

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293249

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) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：動脈管閉鎖の分子機構を解明し、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。我々は、動脈管が閉塞すべき運命にある血管として、特徴的な血管構造と機能を有していることに注目し、「動脈管の分化・成熟を制御する分子機構を詳細に解明すること」を目的とした。その結果、1) NFκB抑制により動脈管閉鎖が促進されること、2) 動脈血の酸素化によって内膜肥厚促進やエラスチン分泌の減少など、動脈管リモデリングに影響を及ぼすこと、3) トロンボキサンA2が動脈管閉鎖を促進すること、4) リポ多糖による胎内感染ラット新生仔動脈管では、動脈管閉鎖が遅延すること、が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The ductus arteriosus (DA) is essential for fetal circulation and closes immediately after birth. It is very important to investigate the molecular mechanism of DA closure. In addition to the well-known vasodilatory role of PGE2, we previously found that PGE2-EP4 signal plays a critical role in characterizing the DA structure. In the present study, we found that 1) NFκB inhibition promoted DA closure, 2) Oxygenation in blood after birth promoted intimal cushion formation and decreased secretion of elastin from DA smooth muscle cells, 3) Thromboxane A2 promoted DA closure, 4) Lipopolysaccharide delays closure of the rat DA by induction of inducible nitric oxide synthase but not prostaglandin E2. Our studies emphasize that a better understanding of DA vascular remodeling could encourage the design and development of novel pharmacological treatments for patients with patent DA or DA-dependent congenital heart diseases.

研究分野：発達循環生理学

キーワード：未熟児 新生児 先天性心疾患 vascular remodeling プロスタグランジン 血管内皮細胞 弾性線維  
周産期ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

動脈管は胎生期にのみ開存し、生直後の肺呼吸の開始とともに閉塞にむかう。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、索状の線維性組織(解剖学的閉鎖)へと変化する。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。これらの構造変化は、内腔の狭小化や血管の弾力性低下をきたし、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。一方、未熟児動脈管や先天性動脈管開存症では、内膜肥厚の低形成や弾性線維の大動脈化が認められることが知られている。さらに動脈管は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分かっている。

従来の動脈管研究は、主に機能的な血管収縮弛緩機序について、生理学的・薬理学的な取り組みによって進められてきた。一方、動脈管に特徴的な血管リモデリングを生じる機序に関しては、国外において、細胞外基質フィブロネクチンの発現を阻害し、血管内膜肥厚を抑制して動脈管開存状態に保つという研究 (Mason CA, et. al. *Nat Med* 1999) や血小板血栓形成が動脈管閉鎖に重要な役割があるという研究 (Echtler K, et. al. *Nat Med* 2010) が報告されているが、不明な点が多く残されている。我々は PGE<sub>2</sub> がその特異的受容体 EP4 を介して、動脈管血管内膜肥厚を促進すること及び動脈管弾性線維の形成不良の主因となることを先行研究で明らかにした。このことは PGE<sub>2</sub>-EP4 シグナルが、動脈管拡張という機能的役割以外に、血管組織のリモデリングを促し、動脈管の解剖学的閉鎖に対して促進的な役割を担うことを示しており、「動脈管の恒久的な閉鎖には機能的閉鎖のみならず、構造的分化が重要である」ことが明らかとなった。こうした我々の先行研究は、PGE<sub>2</sub>-EP4 シグナルが細胞外基質の組成を変化させ、動脈管リモデリングを促すという、新たな制御機序を示してはいたが、動脈管細胞外基質についてはまだ十分に機能が調べられていない分子が多く残されてい宅ファイル。さらに PGE<sub>2</sub>-EP4 の下流シグナルは cAMP 経路と非 cAMP 経路が多岐に分かれて、異なる血管リモデリングを起こすことが明らかとなったが、非 cAMP 経路には未解決の課題が残されていた。一方、PGE<sub>2</sub>-EP4 刺激のように動脈管の血管トーンに影響する他の因子がリモデリングに果たす役割の検討は、世界的にも殆どなされていない。また、我々は世界に先駆けて動脈管内皮細胞の網羅的遺伝子発現プロファイルを明らかにし、動脈管内皮細胞特異的な遺伝子が動脈管特有の構造や機能に参与している可能性は高いが、それら遺伝子の役割について、詳細な検討には到っていなかった。以上、我々の先行研究の成果を基に本研究が立案された。

