

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10099

研究課題名(和文) サイトカインを標的とした動脈管制御の開発

研究課題名(英文) investigation for management of ductus arteriosus by cytokines

研究代表者

岩崎 志穂 (Iwasaki, Shiho)

横浜市立大学・医学部・客員准教授

研究者番号：10347338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はプロスタグランジン合成阻害剤抵抗性の未熟児動脈管開存症の治療として、他の抗炎症性薬剤の併用等の新たな治療方法を確立することを目的とした。抗炎症性薬剤の代表的なものとして糖質コルチコイドが挙げられるが、その1種であるベタメタゾンを早産児分娩前母体へ投与することで出生児の動脈管開存症が減少することが報告されている。本研究では、ベタメタゾンを妊娠母体ラットへ投与することで、Art3を介して未熟児ラット動脈管平滑筋細胞の遊走を促進し、ラット胎仔の動脈管における内膜肥厚を進行させて動脈管閉鎖率の向上に寄与している可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、分娩前母体へのベタメタゾン投与が胎仔動脈管の内膜肥厚形成を促進することが示唆された。これらは糖質コルチコイドによる動脈管リモデリングの機序をはじめて示したものである。これまで未熟児動脈管開存症に対する内科的治療手段はプロスタグランジン合成阻害剤のみであり、治療不応の場合はより侵襲の高度な外科的治療に踏み切るしか方法はなかった。本研究は未熟児動脈管開存症の治療に新たな選択肢を示す足掛かりとなる考えられ、新生児医療の更なる発展に寄与する結果を得られたと考えている。

研究成果の概要(英文)：We aimed to explore a new treatment strategy for prostaglandin inhibitor-resistant patent ductus arteriosus in preterm infants. Glucocorticoid is a major anti-inflammatory drug, and some observational studies have demonstrated that the prevalence of patent ductus arteriosus is lower in human preterm infants who received antenatal betamethasone. In the present study, we demonstrated that betamethasone promoted migration of smooth muscle cells isolated from rat preterm ductus arteriosus via Art3 and antenatal administration of betamethasone enhanced intimal thickening formation in preterm rat ductus arteriosus. These data suggest the beneficial role of antenatal betamethasone in the closure of preterm ductus arteriosus.

研究分野：小児科

キーワード：動脈管 内膜肥厚 炎症

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

1. 研究開始当初の背景

早産児において動脈管開存症 (PDA) は肺出血や心不全で不幸な転機をとる例もあり、生命予後を大きく左右する因子の一つである。現在、PDA に対し使用されている唯一の薬剤は PG 合成阻害剤であるが、治療への反応不良例が少なからず存在し、副作用として腎不全、腸管壊死、血小板機能抑制等の重篤なものも頻度も高い¹⁾。薬物治療に反応しない場合は動脈管結紮術の適応となるが、体重 1000g 未満の児に対しての手術侵襲は大きい²⁾。胎児炎症反応症候群では絨毛膜羊膜炎などの子宮内の炎症が胎児に波及し、血中のサイトカイン濃度が著しく上昇している。胎児炎症反応症候群の早産児に PDA の頻度が高いことや、感染の合併例にプロスタグランジン合成阻害剤反応不良例や動脈管の再開存率が高い事が知られている³⁾。

