

Fig. 2. Clustering of 91 genes that showed the significant difference between DA in the presence or absence of MVA. Four 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. MVA, maternal vitamin A administration.

In *cluster B* (upregulation at preterm), in the absence of MVA, the averaged signal intensities of genes in this cluster were developmentally increased from preterm to term. Of 24 genes, 19 genes belonged to the perinatal dominant cluster. MVA upregulated the gene expression at preterm (Table 5). Accordingly, the expression levels of MVA-treated genes at preterm became similar to expression levels of nontreated DA at term, indicating that MVA promoted the upregulated expression of genes. In both *cluster A* and *B*, MVA promoted the developmental changes in gene profiles, resulting in a global profile at preterm that resembled that of the control animal at term.

In *cluster B*, the physiological roles of three genes have been identified in DA: fibronectin 1 (3); Pde5a (32); and ATP-binding cassette, subfamily C (CFTR/MRP), member 9 (Abcc9) (21). Abcc9 is also known as sulfonylurea receptor 2 (SUR2), a component of ATP-sensitive potassium (KATP) channel. We will discuss the role of these genes in vascular remodeling and/or contraction later in *Specific Genes of Interest*. The physiological roles of other genes have not been clarified in DA.

In *cluster C* (perinatal upregulation), in the absence of MVA, the averaged signal intensities of genes in this cluster were developmentally decreased. MVA maintained the expression levels of five genes at term at similar or even higher levels of those at preterm (Table 6). Among them, four genes were related to cytoskeleton organization and belonged to the preterm-dominant cluster.

In *cluster D* (postnatal upregulation), in the absence of MVA, the averaged signal intensities of genes in this cluster were decreased at birth. MVA maintained the expression levels of these genes at birth at similar or even higher levels of those at preterm and term (Table 7). Of 37 genes, three and 14 genes belonged to the preterm- and term-dominant clusters, respectively. Vascular endothelial growth factor

(VEGF), which plays an important role in vascular remodeling of DA (6), belonged to this cluster. The expression levels of integrin  $\alpha 1$  and  $\beta 3$  gene were significantly increased by MVA at birth. In addition, several genes involved in cell differentiation and apoptosis were found in *cluster D*. The physiological role of most genes, however, has not been identified in DA.

Interestingly, the expression of half of genes in the preterm-dominant (30/61) and term-dominant clusters (33/67) was altered in response to MVA, whereas that of only 5% of genes in postnatal dominant cluster (2/38) was changed by MVA, indicating that fetus-dominant genes were susceptible to retinoid signal.

#### Specific Genes of Interest

**Extracellular matrix.** Since extracellular matrix has profound effects on vascular remodeling of DA (24), RA-mediated changes in extracellular matrix are of great interest. We found that MVA significantly increased fibronectin transcripts at preterm and integrin  $\alpha 1$  and  $\beta 3$  transcripts after birth (Fig. 3, A–C). The expression levels of other genes encoding extracellular matrix proteins including collagens, heparan sulfate proteoglycans, chondroitin sulfate proteoglycans, and laminins were not altered by MVA (Fig. 3, D–G). In addition to fibronectin, HA plays an important role in intimal cushion formation in DA (3, 37). No information regarding HA synthase (HAS) was available in the present study, since there was no probe for a gene encoding HAS in the rat genome U34A GeneChip. Therefore, by quantitative RT-PCR analysis, we investigated the expression of HAS2, a predominant isoform in vascular SMCs. MVA increased the expression of HAS2 mRNA by 1.8-fold at preterm (Fig. 3H).

Table 4. Cluster A: downregulation by MVA

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Fold Difference Between MVA(+)/MVA(-)			Developmental Cluster
			Preterm	Term	Postnatal	
rc_AA866237_s_at	albumin	Alb	0.0	0.5	0.3	preterm
rc_AA860062_g_at			0.0	0.4	0.4	
M38759_at	histidine decarboxylase	Hdc	0.0	0.4	0.4	preterm
X16273cds_g_at	serine (or cysteine) proteinase inhibitor,	Serpina1	0.0	1.0	0.8	preterm
X16273cds_at	clade A (alpha-1 antiproteinase,		0.0	0.8	0.5	
rc_AI010453_at	antitrypsin), member 1		0.1	0.6	0.2	
X63446_at	alpha-2-HS-glycoprotein	Ahsg	0.0	0.6	0.5	preterm
D10261_g_at			0.1	0.6	0.8	
M35601_g_at	fibrinogen, alpha polypeptide	Fga	0.0	0.7	0.4	preterm
M35601_at			0.1	0.5	0.4	
X02361_g_at	alpha-fetoprotein	Afp	0.0	0.5	0.2	preterm
X02361_at			0.0	0.9	0.6	
rc_AI237884_s_at			0.1	1.8	1.8	
K01231_f_at			0.1	0.3	0.7	
X05861exon#1_6_s_at	fibrinogen, gamma polypeptide	Fgg	0.1	2.1	0.5	preterm
J00735_g_at			0.0	0.5	0.2	
M00001_i_at	apolipoprotein A-I	Apoa1	0.0	0.7	0.1	preterm
J02597cds_s_at			0.1	1.1	0.6	
M81397_at	coagulation factor 2	F2	0.1	1.6	0.2	preterm
D38380_g_at	transferrin /// signal recognition particle	Tf /// Srprb_predicted	0.1	1.0	1.0	preterm
D38380_at	receptor, B subunit (predicted)		0.1	1.0	0.8	
U31866_g_at			0.1	0.9	0.6	
K02814_at	kininogen 1	Kng1	0.1	0.6	0.2	preterm
K02814_g_at			0.1	0.8	0.1	
rc_AA945169_g_at	transthyretin	Ttr	0.1	1.7	0.2	preterm
rc_AA945169_at			0.2	0.7	0.8	
U05675_at	fibrinogen, B beta polypeptide	Fgb	0.2	1.1	0.2	preterm
S87544_g_at	alpha 1 microglobulin/bikunin	Ambp	0.2	0.6	0.7	preterm
U50353mRNA_s_at	defensin RatNP-3 precursor	RatNP-3b	0.2	0.9	2.1	preterm
X02291exon_s_at	aldolase B	Aldob	0.2	1.0	1.4	preterm
rc_AA893495_at	serine (or cysteine) proteinase inhibitor,	Serpina6	0.3	0.7	1.1	not
	clade A (alpha-1 antiproteinase,					
	antitrypsin), member 6					
K01933_at	haptoglobin	Hp	0.3	0.9	0.8	not
U19485_g_at	secreted phosphoprotein 2	Spp2	0.3	0.6	0.9	preterm
M10934_s_at	retinol binding protein 4, plasma	Rbp4	0.2	0.9	0.9	preterm
K03045cds_s_at			0.3	0.9	0.8	
M11794cds#2_f_at	metallothionein	Mt1a	0.3	0.7	0.7	preterm
M33648_g_at	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme	Hmgcs2	0.3	0.8	1.5	postnatal
	A synthase 2					
S76779_s_at	apolipoprotein E	ApoE	0.3	1.0	1.8	preterm
U16686_at	defensin, alpha 5, Paneth cell-specific	Defa	0.4	0.4	1.4	preterm
rc_AI014135_g_at	Mss4 protein	Mss4	0.6	0.3	0.8	not
rc_AA945321_at			0.0	0.2	0.4	preterm
rc_AI176456_at			0.2	0.6	0.5	postnatal
42 probe sets	27 genes					

In the Developmental Cluster column, "not" indicates that the gene does not belong to any developmental mode-specific cluster.

Since previous studies have demonstrated that fibronectin and HA play an important role in intimal cushion formation (2, 17, 37), we hypothesized that upregulation of fibronectin and HA by MVA may accelerate the formation of intimal cushion at preterm. We found that intimal cushion formation was already visible in MVA-treated DA at preterm as usually seen in DA at term, whereas it was rarely found in control DA at preterm (Fig. 4A). Accordingly, the intima-media ratio was higher in MVA-treated DA than in control DA at preterm (Fig. 4B), even though the media of the smooth muscle layer was thicker in MVA-treated DA than in control DA at preterm (Fig. 4C). The thickness of intimal cushion was not different between MVA-treated DA than in control DA at term. We also found strong HA and fibronectin staining in MVA-treated DA at preterm at a similar level

with that in control DA at term (Fig. 4A). Furthermore, we investigated the effects of atRA on DA SMC migration using a modified Boyden chamber method, because SMC migration into the subendothelial layer is an important cellular process for intimal cushion formation in DA. In the presence of atRA, SMC migration was slightly increased at basal level although the value did not reach statistical significance (Fig. 5A). PDGF, a potent enhancer of cell migration, significantly increased DA SMC migration. atRA administration further increased PDGF-induced migration (Fig. 5A). The expression of fibronectin was significantly increased in atRA-treated DA SMCs when compared with that in nontreated DA SMCs (Fig. 5B). The expression of HAS2 was also increased in atRA-treated DA SMCs, although the value did not reach statistical significance (Fig. 5B).

Table 5. Cluster B: upregulation at preterm by MVA

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Fold Difference Between MVA(+)/MVA(-)			DA Development
			Preterm	Term	Postnatal	
X05831cds_at	fibronectin 1	Fn1	8.2	0.8	0.9	term
U82612cds_at			2.9	0.8	0.5	
M28259cds_at			5.8	0.8	0.8	
AF004811_at	moesin	Msn	3.6	0.8	0.9	term
D43778exon#3_s_at			3.3	1.0	0.8	term
rc_AI234060_s_at	angiotensin II receptor, type 2	Agt2	3.2	1.1	1.5	term
rc_AA875582_at			3.1	1.0	1.4	
rc_AA866443_at	lysyl oxidase	Lox	3.1	1.2	0.9	not
rc_AA800908_at			2.9	1.1	0.7	not
AF036761_at	protease, serine, 35 (predicted)	Prss35	2.9	0.8	1.2	not
S61948_s_at			2.9	0.8	1.3	term
U50842_at	potassium channel tetramerisation domain containing 12 (predicted)	Kctd12_predicted	2.8	1.4	3.6	term
D16308_at			2.7	1.5	6.2	term
AB012234_g_at	cyclin D2	Ccnd2	2.7	2.0	16.4	term
Z14030_at			2.6	1.1	5.7	not
rc_AI176461_s_at	nuclear factor I/X	Nfix	2.6	1.1	2.4	term
D14045_s_at			2.6	1.1	1.1	term
AF087839mRNA#2_f_at	signal sequence receptor, gamma	Ssr3	2.5	1.1	0.9	term
U76032_s_at			2.5	0.9	1.4	term
E00988mRNA_s_at	Golgi apparatus protein 1	Glg1	2.5	1.3	1.9	term
rc_AA859372_s_at			34.4	2.6	8.5	preterm
X05472cds#2_at	topoisomerase (DNA) 2 alpha	Top2a	11.8	1.7	9.7	term
X07686cds_s_at			3.5	1.6	5.0	term
rc_AA893870_g_at	ATP-binding cassette, subfamily C (CFTR/MRP), member 9	Abcc9	2.9	0.9	3.5	term
M13100cds#5_s_at			2.9	1.7	2.2	term
M13100cds#1_g_at	phosphodiesterase 5A, cGMP-specific	Pde5a	2.9	0.9	2.0	term
X05472cds#1_s_at			2.7	1.9	5.2	term
27 probe sets	insulin-like growth factor 2	Igf2	2.7	1.9	5.2	term
			34.4	2.6	8.5	preterm
	similar to LRRGT00149	LOC498738	11.8	1.7	9.7	term
			3.5	1.6	5.0	term

DA, ductus arteriosus. In the DA Development column, "not" indicates that the gene does not belong to any developmental mode-specific cluster.

**Cytoskeleton.** Since the composition of the genes related to cytoskeletal organization is known to be an excellent marker of muscle differentiation, we evaluated the effects of MVA on the expression of myofibril-related genes in DA in detail. As described above, the expression levels of fetal cardiac type of five myofibril-related genes remained the same or showed elevated expression levels compared with those at preterm by MVA (Fig. 6, A–E). Accordingly, MVA tended to prevent the genes encoding cardiac myofibrillar proteins from developmentally dependent downregulation in matured DA, resulting in retarded smooth muscle differentiation in DA. The expres-

sion of the gene encoding similar to Myh11 protein was upregulated at preterm by MVA (Fig. 6F). By contrast, the expression levels of the smooth muscle MHC genes such as SM22, SM1, and SM2 were not altered by MVA (Fig. 6, G–I). Although most of data were consistent between quantitative RT-PCR and microarray analyses, it should be noted that there was an inconsistency between quantitative RT-PCR and microarray data regarding the expression of SM22 mRNA (Supplemental Fig. S2). The microarray analysis showed that the expression of SM22 mRNA was further upregulated after birth, whereas quantitative RT-PCR analysis demonstrated that it

Table 6. Cluster C: perinatal upregulation by MVA

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Fold Difference Between MVA(+)/MVA(-)			DA Development
			Preterm	Term	Postnatal	
rc_AA891242_g_at	myosin, light polypeptide 7, regulatory (predicted)	MyI7_predicted	0.6	13.5	8.8	preterm
rc_AA891242_at			0.8	3.1	3.5	
X15939_f_at	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta	Myh7	0.8	6.1	3.2	preterm
X80130cds_i_at			1.2	4.9	6.1	preterm
rc_AI104567_g_at	actin alpha cardiac 1	Actc1	0.9	6.8	7.7	
rc_AA866452_s_at			0.9	6.2	8.1	
rc_AA945054_s_at	cytochrome b-5	Cyb5	0.3	3.8	0.7	not
M80829_at			0.6	2.6	3.4	preterm
8 probe sets	troponin T2, cardiac	Tnnt2				
	5 genes					

Table 7. Cluster D: postnatal upregulation by MVA

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Fold Difference Between MVA(+)/MVA(-)			DA Development
			Preterm	Term	Postnatal	
rc_AI638955_at	RNA binding motif protein 9 (predicted)	Rbm9-predicted	1.6	1.5	11.6	term
rc_AA899106_at	cyclin D2	Ccnd2	1.5	1.2	5.6	term
X53581cds#5_f_at	long interspersed repetitive DNA sequence LINE4 (LIRn)	LOC500862	2.1	1.3	4.6	term
M83680_at	RAB14, member RAS oncogene family	Rab14	1.5	2.2	4.3	not
M92074_g_at	troponin I, cardiac	Tnni3	0.9	2.2	4.3	not
S68135_s_at	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	Slc2a1	1.1	1.2	4.1	not
U62897_at	carboxypeptidase D	Cpd	1.8	1.3	4.0	not
AF001417_s_at	core promoter element binding protein	Copeb	1.7	1.4	3.6	not
AF030050_at	replication factor C 1	Recc1	1.5	1.3	3.6	term
AF048828_at	voltage-dependent anion channel 1	Vdac1	1.6	1.5	3.5	term
U42627_at	dual specificity phosphatase 6	Dusp6	1.3	1.3	3.5	not
U50185_g_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12A	Ppp1r12a	2.2	2.0	3.5	not
U50185_at	(inhibitor) subunit 12A		1.5	2.1	3.3	not
L10326_at	GNAS complex locus	Gnas	2.0	1.6	3.3	not
rc_AA850734_at	vascular endothelial growth factor A	Vegfa	1.4	1.1	3.1	not
rc_AA894332_at	integrin, beta3	Itgb3	1.4	1.1	3.0	not
J04024_at	ATPase, Ca <sup>2+</sup> transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	Atp2a2	1.2	1.1	3.0	not
rc_AI230256_at	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	Id2	1.8	0.9	3.0	term
rc_AA925762_at	myristoylated alanine rich protein kinase C substrate	Marcks	1.3	1.6	10.2	preterm
rc_AA859896_at	C substrate		1.4	1.1	2.9	term
U77931_at	rRNA promoter binding protein	LOC257642	2.1	1.5	2.9	not
rc_AI013194_at	eukaryotic translation initiation factor 5	Eif5	1.8	1.5	2.8	not
X13167cds_s_at	nuclear factor I/A	Nfia	1.3	1.1	2.8	not
S71570_s_at	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II gamma	Camk2 g	0.8	0.9	2.7	not
AF009330_at	basic helix-loop-helix domain containing, class B2	Bhlhb2	1.1	0.9	2.7	not
AF077354_g_at	heat shock protein 4	Hspa4	0.9	1.2	2.7	preterm
rc_AA893853_at	androgen receptor-related apopto- sis-associated protein CBL27	Cbl27	1.5	1.6	2.7	not
rc_AA900503_at	Jagged 1	Jag1	1.2	1.0	2.7	term
X52140_at	integrin alpha 1	Itga1	0.9	1.2	2.6	term
M13100cds#6_f_at			2.1	1.3	5.5	term
M13101cds_f_at			1.9	1.3	4.4	term
X61295cds_s_at			1.9	1.7	3.2	
rc_AI638989_at			1.6	1.5	3.4	not
rc_AA866299_at	transcribed locus		1.0	0.9	3.2	not
rc_AA799406_at	hypothetical protein LOC503325	LOC503325	2.1	1.0	3.2	term
rc_AI639367_at	transcribed locus		1.2	1.0	3.0	not
rc_AA894148_s_at			2.0	0.9	2.9	term
rc_AA892642_at	transcribed locus		1.0	1.0	2.8	term
rc_AI009141_at	transcribed locus		0.7	1.2	2.6	preterm
39 probe sets	36 genes					

was decreased from the 21-day of gestation to a postnatal period.

Because Colbert et al. (10) demonstrated that endogenous RA signaling, which colocalized with advanced expression of SM2, promoted SM2 induction during development and a number of studies have demonstrated that RA induces differentiation in vascular SMCs (15, 18), the above finding was somehow unexpected. Therefore, we investigated the effect of atRA on the expression of myofibrillar genes such as Myh7, Actc1, Tnni3, SM22, SM1, and SM2 using cultured DA SMCs. We found that atRA upregulated SM1, SM2, and SM22 mRNAs and downregulated Myh7 mRNA in cultured DA SMCs (Fig. 7). Thus, the result obtained from cultured DA SMCs was apparently different from the DNA microarray data obtained from in vivo MVA-treated DA.

**Phosphodiesterase.** The PDE gene superfamily consists of at least nine genes: Pde1 to Pde9 (14). The present microarray analyses revealed that Pde1, Pde2, Pde3, Pde4b, and Pde5a were present in DA at least at one developmental mode and that Pde5a was the only isoform whose expression was significantly altered by MVA (Fig. 8). Both quantitative RT-PCR and microarray analyses demonstrated MVA upregulated Pde5a mRNA at preterm, although they showed an inconsistency in the postnatal expression (Supplemental Fig. S3).

**Ion channels and pumps.** Nakanishi et al. (21) have demonstrated that KATP channels play an important role in oxygen-induced vasoconstriction of DA. KATP channels are hetero-octameric proteins composed of inwardly rectifying potassium channels and SUR subunits. We found that MVA increased SUR2 (Abcc9) transcripts at preterm (Fig. 9A). Another SUR

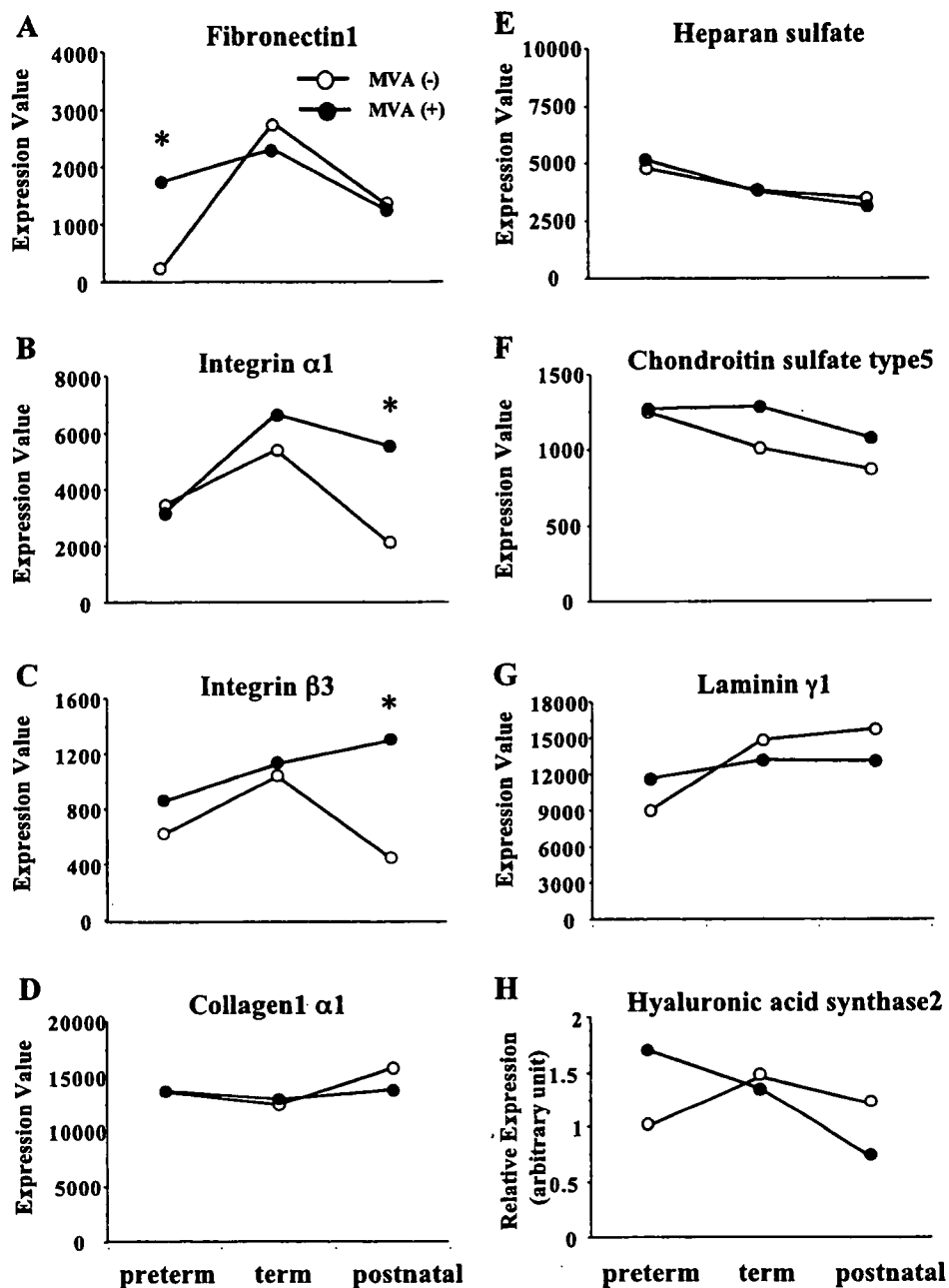


Fig. 3. The pattern of expression changes in genes encoding extracellular matrix proteins by MVA. MVA increased fibronectin transcripts at preterm and integrin  $\alpha$ 1 and  $\beta$ 3 on the day of birth. Data are expressed as means of duplicate experiments in expression value. Since HAS2 was called "absent" in DNA microarray, the data were obtained by quantitative RT-PCR analysis and expressed as means of triplicate experiments in arbitrary unit.  $\circ$ , Nontreated DA;  $\bullet$ , MVA-treated DA; \*2.5-fold difference between nontreated and MVA-treated DA. HAS2, hyaluronic acid synthase 2.

isoform, SUR1, was called "absent" in DA. Among inwardly rectifying potassium channels, Kir6.1 and Kir1.1 were called "present" in DA. The expression of both genes was not affected by MVA (Fig. 9, B and C). Other potassium channels, such as Kv1.5 and Kv2.1, were called "absent" in DA. We also found that two channel-related genes encoding potassium channel tetramerization domain containing 12 (predicted) and voltage-dependent anion channel 1 belonged to cluster B and D, respectively (Fig. 9, D and E). Sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$  transporting, cardiac muscle, slow twitch 2) mRNA was postnatally upregulated by MVA (Fig. 9F). Phospholamban, an endogenous inhibitory protein of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase, was called "absent" in DA.

