

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16861

研究課題名（和文）糖タンパク質Fibulin-1に焦点を当てた動脈管閉鎖機構の解明

研究課題名（英文）The role of fibulin-1 in intimal thickening of the ductus arteriosus

研究代表者

伊藤 智子 (Ito, Satoko)

東京医科大学・医学部・客員研究員

研究者番号：80784652

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）：未熟児動脈管開存症を発症すると新生児は循環不全から命を落とすことがある。動脈管の閉鎖には、血管内腔側の内膜が出生時に十分に肥厚していることが重要である。この内膜肥厚を誘導する有力な候補遺伝子としてフィブリン1を同定した。フィブリン1は、動脈管の平滑筋細胞において胎盤由来ホルモンであるプロスタグランジンEにより誘導されるタンパクであるが、プロスタグランジンE受容体であるEP4の刺激で著明に増加した。このフィブリン1が中心的な役割を果たし、バーシカンという細胞遊走を促すタンパクと共に働くことで内膜肥厚が血管内腔に向けて形成されてくるという機序が今回初めて明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈管閉鎖は動脈管収縮と内膜肥厚よりなるが、未熟児動脈管開存症の内科的治療は、この40年間、血管収縮を促す作用のあるシクロオキシゲナーゼのみである。超未熟児ではシクロオキシゲナーゼ阻害薬への抵抗例が30%と極めて多く、循環不全で命を落とす症例が多い。近年本邦でも他の先進諸国と同様、未熟児の出生率は約10%と増加し、動脈管開存症に対する新たな治療法の開発は急務である。本研究により動脈管内膜肥厚形成に重要な役割を果たす分子としてフィブリン1が同定された。フィブリン1の誘導により、非侵襲的な新規薬物治療が可能となる。本研究の成果は未熟児の生命予後、発達予後の改善に大きく貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Patent ductus arteriosus (PDA) induces neonatal heart failure. Premature infants with PDA shows poor prognosis. Intimal thickening (IT) is essential for the DA closure. I identified Fbln1 as a candidate gene for IT. I demonstrated that fibulin-1 is induced via prostaglandinE-EP4receptor signaling pathway in DA smooth muscle cells (SMCs). Fibulin-1 plays a role in integration of multiple extracellular matrices (ECM). Among Fbln1-binding ECM, versican was known to promote cell migration. Therefore, I hypothesized that fibulin-1-versican complex may induce DA IT. In this study, I demonstrated the molecular mechanism by which induces fibulin-1 expression in DASMCs, and the role of fibulin-1-versican complex in DASMC migration and IT of the DA.

研究分野：新生児学

キーワード：動脈管 内膜肥厚 フィブリン1 バーシカン ヒアルロン酸

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

早産児は出生後に動脈管の自然閉鎖が遅延し、動脈管開存症を発症しやすい<sup>(1)</sup>。未熟児動脈管開存症は、慢性肺疾患、壊死性腸炎、未熟児網膜症、神経発達遅滞の発症と強く関連することが報告されており<sup>(2) - (5)</sup>、早産児の予後に重大な影響を与える。体重 1000g 未満の超低出生体重児の動脈管開存率は 70%を超えている<sup>(6)</sup>。これまで、未熟児動脈管開存症の治療はプロスタグランジン E (PGE<sub>2</sub>) 合成阻害剤が第一選択とされてきた。早産児は、動脈管の開存性が PGE<sub>2</sub> 濃度に強く依存しており<sup>(7)</sup>、副作用が許容範囲内で、使用方法がすでに確立しているからである<sup>(8)</sup>。しかし、超低出生体重児においては、約 30%が治療抵抗性を示す<sup>(2)</sup>。動脈管は、中膜を構成する血管平滑筋の収縮に加え、内膜肥厚が生じることで解剖学的閉鎖に至る。内膜肥厚は、胎生中期から胎盤由来の PGE<sub>2</sub> によって徐々に形成される<sup>(9)</sup>。これは、PGE<sub>2</sub> が胎内では胎児循環の維持に必要な動脈管の開存を維持する一方で、出生後には新生児循環への適応が速やかになされるよう、内膜肥厚による血管の狭小化を進めているということである。早産児では出生時にはまだ内膜肥厚形成が十分でないため、動脈管が解剖学的閉鎖に至らない。動脈管内膜肥厚の分子機序解明は動脈管の開存・閉鎖の制御に重要であると考えられる。

