

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461648

研究課題名(和文) 動脈管収縮制御におけるATP感受性カリウムチャネルの役割に関する包括的研究

研究課題名(英文) Study of ATP-sensitive potassium channel in constriction of ductus arteriosus

研究代表者

石井 徹子 (Ishii, Tetsuko)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：00360157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：血管のKATPチャネルは、Kir6.1、SUR2から成る。ラット未熟(胎生19日)、成熟(胎生21日)胎仔・新生仔の動脈管・肺動脈・下行大動脈における両遺伝子の発現は、動脈管で最も高かった。未熟胎仔動脈管にはSUR2Bとは異なる、未知のSUR2転写産物が発現する。スルホニル尿素薬中で最も強力に現在も糖尿病治療に用いられるグリベンクラミドは胎盤通過性が乏しく、胎仔へ直接腹腔内注射すると臨床量の100倍量で動脈管が閉じた。新生仔も胎仔と同様グリベンクラミドにより投与量依存で動脈管収縮を生じた。母体にインドメサシン2回投与した新生仔にグリベンクラミドを大量投与しても動脈管収縮は速くならなかった。

研究成果の概要(英文)：ATP-sensitive potassium channels expressed in vascular smooth muscle cells are mainly composed of Kir6.1 and SUR2 subunits. Expression of Kir6.1 and SUR2 transcripts in ductus arteriosus (DA), main pulmonary artery (PA), and descending aorta (dAo) in rat immature and mature fetuses, and newborns were determined using real-time PCR. Both Kir6.1 and SUR2 transcripts are expressed in the DA higher than PA and dAo in the fetuses and newborns. Unidentified SUR2 transcript variants are expressed in the immature fetal DA, specifically. Glibenclamide, an inhibitor of ATP-sensitive potassium channel, directly injected intraperitoneally to fetus rats, constricted DA in near-term and preterm. Effect of glibenclamide in the DA was dose-dependently. With clinical dose (1mg/kg), DA diameter was 70%, and with 100mg/kg, DA closed completely. Glibenclamide closes neonatal DA dose-dependently in hypoxia but not following prenatal chronic exposure to indomethacin.

研究分野：循環器小児科学

キーワード：動脈管 KATP channel

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 動脈管は、生後、血中酸素分圧の上昇などにより収縮する。酸素は直接又は間接に動脈管平滑筋細胞の K チャネルを閉じ、カルシウム (Ca) チャネルが開き、細胞質中の Ca 濃度の上昇により、細胞内 Ca が増加して平滑筋細胞が収縮する。我々は、これまで動脈管収縮拡張における KATPチャネル(Nakanishi T, Circ Res, 1993)、膜電位依存性 K (Kv) チャネル (Hayama E, Pediatric Res, 2006)、BKCa チャネル(Sun, Heart Vessels, 2010)の役割について明らかにしてきた。

(2) KATP チャネルは、大脳神経系・心臓・血管・膵臓などに発現する。KATP チャネルは、膜二回貫通型の内向き整流性 K チャネルであり、4 つの Kir6.1 または Kir6.2 サブユニットと 4 つのスルホニル尿素受容体 (SUR1 または SUR2) が集合して、KATP チャネルを形成する。細胞質内の ATP のレベルに応じて、KATP チャネルは活性化・不活性化される。血管平滑筋には、主に Kir6.1 と SUR2B が発現するが、血管の種類や部位によっては、Kir6.2 や SUR1 が発現することもある(Nichols CG, Circ Res, 2013)。さらに転写バリエーションがヒト Kir6.1 では 2 つ、ヒト SUR2 では 8 つと多く、多様な発現部位特異的な組合せがありうる。動脈管で発現する KATP チャネルの実体は未解明である。

(3) 糖尿病治療薬であるスルホニル尿素系薬剤は、KATP チャネル阻害効果を持つ。50 年前スルホニル尿素系薬剤であるトルブタミドとクロルプロパミドは世界中で用いられたが、妊娠中の糖尿病の治療に用いて原因不明の胎児死亡が多発し(Jackson WPU, Diabetes, 1962)、それ以後妊娠中の使用は禁忌となった。死亡した胎児は剖検でも奇形はなく、動脈管早期閉鎖の概念の無かった当時は原因不明とされた。スルホニル尿素系薬剤が KATP チャネルを阻害して、胎児の動脈管早期閉鎖が起こった可能性がある。

