



## 薬の名前

# ステムを知れば薬がわかる

Stems used in drug names : For the better understanding of pharmacological actions of drugs

### 第15回

国立医薬品食品衛生研究所

内田恵理子, 川崎ナナ

ERIKO UCHIDA, NANA KAWASAKI

National Institute of Health Sciences

名古屋市立大学大学院薬学研究科

宮田直樹

NAOKI MIYATA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University

## はじめに

第14回(本誌2007年9月号)では, 抗悪性腫瘍作用を有する医薬品を示すステムとして,

「-citabine」:ヌクレオシド系抗ウイルス薬・抗悪性腫瘍薬(シタラビン・アザシチジン誘導體)

「-mestane」:アロマトーゼ阻害薬

「-rozole」:イミダゾール/トリアゾール系アロマトーゼ阻害薬

「-bulin」:有糸分裂阻害作用を有するチューブリン結合性抗悪性腫瘍薬

「-platin」:白金錯体系抗悪性腫瘍薬

「-quidar」:キノリン誘導體系多剤耐性阻害薬

「-racil」:ウラシル系抗悪性腫瘍薬

を紹介した。

今回は, 生物薬品の第5回目として, 血液凝固因子および抗凝固作用を持つ生物薬品のステムを紹介する。

血液凝固は, 血液凝固因子と呼ばれる血漿中の一団の分子が関与して起こる止血反応であり, 1つの凝固因子の活性化により一連の凝固因子が次々と活性化される血

液凝固カスケードにより引き起こされる(図1)。血液凝固カスケードには, 外因系凝固と内因系凝固の2種類がある。外因系凝固は, 組織の損傷により血漿中の活性化第Ⅶ因子(第Ⅶa因子)が血管外の組織因子と結合することにより開始する。内因系凝固は, 露出した血管内皮のコラーゲンやガラスなどの異物面(陰性荷電表面)に血漿中の第Ⅻ因子が接触して活性化することで開始する。外因系凝固, 内因系凝固とも, 第Ⅸ因子, 第Ⅹ因子の活性化以降の経路は共通である。最終的に生成したトロンビンがフィブリノーゲンを限定分解してフィブリンを形成し, さらにトロンビンにより活性化された第Ⅻ因子がフィブリン間を架橋して血液凝固は完了する。

一方, 生体内には血液凝固反応の過剰な進行を防ぐため, 凝固反応の制御因子が存在する。血液中の凝固阻止因子には, アンチトロンビンⅢやプロテインCなどが, 血管内皮表面の凝固阻止因子には, トロンボモジュリンや組織因子経路インヒビターなどがある。

これらの血液凝固因子や凝固阻止因子の一部は医薬品として用いられており, 従来はヒトの血漿から分画・精製した血漿分画製剤が使用されてきた。しかし, 血漿分画製剤によるウイルス等の感染性因子伝播の危険性を避

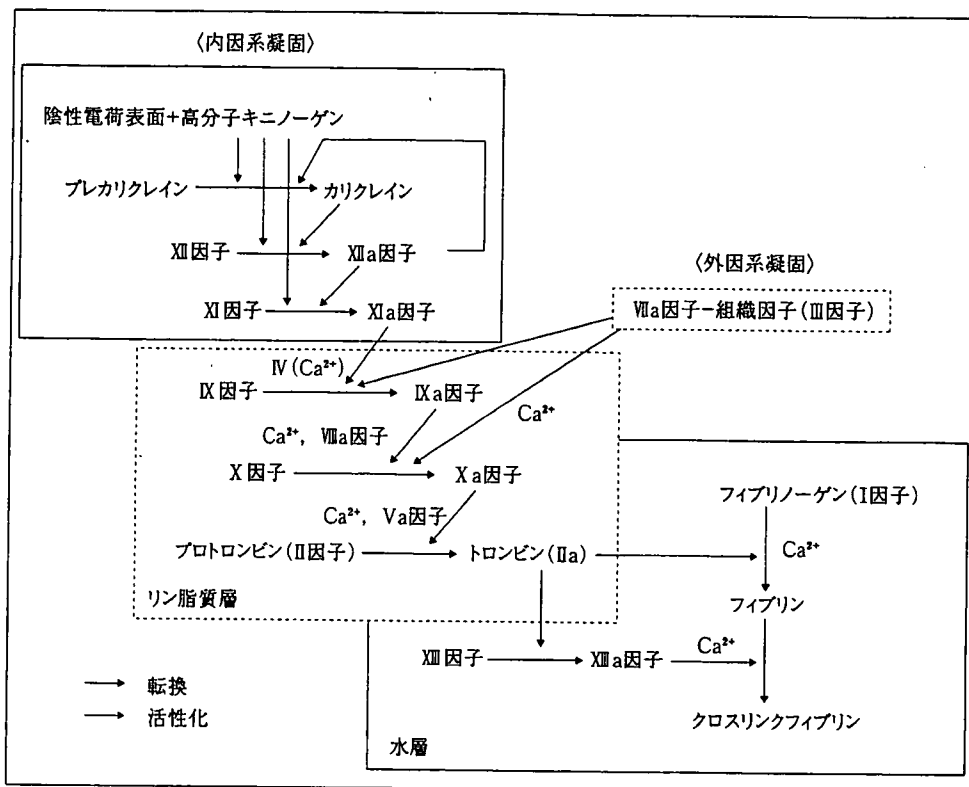


図1 血液凝固カスケード

けるために、これらに対応する遺伝子組換え医薬品が開発されてきている。なお、天然の血液製剤については、生物学的製剤基準による名称が使用されている。今回は、血液凝固因子、および、凝固阻止因子や抗凝固作用を持つ生物薬品のうち、ステムやINNが定義されている医薬品を中心に紹介する。

### 「-cog」：血液凝固因子類

「-cog」は、遺伝子組換え技術により製造される血液凝固因子類(blood coagulation factors)に共通のステムである。INNでは現在までに、第VII因子、第VIII因子、第IX因子に対応するサブステムとしてそれぞれ「-eptacog」, 「-octocog」, 「-nonacog」が決められている。アミノ酸配列が天然型と異なる場合は、接頭語を付けて表す。また、糖タンパク質の場合には、Alfa, Beta等を付けて区別する。さらに、活性型の血液凝固因子が医薬品である場合は、一般名の後に括弧書きで(Activated)(活性型)と表す、というINNのルールが定められている。

#### (1)「-eptacog」：血液凝固第VII因子

「-eptacog」は、遺伝子組換え技術により製造される血液凝固第VII因子を表すステムである。

第VII因子は、Ca<sup>2+</sup>との結合性を有するビタミンK依存性セリンプロテアーゼ前駆体であり、406個のアミノ酸残基からなる分子量約50,000の一本鎖糖タンパク質として肝臓で産生される。N末端から順に、γ-カルボキシグルタミン酸(Gla)に富むGlaドメイン、EGF様ドメイン、セリンプロテアーゼドメインからなる。第VII因子は、第Xa因子、第IXa因子、トロンピン、第XIIa因子などにより活性化され、Arg152とIle153の間が切断されて、GlaドメインおよびEGF様ドメインからなるL鎖とセリンプロテアーゼドメインからなるH鎖がジスルフィド結合で結ばれた2本鎖型の第VIIa因子(図2)に転換される。第VIIa因子は、外因系凝固経路における重要な凝固因子であり、局所の損傷部位で、Ca<sup>2+</sup>存在下、組織因子と複合体を形成し、第IX因子および第X因子を活性化する(図1)。

ステム「-eptacog」を持つ医薬品として、日本ではEptacog Alfa(Activated)(エプタコグ アルファ(活性型))が承認されている。エプタコグ アルファ(活性型)は、

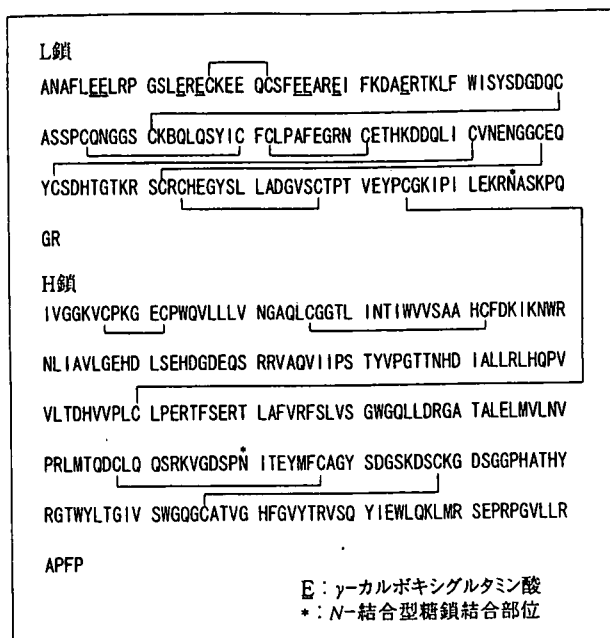


図2 血液凝固第Ⅶa因子の構造

ヒト第Ⅶ因子の遺伝子を導入したベビーハムスター腎臓(BHK)細胞で製造した第Ⅶa因子である。血友病患者では、急性出血時の止血管理に第Ⅷ因子または第Ⅸ因子製剤による補充療法が用いられる。しかし、反復投与により第Ⅷ因子または第Ⅸ因子に対する抗体(インヒビター)ができてしまうと補充療法は無効となり止血管理が困難となる。第Ⅶa因子は、血液循環中では不活性だが、損傷部位で局所的に組織因子と複合体を形成し、直接第Ⅹ因子を第Ⅹa因子に活性化する。したがって、第Ⅶa因子は、第Ⅷ因子や第Ⅸ因子に対するインヒビターを保有する血友病患者でも局所での止血が可能である。エプタコグ アルファは、インヒビターを保有する先天性血友病および後天性血友病患者の出血抑制を適応として2000年に承認されている。また、脳内出血への適応拡大について現在臨床試験中である。

## (2)「-octocog」：血液凝固第Ⅷ因子

遺伝子組換え技術により製造される血液凝固第Ⅷ因子を表すシステムは、「-octocog」である。

第Ⅷ因子は、2,332個のアミノ酸残基からなる分子量約330kDaの糖タンパク質であり、一次構造上の相同性からN末端より順に、A1(1~328)、A2(380~711)、B(740~1648)、A3(1649~2019)、C1(2020~2172)、C2(2173~2332)というドメイン構造をとる。トロンビンにより活性化され、Bドメインがはずれて第Ⅶa因子となる。

第Ⅶa因子は第Ⅸa因子の補酵素であり、第Ⅸa因子、リン脂質、Ca<sup>2+</sup>と複合体を形成し、第Ⅹ因子の活性化を促進することで血液凝固に関与している(図1)。血友病A患者は、X染色体上にある第Ⅷ因子の遺伝子異常により、生涯にわたる出血傾向を示す先天性第Ⅷ因子欠損症である。

なお、天然の血漿分画製剤では、「乾燥人血液凝固第Ⅷ因子」が、第Ⅷ因子欠乏患者の出血傾向抑制を適応として承認されている。

ステム「-octocog」を持つ医薬品として、日本ではOctocog Alfa(オクトコグ アルファ)、Rurioctocog Alfa(ルリオクトコグ アルファ)の2品目が承認されている。

オクトコグ アルファは、ヒトT細胞ハイブリドーマのmRNAに由来するヒト第Ⅷ因子cDNAを導入したBHK細胞で産生される2,332個のアミノ酸残基からなる糖タンパク質(分子量:300,000~350,000)である。一方、ルリオクトコグ アルファは、ヒト肝細胞のmRNAに由来するヒト第Ⅷ因子cDNAを導入したチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞で産生される2,332個のアミノ酸残基からなる糖タンパク質(分子量:300,000~350,000)であり、オクトコグ アルファとは遺伝子多型によりアミノ酸残基1カ所(1,241番目)が異なる。オクトコグ アルファは1993年、ルリオクトコグ アルファは1996年に、いずれも血友病A患者の出血傾向の抑制を適応として承認されている。

その他、INNにはMoroctocog Alfa, Beroctocog Alfaが収載されている。Moroctocog Alfaは、CHO細胞で製造したBドメイン欠損型遺伝子組換え第Ⅷ因子製剤で、第Ⅷ因子の1~1,648番目のアミノ酸残基のうち743~1,636番目が欠損した90kDaのペプチドと1,649~2,332番目からなる80kDaのペプチドのヘテロ2量体からなる糖タンパク質である。血友病A患者の出血の治療、予防薬として欧州で1999年に承認されているが、日本では未承認である。Beroctocog Alfaも、Bドメイン欠損型遺伝子組換え第Ⅷ因子製剤で、第Ⅷ因子のアミノ酸残基のうち1~740番目のペプチドと1,649~2,332番目のペプチドのヘテロ2量体である。Beroctocog Alfaは、最近INNに収載された品目で、海外でも未承認である。

## (3)「-nonacog」：血液凝固第Ⅸ因子

「-nonacog」は、遺伝子組換え技術により製造される血液凝固第Ⅸ因子を表すシステムである。

第Ⅸ因子は、ビタミンK依存性のセリンプロテアーゼ

前駆体であり、415個のアミノ酸残基からなる分子量約55kDaの一本鎖の糖タンパク質として肝臓で産生される。N末端から順に、Glaドメイン、EGF様ドメイン、活性化ペプチド、セリンプロテアーゼドメインからなる。第IX因子は、VIIa因子、組織因子、リン脂質、Ca<sup>2+</sup>の複合体(外因系凝固)またはCa<sup>2+</sup>存在下、XIa因子(内因系凝固)により開裂して、分子量約11kDaの活性化ペプチドが遊離し、27kDaのH鎖と17kDaのL鎖がジスルフィド結合で結ばれた2本鎖型の第IXa因子が生成される。第IXa因子は、第VIIa因子、リン脂質、Ca<sup>2+</sup>と複合体を形成し、X因子を活性化することで血液凝固に関与する(図1)。血友病Bは、X染色体上にある第IX因子の遺伝子異常により生涯にわたる出血傾向を示す先天性第IX因子欠損症である。

ステム「-nonacog」を持つJAN品目にはNonacog Alfa(ノナコグ アルファ)がある。ノナコグ アルファは、遺伝子組換え技術によりCHO細胞で産生されるヒト第IX因子である。血友病B患者の止血管理を適応として欧州で1997年に承認されているが、日本では未承認である。

なお、対応する天然の血漿分画製剤として、「乾燥濃縮人血液凝固第IX因子」および「乾燥濃縮人血液凝固第IX因子複合体」が、第IX因子欠乏患者の出血傾向抑制を適応として承認されている。

#### (4) その他

血液凝固因子のうち、トロンビンは、Thrombin(トロンビン)としてJANおよび局方に収載されているが、INNではない。局方のトロンビンは、ヒトまたはウシの血液から精製したプロトロンビンに、Ca<sup>2+</sup>存在下、トロンボプラスチンを作用させて製造し、滅菌、凍結乾燥したものである。トロンビンはフィブリノーゲンからフィブリンへの分解作用と第XIII因子の活性化作用を有し、両者により安定化したフィブリンを形成する(図1)。トロンビンは、通常の結果によって止血困難な小血管、毛細血管および実質臓器からの出血(例えば外傷に伴う出血、手術中の出血、骨性出血、膀胱出血、抜歯後の出血、鼻出血および上部消化管からの出血など)、および上部消化管出血を適応として承認されている。

## 「-cogin」:血液凝固カスケード阻止因子類

「-cogin」は、血液凝固カスケード阻止因子類(blood coagulation cascade inhibitors)に共通のステムである。INNには、「-cogin」をステムに持つものとして、Drotrecogin Alfa(Activated)、Tifacogin、Taneptacogin Alfaが収載されているが、JANには未収載である。

Drotrecogin Alfa(Activated)は、遺伝子組換えによりヒト培養細胞株で製造したヒト活性化プロテインCである。ヒトプロテインCは、凝固阻止因子の1つで、分子量約62,000の1本鎖糖タンパク質として肝臓で合成された後、トロンビン-トロンボモジュリン複合体により切断され、ジスルフィド結合で結ばれた2本鎖型の活性化プロテインCが生成される。活性化プロテインCは、セリンプロテアーゼで、第Va因子と第VIIa因子を特異的に分解・不活化して血液凝固カスケードを阻害するほか、線溶系の促進作用もある。Drotrecogin Alfa(Activated)は、死亡リスクの高い重度敗血症(急性臓器不全を伴う敗血症)の治療薬として、米国で2001年、欧州で2002年に承認されているが、日本では未承認である。

なお、対応する天然の血漿分画製剤として、「乾燥濃縮人活性化プロテインC」が、先天性プロテインC欠乏症に起因する深部静脈血栓症、急性肺血栓塞栓症、電撃性紫斑病を適応として承認されている。

Tifacoginは、遺伝子組換えで製造した組織因子経路インヒビター(TFPI)のアナログである。TFPIは内皮細胞が生産する276個のアミノ酸残基からなる分子量約38,000の1本鎖の糖タンパク質で、第VIIa因子-組織因子複合体および第Xa因子と結合し、外因系血液凝固反応の開始を阻止する。Tifacoginは、TFPIのN末端にAlaが1残基付加しており、糖鎖の結合はない。現在、重症の市中肺炎を対象として米国でフェーズⅢ臨床試験中である。

Taneptacogin Alfaは、臨床開発されていない。



## 「Thrombomodulin」: トロンボモジュリン類

トロンボモジュリン(thrombomodulin)類には、ステム「Thrombomodulin」が用いられている。ヒトトロンボモジュリンは、血管内皮細胞の膜表面に発現される557個のアミノ酸残基からなる分子量約105,000の膜貫通

```

APAEPQPGGS QCVEHDCFAL YPGPATFLNA SQICDGLRGH LMTVRSSVAA
DVISLLNGD GGVGRRRLWI GLQLPPGCGD PKRLGPLRGF QWVTGDNNTS
YSRWARLDLN GAPLCGPLCV AVSAAEATVP SEPIWEEQQC EVKADGFLCE
FHFPTACRPL AVEPGAAAAA VSITYGTPFA ARGADFOALP VGSSAAVAPL
GLQLMCTAPP GAVOGHWARE APGAWDCSVE NGGCEHACNA IPGAPRCQCP
AGAALQADGR SCTASATQSC NDLCEHFVCP NPDQPGSYSC MCETGYRLAA
DQHRCEDVDD CILEPSPCPQ RCVNTQGGFE CHCYPNYDVL DGECVEPVDP
CFRANCEYQC QPLNQTSYLC VCAEGFAPIP HEPHRCQMFQ NQTACPADCD
PNTQASCECP EGYILDGDFI CTDIDECENG GFCSGVCHNL PGTFECICGP
DSALVRHIGT DCDSGKVDGG DSGSGEPPPS PTPGŠTLTPP AVGLVHSG

```

\*:糖鎖結合部位

図3 Thrombomodulin Alfa(トロンボモデュリン アルファ)  
(日本未承認)の構造

型の糖タンパク質である。トロンボモジュリンは、トロンビンが関与する血液凝固反応系の調節因子で、トロンビンと結合し、トロンビンによるフィブリン形成、血小板活性化、第V因子や第VIII因子の活性化などを直接阻害

する。また、トロンビン-トロンボモジュリン複合体は、プロテインCの活性化作用があり、活性化プロテインCを介して凝固反応を阻害する(ステム95参照)。さらに、トロンボモジュリンには、アンチトロンビンⅢ(ステム97参照)のトロンビン阻害作用を促進する働きもある。

「Thrombomodulin」をステムに持つ品目として、JANにはThrombomodulin Alfa(トロンボモデュリン アルファ)が記載されている。トロンボモデュリン アルファは、ヒトトロンボモジュリンの活性部位を含む細胞外ドメインに相当する1~498番目のアミノ酸残基をコードするcDNAの発現により、CHO細胞で産生される分子量約64,000の可溶性糖タンパク質である(図3)。現在、トロンボモデュリン アルファは、造血器悪性腫瘍・感染症を基礎疾患とする汎発性血管内血液凝固症(DIC)の治療薬として承認申請中である。

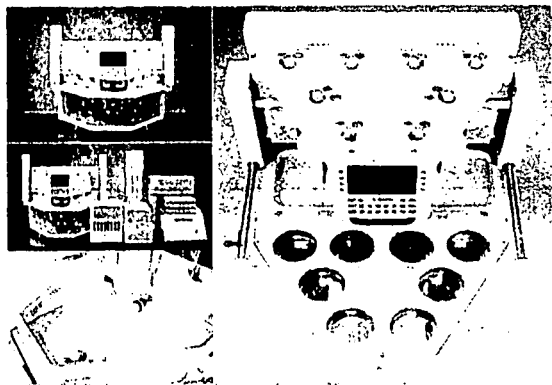


## 「Antithrombin」: アンチトロンビン類

「Antithrombin」は、アンチトロンビンⅢ類(antithrombin Ⅲ)に共通のステムである。アンチトロンビンⅢは、トロンビンや第Xa因子などの凝固因子に結

# 究極の溶出試験グローバルスタンダード

## VK7025 溶出試験器は世界標準の溶出試験器です



USP キャリブレーターでお困りではありませんか?  
溶出試験器間誤差の問題はありませんか?

