

令和元年6月11日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16276

研究課題名(和文) FBLN1の動脈管内膜肥厚作用の検討

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)

横浜市立大学・医学研究科・共同研究員

研究者番号：80784652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000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、新生児は循環不全となり、命を落とすことがある。動脈管の閉鎖には、血管内腔側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のフィブリン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、パ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、発達予後改善に大きく貢献すると思われる。

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 prostaglandineE-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 DASMCMigration 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 パーシカン ヒアルロン酸

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⁽¹⁾。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^{(2)・(5)}、早産児の予後に重大な影響を与える。超低出生体重児の動脈管開存率は70%を超えている⁽⁶⁾。

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 (PGE₂) 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 PGE₂ 濃度に強く依存しており⁽⁷⁾、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⁽⁸⁾。しかし、体重 1000g 未満の超低出生体重児においては、約 30% が治療抵抗性を示す⁽²⁾。

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 PGE₂ によって徐々に形成される⁽⁹⁾。これは、PGE₂ 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が、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

PGE₂ 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、PGE₂ 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⁽¹⁰⁾。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 の細胞遊走に対する作用機序 (in vitro)

フィブリン 1 が細胞遊走を促進するかどうかの検討を、スクラッチアッセイにより評価した。ガラスチャンパーに動脈管平滑筋細胞を播種し、EP4 アゴニスト刺激を加えた後に、細胞の半分をへらで掻き取り、72 時間後の細胞遊走面積をマニュアルで計測した。細胞遊走観察の前に、フィブリン 1 を標的とした siRNA を用いて遺伝子を抑制させることでフィブリン 1 の細胞遊走に対する作用を検討した。また、フィブリン 1 のリコンビナント蛋白を平滑筋細胞に添加し、細胞遊走を促進するかどうかについても検討した。

(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⁺/CD45⁻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^{-/-} 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)

(3) で得られた結果をもとに、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、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がについて検討した。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。

(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^{-/-}マウスを用いて検討した。野生型マウスと EP4^{-/-}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。

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 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。ウエスタンブロットティングでは、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、PGE₂ 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、PGE₂-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 の細胞遊走に対する作用機序 (in vitro)

EP4 アゴニストによる刺激で、ラット動脈管平滑筋細胞の遊走は促進した。また、この細胞遊走促進作用は、フィブリン 1 を標的とした siRNA によって有意に抑制された (n=5-16, p<0.05, p<0.01)。また、フィブリン 1 動脈管平滑筋細胞にリコンビナント蛋白を添加したところ、フィブリン 1C、フィブリン 1D どちらのアイソフォームによっても細胞遊走は亢進した (n=11-14, p<0.01) (図 1)。以上の結果より、フィブリン 1 は動脈管平滑筋細胞遊走促進作用を有することが明らかになった。

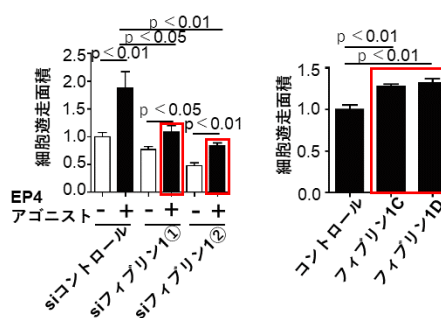


図 1. スクラッチアッセイ結果。
(左; siRNA, 右; リコンビナント蛋白)

(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においても、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共局在していた。EP4^{-/-}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 2)。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。

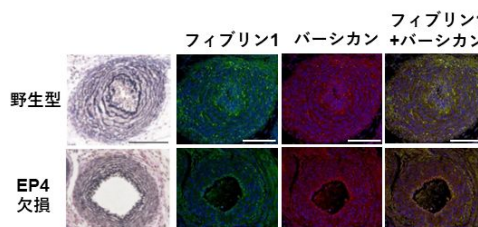


図 2. マウス新生児動脈管におけるフィブリン 1 とパーシカンの局在。

(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 (n=6-18, p<0.05) (図 3)。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。

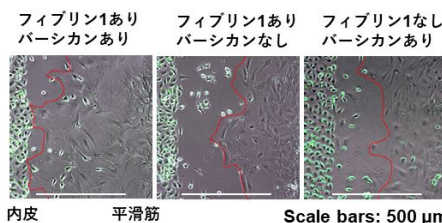


図 3. 内皮方向への平滑筋細胞遊走にフィブリン 1 とパーシカンが重要。

(5) フィブリン 1 の動脈管内膜肥厚作用の検討 (in vivo)

図 2 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る。内膜肥厚部と中膜平滑筋細胞層にフィブリン 1 が発現しており、EP4^{-/-}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。

以上に述べた研究成果から、PGE2-EP4 シグナルによって動脈管平滑筋細胞内でフィブリン 1 が誘導され、このフィブリン 1 が中心的な役割を果たしながら、パーシカンと共役して内皮細胞と平滑筋細胞と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 4)。

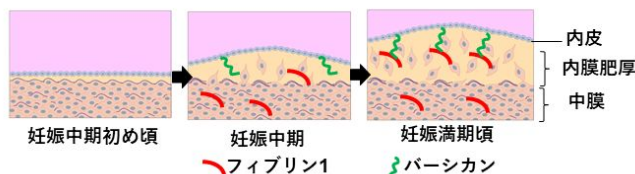


図 4. フィブリン 1 とパーシカンの動脈管内膜肥厚形成機序

< 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, Erdevi 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.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

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.* 67(6): 723-729, 2017. 査読あり.

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. 13(1): e0190871, 2018. 査読あり.

Kemmotsu T, Yokoyama U, Saito J, **Ito S**, Uozumi A, Nishimaki S, Iwasaki S, Seki K, Ito S, Ishikawa. Antenatal administration of betamethasone contributes to intimal thickening of the rat ductus arteriosus. Circ J. 83(3): 654-661, 2019. 査読あり.

〔学会発表〕(計 4 件)

伊藤智子、斎藤純一、横山詩子、石川義弘. Fibulin-1 の動脈管内膜肥厚形成機序. 第 53 回日本周産期新生児医学会学術集会 (横浜, 2017 年 7 月 16-18 日)

Ito S, Yokoyama U, Saito J, Masuda M, Asou T, Ishikawa Y. Prostaglandin E-EP4-mediated fibulin-1 up-regulation plays a role in intimal thickening of the ductus arteriosus. The 8th TAKAO International symposium on molecular mechanism of cardiopulmonary (Matsue, Oct 6-8, 2017)

伊藤智子、横山詩子、斎藤純一、佐藤信一、臼田治夫、渡邊真平、北西龍太、三浦雄一郎、埴田卓志、松田直、石川義弘. 多胎妊娠では胎児の動脈管内膜肥厚が抑制される 第 62 回日本新生児生育医学会学術集会 (大宮, 2017 年 10 月 12-14 日)

Ito S, Yokoyama U, Saito J, Masuda M, Asou T, Ishikawa Y. Prostaglandin E-Ep4 signaling-mediated fibulin-1 integrates extra-cellular matrices to promote smooth muscle cell migration of the ductus arteriosus. Weinstein 2018 (Nara, May 16-18, 2018)

〔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〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

研究協力者氏名 : なし

ローマ字氏名 : なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。