

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32625

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08282

研究課題名(和文) 酸素による血管リモデリングを標的とした動脈管閉鎖機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms targeting oxygen-induced vascular remodeling on ductus arteriosus closure

研究代表者

赤池 徹 (Akaike, Toru)

女子栄養大学・栄養学部・教授

研究者番号：20647101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、出生後に酸素濃度の上昇により閉鎖する動脈管の分子機構を明らかにするため、胎生末期と出生後のラット動脈管及び肺小動脈の遺伝子変化をDNAマイクロアレイ法で調査した。それぞれ胎生21日と比べ、生後2日で発現が増加、または、減少した遺伝子を抽出した。動脈管では、Vegfa、Hmox1、Angptl4、Spp1、そしてItga10の発現が増加し、Afp、Adgrg6、そしてAnkrd1の発現が減少した。これらの遺伝子は、低酸素状態での血管新生、細胞増殖・遊走、細胞外基質産生に関与する遺伝子であり、今後、動脈管閉鎖にどのような作用を持つのか調査していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生後に動脈管が閉鎖しない疾患である動脈管開存症の薬物的治療は、プロスタグランジンEを治療標的とする非ステロイド性抗炎症薬のみである。しかしながら、動脈管開存症を発症しやすい早期産児や低出生体重児では、薬物治療により壊死性腸炎や腎不全などの副作用を生じやすい。そのため、非ステロイド性抗炎症薬に替わる新たな治療薬の開発が望まれている。そこで、本研究成果を基にさらなる研究を行い、動脈管の閉鎖作用をもつ遺伝子を同定し、最終的に動脈管開存症の新たな治療薬を開発することが期待される。

研究成果の概要(英文)： In this study, we performed DNA microarray on fetal rat ductus arteriosus and pulmonary arterial tissues to investigate genetic changes between before and after birth in order to clarify the molecular mechanism of oxygen-related ductus arteriosus closure after birth. We selected genes whose expression increased or decreased at 2 days after birth compared to embryonic day 21st. In the ductus arteriosus, the expression of Vegfa, Hmox1, Angptl4, Spp1, and Itga10 was especially increased, and the expression of Afp, Adgrg6, and Ankrd1 was especially decreased. These genes are involved in angiogenesis, cell proliferation/migration, and extracellular matrix production under hypoxic conditions, and we will continue to investigate their effects on ductus arteriosus closure.

研究分野：小児循環器学

キーワード：動脈管

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む哺乳動物は、母胎からの出生により劇的な酸素環境変化に曝される。新生児は、出生後の啼泣に続き、肺呼吸を開始する。呼吸の開始に伴い、血中酸素濃度が上昇し、動脈管は速やかに閉鎖する。動脈管の閉鎖機転には、血管収縮に伴う閉鎖（機能的閉鎖）と血管内腔面の閉塞に伴う閉鎖（解剖学的閉鎖）の2種類がある。この二つの閉鎖機転が働き、動脈管は恒久的に閉鎖する。したがって、動脈管の閉鎖には、機能的閉鎖だけでなく、血管内膜肥厚や弾性線維の形成不良のような血管リモデリングによる解剖学的閉鎖も重要である。そこで、動脈管が迅速に、且つ、恒久的に閉鎖するためには、酸素濃度の上昇が血管収縮だけでなく、血管リモデリングにも作用していることが推測される。しかしながら、その詳細な分子機序について、いまだ不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究では、ラット胎仔動脈管と、対照として出生後に肺呼吸開始に伴い拡張する血管であるラット胎仔肺小動脈と出生後も血管径がほとんど変化しない血管であるラット胎仔大動脈を用いて、出生直後の血中酸素濃度の上昇が、血管リモデリングを促進して動脈管を閉鎖させる分子機序を明らかにすることを最終目標とする。その目標に到達するために、最初に、出生後の動脈管閉鎖に関与する因子を探索する。そこで、出生直前と出生後の動脈管組織を用いた網羅的遺伝子解析を実施し、候補となる因子を抽出すること、そして、それらの因子が動脈管の閉鎖に関与するのか明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

妊娠ラットをイソフルレン吸入麻酔下で帝王切開し、在胎 21 日の胎仔を摘出した。肺呼吸が開始される前に、胎仔を断頭により安楽死させ、速やかに動脈管及び肺小動脈を摘出した。また、動脈管が閉鎖した生後 2 日目の新生仔から動脈管及び肺小動脈を摘出した。その後、それぞれの組織を回収し、RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ法により、網羅的遺伝子発現解析を行った。

次に、上記と同様の手技により、妊娠ラットより在胎 19 及び 21 日の胎仔を摘出した。肺呼吸が開始される前に、胎仔を断頭により安楽死させ、速やかに動脈管、肺小動脈、そして大動脈を摘出した。また、動脈管が閉鎖した生後 2 日目の新生仔から動脈管、肺小動脈、そして大動脈を摘出した。その後、それぞれの組織から RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いて目的遺伝子の mRNA 量を測定した。

## 4. 研究成果

胎生 21 日と生後 2 日の動脈管及び肺小動脈を用いた DNA マイクロアレイ法により得られた結果から、動脈管及び肺小動脈において、胎生 21 日と比べ生後 2 日で発現量が 2.0 倍以上に増加・減少した遺伝子を抽出した。

ラット動脈管で発現量が増加・減少した遺伝子のうち上位 10 遺伝子は図 1 のとおりである。*Vegfa*、*Hmox1*、*Angptl4*、*Spp1*、そして *Itga10* などが、発現が増加した主な遺伝子である。*Vegfa*、*Hmox1*、そして *Angptl4* は、低酸素状態における血管新生の促進に関連する因子である。また、*Vegfa*、*Spp1*、そして *Itga10* は、細胞遊走に関わる細胞接着関連因子であり、細胞増殖に関連する PI3K-Akt signal 伝達に関連する因子である。出生後における動脈管の解剖学的閉鎖には、細胞増殖、細胞遊走、弾性線維低形成などの分子機序が作用し、動脈管内膜の肥厚が促進し、動脈管内腔が狭窄・閉塞することが明らかになっている。これらの機序には、prostaglandin E<sub>2</sub> が重要な役割を持ち、これらの遺伝子と prostaglandin E<sub>2</sub> との相互関係を今後検討していく。*Afp*、*Adgrg6*、そして *Ankrd1* などが、発現が減少した主な遺伝子である。*Afp* や *Adgrg6* は細胞外基質に局在し、*Ankrd1* は核に局在して低酸素に反応する遺伝子である。酸素感受性の高く、出生後ヒアルロン酸という細胞外基質の分泌を促進する動脈管において、これら遺伝子の作用について今後検討していく。

ラット肺小動脈で発現量が増加・減少した遺伝子のうち上位 10 遺伝子は図 2 のとおりである。*Angptl4*、*Afp*、そして *LOC680415* は、動脈管と同様の発現変化を示した。しかしながら、出生後に動脈管は狭窄・閉鎖し、肺小動脈は拡張するという正反対の機能的・構造的変化を示す。そこで、出生後に動脈管で増加（減少）し、肺小動脈で減少（増加）する遺伝子を抽出した。抽出された 40 遺伝子のうち、これまでの研究から血管リモデリングに関わりのある遺伝子を 4 つ選択し、胎生 19 日の動脈管及び肺小動脈、また血管の変化に乏しい大動脈を含めてリアルタイム PCR で mRNA 発現量を測定した。*Sfrp4*、*Epyc*、そして *Car8* は、出生後に動脈管で発現が

減少し、肺小動脈で発現が増加した。また、*Fos* は、出生後に動脈管で発現が増加し、肺小動脈で発現が減少した(図3)。*Srfp4* は、細胞外基質に局在し、細胞の分化や増殖、また、細胞死に関連する JNK signal 伝達に関連する因子である。また、*Fos* は、細胞の分化や増殖に関わる転写因子として作用する。これらの遺伝子が、出生後の動脈管の細胞増殖に関与するのか今後検討していく。また、*Epyc* は、細胞外基質の産生に関わる線維化関連因子であり、動脈管におけるヒアルロン酸との関連について検討していく。

本研究で、出生後の動脈管閉鎖に関与しうる候補遺伝子が同定された。これら遺伝子が、動脈管平滑筋細胞を用いた細胞レベルの実験でどのような作用を持つのか検討し、さらに、*in vivo* でも機能的・形態的にどのような変化をもたらすのか検討していく必要がある。

Gene_Symbol	GeneName	ratio
<i>Hmox1</i>	heme oxygenase 1	22.32
<i>Ano1</i>	anoctamin 1, calcium activated chloride channel	22.31
<i>LOC100912446</i>	uncharacterized LOC100912446	19.05
<i>Spp1</i>	secreted phosphoprotein 1	18.02
<i>Itga10</i>	integrin, alpha 10	16.19
<i>Hdac9</i>	histone deacetylase 9	15.10
<i>Angptl4</i>	angiopoietin-like 4	14.30
<i>Akr1b8</i>	aldo-keto reductase family 1, member B8	13.37
<i>Ank3</i>	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)	11.83
<i>Vegfa</i>	vascular endothelial growth factor A	11.77
<i>LOC102546539</i>	uncharacterized LOC102546539	-17.73
<i>Afp</i>	alpha-fetoprotein	-14.59
<i>LOC102547522</i>	uncharacterized LOC102547522	-14.37
<i>Adgrg6</i>	adhesion G protein-coupled receptor G6	-14.13
<i>Ankrd1</i>	ankyrin repeat domain 1	-12.06
<i>LOC691485</i>	hypothetical protein LOC691485	-11.71
<i>Myh3</i>	myosin, heavy chain 3, skeletal muscle, embryonic	-11.65
<i>LOC680415</i>	similar to pappalysin 2 isoform 1	-11.36
<i>Map2</i>	microtubule-associated protein 2	-9.92
<i>Nuf2</i>	NUF2, NDC80 kinetochore complex component	-9.86

図1 胎生21日の動脈管と比べ生後2日の動脈管で発現量が変化した遺伝子

Gene_Symbol	GeneName	ratio
<i>Angptl4</i>	angiopoietin-like 4	15.39
<i>Cldn19</i>	claudin 19	10.59
<i>Esm1</i>	endothelial cell-specific molecule 1	10.38
<i>Pthlh</i>	parathyroid hormone-like hormone	7.12
<i>Hmgcs2</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (mitochondrial)	6.13
<i>LOC100911813</i>	sperm motility kinase X-like	6.08
<i>Ccl2</i>	chemokine (C-C motif) ligand 2	5.63
<i>Trpv4</i>	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4	5.51
<i>Plac8</i>	placenta-specific 8	4.59
<i>Npy</i>	neuropeptide Y	4.35
<i>Scd1</i>	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	-6.24
<i>Afp</i>	alpha-fetoprotein	-5.47
<i>Ckm</i>	creatine kinase, muscle	-4.64
<i>Fosb</i>	FBJ osteosarcoma oncogene B	-4.58
<i>Fcnb</i>	ficolin B	-4.48
<i>Xirp1</i>	xin actin-binding repeat containing 1	-4.13
<i>Synpo2l</i>	synaptopodin 2-like	-3.80
<i>Cdkn1c</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C	-3.78
<i>G0s2</i>	G0/G1switch 2	-3.64
<i>LOC680415</i>	similar to pappalysin 2 isoform 1	-3.50

図2 胎生21日の肺小動脈と比べ生後2日の肺小動脈で発現量が変化した遺伝子

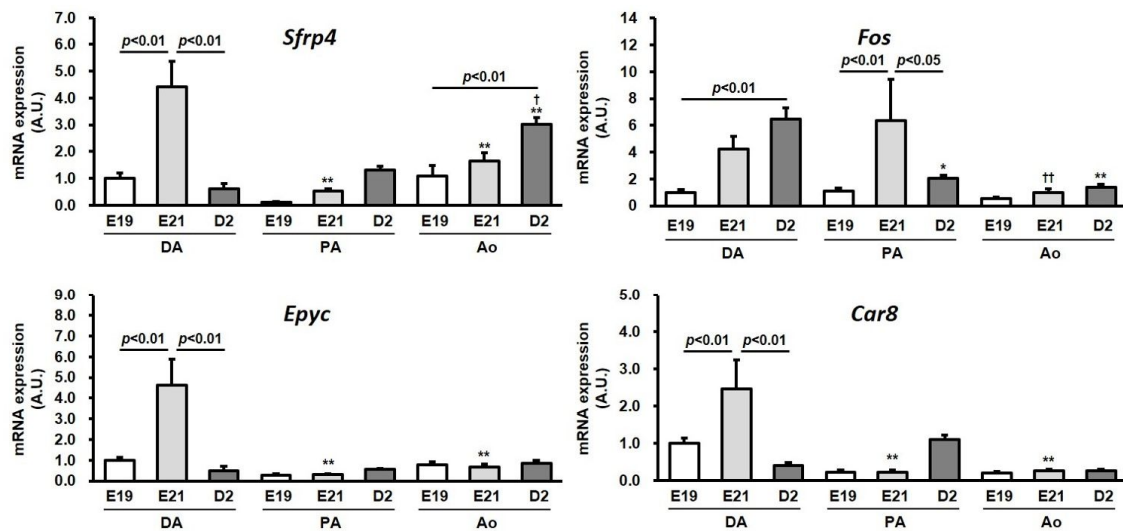


図3 出生前後の動脈管で発現量が変化した遺伝子

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Akaike Toru, Shinjo Satoko, Ohmori Eriko, Kajimura Ichige, Goda Nobuhito, Minamisawa Susumu	4. 巻 14
2. 論文標題 Transcriptional profiles in the chicken ductus arteriosus during hatching	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0214139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0214139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kishibuchi Ayana, Akaike Toru, Minamisawa Susumu	4. 巻 61
2. 論文標題 Standard-dose gentamicin does not increase risk of patent ductus arteriosus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatrics & Neonatology	6. 最初と最後の頁 45 ~ 50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pedneo.2019.05.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Iwaki Ryuma, Matsuhisa Hironori, Minamisawa Susumu, Akaike Toru, Hoshino Masato, Yagi Naoto, Morita Kiyozo, Shinohara Gen, Kaneko Yukihiro, Yoshitake Shuichi, Takahashi Masashi, Tsukube Takuro, Oshima Yoshihiro	4. 巻 110
2. 論文標題 Effect of Long-term Administration of Prostaglandin E1 on Morphologic Changes in Ductus Arteriosus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Annals of Thoracic Surgery	6. 最初と最後の頁 2088 ~ 2095
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.athoracsur.2020.02.053	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kuga Kazuhiro, Kusakari Yoichiro, Uesugi Ken, Semba Kentaro, Urashima Takashi, Akaike Toru, Minamisawa Susumu	4. 巻 15
2. 論文標題 Fibrosis growth factor 23 is a promoting factor for cardiac fibrosis in the presence of transforming growth factor- 1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0231905
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0231905	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Yuki, Kusakari Yoichiro, Akaoka Munetoshi, Watanabe Masato, Tanihata Jun, Nishioka Naritomo, Bochimoto Hiroki, Akaike Toru, Tachibana Toshiaki, Minamisawa Susumu	4. 巻 130
2. 論文標題 Thiamine treatment preserves cardiac function against ischemia injury via maintaining mitochondrial size and ATP levels	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Applied Physiology	6. 最初と最後の頁 26 ~ 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/jappphysiol.00578.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iwaki Ryuma, Matsuhisa Hironori, Minamisawa Susumu, Akaike Toru, Hoshino Masato, Yagi Naoto, Morita Kiyozo, Shinohara Gen, Kaneko Yukihiro, Yoshitake Syuichi, Takahashi Masashi, Tsukube Takuro, Oshima Yoshihiro	4. 巻 42
2. 論文標題 Evaluation of Ductal Tissue in Coarctation of the Aorta Using X-Ray Phase-Contrast Tomography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatric Cardiology	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) 10.1007/s00246-020-02526-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Akaike T, Minamisawa S.
2. 発表標題 A Sarcoplasmic Reticulum-Localized Protein Phosphatase Regulates Phospholamban Phosphorylation and Promotes Ischemia Reperfusion Injury in the Heart.
3. 学会等名 The 97th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横田 昂子、赤池 徹、南沢 享.
2. 発表標題 酸素感受性に寄与する候補遺伝子群がラット動脈管と肺小動脈から同定された.
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横田 昂子、赤池 徹、南沢 享.
2. 発表標題 酸素感受性に寄与する候補遺伝子群がラット動脈管と肺小動脈から同定された.
3. 学会等名 第137回成医学会総会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横田 昂子、赤池 徹、南沢 享.
2. 発表標題 転写因子Nr4a1はヒアルロン酸産生の制御を介して動脈管の解剖学的閉鎖に寄与している可能性が示唆された.
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yokota T, Akaike T, Minamisawa S.
2. 発表標題 Nr4a1 is Identified as an Oxygen-sensitive Gene in the Ductus Arteriosus.
3. 学会等名 Experimental Biology 2021. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横田 昂子、赤池 徹、南沢 享.
2. 発表標題 転写因子Nr4a1は酸素応答性に発現が増加し、ラット動脈管の解剖学的閉鎖を促進する可能性がある.
3. 学会等名 第57回日本小児循環器学会総会・学術総会.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤池 徹、横田昂子、南沢 享.
2. 発表標題 Nr4a1はラット動脈管においてプロスタグランジンE1が誘発する内膜肥厚を抑制した.
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会.
4. 発表年 2022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
研究分担者	南沢 享  (Minamisawa Susumu)  (40257332)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授    (32651)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------