

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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号: 37104  
 研究種目: 若手研究(B)  
 研究期間: 2010~2012  
 課題番号: 22791042  
 研究課題名(和文) 動脈管の器質的閉鎖における分子機構解明と治療標的分子の同定

研究課題名(英文) Identification of molecular mechanisms and therapy target in the closure of ductus arteriosus

研究代表者  
 梶本 英美(KAJIMOTO HIDE MI)  
 久留米大学・循環器病研究所・助教  
 研究者番号: 50349700

研究成果の概要（和文）：早産児の動脈管は、一旦収縮（機能的閉鎖）しても永久的閉鎖（器質的閉鎖）が十分ではなく、容易に再開存する。動脈管の閉鎖過程において、PI3-キナーゼ/Akt系の抑制因子である Phosphatase and tensin homolog の発現が、内皮細胞で劇的に増加することを見出した。さらに、動脈管収縮前後における網羅的遺伝子解析により、新しい視点から動脈管閉鎖機序の解明に対する手がかりをつかんだ。

研究成果の概要（英文）：Patent DA accounts for significant morbidity in preterm newborns. Phosphatase and tensin homolog that is a protein phosphatase in PI3 kinase/Akt pathway increases after ductus arteriosus closure. Analysis of the comprehensive gene expression profile changes provided new insight into understanding the mechanism of DA closure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：新生児医学、動脈管

1. 研究開始当初の背景

(1) 動脈管は胎生期には開存しているが、生直後の肺呼吸の開始と共に直ちに収縮する。動脈管開存症の頻度は、在胎週数 28 週以前で

は 60%、32 週以降では 20%であり、早産児の生命予後に関わる。現在、シクロオキシゲナーゼ阻害薬(インドメサシン)が治療薬として使用されているが、20-30%の患児において有効では

ない。消化管穿孔、腎障害などの副作用も高頻度に見られるため、他の治療法の開発が必要である。一方、動脈管依存性先天性心疾患の患児では、初期手術までの間、動脈管の開存を保つことにより体・肺血流を維持する必要がある。

(2) 胎生後期より動脈管の内膜肥厚がみられ、内腔の狭小化がはじまる。内膜肥厚は、動脈管平滑筋細胞の増殖と内腔側への遊走、細胞外基質や接着因子の増加 (Mason et al, Nat Med 1999, Yokoyama et al, J Clin Invest 2006)、エラスチン線維の配列の乱れ (Zhu et al, Lab Invest 1993)などの関与が報告されている。早産児の動脈管は一旦収縮しても容易に再開存を繰り返して治療に難渋する場合がある。超低出生体重児の約 1/4 の症例は生後 1 週間以降に再開存している。一方、動脈管依存性先天性心疾患では、動脈管の閉鎖を未然に予防する必要がある。これらの臨床的課題を解決するためには、動脈管の器質的閉鎖の分子メカニズム解明と治療標的分子の同定が必須である。

(3) セリン/スレオニンキナーゼである Akt は、生存シグナル伝達の中心である。Akt は、PI3-キナーゼ依存性に活性化され、CDK 阻害因子や、cyclin D1 および p53 を介して細胞増殖を制御する。さらに、Bad や Forkhead ファミリーのようなプロアポトーシスシグナルを阻害することによって細胞生存を調節する。動脈管の器質的閉鎖における PI3-キナーゼ/Akt 経路の関与に着目した。

## 2. 研究の目的

- (1) 動脈管の器質的閉鎖における分子イベントの解明
- (2) 内皮細胞における PI3-キナーゼ/Akt 経路の機能解析
- (3) 器質的閉鎖における PI3-キナーゼ/Akt 経

## 路の意義

## 3. 研究の方法

### (1) 動脈管・大動脈の形態学的解析

妊娠 WKY ラットを preterm (妊娠 19 日目)、term (妊娠 21 日目)に帝王切開をし、胎児を娩出する。第一呼吸の前に急速全身凍結をすることにより、形態を保ったまま標本作製する。

### (2) 動脈管・大動脈の分子生物学的解析

妊娠 21 日目と 19 日目、生後 1 日目に摘出した動脈管と大動脈組織を用いて、PI3-キナーゼ/Akt 経路のリン酸化を含むタンパクなどをウェスタンブロット、PCR、蛍光染色法により評価する。

### (3) 内皮細胞における PI3-キナーゼ/Akt 経路の機能解析

胎生 19 日目にラット動脈管を摘出し、組織培養を行う。Akt 阻害剤(Wortmannin や LY294002 など)の添加し、2 日後に動脈管の内皮細胞におけるアポトーシス、細胞周期を評価する。

### (4) 血管内皮特異的 PTEN ノックアウト(KO)マウスの心臓・血管の表現型の解析

Phosphatase and tensin homolog (PTEN)は PI3-キナーゼ/Akt 系の抑制因子である。血管内皮特異的 PTEN KO マウスにおける動脈管のアポトーシス、細胞周期、閉鎖遅延効果を調べることにより、PI3-キナーゼ/Akt 経路の関与を解析する。

(5) 胎生 19 日目のラット動脈管を用いて、Akt 阻害剤の添加した動脈管から RNA を抽出する。一方、生後 7 日目の器質的閉鎖した動脈管からも RNA を抽出しマイクロアレイを行う。両者の遺伝子プロファイルを比較することにより、PI3-キナーゼ/Akt 経路を介した器質的閉鎖のメカニズムを検討する。Affymetrix GeneChip®を用いて、網羅的遺伝子解析を行う。

## 4. 研究成果

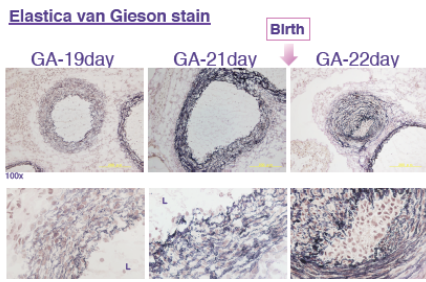


図1 動脈管収縮の組織像

(1) ラット胎児の動脈管切片の作成: 動脈管は胎内では開存しているが、出生後、呼吸の開始とともに収縮が始まる。動脈管の閉鎖機序を調べるためには開存したままの動脈管(妊娠 19 日目と 21 日目)と閉鎖後(22 日目)の動脈管を調べる必要がある。まず、ラットの胎児を帝王切開で娩出後、動脈管そのものを切り出した。しかし、径 200-300  $\mu\text{m}$  と非常に小さく、パラフィンブロック、凍結ブロックともに困難であり、動脈管の形態を保ちながら切片を作成することは難しかった。その後、胎児を娩出後、直後に全身凍結ブロックを作成し、切片を作成した。動脈管の同定が難しかったが、連続切片を作成することにより、形態を保ったままの動脈管のスライスを作成することが出来た。EVG 染色により、動脈管の閉鎖過程を組織学的に示すことが出来た(図1)。

(2) 動脈管収縮におけるPTENを含むPI3-キナーゼ/Akt系の変化: 発現量を蛍光染色で調べた。動脈管の閉鎖過程において、PI3-キナーゼ/Akt系の抑制因子であるPTENの発現が、内皮細胞で劇的に増加することを見出した(図2)。しかし、リン酸化PTEN、リン酸化Akt、eNOS、リン酸化AMPK  $\alpha$  (Thr172)には明らかな変化は見られなかった。

(3) ラット胎児の動脈管を、未熟児(妊娠 19 日目)、満期(21 日目)、出生後(22 日目)にそれぞれ 10 匹ずつ取り出し、RNA を抽出した。Affymetrix 社の DNA microarray を用いて遺伝子解析を行った。大動脈の遺伝子量の変化と比

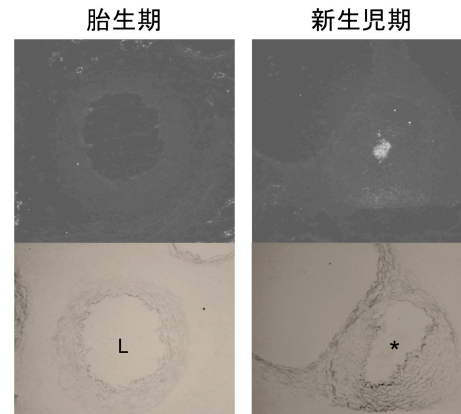
図2

上段: PTEN の蛍光染色(白色)

下段: 光学顕微鏡像

L: lumen

\*: 閉鎖した動脈管の内膜領域



較した。結果を、DAVID Bioinformatics Resources を用いて解析した。Enrichment score は、細胞死 2.13、細胞周期 1.85 であった。

(4) 血管内皮特異的 PTEN ノックアウト(KO)マウスの心臓・血管の表現型を調べた。成体では、体重増加 Wild マウス 3.5 g、KO マウス 3.53 g/4 週間(生後 10 週から 14 週)、血圧 Wild マウス 121.8 mmHg、KO マウス 125.8 mmHg、腎機能 BUN Wild マウス 26.9 mg/dl、KO マウス 30.6 mg/dl、クレアチニン Wild マウス 0.19 mg/dl、KO マウス 0.17 mg/dl、組織学的検討(HE 染色と sirius Red 染色)においても、心臓と大動脈では Wild マウスと KO マウスの違いは見られなかった。KO マウスの体外受精を何度か行ったが、妊娠数自体が少なく、胎児の評価に至らなかった。妊娠過程における血管内皮特異的 PTEN の関与が考えられた。

## 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 9 件)

1. Kajimoto H (他 7 人 1 番目), Kai H, et al: Inhibition of eNOS phosphorylation mediates endothelial dysfunction in renal failure: New effect of asymmetric dimethylarginine. *Kidney Int* 81(8):762-768, 2012. 査読有  
doi: 10.1038/ki.2011.476
2. Anegawa T, Kai H, Kajimoto H (他10人8番目): High-sensitive troponin T is associated with atrial fibrillation in a general population. *Int J Cardiol* 156(1): 98-100, 2012. 査読有  
doi: 10.1016/j.ijcard.2011.12.117
3. Ikeda A, Kai H, Kajimoto H (他 3 人 3 番目): Selective gene expression analysis of muscular and vascular components in hearts using laser microdissection method. *International Journal of Vascular Medicine* 2012:863410, 2012. 査読有  
doi: 10.1155/2012/863410.
4. Toyama Y, Kajimoto H (他 11 人 5 番目): Ultrasound stimulation restores impaired neovascularization-related capacities of human circulating angiogenic cells. *Cardiovasc Res* 95(4): 448-459, 2012. 査読有  
doi: 10.1093/cvr/cvs173
5. Takayama N, Kai H, Kajimoto H (他7人8番目): Simvastatin prevents large blood pressure variability induced aggravation of cardiac hypertrophy in hypertensive rats by inhibiting RhoA/Ras-ERK pathways. *Hypertens Res* 34(3): 341-347, 2011. 査読有  
doi: 10.1038/hr.2010.229
6. Mori T, Kai H, Kajimoto H (他7人3番目): Enhanced cardiac inflammation and fibrosis in ovariectomized hypertensive rats : a possible mechanism of diastolic dysfunction in postmenopausal women. *Hypertens Res* 34(4): 496-502, 2011. 査読有  
doi: 10.1038/hr.2010.229
7. Thenappan T, Kajimoto H (他 12 人 7 番目): A Central role for CD68 (+) macrophages in hepatopulmonary syndrome: Reversal by macrophage depletion. *Am J Resp Crit Care Med* 183:1080-1091, 2011. 査読有  
doi: 10.1164/rccm.201008-1303OC  
[学会発表] (計 12 件)
1. Kajimoto H, et al: Increased Phosphatase and Tensin Homolog Plays a Crucial Role in Endothelial Dysfunction in Mice with Renal Failure. (*American Heart Association's Scientific Sessions, Los Angeles, USA, 3-7/11/2012*)
2. Kajimoto H, et al: Inhibition of CaMKII/ERK-mediated eNOS phosphorylation by asymmetric dimethylarginine is novel molecular mechanism of endothelial dysfunction in chronic kidney disease mice. (*76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Fukuoka, Japan, 16-18/3/2012*)
3. Kajimoto H, et al: Inhibition of CaMKII- and ERK-mediated eNOS phosphorylation impairs endothelial function in renal failure mice: New effect of asymmetric dimethylarginine. (*American Heart Association's Scientific Sessions, Orlando, USA, 12-16/11/2011*)
4. Kajimoto H, et al: Increased circulating asymmetric dimethylarginine in chronic kidney disease mice induces endothelial dysfunction by inhibiting Ca/Calmodulin-dependent protein kinase II-eNOS signaling. (*American Heart Association's Scientific Sessions, Chicago, USA, 13-17/11/2010*)

5. Kajimoto H, et al: Asymmetric dimethylarginine impairs endothelial function in CKD mice. (*ISN-Nexus Symposium 2010, Kyoto, Japan, 15-18/4/2010*)

6. 研究組織

(1)研究代表者

梶本 英美 (KAJIMOTO HIDEMI)

久留米大学・循環器病研究所・助教

研究者番号: 50349700

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: