

平成21年 6月15日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19591285

研究課題名（和文）動脈管分化促進による未熟児動脈管開存症の新治療を目指して

研究課題名（英文）Promoting vascular differentiation could be a new therapeutic strategy for patent ductus arteriosus in premature infants

研究代表者

岩崎 志穂（IWASAKI SHIHO）

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：10347338

研究成果の概要：

現在、動脈管治療はプロスタグランジン(PG)標的であるが副作用が大きい。胎児期にはPGが動脈管を拡張しつつ、ヒアルロン酸(HA)産生を促進し内膜肥厚を誘導している。PGはアデニールシクラーゼ(AC)を活性化し作用するため、ACを標的としたより選択的な薬剤開発を目的とした。動脈管において高発現していたAC2、5、6の刺激薬での検討で、AC5/6刺激薬にはPGと同様に血管拡張作用とHA産生作用があるが、AC2刺激薬は血管拡張作用が主である事が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：動脈管、内膜肥厚、ヒアルロン酸

1. 研究開始当初の背景

救命率が飛躍的に向上した未熟児医療の中で、いまなお生命予後を左右する重篤な疾患の一つに動脈管開存症(PDA)が挙げられる。動脈管の管理は新生児医療において非常に重要な位置を占める。動脈管は他臓器に比しプロスタグランジン E(PGE)に対する反応性が極めて高く、臨床においては未熟児PDAに対して収縮を目的としたPGE合成阻害剤が投与されている。しかしPGE受容体が全身に広く分布しているためにこれらの薬剤の投与は他臓器にも作用し、生命を脅かしかねない副作用の出現がしばしば

治療を困難なものにする。このような事情によりPGEよりも特異的に動脈管に作用する薬剤の出現が望まれている。

2. 研究の目的

出生後の動脈管閉鎖の前段階として、胎生後期に血管内膜肥厚による内腔の狭小化が生じている事が知られている。

研究代表者らは、PGE刺激が内膜肥厚に重要な役割を果たす事を明らかにした(Yokoyama et. al. *J Clin Invest* 2006)。

また、良く知られている様にPGEは出生前の

動脈管を開存させておく作用も担っている。以上のように胎児期において PGE は、動脈管内膜の肥厚を誘導し内腔を狭める事で出生後の閉鎖に向けて準備をしつつ、胎児期の閉鎖を阻止するために動脈管を拡張しているという一見相反する作用を動脈管に及ぼしている。

PGE が動脈管に作用する機序としては、PGE 刺激により受容体を介してアデニル酸シクラーゼ (AC) が活性化され、細胞内 cAMP が増加する事が関与していると考えられている。

そこで我々は9つある AC のアイソフォームにつき以下を検討する事を目的とした。

- (1) 動脈管に対し特異的に作用する AC アイソフォームの特定
- (2) それぞれの AC アイソフォームが動脈管の収縮、内膜肥厚に対しどのような作用を及ぼすか。

3. 研究の方法

- (1) 動脈管に対し特異的に作用する AC アイソフォームの特定

① Quantitative, Semi-quantitative Reverse Transcriptase (RT)-PCR

ウィスターラット胎仔、新生仔より動脈管および大動脈の組織をとりだし、そこから RNA を抽出、RT-PCR を行なった。AC アイソフォーム 1~9 につき胎齢 19、21、日齢 0 において PCR を行い、発現を比較検討した。

② AC アイソフォームによる cAMP 産生に関する検討

研究代表者ら研究代表者らが世界に先駆けて確立したラットの動脈管平滑筋細胞 (DASMC) 培養技術 (Yokoyama U et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006) により得た 4-6 継代目の培養細胞を用いて実験を行った。

特定の AC アイソフォームが動脈管に特異的に作用しているか否かを [³H] アデニンを用い、AC アイソフォームそれぞれの刺激薬で動脈管の平滑筋細胞を刺激し、cAMP の上昇を検討した。

- (2) それぞれの AC アイソフォームが動脈管の収縮、内膜肥厚に対しどのような作用を及ぼすか。

① 血管拡張作用の検討

胎齢 21 のラット胎仔より動脈管をリング状に切り出し、血管張力を測定する。PGE は AC の活性化を通じて動脈管に強力な血管拡張作用を及ぼす。このことより AC 刺激は動脈管において血管拡張作用を持つ事が予測される。インドメタシンにより収縮した動脈管をそれぞれの AC アイソフォーム刺激薬で刺激しその際の張力を調べることで、血管拡張能を計測する。

② ヒアルロン酸産生の測定

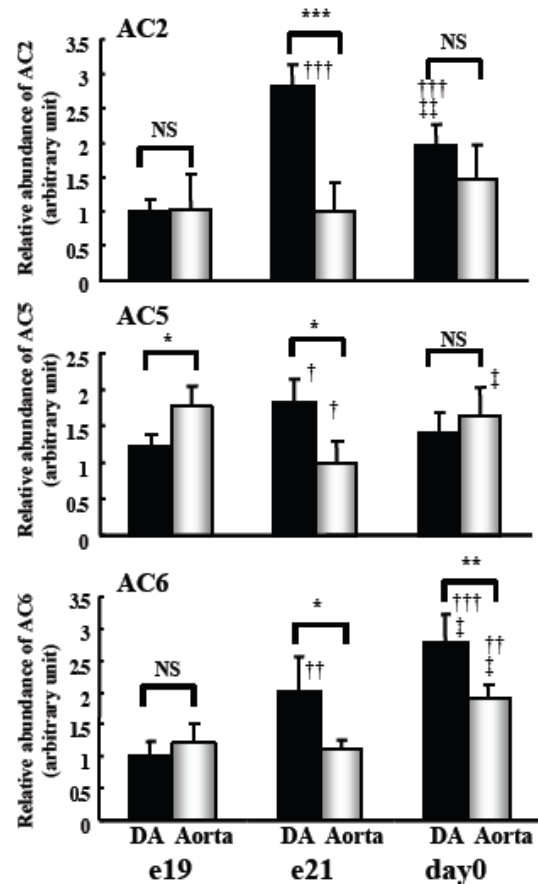
従来の基礎研究では、フィブロネクチンやヒアルロン酸などの細胞外基質の増加が内膜肥厚形成に重要である事が明らかになっている。そこで上記の動脈管培養細胞を使用し AC 2 刺激薬 (FD 1、6-[N-(2-isothiocyanatoethyl) aminocarbon 1] forskolin)、AC 5/6 刺激薬 (FD6、6-[3-(dimethylamino)propionyl] propionyl-14 15-dihydroforskolin) それぞれがヒアルロン酸合成に及ぼす影響につき PGE₁、フォルスコリン (非特異的 AC 刺激剤)、cAMP 依存性プロテインキナーゼ A (PKA) 刺激薬の作用と比較しながら検討した。ヒアルロン酸の合成能は動脈管培養細胞の培養液中の濃度を測定する。

4. 研究成果

- (1) 動脈管に対し特異的に作用する AC アイソフォームの特定

① Quantitative, Semi-quantitative Reverse Transcriptase (RT)-PCR

胎齢 21 日のラット DASMC を用いて行った PCR では大動脈に比して動脈管に AC 2、5、6 が高発現していた。胎生 19、21、出生直後で検討したところ AC 2、5 は胎生 21 で最高となり、AC 6 は成熟過程を追うに従って発現が高くなっていった (図 1)。

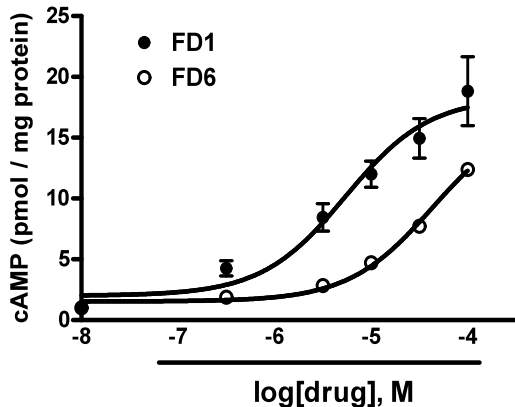


(図 1)

この結果より、ACアイソフォーム1-9のうち2、5、6に着目し以下の実験を行った。

②ACアイソフォームによるcAMP産生に関する検討

PCRでの結果を踏まえて、FD1、FD6を用いDASMCにおけるcAMPの産生を調べた。FD1、FD6ともにcAMP産生を促進した。同じ濃度での刺激で比較するとFD6に比しFD1による刺激でより多くのcAMPの産生が認められた(図2)。

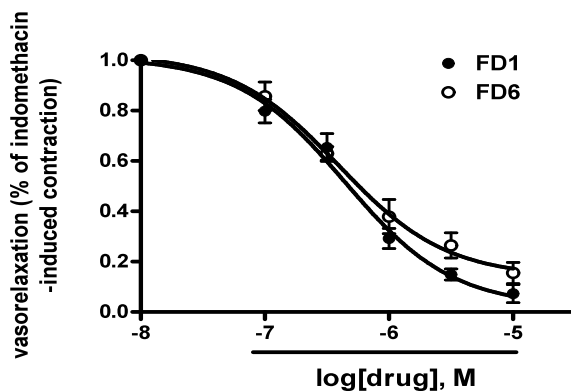


(図2)

(2)それぞれのACアイソフォームが動脈管の収縮、内膜肥厚に対しどのような作用を及ぼすか。

①血管拡張作用の検討

インドメタシンによる動脈管収縮をFD1、6ともに減弱させた(図3)

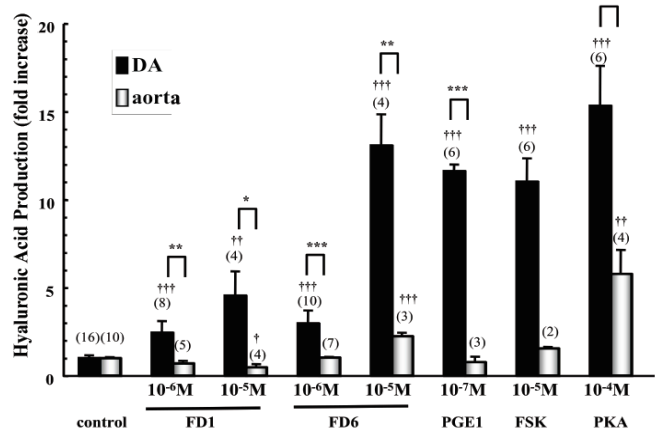


(図3)

②ヒアルロン酸産生の測定

コントロールではDASMC、大動脈平滑筋細胞におけるHA産生は有意差がなかったが、PGE₁、フォルスコリン、PKAの刺激によってDASMCにおけるHA産生は有意に上昇した。FD1およびFD6刺激によってもDASMCで

ヒアルロン酸産生が促進されたが、10⁻⁵Mの濃度でFD1に比しFD6でHA産生がより促進されていた(図4)。



(図4)

以上よりAC 5/6刺激薬(FD6)にはPGEの作用と同様に血管拡張作用とヒアルロン酸産生の作用があるが、AC2刺激薬(FD1)にはヒアルロン酸を産生刺激作用はなく血管拡張作用だけを持つ事が示唆された。

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13件)

- ① Iwasaki S, Minamisawa S, Yokoyama U, Akaike T, Hong Q, Nagashima Y, Nishimaki S, Ishikawa Y, Yokota S. Interleukin-15 inhibits smooth muscle cell proliferation and hyaluronan production in rat ductus arteriosus. *Ped Res* 62 (4): 392-8, 2007. 査読あり
- ② Yokoyama U, Sato Y, Akaike T, Ishida S, Sawada J, Nagao, T, Quan H, Jin M, Iwamoto M, Yokota S, Ishikawa Y, Minamisawa S. Maternal vitamin A alters gene profiles and structural maturation of the rat ductus arteriosus *Physiol Genomics* 31(1): 139-57, 2007. 査読あり
- ③ Ulucan C, Wang X, Baljinniyam E, Bai YZ, Okumura S, Sato M, Minamisawa S, Hirotani S, Ishikawa Y. Developmental changes in gene expression of Epac and its upregulation in myocardial hypertrophy. *J Physiol Heart Circ Physiol* 293 (3): H1662-72, 2007. 査読あり
- ④ Iwatsubo K, Suzuki S, Li C, Tsunematsu T, Nakamura F, Okumura S, Sato M, Minamisawa S, Toya Y, Umemura S, Ishikawa Y. Dopamine induces apoptosis in young, but not in neonatal, neurons via Ca²⁺-dependent signal. *Am J Physiol Cell Physiol*. 293 (5): C1498-508, 2007. 査読あり

- ⑤ 南沢享, 赤池徹, 金美花, 全紅, 焦其彬, 岩崎志穂: 成長ホルモン及びその関連因子は動脈管の血管成熟・分化を促すか?(原著論文). 成長科学協会研究年報 (0386-7617) 30号 Page229-235, 2007 査読なし
- ⑥ Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, Akaike T, Suzuki S, Jin M, Jiao Q, Watanabe M, Otsu K, Iwasaki S, Nishimaki S, Sato M, Ishikawa Y: Prostaglandin E2-activated Epac Promotes Neointimal Formation of the Rat Ductus Arteriosus by a Process Distinct from That of cAMP-dependent Protein Kinase A. J Biol Chem. 1283 (42): 28702-9, 2008. 査読あり
- ⑦ Okumura S, Tsunematsu T, Bai Y, Jiao Q, Ono S, Suzuki S, Kurotani R, Sato M, Minamisawa S, Umemura S, Ishikawa Y: Type 5 adenylyl cyclase plays a major role in stabilizing heart rate in response to microgravity induced by parabolic flight. J Appl Physiol. 105 (1): 173-9, 2008. 査読あり
- ⑧ Nishimaki S, Iwasaki S, Minamisawa S, Seki K, Yokota S: Blood flow velocities in the anterior cerebral artery and basilar artery in asphyxiated infants. J Ultrasound Med. 27 (6): 955-60, 2008. 査読あり
- ⑨ Shimura M, Minamisawa S, Takeshima H, Jiao Q, Bai Y, Umemura S, Ishikawa Y: Sarcalumenin alleviates stress-induced cardiac dysfunction by improving Ca²⁺ handling of the sarcoplasmic reticulum. Cardiovasc Res 77 (2): 362-70, 2008. 査読あり
- ⑩ Nishimaki S, Yukawa T, Makita Y, Honda H, Kikuchi N, Minamisawa S, Yokota S: Transient neonatal diabetes mellitus in extremely preterm infant. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 93(3):F240-1, 2008. 査読あり
- ⑪ Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, Akaike T, Jin M, Otsu K, Ulucan C, Wang X, Baljinyam E, Takaoka M, Sata M, Ishikawa Y: Epac1 is upregulated during neointima formation and promotes vascular smooth muscle cell migration. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 295(4):H1547-55, 2008. 査読あり
- ⑫ Misra S, Obeid LM, Hannun YA, Minamisawa S, Berger FG, Markwald RR, Toole BP, Ghatak S: Hyaluronan constitutively regulates activation of COX-2-mediated cell survival activity in intestinal epithelial and colon carcinoma cells. J Biol Chem. 283(21):14335-44, 2008. 査読あり
- ⑬ 赤池徹, 南沢享: 心筋症の分子生物学. 小児科 49 (6), 795-801, 2008. 査読なし
- ① 岩崎志穂, 西巻滋, 横田俊平: ラット胎児動脈管に対するインターロイキン15の作用. 第52回日本未熟児新生児学会(高松). Nov. 2007
- ② Minamisawa S, Yokoyama U, Akaike T, Hong Q, Segi-Nishida E, Iwasaki S, Ghatak S, Misra S, Toole BP, Sugimoto Y, Ishikawa Y. cAMP-dependent neointimal cushion formation in rat ductus arteriosus. The Capri Science Conferences "Translational Approaches to Cardiovascular Research" Meeting. Capri, Italy, Oct 14-16, 2007. (selected oral presentation)
- ③ Quan H, Yokoyama U, Watanabe M, Akaike T, Otsu K, Iwasaki S, Ishikawa Y, Minamisawa S. cAMP-dependent Intimal Cushion Formation Of the Rat Ductus Arteriosus: The Role Of Epac. The 80th annual scientific meeting of the American Heart Association, Orlando, Orange County Convention Center, 11/4-7/2007
- ④ Minamisawa S: Prostaglandin E2 in the Ductus Arteriosus: A New Role for an Old Friend. CNSI-ASMeW Joint Symposium on Nano-scale Research into Biosensors, Biomaterials, and Nanotoxicology. 2008.3.6. Los Angeles, USA
- ⑤ 南沢享: Prostaglandin E-cAMP signals promote neointimal cushion formation in the ductus arteriosus. 第85回日本生理学会大会. 2008.3.27. 東京
- ⑥ 南沢享: プロスタグランジンによる血管内膜肥厚: A new role for an old friend. 岩手医科大学先端医療研究センター公開シンポジウム「バイオイメージングと分子生物学による脳・血管解明—健康増進に向けた最先端研究」. 2008.7.19. 盛岡
- ⑦ Minamisawa S: Animal model of ductus arteriosus: A new role of prostaglandin E. 2008 Pediatric Research Workshop 'What Animal Model Can Do in Pediatric Research' by Taiwan Pediatric Association. 2008.9.13. Taipei
- ⑧ 南沢享: 構造変化から見た動脈管閉鎖機構. 第7回心臓血管発生研究会第7回心臓血管発生研究会. 2008.7.5. 郡山
- ⑨ 南沢享: Regulation of activity of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase in the failing heart. The 72th Annual Scientific meeting of the Japanese Circulation Society. 2008.3.27. 東京

[図書] (計2件)

- ① 南沢享. 動脈管の閉鎖機転: 細胞外基質の役割. 山口徹, 高本眞一, 中澤誠, 小室一成編集*Annual Review 循環器 2007. 中外医学社, pp. 33-38, 1/20/2007.

[学会発表] (計9件)

- ② 横山詩子、南沢享. 動脈管閉鎖の分子機構. 山岸敬幸、白石公編集*先天性心疾患を理解するための臨床心臓発生学. メジカルビュー社、pp. 175-179, 11/1/2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 志穂 (IWASAKI SHIHO)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号：10347338

(2) 研究分担者

南沢 享 (MINAMISAWA SUSUMU)
横浜市立大学・医学研究科・客員教授
研究者番号：40257332

(3) 連携研究者