Other genes of which a functional role has been well characterized in DA. Clyman et al. (6) has demonstrated that VEGF plays an important role in the formation of neointimal mounds and vasa vasorum in-growth during permanent ductus closure. MVA postnatally increased the expression of VEGF-A mRNA (Fig. 10A). Endothelin-1 has been known to induce contraction of DA, resulting in postnatal DA closure (11, 31). MVA did not alter the expression of endothelin-1 and endothelin converting enzyme (Fig. 10, B and C). Endothelin receptor A and B were called "absent" in DA. Since prostaglandin E receptor subtype 4 (EP4) and cyclooxygenase-1 and -2 (COX-1, -2) play a critical role in the patency of DA (16, 22, 27), the effect of MVA on the expression of these genes is of great interest. The expression levels of EP4, COX-1, and

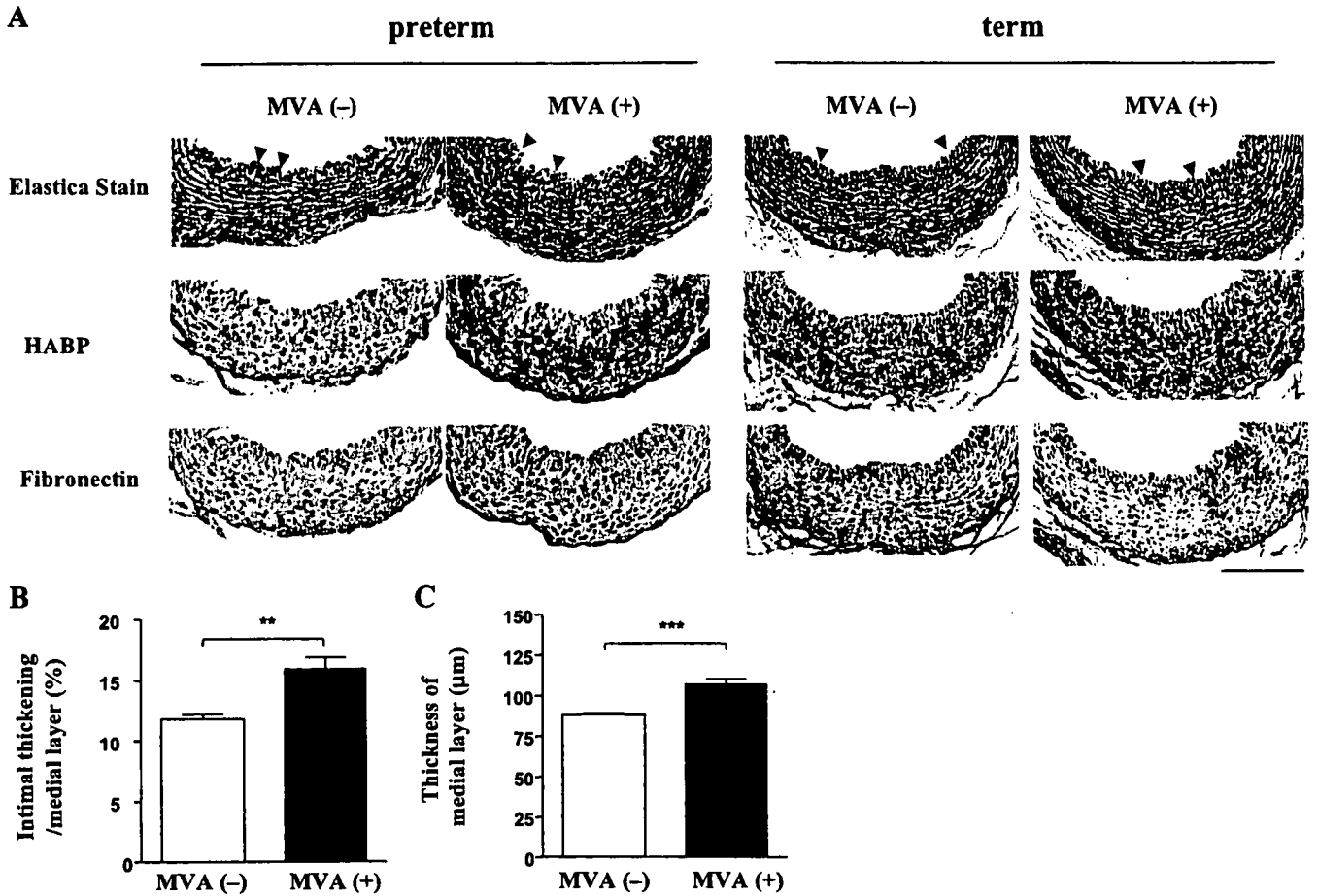


Fig. 4. MVA promoted intimal cushion formation at preterm. **A**: effect of MVA on intimal cushion formation and HA and fibronectin production in rat DA. Intimal cushion formation was already visible in MVA-treated DA at preterm as usually seen in DA at term, whereas it was rarely found in control DA at preterm. Intimal cushion formation was similar between MVA-treated and control DA at term. HA production was visualized by HABP stain (*middle*). The stain of HABP and fibronectin was increased in preterm DA in the presence of MVA. Scale bars, 100  $\mu$ m. **B**: intima-media ratio was higher in MVA-treated DA than in control DA at preterm. **C**: media of DA was thicker MVA-treated DA than in control DA at preterm ( $n = 5-7$ ). Data are expressed as means  $\pm$  SE. Arrowheads indicate the region of intimal thickening. \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ . HABP, HA binding protein (HABP).

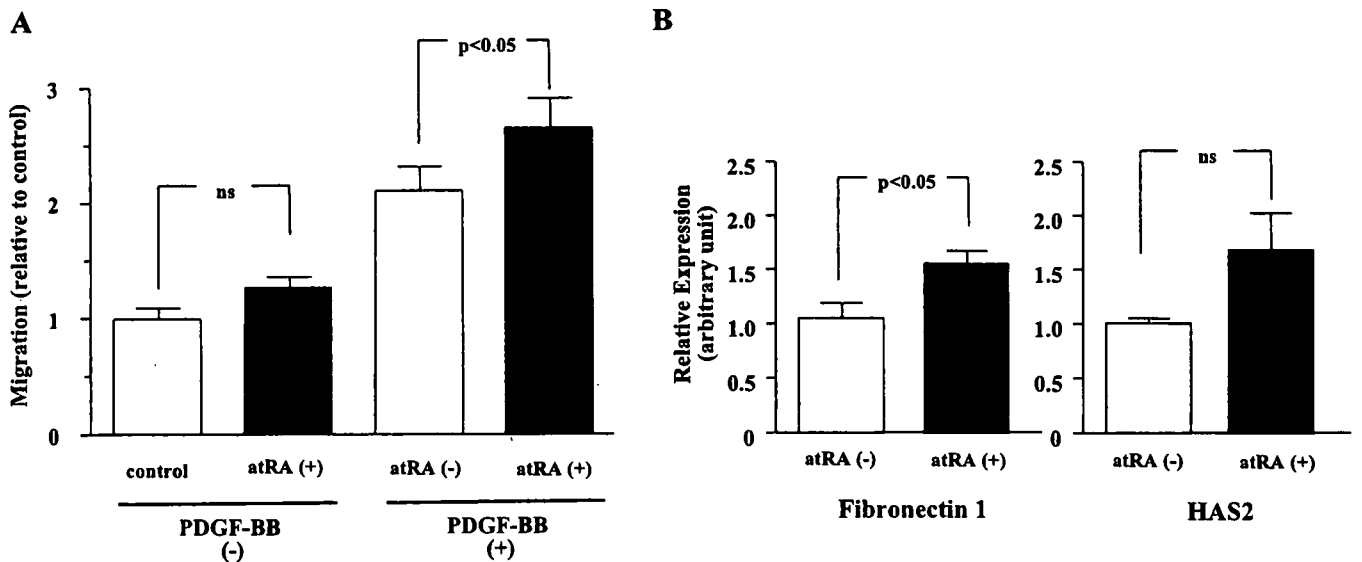


Fig. 5. Effects of atRA on DA SMC migration. **A**: cell migration in response to atRA exposure was measured by modified Boyden chamber method. The PDGF-BB-induced SMC migration was significantly increased by atRA ( $n = 16$ ). Data are expressed as means  $\pm$  SE. **B**: expression of fibronectin-1 and HAS2 mRNAs was measured by quantitative RT-PCR analysis ( $n = 6$ ). Data are expressed as means  $\pm$  SE. atRA, all-trans retinoic acid; PDGF-BB, platelet-derived growth factor-BB; ns, not significant; SMC, smooth muscle cell.