## 2. 研究の目的

酸素は直接または間接的に動脈管平滑筋細胞の ATP 感受性カリウム(KATP)チャネルに働き、動脈管を収縮させる。本研究では、動脈管に存在する KATP チャネルの特徴を分子生物学的、薬理的に調べ、KATP チャネル作用薬が、動脈管の収縮や拡張の治療ターゲットとして臨床応用できるかを明らかにする。分子生物学的研究では、動脈管に特異的に発現する KATP チャネル構成要素のアイソフォームを突きとめ、その発現量を明らかにする。薬理学的研究では、KATP チャネル阻害効果がある経口糖尿病薬のスルホニル尿素系薬剤の動脈管収縮作用を、ラット胎仔・新生仔を用いて検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 分子生物学的研究 (動脈管に発現する KATP チャネルの実体の解明)

### (1)-1 ラット血管試料採取

ラット胎生 21 日 (満期) 77 匹 (5 腹)、19 日 (未熟) 胎仔 131 匹 (10 腹) 及び生後 0.5 日の新生仔 80 匹 (7 腹) から動脈管、主肺動脈、下行大動脈を冷却しつつ採取し、RNA later 液に浸し-20 に保存した。血液などを顕微鏡下除去しプール分析試料とした。

### (1)-2 定量 PCR

RNeasy mini kit (キアゲン)を用いて各血管試料から total RNA を抽出し、ランダム及びオリゴ dT プライマーを用いて逆転写反応し cDNA を調製した (PrimeScript RT Master Mix, Takara)。この cDNA をテンプレートとして、SYBR タイプの定量 PCR 酵素(Universal Select Master mix, ABI)を用いて定量 PCR を行った。

*Kcnj8* (Kir6.1 遺伝子)、*Abcc9* (SUR2 遺伝子)のラット胎仔・新生仔の動脈管・肺動脈・下行大動脈における発現を絶対定量法により求めた。ラット *Kcnj8* の全コード領域、*Abcc9* 及び GAPDH 遺伝子の一部をクローニングし、プラスミドに挿入してスタンダードとし、段階希釈し標準曲線を作製した。内部標準には GAPDH を用いた。結果の表示は、「ターゲット遺伝子の cDNA のモル数 / GAPDH cDNA のモル数 × 10<sup>3</sup>」とした。

また、*Kcnj8* と *Abcc9* の転写バリエーションを探索するために、それぞれの参照塩基配列の各エクソンに対するプライマーをデザインし、各エクソンの発現量を相対定量法 (2<sup>-Ct</sup>) により算出した。

### (2) 薬理学的研究 (KATP チャネル阻害剤・開口剤の動脈管収縮弛緩における寄与)

#### (2)-1 トルブタミドの胎生期動脈管収縮作用の検討

妊娠末期 (胎生 21 日目) のラットに所定量のトルブタミドを経口投与し、所定時間後、帝王切開で胎仔を取出し、速やかに全身急速凍結法で固定して動脈管内径を測定した。

#### (2)-2 グリベンクラミドの胎生期動脈管収縮作用の検討

ラット妊娠満期に麻酔下開腹下、グリベンクラミドを腹腔内注射で投与し、1-8 時間に全身急速凍結法で動脈管内径を計測した。

#### (2)-3 低酸素性拡張動脈管に対するグリベンクラミド収縮作用の検討

満期 (胎生 21 日目) に帝王切開で取り出したラット新生仔は速やかに呼吸を開始し、21%酸素下 34 に保つと、呼吸開始後 30 分で内径は胎生期の 15%に収縮する。この新生仔に生後 1-2 分で DMSO に溶解したグリベンクラミドを腹腔内注射し、30 分間 5%酸素下 34 に保った後、全身急速凍結法で固定して動脈管内径を測定した。

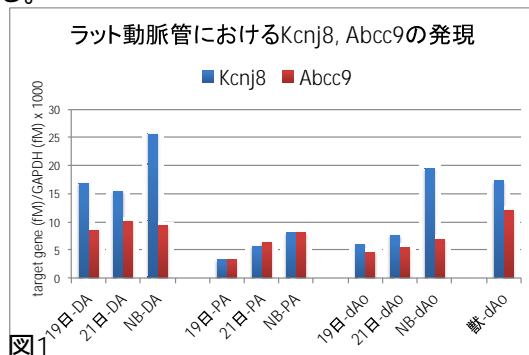
又、インドメサシン (10mg/kg) を妊娠 19 日、20 日に親ラットに投与し、21 日目に帝王切開で取り出したラット新生仔にグリベンクラミドを投与して動脈管収縮をしらべた。

