

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：22701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07107

研究課題名(和文) 組織型プラスミノゲン活性化因子に着目した動脈管の内膜肥厚形成のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of the intimal thickening formation of ductus arteriosus focused on tissue-type plasminogen activator

研究代表者

齋藤 純一 (Saito, Junichi)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：30779301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：動脈管が解剖学的に閉鎖するには、血管収縮による機能的閉鎖だけでなく、胎児期から始まる血管リモデリング(内膜肥厚形成)が必要である。内膜肥厚形成の初期段階として内弾性板の断裂が知られているが、その機序はこれまで不明であった。本研究により、動脈管の内皮細胞で高発現する組織型プラスミノゲン活性化因子が、マトリックスメタロプロテアーゼの活性化を介して、内弾性板を断裂させ、内膜肥厚形成を促進することが示唆された。早産児では血中プラスミノゲン濃度が生理的に低いため、プラスミノゲンを補充することで、動脈管の内膜肥厚形成を促進し、動脈管閉鎖を促すことが出来る可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In addition to smooth muscle contraction, the ductal tissue remodeling, such as intimal thickening (IT) formation, is necessary for complete anatomical closure of the ductus arteriosus (DA). Although disruption of the internal elastic lamina (IEL) is the early process of the DA remodeling, the molecular mechanisms have not been fully investigated. This study revealed that tissue-type plasminogen activator (t-PA) was highly expressed in the endothelial cells of the DA and that it promoted the plasmin-induced activation of matrix metalloproteinase and the subsequent disruption of the IEL, which may contribute to IT formation in the DA. In human preterm infants, serum plasminogen levels are physiologically lower than those in adults. Plasminogen supplementation may promote the IT formation and subsequent closure of the DA.

研究分野：新生児

キーワード：動脈管 内膜肥厚 内弾性板 組織型プラスミノゲン活性化因子 プラスミノゲン マトリックスメタロプロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

動脈管とは、大動脈と肺動脈の間に存在し、胎児が生存するためには開存が必要な血管である。通常は、出生直後の肺呼吸の開始とともに血管収縮（機能的閉鎖）が起こり、続いて解剖学的閉鎖に至る。しかし、早産児ではしばしば出生後も開存したまま（動脈管開存症）になり、心不全や肺出血、脳室内出血、壊死性腸炎などの重大な合併症を起し、生命予後が悪化する。現在、動脈管開存症に対する治療薬は、血管収縮を目的としたシクロオキシゲナーゼ阻害薬のみであるが、腎機能障害や消化管穿孔などの重篤な副作用が報告されていることや、半数近くの児では効果不十分のために外科治療が行われる。そのため、動脈管開存症に対する新たな治療薬の開発が望まれている。

近年、動脈管が解剖学的に閉鎖するためには、血管収縮による機能的閉鎖だけでなく、胎生中期から始まる血管リモデリング（内膜肥厚形成）が重要であることが明らかとなった(Yokoyama U et al., *Circulation*. 2014; *Circ. Res.* 2008; *J Clin Invest.* 2006 他)。胎児は胎内で高濃度のプロスタグランジン E(PGE)にさらされながら、動脈管を拡張させつつ、生後の閉鎖に向けた準備として動脈管の内膜肥厚を形成している。動脈管の内膜肥厚は、内弾性板の断裂と中膜の平滑筋細胞の血管腔側への遊走によって形成されるが、内弾性板断裂の機序は明らかとなっていない。

研究代表者は、先行研究でヒト動脈管に対する網羅的遺伝子解析を行い、内膜肥厚部に組織型プラスミノゲン活性化因子 (t-PA) が高発現していることを見出した。t-PA には血栓溶解作用の他に、弾性線維分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) を活性化する作用が報告されている。このため、研究代表者は、動脈管の内膜で高発現する t-PA が MMP 活性化を介して、内弾性板を断裂させ、内膜肥厚形成を促進している可能性があるとして着想した。

2. 研究の目的

本研究では、t-PA に着目し、動脈管の内膜肥厚形成への関与を解明することが目的である。

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 (Fluorescence-activated cell sorting) を行った。FITC 標識抗 CD31 抗体 (Abcam) と抗 CD45 抗体 (BioLegend) を内皮細胞と血球に対する標識として用いて、

CD31⁺, CD45⁻ の細胞群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。また、発達段階における t-PA 発現を検討するために、胎生 19 日目、胎生 21 日目、日齢 0 のラット動脈管のパラフィン切片を作製し、抗 t-PA 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いて、免疫組織染色を行った。

