様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　６ 月 １４ 日現在

機関番号：１４２０２
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2020
課題番号：１９Ｋ１８６６９

研究課題名（和文）子宮平滑筋細胞における細胞容積調節塩素チャネルの妊娠による影響に関する研究

研究課題名（英文）Study of volume-regulated anion channels in myometrial smooth muscle cells during pregnancy

研究代表者
山田　一貴（Yamada, Kazutaka）

滋賀医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：３０７７０２３４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　1,100,000円

研究成果の概要（和文）：妊娠子宮において、細胞容積調節陰イオンチャネルを構成する Leucine-rich repeat containing 8A タンパクは細胞膜を含む子宮平滑筋細胞全体にびまん性に存在し、その発現密度や局在、の細胞内発現と局在、同チャネルを介する Swelling-induced Chloride Current の電流密度に妊娠の有無による有意な変化は観察されなかった。この研究より、妊娠中も同チャネルの機能は維持され、妊娠子宮における変化に対する子宮平滑筋細胞の保護など、同チェネルが妊娠の維持に一定の役割を果たす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
妊娠中の子宮平滑筋細胞および子宮平滑筋組織における細胞容積調節陰イオンチャネルの細胞内分布、密度、および機能の維持に関連する最初の研究である。妊娠マウスの子宮における細胞容積調節陰イオンチャネルの機能を解明することにより、周産期医療の最大の課題である早産や妊娠を維持する機能について、その要因や機序を解明することを目的とした妊娠動物実験の基礎となる。つまり、今後の周産期医療の発展を目的とした研究の重要な基礎となる。

研究成果の概要（英文）：Leucine-rich repeat containing 8A (LRRC8A), an essential membrane protein that constitutes part of the Volume-regulated anion channel (VRAC), was determined to be diffused throughout myometrial smooth muscle cells including in the cell membrane. No significant changes between non-pregnancy and pregnancy groups were observed in either the expression density and localization of LRRC8A protein or the current density of Swelling-induced chloride currents mediated by VRAC. This study suggests that the VRAC may play a role in maintaining pregnancy by protecting myometrial smooth muscle cells against pregnancy-induced changes.

研究分野：周産期医療

キーワード：LRRC8A　myometrium　pregnancy　VRAC　chloride current

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

早産は児の生命予後だけでなく、脳性麻痺等の重症合併症と関連する。現在、切迫早産に対する治療薬として、不適な子宮収縮を抑制する目的で、生理的物質であるオキシトシンやプロゲステロン、プロスタグランジン等を制御する薬剤、また Ca^{2+} を介する機序での子宮収縮を抑制する薬剤が存在する。しかし、周産期医療の進歩にもかかわらず、先進国でさえ全分娩の 5～10%が早産となっている。

早産であれ正期産であれ、分娩に際する子宮収縮、つまり陣痛の発来機序については未解明である。陣痛発来が解明されれば、早産における不適な子宮収縮の機序の解明につながり、早産の発症予測および予防方法の確立に至り、周産期予後が改善されることが期待できる。

子宮は、妊娠の一定期間、静的状態を維持する一方で、分娩時には陣痛として律動性に収縮を繰り返す。これまで、子宮の収縮活動について数多く研究されてきており、電気生理学的機序については、筋収縮に必要な Ca^{2+} を介する機序での研究は上記のごとく臨床応用に至るまでとなっている。しかし、その他のイオンを介する機序については未解明の部分が多い。また、妊娠子宮は妊娠期間とともに細胞単位で増大することで、子宮全体の容積が増大することがわかっている。

本研究では、子宮平滑筋における Volume-Regulated Anion Channel (以下、VRAC)、特に Volume-Sensitive Outwardly Rectifying (以下、VSOR) Cl^- channel に着目した。VSOR Cl^- current、つまり Swelling-induced Cl^- current は、細胞容積の増大に伴い発生し、細胞内浸透圧を低下させ、膨張した細胞を収縮させる役割を担っており、ほとんどの脊椎動物に存在するとされている。しかし、子宮平滑筋、特に妊娠子宮平滑筋において VSOR Cl^- current、つまり Swelling-induced Cl^- current の存在は未だ証明されておらず、VRAC を構成する必須タンパク Leucine-rich repeat containing 8A (以下、LRRC8A) の細胞内局在や細胞内密度なども不明で、妊娠による変化も研究されていない。

２．研究の目的

Swelling-induced Cl^- current の子宮平滑筋細胞での存在を証明し、妊娠子宮と非妊娠子宮とにおける同電流を比較することによって、分娩直前の子宮平滑筋細胞の増大に伴って生じる同電流が陣痛を含む妊娠子宮平滑筋の律動性収縮活動にどのように関与しているかを検討することを目的とする。その解明から、切迫早産に対する治療として、電気生理学的に子宮収縮を抑制する方法の開発につなげることを目的とする。

