

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591605

研究課題名(和文) Na/Ca 交換輸送が胎児・新生児の動脈管と末梢肺動脈の血管緊張度にはたす役割

研究課題名(英文) Role of Na/Ca exchanger on vascular tone of fetal and neonatal ductus arteriosus and peripheral pulmonary artery

研究代表者

勝部 康弘 (KATSUBE, YASUHIRO)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20246523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：(1) Na/Ca 交換体 Slc8A1、A2、A3 の 3 つの member とともに動脈管、肺動脈で発現していた。発現量の多いのは A1 と A3 で、A2 は少なかった。(2) Slc8A1 は動脈管、肺動脈とも発達に伴いやや減少したが、心室筋での著しい変化は見られなかった。一方 A3 は発達に伴いやや増加した。(3) 免疫染色では動脈管、肺動脈で最もよく染まったのは A3 で続いて A1 であった。A2 は染まらなかった。(4) Slc8A1 を HEK293 細胞への導入させることができた。(5) パッチクランプ法により導入した Slc8A1 から Na/Ca 交換輸送電流を測定することができたが、各種条件下での電流測定はできなかった。

研究成果の概要(英文)：(1) All isoform of Na/Ca exchanger member (Slc8A1, A2, A3) was seen in pulmonary artery and ductus arteriosus. High expression levels were observed in A1 and A3, whereas A2 expression level was low. (2) In developmental changes, Slc8A1 tends to decrease slightly in ductus arteriosus and pulmonary artery, compare with significant change is observed in ventricular muscle. On the other hand, Slc8A3 tends to increase with development. In immunostaining analyses showed strong stain in A3 followed in A1 in ductus arteriosus and pulmonary artery. Slc8A2 showed negative immunostaining. (4) Transfection of Slc8A1 into HEK293 cell was performed. (5) Measurement of the Na/Ca exchanger current of Slc8A1 was performed by patch clamp method. However, measurements of the currents under various conditions such as hypoxia were not completed. Research will be continued.

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：胎児・新生児医学

キーワード：Na/Ca 交換輸送 血管平滑筋 動脈管 胎児 収縮

1. 研究開始当初の背景

(1) Na/Ca 交換輸送とは細胞膜において 1Ca^{2+} と 3Na^{+} の交換輸送する機構を指す。この機構は心筋細胞においては、細胞内へ Ca^{2+} を流入させたり、流出させたりして、その収縮・拡張機構に大きな役割を演じている。特に Ca^{2+} チャネルの未成熟な心筋においてはその役割は大きく、Na/Ca 交換輸送で細胞内への Ca^{2+} 流入に寄与し、小さな Ca 電流を補っている。未熟な心筋細胞では弱い細胞膜 Ca チャネルの機能を細胞内の筋小胞体、細胞膜の Na/Ca 交換輸送がカバーする。家兔の新生仔と成獣における細胞膜 Ca 電流の密度は発達により大きく変化し、成獣は新生仔の約 2 倍である。一方、Na/Ca 交換輸送電流は、逆に新生仔の方が成獣の 3 ~ 4 倍大きい。

(2) 研究代表者もこれまで Ca 電流の発達に伴う変化とその調節機構ならびに、Na/Ca 交換輸送の発達に伴う変化を心筋細胞で研究して報告してきた。また、血管平滑筋 Na/Ca 交換輸送電流の低酸素での変化も報告した。一方、連携研究者らもこれまで多くの動脈管の収縮機序解明の研究を続けてきており、多くの研究成果を報告している。

2. 研究の目的

肺動脈血管平滑筋細胞において低酸素状態が Na/Ca 交換輸送を抑制し、肺動脈の低酸素による収縮機序をきたすとの報告がある。また、言うまでもないことであるが、肺動脈血管平滑筋は酸素により弛緩するが、動脈管血管平滑筋は酸素により収縮する。このように、発達による Na/Ca 交換輸送の変化、酸素による血管緊張(動脈管は収縮、肺動脈は拡張)への Na/Ca 交換輸送の役割など、複雑な機序が絡み合っている。本研究ではその複雑な機序を分子生物学的ならびに電気生理学的手法を駆使して明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