### 2. 研究の目的

PGE<sub>2</sub> によって支配され、動脈管の内膜肥厚に最も関与する分子を同定するために、先行研究として、ラット動脈管平滑筋細胞を用いて網羅的遺伝子解析を行った。その結果、有力な候補遺伝子としてフィブリン 1 (Fbln1) を同定した。Fbln1 は、PGE<sub>2</sub> 受容体の一つである EP4 アゴニストの刺激によって最も増加した (28.2 倍)。フィブリン 1 自体は細胞外基質であるが、種々の細胞外基質を統合して機能的に働かせる役割を担う<sup>(10)</sup>。フィブリン 1 と共役して働く細胞外器質の一つとして、パーシカンが知られているが、このパーシカンは、細胞遊走を引き起こす分子として動脈のリモデリングに関与することで知られている。研究代表者は、フィブリン 1 が中心的役割を果たしながら、パーシカンと共役して動脈管内膜肥厚を形成する分子機序について明らかにすること、最終的には、このフィブリン 1 により動脈管内膜肥厚の誘導が可能であるかを検討することを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) フィブリン 1 産生の分子機序 (in vitro)

網羅的遺伝子解析により得られたデータをもとに、初代培養によって得られたラット胎児動脈管平滑筋細胞を用いて、EP4 受容体刺激によって、フィブリン 1 の発現が mRNA レベル、蛋白レベルで増加しているのかどうかについて、定量的 PCR とウエスタンブロッティングで検討した。フィブリン 1 は分泌蛋白であるため、蛋白の解析には細胞上清を用いた。

#### (2) フィブリン 1 産生経路の解明 (in vitro)

PGE<sub>2</sub>-EP4 シグナルの下流におけるフィブリン 1 産生シグナルを、EP4 受容体を刺激処理したラット胎児動脈管平滑筋細胞に PLC、PKC、NF- $\kappa$ B 他各種インヒビターや cAMP アナログを添加後に定量的 PCR とウエスタンブロッティングで検討した。

#### (3) 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 で、ラット動脈管平滑筋細胞を内皮細胞と平滑筋細胞に分別した。FACS には、CD31 と CD45 抗体を用い、CD31<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>の細胞を内皮細胞として分別した。定量的 PCR により、フィブリン 1 とパーシカンがそれぞれ内皮細胞に由来するのか、平滑筋細胞に由来するのかを解析した。また、EP4<sup>-/-</sup>マウス新生児動脈管の蛍光免疫染色を行い、フィブリン 1 とパーシカンの動脈管組織内での局在を検討した。

#### (4) 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検討した。共培養には、シリコン製インサートを用いた。FACS ではラット動脈管内皮細胞を細胞遊走実験使用可能な十分量確保できないため、パーシカンを発現している EA.hy926 細胞 (ヒト不死化内皮細胞) を実験に用いた。内皮細胞、EP4 アゴニストで刺激処理した平滑筋細胞に対し、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、各々の分子が、平滑筋細胞の内皮方向への方向性をもった遊走に対して関与するのかについて検討した。細胞遊走は 96 時間観察し、スクラッチアッセイと同様に細胞遊走面積をマニュアルで計測した。また、レスキュー実験としてフィブリン 1 を標的とした siRNA を用いて遺伝子を抑制した平滑筋細胞にフィブリン 1 のリコンビナント蛋白をフィブリン 1 のリコンビナント蛋白を添加して、細胞遊走の程度が回復するかどうかについても検討した。

