

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目:若手研究 (B)
 研究期間:2008~2009
 課題番号:20790778
 研究課題名(和文) 内因性 NO 合成阻害物質を介する動脈管収縮の分子機構:遺伝子改変マウスを用いた検討
 研究課題名(英文) Mechanism of Ductus arteriosus through an endogenous inhibitor of NOS

研究代表者

梶本 英美(HIDEMI KAJIMOTO)
 久留米大学・循環器病研究所・助教
 研究者番号:50349700

研究成果の概要(和文):内因性 NO 合成阻害物質である Asymmetric dimethylarginine の代謝酵素である Dimethylarginine dimethylaminohydrolase の発現量は成熟とともに増加した。動脈管収縮前後における網羅的遺伝子解析により、新しい視点から動脈管収縮機序の解明に対する手がかりをつかんだ。

研究成果の概要(英文):Dimethylarginine dimethylaminohydrolase that metabolizes endogenous NOS inhibitor increases after ductus arteriosus closure. Analysis of the comprehensive gene expression profile changes provided new insight into understanding the mechanism of DA closure.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1700000	510000	2210000
2009 年度	1600000	480000	2080000
年度			
年度			
年度			
総計	3300000	990000	4290000

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:新生児医学、動脈管

1. 研究開始当初の背景

(1) 動脈管は胎生期には開存しているが、生直後の肺呼吸の開始と共に直ちに収縮する。動脈管の開鎖遅延(動脈管開存症)は早産児では高頻度に見られ、循環不全を引き起こし生命予後に関わる。未熟児動脈管開存症に対する治療は、現在、シクロオキシゲナーゼ阻

害薬インドメサシンが治療薬として使用されているが、20-30%の患児において有効ではない。一方、動脈管依存性先天性心疾患の患児においては、初期手術までの間、動脈管の開存を保つことにより体・肺血流を補う必要がある。
 (2) 動脈管の開鎖機転として、pO₂の上昇によ

る動脈管平滑筋細胞内の Ca イオンの増加による機序の他、申請者は最近、ミトコンドリア由来の酸化ストレスが惹起する Rho-kinase が大きく関与することを発見した (Kajimoto et al, *Circulation* 2007)。酸化ストレスの関わりを調べる中で、ガスメディエーターのひとつである NO に注目した。NO の動脈管に対する作用は報告されてきたが、動脈管における NO の生合成に関する報告はみられない。

(3) 1992 年に腎不全研究から報告された (Vallance et al, *Lancet* 1992) 内因性 NO 合成阻害物質 ADMA は近年、循環器、内分泌領域でも注目されつつある。ADMA は protein arginine N-methyltransferase (PRMT) により産生され、大部分 dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) により代謝される。最近、DDAH 活性の抑制が ADMA 上昇を引き起こし、血圧への影響が報告された (Leiper et al, *Nature* 2007)。「ADMA は動脈管収縮を制御する」可能性に着目した。

2. 研究の目的

(1) 動脈管収縮における内因性 NO 合成阻害物 Asymmetric dimethylarginine (ADMA) の役割を解明する。

(2) 動脈管開存症の患者に対し、ADMA を利用した新たな治療薬として臨床応用に展開するための基盤を確立する。

3. 研究の方法

(1) 動脈管・大動脈の形態学的解析

妊娠 WKY ラットを preterm (妊娠 19 日目)、term (妊娠 21 日目) に帝王切開をし、胎児を娩出する。第一呼吸の前に急速全身凍結をすることにより、形態を保ったまま標本を作製する。

(2) 動脈管・大動脈の分子生物学的解析

妊娠 21 日目と 19 日目、生後 1 日目に摘出した動脈管と大動脈組織を用いて、DDAH、PRMT、ADMA、NOS 活性などをウエスタンブ

ロット、PCR、蛍光染色法により評価する。

(3) ADMA の内皮細胞に対する作用

ヒト血管内皮細胞培養に ADMA を投与し、eNOS 活性に与える影響を分子生物学的に検討する。

(4) DDAH1 トランスジェニックマウスの心臓・血管の表現型の解析

DDAH は ADMA の代謝を担っている。DDAH1 トランスジェニックマウスでは、下肢の血管損傷が起こっても血管内皮が増殖しにくいと報告されている (Konishi et al, *J Am Coll Cardiol* 49:1099, 2007)。DDAH1 トランスジェニックマウスについて、動脈管収縮過程を組織学的に解析し、野生型マウスと比較評価する。また動脈管・大動脈細胞を用いて、DDAH、PRMT、ADMA、NOS 活性などをウエスタンブロット、PCR により評価する。