#### 4. 研究成果

##### 分子生物学的研究

(1) ラット胎仔・新生仔の動脈管 (DA)・肺動脈 (PA)・胸部下行大動脈 (dAo) における *Kcnj8*, *Abcc9* 遺伝子の発現

GAPDH の発現量で補正後の *Kcnj8* 及び *Abcc9* 遺伝子の発現量は、19 日目胎仔、21 日目胎仔、生後半日の新生仔の DA, PA, dAo において、DA で最も高かった。(図 1)。 *Kcnj8* 遺伝子の発現量は特に違いが大きく、DA/PA の比は、19 日胎仔で 5.2 倍、21 日胎仔で 2.7 倍、新生仔で 3.1 倍であり、DA/dAo の比は、19 日胎仔で 2.8 倍、21 日胎仔で 2.0 倍、新生仔で 1.3 倍であった。 *Abcc9* 遺伝子の発現量は *Kcnj8* に比べて違いが小さいが、DA/PA の比は、19 日胎仔で 2.6 倍、21 日胎仔で 2.0 倍、新生仔で 1.1 倍であり、DA/dAo の比は、19 日胎仔で 1.8 倍、21 日胎仔で 1.9 倍、新生仔で 1.3 倍であった。興味深いことに、DA においては、 *Kcnj8* の発現量は、 *Abcc9* に対して、19 日胎仔で 2.0 倍、21 日胎仔で 1.5 倍、新生仔で 2.7 倍であり、およそ 1.5-2.7 倍 *Kcnj8* の発現が高い。PA においては、19 日胎仔で 1.0 倍、21 日胎仔で 0.9 倍、新生仔で 1.0 倍と、 *Kcnj8* と *Abcc9* 発現比は、ほぼ 1 であった。dAo では、19 日胎仔で 1.3 倍、21 日胎仔で 1.4 倍、新生仔で 2.8 倍を示し、DA は dAo における割合に近い。KATP チャネルは、Kir6.1 (*Kcnj8*) サブユニット 4 つ、SUR2 (*Abcc9*) サブユニット 4 つから成る 8 量体と考えられている。DA では、 *Kcnj8* 転写物と *Abcc9* 転写物の比は約 2 倍であることを、一部の Kir6.1/SUR2 複合体では SUR2 に不足があるかもしれない。DA の KATP チャネルは SUR 阻害剤である SU 剤による制御を受けにくい可能性がある。DA は、これら近傍の大血管、特に PA に対してユニークな KATP チャネルを発現していることは明らかである。



(1)-2 *Kcnj8*, *Abcc9* 転写バリエーションの探索

DA, PA, dAo は同一個体から採取する。よって、ラット胎生 19 日目胎仔、21 日目胎仔、生後 0.5 日の新生仔から集めた DA, PA, dAo は、それぞれの日齢のプール内では遺伝的背景は同じである。 *Kcnj8*, *Abcc9* 転写バリエーションを探索するために、各エクソンに対応する定量 PCR 用プライマーをデザインし、血管試料に対して、相対定量法により定量 PCR を実

施した。

*Kcnj8* 遺伝子は 3 つのエクソンから成り、5' 末のエクソン 1 と 3' 末のエクソン 3 に違いのある転写バリエーションが、マウスでは 4 種、エクソン 1 に違いのあるものがヒトでは 3 種知られているが、ラットではバリエーションの報告がない。本研究では、DA, PA, dAo におけるバリエーションの違いを探索する目的であるため、GAPDH で補正後の各エクソン相当塩基配列の発現量を、DA を 1 とした相対値として表示した。

胎生 19 日の胎仔では、DA における発現量が 1 の場合、いずれの *Kcnj8* エクソン相当塩基配列においても PA はおよそ 0.2、dAo はおよそ 0.4 を示した (図 2-1)。胎生 21 日 (満期) 胎仔では、DA が 1 の場合、PA はおよそ 0.4、dAo はおよそ 0.6 を示した (図 2-2)。生後 0.5 日の新生仔では、DA が 1 の場合、PA はおよそ 0.3、dAo は 0.6-0.8 を示した (図 2-3)。これらの発現量の比は、絶対定量法で測定した場合の比と同等であった。これらの結果から、若干の変動は見られたが、未熟胎仔・成熟胎仔・新生仔の DA と周囲の大血管 (主肺動脈と下行大動脈) における *Kcnj8* の参照塩基配列を持つ転写産物の発現には際立った違いがないことが判明した。但し、この結果は、参照塩基配列を持たないバリエ

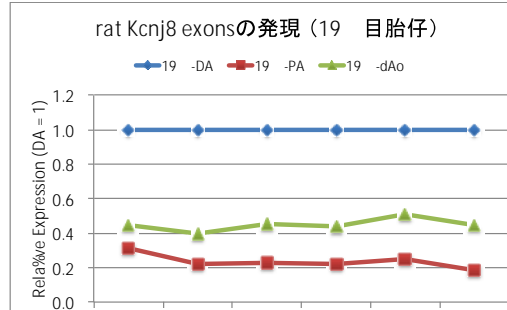


図 2-1

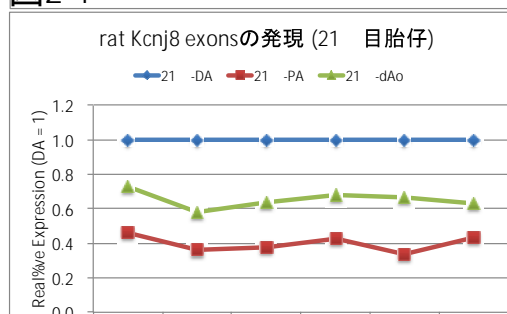


図 2-2

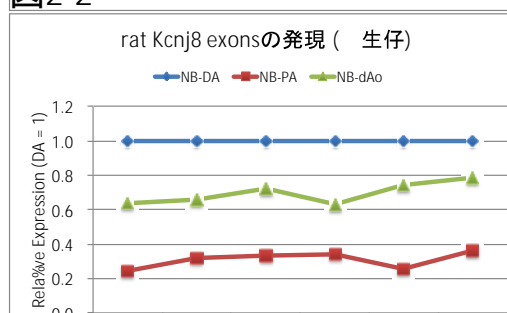


図 2-3

トが全く存在しないことを示すわけではない。

SUR2 遺伝子には、SUR2A と SUR2B の 2 つの 3' 末の異なるスプライシングバリエントが知られている。ヒトでは、SUR2A はエクソン 38A を、SUR2B はエクソン 38B を用いる。さらに 5' 末近くのエクソン 2 に違いのある転写バリエントが加えて 8 種予期されている。マウスでは 5' 末のエクソンに違いのある転写バリエントが 5 種予想されている。しかし、ラットでは SUR2B 転写物 1 種の報告があるのみである。ラット *Abcc9* 遺伝子転写物の参照配列をラットゲノム配列にアラインすると 39 ブロック (39 エクソン) となり、本研究ではこの 39 ブロックに対応する qPCR プライマーをデザインした。但し、エクソンによっては、塩基配列が短すぎるなどの理由で、隣のエクソンにまたがるプライマーをデザインした。

胎生 19 日の胎仔では、DA における発現量が 1 の場合、最も 3' 末の ex38-39 プライマーを除いて、いずれの *Abcc9* エクソン相当塩基配列においても PA と dAo はおよそ 0.5 を示した (図 2-4)。この ex38-39 プライマーによる定量結果では、PA と dAo は DA より 4 倍程度の高値を示した。これは DA の発現量を 1 としたためであり、実際は DA における発現量がこのエクソン部分のみで低下していた。