３．研究の方法

すべての実験で 10-22 週齢の妊娠マウス (Day 7、13、17・18) と非妊娠マウスを用いた。

①　妊娠マウスと非妊娠マウスの子宮平滑筋単離細胞における Swelling-induced Cl^- current を全細胞型パッチクランプ法で記録し、妊娠マウスと非妊娠マウスとで比較した。

全細胞パッチクランプ法において、パッチ電極 (2.5～4.5MΩ、～320 mosmol/kg H_2O) として、同単離細胞を記録チャンバー (37°C) で連続的に灌流した。全細胞膜電流は、次の 3 つのフェーズで構成される電圧ランププロトコルを使用して測定した：400 ミリ秒間で保持電位 -40 mV から +40 mV へ至る脱分極フェーズ、800 ミリ秒間で +40 mV から -120 mV へ至る過分極フェーズ、400 ミリ秒間で -120mV から -40 mV に戻る再分極。過分極フェーズで電流-電圧関係が測定した。細胞膜静電容量 (Cm) は 20 ミリ秒間で -8 0mV の静止電位から電位固定ステップ (±5 mV) によって誘発される容量性過渡現象から計算した。

パッチクランプ法における細胞灌流槽に細胞内浸透圧と等浸透圧 (～315 mosmol/kg H_2O) および低浸透圧 (～230 mosmol/kg H_2O) の Cl^- 溶液を灌流し、マウス子宮平滑筋単離細胞を膨張させ、Swelling-induced Cl^- current を連続的に記録する。低浸透圧 Cl^- 溶液の灌流で細胞が膨張し定常状態となった後に、Swelling-induced Cl^- current を抑制する薬剤 (20 μM glibenclamide および 200 μM 4-(2-butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentyl-indan-1-on-5-yl) oxobutyric acid) を溶解した低浸透圧 Cl^- 溶液を灌流することで電流が抑制されること、逆転電位がネルンストの式から計算される電位とほぼ一致することを Swelling-induced Cl^- current であることの証明とする。同電流において、妊娠子宮と非妊娠子宮をそれぞれ解析し、両者における同電流密度の相違について調査した。

②　妊娠マウスと非妊娠マウスおよび子宮平滑筋組織・細胞をおいて、ウェスタンブロッティング法・蛍光免疫染色化学法で LRRC8A の存在から VRAC を有する細胞であることを証明し、その細胞内局在や発現密度などの妊娠の有無、妊娠の進行に伴う相違について調査した。

ウェスタンブロッティング法において、LRRC8A 抗体 (1:5,000)を用いて、GAPDH (1:10,000) を内部標準として施行した。

蛍光免疫染色化学法において、LRRC8A 抗体 (1:1,000)とともに平滑筋細胞マーカー smooth

muscle actin と 488-、568- 二次抗体 (1:400)、4′,6′-diamino-2-phenylindole (2 μg/mL) を用いた。

４．研究成果

妊娠期の Swelling-induced Cl^- current について
実験条件におけるネルンストの式より計算した平衡電位付近に逆転電位は測定された。
Swelling-induced Cl^- current は 20μM glibenclamide および 200 μM 4-(2-butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentyl-indan-1-on-5-yl) oxobutyric acid で完全に抑制された。
上記より子宮平滑筋細胞において VRAC を介する Swelling-induced Cl^- current が測定されることを証明した。しかし、Swelling-induced Cl^- current の電流密度をそれぞれ +40 mV と -100 mV で評価した結果、妊娠の有無による有意な変化は観察されなかった。

LRRC8A の細胞内局在と発現密度について
LRRC8A タンパクは細胞膜を含む子宮平滑筋細胞全体にびまん性に存在していたが、その発現密度や局在の電流密度に妊娠の有無による有意な変化は観察されなかった。

この研究より、陣痛を含む妊娠子宮平滑筋の律動性収縮活動にどのように関与しているかは明らかにできなかったが、妊娠中も VRAC の機能は維持されていることがわかった。
しかし、妊娠子宮における変化に対する子宮平滑筋細胞の保護など、VRAC が妊娠の維持に一定の役割を果たす可能性が示唆された。妊娠マウスの子宮における細胞容積調節陰イオンチャネルの機能を解明することにより、周産期医療の最大の課題である早産や妊娠を維持する機能について、その要因や機序を解明することを目的とした妊娠動物実験の基礎となる研究成果が得られた。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 山田一貴
２．発表標題 妊娠によるマウス子宮平滑筋細胞におけるSwelling-induced Chloride currentの変化
３．学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術集会
４．発表年 2020年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究協力者	丁　維光 (Ding Wei-Guang)		
研究協力者	尾松　万里子 (Omatsu-Kanbe Omatsu-Kanbe)		
研究協力者	豊田　太 (Toyoda Futoshi)		
研究協力者	辻　俊一郎 (Tsuji Shunichiro)		

6．研究組織（つづき）

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究協力者	桂　大輔 (Katsura Daisuke)		
研究協力者	木村　文則 (Kimura Fuminori)		
研究協力者	松浦　博 (Matsuura Hiroshi)		
研究協力者	村上　節 (Murakami Takashi)		

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関