(4) Affymetrix GeneChip® Rat Genome 230 2.0 (31,099 probes) を用いて、網羅的遺伝子解析を行う。解析方法は、DAVID Bioinformatics Resources を用いる。1.5 倍変化、あるいは、z-score 2 以上を有意な変化とした。

4. 研究成果

(1) ラット胎児の動脈管切片の作成: 動脈管は胎内では開存しているが、出生後、呼吸の開始とともに収縮が始まる。動脈管の閉鎖機序を調べるためには開存したままの動脈管 (妊娠 19 日目と 21 日目) と閉鎖後 (22 日目)

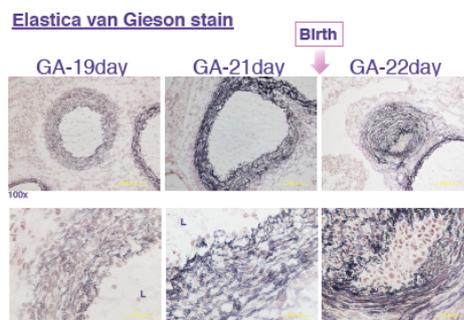


図 1 動脈管収縮の組織像

の動脈管を調べる必要がある。まず、ラットの胎児を帝王切開で娩出後、動脈管そのものを切り出した。しかし、径 200-300 μ m と非常に小さく、パラフィンブロック、凍結ブロックともに困難であり、動脈管の形態を保ちながら切片を作成することは難しかった。その後、胎児を娩出後、直後に全身凍結ブロックを作成し、切片を作成した。動脈管の同定が難しかったが、連続切片を作成することにより、形態を保ったままの動脈管のスライスを作成することが出来た。全身凍結ブロック法では、組織が大ききこともあり、血管壁に結晶が出来てしまう問題があったが、凍結時の温度を調整することにより軽減できた。EVG 染色により、動脈管の閉鎖過程を組織学的に示すことが出来た (図 1)。

(2) 血管内皮機能における ADMA の役割: 血管内皮細胞において Asymmetric dimethylarginine (ADMA)がいかにか NOS を抑制しているか不明な点が多い。ヒト血管内皮細胞培養に ADMA を投与したところ、eNOS の active form である p-eNOS (Ser1177)を低下させた。

(3) 動脈管収縮における DDAH の変化: 動脈管の閉鎖機序の一つとして NOS の関与が言われている。ADMA の代謝酵素である DDAH (dimethylarginine dimethylaminohydrolase)の発現量を蛍光染色で調べた。DDAH は、血管内腔に面して発現していたが、予想に反し、DDAH の発現量は成熟とともに増加した。動脈管の成熟に関

Annotation Cluster	Enrichment Score
Glycolysis	2.44
Cell Death	2.13
Cell Cycle	1.85
Cell Proliferation	1.85
Response to Stimulus	1.81

図 2 Enrichment Score 上位 5 位

与している可能性が示唆された。

(4) ラット胎児の動脈管を、未熟児 (妊娠 19 日目)、満期 (21 日目)、出生後 (22 日目)に取り出し、RNA を抽出し、約 3 万個の遺伝子解析を行った。対象は、大動脈の遺伝子量の変化と比較した。結果を、DAVID Bioinformatics Resources を用いて解析した。糖代謝、細胞周期、細胞死との関連を示すことができ、今後の動脈管研究の道しるべとなる結果を得ることが出来た (図 2)。

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 5 件)

- ① 梶本英美、甲斐久史、今泉勉: 慢性腎不全患者の心血管病変進展における内因性 NO 合成阻害物質(ADMA)の役割. 腎臓, 32(2):103-107, 2009. 査読無
- ② Kai H, Kudo H, Takayama N, Yasuoka S, Kajimoto H, Imaizumi T. Large blood pressure variability and hypertensive cardiac remodeling--role of cardiac inflammation. Circ J, 73(12) Dec: 2198-2203, 2009. 査読有
- ③ Kudo H, Kai H, Kajimoto H, Koga M, Takayama N, Mori T, Ikeda A, Yasuoka S, Anegawa T, Mifune H, Kato S, Hirooka Y, Imaizumi T. Exaggerated blood pressure variability superimposed on hypertension aggravates cardiac remodeling in rats via angiotensin II system-mediated chronic inflammation. Hypertension, 54(4) Oct: 832-838, 2009. 査読有
- ④ Kajimoto H, Nakazawa M, Murasaki K, Hagiwara N, Nakanishi T. Increased P-selectin expression on platelets and decreased plasma thrombomodulin in

