

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：22701
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2013
 課題番号：23791233
 研究課題名（和文）血管リモデリング促進による未熟児動脈管開存症の新規治療法開発

研究課題名（英文）Oxygen promoted bFGF-induced Intimal Thickening

研究代表者
 市川 泰広 (ICHIKAWA YASUHIRO)
 横浜市立大学・医学部・助教
 研究者番号：10555121

研究成果の概要（和文）：

動脈管の出生後の閉鎖には、内膜肥厚形成をはじめとする血管リモデリングが必須である。酸素による動脈管収縮の機序は明らかになっているが、内膜肥厚形成への作用は不明である。本研究では、出生後急激に上昇する酸素分圧が内膜肥厚形成を増強させるかどうか検証した。生後の酸素分圧の上昇が、bFGF の分泌を増加させた。ラットの成熟児に bFGF 中和抗体の投与により出生後動脈管内膜肥厚の形成が抑制された。また、bFGF をラットに投与すると、動脈管内膜肥厚が促進した。出生後の酸素化によって動脈管平滑筋細胞で bFGF が産生され、これによって動脈管の内膜肥厚形成をうながしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Postnatal patent ductus arteriosus (DA) is a major cause of morbidity and mortality in premature infants. The DA contracts immediately after birth in response to acute oxygenation and the withdrawal of placental prostaglandin. For complete closure, however, the DA region must also undergo intimal thickenings. It remains unknown how intimal thickening of the DA proceeds after birth. Here, we show that oxygenation induces basic fibroblast growth factor (bFGF) production in the DA *in vivo*. bFGF induced intimal thickening, leading to anatomical closure of the DA. bFGF with a low dose of cyclooxygenase inhibitor achieved the closure of preterm DA. Accordingly, oxygenation, in addition to inducing contraction, plays an important role in completing DA closure after prostaglandin removal. The current vasoconstrictor therapy may thus be combined with an inducer of postnatal intimal thickening, such as bFGF, to achieve permanent DA closure, especially in premature infants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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、bFGF、動脈管開存症

1. 研究開始当初の背景
 未熟児新生児医療の分野において救命率が飛躍的に向上した現在においても、未熟児動脈管開存症は超・極低出生体重児の生命予後を大きく左右する。現代の新生児医療の進歩

により早産児、低出生体重児の救命率は飛躍的に向上しているが、その反面、合併症の克服が患児の発達にとって非常に大きな問題となっている。動脈管開存症は 1000 グラム以下の低出生体重児のうち約 30%に合併する

罹患率の高い疾患であり、動脈管の開存は体血流の減少をもたらす循環不全となるため治療には急を要する。内科的治療薬であるプロスタグランジンE合成阻害薬は、在胎週数が短いと動脈管の未熟性から効果が得られない場合も多く、投与後の腎機能低下、低血糖、出血傾向などの副作用が多い。プロスタグランジン合成阻害剤で治療効果が得られない場合の外科的治療は超低出生体重児には一般的には不可能であり、手術にいたる場合でも周術期の管理が患児に多大なリスクを与える。これらのことが動脈管開存症の治療を困難にしている。つまり、より体重の少ない低出生体重児が救命されるようになった現在、副作用の少ない、効果的な未熟児動脈管開存症の治療法の開発が必要とされている。

2. 研究の目的

動脈管では胎生末期になると血管内膜が肥厚してくる。未熟児動脈管ではこの内膜肥厚の発達が不十分であることが知られている。成熟児の動脈管は、生後に血管が収縮ときに、この内膜肥厚が「のりしろ」のような働きをすることで、解剖学的に完全に動脈管が閉鎖するが、動脈管開存症ではこの内膜肥厚の発達が不十分であることも報告されており、**内膜肥厚の発達は動脈管の完全な閉鎖に必須の血管リモデリングであることは明らかである** (Mason CA, et al., Nat Med, 1999, Gittenberger-de Groot AC, et al., J Pediatr, 1980)。研究代表者の教室では、動脈管の内膜肥厚がプロスタグランジンEによって胎生後期に形成されることを明らかにしてきた (Yokoyama U, et al., J Clin Invest, 2006, highlighted in Science, 2006)。現在の血管収縮を目的としたプロスタグランジンE合成阻害薬の治療は、この動脈管内膜肥厚を同時に抑制するために、未熟児動脈管開存症で治療効果を十分に上げられない可能性が高く、他に動脈管の内膜肥厚を誘導する治療は現在存在しない。これらの背景から、本研究では、動脈管の内膜肥厚を促進する新たな未熟児動脈管開存症に対する治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 未熟児動脈管組織を用いて器官培養を行い、bFGFの内膜肥厚促進作用を検討する。
(*ex vivo*)

bFGFが動脈管の内膜肥厚を誘導するかどうかを、*ex vivo*で検討する。生体内は複数の要素が混在しており、bFGFが内膜肥厚を誘導したとしても、直接の因果関係として結論できないために、はじめに本課題を行う。胎生21日でラットは出生するため、胎生19日のラットを未熟児として使用する。胎生