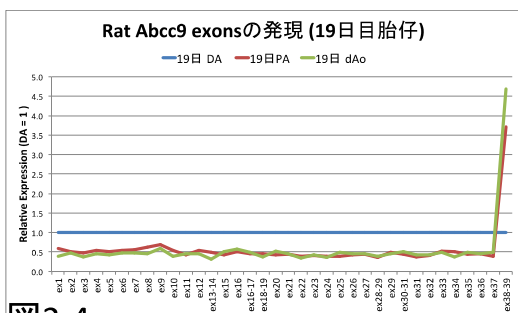


図2-4

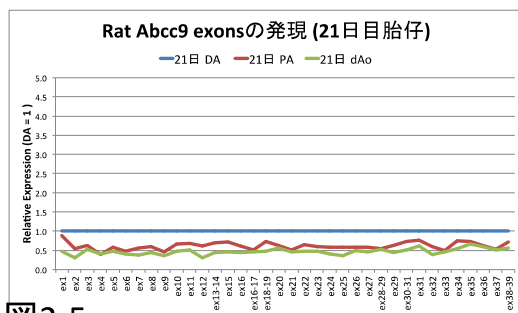


図2-5

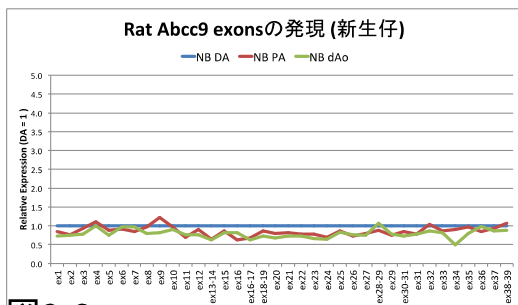


図2-6

胎生 21 日の胎仔及び生後 0.5 日の新生仔では、DA が 1 の場合、PA と dAo は 0.5 又は 0.8 前後を示した (図 2-4, 5)。すなわち、成熟胎仔・新生仔の DA と周囲の大血管 (主肺動脈と下行大動脈) における *Abcc9* の参照塩基配列を持つ転写産物の発現には、転写物量に違いがあるものの質的には際立った違いがないことが判明した。これらの結果から、ラット未熟胎仔 (胎生 19 日) の DA のみ、PA や dAo と異なる転写バリエントを発現していることが予想された。ヒトの場合、3' 末の異なる SUR2A と 2B が報じられている。SUR2A と 2B は C 末のアミノ酸にも違いがあるバリエントである。未熟胎仔の DA では SUR2B とは異なる、未同定の SUR2 転写産物が混在して発現している可能性がある。*Abcc9* 遺伝子産物 SUR2 は KATP チャンネルと複合体を形成し、薬剤感受性や機能を制御することから、未熟児の動脈管の KATP チャンネルは、成熟の場合とは異なる薬剤感受性や機能を示す可能性がある。

### 薬理学的研究

#### (1) トルブタミドの胎生期動脈管収縮作用の検討

第一世代のスルホニル尿素薬であり、妊娠中に用いられて胎児死亡事故を生じたトルブタミドは胎盤通過性があり、妊娠末期のラットに経口投与すると胎仔動脈管が収縮した。収縮は 2-4 時間でもっとも強く、投与量に依存性で、臨床量 (10mg/kg) で動脈管内径は 70% に、100mg/kg で 50% に、1000mg/kg で 10% に減少した。動脈管の強い収縮は胎仔死亡を生じた。

#### (2) グリベンクラミドの胎生期動脈管収縮作用の検討

スルホニル尿素薬中で最も強力である現在も糖尿病治療に用いられているグリベンクラミドは胎盤通過性が乏しく、親ラットに経口投与しても胎仔動脈管はほとんど収縮せず、麻酔下開腹、直接胎仔への腹腔内注射で動脈管収縮を生じた。この場合、収縮は注射後 30 分から 4 時間で強く、投与量依存性で、成人糖尿病治療に用いる 0.1mg/kg では動脈管内径は 90% に縮小、新生児糖尿病小児治療に用いる 1mg/kg では 70% に縮小、10mg/kg では 30% に、100mg/kg では 10% に縮小した。この実験によりグリベンクラミドには糖尿病の臨床で用いるグリベンクラミド臨床量の 100 倍の量で胎生期の動脈管がほぼ閉じることが示された。(図 3, 4)

ラットの妊娠期間は 21.5 日で 14 日迄が胚芽期、15 日以後の 6 日が胎生期である。妊娠 19 日のラット胎仔は体重が満期の 40% であり未熟である。19 日ラット胎仔で満期胎仔と同じようにグリベンクラミド動脈管収縮を調べると、未熟仔でも投与量依存性に動脈管は収縮したが、成熟仔に比べて未熟仔の動脈管収縮はかるく、おなじ収縮を生じるのに

5倍量を要した。

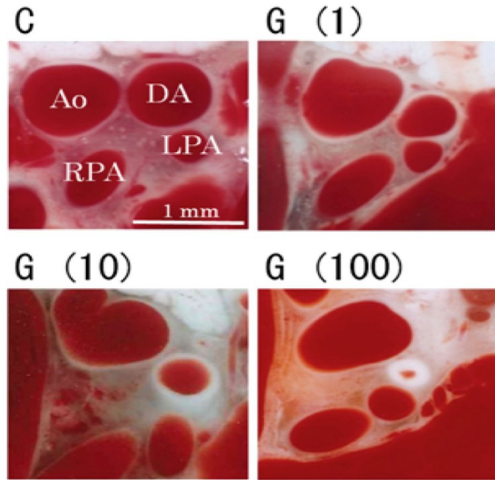


図3 グリベンクラミドをラット胎仔に腹腔内投与後1時間の動脈管 (DA) と大動脈 (Ao) の断面

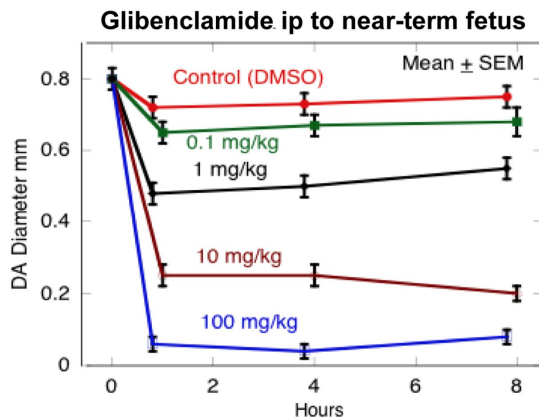


図4 妊娠ラット麻酔下胎仔へグリベンクラミドを腹腔内投与した場合の動脈管の収縮

臨床では未熟児動脈管開存症の治療にインドメサシンが用いられている。実験でもインドメサシンとグリベンクラミドの併用効果をしらべた。インドメサシン 10mg/kg でラット胎仔動脈管は 65%まで収縮し、これにグリベンクラミド 1mg/kg を追加すると動脈管は 95%迄収縮した。

以上の実験によりグリベンクラミド大量の胎生期動脈管収縮作用があきらかになった。その動脈管収縮作用はインドメサシンと相加性であり、未熟仔でやや軽度であった。

### (3) 低酸素性拡張動脈管に対するグリベンクラミド収縮作用の検討

満期 (胎生 21 日目) に帝王切開で取り出したラット新生仔は速やかに呼吸を開始し、21%酸素下 34 に保つと、呼吸開始後 30 分で内径は胎生期の 15%に収縮した。この新生仔を 5%酸素下 34 に保つと、動脈管は拡張したまま 30 分以上生存した。この新生仔に生後 1-2 分で DMSO に溶解したグリベンクラミ

ドを腹腔内注射し、30 分低酸素生存後に全身急速凍結法で固定して動脈管内径を測定した。

このラット新生仔においても胎仔と同じくグリベンクラミドによる動脈管収縮が生じた。動脈管収縮は投与量依存性であり、1mg/kg では収縮は軽度で、100 mg/kg では内径が 10% に縮小した。(図 5)

Glibenclamide ip to newborn rat in 5%O<sub>2</sub> for 30 min

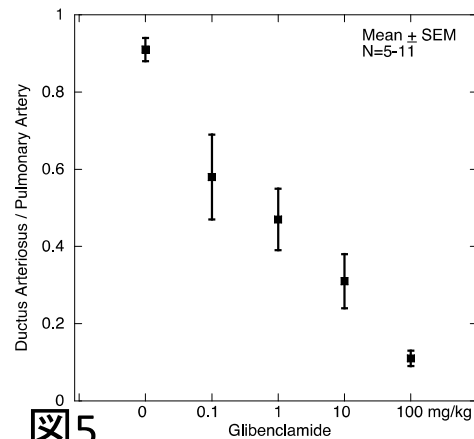


図5

次の実験ではインドメサシン (10mg/kg) を妊娠 19 日、20 日に親ラットに投与し、21 日目に帝王切開で取り出したラット新生仔にグリベンクラミドを投与して動脈管収縮をしらべた。この場合はインドメサシンのラットの胎生期 (7 日の後半 25%) の投与で慢性胎生期シクロオキシゲナーゼ阻害の効果が生じ、動脈管閉鎖は正常の 6-7 倍に延長している。インドメサシン 2 回投与後の新生仔ではグリベンクラミドを大量投与しても動脈管収縮は速くならなかった。(図 6)