研究課題である「胎児・新生児の肺動脈ならびに動脈管の Na/Ca 交換輸送が血管緊張度に

果たす役割」を調べるために大きく 2 つの異なるアプローチから検討を加える。分子生物学的アプローチと電気生学的アプローチである。

分子生物学的アプローチ

1) Na/Ca 交換輸送 mRNA 発現の発達に伴う変化を調べる。

心筋細胞で証明されている Na/Ca 交換輸送 mRNA 発現の発達に伴う変化を末梢肺動脈ならびに動脈管を用いて発達段階別にその発現量を調べ、発達による変動を調べる。

2) Na/Ca 交換輸送の蛋白を HEK 細胞へ発現させる。

Na/Ca 交換輸送の蛋白をクローニングし HEK 細胞へ発現させる。さらに、発現した Na/Ca 交換輸送蛋白を緑色蛍光蛋白質 (GFP) と同時に HEK 細胞に発現させ、Na/Ca 交換輸送の電気生理学的研究の効率を良くさせる。

電気生理学的アプローチ

1) Na/Ca 交換輸送電流を測定する。

末梢肺動脈血管平滑筋細胞、動脈管血管平滑筋細胞における Na/Ca 交換輸送電流を発達別に測定する。

2) 各種薬剤の Na/Ca 交換輸送電流への効果を調べる。

HEK 細胞に発現させた Na/Ca 交換輸送を用いて、高酸素、低酸素、日常用いる各種薬剤(交感神経刺激薬ならびに遮断薬、インドメタシン、プロスタグランジンなど)による Na/Ca 交換輸送電流への効果について検討する。

以上の分子生物学的アプローチ、電気生理学的アプローチを駆使して、Na/Ca 交換輸送の未熟な血管平滑筋細胞における役割を明らかにする。

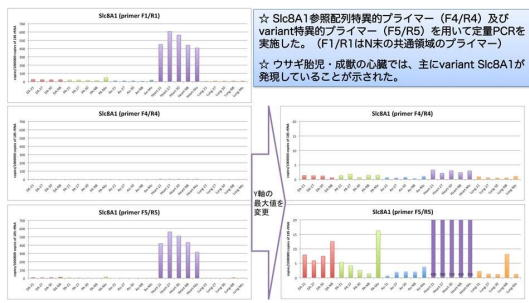
4. 研究成果

< Na/Ca 交換輸送 mRNA 発現の発達に伴う変化を調べる >

(1) Slc8A1 の絶対定量の結果から、胎児・成獣の心臓では主にクローンした variant が発現していることが示された。Slc8A1 は心臓にきわめて

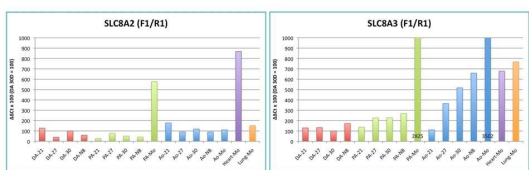
高い発現がみられた。動脈管などの血管や肺においては胎仔動脈管における発現は比較的高かった。免疫蛍光染色では心血管いずれも組織全体が染色された。

Expression of rabbit Slc8A1 mRNA in rabbit fetal tissue - Real-time PCR DATA -



(2)Slc8A2 は相対定量 PCR の結果、成獣の心臓、肺動脈でやや高発現であった。胎仔動脈管、肺動脈、大動脈では大動脈でわずかに発現が高かった。発達に伴う変化はいずれの血管においてもわずかであった。免疫蛍光染色では心外膜は低染色であるが心筋が染色された。(3) Slc8A3 は相対定量 PCR の結果、成獣の大動脈、大動脈、心臓、肺で高発現であった。胎仔動脈管、肺動脈では発達に伴う変化はわずかであったが、大動脈では発達にともなって発現量が増加した。

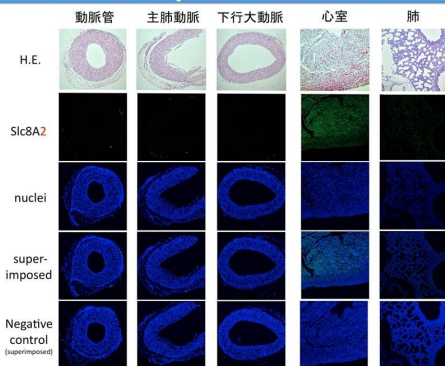
Expression of rabbit Slc8A2, 3 mRNA in rabbit fetal tissue - Real-time PCR DATA (Relative value) -