patients after the Fontan procedure. *Circ. J.* 73(9) Sep: 1705-1710, 2009. 査読有

- ⑤ Thébaud B, Wu XC, Kajimoto H, Bonnet S, Hashimoto K, Michelakis ED, Archer SL: Developmental absence of the O₂ sensitivity of L-type calcium channels in preterm ductus arteriosus smooth muscle cells impairs O₂ constriction contributing to patent ductus arteriosus. *Pediatr Res*, 63(2) Feb: 176-181, 2008. 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① Kajimoto H, Kai H, Miyamoto T, Imaizumi T: Comprehensive Analysis of the Gene Expression Profile Changes Before and After Ductus Arteriosus Closure in Rats. 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (*Kyoto, Japan, 5-7/3/2010*)
- ② Kajimoto H, Kai H, Yasuoka S, Anegawa T, Imaizumi T: Smad-Msx2 Pathway Plays an Initial Role in Vascular Calcification in CKD Mice. 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (*Kyoto, Japan, 5-7/3/2010*)
- ③ Yasuoka S, Kai H, Kajimoto H, Kudoh H, Takayama N, Anegawa T, Imaizumi T: Eplerenone Prevented the Large Blood Pressure Variability-Induced Aggravation of Perivascular Inflammation and Cardiac Remodeling in Spontaneously Hypertensive Rats. 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (*Kyoto, Japan, 5-7/3/2010*)
- ④ Kajimoto H, Kai H, Yasuoka S, Anegawa T, Imaizumi T. 腎不全における血清

Asymmetric Dimethylarginine の上昇が血管内皮に与える影響(6th

Cardiovascular Translational Research Conference, Fukuoka, 13/2/2010)

- ⑤ Kajimoto H, Kai H, Yasuoka S, Anegawa T, Aoki H, Imaizumi T. Asymmetric Dimethylarginine Triggers Vasculo-Renal Interaction in CKD Mice: *Circulation* 120 (18): S1077 (*American Heart Association's Scientific Sessions, Orlando, USA, 15-17/11/2009*)
- ⑥ Mori H, Kai H, Kajimoto H, Kudo H, Takayama N, Ikeda A, Yasuoka S, Anegawa T, Imaizumi T. Enhanced cardiac inflammation and myocardial fibrosis in ovariectomized, pressure-overloaded rats -A possible mechanism of aggravation of diastolic dysfunction in the post-menopause: *Circulation* 120 (18): S774-775 (*American Heart Association's Scientific Sessions, Orlando, USA, 15-17/11/2009*)
- ⑦ Kajimoto H, Kai H, Yasuoka S, Aoki H, Anegawa T, Imaizumi T: 腎不全マウスにおける血清 Asymmetric Dimethylarginine の上昇が血管内皮に与える影響. The 32nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Society of Hypertension (*Shiga, Japan, 30/10-1/11/2009*)
- ⑧ Kajimoto H, Kai H, Yasuoka S, Aoki H, Anegawa T, Imaizumi T: Asymmetric Dimethylarginine is a paracrine regulator of vascular function in CKD. The 13th Annual Scientific Meeting of the Japanese Heart Failure Society

(Fukuoka, Japan, 10/2009)

- ⑨ Kajimoto H, Kai H, Yasuoka S, Aoki H, Anegawa T, Imaizumi T: 血清 Asymmetric Dimethylarginin の増加が腎不全マウスにおける内皮機能障害を起こす. The 57th Annual Scientific Session of the Japanese College of Cardiology (Sapporo, Japan, 18-20/9/2009)
- ⑩ Kajimoto H, Kai H, Yasuoka S, Ikeda, A, Imaizumi T: Asymmetric Dimethylarginine Induces Endothelial Dysfunction in Renal Failure Mice. 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Osaka, Japan, 20-22/3/2009)
- ⑪ Kajimoto H, Kai H, Yasuoka S, Ikeda, A, Imaizumi T: Role of Asymmetric Dimethylarginine in Endothelial Dysfunction in Renal Failure Mice. 62nd High Blood Pressure Research Conference (Atlanta, USA, 17-20/9/2008)

6. 研究組織

(1)研究代表者

梶本 英美 (HIDEMI KAJIMOTO)
久留米大学・循環器病研究所・助教
研究者番号:50349700

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: