

令和元年6月13日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05358

研究課題名(和文) 解剖学的リモデリングに焦点をあてた動脈管制御法の開発

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of remodeling of the ductus arteriosus

研究代表者

横山 詩子 (Yokoyama, Utako)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：70404994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：動脈管の完全な閉鎖には内膜肥厚が重要な役割を果たす。本研究では、内膜肥厚形成の分子機序を解明することを目的とした。ヒトとラット動脈管を用いて網羅的遺伝子解析を行い、内膜肥厚を誘導する最も有力な候補遺伝子として組織型プラスミノゲン活性化因子(tPA またはPLAT)とファイブリン1(FBLN1)を同定した。PLATは内皮細胞から分泌され、MMP-2を活性化させることで血管の内弾性板を破壊し、動脈管内膜肥厚を促進することを示した。FBLN1はプロスタグランジンE刺激によりNFkBを介して増加し、細胞遊走を促進させることで動脈管内膜肥厚を促進することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎児期に存在する動脈管は出生後には速やかに閉鎖するが、早産児では出生後の動脈管開存症が生命予後を悪化させ、ある種の先天性心疾患では出生後にも動脈管の開存が必要である。つまり、動脈管の閉鎖と開存の制御は小児医療上極めて重要な課題である。動脈管の完全な閉鎖には、胎生中期から始まる解剖学的リモデリングである内膜肥厚が重要な役割を果たす。しかしながら現在の治療では内膜肥厚形成を制御することができておらず、十分な効果が得られていない。本研究から内膜肥厚における内弾性板断裂から平滑筋細胞の遊走の分子機序が明らかとなった。これら分子を生体内で誘導することができれば動脈管の制御につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The ductus arteriosus (DA) closes after birth to adapt to the robust changes in hemodynamics, which require intimal thickening to occur. The tissue-type plasminogen activator (t-PA) mRNA expression level was higher in DA endothelial cells (ECs) than in aortic ECs. t-PA-mediated marked gelatinase activity was observed at the site of disruption in the internal elastic laminae (IEL). In vivo administration of plasminogen to pre-term rat fetuses, in which intimal thickening is poorly formed, promoted IEL disruption accompanied by gelatinase activation, and enhanced intimal thickening formation in the DA. We also identified Fbln1 as a candidate gene for intimal thickening. Fibulin-1 is induced via prostaglandinE-EP4receptor signaling pathway in DA smooth muscle cells (SMCs). Fibulin-1 promoted SMC migration in combination with fibulin-1 binding protein versican. In conclusions, EC-derived t-PA and SMC-derived fibulin-1 promoted DA intimal thickening.

研究分野：循環生理学

キーワード：動脈管 発生・分化 生理学 シグナル伝達 リモデリング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

動脈管は出生直後に血管平滑筋の収縮にともなって閉鎖するが、早産児ではしばしば出生後も開存したままとなる。特に胎生 28 週未満の超早産児では動脈管開存症の割合は 75% と非常に高く、肺高血圧、感染症、呼吸障害などを引き起こして生命予後を悪化させる。一方、肺動脈閉鎖や、大動脈弓離断のように動脈管に血流を依存する先天性心疾患では、根治手術までの期間は生命維持のために動脈管が開存する必要がある。つまり、動脈管の開存と閉鎖を十分に制御できれば小児の生命予後を大きく改善することができる。

動脈管の閉鎖に重要な内膜肥厚に最も強く関与する分子機構を明らかにして、それらを制御することすることが動脈管の閉鎖・開存の制御に重要であると着想した。研究代表者らは、先行研究でヒトとラット動脈管を用いて網羅的遺伝子解析を行い、内膜肥厚を誘導する最も有力な候補遺伝子として組織型プラスミノゲン活性化因子 (tPA または PLAT) とファイブリン 1 (FBLN1) の 2 つを同定した。動脈管内膜肥厚は、内弾性板の断裂と中膜の平滑筋細胞の血管内腔側への遊走によって形成される (引用文献 1)。PLAT は血栓溶解作用に加えて、プロテアーゼ活性により弾性板の分解や細胞遊走に関与することが注目されている。FBLN1 も細胞外基質と結合して細胞遊走を亢進させることが示唆されていることから、PLAT と FBLN1 が内膜肥厚に重要な役割を果たす可能性があると考えた。

## 2. 研究の目的

胎児期に存在する動脈管は出生後には速やかに閉鎖するが、早産児では出生後の動脈管開存症が生命予後を悪化させ、ある種の先天性心疾患では出生後も動脈管の開存が必要である。つまり、動脈管の閉鎖と開存の制御は小児医療上極めて重要な課題である。動脈管の完全な閉鎖には、胎生中期から始まる解剖学的リモデリングである内膜肥厚が重要な役割を果たす。しかしながら現在の治療では内膜肥厚形成を制御することができておらず、十分な効果が得られていない。本研究では、動脈管の閉鎖に必要な内膜肥厚形成の分子機序を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ラット動脈管における t-PA 発現の検討

動脈管と大動脈の内皮細胞における t-PA 発現を比較するために、胎生 21 日目 (胎生満期) の胎仔ラットから動脈管と大動脈を摘出し、FACS を行った。FITC 標識抗 CD31 抗体と抗 CD45 抗体を内皮細胞と血球に対する標識として用いて、CD31<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup> の領域を内皮細胞として分離した。分離した内皮細胞から RNA を抽出し、定量 PCR で t-PA 発現の検討を行った。

### (2) 内皮由来の MMP による内弾性板断裂の検討 (in vitro)

ラットの新生仔大動脈から分離した血管平滑筋細胞の細胞表面にフィブロネクチンとゼラチンのコーティングを行い、細胞播種と細胞コーティングを繰り返すことで、弾性線維を有する合計 7 層の平滑筋細胞積層体を構築した (引用文献 2)。最上層には、臍帯静脈内皮細胞を積層し、内皮細胞と弾性線維が存在する 3 次元血管モデルを作製した。3 次元血管モデルに対して、プラスミノゲンの添加の有無を行い、弾性線維の変化と MMP 活性の変化を検討した。

### (3) 胎仔ラット動脈管の内弾性板断裂と内膜肥厚形成の検討 (in vivo)

胎生 19 日目の胎仔ラットにプラスミノゲン (20µg/body) の腹腔内投与を行い、胎生 20 日目の胎仔ラットの動脈管を摘出した。パラフィン切片を作成し、内弾性板断裂と内膜肥厚形成をエラスチカ・ワンギーソン染色で検討した。また、MMP 活性を、in situ ザイモグラフィーで検討した。

### (4) フィブリン 1 の細胞遊走に対する作用機序 (in vitro)

ガラスチャンバーに動脈管平滑筋細胞を播種し、EP4 アゴニスト刺激を加えた後に、スクラッチアッセイにより 72 時間後の細胞遊走面積を計測した。

#### (5) フィブリン 1 とパーシカンの細胞遊走に対する作用機序 (in vitro)

内皮細胞と平滑筋細胞の共培養系で、平滑筋細胞遊走が促進するかどうかについて、シリコン製インサートを用いて検討した。内皮細胞はパーシカンを発現している EA.hy926 細胞を実験に用いた。内皮細胞、平滑筋細胞に対し、パーシカンおよびフィブリン 1 を標的とした siRNA を用いて遺伝子を抑制し、細胞遊走を評価した。

#### (6) フィブリン 1 の動脈管内膜肥厚作用の検討 (in vivo)

EP4<sup>-/-</sup>マウスの動脈管でエラスチカ染色を行って内膜肥厚を評価した。野生型マウスと EP4<sup>-/-</sup>マウス新生児動脈管組織の蛍光免疫染色を行い、フィブリン 1 の発現を比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) ラット動脈管の内皮細胞における t-PA の高発現

動脈管の内皮細胞は、大動脈の内皮細胞と比較して t-PA が高発現していた (2.7 倍、n=6、 $p < 0.01$ )。免疫組織染色で、t-PA が胎生 19 日目の未熟な胎仔期から動脈管の内皮細胞に存在し、胎生 19 日目には内弾性板が断裂しておらず、胎生 21 日目には内弾性板が断裂していることを確認した。

#### (2) ラット動脈管の内皮細胞における MMP-2 の活性化

動脈管の内皮細胞で MMP-2 の高発現を認めた (6.7 倍、n=6、 $p < 0.05$ )。また、t-PA の基質であるプラスミノゲンの添加により、動脈管の内皮細胞で MMP-2 の活性化が生じることを確認した。動脈管と大動脈のいずれの内皮細胞でも、MMP-9 の発現は認めなかった。

#### (3) 内皮由来の MMP による内弾性板の断裂 (in vitro)

内皮細胞と弾性線維が存在する 3 次元血管モデルを作製し、プラスミノゲンの添加を行い、48 時間の培養を行ったところ、プラスミノゲン添加群でのみ、弾性線維の断裂と MMP の活性化が確認された。これらの変化は、t-PA の silencing を行うことで抑制された。このため、t-PA によるプラスミノゲンのプラスミンへの変換を介して、MMP が活性化し、弾性線維が断裂したことが示された。

#### (4) 胎仔ラットへのプラスミノゲン投与による動脈管の内膜肥厚形成の促進 (in vivo)

胎生 19 日目の未熟な胎仔ラットに対して、プラスミノゲンの胎仔投与を行ったところ、胎生 20 日目の胎仔ラットの動脈管で MMP 活性が増加していた (1.3 倍、n=6、 $p < 0.05$ )。また、内弾性板断裂と内膜肥厚形成の促進が確認された (内膜肥厚部の面積: 2.0 倍、n=6-8、 $p < 0.001$ )。

#### (5) ヒト動脈管の内膜肥厚部における t-PA 高発現と MMP 活性化

ヒト動脈管の内膜肥厚部と中膜に対する定量 PCR では、内膜肥厚部で t-PA が高発現していた (3.7 倍、n=5、 $p < 0.05$ )。免疫組織染色では、内皮細胞における t-PA の高発現を確認した。in situ ザイモグラフィーでは、内膜肥厚部と内弾性板における MMP 活性化を確認した。

#### (6) フィブリン 1 産生の分子機序 (in vitro)

フィブリン 1 mRNA の発現は、ラット動脈管平滑筋細胞において、EP4 刺激によって約 300 増加した (n=6-10、 $p < 0.001$ )。ウエスタンブロットティングでは、フィブリン 1 蛋白は濃度、時間依存的に発現が増加し、EP4 刺激による増加は、約 30 倍 (n=5、 $p < 0.01$ ) と顕著であった。EP4 刺激で増加したフィブリン 1 蛋白の増加は、EP4 アンタゴニストによって完全に抑制された。

( 7 ) フィブリン 1 の細胞遊走に対する作用機序 (in vitro)

EP4 アゴニストによる刺激でラット動脈管平滑筋細胞の遊走が促進した。また、この細胞遊走促進作用は、フィブリン 1 を標的とした siRNA によって有意に抑制された。また、フィブリン 1 動脈管平滑筋細胞にリコンビナント蛋白を添加したところ、フィブリン 1C、フィブリン 1D どちらのアイソフォームによっても細胞遊走は亢進した (n = 11-14, p<0.01)。

( 8 ) フィブリン 1 とパーシカンの分泌責任細胞の同定 (in vitro, in vivo)

FACS 解析の結果、フィブリン 1 の発現は、ラット動脈管内皮細胞と平滑筋細胞で有意差は認めなかったが、パーシカンの発現においては、内皮細胞に有意に高く発現していた (n=5-6, p<0.01)。マウス新生児動脈管の蛍光免疫染色においても、野生型では、内膜肥厚部、中膜平滑筋細胞層にフィブリン 1 の局在を認め、内膜肥厚部に一致した部位でパーシカンと共局在していた。以上の結果より、フィブリン 1 は主として平滑筋細胞由来であり、パーシカンは内皮細胞由来であることが示唆された。

( 9 ) フィブリン 1 とパーシカンの細胞遊走に対する作用機序 (in vitro)

動脈管平滑筋細胞と内皮細胞を共培養すると、EP4 刺激により平滑筋細胞は内皮方向に向かって著明に遊走した。siRNA を用いて平滑筋細胞でのフィブリン 1 または内皮細胞でのパーシカンの発現を抑制すると、平滑筋細胞の内皮方向への細胞遊走は有意に抑制された (n = 6-18, p<0.05)。

( 10 ) フィブリン 1 の動脈管内膜肥厚作用の検討 (in vivo)

野生型マウスでは動脈管は閉鎖しており、内膜肥厚が十分に形成されていた。内膜肥厚部と中膜平滑筋細胞層にフィブリン 1 が発現しており、EP4<sup>-/-</sup>マウスでは、平滑筋細胞におけるフィブリン 1 の発現が抑制されていた。これらの結果よりフィブリン 1 が動脈管内膜肥厚に関する可能性が示唆された。

< 引用文献 >

Yokoyama U, et al., J Smooth Muscle Res, 2010  
Atherosclerosis, 2014

5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 8 件 )

Kemmotsu T, Yokoyama U, Saito J, Ito S, Uozumi A, Nishimaki S, Iwasaki S, Seki K, Ito S, Ishikawa Y, Antenatal Administration of Betamethasone Contributes to Intimal Thickening of the Rat Ductus Arteriosus. Circ J, 2019, 83: 654-661. 査読有  
DOI:10.1253/circj.CJ-18-1033.

Kato Y, Yokoyama U, Fujita T, Umemura M, Kubota T, Ishikawa Y, Epac1 deficiency inhibits basic fibroblast growth factor-mediated vascular smooth muscle cell migration. J Physiol Sci, 2019, 69: 175-184. 査読有  
DOI:10.1007/s12576-018-0631-7.

横山詩子, 齋藤純一, 石川義弘, 動脈管閉鎖における t-PA 活性の役割, 日本血栓止血学会誌, 2018, 29: 1-3. 査読無  
DOI なし

Saito J, Yokoyama U, Nicho N, Zheng YW, Ichikawa Y, Ito S, Umemura M, Fujita T, Ito S, Taniguchi H, Asou T, Masuda M, Ishikawa Y, Tissue-type plasminogen activator contributes to remodeling of the rat ductus arteriosus. PLoS One, 2018, 13: e0190871. 査読有  
DOI:10.1371/journal.pone.0190871.

Mamun A, Yokoyama U, Saito J, Ito S, Hiromi T, Umemura M, Fujita T, Yasuda S, Minami T, Goda M, Uchida K, Suzuki S, Masuda M, Ishikawa Y, A selective antagonist of

prostaglandin E receptor subtype 4 attenuates abdominal aortic aneurysm. *Physiol Rep*, 2018, 6: e13878. 査読有  
DOI:10.14814/phy2.13878.

Kato Y, Yokoyama U, Fujita T, Umemura M, Kubota T, Ishikawa Y, Epac1 deficiency inhibits basic fibroblast growth factor-mediated vascular smooth muscle cell migration. *J Physiol Sci*, 2018, 69:175-184. 査読有  
DOI:10.1007/s12576-018-0631-7.

Yokoyama U, Ichikawa Y, Minamisawa S, Ishikawa Y, Pathology and molecular mechanisms of coarctation of the aorta and its association with the ductus arteriosus. *J Physiol Sci*, 2017, 67: 259-270. 査読有  
DOI:10.1007/s12576-016-0512-x.

Ito S, Yokoyama U, Saito J, Sato S, Usuda H, Watanabe S, Kitanishi R, Miura Y, Saito M, Hanita T, Matsuda T, Ishikawa Y, Attenuation of ductus arteriosus intimal thickening in preterm sheep twins compared with singletons. *J Physiol Sci*, 2017, 67: 723-729. 査読有  
DOI:10.1007/s12576-017-0565-5.

[学会発表](計 33 件)

Yokoyama U, Uncovering new GPCR signaling pathways in Prostaglandin E2-mediated vascular remodeling and inflammation, The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress, 2019.

横山詩子, 動脈管は面白い! 100 年前からの謎を解く, 横浜市立大学小児科リサーチ発表会, 2019.