2. 研究の目的

本研究では炎症が PDA の病態形成に重要な役割を果たしているという仮説をたて、早産児のサイトカインと PDA の関係を明らかにし、これにより PG 合成阻害剤抵抗性の PDA の治療として他の抗炎症性薬剤の併用等の新たな治療方法を確立することを目的とした。抗炎症性薬剤の代表的なものとして糖質コルチコイドが挙げられるが、その一種であるベタメタゾンが早産児分娩前の母体に児の呼吸窮迫症候群発症予防を目的として投与されることにより、PDA 発症率が低下することが複数の観察研究において報告されてきた⁴⁾⁻⁷⁾。しかしこれらの観察研究はいずれも新生児予後評価の項目として呼吸窮迫症候群など複数が挙げられている中に PDA が含まれている、という内容であって PDA そのものに焦点を当てた研究デザインとはなっておらず、PDA 発症率が減少する機序についての検討も行われてはいない。一方、糖質コルチコイドの動脈管収縮効果については、過去に様々な動物種において報告が行われてきている⁸⁾。さらに Shelton らはマウスの動脈管の酸素に対する感受性がベタメタゾンにより上昇し、それにはアンジオテンシン受容体 R1 (AT₁-R1)、カリウムチャネル (BKCa-beta1, Kv 1.2, Kvbeta 1.2)、ホスホジエステラーゼ (Pde1b, Pde3b) といった酸素による血管収縮・拡張を調節する遺伝子の発現変化を伴っていることを報告している⁹⁾。これらの報告と前述の観察研究の結果を踏まえると、母体への分娩前ベタメタゾン投与が出生児の動脈管閉鎖促進に関連性を有していることが推測される。そこで我々は臨床における使用頻度が極めて高い抗炎症性薬剤であるベタメタゾンに着目して分娩前母体ベタメタゾン投与が動脈管閉鎖に与える作用を分子生物学的に検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) DNA マイクロアレイ解析

初代培養後に継代を重ねて得たラット未熟児動脈管平滑筋細胞を培養プレートに播種し、BMZ 100 $\mu\text{mol/l}$ による刺激群とコントロール群の各々から全 RNA を抽出した。SurePrint G3 Human GE 8x60K v2 Microarray (Agilent, Santa Clara, CA, USA) を用いて解析を行った。そしてマイクロアレイ上の 58717 プローブセット中で BMZ とコントロールの間での発現変化を解析し、2.5 倍以上の変化を認める遺伝子を抽出した。

(2) BMZ 刺激を加えた動脈管平滑筋細胞の RT-PCR (in vitro)

BMZ で刺激を加えた動脈管平滑筋細胞から抽出した RNA で、上記(1)で最大の増幅を示した遺伝子である *Art3* のプライマーを用いて RT-PCR を行った。まず BMZ 添加濃度による変化を検討する実験では、初代培養後に継代を重ねて得た未熟児動脈管平滑筋細胞と未熟児大動脈平滑筋細胞を培養プレートに播種し、その後 BMZ 1 $\mu\text{mol/l}$ 、10 $\mu\text{mol/l}$ または 100 $\mu\text{mol/l}$ を添加した刺激群とコントロール群から RNA を抽出した。時系列での変化を検討する実験では、同様に播種した平滑筋細胞にアクチノマイシン D 5 $\mu\text{g/ml}$ と BMZ 100 $\mu\text{mol/l}$ を添加し、添加後 2 時間、6 時間、24 時間で各々 RNA を抽出した。

(3) *Art3* 発現阻害と細胞遊走能測定 (in vitro)

動脈管の解剖学的閉鎖において重要な要素である細胞遊走能の BMZ 刺激による変化を、動脈管平滑筋細胞を用いたスクラッチアッセイで検討した。初代培養後に継代を重ねて得たラット未熟児動脈管平滑筋細胞を培養ディッシュに播種し、*Art3* を標的とした siRNA またはコントロール siRNA を導入した。導入後に BMZ 100 $\mu\text{mol/l}$ (または培地のみのコントロール) を添加し、スクラッチアッセイにより細胞遊走能の測定を 72 時間行った。

(4) 免疫細胞染色とラメリポディア形成の評価 (in vitro)

遊走能変化の傍証として、BMZ 刺激に伴う動脈管平滑筋細胞の形態学的変化を検討するため免疫細胞染色を行った。初代培養後に継代を重ねて得た未熟児動脈管平滑筋細胞を培養プレートに播種し、BMZ 100 $\mu\text{mol/l}$ (または培地のみのコントロール) を添加し、24 時間後に 10% 中性緩衝ホルマリンで固定した後に免疫染色を行い形態学的変化の評価としてラメリポディア形成を検討した。

(5) BMZ 投与による内膜肥厚形成の解析 (in vivo)

妊娠ラットに対し、妊娠 18 日目と 19 日目に生理食塩水 0.5ml または BMZ (0.4mg/kg) を静注し、妊娠 20 日目 (ヒトで妊娠第 2 期に相当) に胎子を摘出し、胎子を解剖して胸腔から動脈管と大動脈弓を含む血管系と肺を一塊にして採取し、動脈管組織・肺組織の評価を行った。肺組織の形態学的評価では、まず気腔領域の面積を 1 視野全体の面積で除することで気腔容量密度を算出し、それを用いて肺の成熟度を評価した。また、動脈管内膜肥厚形成の評価については、内膜肥厚部分の面積を中膜面積で除することで算出した。

4. 研究成果

(1) DNA マイクロアレイ解析 (in vitro)

DNA マイクロアレイ解析を行い得られた 58717 のプローブセットのうち、51 遺伝子が 2.5 倍以上に発現が増加し、その中でも最も発現増加が高度だったのは ADP-ribosyltransferase 3 (*Art3*) だった。さらに、糖質コルチコイドにより調節されることが知られている遺伝子である、FK506-binding protein 5 (*FKBP5*), glucocorticoid-inducible kinase 1 (*SGK1*), *Tsc22d3* がそれぞれ 1.7 倍, 1.3 倍, 2.0 倍と発現増加を認めており、これらにより BMZ がラット未熟児動脈管平滑筋細胞に対して作用している、という事実を確認することができた。これらは、その他の遺伝子発現変化が糖質コルチコイドによって生じたことを支持する結果となった。ADP ribosyltransferases (*Arts*) は翻訳後タンパク修飾の 1 種であるモノ ADP リボシル化を触媒することで細胞機能を変換する作用を有する酵素の一群である。また、*Art3* はメラノーマ細胞の遊走や増殖を促進すると報告されている。細胞遊走や増殖は内膜肥厚形成にとって非常に重要な細胞プロセスであることから、我々は平滑筋細胞遊走における *Art3* の役割に焦点を当て研究を行うこととした。

(2) BMZ 刺激を加えた動脈管平滑筋細胞の RT-PCR (in vitro)

未熟児動脈管平滑筋細胞では *Art3* の発現量が顕著に増加していたが、未熟児大動脈平滑筋細胞では変化を有意な変化を認めなかった。また、未熟児動脈管平滑筋細胞における *Art3* 発現量の増加幅は、刺激に用いる BMZ の濃度に依存して大きくなった (図 1A)。さらに BMZ は時間依存性を持って *Art3* の発現量を変化させ、この発現量変化は転写抑制薬であるアクチノマイシン D を添加することで抑制されたため、BMZ が *Art3* の転写を促進することで mRNA 発現量を増加させている、ということが判明した (図 1B)。

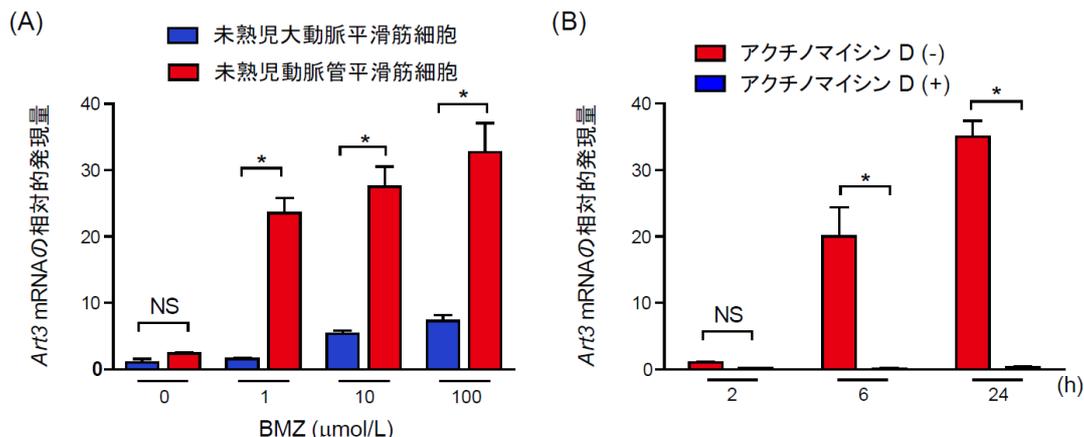


図 7 未熟児ラット血管平滑筋細胞での BMZ 刺激に伴う *Art3* 発現量変化

- (A) ラット未熟児動脈管平滑筋細胞では、未熟児大動脈平滑筋細胞と比較して有意に BMZ 刺激に伴う *Art3* 発現量の増加を認めた。また、その発現量増加の割合は BMZ 濃度上昇に伴って増加した。n = 6, * $p < 0.05$, NS: not significant.
- (B) ラット未熟児動脈管平滑筋細胞では BMZ 刺激に伴う *Art3* 発現量の時間依存的な増加を認めた。また、この発現量の変化は、アクチノマイシン D を添加することによって抑制された。n = 6, * $p < 0.05$, NS: not significant.

(3) *Art3* 発現阻害と細胞遊走能測定 (in vitro)

まず初めに siRNA が有効に作用するかを評価したが、2 種類の *Art3* に対する siRNA (siArt3) はいずれもコントロール siRNA (siNeg) と比較して有意に未熟児動脈管平滑筋細胞における *Art3* の発現を抑制することができた (図 2A)。これら 2 種類の siArt3 とコントロール siRNA (siNeg) を用いて実施したスクラッチアッセイでは、まず siNeg 添加下において、BMZ によるラット未熟児動脈管平滑筋細胞の有意な遊走促進を認めた。また、この遊走促進効果は時系列に沿って増加していた (図 2B・C 中の赤折れ線グラフ vs. 黒折れ線グラフ)。そして、これらの遊走促進効果は、2 種類の siArt3 のいずれを添加した場合でも抑制されていた (図 2B・C 中の赤折れ線グラフ vs. 青折れ線グラフ)。