(2) ラット動脈管における MMP 活性の検討
動脈管組織での MMP 活性を確認するために、ラット動脈管を亜鉛固定液 (36.7 mM ZnCl₂, 27.3 mM ZnAc₂ × 2H₂O, 0.63 mM CaAc₂ in 0.1 M Tris, pH 7.4) で固定し、パラフィン切片を作成した。そして、パラフィン切片に、DQ ゼラチン (Invitrogen) を反応させて、MMP 活性を検討した。

また、胎仔ラット（胎生 21 日目）の動脈管と大動脈の内皮細胞を FACS で分離し、72 時間の培養を行った。その培養上清を用いて、ゼラチンゼイモグラフィを行い、MMP 活性を検討した。内皮細胞の培養は、t-PA の基質であるプラスミノゲン (WAKO) の添加の有無を行い、MMP 活性の変化を検討した。

(3) 内皮由来の MMP による内弾性板断裂の検討 (in vitro)

内皮由来の MMP 活性が内弾性板を断裂させることを in vitro で検討するために、3 次元の血管モデルを作製した。ウイスター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対して、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 (Atherosclerosis, 2014)。最上層には、臍帯静脈内皮細胞 (JCRB Cell Bank) 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を行い、48 時間の培養を行った後に、弾性線維の変化をエラスチカ・ワンギーソン染色で検討した。MMP 活性の変化を in situ ゼイモグラフィで検討した。また、t-PA の silencing を行い、弾性線維と MMP 活性の変化を検討した。

(4) 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 20 日目の未熟な胎仔ラットでは動脈管の内弾性板断裂と内膜肥厚形成が不十分であるため、これら未熟な胎仔ラットへ t-PA の基質であるプラスミノゲンを投与することで内弾性板断裂と内膜肥厚形成が促進できるかを検討した。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製し、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。

(5) ヒト動脈管における t-PA 発現、MMP 活性の検討

先天性心疾患の手術時に得たヒト動脈管 6 例を、用手的に内膜肥厚部と中膜に分離し、定量 PCR で t-PA 発現の検討を行った。また、パラフィン切片を作成し、免疫組織染色で t-PA の発現を検討した。MMP 活性は、in situ ザイモグラフィーで検討した。

(6) 統計

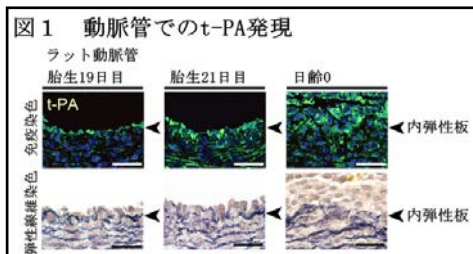
すべての値は 4 回以上の独立した実験の平均値±SEM として示した。2 群間の比較は、ウェルチの t 検定で行った。P<0.05 の値を有意とした。

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

定量 PCR の結果から、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することを確認した(図 1 上)。また、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(図 1 下)。

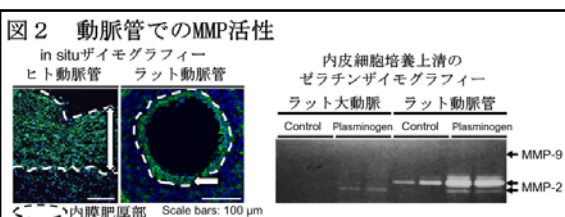


(2) ラット動脈管の内皮細胞における MMP-2 の活性化

in situ ザイモグラフィーで、動脈管の内膜肥厚部での MMP 活性を確認した(図 2 中央)。

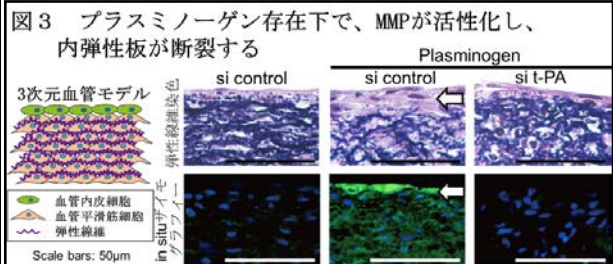
動脈管と大動脈の内皮細胞の培養上清を用いたゼラチンザイモグラフィーでは、動脈管の内皮細胞で MMP-2 の高発現を認めた(6.7 倍、n=6、p<0.05)(図 2 右)。また、t-PA の基質であるプラスミノゲンの添加により、動脈管の内皮細胞で MMP-2 の活性化が生じることを確認した。動脈管と大動脈のいずれの内皮細胞でも、MMP-9 の発現は認めなかった。