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

実際に、フィブリン 1 が内膜肥厚に関与するかどうかについて、EP4<sup>-/-</sup>マウスを用いて検討した。

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。また、EP4<sup>-/-</sup>マウス動脈管組織をフィブリン 1 のリコンビナント蛋白を添加して培養し、内膜肥厚形成が促進されるかを検討した。

#### (6) フィブリン 1 の動脈管開存症発症への関与の検討 (in vivo)

フィブリン 1 欠損マウス(Fbln1<sup>-/-</sup>)の動脈管を弾性線維染色およびフィブリン 1 に対する免疫染色を行って観察し、フィブリン 1 が動脈管開存症発症に関与するかどうかを検討した。

#### (7) パーシカン-ヒアルロン酸複合体の動脈管開存症発症への関与の検討 (in vivo)

ヒアルロン酸が動脈管内膜肥厚を促進すること<sup>(11)</sup>、パーシカンは N 末端の G1 ドメインでヒアルロン酸と結合する<sup>(12)</sup>ことから、パーシカンのヒアルロン酸結合部位欠損マウス(VCAN<sup>3/3</sup>)の動脈管を弾性線維染色およびパーシカンの免疫染色を行って組織観察し、パーシカン-ヒアルロン酸複合体が動脈管開存症発症にどの程度関与するかを検討した。

#### (8) ヒト動脈管内膜肥厚部位でのフィブリン 1 とパーシカンの発現の局在性の検討 (in vivo)

ヒト動脈管平滑筋細胞及び組織を用い定量的 PCR と免疫染色を行い、フィブリン 1 とパーシカンの発現の局在性について検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) フィブリン 1 産生の分子機序 (in vitro)

定量的 PCR の結果、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 倍増加した (n=6-10, p<0.001)。一方で、ラット大動脈平滑筋細胞では増加は約 4 倍とわずかであった。ウエスタンブロッティングでは、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。また、PGE<sub>2</sub> には、EP1-EP4 の 4 種の受容体が同定されているが、EP4 以外の受容体刺激では発現が増加しなかった。以上の結果より、フィブリン 1 の発現は、動脈管平滑筋細胞特異的に、PGE<sub>2</sub>-EP4 シグナルを介して制御されていることが明らかになった。

#### (2) フィブリン 1 産生経路の解明 (in vitro)

ヒアルロン酸は cAMP-PKA 経路を介して増殖する<sup>(11)</sup>が、フィブリン 1 mRNA の産生および蛋白の産生は PLC、PKC、NF- $\kappa$ B インヒビターによって有意に抑制された (n=5, p<0.01; n=5-8, p<0.01)。cAMP アナログを添加してもフィブリン 1 mRNA の産生は増加しなかった。これにより、フィブリン 1 は、後に図 7 で示すように、ヒアルロン酸とは別の、PLC-PKC-NF- $\kappa$ B 経路を介することが明らかになった。さらに NF- $\kappa$ B 経路には、古典経路と非古典経路があり、それぞれ I $\kappa$ B、p100 の分解に引き続いて核内移行し遺伝子の転写促進が生じることが分かっている<sup>(13)</sup>。EP4 受容体を刺激処理したラット胎児動脈管平滑筋細胞において、p100 の発現は有意に減少したが (n=5, p<0.05)、I $\kappa$ B の発現量は不変であったことから、NF- $\kappa$ B を介するフィブリン 1 産生は比較的稀な非古典経路を介することが明らかになった。

#### (3) 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でも、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局在していた。EP4<sup>-/-</sup>マウスにおいて、パーシカンの発現は内皮細胞に一致した部位に局在していた (図 1)。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。