- VK7025 の特長
- ① フルオープンアクセス
- ② 調整不要のツールセンターベッセル
- ③ 最短ロッドで極小のバドル偏心
- ④ メンテナンス性抜群

バリアン社の溶出試験器なら  
問題解決できます

信頼をお届けする



株式会社 ユニフレックス

ホームページ: <http://www.uniflex.co.jp>

東京営業部 〒277-0861 千葉県柏市高田 537-1

TEL.04-7147-3751 FAX.04-7144-8242

大阪営業所 〒533-0033 大阪市東淀川区東中島 1-17-18 新大阪ビル東館 2F

TEL.06-6323-8344 FAX.06-6323-8257

本社 〒113-0033 東京都文京区本郷 3-26-4 ドルミ本郷 7F

TEL.03-3816-1004 FAX.03-3816-1392

DM資料請求カードNo.110

ステムを知られば薬がわかる

第1回

合し、それらを不活性化させる。ヒトアンチトロンビンⅢは、432個のアミノ酸残基からなる糖タンパク質で、N-結合型糖鎖結合部位が4カ所存在する。「Antithrombin」をステムを持つ医薬品として、INNにはAntithrombinⅢとAntithrombin Alfaが収載されている。

AntithrombinⅢは、血漿分画製剤「乾燥濃縮人アンチトロンビンⅢ製剤」として、先天性アンチトロンビンⅢ欠乏に基づく血栓形成傾向治療薬、およびアンチトロンビンⅢ低下を伴うDIC治療薬として国内承認されている。

Antithrombin Alfaは、遺伝子組換えヤギ(トランスジェニックヤギ)で産生される糖タンパク質で、ヤギの乳中に分泌タンパク質として発現される。Antithrombin Alfaは、AntithrombinⅢとアミノ酸配列が同一であるが、結合している糖鎖の構造が異なる。2006年に欧州で先天性のアンチトロンビン欠損症治療薬として承認され、米国では現在フェーズⅢ臨床試験中である。

「-parin」: ヘパリン類  
および低分子量ヘパリン

「-parin」は、ヘパリン類(heparin)および低分子量ヘパリン(low molecular weight heparin)を含むヘパリン誘導体に共通するステムである。

ヘパリンは、健康な食用獣の肝、肺、または、腸粘膜から得たD-グルコサミンおよびウロン酸(L-イズロン酸またはD-グルクロン酸)の2糖単位からなる硫酸化グリコサミノグリカンで、平均分子量10,000~15,000である。アンチトロンビンⅢと結合することによりトロンビンや第Xa因子などの凝固因子を阻害し、血液凝固阻止作用を発揮する。ヘパリン類としてJANにはHeparin Sodium(ヘパリンナトリウム)およびHeparin Calcium(ヘパリンカルシウム)が収載されている(図4)。

ヘパリンナトリウムおよびヘパリンカルシウムは、DIC治療、血栓塞栓症の治療および予防、ならびに血液体外循環時における血液凝固防止等に適用されている。ヘパリンナトリウムは、日局収載品目である。ヘパリンカルシウムは、第16改正日局に収載が予定されている。

低分子量ヘパリンは、ヘパリンナトリウムやヘパリンカルシウムを亜硝酸や過酸化水素等により分解して得られる分子量約数千のヘパリン誘導体である。アンチトロンビンⅢには結合するがトロンビンには結合しないので、

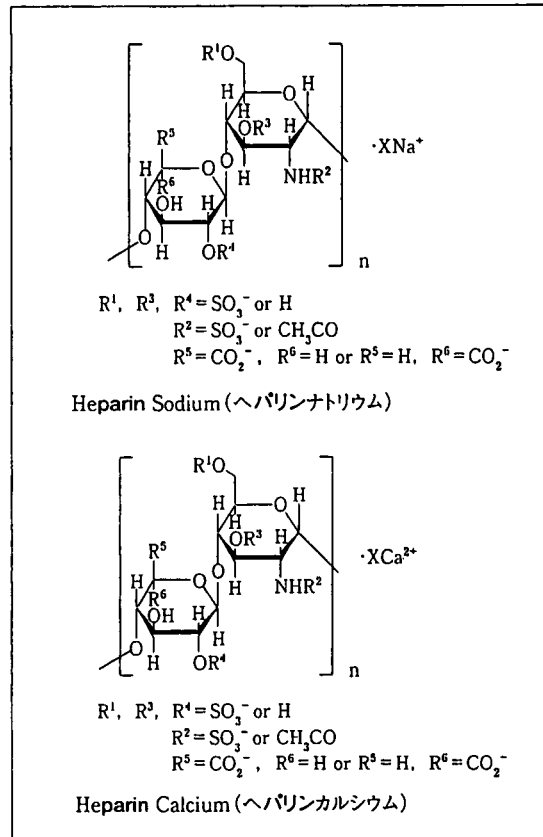


図4 ステム「-parin」を持つヘパリン医薬品

第Xa因子活性を阻害するがトロンビンの作用を阻害しない。低分子量ヘパリンは、出血の副作用が少ない抗凝固薬として用いられている。INNに収載されている低分子量ヘパリンを表1にまとめた。

Parnaparin Sodium(パルナパリンナトリウム)は、ヘパリンナトリウムを過酸化水素および酢酸第二銅で分解して得られる低分子量ヘパリンナトリウムで、平均分子量は4,500~6,500である。血液体外循環時の灌流血液の凝固防止に適用されている。日局には第15改正から収載され、欧州でも販売されている(EP収載)。

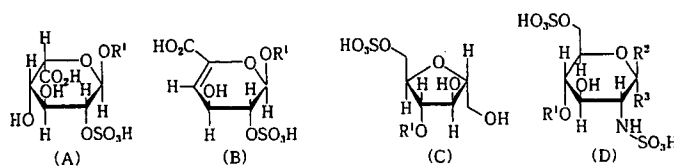
Dalteparin Sodium(ダルテパリンナトリウム)は、ヘパリンナトリウムを亜硝酸で分解して得られる低分子量ヘパリンナトリウム(平均分子量5,600~6,400)で、血液体外循環時の灌流血液の凝固防止およびDIC治療薬に適用されており、今後日局への収載が予定されている。ダルテパリンナトリウムは、欧州や米国でも販売されている(EP収載)。

Enoxaparin Sodium(エノキサパリンナトリウム)は、米国および欧州で販売されており(EP収載)、日本では現在承認申請中である。その他、ステム「-parin」を持つ医薬品として、JAN収載品目であるReviparin Sodium

表1 ステム「-parin」を持つ低分子量ヘパリン医薬品

INN	分解方法	分子量分布または平均分子量	硫酸基/2糖	主成分の構造	
				非還元末端	還元末端
Dalteparin Sodium	亜硝酸	5,600~6,400 (6,000)	2.0~2.5	A	C
Minolteparin Sodium	亜硝酸	90%は1,000~8,000 (1,700~3,300)	2.1	A	C
Nadroparin Calcium	亜硝酸	3,600~5,000 (4,300)	2.1	A	C
Reviparin Sodium	亜硝酸	3,150~5,150 (4,150)	2.1	A	C
Certoparin Sodium	亜硝酸イソamil	70%は10,000以下 (5,000~7,000)	2~2.5	A	C
Livarparin Calcium	亜硝酸	75%は8,000以下 (3,000~5,000)	2	A	6-O-sulfo-structure
Parnaparin Sodium	過酸化水素/第二銅塩	4,500~6,500	2.0~2.6	A	D
Tinzaparin Sodium	<i>Flavobacterium heparinum</i> 由来ヘパリンナーゼ	5,500~7,500 (6,500)	1.8~2.5	B	D
Enoxaparin Sodium	ベンジルエステル誘導体をアルカリ分解	3,500~5,500 (4,500)	約2	B	記載なし
Bemiparin Sodium	4級アンモニウム塩によるアルカリ分解	3,000~4,200 (3,600)	約2	2-O-sulfo-4-ene-pyranosuronic acid	D
Deligoparin Sodium	金属イオン/過酸化水素	2,250~3,850 (3,200)	2.5	記載なし	記載なし
Ardeparin Sodium	過酸化物/加熱	98%は2,000~15,000 (5,500~6,500)	2.7	異常な糖を含まない	

\*主成分の構造



R<sup>1</sup> = Carbohydrate  
R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = OH or R<sup>2</sup> = OH, R<sup>3</sup> = H

(レビパリンナトリウム)、欧米で販売されている Tinzaparin Sodium (EP収載)、および欧州で販売されている Nadroparin Sodium (EP収載) などがある。

### 「-irudin」: ヒルジン誘導体

「-irudin」は、ヒルジン (hirudin) 誘導体に共通するステムである。ヒルジンは、医用ヒルの唾液腺から分泌される65個のアミノ酸残基からなるポリペプチドで、63番目のTyrが硫酸化されている。酸性アミノ酸残基が多いC末端側でトロンビンと結合し、トロンビンの活性を阻害する。「-irudin」を持つ医薬品として4品目がINNに収載されている(図5)。Bivalirudin, DesirudinおよびLepirudinの3品目は米国および欧州で承認されているが、日本では未承認である。

Bivalirudinは、20個のアミノ酸残基からなる合成ヒル

ジン誘導体であり、9~20番目のアミノ酸の配列はヒルジンの52~63番目の配列に一致する。トロンビンに特異的かつ可逆的に結合し、トロンビン活性を阻害する。冠動脈形成手術を実施する不安定狭心症患者に適用されている。Desirudinは、酵母から産生される遺伝子組換え型ヒルジン誘導体であり、天然のヒルジンと異なり、Tyr63が硫酸化されていない。静脈血栓塞栓症の予防薬として認められている。Lepirudinは、遺伝子組換え技術によって酵母から産生されるヒルジン誘導体であり、1番目と2番目のアミノ酸が置換され、Tyr63が硫酸化されていない。ヘパリン誘導による血小板減少症および血栓塞栓性合併症の患者に適用されている。Pegmusirudinは、ヒルジン改変体のLys27およびLys32にポリエチレングリコールが結合したPEG化改変ポリペプチドである。

以上、今回は、血液凝固因子類および抗凝固作用を持つ生物薬品のステムとして「-cog」、「-cogin」、「thrombomodulin」、「antithrombin」、「-parin」、「-irudin」を紹介した。

■参考文献

本稿作成に際してこれまでに紹介した参考文献を使用した。

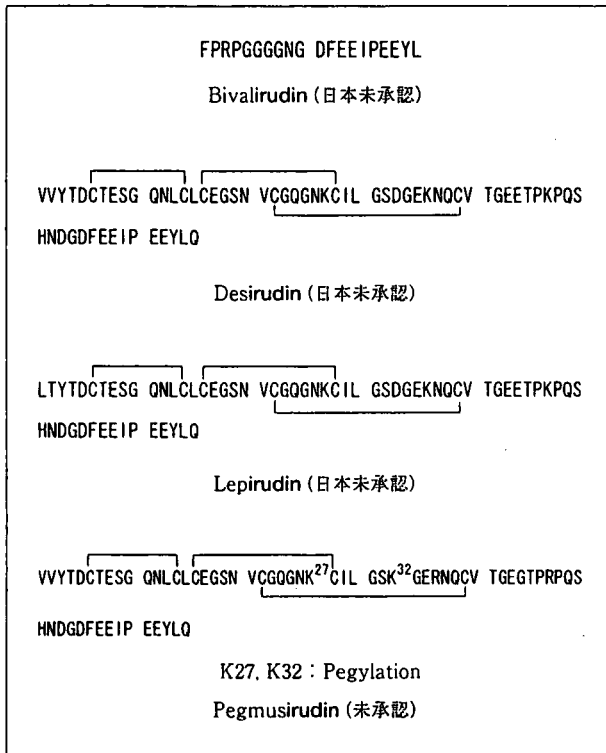


図5 ヒルジン類を示すステム「-irudin」を持つ医薬品



精製グレードのポリオキシエチレン硬化ヒマシ油  
NIKKOL HCO シリーズ

- 安全性、安定性の高い可溶化剤です
- 長期間、おりの発生がありません
- 製剤の味にほとんど影響を及ぼしません
- 内服用液剤、口腔医薬品、点眼剤などに最適です

ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 40 (NIKKOL HCO-40 (医薬用))

ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 50 (NIKKOL HCO-50 (医薬用))

ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60 (NIKKOL HCO-60 (医薬用))

日光ケミカルズ株式会社

www.nikkol.co.jp

お問合せ先 営業部：TEL 03-3662-7055 FAX 03-3664-8679

東京都中央区日本橋馬喰町1-4-8

大阪支店：TEL 06-6262-0371 FAX 06-6262-9700

大阪府大阪市中央区安土町1-6-14

DM資料請求カードNo.264



# 遺伝子治療薬開発の現状と品質・ 安全性確保に関する国際的動向

内田 恵理子 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 第一室長

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 Tel: 03-3700-1141 Fax: 03-3700-9217