齋藤純一, 動脈管の内皮細胞による血管リモデリング, 第 13 回 新生児科指導医教育セミナー, 2019.

釘持孝博, 母体ラットへのベタメタゾン投与が動脈管内膜肥厚に与える作用の検討, 第 63 回日本新生児成育医学科医・学術集会, 2018.

横山詩子, 動脈管作動薬の作用機序 薬物療法の基礎として, 第 10 回教育セミナー Advanced Course, 2018.

Saito J, Mechanoreponse to periodic hydrostatic pressure enables fabrication of human arterial graft, American Society for Matrix Biology Biennial Meeting 2018, 2018.

中川路太一, Fibulin-1 の動脈管内膜肥厚形成における役割, 第 28 回日本病態生理学会大会, 2018.

齋藤純一, 動脈管閉鎖における内皮機能の役割, 第 54 回日本小児循環器学会総会・学術集会, 2018.

横山詩子, 胎盤由来プロスタグランディン E は Fibulin-1 を介した動脈管リモデリングを促進する, 第 50 回日本結合組織学会学術大会, 2018.

Saito J, Tissue-type plasminogen activator promotes intimal thickening formation of the ductus arteriosus, Weinstein 2018 Cardiovascular Development and Regeneration Conference, 2018.

Kemmotsu T, Antenatal administration of betamethasone promotes closure of the preterm ductus arteriosus via intimal thickening formation, Weinstein 2018 Cardiovascular Development and Regeneration Conference, 2018.

Ito S, Prostaglandin E-EP4 signaling-mediated fibulin-1 integrates extracellular matrices to promote smooth muscle cell migration of the ductus arteriosus, Weinstein 2018 Cardiovascular Development and Regeneration Conference, 2018.

Saito J, Tissue-type plasminogen activator contributes to remodeling of the ductus arteriosus, The 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2018.

横山詩子, 肺血管の発達と密接な関連を有する動脈管の発達, 第 24 回日本小児肺循環研究会, 2018.

Yokoyama U, Molecular mechanisms of the ductus arteriosus, The 90th Scientific Session, American Heart Association, 2017.

伊藤智子, 多胎妊娠では動脈管内膜肥厚が抑制される, 第 62 回日本新生児成育医学会学術集会, 2017.

Yokoyama U, New insights on how to treat patent ductus arteriosus, The 8th TAKAO International symposium, 2017.

Saito J, Fabrication of implantable human arterial graft by periodic hydrostatic pressure, The 8th TAKAO International symposium, 2017.

Kemmotsu T, Antenatal administration of betamethasone contributes to intimal thickening of the ductus arteriosus, The 8th TAKAO International symposium, 2017.

Ito S, Prostaglandin E-EP4-mediated fibulin-1 up-regulation plays a role in intimal thickening of the ductus arteriosus, The 8th TAKAO International symposium, 2017.

〔図書〕(計 5 件)

横山詩子, 齋藤純一, エルゼビア・ジャパン社, ガイトン生理学 原著第 13 版 第 84 章: 胎児と新生児の生理学, 2018, 1982-1991.

横山詩子, エルゼビア・ジャパン社, ガイトン生理学 原著第 13 版 第 14 章: 循環の概要; 圧, 流量, 抵抗の生物物理学, 2018, 1153-1162.

横山詩子, エルゼビア・ジャパン社, ガイトン生理学 原著第 13 版 第 15 章: 動脈系と静脈系の血管伸展性と機能, 2018, 1163-1171.

横山詩子, 診断と治療社, 小児・成育循環器学, 動脈管作用薬, 2018, 100-101.

Yokoyama U, Minamisawa S, Ishikawa Y, Springer, Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease, The multiple roles of prostaglandin E2 in the regulation of the ductus arteriosus, 2016, 253-258.

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~seiri1/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 藤田 秀次郎

ローマ字氏名: Fujita Shujiro

所属研究機関名: 横浜市立大学

部局名: 医学研究科

職名: 共同研究員

研究者番号 (8 桁): 90381516

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、研究者個人に帰属されます。