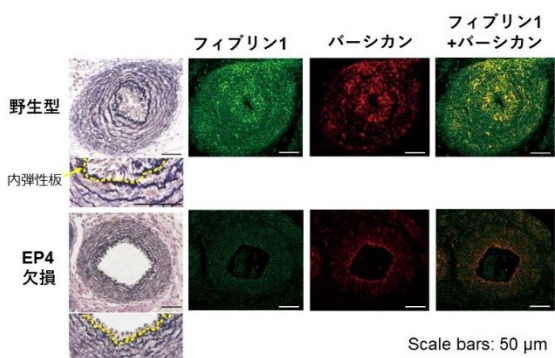


図 1. マウス新生児動脈管におけるフィブリン 1 とパーシカンの局在。

#### (4) 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。siRNA によってフィブリン 1 を抑制した後にフィブリン 1 のリコンビナント蛋白質を加えると、平滑筋細胞の内皮方向への細胞遊走はレスキューされた (n=6-12, p<0.01) (図 2)。以上の結果より、動脈管平滑

筋細胞の内皮方向への一方向性の細胞遊走には、フィブリン1とパーシカンという、由来細胞の異なる2種類の細胞外基質が関与することが示唆された。

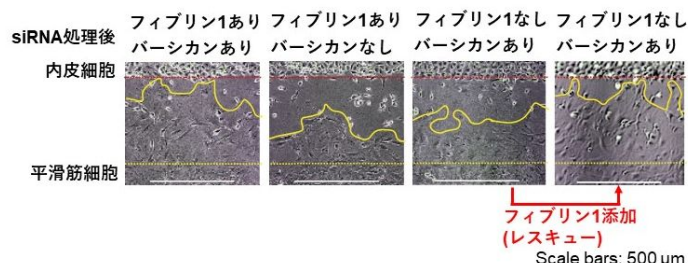


図2. 内皮方向への平滑筋細胞遊走にフィブリン1とパーシカンが重要.

(5) フィブリン1の動脈管内膜肥厚作用の検討 (in vivo)

図1の通り、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。また、内膜肥厚部と中膜平滑筋細胞層にフィブリン1が発現していたが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。結果より、フィブリン1が動脈管内膜肥厚に関与する可能性が示唆された。PDAの表現型を示すEP4欠損マウス新生児の動脈管組織にフィブリン1蛋白を添加培養したところ、内膜肥厚が増加することが示された(図3)。

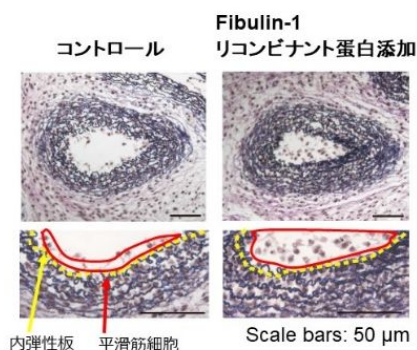


図3. フィブリン1は動脈管内膜肥厚を促進する.

(6) フィブリン1の動脈管開存症発症への関与の検討 (in vivo)

野生型では4/4匹全例の動脈管が閉鎖したが、フィブリン1欠損マウスは7/7匹が動脈管開存症の表現型を示し、さらに内膜肥厚も抑制されていた(n=4-7, p<0.01)(図4)。

(7) パーシカン-ヒアルロン酸複合体の動脈管開存症発症への関与の検討 (in vivo)

フィブリン1とパーシカンは内膜肥厚部位に共局在していたが、動脈管の閉鎖は変異マウスの6/9匹のみで、パーシカン-ヒアルロン酸複合体の動脈管開存症発症への関与が示唆された(図5)。

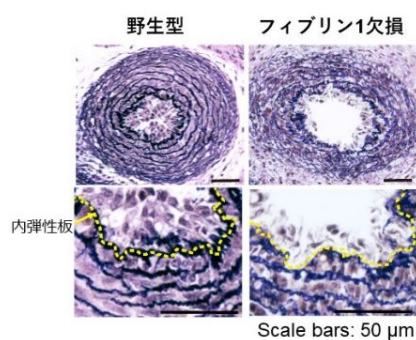


図4. フィブリン1欠損マウスは全例が動脈管開存症となる.