E-mail: uchida@nihns.go.jp

## 1 はじめに

遺伝子治療とは、疾病の治療を目的として遺伝子または遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与する治療法である。1990年にアデノシンデアミナーゼ欠損重症複合免疫不全症(ADA-SCID)に対して開始されて以降、効果的な治療法が少ないがんをはじめ、各種遺伝性疾患、心血管疾患、神経変性疾患等に対して画期的な治療法となる可能性を秘めた先端医療と期待され、世界中で多種多様な臨床プロトコルが実施されている。これまでに世界では1300以上のプロトコルが実施されており、欧米での承認例はまだないものの、中国では2003年に世界で初めての遺伝子治療薬が承認されている。

遺伝子治療薬として臨床プロトコルで使用されるベクターは、アデノウイルスやレトロウイルス、アデノ随伴ウイルスなどに由来するウイルスベクターが約7割を占め、高い感染性や染色体への遺伝子組み込み能など、ウイルスの特性を利用したものが多い。ウイルスベクター開発の進歩により、遺伝子治療による有望な結果も得られ始めているが、一方で、ウイルスベクターによる予想外の重篤な副作用の発現も明らかになり、遺伝子治療薬の実用化には品質・安全性確保において克服すべき課題も多い。

遺伝子治療薬の品質・安全性確保に関しては各国にガイドラインがある<sup>1,2)</sup>。またICHでも2002年以降、遺伝子治療専門家会議において遺伝子治療薬の規制に影響を及ぼす可能性のある最新の問題が議論されており、ガイドラインのように各規制当局への拘束力はないものの、現時点の科学的な見解をICHとしてまとめた「ICH見解」(ICH consideration)も出されている。本稿では、

遺伝子治療薬としてのウイルスベクターの最近の話題を中心に、ICH 遺伝子治療専門家会議の議論や欧米の最近のガイドライン等も含めて、遺伝子治療薬開発の現状と品質・安全性確保の国際的動向を概説する。

## 2 日本の遺伝子治療の現状と関連する指針等

日本の遺伝子治療は、薬事法に定める治験または臨床研究として実施されている。「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針」(平成7年11月15日厚生省薬務局長通知薬発第1062号、平成14年改正、平成16年一部改正)は遺伝子治療薬の品質、安全性等の確保に必要な基本的事項を定めたもので、治験として実施する場合には、本指針に基づき治験前に確認申請を行う義務がある。「遺伝子治療臨床研究に関する指針」(平成14年3月27日文科部科学省・厚生労働省告示第1号、平成16年12月28日全部改正)は遺伝子治療臨床研究が医療上の有用性及び倫理性を確保し、適正に実施されるために遵守すべき事項を定めたもので、治験以外の臨床研究を実施する場合には本指針に基づく大臣承認が必要となる。なお、治験でも臨床研究でも、遺伝子組換えウイルスベクターを臨床使用する場合には、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(カルタヘナ法)」で定められた「遺伝子組換え生物等」の「第一種使用等(環境中への拡散を防止しないで行う使用等)」に該当するため、第一種使用規程の大臣承認も必要とされる。

日本では、これまでに20以上の遺伝子治療プロトコルが承認され、130名以上に実施されているが、その多くは臨床研究である。最近の話題としては、国産の

遺伝子治療薬である HGF 遺伝子発現プラスミドを用いた閉塞性動脈硬化症に対する血管新生遺伝子治療の治験が今年 7 月に第三相試験を終了し、遺伝子治療薬に関する本邦初の承認申請が来春にも予定されていることが挙げられる。また、自殺遺伝子 HSV-TK 発現レトロウイルスベクターを用いた再発白血病の遺伝子治療は、今年 9 月に治験前の確認申請が承認された。一方、臨床研究では、国産の FGF-2 発現センダイウイルスベクターを用いた閉塞性動脈硬化症の遺伝子治療が昨年より、国内初のアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いたパーキンソン病の遺伝子治療も今年から開始されるなど、遺伝子治療の実用化への動きは活発化している。

### 3 ウイルスベクター開発の現状と課題

#### 3.1 レトロウイルスベクター

レトロウイルスベクターは、主にガンマレトロウイルスであるマウス白血病ウイルスに由来するベクターを指す。宿主染色体に遺伝子を組み込むことが可能であり、持続的な遺伝子発現が必要となる遺伝子治療に適している。しかし、非分裂細胞には遺伝子導入できず、導入効率も低いため、主に *ex vivo* での血液細胞への遺伝子導入に用いられる。

1999 年にフランスで開始されたレトロウイルスベクターによる X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) に対する造血幹細胞遺伝子治療では、10 例中 9 例で著明な効果が得られ、遺伝子治療で初の成功例と報告された。その後、レトロウイルスベクターを用いた造血幹細胞遺伝子治療は、X-SCID と同様の先天性免疫不全症である ADA-SCID や慢性肉芽腫症 (X-CGD) に対しても良好な結果が報告されており、このような先天性免疫不全症に対するレトロウイルスベクターによる造血幹細胞遺伝子治療は確立された治療法と考えられるようになった。

しかし、X-SCID 遺伝子治療では、治療から数年後に、遺伝子の染色体への挿入変異により癌原遺伝子が活性化したことが原因となる重篤な副作用の発症が判明した。2007 年現在までに、治療効果が得られた 9 名中 4 名という高頻度で T 細胞白血病様症状が発症し、うち 1 名

は白血病で死亡した。X-SCID 遺伝子治療による副作用発現の原因には疾患・プロトコル特有の問題もあると考えられるが、レトロウイルスベクターによる挿入変異のリスクは予想以上に高頻度である可能性がある。先天性免疫不全症に対する遺伝子治療の臨床的有用性は明らかであるが、今後の遺伝子治療の安全性確保には、リスク・ベネフィットを十分に考慮すると共に、安全性を高めた改良型ベクターの開発や、細胞あたりの遺伝子導入数の低減、患者に戻す遺伝子導入細胞数の低減などの安全な投与法の検討、さらに臨床での副作用発現を未然に防ぐため、遺伝子導入細胞のクローナリティーをより高感度で監視することが重要である。

レトロウイルスベクターに関しては、以前より、増殖性レトロウイルス (RCR) のベクターへの混入が発がんリスクを高めるとして問題視され、FDA は RCR 感染の監視に特化したガイダンス<sup>3)</sup>を 2000 年 10 月に発出して安全性確保を図ってきた (2006 年 11 月改正)。その後、X-SCID による副作用発現の問題を受け、FDA は 2006 年 11 月、被験者の長期フォローアップに関するガイダンス<sup>4)</sup>を発出し、遺伝子治療薬による遅発性有害事象のリスク評価の方法と被験者の長期フォローアップ観察のあり方を提示した。ガイダンスでは、長期フォローアップが必要な遺伝子治療臨床研究について、①遺伝子治療後 15 年間の被験者のフォローアップの実施、最初の 5 年間は最低年に一度の健康診断・検査、6 年目以降は調査票によるフォローアップを計画すること、②フォローアップでは、新たな臨床症状の発症の有無のほか、ベクター配列の持続性試験をベクターが検出されなくなるまで継続すること、また、レトロウイルスベクターのような染色体組み込み型ベクターによる造血幹細胞遺伝子治療ではクローナリティーの評価の実施が求められている。レトロウイルスベクターの安全性確保にはこれらのガイダンスも参考にすることが望ましい。

#### 3.2 アデノウイルスベクター

アデノウイルスベクターは、主にヒトアデノウイルス 5 型に由来するベクターを指す。他のベクターと比べて遺伝子導入効率が高く、非分裂細胞への遺伝子導入が可

能という特徴を持つ。染色体に組み込まれることはほとんど無く、遺伝子発現は一過性で、長期的な遺伝子発現が必要な遺伝子治療には向かない。世界の遺伝子治療臨床プロトコルの約 1/4 でアデノウイルスベクターが使用されており、in vivo での癌の遺伝子治療に繁用されている。

1999 年には米国で実施された先天性代謝疾患の遺伝子治療でアデノウイルスベクター投与による死亡事故が発生した。原因はアデノウイルスベクターの肝動脈内への過剰投与により異常免疫反応が惹起されたためと結論された。動脈内にアデノウイルスベクターを投与するプロトコルが問題とされたが、さらに安全性確保のためにベクターの正確な投与量の測定が重要とされ、FDA の主導で 2002 年にアデノウイルス 5 型国際参照品が確立された (ATCC, VR-1516)。この参照品を用いることで、異なる施設でのアデノウイルスベクターのウイルス粒子数、プラーク形成単位、感染単位の相互比較が可能であり、毒性データ等に関して、用量依存的な毒性発現などの安全性に関する情報の相関関係が明らかになると期待されている。現在では、アデノウイルスを用いた多くの製品の評価に本参照品が用いられている。

アデノウイルスベクターは免疫原性や細胞障害性が強いこと、特異性が低いことが問題となることから、免疫原性を抑えたベクターの開発や、標的細胞指向性を付与したベクターの開発など、安全性・有効性を高めたベクターの開発研究も進んでいる。一方、アデノウイルスベクターの製造では、ベクター産生細胞内で相同組換えにより生じる増殖性アデノウイルス (RCA) がベクターの品質・安全性確保上問題となる。最近、アデノウイルスベクター製造用に開発された PER.C6 細胞や C139 細胞では、ベクターと産生細胞の DNA 配列に重複がないため、RCA が出現しないことが報告されており、このような細胞の使用も遺伝子治療薬の安全性確保には重要である。

### 3.3 AAV ベクター

AAV ベクターは、非病原性のウイルスに由来し、安全性が高く、非分裂細胞への遺伝子導入も可能であること

と、染色体には組み込まれないが、非分裂細胞内で長期間遺伝子発現が可能であることから、in vivo での神経細胞や筋肉細胞への遺伝子導入用ベクターとして近年開発が進んでいる。主に 2 型 AAV ベクターが使用されているが、他の血清型に由来する AAV ベクターも開発が進められている。

AAV ベクターに関しては、今年 6 月、米国で実施されたパーキンソン病に対する遺伝子治療第一相試験で、治療 1 年後に全員に改善が認められたという有望な結果が報告された。一方、今年 7 月には、米国での関節リウマチの遺伝子治療で、可溶性 TNF 受容体を発現する AAV ベクターを投与後、患者に重症の有害事象が発生して死亡した。この有害事象については、9 月の NIH RAC (組換え DNA 諮問委員会) で、真菌感染症のヒストプラズマ症が直接の死因とされた。AAV ベクターによる遺伝子導入が病態に影響した可能性は低いと結論され、追加の試験を実施して慎重に検討されている。ヒストプラズマ症の原因としては、事前投与された抗 TNF 抗体の影響も含めた可能性が議論されている。

### 3.4 レンチウイルスベクター

レンチウイルスベクターは、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) に代表されるレンチウイルスに由来するベクターである。ガンマレトロウイルスベクターと同様、染色体組み込み能を持つが、ガンマレトロウイルスベクターと異なり非分裂細胞にも遺伝子導入可能であり、in vivo での遺伝子導入にも有用であると期待されている。また、遺伝子サイレンシングの頻度が低く、長期間の遺伝子発現が期待される。レンチウイルスベクターに関する特別のリスクはこれまで報告されていないが、ベクター開発の中心が AIDS の原因ウイルスである HIV に由来するものであることから、より一層安全性の問題が重要視されている。

ICH 遺伝子治療専門家会議では、2002 年のワークショップでレンチウイルスベクターの安全性や品質に関して議論された。特に、①レンチウイルスベクターに含まれる増殖性レンチウイルス (RCL) の試験・検査法、

②挿入変異の可能性と検出法, ③生殖細胞への挿入の可能性について議論し, RCLの検出は適切な陽性対照を置いて実施すべきであること, RCLの試験・検査の1つとしてRCLにenv配列が含まれないことを確認すること, の2点が推奨された。また, レンチウイルスベクターの体内動態, 染色体への挿入及び生殖細胞系列への伝達を調べるための適切なモデル動物を用いたアッセイ系の開発が推奨された。また, レンチウイルスベクターの臨床応用にあたってはリスクベネフィットを十分考慮した上で開始すべきであると結論された。一方, EMEAからは2005年に「レンチウイルスベクターの開発と製造に関する指針」が発出されている<sup>5)</sup>。指針には, レンチウイルスベクターの設計や製造において安全性確保のために留意すべき事項, 特性解析や品質管理試験として実施すべき事項が提示されている。

### 3.5 腫瘍溶解性ウイルス

腫瘍溶解性ウイルスとは, 正常細胞内では増殖できず, 標的とするがん細胞内で特異的に増殖可能な制限増殖性ウイルスのことである。がん細胞に腫瘍溶解性ウイルスが感染すると, 細胞内で増殖してがん細胞を破壊・死滅させるのみならず, その際放出されたウイルスは周辺のがん細胞にも感染して腫瘍全体を縮小させることから, 非増殖性のウイルスベクターを用いたがん遺伝子治療よりも高い抗腫瘍効果が得られると期待されている。腫瘍溶解性ウイルスの開発は, ニューカッスル病ウイルスやレオウイルスなどの腫瘍特異的増殖性を示す野生型ウイルスや弱毒化ウイルスを用いたものから, ヘルペスウイルスやアデノウイルスなどを遺伝的に改変して病原性を除去し腫瘍指向性をより高めた制限増殖性ウイルスの開発, さらに治療用遺伝子を搭載して抗腫瘍効果をさらに高めたウイルスの開発へと移行しつつある。腫瘍溶解性ウイルスの開発はここ数年急速に進展し, 中国では既に2005年に1品目が承認されているが, 臨床適用は未知・未経験の要素も多く, 基礎となる科学的知見も十分に集積されていない。そこで, ICH 遺伝子治療専門家会議では, 2005年に腫瘍溶解性ウイルスに関する公開ワークショップを開催して問題点を検討した。その結果, 腫瘍

溶解性ウイルスの品質・安全性に関する重要な課題として, 1) 腫瘍溶解性ウイルスの選択・設計(野生型・弱毒型・遺伝子組換え型), 2) 動物やヒトで期待される効果の評価, 3) ウイルス複製の腫瘍選択性, 4) 腫瘍溶解性ウイルスに混入する増殖性ウイルス及び目的とする腫瘍溶解性ウイルスの分子変化体の検出法, 5) 迷入ウイルスの試験法, 6) 臨床上の安全性, 7) 動物試験に用いる適切な動物モデル, 8) 腫瘍溶解性ウイルスの体外排出の測定法とそのリスク評価などが挙げられた。今後, このコンセプトペーパーを基に, 腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性評価に関するICH見解の作成が2008年を目途に予定されている。

## 4 ICH 見解

### 4.1 生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的考え方

ICHは, 2006年にICH見解「生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的考え方」<sup>6)</sup>を公表した。本見解の最も大きな目的は, 遺伝子改変された次世代を作らないということにある。本見解では, 非臨床試験において, 生体内分布試験により生殖組織にベクターが分布するか否か, ベクターが生殖組織で検出された場合にはその検出が持続的か一過性か, さらに生殖組織で持続的に検出された場合, 生殖細胞そのものに遺伝子が組み込まれているのかどうかを明らかにすることが求められている。非臨床試験でベクターが一過性にせよ生殖腺に局在する可能性が示された場合には, 臨床試験で患者の精液のモニタリングを考慮する必要がある。また, 臨床試験の期間中は, 非臨床生体内分布試験の結果によらず避妊手段をとるべきことが推奨されている。

### 4.2 ウイルス/ベクターの体内からの排出

遺伝子治療薬の臨床適用に当たり, ベクターやベクターに混入する可能性のある増殖性ウイルスが患者から排出(shedding)されることは非常に大きな問題であ

る。2002年のICH 遺伝子治療公開ワークショップでは、アデノウイルスベクターを投与した患者からのベクターの排出について、測定法を含め、安全性の観点から議論された。現在までのところ、ウイルスベクターの体外への排出に伴う安全性上の問題は確認されていないが、データの収集を引き続き継続した上で、後日改めて議論することとされた。

アデノウイルスベクター以外にも体外排出のリスクが想定されるベクターや腫瘍溶解性ウイルスが次々と開発されており、患者家族や医療従事者等への伝播のリスクや公衆衛生の観点からの安全性確保は大きな課題である。今年10月には、ICH 遺伝子治療専門家会議とヨーロッパ遺伝子治療学会との共催で、排出リスクの高いベクターやウイルスの患者体内からの排出に関するICHワークショップが開催された。今後、このワークショップでの議論を踏まえ、遺伝子治療用ベクターやウイルスの排出に関するICH見解の作成や、ガイドライン化が検討される予定である。

## 5. おわりに

今後の遺伝子治療薬の実用化には、より安全性、有効性の高いベクターの開発などの基礎研究の推進とともに臨床開発での安全性の確保が重要である。ICH見解や各国のガイドラインは、遺伝子治療の実施を規制するためのものでなく、遺伝子治療の安全性、有効性、倫理性の確保及び使用する遺伝子治療薬の品質、安全性等の確保により、遺伝子治療薬の適正で円滑な開発を促進するためのものである。ICH 遺伝子治療専門家会議の活動やガイドラインの策定が遺伝子治療薬開発の促進につながることを期待したい。

## 参考文献

- 1) FDA/CBER: Guidance for industry : Guidance for human somatic cell therapy and gene therapy, 1998. 3
- 2) EMEA/CPMP : Note for guidance on the quality, preclinical and clinical aspects of gene transfer medicinal products. CPMP/BWP/3088/99, 2001. 4
- 3) FDA/CBER : Guidance for Industry : Supplemental guidance on testing for replication competent retrovirus in retroviral vector based gene therapy products and during follow-up of patients in clinical trials using retroviral vectors, 2006. 11
- 4) FDA/CBER : Guidance for industry : Gene therapy clinical trials-Observing subjects for delayed adverse events, 2006. 11
- 5) EMEA/CHMP : Guideline on development and manufacture of lentiviral vectors. CHMP/BWP/2458/03, 2005. 5
- 6) ICH Considerations : General principles to address the risk of inadvertent germline integration of gene therapy vectors, 2006. 10

## Maternal vitamin A alters gene profiles and structural maturation of the rat ductus arteriosus

Utako Yokoyama,<sup>1\*</sup> Yoji Sato,<sup>2\*</sup> Toru Akaike,<sup>1</sup> Seiichi Ishida,<sup>3</sup> Junichi Sawada,<sup>4</sup> Taku Nagao,<sup>2</sup> Hong Quan,<sup>1</sup> Meihua Jin,<sup>1</sup> Mari Iwamoto,<sup>5</sup> Shumpei Yokota,<sup>5</sup> Yoshihiro Ishikawa,<sup>1,6</sup> and Susumu Minamisawa<sup>1,7</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, Yokohama City University, Yokohama; <sup>2</sup>Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, Tokyo; Divisions of <sup>3</sup>Pharmacology and <sup>4</sup>Biochemistry and Immunochemistry, National Institute of Health Sciences, Tokyo; <sup>5</sup>Department of Pediatrics, Yokohama City University, Yokohama, Japan; <sup>6</sup>Department of Cell Biology and Molecular Medicine and Medicine (Cardiology), New Jersey Medical School, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Newark, New Jersey; and <sup>7</sup>Department of Life Science and Medical Bio-Science, Waseda University, Tokyo, Japan

Submitted 11 January 2006; accepted in final form 5 July 2007

Yokoyama U, Sato Y, Akaike T, Ishida S, Sawada J, Nagao T, Quan H, Jin M, Iwamoto M, Yokota S, Ishikawa Y, Minamisawa S. Maternal vitamin A alters gene profiles and structural maturation of the rat ductus arteriosus. *Physiol Genomics* 31: 139–157, 2007. First published July 17, 2007; doi:10.1152/physiolgenomics.00007.2006.—Retinoic acid (RA), a metabolite of vitamin A, has been proposed to regulate vascular remodeling and reactivity of the ductus arteriosus (DA). Using rat Affymetrix GeneChips, we found that a considerable number of genes in DA varied their expression levels in accordance with developmental mode: namely, preterm-, term-, and postnatal-dominant clusters. Among a total of 8,740 probe sets, maternal vitamin A administration (MVA) changed the expression levels of 91 genes (116 probe sets) >2.5-fold. About half of preterm- and term-dominant genes responded to MVA, whereas only 5% of postnatal-dominant genes responded to MVA, indicating that fetal-dominant genes were susceptible to RA signals. The expression levels of 51 genes in MVA-treated DA at preterm were similar to the expression levels in nontreated DA at term, indicating that the global gene profile at preterm resembled that of the control animal at term. We observed neointima formation in MVA-treated DA at preterm in accordance with upregulation of fibronectin and hyaluronic acid, whereas it was rarely observed in nontreated DA at preterm. Five fetal cardiac myofibrillar genes were also upregulated in MVA-treated *in vivo* DA, whereas they were developmentally downregulated in nontreated DA. The present study indicates that MVA-mediated alteration in gene profile was associated with early structural maturation of DA, although MVA-mediated maturation may differ from normal vascular remodeling of DA.

retinoic acid; vascular remodeling; development; myofibrillar differentiation

PATENCY OF THE DUCTUS ARTERIOSUS (DA), a fetal arterial connection between the pulmonary artery and the descending aorta, is essential in gestation. The morphology and function of the DA change dramatically during development. At late gestation the deposition of extracellular matrix in the subendothelium is increased, and smooth muscle cells of the media migrate into this region, resulting in intimal thickening (2, 12). After birth, the DA closes immediately through the contraction of its smooth muscle

by an increase in oxygen tension, and a dramatic decline in circulating prostaglandins (8). The DA later undergoes permanent closure through structural remodeling and apoptosis. The DA, however, remains patent after birth, especially in premature infants, which is responsible for significant morbidity and mortality. Therefore, it is important to understand the precise mechanisms by which the DA exhibits developmental mode-specific remodeling. We hypothesized that this specification of the DA is largely dependent on the expression of a distinct subsets of genes involved in developmental vascular remodeling.