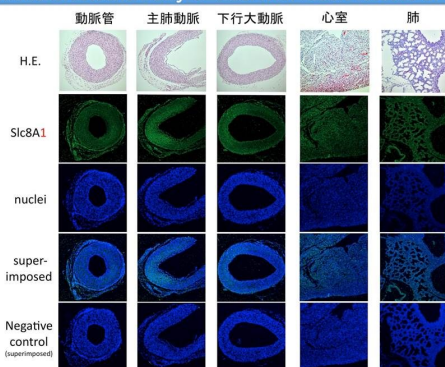
☆ これらのqPCRの結果は、18Sによる補正後、妊娠30日目の胎仔動脈管 (DA) を100とした相対値である。
 ☆ Slc8A2は、家兎成獣の心臓、肺動脈でやや高発現であった。胎仔DA、PA、AoではAoでわずかに発現が高かった。発達に伴う変化は、いずれの血管においてもわずかであった。
 ☆ Slc8A3は、家兎成獣のAo、PA、心臓、肺で高発現である。胎仔DA、PAでは発達に伴う変化はわずかであったが、Aoでは成熟に従い発現量が増加した。

免疫蛍光染色では大動脈の中膜がよく染色された。動脈管の中膜は大動脈に比べると低染色であった。心外膜は低く心筋が強く染色された。肺は気管支の円柱上皮がよく染色され肺泡を形成する細胞もよく染色された。

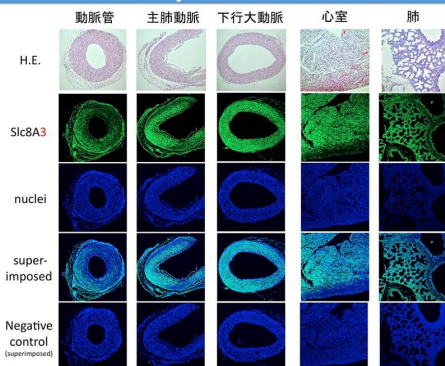
Immunohistochemistry of Slc8A2 in rabbit fetuses of day 26



Immunohistochemistry of Slc8A1 in rabbit fetuses of day 26

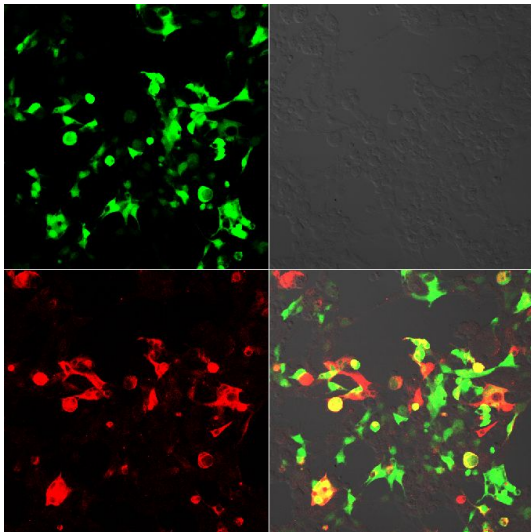


Immunohistochemistry of Slc8A3 in rabbit fetuses of day 26



< Na/Ca 交換輸送の蛋白を HEK 細胞へ発現させる >

家兎胎仔の心臓からクローニングした Na-Ca 交換輸送体のうち発現量の多い Slc8A1 を pB1-CMV2 ベクターに挿入し、HEK293 細胞に導入した。GFP と共発現させパッチクランプ法により電流を測定する際 SLC8A1 が発現している細胞の目印とした。GFP の発現は極めて良好であった。また、抗 SLC8A1 抗体を用いて免疫染色したが、Slc8A1 の発現を確認でき、Na/Ca 交換輸送の蛋白(Slc8A1)を HEK 細胞へ発現させることができた。



< Na/Ca 交換輸送電流の測定 >

図 A, B はそれぞれ Na/Ca 輸送電流の阻害薬である Ni と KB-R7943 の電流への影響を見たものである。HEK293 細胞に発現させた Slc8A1 による Na/Ca 交換輸送電流 (電流の差) を測定することができた。

