリア内部に輸送される。III ミトコンドリア内膜に存在する酵素カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ II (CPT-II) により、アシルカルニチンはアシル CoA に転換され、フリーのカルニチンは細胞質に戻る。カルニチン、パントテン酸並びにアセチル CoA 関連酵素の mRNA 発現量を、ラット満期胎仔動脈管 (無処理、酸素又は窒素曝露) について比較した。この比較には、当該研究の研究分担者である羽山の 2012-2014 基盤研究 C において実施したラット動脈管トランスクリプトームのデータを用いた。発現量の指標である FPKM 値 (Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped, ある転写物上に mapping された fragments 数をその転写物の長さの合計と全ゲノムに mapping された全 fragments 数で正規化したもの) により算出した。

結果を表 1 に示した。カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ I (Cpt1a 肝臓タイプ, Cpt1b 骨格筋タイプ, Cpt1c 脳タイプ) の中では、Cpt1b が酸素曝露の動脈管でコントロールに比べて約 6 倍増加した。カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ II, カルニチン/アシルカルニチントランスロカーゼ, カルニチンアセチルトランスフェラーゼ, アセチル CoA トランスフェラーゼ, パントテン酸キナーゼなど 10 種以上を検討したが、酸素曝露により明らかな増加を示したものは、Cpt1b のみであった。この結果は、生後の動脈管における筋収縮とリモデリングにおける、ミトコンドリアへの長鎖脂肪酸輸送の増加には、骨格筋タイプ Cpt1b の転写レベルの上昇が関与する可能性を示した。

③ 酸化ストレスマーカー (グルタチオン, オフタルミン酸) のメタボロミクス解析 酸化ストレスのもとでは、グルタチオンは消費され、オフタルミン酸の合成は増える<sup>1)</sup>。メタボロミクス解析の結果 (図 4)、酸素処理した成熟動脈管では肺動脈に比べてグルタチオンは多く、オフタルミン酸はやや少なかった。本結果から成熟動脈管は肺動脈に比べて酸化ストレスに抵抗性が

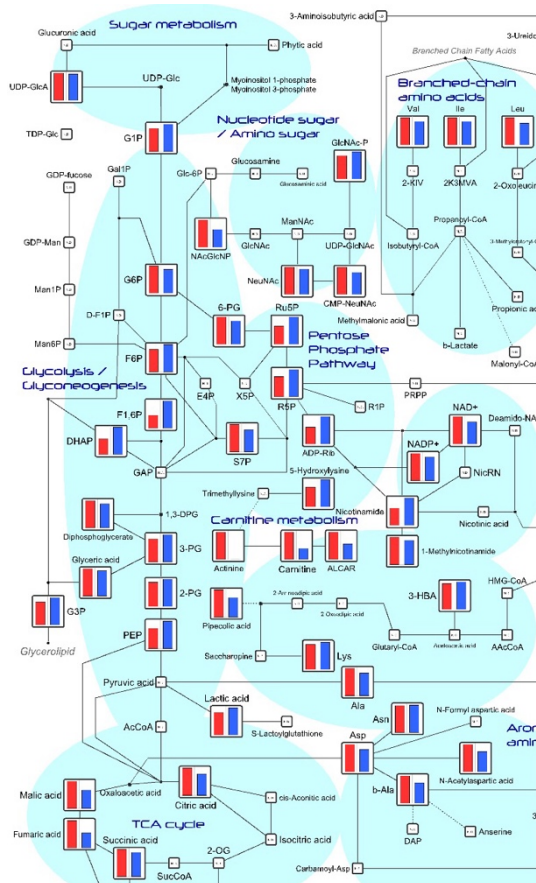


図 3 高酸素処理満期ラット胎仔動脈管と肺動脈のメタボロミクス カルニチン関連抜粋 酸素処理動脈管 (赤)、酸素処理肺動脈 (青)