Neonatal Rat Ductus Arteriosus Constriction: Chronic Prenatal Indomethacin and Large Dose Glibenclamide

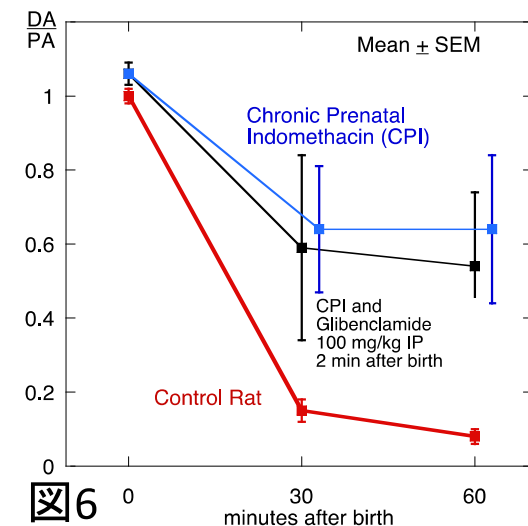


図6

以上の結果からはグリベンクラミドの未熟児動脈管開存症での適応を次のように考察された。臨床量は 1mg/kg なので、この量でもインドメサシン、イブプロフェンなどと

併用すれば効果が大きいであろう。100mg / Kg の大量は動脈管効果が大きい低血糖予防対策が必要になる。未熟児動脈管開存症では動脈管未熟性があり、この未熟性は慢性胎生期シクロオキシゲナーゼ阻害の効果と同じなので、グリベンクラミドの効果は限定的であろう。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

門間和夫. 動脈管薬の実験40年. 日本小児循環器学会雑誌 2016; 32: 261-269.

〔学会発表〕(計7件)

門間和夫, 石井徹子, 中西敏雄, 羽山恵美子, 豊島勝昭. グリベンクラミドによるラット未熟仔動脈管の閉鎖. 第51回日本小児循環器学会総会シンポジウム 2015年7月16日(東京)

豊島勝昭, 門間和夫. グリベンクラミドの動脈管収縮(実験から臨床へ). 第51回日本周産期新生児医学会. 2015.7.10-12.(東京)

Momma K, Toyoshima K, Hayama E, Ishii T, Nakanishi T. Glibenclamide closes premature fetal ductus arteriosus in rats. European Academy of Paediatrics, 2017.9.17-20.Oslo, Norway.

Momma K, Toyoshima K, Hayama E, Nakanishi T. Glibenclomid closes neonatal ductus arteriosus in rats. Fifth European Academy of Pediatrics, Barcelona, 2014.10.17-21.

門間和夫. 動脈管の研究40年. 第50回日本小児循環器学会、学術集会、50周年記念プログラム. 2014.7.4.岡山。

豊島勝昭, 川瀧元良, 門間和夫. 新生児乳児の術前術後の循環管理の進歩 内分泌学的視点から見た新生児循環管理. 第50回日本小児循環器学会総会 2014年7月5日(岡山)

豊島勝昭, 門間和夫, 門間美佳, 石井徹子, 中西敏雄. インドメタシン母体投与による未熟児PDAラットモデルにおけるスルホニル尿素薬の動脈管収縮促進作用. 第8回新生児内分泌研究会 2014年9月13日(京都)

〔図書〕(計1件)

Momma K, Monma M, Toyoshima K, Hayama E, Nakanishi T. Fetal and neonatal ductus arteriosus is regulated with ATP-sensitive potassium channel. In Nakanishi T, Markwald RR, Baldwin HS, Kellet BB, Srivastava D, Yamagishi H (Editors): Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease. Springer, Japan. pp 263-265, 2016.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

石井徹子 (ISHII, Tetsuko)  
東京女子医科大学・医学部・  
循環器小児科・講師  
研究者番号: 00360157

### (2)研究分担者

中西敏雄 (NAKANISHI, Toshio)  
東京女子医科大学・医学部・循環器小児科・特任教授  
研究者番号: 90120013

羽山恵美子 (HAYAMA, Emiko)  
東京女子医科大学・医学部・循環器小児科・非常勤講師  
研究者番号: 00349698

### (3)連携研究者

門間和夫 (MOMMA, Kazuo)  
東京女子医科大学・医学部・循環器小児科・名誉教授  
研究者番号: 80075233