## 2. 研究の目的

未熟児や先天性心疾患患児では、胎生期特有の血管である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。我々は、動脈管が将来閉塞すべき運命にある血管として、隣接する大動脈や肺動脈などの大血管には見られない血管構造と機能を有していることに注目し、その分子機序の解明を目指し、本研究では、「動脈管の分化・成熟を制御する分子機序を詳細に解明すること」を目的とした。さらに最終的には、動脈管の閉鎖・開存を制御する分子機序に基づいた新たな治療法を開発・確立することを目指す。

## 3. 研究の方法

1). PGE<sub>2</sub>-EP4 刺激下における非 cAMP 経路の動脈管閉鎖機序の解明: 先行研究の結果、PGE<sub>2</sub>-EP4 刺激によって、cAMP を介さずに動脈管閉鎖を制御するシグナル経路の存在 (Src-PLC 経路や NFκB 経路など) が示唆された。本研究でさらに詳細な NFκB 経路が動脈管閉鎖に果たす役割を検討した。

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因子の同定: PGE<sub>2</sub>-EP4 シグナルが機能的閉鎖と解剖学的閉鎖に影響する様に、動脈管の収縮(機能的閉鎖)を促すと考えられている因子(酸素、トロンボキサン A2) が、動脈管リモデリングにも関与しているか否かを検討した。また、ニワトリには PGE<sub>2</sub> の供給源である胎盤が存在しないため、ニワトリ胚動脈管での動脈管リモデリングには PGE<sub>2</sub> 以外の因子が関与することが想定される。そこでニワトリ胚動脈管での動脈管リモデリング因子を探索した。

3). 動脈管細胞外基質のリモデリングに果たす役割の解明: 動脈管ではヒアルロン酸・フィブロネクチンの蓄積、弾性線維の低形成が認められ、細胞外基質の組成の違いが動脈管特性を規定している。本研究では、その他の細胞外基質も含めて、血管リモデリングに重要な基質の同定とその役割の解明を行った。

## 4. 研究成果

### 1). NFκB 経路が動脈管閉鎖に果たす役割

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。そこで動脈管の閉鎖に NFκB 経路が如何に関与しているのかを検討するため、NFκB inhibitor である IMD-0354 を用

いて、ラット胎仔の動脈管組織を IMD- 0354 で刺激し、動脈管の形態変化を観察した。その結果、IMD- 0354 によって動脈管が著しく閉鎖する事を見出した。

## 2). 酸素が動脈管閉鎖に果たす役割

低酸素下(酸素 1%)及び正常酸素下(酸素 21%)の条件で培養したラット動脈管平滑筋細胞の上清を回収し、中の分泌タンパク質を網羅的に調べた。回収した細胞上清を Centrifugal Filter Units (MILLIPORE)を用いて濃縮し、濃縮細胞上清から標本あたりタンパク量 0.2µg を使い、LC-MS/MS を用いて質量分析を行った。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、パ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。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と、動脈管平滑筋細胞においてエラスチン mRNA、トロポエラスチン蛋白質の発現が減少する事が判明した(発表論文 5)。

さらに、出生後の血液中酸素濃度上昇に伴い、酸化ストレスによって、平滑筋から塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)が分泌し、細胞遊走能・内膜肥厚が促進することを見出した。これらの結果から、胎生期から出産後における酸素化は、動脈管収縮ばかりではなく、血管リモデリングに関与していることを見出した。

## 3). トロンボキサン A2 が動脈管閉鎖に果たす役割

PGE<sub>2</sub>と同様にアラキドン酸から生成される脂質メディエータの一つであるトロンボキサン A2 の動脈管に及ぼす影響を検討した。トロンボキサン A2 受容体である TP は、胎生期ラット動脈管で優位に発現し、TP アゴニストである U46619 は、成熟した胎生末期だけでなく、未成熟な胎生後期ラット動脈管も強力に収縮させた。また、U46619 はラット動脈管の内膜肥厚形成も促進させた。一方、U46619 は、低濃度であれば腎動脈や腸間膜動脈への収縮作用は弱かった。これらの結果から、TP アゴニストは機能的及び解剖学的にも動脈管を閉鎖させる作用を有することが明らかになった(発表論文 8)。

## 4). ニワトリ胚動脈管での動脈管リモデリング因子

孵卵 19 日目(embryo 19 ; e19), 20 日目(孵化前期 internal pipping ; IP)、21 日目(孵化後期 external pipping ; EP)のニワトリ胚と出生後 1 日以内のヒナから動脈管を採取し、組織学的評価試験を行った。Elastica van Gieson 染色と HE 染色を、肺動脈側動脈管、大動脈側動脈管について行った。その結果、肺動脈側動脈管では e19 から弾性組織の断片化が、さらに IP 以降には内腔側に新生内膜に似た構造が観察された。また、意外にもニワトリ胚の血中プロスタグランジン E 値はラット胎仔と同等以上であり、ニワトリ胚でも

プロスタグランジン E が動脈管のリモデリングに影響を及ぼすことが示唆された。

## 5). PGE<sub>2</sub> 刺激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、PGE<sub>2</sub> 刺激の有無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、PGE<sub>2</sub> 刺激により動脈管平滑筋細胞から分泌される Nov/CCN3、ファイブロネクチン、パイグリカン、Follistatin-like 1 の分泌が非刺激下の培養条件でと比較して有意に増加する事が分かった。これらは細胞外マトリックスの主要構成因子であり、血管のリモデリングに関与す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、PGE<sub>2</sub> 刺激により動脈管平滑筋細胞において Nov/CCN3 mRNA、Nov/CCN3 蛋白質の発現が増加する事を確認した。

## 6). 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(発表論文 7)。

## 7). 胎内感染が動脈管閉鎖に及ぼす影響

グラム陰性菌細胞膜の構成成分であるリポ多糖(lipopolysaccharide: LPS)を母体に投与すると絨毛膜炎が生じる。そこで LPS 投与による新生仔動脈管閉鎖遅延モデルを作成した。LPS による胎内感染ラット新生仔動脈管では、TNF- $\alpha$  及び iNOS の発現が上昇していた。さらに、NOS 阻害剤である L-NAME は、LPS の母体内投与による動脈管閉鎖遅延を改善した(発表論文 2)。これらの結果から、胎内感染による動脈管閉鎖遅延は、一酸化窒素シグナル伝達経路と強く関連していることが示唆された。

## 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. Yokoyama U, Y Ichikawa, Minamisawa S, Ishikawa Y. Pathology and molecular mechanisms of coarctation of the aorta and its association with the ductus arteriosus. *J Physiol Sci* 67(2):259-270, 2017. doi: 10.1007/s12576-016-0512-x.
2. Kajimura I, Akaike T, Minamisawa S. Lipopolysaccharide delays closure of the rat ductus arteriosus by induction of inducible nitric oxide synthase but not prostaglandin E<sub>2</sub>. *Circ J*. 80(3):703-11, 2016. doi: 10.1253/circj.CJ-15-1053.
3. 南沢享: 動脈管閉鎖の分子機序解明にむけ

- て. 日本小児循環器学会雑誌 32 (1): 2-8, 2016. doi: 10.9794/jspccs.32.2
4. 赤池徹, 梶村いちげ, 横山詩子, 南沢享. 動脈管閉鎖のメカニズム—分子機序に基づく治療への再考—. 日本小児科学会雑誌 120 (10): 1444-52, 2016.
  5. Kawakami S, Minamisawa S. Oxygenation decreases elastin secretion from rat ductus arteriosus smooth muscle cells. *Ped Int* 57(4):541-5. 2015. doi: 10.1111/ped.12684.
  6. 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.
  7. 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.
  8. 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.
  9. Aoki R, Yokoyama U, Ichikawa Y, Taguri M, Kumagaya S, Ishiwata R, Yanai C, Fujita S, Umemura M, Fujita T, Okumura S, Sato M, Minamisawa S, Asou T, Masuda M, Iwasaki S, Nishimaki S, Seki K, Yokota S, Ishikawa Y. Decreased serum osmolality promotes ductus arteriosus constriction. *Cardiovasc Res* 104(2):326-36, 2014. doi: 10.1093/cvr/cvu199