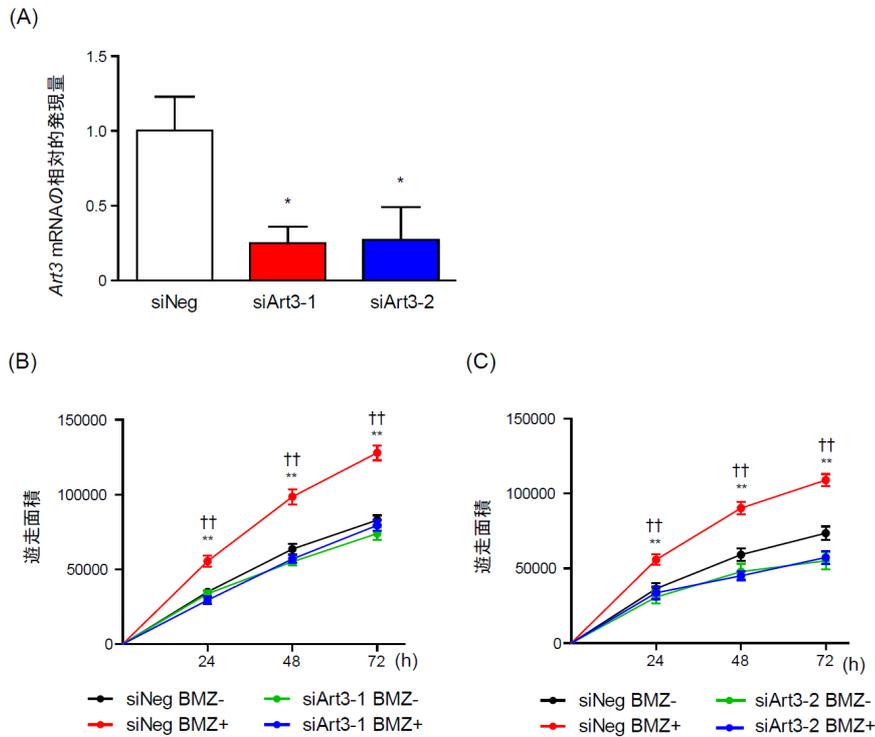


図2 ラット未熟児動脈管平滑筋細胞を用いたスクラッチアッセイ

(A) siArt3-1 と siArt3-2 は共にラット未熟児動脈管平滑筋細胞における Art3 発現を抑制した。n = 6, *p<0.05 in siNeg vs. siArt3-1 or siArt3-2. (B-C) 2 種類の siArt3 (siArt3-1 と siArt3-2) と siNeg を用いて実施したスクラッチアッセイでは, BMZ によりラット未熟児動脈管平滑筋細胞の遊走は有意に促進され,そしてその効果は siArt3 によって抑制された。n=7-8, ** p < 0.05 in siNeg BMZ+ vs. siNeg BMZ-, † † p<0.05 in siNeg BMZ+ vs. siArt3-1 BMZ+ または siArt3-2 BMZ+.

(4) 細胞免疫染色とラメリポディア形成の評価 (in vitro)

BMZ 刺激により、動脈管平滑筋細胞全体におけるラメリポディアを形成した細胞の割合は有意に上昇していた (図 3)。

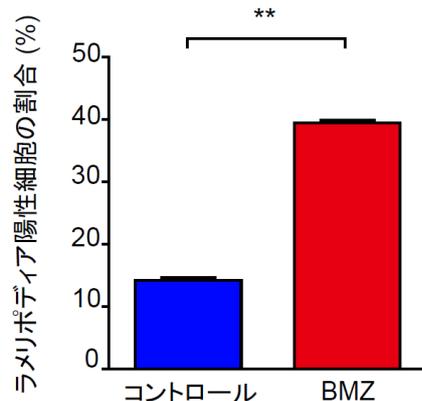


図3 ラット未熟児動脈管平滑筋細胞のラメリポディア形成率

辺縁にリン酸化パキシリンを高発現しながらラメリポディアを形成しているものをラメリポディア陽性細胞と判定し、各視野における総細胞数に占める割合を算出した。ラメリポディア形成率は BMZ 刺激により有意に上昇していた。Control: n=5, BMZ: n=6, ** p<0.01.

(5) BMZ 投与による内膜肥厚形成の分析 (in vivo)

まず、分娩前 BMZ 投与により胎仔肺の気腔容量密度は増加しており (図 4)、これは過去の報告と同様にこの治療により胎仔の肺成熟が促進されていることを意味すると考えられ、この BMZ 投与方法がラット胎仔に有効に作用していることが示唆された。

そして、ラット動脈管組織において内膜肥厚面積の中膜面積に対する割合が BMZ 刺激により有意に増加しており (図 5)、分娩前 BMZ 投与が未熟胎仔動脈管の内膜肥厚形成を促進していることが証明された。

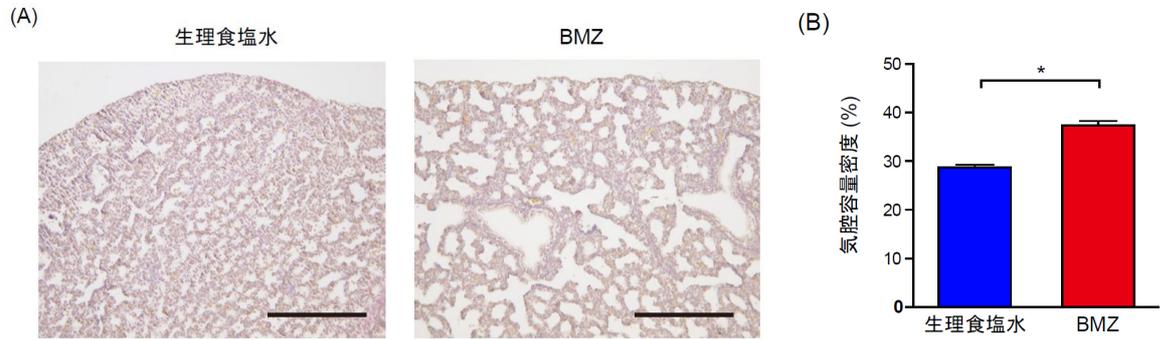


図4 ラット未熟胎仔肺組織の成熟度評価

(A) 胎齢 18 と 19 に生理食塩水または BMZ を投与された胎齢 20 ラット胎仔の肺組織写真。スケールバーは 200 μm に相当する。(B) (A)を用いて気腔容量密度を算出した。BMZ を投与された群では気腔容量密度が有意に増加していた。n = 6, * $p < 0.05$ 。