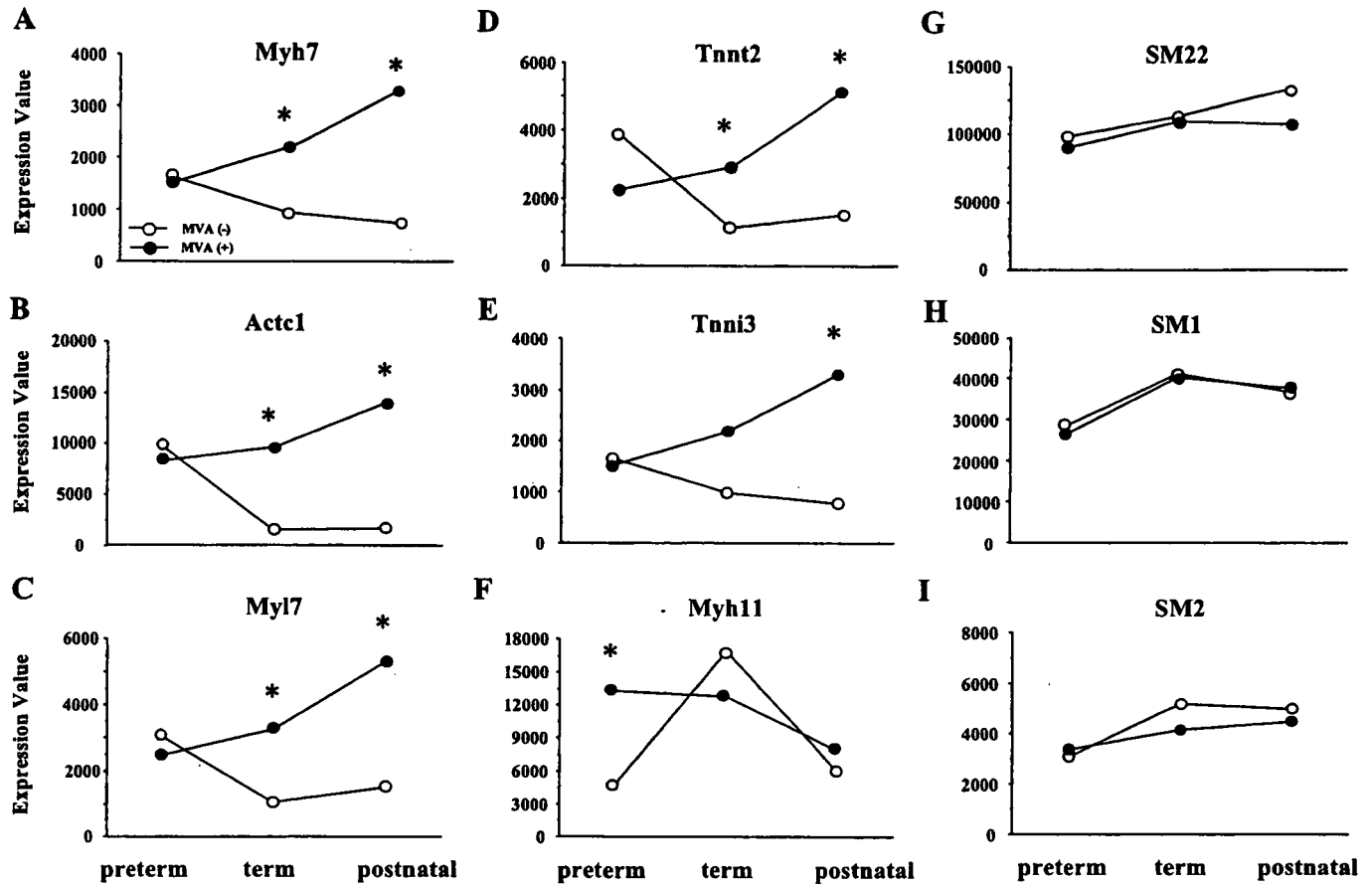


Fig. 6. The pattern of expression changes in myofibril-related genes by MVA. The expression levels of Myh7 (A), Actc1 (B), Myl7 (C), Tnnt2 (D), Tnni3 (E), and Myh11 (F) mRNAs were upregulated by MVA. MVA did not change these expression levels of SM22 (G), SM1 (H), and SM2 (I) mRNAs. Data are expressed as means of duplicate experiments in expression value.  $\circ$ , Nontreated DA;  $\bullet$ , MVA-treated DA; \*2.5-fold difference between nontreated and MVA-treated DA. Myh7, myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta; Actc1, actin alpha cardiac 1; Myl7, myosin, light polypeptide 7, regulatory; Tnnt2, troponin T2, cardiac; Tnni3, troponin I type 3 (cardiac); Myh11, myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle; SM22, transgelin; SM1, smooth muscle myosin heavy chain 1; SM2, smooth muscle myosin heavy chain 2.

COX-2 mRNAs were not significantly altered by MVA (Fig. 10, D-F).

#### Confirmation of Accuracy of Microarray Hybridization Results by Quantitative Real-Time RT-PCR Analyses

To confirm the accuracy of microarray hybridization results, we used quantitative RT-PCR analyses to examine the expression of 13 mRNAs: SM1, SM2, SM22, Myh7, Actc1, Tnnt2, Tnni3, Pde5a, Abcc9, Kcnj8, EP4, endothelin-1, and fibronectin 1. Although there were incongruent data between microarray and quantitative RT-PCR analyses in individual genes, we found significant correlation between microarray hybridization and quantitative RT-PCR results (Supplemental Fig. S4), indicating that the present results described above were verified.

#### DISCUSSION

The present microarray analysis revealed that the gene expression profiles in the DA dramatically changed during development. The changes in the expression of the distinct subsets of genes are responsible at least in part for the changes in morphology and function of the DA during development. Genes in the preterm-dominant cluster and in the term-dominant cluster may be associated with immaturity and maturity of

the DA, respectively. Genes in the postnatal-dominant cluster may be associated with the response to the transition from fetal to neonatal circulation. In accordance with the developmental changes in gene profiles, one of the important findings of the present study is that the effects of MVA on gene expression profiles are dependent on DA development and conditions such as the transition from fetal to neonatal circulation. About half of the genes in the preterm-dominant and term-dominant clusters responded to MVA, whereas only 5% of genes in the postnatal-dominant cluster responded to MVA. These results indicated that fetus-dominant genes were susceptible to retinoid signal. On the other hand, it should be noted that a considerable number of genes were postnatally upregulated by MVA (see cluster D), even though these genes were exposed to RA stimuli from the 17th day of gestation. Therefore, the results suggest that in addition to RA signals, other postnatal factors such as oxygen must play a role in the regulation of MVA-related gene expression after birth. In this regard, Demary et al. (13) have demonstrated that RA receptor activity is regulated by redox state. Costa et al. (11) also demonstrated that oxygen changed gene expression profiles in rat DA. Not only oxygen, but also declined circulating PGE<sub>2</sub> may contribute to MVA-related postnatal upregulation of genes. Further

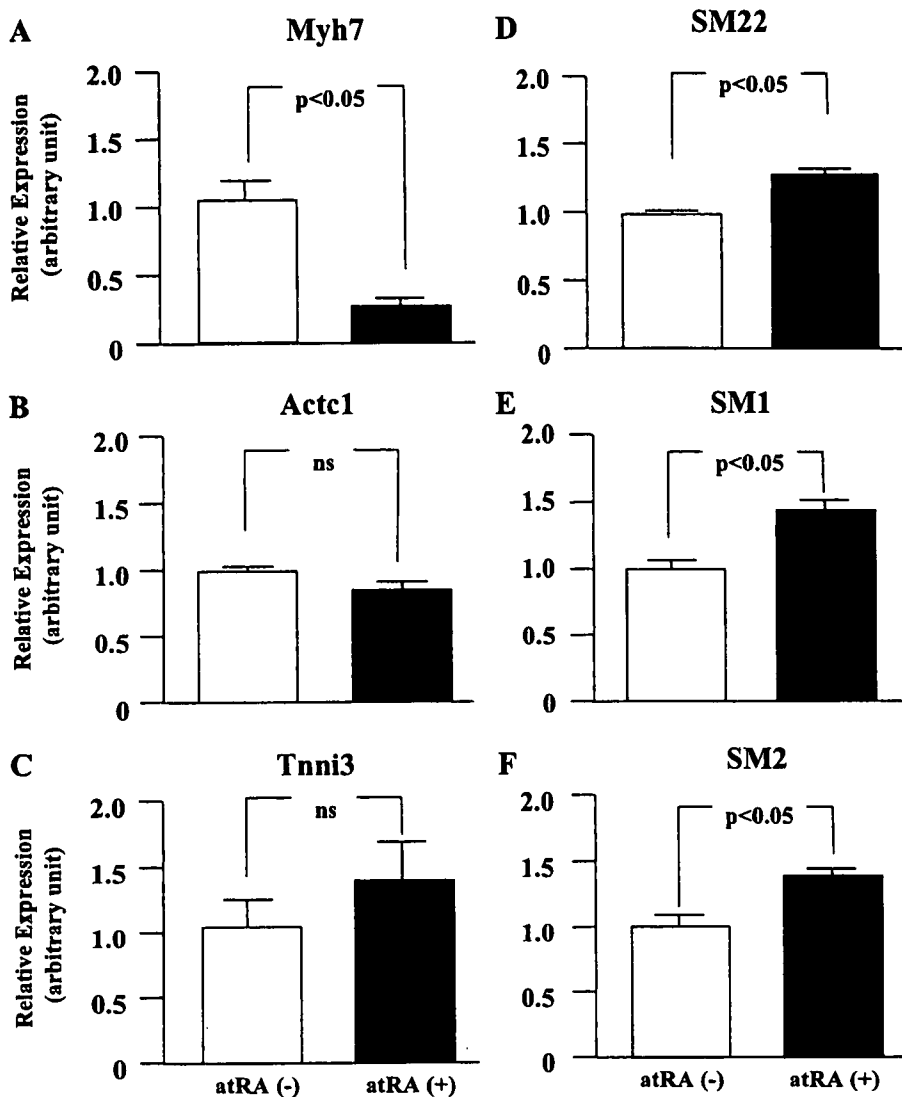


Fig. 7. The changes in the expression of myofibril-related genes in cultured DA SMCs in the presence of atRA (10 nM) ( $n = 6-9$ ). Data are expressed as means  $\pm$  SE. Abbreviations are defined in Fig. 6 legend.

study is required to identify the factor(s) that synergistically affect the gene profiles in MVA-treated DA after birth.

We found that MVA promoted the developmental changes in gene profiles, especially at preterm, resulting in a global gene profile at preterm largely resembling that of the control animal at term. These results suggested that MVA could promote an earlier maturation of the functions and structure of DA. In this sense, we found that MVA promoted intimal cushion formation in premature DA. Accordingly, genes in *cluster A* and *B* are primary candidates to be involved in MVA-promoted intimal cushion formation. The present study showed that MVA increased fibronectin 1 and HAS2 transcripts at preterm, which is consistent with the previous studies demonstrating that RA increased the expression of fibronectin (28) and HAS2 (26) mRNAs. Previous studies have demonstrated that fibronectin and hyaluronan play a critical role in intimal cushion formation in DA (2, 3, 17, 37). We also found that atRA significantly increased PDGF-mediated DA SMC migration. Accordingly, the increases in fibronectin and HAS2 transcripts could contribute to MVA-promoted SMC migration and thus intimal cushion formation of the DA at preterm.

Furthermore, among *clusters A* and *B*, several genes such as moesin (1), angiotensin II receptor type 2 (34), lysyl oxidase (23), insulin growth factor 2 (38), and coagulation factor 2 (F2: thrombin) (4) have been known to be associated with formation of neointimal thickening in other vascular smooth muscles. Therefore, it is likely that MVA also promotes maturation of DA at preterm in terms of vascular remodeling. Further investigation is warranted to explore the physiological role of these genes in vascular remodeling in DA.

In addition, previous studies have demonstrated that MVA-treated rat DA at preterm responded to vasoconstrictive stimuli such as oxygen to the same degree as control DA at term, whereas nontreated DA at preterm did not (20, 35), indicating that MVA accelerates functional maturation of DA at preterm. Among 51 genes in *clusters A* and *B*, Pde5 (32) and KATP (21) have been assigned a role in oxygen-induced vasoconstriction of DA. Therefore, the present study supported that Pde5a and SUR2 (Abcc9) are involved in the MVA-promoted sensitivity of premature DA to oxygen-induced contraction. In addition to Pde5a, we also found that MVA increased the expression of Pde4b gene in DA (Fig. 8), although it did not reach statistical



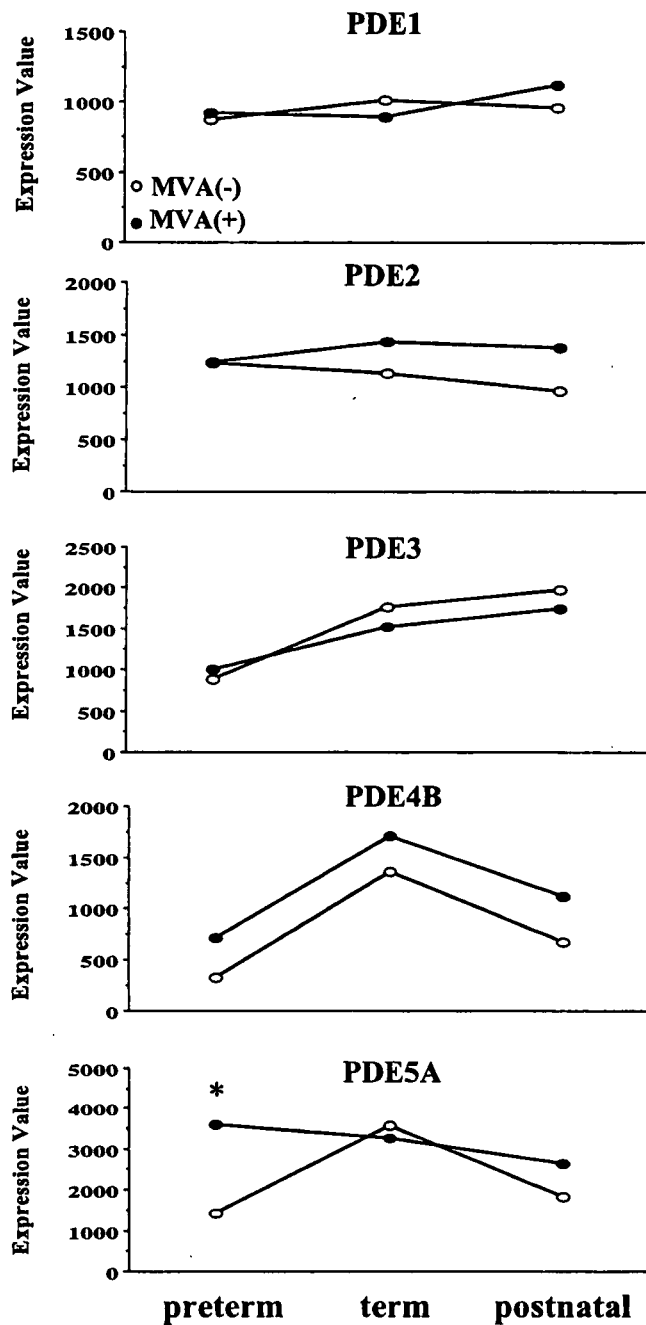


Fig. 8. The pattern of expression changes in genes encoding PDE by MVA. MVA increased PDE5A transcripts at preterm. Data are expressed as means of duplicate experiments in expression value.  $\circ$ , Nontreated DA;  $\bullet$ , MVA-treated DA; \*2.5-fold difference between nontreated and MVA-treated DA. PDE, phosphodiesterase.

significance. Since Pde4 modulates generation of reactive oxygen species through activation of cAMP-PKA pathway (14), Pde4b may also modulate the relaxant action of PGE<sub>2</sub>. Furthermore, the expression of potassium channel tetramerization domain containing 12 (predicted) mRNA was upregulated by MVA at preterm (Fig. 9D). The function of this gene has remained unknown. Since potassium channels are involved in oxygen-induced contraction of DA, it is intriguing to investigate whether potassium channel tetramerization do-

main containing 12 plays a role in oxygen-induced contraction of DA.

MVA postnatally increased the expression of VEGF-A and integrin  $\alpha 1$  and  $\beta 3$  mRNAs that also have been known to play a role in vascular remodeling in DA (5-7). Clyman et al. (6) has demonstrated that VEGF promotes the formation of neointimal mounds and vasa vasorum in-growth during permanent ductus closure. Integrin  $\alpha 1$  and  $\beta 3$  have been known to play a role in DA SMC adhesion and migration (5, 7). Therefore, MVA may contribute to permanent closure of DA after birth via increases in VEGF-A and integrin  $\alpha 1$  and  $\beta 3$  mRNAs. In addition, several genes involved in cell differentiation and apoptosis in *cluster D* may also contribute to promotion of postnatal vascular remodeling and thus permanent closure of DA.

Although we show that MVA accelerates maturation of DA, an unexpected, but important finding of the present study is that MVA prevented the downregulation of several cardiac myofibrillar genes in DA during development. We found that MVA did not significantly increase the transcripts of differentiated myofibrillar proteins such as SM1, SM2, and SM22 in DA. On the contrary, the expression levels of fetal cardiac type of myofibrillar-related genes remained the same or showed higher expression levels of those at preterm by MVA. Therefore, MVA may have the effect, at least in part, of diminishing the distinct profiles of SMC phenotype in DA. These results suggested that MVA retarded the smooth muscle specification of DA in term of myofibrillar genes. This finding was different from other previous studies (10, 15, 18) and our in vitro study using cultured DA SMCs. We assume that the difference is due to the experimental conditions. Because the transcripts of differentiated smooth myofibrillar proteins such as SM2 have already been highly upregulated in in vivo DA, the additional RA signal via MVA has little effect on it. On the other hand, cultured in vitro SMCs could respond to RA signals, because they may exhibit poorly differentiated character. To our knowledge, no study has demonstrated the effect of RA signal on the expression of fetal cardiac myofibrillar genes in an in vivo artery. Further study will be apparently required to understand the distinct responses of myofibrillar genes to RA signal in different experimental conditions of DA SMCs.

In conclusion, by using comprehensive microarray analyses, we found 91 RA-related genes in the DA during developmental vascular remodeling. In addition to the expected genes, microarray analysis uncovered many genes whose roles were not previously recognized in DA. MVA promoted the developmental changes in gene profiles, especially at preterm, which could be associated with earlier functional and structural maturation of DA. These data imply the beneficial effect of vitamin A therapy for premature infants with patent DA. On the other hand, vitamin A therapy may retard myofibrillar differentiation of DA SMCs. Moreover, the response to vitamin A was quite different before and after birth. These should be taken into account when early vitamin A therapy would be adopted in premature infants. Our data provide a basis for understanding the molecular mechanisms underlying the MVA/RA-mediated differentiation and remodeling of DA.

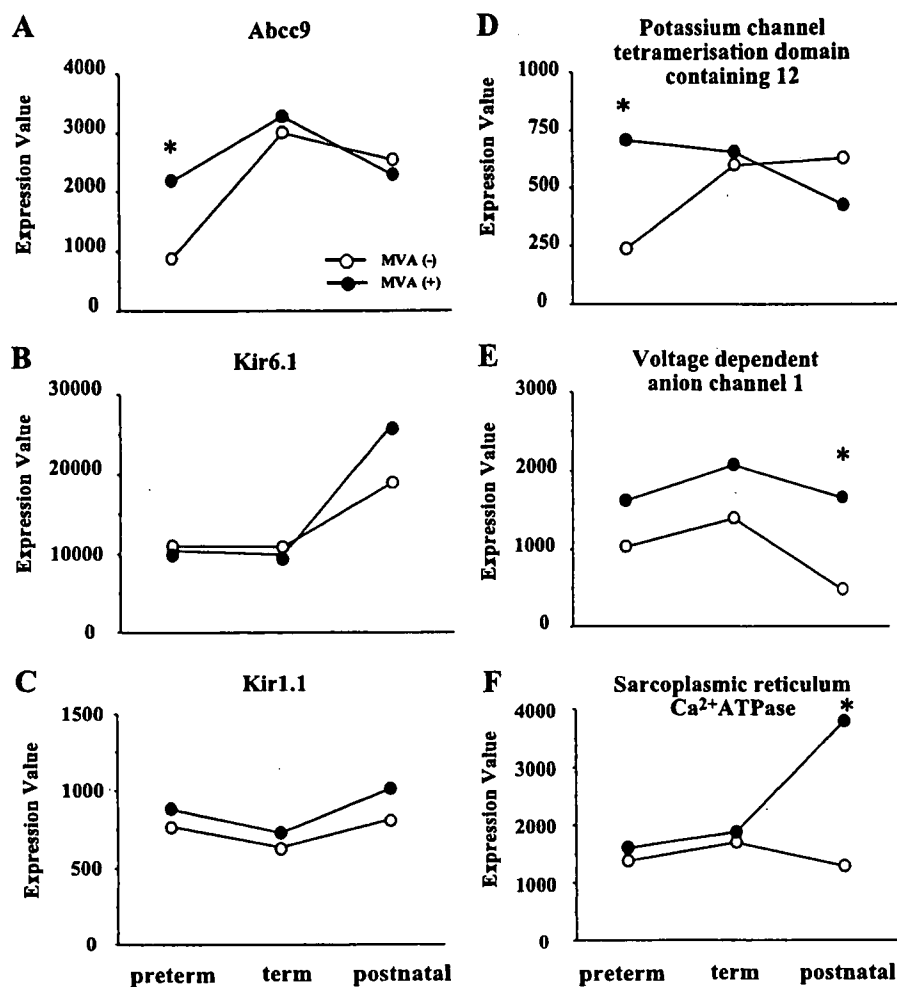


Fig. 9. Expression profile of genes encoding ion channels and pumps in the absence or presence of MVA. Data are expressed as means of duplicate experiments in expression value. O, Nontreated DA; ●, MVA-treated DA; \*2.5-fold difference between nontreated and MVA-treated DA. Acc9, ATP-binding cassette, subfamily C (CFTR/MRP), member 9; Kir6.1, potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 8; Kir1.1, potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 1.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Drs. Sylvia M. Evans and Hemal H. Patel at University of California, San Diego, for critical reading and English editing of the manuscript. We thank Takayo Musuda, Remi Haruno, and Kayoko Fujishita for excellent technical assistance.

#### GRANTS

This work was supported in part by grants from National Institute of Biomedical Innovation (MF-16, 05-25), Yokohama Foundation for Advanced Medical Science (to U. Yokoyama, T. Akaike, S. Ishida, and Y. Ishikawa), and the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan (to S. Minamisawa, Y. Ishikawa, Y. Sato, and S. Ishida), the Miyata Cardiology Research Promotion Funds (to S. Minamisawa), and the Foundation for Growth Science (to S. Minamisawa), the Mother and Child Health Foundation (to S. Minamisawa), and the grant for 2005 Strategic Research Project of Yokohama City University (to S. Minamisawa).

#### REFERENCES

- Blindt R, Zeiffer U, Krott N, Filzmaier K, Voss M, Hanrath P, vom Dahl J, Bosserhoff AK. Upregulation of the cytoskeletal-associated protein Moesin in the neointima of coronary arteries after balloon angioplasty: a new marker of smooth muscle cell migration? *Cardiovasc Res* 54: 630–639, 2002.
- Boudreau N, Rabinovitch M. Developmentally regulated changes in extracellular matrix in endothelial and smooth muscle cells in the ductus arteriosus may be related to intimal proliferation. *Lab Invest* 64: 187–199, 1991.
- Boudreau N, Turley E, Rabinovitch M. Fibronectin, hyaluronan, and a hyaluronan binding protein contribute to increased ductus arteriosus smooth muscle cell migration. *Dev Biol* 143: 235–247, 1991.
- Cao H, Dronadula N, Rizvi F, Li Q, Srivastava K, Gerthoffer WT, Rao GN. Novel role for STAT-5B in the regulation of Hsp27-FGF-2 axis facilitating thrombin-induced vascular smooth muscle cell growth and motility. *Circ Res* 98: 913–922, 2006.
- Clyman RI, Mauray F, Kramer RH. Beta 1 and beta 3 integrins have different roles in the adhesion and migration of vascular smooth muscle cells on extracellular matrix. *Exp Cell Res* 200: 272–284, 1992.
- Clyman RI, Seidner SR, Kajino H, Roman C, Koch CJ, Ferrara N, Waleh N, Mauray F, Chen YQ, Perket EA, Quinn T. VEGF regulates remodeling during permanent anatomic closure of the ductus arteriosus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282: R199–R206, 2002.
- Clyman RI, Tannenbaum J, Chen YQ, Cooper D, Yurchenco PD, Kramer RH, Waleh NS. Ductus arteriosus smooth muscle cell migration on collagen: dependence on laminin and its receptors. *J Cell Sci* 107: 1007–1018, 1994.
- Cocceani F, Olley PM. The control of cardiovascular shunts in the fetal and perinatal period. *Can J Physiol Pharmacol* 66: 1129–1134, 1988.
- Colbert MC. Retinoids and cardiovascular developmental defects. *Cardiovasc Toxicol* 2: 25–39, 2002.
- Colbert MC, Kirby ML, Robbins J. Endogenous retinoic acid signaling colocalizes with advanced expression of the adult smooth muscle myosin heavy chain isoform during development of the ductus arteriosus. *Circ Res* 78: 790–798, 1996.
- Costa M, Barogi S, Socci ND, Angeloni D, Maffei M, Baragatti B, Chiellini C, Grasso E, Cocceani F. Gene expression in ductus arteriosus and aorta: comparison of birth and oxygen effects. *Physiol Genomics* 25: 250–262, 2006.
- De Reeder EG, Girard N, Poelmann RE, Van Munsteren JC, Patterson DF, Gittenberger-De Groot AC. Hyaluronic acid accumulation and endothelial cell detachment in intimal thickening of the vessel wall. The

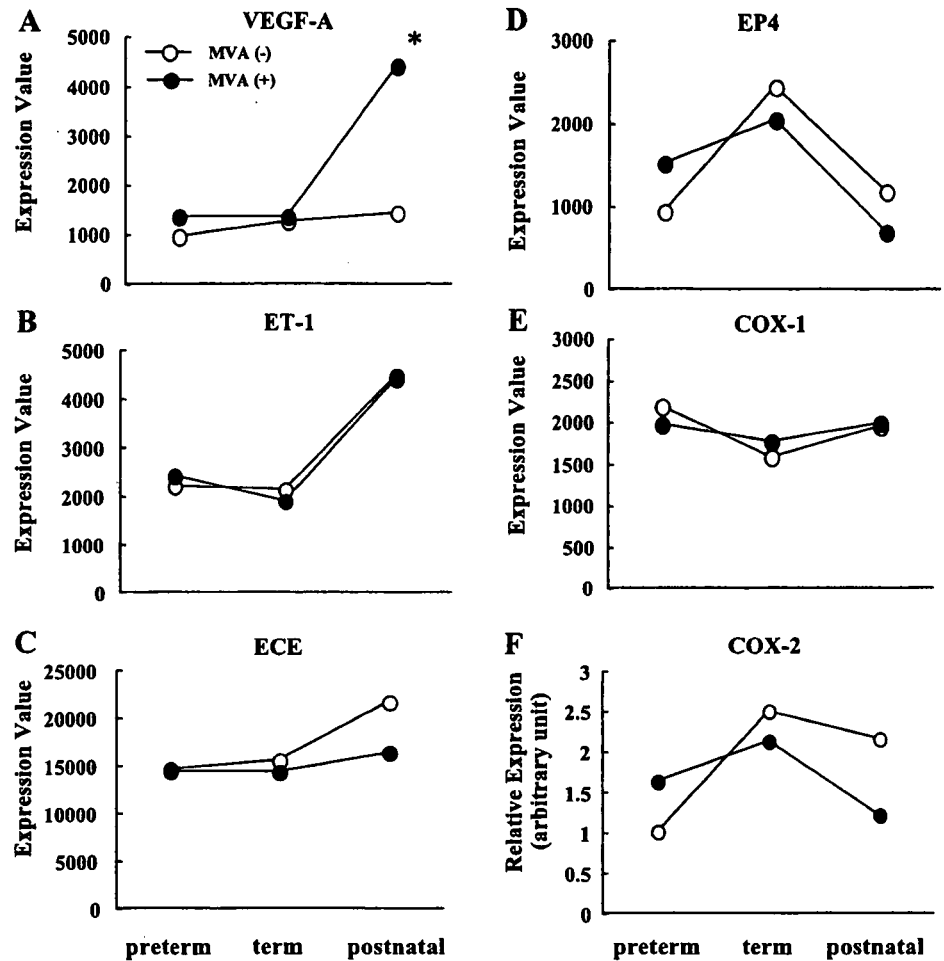


Fig. 10. Expression profiles of DA-related genes in the absence or presence of MVA. MVA postnatally increased the expression of VEGF-A mRNA (A). Data are expressed as means of duplicate experiments in expression value. ○, Nontreated DA; ●, MVA-treated DA; \*2.5-fold difference between nontreated and MVA-treated DA. VEGF-A, vascular endothelial growth factor-A; ET-1, endothelin-1; ECE, endothelin converting enzyme; EP4, prostaglandin E receptor subtype 4; COX-1, cyclooxygenase-1; COX-2, cyclooxygenase-2.

- normal and genetically defective ductus arteriosus. *Am J Pathol* 132: 574–585, 1988.
- Demary K, Wong L, Liou JS, Faller DV, Spanjaard RA. Redox control of retinoic acid receptor activity: a novel mechanism for retinoic acid resistance in melanoma cells. *Endocrinology* 142: 2600–2605, 2001.
  - Dousa TP. Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney Int* 55: 29–62, 1999.
  - Herdeg C, Oberhoff M, Baumbach A, Schroeder S, Leitritz M, Blattner A, Siegel-Axel DI, Melsner C, Karsch KR. Effects of local all-trans-retinoic acid delivery on experimental atherosclerosis in the rabbit carotid artery. *Cardiovasc Res* 57: 544–553, 2003.
  - Loftin CD, Trivedi DB, Tiano HF, Clark JA, Lee CA, Epstein JA, Morham SG, Breyer MD, Nguyen M, Hawkins BM, Goulet JL, Smithies O, Koller BH, Langenbach R. Failure of ductus arteriosus closure and remodeling in neonatal mice deficient in cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 1059–1064, 2001.
  - Mason CA, Bigras JL, O'Blens SB, Zhou B, McIntyre B, Nakamura N, Kaneda Y, Rabinovitch M. Gene transfer in utero biologically engineers a patent ductus arteriosus in lambs by arresting fibronectin-dependent neointimal formation. *Nat Med* 5: 176–182, 1999.
  - Miano JM, Berk BC. Retinoids: versatile biological response modifiers of vascular smooth muscle phenotype. *Circ Res* 87: 355–362, 2000.
  - Minamisawa S, Wang Y, Chen J, Ishikawa Y, Chien KR, Matsuoka R. Atrial chamber-specific expression of sarcolipin is regulated during development and hypertrophic remodeling. *J Biol Chem* 278: 9570–9575, 2003.
  - Momma K, Toyono M, Miyagawa-Tomita S. Accelerated maturation of fetal ductus arteriosus by maternally administered vitamin A in rats. *Pediatr Res* 43: 629–632, 1998.
  - Nakanishi T, Gu H, Hagiwara N, Momma K. Mechanisms of oxygen-induced contraction of ductus arteriosus isolated from the fetal rabbit. *Circ Res* 72: 1218–1228, 1993.
  - Nguyen M, Camenisch T, Snouwaert JN, Hicks E, Coffman TM, Anderson PA, Malouf NN, Koller BH. The prostaglandin receptor EP4 triggers remodelling of the cardiovascular system at birth. *Nature* 390: 78–81, 1997.
  - Nuthakki VK, Fleiser PS, Malinzak LE, Seymour ML, Callahan RE, Bendick PJ, Zelenock GB, Shanley CJ. Lysyl oxidase expression in a rat model of arterial balloon injury. *J Vasc Surg* 40: 123–129, 2004.
  - Rabinovitch M. Cell-extracellular matrix interactions in the ductus arteriosus and perinatal pulmonary circulation. *Semin Perinatol* 20: 531–541, 1996.
  - Ravishankar C, Nafday S, Green RS, Kamenir S, Lorber R, Stawiec-Sapuntzakis M, Bridges ND, Holzman IR, Gelb BD. A trial of vitamin A therapy to facilitate ductal closure in premature infants. *J Pediatr* 143: 644–648, 2003.
  - Saavalainen K, Pasonen-Seppanen S, Dunlop TW, Tammi R, Tammi MI, Carlberg C. The human hyaluronan synthase 2 gene is a primary retinoic acid and epidermal growth factor responding gene. *J Biol Chem* 280: 14636–14644, 2005.
  - Segi E, Sugimoto Y, Yamasaki A, Aze Y, Oida H, Nishimura T, Murata T, Matsuoka T, Ushikubi F, Hirose M, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S, Ichikawa A. Patent ductus arteriosus and neonatal death in prostaglandin receptor EP4-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 246: 7–12, 1998.
  - Shanker G, Sawhney R. Retinoic acid: identification of specific receptors through which it may mediate transcriptional regulation of fibronectin gene in bovine lens epithelial cells. *Cell Biol Int* 20: 613–619, 1996.
  - Shaul PW. Maternal vitamin A administration and the fetal ductus arteriosus. *Pediatr Res* 49: 744–746, 2001.

30. Smith SM, Dickman ED, Power SC, Lancman J. Retinoids and their receptors in vertebrate embryogenesis. *J Nutr* 128: 467S-470S, 1998.
31. Taniguchi T, Azuma H, Okada Y, Naiki H, Hollenberg MD, Muramatsu I. Endothelin-1-endothelin receptor type A mediates closure of rat ductus arteriosus at birth. *J Physiol* 537: 579-585, 2001.
32. Thebaud B, Michelakis E, Wu XC, Harry G, Hashimoto K, Archer SL. Sildenafil reverses O<sub>2</sub> constriction of the rabbit ductus arteriosus by inhibiting type 5 phosphodiesterase and activating BK(Ca) channels. *Pediatr Res* 52: 19-24, 2002.
33. Uemura N, Ohkusa T, Hamano K, Nakagome M, Hori H, Shimizu M, Matsuzaki M, Mochizuki S, Minamisawa S, Ishikawa Y. Down-regulation of sarcolipin mRNA expression in chronic atrial fibrillation. *Eur J Clin Invest* 34: 723-730, 2004.
34. Wilson DP, Saward L, Zahradka P, Cheung PK. Angiotensin II receptor antagonists prevent neointimal proliferation in a porcine coronary artery organ culture model. *Cardiovasc Res* 42: 761-772, 1999.
35. Wu GR, Jing S, Momma K, Nakanishi T. The effect of vitamin A on contraction of the ductus arteriosus in fetal rat. *Pediatr Res* 49: 747-754, 2001.
36. Yokoyama U, Minamisawa S, Adachi-Akahane S, Akaike T, Naguro I, Funakoshi K, Iwamoto M, Nakagome M, Uemura N, Hori H, Yokota S, Ishikawa Y. Multiple transcripts of Ca<sup>2+</sup> channel alpha1-subunits and a novel spliced variant of the alpha1C-subunit in rat ductus arteriosus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H1660-H1670, 2006.
37. Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, Ghatak S, Akaike T, Segi-Nishida E, Iwasaki S, Iwamoto M, Misra S, Tamura K, Hori H, Yokota S, Toole BP, Sugimoto Y, Ishikawa Y. Chronic activation of the prostaglandin receptor EP4 promotes hyaluronan-mediated neointimal formation in the ductus arteriosus. *J Clin Invest* 116: 3026-3034, 2006.
38. Zaina S, Nilsson J. Insulin-like growth factor II and its receptors in atherosclerosis and in conditions predisposing to atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 14: 483-489, 2003.



## 細胞組織利用医薬品・医療機器の安全性とその有用性評価

山口照英,<sup>\*a</sup> 土屋利江<sup>b</sup>

## Safety and Efficacy of Cell/Tissue Medical Products

Teruhide YAMAGUCHI<sup>\*a</sup> and Toshie TSUCHIYA<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Division of Biological Chemistry and Biologicals, and <sup>b</sup>Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

近年、バイオテクノロジー応用技術の進歩や再生医学・幹細胞研究の飛躍的な進展により、ヒト又は動物の細胞や組織を培養、加工し、様々な疾患の治療に用いる細胞治療の開発が急速に進んでいる。このように細胞そのものを治療薬として用いることができれば、ガン、再生不良性貧血、心筋梗塞など致死的な疾患ばかりでなく、糖尿病やパーキンソン病等の重篤な慢性疾患に対して極めて有効な治療法になる可能性が高い。

厚生労働省では、この細胞治療・再生医療に用いられる細胞組織利用医薬品・医療機器（細胞・組織利用医薬品等）の安全性及び品質の確保のために必要な基本的要件を明らかにするため、平成12年、「細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方」、及び「ヒト由来細胞・組織利用医薬品等の品質及び安全性確保に関する指針」（以下「指針」と略す）を策定した。前者は、細胞組織利用医薬品等の品質及び安全性確保、並びに細胞・組織の採取からその取り扱いに関する科学的妥当性及び倫理的妥当性を確保するために遵守すべき基本的原則をまとめたものである。後者の指針は、前者の通知に基づき、ヒト由来の細胞・組織を加工した製品について、治験前の品質・安全性確認を含めた細胞・組織利用医薬品等の製造者が厚生労働省に提出しなければならない資料の内容について明らかにしたものである。細胞を用いた製品を医薬品や医療機器として開発しようとする企業は、その品質・安全性・有効性を担保するためにこれらの指針に従っ

てデータを作成し、確認申請や承認申請時に提出する必要がある。

一方、大学や医療機関等で細胞を用いて医師が直接治療を行う医療行為やその臨床研究は、薬事法上の規制を受けることはなかった。しかし、細胞治療・再生医療のような未知・未経験の要素の多い革新的医療にあっては、その品質や安全性を担保するために新たなガイドラインが必要とされ、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」が、平成18年7月に出された。この中で、用いる細胞については、その品質・安全性確保のための方策については上述した細胞・組織利用医薬品等に関する指針を準用するように求めており、薬事法上の規制を受けない臨床研究においても、治療に用いる細胞について同等の品質・安全性を担保することが大きな特徴である。

細胞組織利用医薬品・医療機器の開発は日米欧の先進国のみならず、ASEAN諸国や他の地域でも活発に行われており、世界レベルで開発競争が繰り広げられている。残念ながら日本で承認された細胞組織利用医薬品・医療機器はまだないが、欧米では既に培養皮膚や培養軟骨など、いくつかの製品が販売されている。一方、わが国においても、複数の製品が確認申請を受け治験に入っており、臨床研究を含めると200を超える細胞治療・再生医療の開発が行われている。このような細胞治療・再生医療の適切な開発を促進するためには、ウイルス等の安全性の確保や細胞組織利用医薬品がどのような機構で臨床効果を発揮しているのか明確にすることなど、いくつかの課題がある。

今回の誌上シンポジウムでは、細胞治療・再生医療に用いられる細胞組織利用医薬品・医療機器の安

国立医薬品食品衛生研究所、<sup>a</sup>生物薬品部、<sup>b</sup>療薬品部  
(〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)

\*e-mail: yamaguch@nihs.go.jp

日本薬学会第126年会シンポジウム S4 序文

全性や有用性確保にはどのような視点が必要かについて、4人の専門家に紙上発表をして頂くことにした。具体的事例として、「血管内皮前駆細胞を用いた治療」について浅原孝之先生に、「軟骨再生の現状と将来」として脇谷滋之先生に、また、「細胞組織医療機器に利用される幹細胞の品質及び安全性評価」として、間葉系幹細胞について品質・安全面から澤田留美先生にお願いし、最後にレギュラトリーな観点から「細胞組織医療機器開発総論」を土屋利江が担当した。

血管再生治療に関しては、血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell; EPC) を用いた再生医療を取り上げて頂いた。成人末梢血中に EPC が発見されて以来、胎生期のみ認められるとされていた血管発生 (vasculogenesis) という現象が成人期においても同様に認められ、局所で EPC が増殖・分化し血管新生に係わっていることが明らかになった。さらに、冠動脈疾患や下肢虚血疾患 (バージャー病や閉塞性動脈硬化症など) を含む重症虚血性疾患患者に対して、自己 EPC を虚血部位に移植するという血管再生療法の臨床試験が実施されており、良好な成績が報告されつつある。一方、老化や糖尿病に代表される基礎疾患により患者の EPC 量及び質が低下し、移植後に十分な治療効果が期待できないという問題点も抱えている。そこで、成体での血管形成のメカニズム及び EPC の特性を生かした現行の EPC 移植治療について将来的展望を含めて概説して頂いた。

軟骨再生に関しては、世界中で企業開発品として 1 万例以上の再生医療が実施されているにも関わらず、いまだにその有効性については論争中であり、広く認められる結論が得られていない。その要因として、1) 関節軟骨欠損による臨床症状あるいは自然経過が明らかにされていないため手術適応基準があいまいであり、どのような患者に再生医療を実施すべきかコンセンサスが得られていないこと、及び 2) 再生医療による軟骨修復の評価方法が確立されていない、さらに 3) 企業開発品は、細胞浮遊液を骨膜で覆った欠損部へ移植したのみで細胞の固定性

が不十分、培養で細胞を増殖する過程で脱分化を生じることなどが挙げられる。本誌上シンポジウム原稿では、関節軟骨再生の現状と、将来、軟骨修復が再生医療として標準的な治療となるために必要な要素について解説して頂いた。

多分化能を持つ幹細胞であり近年再生医療へのソースとして注目を集めている間葉系幹細胞について、その増殖能と形質変化について取り上げて頂いた。間葉系幹細胞は長期に渡る培養で、老化を起こした細胞からがん化した細胞が出現すると報告され、大きな議論を巻き起こしている。これに対して否定的な論文もあり、結論は得られていないが、間葉系幹細胞を治療に用いる際には、このような点にも注意を払う必要がある。この間葉系幹細胞の培養中に起こる遺伝子発現レベルの変化についての解析結果を含め概説して頂いた。

従来の治療法では、なし得ない先端治療として、安全で有効性が高くかつ非侵襲的な治療法が望まれている。細胞・組織利用医療機器は、材料を有効活用して、目的とする部位への適切な固定・機能・適切な強度維持などが可能となる。また、わが国発の再生医療材料技術として、最近、シート工学 (開発者: 東京女子医科大学 岡野光夫教授) が注目されている。シート工学技術により、得られた細胞シートの機能が優れており、心筋再生、角膜再生、歯根膜再生など、様々な組織での動物実験や臨床研究が開始され、成功例が報道されている。しかし、一方では、材料の安全性評価や、試験系が不十分なため、研究が活発に行われ、学会発表や紙上発表が行われているにも関わらず、有効性が期待されるほど高くなく、その結果、リスク・ベネフィットやコスト面等から、産業化されておらず、途中で開発を断念された再生医療品もある。これまでの研究から、開発の阻害要因となった具体例について、概説し、開発への近道となるためのポイントについて概説した。最後に再生医療品の開発と審査の迅速化のために平成 17 年度からスタートした次世代医療機器評価指標作成事業 (再生医療分野) を紹介した。

# アデノウイルスベクター開発の 最前線

水口裕之

従来のアデノウイルスベクターの問題点（免疫反応を生じることや感染域の制限など）を克服し、機能性（ターゲティング能の付与など）に優れた次世代アデノウイルスベクターの開発が進んでいる。本稿では、主に遺伝子工学的手法を用いたアデノウイルスベクターの改良研究の最前線について解説する。

## はじめに

遺伝子治療の実用化といっそうの進展に向けての最大の鍵は、高い安全性を確保し、治療用目的遺伝子を必要な細胞に効率良く導入し、目的に応じて自由に発現させる技術の開発である。これまで施行されてきた遺伝子治療臨床研究は、主に1990年代に開発された古典的なベクターを用いたものであり、米国でのアデノウイルスベクター投与に伴う死亡事故や、フランスでの白血病の発症といった例外的な事例はあるものの、安全面での評価はほぼ終わり、今後はより有効性に重点を置いた臨床研究が主流になってくるものと思われる。そのためには、機能面で優れた改良型ベクターの開発と実用化が必要不可欠であり、これにより遺伝子治療の安全性・有効性の大幅な増進が期待できる。

アデノウイルスベクターは、①既存のベクターでは最も遺伝子導入効率が良いこと<sup>\*1</sup>、②導入遺伝子が宿主染色体へ組み込まれることなく、染色体外にエピゾームとして存在することから、一過性の遺伝子発現を示すこと<sup>\*2</sup>、③他のウイルスベクターに比べ圧倒的に高いタイター（力価）のベクター（通常他のベクターに比べ1,000倍以上）が得られること、などの長所を有し、ベクターとしての優れた基本的性質を有している。

一方、①遺伝子導入が標的細胞のアデノウイルス受容体（coxsackievirus and adenovirus receptor: CAR）の発現レベルに依存し、CARを発現していない細胞への適用が困難なこと、②組織

特異性を示さないこと、③免疫反応を伴うこと、などの問題点を有し、これらの問題を克服し、機能面で優れた次世代アデノウイルスベクターの開発がわれわれや欧米を中心に盛んに行われている。本稿では、次世代アデノウイルスベクター開発の最前線について解説する。

## 1. 標的細胞指向性の制御

### i) 遺伝子導入時のCAR依存性を克服したアデノウイルスベクターの開発

従来用いられているアデノウイルスベクターは、サブグループCに属する5型（あるいは2型）のヒトアデノウイルスを基盤としている。ヒトアデノウイルスはAからFまでのサブグループに分けられ、少なくとも51種類のserotypeが知られているが、サブグループBに属するウイルスを除き、多くのアデノウイルスは受容体としてCARを認識して細胞に感染する（図1）<sup>1)</sup>。CARの発現が乏しいために従来の5型アデノウイルスベクターでの効率の良い遺伝子導入が困難な細胞種は意外と多く、造血幹細胞をはじめとする血液系細胞、樹状細胞、間葉系幹細胞、血管平滑筋細胞、骨格筋細胞、滑膜細胞などが知られている。また、癌細胞は悪性度の進行とともに、CARの発現低下、およびアデノウイルスベクターでの遺伝子導入効率の低下が報告されており<sup>2)</sup>、本ベクターを用いて癌を対象とした遺伝子治療臨床研究を進めるうえで考慮すべき問題と考えられている。

\*1: センダイウイルスベクターも遺伝子発現効率に優れていることが報告されているが、本ベクターは他の一般的なウイルスベクターと異なり、細胞内に導入された遺伝子が増殖するという特異な性質を有することから、他のベクターと同列に比較することは困難である。

\*2: 細胞増殖に伴い導入遺伝子が希釈されるため、一過性の遺伝子発現を示す。一方、分化した増殖停止期の細胞に対しては、後述するようにアデノウイルスに対する免疫の問題が克服されれば、数ヶ月以上の長期間の遺伝子発現を示すことが知られている。

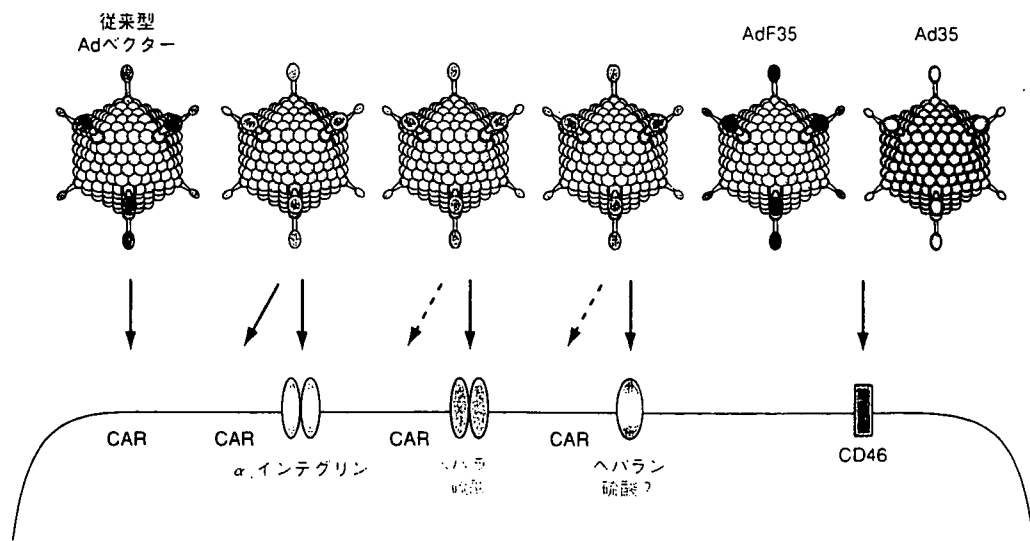


図1 ●各種改良型アデノウイルスベクター

野生型のファイバーをもった従来型の5型アデノウイルスベクターは細胞表面上の受容体であるCARを認識して感染するが、RGD配列やポリリジン配列をファイバーに有したファイバー改変ベクター（AdRGD、AdK7）はCARだけでなく $\alpha$ -インテグリンやヘパラン硫酸を認識しても感染できる。TATペプチドを付与したAdTATは、詳細な細胞内移行メカニズムは不明であるが、CAR非依存的に感染できる。また、35型アデノウイルスのファイバーを有したベクター（AdF35）や、すべての構造タンパク質が35型アデノウイルスからなるベクター（Ad35）は、CD46を認識して感染する