遺伝子名	酸素処理動脈管/ コントロール動脈管	窒素処理動脈管/ コントロール動脈管	酸素処理動脈管/ 窒素処理動脈管
Aacs	1.55	1.09	1.42
Acaa2	1.05	1.15	0.91
Acaca	0.99	0.91	1.09
Acacb	0.88	0.94	0.94
Acat1	0.90	0.90	1.00
Cdv3	1.34	0.99	1.35
Cpt1a	0.68	0.74	0.92
Cpt1b	5.80	2.13	2.72
Cpt1c	0.91	1.00	0.91
Cpt2	0.39	0.59	0.67
Crat	1.03	1.10	0.93
Crot	1.06	1.14	0.93
Pank1	1.26	1.27	0.99
Pank2	0.88	1.06	0.83
Pank3	0.92	0.77	1.20
Pank4	0.83	1.00	0.84
Pparg	0.72	0.82	0.88
Ppcs	0.48	0.70	0.69
Slc25a20	1.05	1.04	1.01
Slc33a1	1.19	0.95	1.25

表 1 高酸素高窒素処理満期胎仔動脈管におけるカルニチン代謝関連酵素の発現

高いのではないかと考えられる。

④ 血管拡張性因子（乳酸、アデノシン）のメタボロミクス解析 血管拡張性因子とされるアドレナリン、ヒスタミン、乳酸、アデノシンのうち、アドレナリンとヒスタミンの結果は得られなかったが、乳酸とアデノシンの結果を得た（図5）。酸素処理後、肺動脈に比べて動脈管では乳酸はわずかに減少し、アデノシンはおよそ1/4に減少した。生後の血中酸素分圧の上昇を模倣する高酸素刺激を与えた動脈管における血管拡張因子2種の低下は、この条件下で動脈管が収縮状態にあることを示唆する。

血管収縮性因子であるセロトニン、アラキドン酸カスケードに属するアラキドン酸やプロスタグランジンE2（弛緩作用）、トロンボキサン2（収縮作用）の検出はできなかったが、本研究の成果より、酸素刺激は動脈管の代謝物量に影響を与えることが明らかとなった。動脈管の種々の代謝物量の傾向は、肺動脈に比べて酸化ストレスに対して抵抗性があり、血管収縮状態にあることを示唆した。また、動脈管にはカルニチン・アセチルカルニチンが多く、ミトコンドリアにおけるβ酸化によるアセチルCoA生産、TCAサイクルによるエネルギー産生能が高いと推定された。動脈管におけるエネルギー産生能の発達が、生後の血中酸素分圧に上昇に応じる強い平滑筋収縮を可能にしているのではないかと考えられる。

#### 参考文献

1) Soga T. et al. Differential Metabolomics Reveals Ophthalmic Acid as an Oxidative Stress Biomarker Indicating Hepatic Glutathione Consumption. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 281, NO. 24, pp. 16768-16776, 2006

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）  
〔学会発表〕（計 0 件）

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：中西 敏雄

ローマ字氏名：Toshio NAKANISHI

所属研究機関名：公益財団法人日本心臓血管研究振興会（臨床研究施設・研究部門）

部局名：国際分子細胞免疫研究センター

職名：施設長

研究者番号（8桁）：90120013

研究分担者氏名：羽山 恵美子

ローマ字氏名：Emiko HAYAMA

所属研究機関名：東京女子医科大学

部局名：医学部

職名：非常勤講師

研究者番号（8桁）：00349698

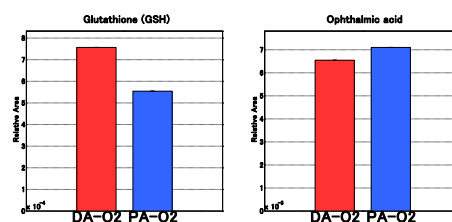


図4 高酸素処理満期胎仔動脈管における酸化ストレスマーカー（グルタチオン、オphthalmic acid）のメタボロミクス解析 酸素処理動脈管（赤）、酸素処理肺動脈（青）

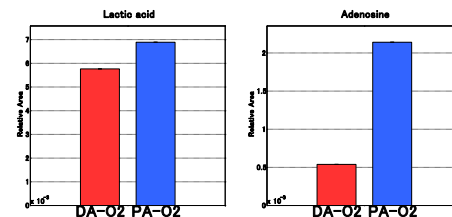


図5 高酸素処理満期胎仔動脈管における血管拡張性因子（乳酸、アデノシン）のメタボロミクス解析 酸素処理動脈管（赤）、酸素処理肺動脈（青）