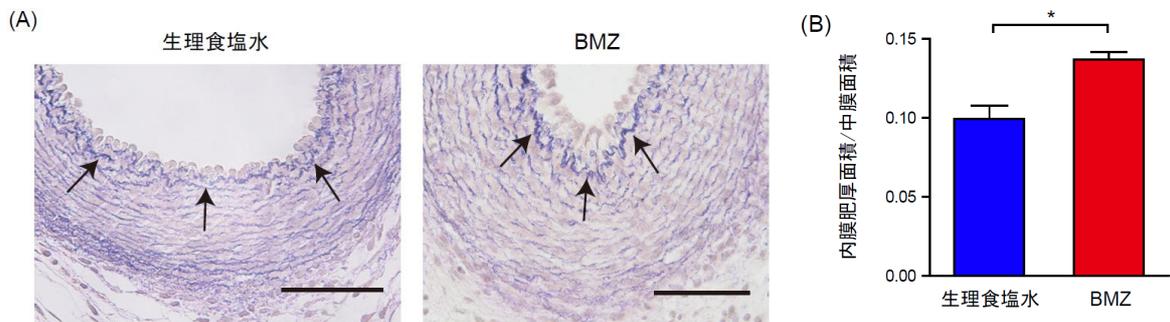


図5 ラット未熟胎仔動脈管組織における内膜肥厚形成の評価

(A) 胎齢 18 と 19 に生理食塩水または BMZ を投与された胎齢 20 ラット胎仔の動脈管組織写真。矢印は内弾性板を示す。スケールバーは 50 μm に相当する。(B) (A)を用いて内膜肥厚面積の中膜面積に対する割合を算出した。BMZ を投与された群では内膜肥厚面積の割合が有意に増加していた。生理食塩水: n = 7, BMZ: n=8, * $p < 0.057$

以上の研究成果から、分娩前母体へ投与された BMZ が *Art3* を介して未熟児ラット動脈管平滑筋細胞の遊走を促進し、ラット胎仔の動脈管における内膜肥厚を促進させることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kemotsu T., Yokoyama U., Saito J., Ito S., Uozumi A., Nishimaki S., Iwasaki S., Seki K., Ito S., Ishikawa Y	4. 巻 83
2. 論文標題 Antenatal administration of betamethasone contributes to intimal thickening of the rat ductus arteriosus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 654, 661
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circj.CJ-18-1033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈿持孝博, 横山詩子, 齋藤純一, 魚住梓, 岩崎志穂, 西巻滋, 関和男, 石川義弘
2. 発表標題 ラット母体への分娩前ベタメタゾン投与が動脈管内膜肥厚へ与える作用の検討
3. 学会等名 第63回日本新生児成育医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kemotsu T, Yokoyama U, Azuma S, Saito J, Ito S, Uozumi A, Iwasaki S, Nishimaki S, Ito S, Ishikawa Y.
2. 発表標題 Antenatal Administration of Betamethasone Promotes Closure of the Preterm Ductus Arteriosus via Intimal Thickening Formation
3. 学会等名 Nara Kasugano International Forum
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kemmothu T, Yokoyama U, Iwasaki S
2. 発表標題 Antenatal Administration of Betamethasone Contributes to Intimal thickening of the Ductus Arteriosus
3. 学会等名 The 8th TAKAO International symposium
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 劔持孝博、横山詩子、岩崎志穂
2. 発表標題 母体ラットへのベタメタゾン投与が動脈管閉鎖に与える作用の検討
3. 学会等名 第53回日本新生児成育医学会学術集会
4. 発表年 2017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