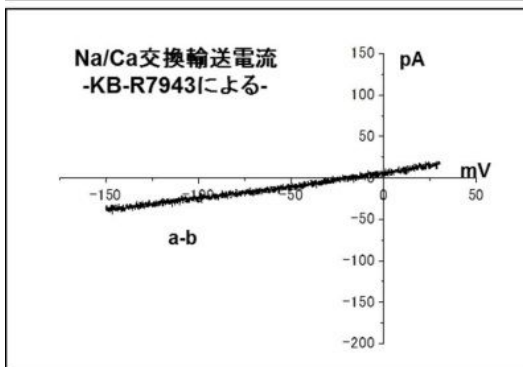
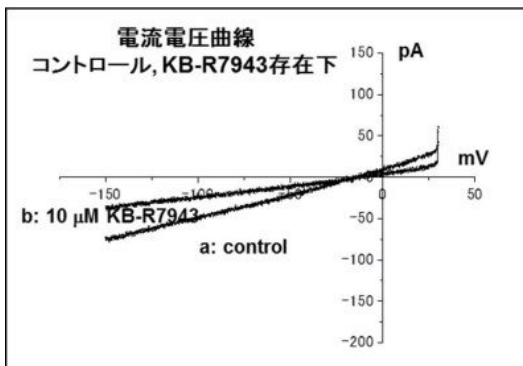


図 A: コントロール(a)の電流へ Na/Ca 交換輸送阻害薬である Ni²⁺(5 mM)を還流すると電流は抑制された。この差電流(a-b)を Na/Ca 交換輸送電流と判断した。

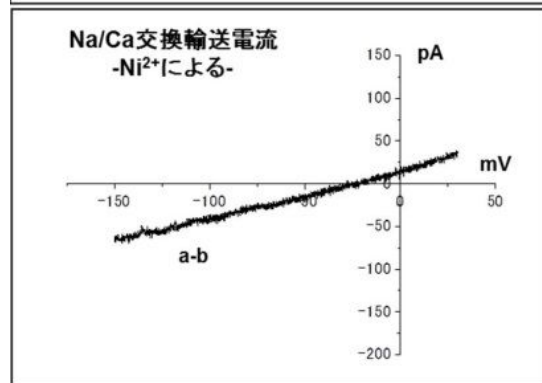
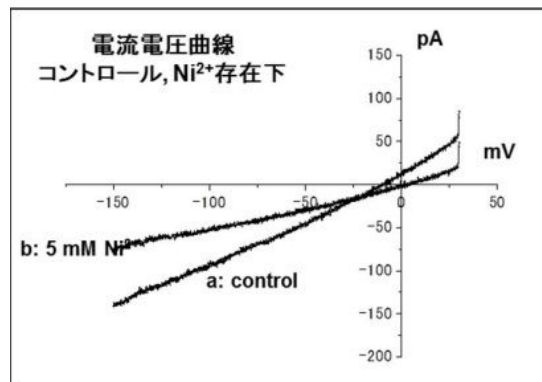


図 B: 同様に、Na/Ca 交換輸送阻害薬 KB-R7943(10 μM)による Na/Ca 交換輸送電流を示した。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1) 勝部康弘、羽山恵美子、中西敏雄、小川俊一: HEK293 細胞に発現させた Na-Ca 交換輸送体電流測定法の確立 第 48 回日本小児循環器学会 2012 年 7 月 5 日 ~ 7 月 7 日 (国立京都国際会館)

2) 羽山恵美子、勝部康弘、中西敏雄、小川俊一: 動脈管・肺動脈の発達に伴う Na⁺/Ca²⁺交換輸送体 mRNA の発現変動 第 48 回日本小児循環器学会 2012 年 7 月 5 日 ~ 7 月 7 日 (国立京都国際会館)

3) 勝部康弘、羽山恵美子、中西敏雄、小川俊一、伊藤保彦: 動脈管、肺動脈における Na⁺/Ca²⁺交換輸送体 mRNA の発現の発達に伴う変化 第 116 回日本小児科学会 2013 年 4 月 19 日 ~ 4 月 21 日 (広島国際会議場)

〔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

勝部康弘(KATSUBE, Yasuhiro)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：

20246523

(2)研究分担者

小川俊一(OGAWA, Shunichi)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号:50194436

深澤隆治(FUKAZAWA, Ryuji)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号:80277566

(3)連携研究者

羽山恵美子(HAYAMA, Emiko)

東京女子医科大学・附属研究所・助教

研究者番号:00349698

中西敏雄(NAKANISHI, Toshio)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号:90120013