19日のラットは内膜肥厚の発達がほとんど見られず、未熟な動脈管として実験に使用されてきている (Yokoyama U, et al., Circ Res, 2010, J Clin Invest, 2006 他)。胎生19日のラットから動脈管を摘出し、リコンビナントbFGFを添加した群としない群に分け、平滑筋培養用の培地で3日間培養する。その後組織を固定し、パラフィン切片を作製し、エラスチカ染色で弾性線維を染色する。内弾性板より内側の内膜肥厚の部分をImage Jソフトウェアで解析し、中膜平滑筋層に対する内膜肥厚の面積を算出して、bFGFによる内膜肥厚形成の促進の程度を計測する。

(2) bFGFを未熟児ラットに投与し、動脈管の内膜肥厚形成の程度を検討する。
(*in vivo*)

次に、リコンビナントbFGFを未熟児ラットに腹腔内投与し、時系列に沿って内膜肥厚形成の程度を検討する。

未熟児ラットは胎生19日を使用するが、母体の帝王切開後に、肺が未熟であるために新生児が生存できない場合には、胎生19.5日または胎生20日を使用する。胎生20日で出生したラット新生児でも、成熟児に比べて内膜肥厚が低形成であることはすでに確認している。リコンビナントbFGFの量は*in vivo*で他の報告で使用されている濃度を参考に体重1mg当たり1・gを中心に濃度を4種類かえて投与する。出生後に呼吸が安定してからリコンビナントbFGFを投与し、投与後15分、30分、1時間、3時間で組織を固定し、パラフィン切片を作製してエラスチカ染色を行う。前述の方法で内膜肥厚の程度を定量して統計学的に検討する。

bFGFとインドメタシンの同時投与が未熟児動脈管を閉鎖に導くかを検討する。
(*in vivo*)

初年度の実験からbFGFがラット未熟児動脈管の内膜肥厚形成を促進することが明らかになれば、引き続き、bFGF動脈管の閉鎖効果を検討する。臨床では、インドメタシンの血管収縮効果は明らかに認められるものの、腎血流の低下などの副作用のためにインドメタシンの使用を中止せざるを得ないことがある。本研究では、未熟児動脈管開存症に対するbFGFとインドメタシンの併用効果を検討することに加えて、内膜肥厚を誘導するbFGFを併用することで、インドメタシンの投与量を減量できないかを検討する。

はじめに、インドメタシンの投与量をヒトの投与量から換算してもとめ、胎生19日または20日のラット新生児に腹腔内投与を行う。投与後15分、30分、1時間、3時間後に組織を固定し、パラフィン切片を作製しエラスチカ染色を行って動脈管の内腔の開存している断面積をImage Jソフトウェアで計測する。これらの実験で、十分に動脈管を閉鎖できるインドメタシンの量を決定し、その10分の一までのインドメタシンの量を

bFGF と併用する際に使用する。単独では動脈管の閉鎖効果が十分ではないインドメタシンの量を用いて、リコンビナント bFGF を胎生 19 日または 20 日のラット新生児に同時に投与する。投与後時間を追って組織を順次固定し、エラスチカ染色にて内膜肥厚の程度と、開存している部分の断面積を計測し、統計処理を行う。各実験においては 6 匹以上のサンプルを検討することを予定している。

これらの実験により、bFGF とインドメタシンのラット未熟児動脈管の閉鎖に対する併用効果が認められ、さらに bFGF の併用によりインドメタシンの投与量を減らすことができる、という結果が得られることが期待される。組織学的な手法や、動物実験の手順は初年度に行うものと同様であり、技術的な困難は予想されない。

4. 研究成果

(1) H23 年度は以下の 2 つの解析を行った。

① 未熟児動脈管組織を用いて器官培養を行い、bFGF の内膜肥厚促進作用を検討した。

(ex vivo) bFGF が動脈管の内膜肥厚を誘導するかどうかを、ex vivo で検討。

胎生 21 日でラットは出生するため、胎生 19 日のラットを未熟児として使用した。胎生 19 日のラットから動脈管を摘出し、リコンビナント bFGF を添加した群としない群とに分け、平滑筋培養用の培地で 3 日間培養後、エラスチカ染色で弾性線維を染色し解析した。bFGF を投与した群で動脈管内膜肥厚促進作用が確認できた。

② bFGF を未熟児ラットに投与し、動脈管の内膜肥厚形成の程度を検討した。(in vivo) リコンビナント bFGF の量は in vivo で他の報告で使用されている濃度を参考に体重 1mg 当たり 1 μ g を中心に濃度を 4 種類かえて投与した。出生後に呼吸が安定してからリコンビナント bFGF を投与し、投与後組織を固定しパラフィン切片を作製してエラスチカ染色を行い解析した。器官培養と同様に、ラット投与モデルでも bFGF による動脈管内膜肥厚作用が観察された。」