Retinoic acid (RA), a metabolite of vitamin A, is one of the most important regulatory factors of gene transcription for cardiovascular development (9, 30). Maternal vitamin A administration (MVA) exerts its effect through oxidized metabolites of retinol. Colbert et al. (10) demonstrated that a strong RA response signal was predominantly detected in the developing DA and that the signal was colocalized with the expression of the adult-specific smooth muscle myosin heavy chain (MHC) isoform, SM2. They have suggested that RA plays an important role in differentiation and maturation of the DA. Accordingly, Momma's group has demonstrated that MVA enhances the susceptibility of contraction of the rat DA in response to oxygen exposure (35) or indomethacin (20) even in the premature fetus at *day 19* of gestation, suggesting that MVA accelerates vascular maturation of the DA in premature fetuses, at least in terms of vascular contraction. On the basis of these animal experiments, vitamin A therapy is considered to be a potent, novel strategy for DA closure in premature infants (29). However, the first clinical trial using vitamin A therapy has failed in premature infants with patent DA (25). To determine whether vitamin A therapy is really worthwhile for premature infants with patent DA, the precise mechanism of MVA-mediated maturation of DA needs to be clarified. Since the developmental mode-specific remodeling of DA is largely dependent on precise regulation of gene expression, RA may alter the transcriptional profiling from immature to mature state of the DA. Accordingly, to understand the precise network of distinct subsets of genes that are regulated by MVA, we have performed comprehensive analyses of gene expression patterns in DA in the presence or absence of MVA.

### MATERIALS AND METHODS

#### Vitamin A Administration

The experiments were approved by the Ethical Committee of Animal Experiments of Yokohama City University School of Medi-

\* U. Yokoyama and Y. Sato contributed equally to this work.  
Article published online before print. See web site for date of publication (<http://physiolgenomics.physiology.org>).

Address for reprint requests and other correspondence: S. Minamisawa, Dept. of Physiology, Yokohama City Univ., 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004, Japan (e-mail: [sminamis@med.yokohama-cu.ac.jp](mailto:sminamis@med.yokohama-cu.ac.jp)).

cine. Vitamin A (retinyl palmitate, 33 mg, which is equivalent to 18 mg of retinol) (Eisai, Tokyo, Japan) was diluted with polyoxyethylene castor oil and was injected intramuscularly daily into pregnant Wistar rats from the 17th day of gestation at doses of 1 mg (3,000 IU)/kg body wt as previously described (36). The dose of vitamin A was determined in accordance with the previous studies (20, 35). We confirmed a significant increase in serum retinol palmitate concentration in vitamin A-injected maternal rats (at least  $>300 \mu\text{g/dl}$ ) by HPLC.

#### Tissue Collection and Preparation

Pooled tissues from the DA in the presence or absence of MVA were obtained from Wistar rat fetuses on the 19th day of gestation (preterm,  $n \geq 120$ ) and the 21st day of gestation (term,  $n \geq 120$ ), and from neonates on the day of birth ( $n \geq 120$ ). Since the timing of tissue collection after birth is critical, we collected the postnatal DA samples between 3 and 6 h after birth. The total number of MVA was two times in the 19-day fetuses and four times in the 21-day fetuses and neonates. Therefore, it should be noted that the conditions of MVA treatment were not exactly the same among MVA-treated animals. After excision, tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

#### Total RNA Preparation and DNA Microarray Analysis

Total RNA was isolated from pooled tissues with TRIzol (Invitrogen). After treatment with DNase I (Promega, Tokyo, Japan), a second

clean-up step was performed on the isolated RNA, using an RNeasy Mini total RNA Preparation Kit (Qiagen, Tokyo, Japan). Total RNA was converted to biotin-labeled cRNA that was hybridized to rat genome U34A GeneChip DNA microarray (Affymetrix, Santa Clara, CA) for 16–24 h at  $45^\circ\text{C}$ . The hybridization signals on the microarray were scanned and analyzed by GeneArray Scanner and Microarray Suite Software (Affymetrix), respectively. The hybridization experiments were performed in duplicate. At the first step, sequences without expression in DA at each developmental mode, which were indicated as “absent” by “absolute analysis” of Microarray Suite Software, were eliminated from the data set. Then, if the difference in the signal intensities of a given sequence tag was equal to the cut-off ( $=2.5$ -fold) or more at any developmental mode or between any two developmental modes, and if the “comparison analysis” of the Microarray Suite Software indicated “increased” or “decreased” at any developmental mode with  $\geq 2.5$ -fold difference or between any two with such a difference, that sequence tag was employed for further analyses. The signal intensities of duplicate genes were averaged. For cluster analysis related to developmental changes in gene profiles, the signal intensities were standardized by subtracting the mean across groups of interest and dividing by the groups’ standard deviation, so that the mean and the standard deviation for each sequence tag was 0 and 1, respectively. Expression pattern clusters were defined by subjecting the standardized signal intensities to the hierarchical tree-clustering algorithm, using the SYSTAT program (SYSTAT Software). For the hierar-

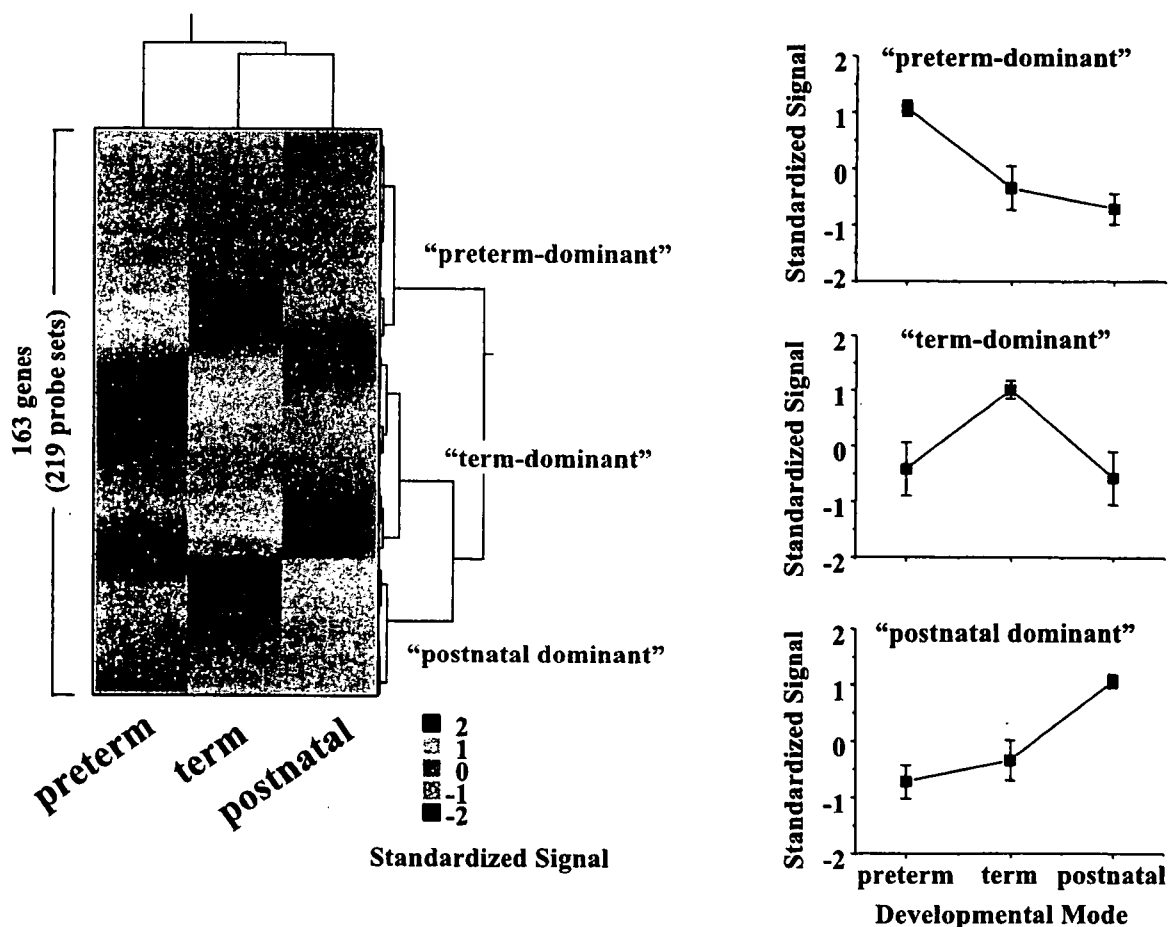


Fig. 1. Hierarchical clustering of 166 genes that were changed significantly during development in DA. Color bar indicates the relative changes in mean normalized intensity of expression of these genes. The Euclidean distance during hierarchical clustering gave rationale to classify genes into 3 clusters shown at right. Three line graphs showed the changes in the standardized expression levels at each developmental mode in DA. Data are expressed as means  $\pm$  SD of standardized signal intensities. DA, ductus arteriosus.

Table 1. *Genes in preterm-dominant cluster*

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Term/Preterm	Fold Difference Between Stages		MVA
				Postnatal/Preterm	Postnatal/Term	
X02361_g_at	alpha-fetoprotein	Afp	0.0	0.0	0.4	+
X02361_at			0.0	0.0	1.1	
rc_AI237884_s_at			0.1	0.0	0.9	
K01231_f_at			0.0	0.0	0.9	
rc_AA866237_s_at	albumin	Alb	0.1	0.0	0.6	+
rc_AA860062_g_at			0.0	0.0	1.2	
M38759_at	histidine decarboxylase	Hdc	0.1	0.1	0.7	+
X63446_at	alpha-2-HS-glycoprotein	Ahsg	0.1	0.1	0.8	+
D10261_g_at			0.1	0.1	0.6	
X16273cds_g_at	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1	Serpinal	0.0	0.1	1.3	+
X16273cds_at			0.0	0.0	1.2	
rc_AI010453_at			0.2	0.1	0.7	
X05861exon#1-6_s_at	fibrinogen, gamma polypeptide	Fgg	0.1	0.1	2.0	+
J00735_g_at			0.1	0.0	0.3	
U50353mRNA_s_at	defensin RatNP-3 precursor	RatNP-3b	0.2	0.1	0.5	+
M35601_g_at	fibrinogen, alpha polypeptide	Fga	0.0	0.0	1.0	+
M35601_at			0.2	0.1	0.7	
rc_AA925762_at	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	Marcks	0.9	0.1	0.1	+
rc_AA945169_g_at	transthyretin	Ttr	0.0	0.1	2.2	+
rc_AA945169_at			0.2	0.2	1.1	
S87544_g_at	alpha 1 microglobulin/bikunin	Ambp	0.2	0.1	0.8	+
U16686_at	defensin, alpha 5, Paneth cell-specific	Defa	0.5	0.1	0.3	+
X02291exon_s_at	aldolase B	Aldob	0.2	0.2	0.7	+
M00001_i_at	apolipoprotein A-I	Apoa1	0.0	0.2	4.1	+
J02597cds_s_at			0.1	0.2	1.6	
K02814_at	kininogen 1	Kng1	0.2	0.2	1.0	+
K02814_g_at			0.1	0.2	1.4	
X80130cds_i_at	actin alpha cardiac 1	Actc1	0.2	0.2	1.0	+
rc_AI104567_g_at			0.2	0.2	1.1	
rc_AA866452_s_at			0.2	0.2	1.1	
U19485_g_at	secreted phosphoprotein 2	Spp2	0.3	0.2	0.6	+
D38380_g_at	Transferrin /// signal recognition particle receptor, B subunit (predicted)	Tf /// Srprb_predicted	0.1	0.2	1.2	+
D38380_at			0.1	0.2	1.7	
U31866_g_at			0.2	0.3	1.5	
AF077354_g_at	heat shock protein 4	Hspa4	0.8	0.2	0.3	+
U05675_at	fibrinogen, B beta polypeptide	Fgb	0.2	0.3	1.6	+
M81397_at	coagulation factor 2	F2	0.0	0.3	8.1	+
M10934_s_at	retinol binding protein 4, plasma	Rbp4	0.3	0.3	0.8	+
K03045cds_s_at			0.4	0.4	1.0	
rc_AA891242_g_at	myosin, light polypeptide 7, regulatory (predicted)	Myl7_predicted	0.1	0.2	2.6	+
rc_AA891242_at			0.3	0.5	1.5	
M80829_at	troponin T2, cardiac	Tnnt2	0.3	0.4	1.4	+
X15939_f_at	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta	Myh7	0.2	0.4	2.0	+
S76779_s_at	apolipoprotein E	ApoE	0.4	0.8	2.0	+
X56326cds_at	hemoglobin, epsilon 1 (predicted)	Hbe1_predicted	0.2	0.1	0.5	
U77777_s_at	interleukin 18	Il18	0.2	0.2	0.8	
AJ222813_s_at			0.2	0.1	0.7	
S73007_g_at	synuclein, alpha	Snca	0.2	0.2	0.8	
AF007758_g_at			0.3	0.2	0.7	
rc_AA866414_at	solute carrier family 4, member 1	Slc4a1	0.3	0.2	0.8	
AJ006295_g_at	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax ( <i>Drosophila</i> ) homolog); translocated to, 3	Mllt3	0.5	0.2	0.4	
AJ006295_at			0.3	0.2	0.8	
D37920_at	squalene epoxidase	Sqle	0.6	0.2	0.4	
M24604_g_at	proliferating cell nuclear antigen	Pcna	0.5	0.2	0.5	
M24604_at			0.6	0.3	0.5	
AF003835_at	isopentenyl-diphosphate delta isomerase	Idi1	0.8	0.3	0.3	
X06827_g_at	hydroxymethylbilane synthase	Hmbs	0.3	0.4	1.3	
X06827_at			0.4	0.2	0.6	
AB015191_g_at	Rhesus blood group CE and D	Rhcd	0.3	0.3	1.2	
AF097593_g_at	cadherin 2 /// hypothetical gene supported by NM-031333	Cdh2 /// LOC497718	0.9	0.3	0.4	
D14015_g_at	cyclin E	Ccne1	0.6	0.3	0.6	

Continued



Table 1.—Continued

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Term/Preterm	Fold Difference Between Stages		MVA
				Postnatal/Preterm	Postnatal/Term	
U17565_g_at	mini chromosome maintenance deficient 6 ( <i>S. cerevisiae</i> )	Mcmd6	0.6	0.3	0.6	
AB004638_at	fibroblast growth factor 18	Fgf18	0.7	0.3	0.5	
S69874_s_at	fatty acid binding protein 5, epidermal	Fabp5	0.4	0.3	0.8	
rc_AI102868_g_at	phosphoserine aminotransferase 1	Psat1	0.3	0.3	1.2	
X56327cds_s_at	hemoglobin, gamma A /// hemoglobin, epsilon 2	Hbg1 /// Hbe2	0.3	0.3	1.3	
U64030_at	deoxyuridine triphosphatase	Dutp	0.5	0.3	0.6	
rc_AA892680_at	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 3	Ppil3	0.9	0.3	0.4	
X54793_at	heat shock protein 1 (chaperonin) /// hypothetical gene supported by BC086507; NM_022229	Hspd1 /// LOC497838	0.5	0.4	0.7	
U68562mRNA#2_s_at	spermatogenesis associated, serine-rich 1	Spats1	0.9	0.4	0.4	
rc_AI639256_at	similar to erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked) isoform 1	LOC313052	0.5	0.4	0.7	
rc_AA894008_at						
AF069782_at	nucleolar protein 5	No15	0.7	0.4	0.6	
rc_AI176546_at	heat shock protein 1, alpha	Hspca	0.8	0.4	0.5	
U17697_s_at	cytochrome P-450, subfamily 51	Cyp51	0.9	0.4	0.4	
rc_AI102562_at	metallothionein	Mt1a	0.2	0.4	2.1	
M11794cds#2_f_at			0.2	0.4	2.3	
AB012214_s_at	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	Dnmt1	0.6	0.4	0.6	
rc_AA859980_at	similar to acetyl CoA transferase-like	MGC95138	0.8	0.4	0.5	
K00750exon#2_3_g_at	cytochrome c, somatic	Cycc	0.6	0.4	0.6	
rc_AA819500_g_at	replication factor C (activator 1) 4 (predicted)	Rfc4-predicted	0.4	0.4	1.1	
U86635_g_at	glutathione S-transferase, mu 5	Gstm5	0.4	0.5	1.4	
rc_AA945321_at			0.0	0.0	0.3	+
rc_AA859372_s_at			0.7	0.2	0.3	+
rc_AI009141_at	transcribed locus		0.8	0.3	0.4	+
M12335expandedCDS_s_at			0.3	0.1	0.5	
86 probe sets	61 genes					

MVA, maternal vitamin A administration; a symbol "+" in the MVA column indicates that MVA significantly altered the expression of its mRNA.

chical tree analysis, Euclidean distance and Ward's method were employed as the distance measure and the linkage rule, respectively. For cluster analysis related to MVA, the selected genes were defined by subjecting the difference in the signal intensities to "increase ( $\geq 2.5$ )" and "decrease ( $\leq 0.4$ )" by MVA at each developmental mode. Then, the selected genes were patterned into four groups in accordance with the developmental differences of signal intensity affected by MVA. All the microarray data in the present study were deposited to the GEO repository (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/>; accession number GSE3420).

#### Primary Culture of Rat DA Smooth Muscle Cells

Vascular smooth muscle cells (SMCs) in primary culture were obtained from DA of Wistar rat fetuses at the 21st day of gestation. Minced tissues were transferred to 800  $\mu$ l of collagenase-dispase enzyme mixture as described previously (36). DA SMCs were harvested in DMEM containing 0.1% fetal calf serum in ambient air in the presence or absence of all-trans retinoic acid (atRA) at a concentration of 10 nM for 4 days. DA SMCs were collected with TRIzol (Invitrogen).

#### Tissue Staining and Immunohistochemistry

Paraffin-embedded blocks containing DA tissues were prepared as previously demonstrated (37). Hyaluronic acid (HA) staining was done as described previously (37). For immunostaining of fibronectin, a rabbit anti-mouse antibody for fibronectin (Santa Cruz) was incubated at 4°C overnight.

#### SMC Migration Assay

DA SMCs were harvested in DMEM containing 0.1% fetal calf serum in the presence or absence of atRA at a concentration of 10 nM for 3 days. DA SMC migration assay was performed as previously demonstrated with some modifications (37).

#### Quantitative RT-PCR Analyses

To verify the microarray hybridization results, we performed quantitative RT-PCR analyses from the same RNA samples used for microarray hybridization as described previously (19, 33). The specifics for PCR primers used in RT-PCR analyses is provided in Supplemental Table S1.<sup>1</sup>

## RESULTS

### Development-dependent Gene Profiles in DA

Since the morphology and function of DA dramatically change during development, we investigated the developmental changes in the gene profiles in DA. Among a total of 8,740 probe sets, a total of 163 genes (219 probe sets) showed the significant difference ( $\geq 2.5$ -fold) between any two developmental modes. The Euclidean distance during

<sup>1</sup> The online version of this article contains supplemental material.

Table 2. *Genes in term-dominant cluster*

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Fold Difference Between Stages			MVA
			Term/Preterm	Postnatal/Preterm	Postnatal/Term	
X05831cds_at	fibronectin 1	Fnl	13.0	6.3	0.5	+
U82612cds_g_at			5.2	4.4	0.9	
U82612cds_at			4.7	3.5	0.7	
M28259cds_at			9.3	5.4	0.6	
AF004811_at	moesin	Msn	4.6	4.0	0.9	+
S61948_s_at	similar to Myh11 protein	LOC497849	3.6	1.3	0.4	+
AF087839mRNA#2_f_at	ATP-binding cassette, subfamily C (CFTR/ MRP), member 9	Abcc9	3.5	2.9	0.8	+
rc_AI234060_s_at	lysyl oxidase	Lox	3.0	1.4	0.5	+
rc_AA875582_at			3.0	1.7	0.6	
U50842_at	neural precursor cell expressed, developmentally downregulated gene 4A	Nedd4a	2.7	0.8	0.3	+
rc_AI176461_s_at	Golgi apparatus protein 1	Gig1	2.6	0.9	0.4	+
AB012234_g_at	nuclear factor I/X	Nfix	2.5	0.3	0.1	+
U76032_s_at	phosphodiesterase 5A, cGMP-specific	Pde5a	2.5	1.3	0.5	+
rc_AI230256_at	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	Id2	2.3	0.7	0.3	+
X53581cds#5_f_at	long interspersed repetitive DNA sequence LINE4 (L1Rn)	LOC500862	1.9	0.4	0.2	+
U83119_f_at			2.3	0.7	0.3	
rc_AA899106_at	cyclin D2	Ccnd2	1.4	0.3	0.2	+
D16308_at			2.5	0.5	0.2	
D14045_s_at	topoisomerase (DNA) 2 alpha	Top2a	1.6	0.6	0.4	+
X52140_at	integrin alpha 1	Itga1	1.6	0.6	0.4	+
E00988mRNA_s_at	insulin-like growth factor 2	Igf2	1.5	0.6	0.4	+
rc_AI638955_at	RNA binding motif protein 9 (predicted)	Rbm9-predicted	1.4	0.2	0.2	+
rc_AA900503_at	Jagged 1	Jag1	1.2	0.3	0.2	+
AF030050_at	replication factor C 1	Recc1	1.0	0.4	0.4	+
M62781_at	insulin-like growth factor binding protein 5	Igfbp5	10.7	3.4	0.3	
M25350_s_at	phosphodiesterase 4B	Pde4b	4.2	2.1	0.5	
rc_AI137246_s_at	neural cell adhesion molecule 1	Ncam1	4.1	2.0	0.5	
U94330_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	Tnfrsf11b	3.7	2.6	0.7	
U07619_at	coagulation factor 3	F3	3.6	2.2	0.6	
U01908cds_s_at	angiotensin II receptor, type 2	Agtr2	3.0	1.5	0.5	
D43778exon#3_s_at			3.6	1.4	0.4	
X82152_at	fibromodulin	Fmod	2.5	1.8	0.7	
rc_AI111481_s_at			4.0	2.5	0.6	
rc_AA859578_at	proprotein convertase subtilisin/kexin type 5	Pcsk5	3.1	2.8	0.9	
U90121_at	thrombomodulin	Thbd	3.1	1.6	0.5	
rc_AI639314_at	delangin (predicted)	NIPBL-predicted	3.1	0.9	0.3	
rc_AI029183_s_at	gap junction membrane channel protein alpha 1	Gjal	3.0	1.4	0.5	
S74907_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12A	Ppp1r12a	3.0	1.8	0.6	
rc_AA875037_at	similar to SPI6	MGC94010	2.9	2.1	0.7	
rc_AA859830_s_at	biglycan	Bgn	2.9	2.5	0.8	
rc_AI058941_s_at	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	Ddah1	2.9	2.1	0.7	
rc_AI180288_s_at	caldesmon 1	Cald1	2.7	1.5	0.6	
rc_AA818604_s_at	heat shock 70-kDa protein 1A /// heat shock 70-kDa protein 1B	Hspa1a /// Hspa1b	2.7	2.6	1.0	
D49955_at	bone marrow stromal cell antigen 1	Bst1	2.6	2.2	0.8	
D28860_s_at	prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	Ptger4	2.6	1.3	0.5	
M24353_g_at	mannosidase 2, alpha 1	Man2a1	2.5	1.0	0.4	
rc_AI639257_at	YTH domain family 3 (predicted)	Ythdf3-predicted	2.2	0.9	0.4	
S45812_s_at	monoamine oxidase A	Maoa	2.2	0.8	0.3	
U20181_at	iron responsive element binding protein 2	Ireb2	2.2	0.8	0.3	
rc_AA818982_at	thymopoietin	Tmpo	2.1	0.3	0.1	
rc_AA955167_s_at	myristoylated alanine rich protein kinase C substrate	Marcks	2.1	0.3	0.2	
rc_AA859896_at			1.8	0.5	0.3	
X13905cds_g_at	similar to Ras-related protein Rab-1B	MGC105830	1.4	0.5	0.4	
X13905cds_at			2.0	0.4	0.2	
U53475_at	RAB8B, member RAS oncogene family	Rab8b	1.7	0.6	0.4	
AF048828_g_at	voltage-dependent anion channel 1	Vdac1	1.9	0.7	0.4	
AF048828_at			1.3	0.5	0.3	
AF077354_at	heat shock protein 4	Hspa4	1.5	0.3	0.2	
rc_AA875506_at	casein kinase II, alpha 1 polypeptide	Csnk2a1	1.5	0.5	0.3	
AF031430_at	syntaxin 7	Stx7	1.4	0.4	0.3	

Continued

Table 2.—Continued

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Fold Difference Between Stages			MVA
			Term/Preterm	Postnatal/Preterm	Postnatal/Term	
rc_AI177004_s_at	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase 1	Hmgcs1	1.3	0.3	0.3	
AB016160_at	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor 1	Gabbr1	1.3	0.4	0.3	
rc_AI639417_at	membrane targeting (tandem) C2 domain containing 1	Mtac2d1	1.2	0.5	0.4	
rc_AI177404_at	NMDA receptor-regulated gene 1 (predicted)	Narg1_predicted	1.1	0.4	0.3	
U67082_at	zinc finger protein 386 (Kruppel-like)	Znf386	1.0	0.3	0.3	
X05472cds#2_at			7.3	0.8	0.1	+
rc_AA893870_g_at			3.0	0.7	0.2	+
rc_AA893870_at			2.4	1.0	0.4	
M13100cds#1_g_at			2.7	1.1	0.4	+
M13100cds#5_s_at			2.3	0.9	0.4	+
X07686cds_s_at	similar to LRRGT00149	LOC498738	2.3	0.5	0.2	+
rc_AA799406_at	hypothetical protein LOC503325	LOC503325	2.1	0.7	0.3	+
X05472cds#1_s_at			1.9	0.4	0.2	+
rc_AA894148_s_at			1.8	0.6	0.3	+
M13101cds_f_at			1.7	0.3	0.2	+
rc_AA892642_at	transcribed locus		1.2	0.4	0.4	+
rc_AA875275_at	transcribed locus		6.8	1.0	0.2	
M13100cds#2_s_at			1.6	0.6	0.4	
M13100cds#6_f_at			2.0	0.3	0.2	
rc_AA859740_at	transcribed locus		1.3	0.5	0.4	
80 probe sets	67 genes					

hierarchical clustering provided the rationale to classify genes into three clusters (Fig. 1 and Supplemental Fig. S1): the first cluster contained 61 genes (86 probe sets) showing a preterm-dominant expression (preterm-dominant cluster), the second cluster contained 67 genes (80 probe sets) showing a term-dominant expression (term-dominant cluster), and the third cluster contained 38 genes (53 probe sets) showing a postnatal dominant expression (postnatal-dominant cluster) (Tables 1–3). Three probe sets encoding common genes (AF077354\_g\_at and AF077354\_at for heat shock protein 4; rc\_AA925762\_at, rc\_AA859896\_at and rc\_AA955167\_s\_at for myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate; rc\_AA818604\_s\_at, Z75029\_s\_at and L16764\_s\_at for heat shock protein 1) belonged to two different clusters, resulting in the inconsistency in numbers between a total of 163 genes and summation of numbers of each cluster ( $n = 166$ ).

Of 61 genes in the preterm-dominant cluster (Table 1), most of genes have not been characterized in DA. The preterm-dominant cluster includes five genes encoding proteins related to cytoskeletal organization and the extracellular matrix such as the MHC polypeptide 7 (Myh7) and cardiac  $\alpha$ -actin (Actc1). This cluster also contained many transport-related genes such as albumin and  $\alpha$ -fetoprotein.

Of 67 genes in the term-dominant cluster (Table 2), several genes such as fibronectin; prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4) (Ptger4); cGMP-specific phosphodiesterase 5A (Pde5a); and ATP-binding cassette, subfamily C, member 9 (Abcc9) have physiological roles in DA. However, most genes have an unknown function in DA. Since the vascular remodeling of DA becomes prominent in the late stage of gestation (term), genes in the term-dominant cluster may be potential targets for regulatory factors of vascular remodeling and maturation in DA.

Of 38 genes in the postnatal dominant cluster (Table 3), most of genes have not been characterized in DA. There were many immediate-early genes such as Jun B, early growth response 1 (Egr1), zinc finger protein 36, dual specificity phosphatase 1, and B-cell translocation gene 2 (Btg2) in this cluster. Genes in this cluster may represent the response to the transition from fetal to neonatal circulation.

#### Changes in Gene Profiles by MVA in DA

Among a total of 8,740 probe sets, a total of 91 genes (116 probe sets) showed significant difference between DA in the presence or absence of MVA at least at one developmental mode. The effects of MVA on transcriptional profiles in the DA were dependent on its developmental mode. Based on the developmental mode-specific effects of MVA on gene expression, we classified the 116 probe sets into four groups: downregulation, preterm upregulation, perinatal upregulation, and postnatal upregulation (Fig. 2). Cyclin D2 was assigned to two groups in a probe set-dependent manner (D16308\_at and rc\_AA899106\_at), resulting in the inconsistency in numbers between a total of 91 genes and summation of numbers of each group ( $n = 92$ ).

In cluster A (downregulation), in the absence of MVA, the averaged signal intensities of genes in this cluster were developmentally decreased from preterm to term. Of 27 genes, 22 genes belonged to the preterm-dominant cluster. MVA decreased the gene expression levels, especially at preterm (Table 4). Accordingly, the expression levels of MVA-treated genes at preterm became similar to expression levels of non-treated DA at term, suggesting that MVA promoted the downregulation of these genes. Many transport-related genes such as albumin and  $\alpha$ -fetoprotein belonged to this group.

Table 3. *Genes in postnatal dominant cluster*

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Term/Preterm	Fold Difference Between Stages		MVA
				Postnatal/Preterm	Postnatal/Term	
D26393exon_s_at	hexokinase 2	Hk2	0.6	11.6	18.4	
rc_AA893846_at	tenascin N (predicted)	Tnn_predicted	5.4	7.5	1.4	
X73524_at	desmin	Des	4.1	6.3	1.5	
U17254_g_at	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	Nr4a1	1.2	7.3	6.3	
U17254_at			1.4	4.4	3.1	
X54686cds_at	Jun-B oncogene	Junb	1.0	4.2	4.1	
rc_AA891041_at			0.3	6.0	17.3	
U02553cds_s_at	dual specificity phosphatase 1	Dusp1	1.1	3.3	3.1	
S81478_s_at			1.4	4.3	3.1	
S74351_s_at			2.1	4.6	2.2	
U75397UTR#1_s_at	early growth response 1	Egr1	0.9	3.9	4.5	
rc_AI176662_s_at			1.2	4.6	3.7	
M18416_at			0.7	4.0	5.8	
AF023087_s_at			0.7	3.5	4.8	
L07315_at	dipeptidase 1 (renal)	Dpep1	2.3	3.5	1.5	
S66024_at	cAMP responsive element modulator	Crem	2.7	3.0	1.1	
L16764_s_at	heat shock 70-kDa protein 1A /// heat shock	HspalA /// HspalB	2.2	2.6	1.2	
Z75029_s_at	70-kDa protein 1B		2.1	2.9	1.4	
rc_AI176856_at	cytochrome P-450, family 1, subfamily b, polypeptide 1	Cyp1b1	0.7	2.0	2.9	
M32062_g_at	Fc receptor, IgG, low affinity III /// Fc gamma receptor II beta /// similar to low-affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III precursor (IgG Fc receptor III) (Fc-gamma RIII) (FcRIII)	Fcgr3 /// LOC498276 /// LOC498277	1.5	3.1	2.1	
X06769cds_g_at	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	Fos	1.1	5.6	5.1	
X06769cds_s_at			1.6	28.3	18.0	
X03347cds_g_at			1.1	7.6	6.8	
rc_AI176710_at	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	Nr4a3	1.3	5.7	4.3	
M15562_g_at	RT1 class II, locus Da	RT1-Da	2.8	5.5	2.0	
U20796_at	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2	Nr1d2	1.9	5.1	2.8	
rc_AI179610_at	heme oxygenase (decycling) 1	Hmox1	1.2	3.5	2.9	
J02722cds_at			0.7	4.3	6.1	
M23697_at	plasminogen activator, tissue	Plat	1.9	3.8	2.0	
X17053mRNA_s_at	chemokine (C-C motif) ligand 2	Ccl2	0.9	3.6	3.9	
rc_AI237654_at	upregulated by 1,25-dihydroxyvitamin D-3	Txnip	2.1	3.8	1.8	
rc_AI014169_at			1.4	2.9	2.1	
L23088_at	selectin, platelet	Selp	1.9	3.3	1.8	
rc_AA800613_at	zinc finger protein 36	Zfp36	1.3	3.2	2.5	
X07266cds_s_at	similar to mitogen-inducible gene 6 protein homolog (Mig-6) (Gene 33 polypeptide) (predicted)	RGD1307599-predicted	2.7	3.8	1.4	
rc_AI169756_s_at			2.1	2.5	1.2	
D88250_at	complement component 1, s subcomponent	C1 s	1.7	3.2	1.9	
rc_AA800318_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade G, member 1	Serping1	0.9	3.0	3.3	
rc_AA944156_s_at	B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	Btg2	1.7	2.9	1.7	
M60921_g_at			0.8	3.4	4.0	
M60921_at			1.2	2.7	2.4	
Y08355cds#2_at	sequestosome 1	Sqstm1	1.7	2.7	1.6	
U65656_at	matrix metalloproteinase 2	Mmp2	2.1	2.7	1.3	
X96437mRNA_g_at	immediate early response 3	Ler3	1.7	2.6	1.5	
U12187_at	Ras-related associated with diabetes	Rrad	0.8	2.6	3.2	
D12769_g_at	basic transcription element binding protein 1	Bteb1	1.2	2.6	2.2	
X58830_at	bone morphogenetic protein 6	Bmp6	1.5	2.6	1.7	
AF065438_at	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	Lgals3bp	1.8	2.6	1.4	
AF020618_g_at	myeloid differentiation primary response gene 116	Myd116	0.6	1.7	2.7	
S72637_s_at	neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1	Nbl1	0.6	1.6	2.6	
M33648_g_at	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase 2	Hmgcs2	0.5	1.2	2.6	+
rc_AI176456_at			0.4	3.2	9.0	+
rc_AA874873_g_at			1.62	2.70	1.67	
53 probe sets	38 genes					