

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月14日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591418

研究課題名（和文） アデニル酸シクラーゼを標的とした副作用のない動脈管制御の開発

研究課題名（英文） Development of Ductus Arteriosus Regulation Targeting Adenylyl Cyclases without Side Effect

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（和文）：動脈管においてプロスタグランジンE(PGE)はアデニル酸シクラーゼ(AC)を介し血管拡張およびヒアルロン酸(HA)に基づく内膜肥厚の作用を及ぼしている。本研究ではAC6によりHA産生が亢進し、AC2でその作用が抑制される事を明らかにした。AC2/6刺激薬であるFD1は、内膜肥厚を生じずにPGEよりも長時間の動脈管拡張作用を示した。FD1は現在の治療薬であるPGEにとって変わる新しい動脈管治療薬となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Prostaglandin E induces vasodilation and intimal thickening (IT) in the ductus arteriosus via activation of adenylyl cyclases (AC). We revealed that AC6 is responsible for hyaluronan production and AC2 inhibited it. Stimulation of both AC2 and AC6 by FD1 induced longer vasodilation without IT. FD1 may be a novel alternative therapy to currently available PGE therapy for ductus arteriosus.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：動脈管、アデニル酸シクラーゼ

1. 研究開始当初の背景

動脈管開存症（PDA）は早産児において生命予後を左右する重大な疾患である。また、動脈管依存性先天性心疾患の新生児では動脈管を開存させておく事が必要である。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PGE合成阻害剤およびPGE製剤がそれぞれ動脈管閉鎖、拡張の目的で投与されている。

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。新生児医療の分野では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

胎児期の動脈管においてPGEは、ヒアルロン

酸(HA)産生による内膜肥厚を誘導し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及ぼしている。PGEは受容体を介してアデニル酸シクラーゼ(AC)を活性化することで細胞内cAMPが増加し動脈管に作用すると考えられている。先行実験のPCRでは9つあるACアイソフォームのうち胎生21日ラット大動脈に比して動脈管にAC2、5、6が高発現している事が明らかになった。それぞれのACアイソフォームが動脈管の内膜肥厚、収縮に対しどのような作用を及ぼすかにつき検討することで、動脈管に特異的に作用し、しかも内膜肥厚を招かず血管拡張作用のみを有する新たな動脈管作用薬を開発する事を最終目的に設定した。

3. 研究の方法

(1) 動脈管培養細胞に対するAC2、5、6の作用の検討

胎生21日目のwistar ratより5-10匹分の動脈管の組織を集め、コラゲナーゼなどの酵素処理を施した後初代培養細胞を行う。継代数4-7での細胞を使用する。

① cAMPに対する検討

AC2、5、6それぞれのsi-RNA細胞を用いてPGE₁10mol/lでの刺激下のcAMPを測定する。

② 内膜肥厚に関する検討

内膜肥厚形成には血管平滑筋細胞によるヒアルロン酸の増加が重要である。そこで以下につき細胞培養液中のヒアルロン酸の濃度を測定することで合成能を検討した。

i) AC2、5、6それぞれのsi-RNA細胞への反応

ii) 過大発現細胞におけるPGE₁10mol/lへの反応

(2) 組織における内膜肥厚の検討

①ラット早産児(胎生19日)を帝王切開で分娩させた後、AC2およびAC6をそれぞれアデノウィルスベクターを用いて遺伝子導入で過大発現させ器官培養を行う。コントロールと組織像を比較し、動脈管内膜肥厚に対する作用を検討する。

②胎生18.5日目のAC5およびAC6ノックアウトマウスの動脈管の組織像を比較する。

③単離した動脈管をAC2/6刺激薬である6-[N-(2-isothiocyanatoethyl)aminocarbonyl] forskolin (FD1)、AC5/6刺激薬である6-[3-(dimethyl amino) propionyl]-14-15-dihydroforskolin (FD6)の刺激下で48時間培養し組織像を比較する。

(3) 単離した動脈管における血管拡張作用に関する検討

胎生21日目のラット動脈管をリング状に摘出しインドメサシンで収縮させた後、FD1、FD6で刺激する。還流恒温槽に設置した圧トランスデューサーを用いて血管張力を計測することで血管張力への影響を検討する。

(4) 生体内におけるFD1、6の作用の検討
ラット新生児動脈管を全身冷凍法で観察した。

①ラット新生児の動脈管閉鎖が生後何時間かを調べる。

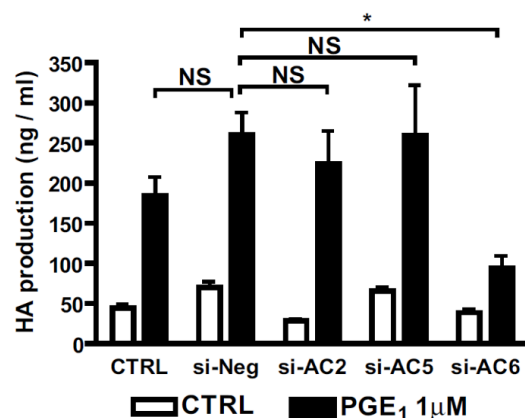
②①の閉鎖時間に合わせてPGE₁、FD1、FD6を腹腔内注射し、注射後の時間を追って動脈管径の観察を行う。

4. 研究成果

(1) 動脈管培養細胞に対するAC2、5、6の作用の検討

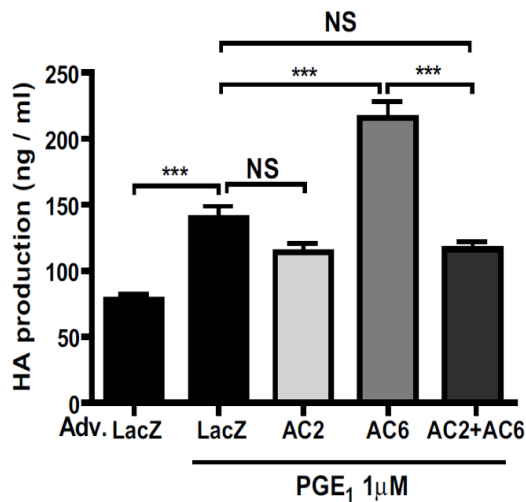
①培養細胞に対するPGE刺激ではコントロールに比してsi-AC2、5、6すべてにおいてcAMP産生が低下していた。

②内膜肥厚に対する検討
i)



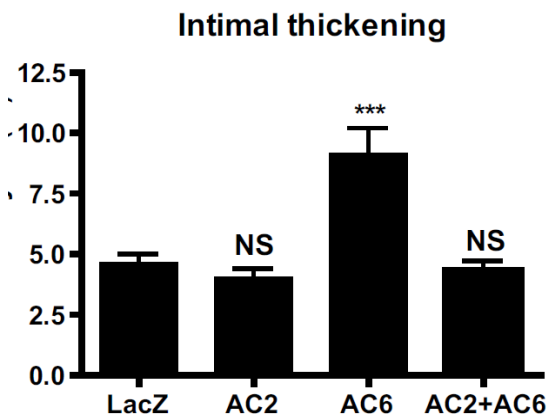
si-AC 2、5 では PGE 刺激に対する HA 産生に影響がなかったのに対し、si-AC 6 においては有意に HA 産生の低下を認めた。

ii) AC 6 過剰発現細胞では PGE 刺激に対する HA 産生が有意に亢進していた。興味深いことに AC 2 と 6 を同時に過剰発現させた細胞では PGE 刺激に対する HA 産生亢進を認めなかった。

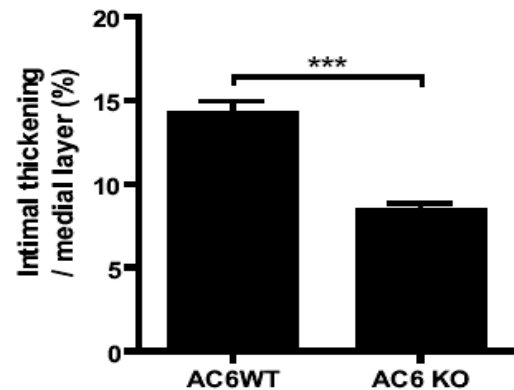
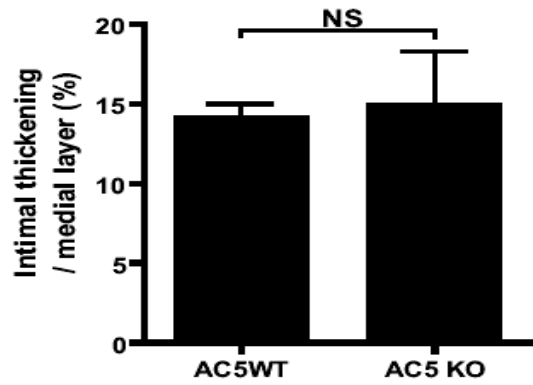


(2) 組織における内膜肥厚の検討

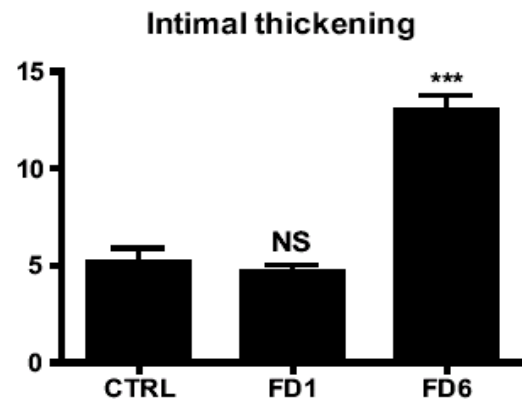
① AC 6 過剰発現の動脈管では内膜肥厚が有意に促進されたが、AC 2 と 6 同時の過剰発現ではコントロール、AC 2 過剰発現の動脈管の内膜肥厚と有意差がなかった。



② AC 5 ノックアウトマウスではコントロールと同程度の内膜肥厚形成を認めたが、AC 6 ノックアウトマウスにおいては内膜肥厚が抑制されていた。



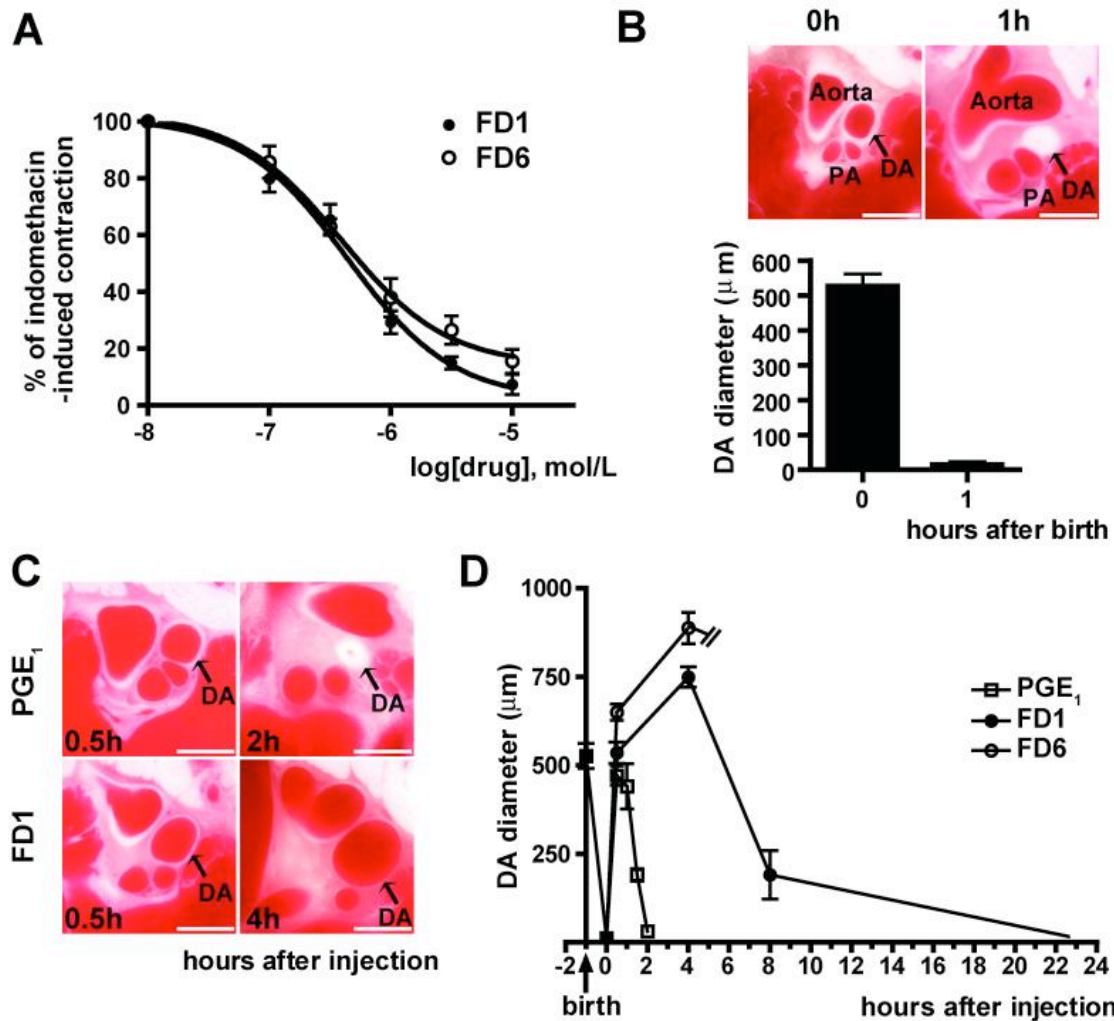
③ FD1 においては内膜肥厚形成を認めず、FD 6 では内膜が肥厚していた。



以上より、内膜肥厚形成に必要な HA 産生能は AC 6 を介して促進されるが、AC 2 の同時発現で AC 6 の HA 産生亢進能が抑制されることが示唆された。

(3) 単離した動脈管における血管拡張作用に関する検討

FD 1、FD 6 はともにインドメサシンで収縮した動脈管を拡張させた (Figure A)。



(4) 生体内における FD 1、6 の作用の検討
①ラット動脈管は生後 1 時間で閉鎖していた (Figure B)。

②生後 1 時間に PGE₁、FD 1、FD 6 を投与したところ、FD 1 は PGE₁ と同等かそれ以上の動脈管拡張作用を示し、かつ、作用時間が長かった (Figure C、D)。FD 6 は動脈管拡張作用を認めたものの呼吸抑制のため総てのラットが死亡した (Figure D)。

以上より、FD 1 は動脈管においてヒアルロン酸産生による内膜肥厚を生じさせず、長時間の血管収縮作用を示す事が示唆された。今後 PGE にかわる治療薬となりうると思われる。

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 8 件)

- 1 Tsuda K, Iwasaki S, Horiguchi H, Mori M, Nishimaki S, Seki K, Taguri M, Yokota S, Ishiwada N. Immune response

to Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine in preterm infants. *Pediatr Int*, 査読有, 54(1):64-7, 2012
DOI:10.1111/j.1442-200X.2011.03505.

ⓧ

- 2 Nishimaki S, Shima Y, Sato M, An H, Fujita S, Iwasaki S, Horiguchi H, Seki K, Yokota S. Urinary β 2-microglobulin in very preterm neonates with chorioamnionitis. *Pediatric Nephrol*, 査読有, 26(12):2185-91, 2011
- 3 Seki K, Iwasaki S, An H, Horiguchi H, Mori M, Nishimaki S, Yokota S. Early discharge from a neonatal intensive care unit and rates of readmission. *Pediatr Int*, 査読有, 53(1):7-12, 2011
DOI:10.1111/j.1442-200X.2010.03179.

ⓧ

- 4 Yokoyama U, Minamisawa S, Katayama A,

- Tang T, Suzuki S, Iwatsubo K, Iwasaki S, Kurotani R, Okumura S, Sato M, Yokota S, Hammond HK, Ishikawa Y. Differential regulation of vascular tone and remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus. *Circ Res*, 査読有, 106(12): 1882-1892, 2010
DOI:10.1161/CIRCRESAHA.109.214924
- 5 Yokoyama U, Minamisawa S, Ishikawa Y. Regulation of vascular tone and remodeling of the ductus arteriosus. *J. Smooth Muscle Res*, 査読有, 46(2): 77-87, 2010
DOI:10.1540/jsmr.46.77
- 6 Sato M, Nishimaki S, An H, Shima Y, Naruto T, Sugai T, Iwasaki S, Seki K, Imagawa T, Mori M, Yokota S. Soluble tumor necrosis factor receptor-I in preterm infants with chorioamnionitis. *J Obstet Gynaecol Res*, 査読有, 35(2):252-7, 2009
- 7 岩崎志穂. たとえで簡単 新生児呼吸器疾患とそのケア、呼吸急迫症候群. *Neonatal care*, 査読無, 22:1238-1243, 2009
- 8 Akaike T, Jin MH, Yokoyama U, Izumi-Nakaseko H, Jiao Q, Iwasaki S, Iwamoto M, Nishimaki S, Sato M, Yokota S, Kamiya Y, Adachi-Akahane S, Ishikawa Y, Minamisawa S. T-type Ca²⁺ channels promote oxygenation-induced closure of the rat ductus arteriosus not only by vasoconstriction but also by neointima formation. *J Biol Chem*, 査読有, 284(36): 24025-24034, 2009
DOI:10.1074/jbc.M109.017061
- [学会発表] (計 17 件)
- 1 Jin MH, Yokoyama U, Ishiwata R, Minamisawa S, Ishikawa Y. Oxygenation-induced postnatal remodeling of the ductus arteriosus. The 89th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2012. 3. 30, 松本文化体育館, 長野
- 2 Ichikawa Y, Yokoyama U, Ishikawa Y. Inhibition of Phosphodiesterase Type 3 Milrinone Dilate the Ductus Arteriosus without Forming Intimal Thickening The 89th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2012. 3. 30, 松本文化体育館, 長野
- 3 Yokoyama U, Jin MH, Kato Y, Ishiwata R, Suzuki S, Masuda M, Asou T, Aoki H, Sugimoto Y, Nakamura T, Minamisawa S, Ishikawa Y. Inhibition of EP4 Signaling Attenuates Mouse Aortic Aneurysm Formation. The 76rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2012. 3. 17, 福岡国際会議場, 福岡
- 4 青木理加, 横山詩子, 岩崎志穂, 関和男, 西巻滋, 横田俊平, 石川義弘. 動脈管収縮における出生後の血清浸透圧低下の役割, 第 56 回日本未熟児新生児学会学術集会, 2011. 11. 14, 東京国際フォーラム, 東京
- 5 Yokoyama U, Shioda A, Kato Y, Asou T, Aoki H, Nakamura T, Minamisawa S, Ishikawa Y. Prostaglandin EP4 Signaling Negatively Regulates Vascular Elastic Fiber Assembly. The 84th Scientific Session, American Heart Association (AHA), 2010. 11. 16, Chicago, USA
- 6 青木理加, 横山詩子, 岩崎志穂, 西巻滋, 横田俊平, 石川義弘. ラット動脈管閉鎖における低浸透圧センサー Transient Receptor Potential Melastatin 3 (TRPM3) チャネルの役割. 第 55 回未熟児新生児学会・学術集会, 2010. 11. 7, 神戸国際会議場, 兵庫
- 7 岩崎志穂, 青木理加, 西巻滋, 横田俊平, 南沢享, 横山詩子. ラット動脈管内膜肥厚におけるアデニル酸シクラーゼアイソフォームの役割の検討. 第 46 回日本周産新生児医学会, 2010. 7. 11-13, 神戸国際会議場, 兵庫
- 8 Yokota T, Ozawa M, Yokoyama U, Minamisawa S. A Role of Thromboxane A2

- Receptor in the Rat Ductus Arteriosus as a Vasoconstrictor. The 16th International Vascular Biology Meeting, 2010.6.20-24, Los Angeles, USA
- 9 Minamisawa S, Yokoyama U, Akaike T, Hammond K, Ishikawa Y. Counteracting regulation of vascular remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus. The 16th International Vascular Biology Meeting, 2010.6.20-24, Los Angeles, USA
- 10 Yokoyama U, Minamisawa S, Ishikawa Y. Regulation of vascular remodeling of the ductus arteriosus. The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (招待講演), 2011.3.29, パシフィコ横浜, 神奈川
- 11 横山詩子. Prostaglandin E2-activated Epac promotes neointimal formation of the rat ductus arteriosus by a process distinct from that of cAMP-dependent protein kinase A. 第52回日本平滑筋学会総会 栗山熙賞受賞記念講演(招待講演), 2010.7.1, 仙台市情報プラザエル, 宮城
- 12 Minamisawa S, Akaike T, Yokoyama U, Iwasaki S, Ishikawa Y. Oxygenation Promotes Migration of Smooth Muscle Cell in the Rat Ductus Arteriosus. Developmental Vascular Biology Workshop IV, 2010.2.10-13, Monterey, California
- 13 Yokoyama U, Minamisawa S, Katayama A, Tang T, Iwasaki S, Hammond HK, Ishikawa Y. Differential regulation of vascular tone and remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus. Developmental Vascular Biology Workshop IV, 2010.2.10-13, Monterey, California
- 14 南沢享, 横山詩子. 動脈管閉鎖の分子機序: プロスタグランジンの予期せぬ役割 Molecular Mechanisms of Closure of Ductus Arteriosus: Unexpected roles of prostaglandins. 第32回日本分子生化学会年会, 2009.12.9-12, パシフィコ横浜、神奈川
- 15 青木理加, 横山詩子, 岩崎志穂, 西巻滋, 横田俊平, 石川義弘. 胎生後期ラット動脈管における TRPM チャネルの発現~大動脈組織との比較検討~. 第54回日本未熟児新生児学会・学術集会, 2009.11.29-12.1, パシフィコ横浜, 神奈川
- 16 横山詩子, 南沢享, 片山綾子, 塩田亜樹, 中邨智之, 杉本幸彦, 石川 義弘. プロスタグランディンE受容体EP4シグナルによる弾性線維形成の制御. 第13回 Molecular Cardiovascular Conference, 2009.9.4-6, 北海道
- 17 Minamisawa S, Akaike T, Yokoyama U, Ozawa M, Iwasaki S, Ishikawa I. Oxygenation Promotes Smooth Muscle Cell Migration in the Rat Ductus Arteriosus. BCVS Conference-Molecular Mechanisms of Cardiovascular Diseases, 2009.6.20-23, Lake Las Vegas, Nevada
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
 ()
 研究者番号:
- (3) 連携研究者
横山 詩子 (YOKOYAMA UTAKO)
 横浜市立大学・医学部・講師
 研究者番号: 70404994