

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390277

研究課題名(和文) 動脈管閉鎖の分子機構解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of ductus arteriosus closure

研究代表者

南沢 享 (Minamisawa, Susumu)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：40257332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円、(間接経費) 4,410,000円

研究成果の概要(和文)：胎生期特有の血管である動脈管は生直後に閉鎖するが、その閉鎖の分子機序は不明な点が多い。本研究において、我々はPGE2-EP4シグナル経路が動脈管弾性線維の低形成をきたす主要なシグナルであること、PGE2-EP4シグナル経路においてcAMP経路を介さない下流シグナルとして、NFκB経路が活性化していること、動脈管内皮細胞の遺伝子発現プロファイルを世界で初めて明らかにした。これらの新たな知見を活かすことによって、動脈管に関する新規治療法の開発の可能性が拓かれた。

研究成果の概要(英文)：The ductus arteriosus (DA) is an essential fetal artery that closes immediately after birth. However, the molecular mechanisms remain unknown, especially its vascular remodeling. We found that 1) prostaglandin E2 (PGE2)-EP4 signaling decreased elastic fiber formation through degradation of the cross-linking enzyme lysyl oxidase, and that 2) NFκB signal could be activated by PGE2-EP4 stimulation via cAMP-independent pathway, and that 3) endothelial cells of the DA exhibited a unique gene profile involved in the regulation of DA-specific morphology and function. These novel findings regarding DA vascular remodeling could open a possibility to innovate a new therapeutic strategy for the regulation of DA closure.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：vascular remodeling 動脈管 新生児 弾性線維 プロスタグランジン 酸素化

## 1. 研究開始当初の背景

動脈管は肺動脈と大動脈とを連結しているバイパス血管で、胎生期にのみ開存し、生直後の肺呼吸の開始とともに直ちに閉塞にむかう。生直後の血管収縮に伴う機能的閉鎖から、血管内腔面が閉塞し、血流が遮断され、最終的には索状の線維性組織（解剖学的閉鎖）へと変化する。こうした劇的な変化を生じるために、隣接する他の血管と異なる構造上の特徴として、動脈管には血管内膜肥厚や弾性線維の形成不良が認められる。血管内膜肥厚部位は、いわば内膜面における接着剤の役割を果たし、出生後に収縮性刺激に曝された動脈管が、速やかに恒久的な閉塞へと進むことを促していると考えられる。未熟児動脈管や先天性動脈管開存症では、内膜肥厚の低形成が認められる場合が知られている。また、弾性線維の形成不良は、動脈管の弾力性を失わせ、速やかに閉鎖するためには合目的であると考えられる。さらに動脈管は隣接する他の弾性血管に比して、酸素やプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) に対して感受性が高いことなど機能的にも違いがあることが知られている。

従来動脈管研究は、血管の収縮弛緩に関する血管作働性因子の検討が中心であり、血管構造の違いをきたす分子機序について、血管分化の視点から取り組んだ研究は遅れていた。我々は、脂質メディエーターである PGE<sub>2</sub> が、その特異的受容体 EP4 を介して、動脈管平滑筋細胞からのヒアルロン酸産生を促し、これが動脈管血管内膜肥厚を生じさせ、閉鎖を促進することを見出した。本発見により、我々は「動脈管閉鎖遅延は、将来閉塞すべき運命にある血管として、その機能的・構造的分化が不完全・未熟であるために発症する」と着想するに至った。

そこで我々は動脈管での PGE<sub>2</sub>-EP4 下流シグナルを詳細に検討した結果、アデニル酸シクラーゼアイソフォームによる動脈管内膜肥厚の相違や新規に発見された cAMP 下流シグナル Epac1 の動脈管内膜肥厚促進作用について明らかにしてきた。さらに T 型カルシウムチャンネルが酸素依存性に活性化し、動脈管内膜肥厚を促進する働きを有することを発見した。以上の結果から、PGE<sub>2</sub>-EP4-cAMP シグナルやカルシウムシグナルを介する動脈管内膜肥厚形成の分子機序に関しては、研究の大きな進展をみることが出来た。しかし、これらの研究の結果、cAMP 下流シグナル活性化のみからでは説明し難い、cAMP 経路を介する以外の動脈管リモデリング機序が存在する可能性が示唆された。一方、動脈管弾性線維の形成不良を起こす分子機序に関しては、不明な点が多く残された。また、近年 BN ラットと呼ばれる特殊な系統のラットは弾性線維の異形成・低形成と動脈管開存症を高率に発症することが報告された。その原因遺伝子の研究が進められているが、まだ同定されるには到っていなかった。さらに、動脈

管で酸素や PGE<sub>2</sub> に対して感受性が高い原因には、それらを検知する内皮細胞の性質が、隣接する他の血管の内皮細胞の性質と異なることが推測された。しかし、これまでに動脈管内皮細胞の構造的・機能的特性について詳細に検討された研究は行われていなかった。

## 2. 研究の目的

未熟児、先天性心疾患患児では、動脈管を人為的に閉鎖ないし開存させなくてはならない場合がしばしばある。動脈管閉鎖の分子機序を解明し、新たな治療法を開発することは、小児医療上、極めて重要な研究課題である。動脈管は将来閉塞すべき運命にある血管として、他の血管には見られない血管構造を有している。本研究では、その特徴ある血管構造を形成する分子機序を詳細に解明することを目的とする。我々の最終目標は、当該研究の成果を基盤として、動脈管の閉鎖・開存を制御する新たな治療法を確立することである。

## 3. 研究の方法

### (1) PGE<sub>2</sub>-EP4 シグナル経路において cAMP 経路を介さない動脈管リモデリング機序の解明

ラット動脈管平滑筋培養細胞に対して、EP4 刺激と cAMP 刺激薬であるフォルスコリンを使って刺激し、48 時間後に細胞を回収した。mRNA 抽出後に DNA マイクロアレイ法で両者の遺伝子発現を比較検討した。

### (2) PGE<sub>2</sub>-EP4 シグナル経路を介さない動脈管リモデリング経路の同定

PGE<sub>2</sub>-EP4 シグナルの様に、動脈管血管収縮（機能的閉鎖）に重要と考えられている因子の中で、酸素化によって有意に変化する細胞外基質を検討した。具体的にはラット動脈管平滑筋培養細胞を低酸素から正常酸素濃度に培養条件を移し替えたときに、培養上清中で変化する蛋白質を LC-MS/MS 法にて解析した。

### (3) 動脈管が弾性線維低形成をきたす分子機序の解明

動脈管では弾性線維の形成不良が認められるが、EP4 遺伝子欠損マウスの動脈管には弾性線維形成不良が認められないことから、EP4 が弾性線維形成を制御する分子機序を検討した。また、BN ラットを用いて、弾性線維低形成、動脈管開存症をきたす原因遺伝子の探索をするため、DNA マイクロアレイ法にて BN ラット動脈管の遺伝子発現プロファイルを検討した。

### (4) 動脈管内皮細胞の特性の解明

動脈管内皮細胞と隣接する他の血管（大動脈など）の内皮細胞を FACS 法を使って純粋分離し、動脈管内皮細胞の遺伝子発現を DNA マイクロアレイ法にて検討した。

## 4. 研究成果

### (1) PGE<sub>2</sub>-EP4 シグナル経路において cAMP 経

## 路を介さない動脈管リモデリング機序の解明

ラット動脈管平滑筋培養細胞に対して、EP4 刺激とフォルスコリン刺激との遺伝子発現を比較検討した。両者において、有意に発現の変化が見られた遺伝子を抽出し、MetaCore というパスウェイ解析ソフトウェアを用いて、さらに解析を行ったところ、フォルスコリン刺激に対して、EP4 刺激では炎症系のシグナルはスウェイが亢進していること、とくに NFκB 経路が活性化していることが示唆された。EP4 刺激の下流に NFκB 経路が活性化しているという報告は非常に少なく、今後動脈管の閉鎖に NFκB 経路が如何に関与しているのかを検討してゆく必要がある。

## (2) 酸素化による動脈管平滑筋培養細胞上清での細胞外基質の変化

LC-MS/MS 解析を行い、低酸素下(酸素 1%)及び正常酸素下(酸素 21%)のそれぞれで培養したラット動脈管平滑筋細胞の上清中の分泌タンパク質を網羅的に調べた。その結果、酸素濃度の上昇により動脈管平滑筋細胞から分泌されるエラスチン、ファイブロネクチン、バイグリカンの分泌が通常酸素下の培養条件で減少する事が分かった。これらは細胞外マトリックスの主要構成因子であり、中でもエラスチンは血管において弾性線維を形成し、血管に弾力性を与える働きをしている事が知られている。

そこで RT-PCR 解析、Western blot 法による解析を行い、低酸素下から通常酸素下になることで動脈管平滑筋細胞においてエラスチン mRNA(図 1)、トロポエラスチン蛋白質(図 2)の発現が減少する事を確認した。

## (3) 動脈管が弾性線維低形成をきたす分子機序の解明

### 1. PGE-EP4 刺激による動脈管平滑筋弾性線維低形成

我々はまず、胎生 21 日目のラット動脈管から血管平滑筋細胞を分離培養し、長期間(14 日間)培地の上清などを交換せずに培養することによって、エラスチン架橋形成を調べることが可能となる実験系を確立した。この培養実験系を使って、培養上清中に PGE2 や EP4 刺激を与え、エラスチン架橋形成への影響を調べた。その結果、PGE2 (10-6M)や EP4 刺激 (ONO-AE1-329, 10-6M) を与えた平滑筋細胞では、対照群に比して、有意にエラスチン架橋形成が低下していた。この低下の程度は、エラスチン架橋形成に働く lysyl oxidase (LOX) 阻害剤  $\alpha$ -aminopropionitrile fumarate (BAPN) を加えたものと同等であった。一方、EP1/3 刺激 (sulprostone, 10-6M) や EP2 刺激 (butaprost, 10-6M) では、対照群に比して変化がなかった。バリンに標識した実験によって、新たに形成される弾性線維の形成が不良であることを認めた。

2. PGE-EP4 刺激による LOX タンパク質の低下  
胎生 21 日目のラット動脈管と大動脈から血管平滑筋細胞を分離培養し、PGE2 や EP4 刺

激によって、培養上清と平滑筋細胞における LOX タンパク質の発現変化を検討した。その結果、PGE2 や EP4 刺激で培養上清と平滑筋細胞における LOX タンパク質が動脈管平滑筋細胞では顕著に低下したが、大動脈平滑筋細胞では変化が認められなかった。また、EP1/3 刺激 (sulprostone, 10-6M) や EP2 刺激 (butaprost, 10-6M) では、対照群に比して変化がなかった。さらに LOX タンパク質をアデノウイルスベクターを使って、過剰発現させ、1 と同様の実験を行ったところ、EP4 刺激 (ONO-AE1-329, 10-6M) で、有意に低下したエラスチン架橋形成は、LOX タンパク質過剰発現によって、回復した。

### 3. PLC を介する EP4 刺激による LOX タンパク質の低下

先行研究によって、PGE2 や EP4 刺激は cAMP をセカンドメッセンジャーとして、その下流シグナルを活性化して、動脈管の血管拡張や血管リモデリングに関与することが判明している。そこで EP4 刺激による LOX タンパク質の低下の原因となるシグナル経路を検討した。その結果、cAMP 下流経路として働く PKA や Epac は EP4 刺激による LOX タンパク質の低下に関与していないことが判明した。一方、EP4 刺激下で、各種シグナル経路の阻害剤を同時に与えたところ、G 阻害剤 (gallein) proteinkinase C 阻害剤 (bis-bisindolylmaleimide I) phosphoinositide 3-kinase (PI3K) 阻害剤 (LY294002) を与えたところ、これらのシグナル経路は EP4 刺激による LOX タンパク質の低下に関与していなかった。唯一、phospholipase C (PLC) 阻害剤である U73122 を加えたところ、EP4 刺激による LOX タンパク質の低下を阻止することができた。

### 4. EP4 刺激によるリソソームにおける LOX タンパク質分解促進

PGE2 や EP4 刺激での LOX mRNA 発現をリアルタイム定量 PCR 法で測定をしたところ、EP4 刺激で LOX mRNA 発現には変化が認められなかった。また、LOX は細胞内では LOX proenzyme として存在し、細胞外に出ると BMP1 プロテアーゼによって、架橋形成活性を持つ LOX と架橋形成活性を持たない propeptide になるが、EP4 刺激で LOX proenzyme 発現には変化が認められなかった。以上のことから、EP4 刺激は LOX タンパク質の分解を促進していることが疑われた。そこでリソソームでのタンパク分解を抑制する塩化アンモニウム (NH<sub>4</sub>Cl) や bafilomycin を加えると、EP4 刺激による LOX タンパク質の低下を抑制することができた。さらにクラスリン誘導によるエンドサイトーシスを抑制する chlorpromazine (CPZ) を加えたところ、EP4 刺激による LOX タンパク質の低下を抑制することができた。以上のことから、PGE2 や EP4 刺激はクラスリン誘導による LOX のエンドサイトーシスを亢進し、リソソームでの分解を促していることが考えられた。この LOX

の低下がEP4を介して動脈管特異的に生じることが、動脈管での弾性線維形成低下の主要な要因となっていると考えられた。

#### 5 .BN ラット動脈管の遺伝子発現プロファイル

弾性線維の異形成・低形成と動脈管閉存症を高率に発症することが知られている BN ラットの動脈管遺伝子発現プロファイルを調べたところ、対照ラット動脈管に比べ、Tenascin-N (Tnn)の発現が有意に低下し、aggrecan (Acan)の発現が有意に低下していることを見出した。また、EP4 の発現も有意に低下していた。

#### (4) 動脈管内皮細胞の特性の解明

胎生 21 日及び新生仔動脈管から内皮細胞を純粋単離することができた。図 3A 右下の CD31 陽性、CD45 陰性分画に認められる細胞群が内皮細胞と考えられた。単離した細胞群から mRNA を抽出し、内皮細胞特異的および平滑筋細胞特異的遺伝子発現を調べたところ、右下の分画には内皮細胞特異的遺伝子の発現が、左下の分画には平滑筋細胞特異的遺伝子発現が多かった。

DNA マイクロアレイ法を用いて、ラット動脈管内皮細胞特異的に発現をする遺伝子を調べたところ、Affymetrix GeneChip® Rat Gene 1.0 ST Array に存在する 26,469 プローブ中、大動脈内皮細胞に比べて 2 倍以上に発現増加をしているものを 82 遺伝子同定することができた。この中には Tgfb2 や Vegfa など既に内皮での役割が知られているものの他にこれまで全く役割が知られていない遺伝子が多数含まれていた。発現の多い遺伝子群の中には、受容体へのリガンドとなる Tgfb2、Vegfa、Fgf10、Efnb、Ctgf、Fbn1、受容体蛋白質である Cxadr、Met、Chrm5、イオンチャネルである Trpc5、Cacnb3 などが、血管リモデリングに関与する可能性の高い遺伝子として挙げられた。

#### 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 18 件)

1. Yokoyama U, Minamisawa S, Shioda A, Ishiwata R, Jin MH, Masuda M, Asou T, Sugimoto Y, Aoki H, Nakamura T, Ishikawa Y. Prostaglandin E2 inhibits elastogenesis in the ductus arteriosus via EP4 signaling. *Circulation* 129(4): 487-96, 2014.
2. Minamisawa S, Akaike T. Role of ion channels in ductus arteriosus closure. *Human Genetics & Embryology : Current Research* 3: 116, 2014. doi:10.4172/2161-0436.1000116.
3. Yokota T, Shiraiishi R, Aida T, Iwai K, Liu NM, Yokoyama U, Minamisawa S. Thromboxane A2 receptor stimulation promotes closure of the rat ductus arteriosus through enhancing neointima formation. *PLoS One* 9(4): e94895,

2014.

4. Hsieh YT, Liu NM, Ohmori E, Yokota T, Kajimura I, Akaike T, Ohshima T, Goda N, Minamisawa S. Transcription profiles of the ductus arteriosus in Brown-Norway rat with irregular elastic fiber formation. *Circ J* 8(5): 1224-33, 2014.
5. Liu NM, Yokota T, Maekawa S, Lü P, Tei I, Taniguchi H, Yokoyama U, Kato T, Minamisawa S. Transcription Profiles of Endothelial Cells in the Rat Ductus Arteriosus during a Perinatal Period. *PLoS One*. 8(9):e73685, 2013.
6. 川上翔士、南沢享. 酸素化によるラット動脈管平滑筋細胞からのエラスチン分泌の減少. *日本小児循環器学会雑誌* 29 (6) : 309-315, 2013.
7. Yokoyama U, Ishiwata R, Jin MH, Kato Y, Suzuki O, Jin H, Ichikawa Y, Kumagaya S, Katayama Y, Fujita T, Okumura S, Sato M, Sugimoto Y, Aoki H, Suzuki S, Masuda M, Minamisawa S, Ishikawa Y. Inhibition of EP4 signaling attenuates aortic aneurysm formation. *PLoS One* 7(5): e36724, 2012.
8. Yokota T, Aida T, Ichikawa Y, Fujita T, Yokoyama U, Minamisawa S. Low-dose thromboxane A2 receptor stimulation promotes closure of the rat ductus arteriosus with minimal adverse effects. *Pediatr Res* 72(2):129-36, 2012
9. Jin MH, Yokoyama U, Sato Y, Shioda A, Jiao Q, Ishikawa Y, Minamisawa S. DNA microarray profiling identified a new role of growth hormone in vascular remodeling of rat ductus arteriosus. *J Physiol Sci*. 61(3):167-79, 2011.

[学会発表](計 90 件)

1. Minamisawa S (シンポジスト), Yokoyama U, Ishikawa Y. cAMP medication for cardiovascular diseases. The 90<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2013.3.27-29, Tokyo)[*J Physiol Sci*: 63 (suppl 1), S34, 2013].
2. 南沢享、横山詩子、青木浩樹、中邨智之、石川義弘. Prostaglandin Eシグナルによる lysyl oxidase 分解亢進が動脈管弾性線維の形成不良を引き起こす. 生理学研究所研究会「心血管膜輸送分子の構造・機能・病態の統合的研究戦略」岡崎、生理学研究所 1 階大会議室. 2013. 11.27-28.
3. Minamisawa S, Yokoyama U, Ishiwata R, Sugimoto Y, Aoki H, Nakamura T, Ishikawa Y. Prostaglandin E2-EP4 Signaling Inhibits Vascular Elastic Fiber Formation in the Rodent Ductus Arteriosus. 2012 the American Society for Cell Biology Annual Meeting. San

Francisco, California. December 15-19, 2012.2

4. Liu N, Yokota T, Maekawa S, Yokoyama U, Kato T, Minamisawa S. The endothelial cells of ductus arteriosus have a unique gene profile to control vascular morphology. Experimental Biology 2012. San Diego, Apr.
5. Minamisawa S (シンポジスト). A comprehensive approach to understand the formation of the cardiovascular network (Overview). The 88<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2011.3.28-30, Yokohama) *J Physiol Sci*. 61(Suppl. 1):S25, 2011.

〔図書〕(計2件)

1. Minamisawa S, Yokoyama U. Recent advances concerning the molecular mechanism of patent ductus arteriosus. In: P. Syamasundar Rao (ed). Congenital Heart disease-Selected Aspects. InTech - Open Access Publisher, pp. 85-96, 1/18/2012. ISBN 979-953-307-058-1

〔その他〕

東京慈恵会医科大学 細胞生理学講座ホームページ

[http://sminamis.m38.coreserver.jp/Jikei\\_Cell\\_Physiology/Welcome.html](http://sminamis.m38.coreserver.jp/Jikei_Cell_Physiology/Welcome.html)

アウトリーチ活動

早稲田大学理工学術院主催のユニラブにて、2010年、2011年に小学生向けの心臓血管教室を開催した。

6. 研究組織

(1)研究代表者

南沢 享 (Minamisawa Susumu)  
東京慈恵会医科大学・細胞生理学・教授  
研究者番号：40257332

(2)研究分担者

横山 詩子 (Yokoyama Utako)  
横浜市立大学・医学研究科・講師  
研究者番号：70404994

合田 巨人 (Goda Nobuhito)  
早稲田大学・理工学術院・教授  
研究者番号：00245549

(3)連携研究者

石川 義弘 (Ishikawa Yoshihiro)  
横浜市立大学・医学研究科・教授  
研究者番号：40305470

中邨 智之 (Nakamura Tomoyuki)  
関西医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20362527

杉本 幸彦 (Sugimoto Yukihiro)

熊本大学・生命科学研究部・教授

研究者番号：80243038

青木 浩樹 (Aoki Hiroki)

久留米大学・循環器病研究所・教授

研究者番号：60322244