以上の結果より bFGF が動脈管内膜肥厚因子であることが強く示唆された。

(2) H24 年度は以下のように bFGF とインドメタシンとの併用効果について検討した。

臨床では、インドメタシンの動脈管収縮効果は明らかに認められるものの、腎血流の低下などの副作用のためにインドメタシンの使用を中止せざるを得ないことがある。未熟児動脈管開存症に対する bFGF とインドメタシンの併用効果を検討することに加えて、内膜肥厚を誘導する bFGF を併用することで、インドメタシンの投与量を減量できないかを検討した。単独では動脈管の閉鎖効果が十分ではないインドメタシンの量を用いて、リコンビナント bFGF を胎生 19 日または 20 日

のラット新生児に同時に投与した。インドメタシンと bFGF 同時投与群のほうが内膜肥厚が促進されていた。

以上より bFGF が未熟児動脈管の内膜肥厚形成を促進し、インドメタシンと併用でも動脈管閉鎖効果がみられた。

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 6 件)

1. Ichikawa Y, Yokoyama U, Iwamoto M, Oshikawa J, Okumura S, Sato M, Yokota S, Masuda M, Asou T, Ishikawa Y, Inhibition of Phosphodiesterase Type 3 Dilates the Rat Ductus Arteriosus Without Inducing Intimal Thickening, 2012 ;76(10):2456-64 *Circ J* (査読有)

2. 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, 2012 ;7(5):e36724. *PLoS One*. (査読有)

3. 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, *Pediatric Res*, 2012;72(2):129-36 (査読有)

4. Kobayashi Y, Hirawa N, Tabara Y, Muraoka H, Fujita M, Miyazaki N, Fujiwara A, Ichikawa Y, Yamamoto Y, Ichihara N, Saka S, Wakui H, Yoshida S, Yatsu K, Toya Y, Yasuda G, Kohara K, Kita Y, Takei K, Goshima Y, Ishikawa Y, Ueshima H, Miki T, Umemura S. Mice lacking hypertension candidate gene ATP2B1 in vascular smooth muscle cells show significant blood pressure elevation, 2012 ;59(4):854-60. *Hypertension* (査読有)

5. Bai Y, Tsunematsu T, Jiao Q, Ohnuki Y, Mototani Y, Shiozawa K, Jin M, Cai W, Jin HL, Fujita T, Ichikawa Y, Suita K, Kurotani R, Yokoyama U, Sato M, Iwatsubo K, Ishikawa Y, Okumura S, Pharmacological Stimulation of Type 5 Adenylyl Cyclase Stabilizes Heart Rate Under Both Microgravity and Hypergravity Induced by Parabolic Flight, 2012;119(4):381-9, *J Pharmacol Sci*. (査

読有)

6. **Ichikawa Y**, Iwamoto M, Yanagi S, Masuda M, Intrapericardial and Retrocardial Implantation of Implantable Cardioverter Defibrillator Lead in a Child with Type 3 Long QT Syndrome, 2011, 32 (7): 1048-52, *Pediatric Cardiology*. (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

1. **Ichikawa Y**, Yokoyama U, Masuda M, Asou T, Ishikawa Y, Inhibition of Phosphodiesterase Type 3 Dilates the Rat Ductus Arteriosus without Inducing Intimal Thickening, 2012年11月6日、ロサンゼルス、アメリカ、**アメリカ心臓病学会 (AHA)**、口演

2. **市川泰広**、横山詩子、岩本眞理、南沢亨、石川義弘、出生後における肺の弾性線維形成の検討、2012年7月5日、京都国際会議場(京都)、**第48回日本小児循環器学会**、口演

3. **Ichikawa Y**, Yokoyama U, Masuda M, Asou T, Ishikawa Y, Phosphodiesterase Type 3 Inhibitor, Milrinone, Dilates the Rat Ductus Arteriosus without Inducing Intimal Thickening, 2012年5月21日、ソウル、韓国、**8th Asian Society for Pediatric Research**、口演 (YIA 受賞)

4. **Ichikawa Y**, Yokoyama U, Ishikawa Y, Inhibition of PDE3 dilates the ductus arteriosus without forming intimal thickening, 2012年3月17日、福岡国際会議場(福岡)、**第76回日本循環器学会**、口演 (Featured research session で発表)

5. **市川泰広**、PDE3 阻害薬は内膜肥厚を起さずに動脈管を拡張させる、2011年8月20日、横浜市立大学(神奈川)、合同夏季研修会、口演

6. **市川泰広**、青木理加、岩本眞理、南沢亨、横山詩子、石川義弘、出生後の血清浸透圧の変化が動脈管収縮に及ぼす作用の検討、2011年7月6日、福岡国際会議場(福岡)、日本小児循環器学会、ポスター

7. **市川泰広**、金晶恵、咲間裕之、西澤崇、岩本眞理、難治性上室性頻拍に対するアミオダロン使用例の検討、2011年7月6日、福岡国際会議場(福岡)、日本小児循環器学会、ポスター

[その他]
ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市川 泰広 (ICHIKAWA YASUHIRO)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：10555121