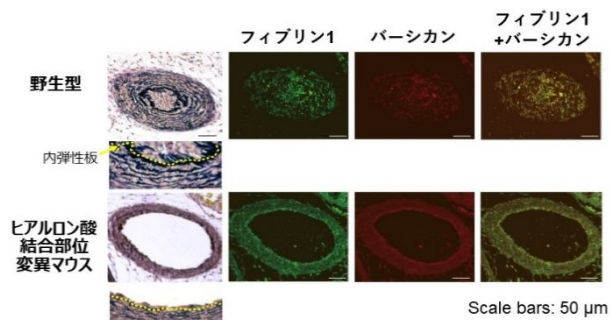


図5. ヒアルロン酸も動脈管開存症の発症に関与.

(8) ヒト動脈管内膜肥厚部位でのフィブリン1とパーシカンの発現の局在性の検討 (in vivo)

ヒト動脈管平滑筋細胞でもEP4刺激でフィブリン1 mRNAは有意に増加した(n=7, p<0.05)。EP4とフィブリン1 mRNAは中膜と内膜肥厚部に同程度に発現していたが、パーシカン mRNAは内皮を含む内膜肥厚部に有意に高発現していた(n=6, p<0.05)。免疫染色でも同様の発現が確認された(図6)。

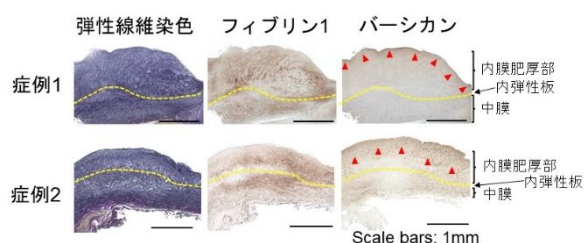


図6. ヒト動脈管組織でのフィブリンとパーシカンの局在.

以上に述べた研究成果から、PGE<sub>2</sub>-EP4 シグナルによって動脈管平滑筋内で PLC-PKC-非古典的 NF B 経路を介してフィブリン 1 が誘導され、フィブリン 1 が中心的な役割を果たしながら、ヒアルロン酸やパーシカンと共役して平滑筋細胞を内皮方向に一方方向性に遊走させ、内皮細胞と平滑筋細胞の間のスペースに秩序だった内膜肥厚という構造を形成する機序が示された(図 7)。

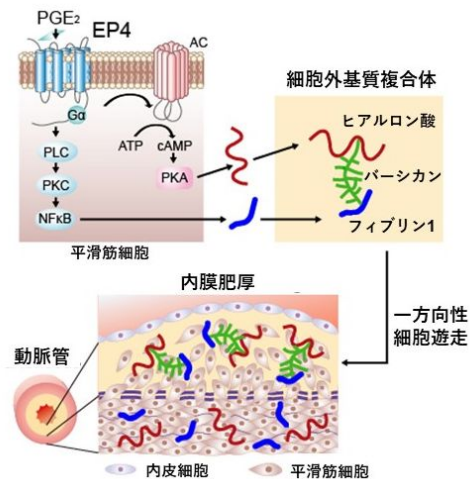


図 7. フィブリン 1-パーシカン-ヒアルロン酸複合体による内膜肥厚形成機序.

<引用文献>

- (1) Reller MD, Rice MJ, McDonald RW, Sato S. Review of studies evaluating ductal patency in the premature infant. *J Pediatr.* 122: S59-S62, 1993.
- (2) Rheinlaender C, Helfenstein D, Pess C, Welch E, Czerink C, Obladen M, Koehne P. Neurodevelopmental outcome after COX inhibitor treatment for patent ductus arteriosus. *Early Hum Dev.* 86: 87-92, 2010.
- (3) Tauzin L, Joubert C, Noel AC, Bouissou A, Molies ME. Effect of persistent patent ductus arteriosus on mortality and morbidity in very-low birthweight infants. *Acta paediatr.* 101: 419-423, 2012.
- (4) Wickremasinghe AC, Rogers EE, Piecuch RE, Johnson BC, Golden S, Moon-Grady AJ, Clyman RI. Neurodevelopmental outcomes following two different treatment approaches (early ligation and selective ligation) for patent ductus arteriosus. *J Pediatr.* 161: 1065-1072, 2012.
- (5) Janz-Robinson EM, Badawi N, Walker K, Bajuk B, Abdel-Latif ME. Neurodevelopmental outcomes of premature infants treated for patent ductus arteriosus: a population-based cohort study. *J Pediatr.* 167: 1025-1032, 2015.
- (6) Adrouche-Amrani L, Green RS, Gluck KM, Lin J. Failure of a repeat course of cyclooxygenase inhibitor to close a PDA is a risk factor for developing chronic lung disease in ELBW infants. *BMC Pediatr.* 12:10, 2012.
- (7) Smith GCS. The pharmacology of the ductus arteriosus. *Pharmacological Reviews.* 50: 35-58, 1998.
- (8) Oncel MY, Erdeve O. Safety of therapeutics used in management of patent ductus arteriosus in preterm infants. *Cur Drug Saf.* 10: 106-112, 2015.
- (9) Yokoyama U. Prostaglandin E-mediated molecular mechanisms driving remodeling of the ductus arteriosus. *Pediatrics International: official journal of the Japan pediatric society.* 57: 820-827, 2015.
- (10) Argraves WS, Greene LM, Cooley MA, Gallanagher WM. Fibulins: physiological and disease perspectives. *EMBO Rep.* 67: 245-65, 2014.
- (11) Yokoyama U, Minamisawa S, Katayama A, Tang T, Suzuki S, Iwatsubo K, et al. Differential regulation of vascular tone and remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus. *Circ Res.* 106(12): 1882-92, 2010.
- (12) LeBaron RG, Zimmermann DR, Ruoslahti E. Hyaluronate binding properties of versican. *The Journal of biological chemistry.* 267(14): 10003-10, 1992.
- (13) Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes & development.* 18(18): 2195-224, 2004.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ito Satoko, Yokoyama Utako	4. 巻 156
2. 論文標題 A new therapeutic target for patent ductus arteriosus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Folia Pharmacologica Japonica	6. 最初と最後の頁 359 ~ 363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.21061	査読の有無 無
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 Satoko Ito, Utako Yokoyama, Taichi Nakakoji, Marion A Cooley, Takako Sasaki, Sonoko HAtano, Yuko Kato, Junichi Saito, Naoki Nicho, Shiho Iwasaki, Masanari Umemura, Takayuki Fujita, Munetaka Masuda, Toshihide Asou, Yoshihiro Ishikawa	4. 巻 40(9)
2. 論文標題 Fibulin-1 integrates subendothelial extracellular matrices and contributes to anatomical closure of the ductus arteriosus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arterioscler Thromb Vasc Biol.	6. 最初と最後の頁 2212-2226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/ATVBAHA.120.314729.	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Utako Yokoyama and Satoko Ito
2. 発表標題 Dynamic cardiovascular remodeling to adapt to extrauterine life
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤智子、横山詩子、中川路太一、斎藤純一、二町尚樹、益田宗孝、麻生俊英、石川義弘
2. 発表標題 Fibulin-1は内膜肥厚部で細胞外基質を統合し、動脈管の解剖学的閉鎖を促進する
3. 学会等名 第56回日本小児循環器学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤智子、横山詩子、中川路太一、加藤優子、斎藤純一、二町尚樹、益田宗孝、麻生俊英、石川義弘
2. 発表標題 Fibulin-1は内皮下で細胞外基質を統合し、動脈管を出生後の解剖学的閉鎖に導く.
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------