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Minamisawa S (シンポジスト). The novel role of prostaglandin E in vascular remodeling: a lesson from ductus arteriosus. 7th Scientific Meeting of Asian Society for Vascular Biology. Buddhist Tzu Chi Medical Center, Hualien, Taiwan, October 27-29, 2016.
2. Akaike T, Minamisawa S. A sarcoplasmic Reticulum Localized Protein Phosphatase Targets Phospholamban Threonine-17 Phosphorylation and Regulates Ischemia-Reperfusion Injury. 第 33 回国際心臓研究学会日本部会 (ISHR2016). 東京. 12 月. (ポスター)
3. Fujimoto Y, Urashima T, Akaike T, Kusakari Y, Minamisawa S. Intrapulmonary venous remodeling caused by pulmonary hypertension due to left atrium stenosis in rats. 第 33 回国際心臓研究学会日本部会 (ISHR2016). 東京. 12 月. (口頭)
4. Yokota T, Zhang Q, Ding Y, Minamisawa S, Hsiai T, Kulkarni R, Xiao X, Wang Y. p38 MAP Regulates Chamber Specific Postnatal

- Remodeling of Cardiac Ventricles. 第 33 回国際心臓研究学会日本部会 (ISHR2016). 東京. 12 月. (口頭)
5. 赤池徹, 横田知大, 梶村いちげ, 横山詩子, 南沢享. プロスタノイドの動脈管閉鎖における役割. 第 51 回日本小児循環器学会総会・学術集会. 東京. 7 月. (口頭)

〔図書〕(計 1 件)

1. Liu N-M, Minamisawa S. Unique phenotypes of endothelial cells in developing arteries: A lesson from the ductus arteriosus. In: Dan Simionescu and Agneta Simionescu (ed). Physiologic and Pathologic Angiogenesis - Signaling Mechanisms and Targeted Therapy. InTech - Open Access Publisher, pp. 85-96, ISBN 978-953-51-3024-6, Print ISBN 978-953-51-3023-9, DOI: 10.5772/64121.

〔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

中学生を対象に、ひらめき ときめきサイエンス(研究成果の社会還元・普及事業)課題: 働き者の心臓を見て、触って、聴いて、知りつくそう、を 2014 年、2015 年、2016 年に実施した。

## 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 2014 年のみ

赤池 徹 (Akaike Toru)  
 東京慈恵会医科大学・細胞生理学・助教  
 研究者番号: 70404994

(3) 連携研究者

森田 紀代造 (Morita Kiyozou)  
 東京慈恵会医科大学・心臓外科・教授  
 研究者番号: 70174422

浦島 崇 (Urashima Takashi)  
 東京慈恵会医科大学・小児科・講師  
 研究者番号: 20338875

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

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

2015,2016 年のみ

赤池 徹 (Akaike Toru)  
東京慈恵会医科大学・細胞生理学・助教  
研究者番号： 70404994

(4)研究協力者

梶村 いちげ (Kajimura Ichige)  
東京慈恵会医科大学・細胞生理学・大学院生

藤井 輝之 (Fujii Teruyuki)  
東京慈恵会医科大学・麻酔科・大学院生

久我 和寛 (Kuga Kazuhiro)  
東京慈恵会医科大学・細胞生理学・大学院生

藤本 義隆 (Fujimoto Yoshitaka)  
東京慈恵会医科大学・小児科・大学院生

河内 文江 (Kawachi Fumie)  
東京慈恵会医科大学・小児科・大学院生

志村 大輔 (Shimura Daisuke)  
早稲田大学・先進理工学研究科・大学院生