(3) 内皮由来の MMP による内弾性板の断裂



(in vitro)

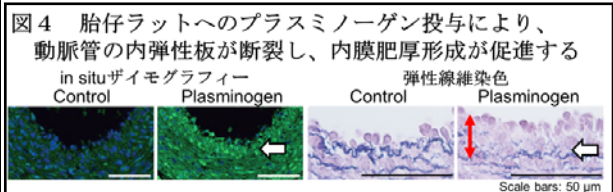
内皮細胞と弾性線維が存在する 3 次元血管モデルを作製し、プラスミノゲンの添加を行い、48 時間の培養を行ったところ、プラスミノゲン添加群でのみ、弾性線維の断裂と MMP の活性化が確認された。これらの変化は、t-PA の silencing を行うことで抑制された。このため、t-PA によるプラスミノゲンのプラスミンへの変換を介して、MMP が活性化し、弾性線維が断裂したことが示された。



(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弾性板断裂と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(図 2 左)。

(6) 結語

本研究から、動脈管の内膜で高発現している t-PA は、MMP の活性化を介して、動脈管の内膜肥厚形成に関与している可能性が示唆された。新生児では血中プラスミノゲン濃度が成人の 50% しかなく、かつ早産児ほど血中プラスミノゲン濃度が低いことが報告されている。そのため、プラスミノゲンを補充することで、動脈管の内膜肥厚形成を促進し、動脈管閉鎖を促すことが出来る可能性がある。しかし、プラスミノゲン投与による出血などの他臓器への影響や、より大型の動物での効果など、今後の検討を行うことが

必要である。本研究は、PLoS One. 5:13. e0190871. 2018. に掲載された。

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4件)

1. 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. 査読有. 5:13. 2018. e0190871. doi:10.1371/journal.pone.0190871.
2. 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. 査読有. 67. 2017. 723-729. doi: 10.1007/s12576-017-0565-5.
3. Yokoyama U, Tonooka Y, Koretake R, Akimoto T, Gonda Y, Saito J, Umemura M, Fujita T, Sakuma S, Arai F, Kaneko M, Ishikawa Y. Arterial graft with elastic layer structure grown from cells. Sci Rep. 査読有. 10:7. 2017. 140. doi:10.1038/s41598-017-00237-1.
4. Saito J, Shibasaki J, Shimokaze T, Kishigami M, Ohyama M, Hoshino R, Toyoshima K, Itani Y. Temporal relationship between serum levels of interleukin-6 and C-reactive protein in therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. Am J Perinatol. 査読有. 33. 2016. 1401-1406.

[学会発表] (計5件)

1. Saito J, Yokoyama U, Nicho N, Zheng YW, Ito S, Taniguchi H, Asou T, Masuda M, Ishikawa Y. Tissue-type plasminogen activator promotes intimal thickening formation of the ductus arteriosus. Weinstein Cardiovascular Development and Regeneration Conference. 2018.
2. 齋藤純一, 横山詩子, 石川義弘. 組織型プラスミノゲン活性化因子による動脈管のリモデリング. 第95回日本生理学会大会. 2018.
3. Saito J, Yokoyama U, Ito H, Tadokoro T, Sugo Y, Kurasawa K, Ogawa M, Miyagi E, Taniguchi H, Kaneko M, Ishikawa Y.

Fabrication of implantable human arterial graft by periodic hydrostatic pressure. The 8th TAKAO International Symposium on Molecular Mechanism of Cardiopulmonary Disease. 2017.

4. 齋藤純一, 横山詩子, 石川義弘. ヒト動脈管の遺伝子解析により明らかとなった組織型プラスミノゲン活性化因子による動脈管内弾性板の分解. 第94回日本生理学会大会. 2017.
5. Saito J, Yokoyama U, Masuda M, Asou T, Ishikawa Y. Human Gene Profiling Reveals Contribution of Tissue Plasminogen Activator to Intimal Thickening of the Ductus Arteriosus. American Heart Association Scientific Session. 2016.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ:

横浜市立大学医学部循環制御医学

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~seiril/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 純一 (SAITO Junichi)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号: 30779301

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者