アデノウイルスベクターによる遺伝子導入時のCAR依存性を克服するために、ファイバータンパク質<sup>\*)</sup>を改変した改良型ベクターの開発が進んでいる。例えば、 $\alpha$ -インテグリンに親和性があるRGD (Arg-Gly-Asp) ペプチドや、ヘパラン硫酸に親和性があるポリリジンペプチドをファイバー表面上に遺伝子工学的に表現させることにより、CARを発現していない細胞に対しても効率良く遺伝子導入できる(図1)<sup>31)</sup>。われわれは最近、HIV (human immunodeficiency virus) 由来のタンパク質導入ドメイン (Protein Transduction Domain: PTD) として知られているTatペプチドをファイバーに付与することで、RGD配列やポリリジン配列を付与したベクターよりも、より広範に効率良く外来遺伝子を発現可能であることを見出し、その応用が期待される。

また、ファイバー部位をCAR以外の分子を認識する他の血清型のアデノウイルスのファイバーに置換することでも、遺伝子導入時のCAR依存性を克服することができる。例えば、ヒト由

来細胞であればほとんどすべての細胞に発現が認められるCD46を受容体としている11・35型アデノウイルス由来のファイバーを付与することで、5型アデノウイルスベクターでの効率の良い遺伝子導入が困難な造血幹細胞、樹状細胞などへの効率の良い遺伝子導入が可能になる<sup>31)</sup>。

## ii) ターゲティング能を有した

### アデノウイルスベクターの開発

ターゲティング能を有したベクターの開発は、全身投与での治療効果が期待できるだけでなく、たとえ局所にベクターを投与した場合においても、標的細胞以外への感染、拡散を防ぐことが期待できることから、重要な研究課題である。目的の組織でだけ遺伝子を発現させることが可能なアデノウイルスベクターの開発には、①キャプシドタンパク質の遺伝子工学的な改変、②抗体やタンパク質、高分子を用いてのベクター表面の修飾、あるいは③組織特異的プロモーターの利用などの方法がある。最終的には、これらの組み合わせが好ましいが、ベクター自身を

\*3: ファイバータンパク質テール、シャフト、ノブからなり、ノブ領域がCARと結合する。



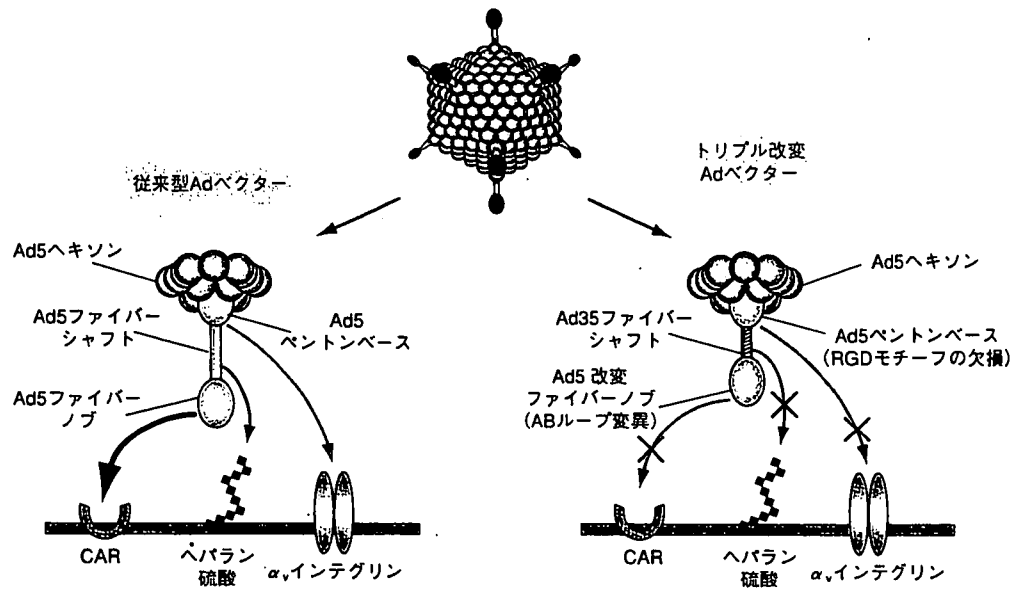


図2 ●ターゲティング能を有したアデノウイルスベクター

ターゲティング能を有したアデノウイルスベクターの開発のためには、まず、①ファイバーノブとCARとの結合を介した感染ルートを回避し、②低親和性であるがペントンベースのRGDモチーフが $\alpha_5$ インテグリンと直接結合することによって起こる感染ルートを回避し、③ファイバーシャフト領域がヘパラン硫酸に作用することによって起こる感染ルートも回避したベクター（トリプル改変ベクター）を開発する必要がある。次に、トリプル改変ベクターに標的細胞特異的に結合するリガンドなどを付与することで、ターゲティング能を有したアデノウイルスベクターが開発できる

改変する①が最も基本的で重要な基盤技術になると考えられ、精力的に研究が進められている。

アデノウイルスは前述のようにファイバーとCARとの結合が感染に重要な役割を果たし、低親和性であるがファイバーの根本に存在するペントンベースのRGDモチーフやファイバーシャフトのKKTKからなるヘパリン結合ドメインが、 $\alpha_5$ インテグリンやヘパラン硫酸と結合して起こる感染ルートも知られている<sup>7)</sup>。また最近では、factor Xなどの血液成分がアデノウイルスと細胞との結合を橋渡しして、受容体非依存的に感染するルートも報告されている<sup>8)</sup>。これらの感染経路を遮断して、標的細胞特異的に結合するリガンドなどをウイルス表面タンパク質のファイバーやヘキソン、protein IX領域<sup>\*4</sup>（われわれはこれらの領域に簡便に外来リガンドを挿入する技術も開発済みである<sup>9)</sup>）に付与すれば、ターゲティング能を有したアデノウイルスベクターが開発

できる。われわれはファイバーノブ、シャフト、ペントンベースの3領域を同時に改変したトリプル改変ベクターを開発し（図2）、このベクターが肝臓をはじめとする *in vivo* での遺伝子発現能をほとんど消失していることを明らかにしている<sup>10)11)</sup>。現在このトリプル改変ベクターに、標的細胞特異的に高親和性を示すリガンドを付与することでターゲティング能をもったアデノウイルスベクターの開発を進めている。

## 2. 免疫反応の制御

アデノウイルスベクターを生体に投与した場合、大別すると、①ベクター投与後数時間以内に生じるベクター粒子そのものに対する自然免疫、②7～10日以内に生じるベクターにより産生されたウイルスタンパク質（および外来遺伝子産物）に対する細胞性免疫、そして、③ウイルスタンパク質に対する液性免疫の3種類の免

\* 4 : protein IX領域  
ヘキソンとヘキシンの間に存在するタンパク質。

疫反応が起こることが報告されている。これらの免疫反応を克服できるベクターや投与方法（投与戦略）の開発は、安全性や有効性の高い遺伝子治療の実現にとって必要不可欠である。

#### i) 自然免疫の制御が可能な

##### アデノウイルスベクターの開発

ウイルスをはじめとする異物を生体に投与すると、生体は即座にインターフェロンやサイトカイン、ケモカインなどを産生し、それらの異物を排除しようとする自然免疫が発動する。アデノウイルスベクターを生体に投与した場合にも自然免疫の活性化は生じ、1999年に米国で起こったオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症に対するアデノウイルスベクターを用いた死亡事故では、自然免疫の過剰な活性化が原因と考えられている。

アデノウイルスベクターをマウスに全身投与した場合には、IL-6、IL-12などの産生が投与3時間以内に生じる。全身投与されたベクターの90%以上は肝臓（実質細胞とクッパー細胞<sup>\*5</sup>をはじめとする非実質細胞）に移行するが、多くの炎症性サイトカインは肝臓（のクッパー細胞）ではなく、主に脾臓で分泌される<sup>12)</sup>。したがって、脾臓への移行性を抑えたベクターは、炎症性サイトカインの産生が低い。例えば、前述したポリリジンでファイバーを修飾したアデノウイルスベクターでは、脾臓への移行性が減少する結果、血中へ分泌されるIL-6は約1/4にまで減少する（肝臓をはじめとする各臓器での遺伝子発現は従来型ベクターと同等以上に起こる<sup>12)</sup>。また、CAR、インテグリン、ヘパラン硫酸との結合性を欠損させたトリプル改変ベクターにおいては、IL-6はほとんど産生されない<sup>13)</sup>。興味深いことに、従来のアデノウイルスベクターを投与した場合に生じるAST (aspartate aminotransferase) やALT (alanine transferase) などの肝傷害性マーカーの産生も、ポリリジン型ベクターやトリプル改変ベクターではほとんど全く起こらず<sup>13)12)</sup>、安全性が高いことが明らかとなっている。

ウイルスなどの病原体を認識する細胞上のセンサー受容体として、近年TLR (Toll Like Receptor) が注目されている。TLR3を除くTLRが利用しているアダプタータンパク質のMyD88欠損マウスを用いたわれわれの検討では、アデノウイルスベクター刺激による樹状細胞でのIL-6産生にはMyD88が関与するものの、マクロファージでのIL-6産生にはMyD88には関与せず、細胞種によりIL-6の産生メカニズムが異なっていることが明らかとなった<sup>14)</sup>。さらに*in vivo*での血中IL-6の産生は、MyD88欠損マウスにおいても野生型マウスと同程度に起こり、TLR以外の経路が*in vivo*におけるIL-6産生に大きく寄与していることが示唆された。アデノウイルスベクター投与に伴う自然免疫に関与する生体側因子やウイルス側因子、シグナル伝達機構の解明は、自然免疫応答の克服に向けて重要な研究課題であり、われわれのグループでは、各種改変アデノウイルスベクターやノックアウトマウス、RNAi技術、マイクロアレイ解析を通して、これらの研究を進めている。

#### ii) 細胞性免疫の制御が可能な

##### アデノウイルスベクターの開発

アデノウイルスベクターを生体に投与すると、通常数週間から数カ月間の一過性の遺伝子発現を示す。しかしながら、免疫不全マウスにおいては、数カ月から一年以上（場合によっては一生涯）にわたる長期間の遺伝子発現を示すことから<sup>15)</sup>、免疫系による遺伝子導入細胞の排除が一過性の遺伝子発現の原因と考えられている。すなわち、従来のアデノウイルスベクターは、ウイルスの増殖やウイルスタンパク質の合成に必須のE1遺伝子領域を除去することで、ウイルスタンパク質の産生が生じないように設計されているが、E1遺伝子非依存的に他のウイルスタンパク質の合成がわずかながら起こり、これが免疫系のターゲットとなることが明らかになっている。この問題を克服するために、ウイルスコード遺伝子をすべて除去したguttedアデノウイルスベクターが開発されており、本ベクターを

#### \*5: 実質細胞とクッパー細胞

肝臓は肝実質細胞（肝細胞）の他に、クッパー細胞、類洞内皮細胞、星細胞、胆管上皮細胞などの肝非実質細胞から構成される。

#### \*6:

増殖停止期の終末分化した細胞に遺伝子導入した場合には、導入遺伝子が染色体外にエピソームとして存在するアデノウイルスベクターにおいても長期間の遺伝子発現を示す。

用いた場合は、通常のマウスにおいても長期間の遺伝子発現が認められる<sup>14)</sup>。従来は、高タイトルの gutted アデノウイルスベクターの産生が技術的に難しいのが課題点であったが、最近ではヘルパーウイルスとパッケージング細胞の改良により、その問題点は一部克服されつつある<sup>15)</sup>。また、gutted アデノウイルスベクターに、Sleeping Beauty<sup>16)</sup> やバクテリオファージインテグラーゼΦC31<sup>17)</sup>、レトロトランスポゾン<sup>18)</sup> の染色体への遺伝子組み込み活性を付与することで、導入遺伝子が積極的に染色体に組み込まれる性質をもたせたアデノウイルスベクターの開発も進められており、このようなベクターでは分裂細胞においても永続的な遺伝子発現が期待できる。

### iii) 液性免疫の制御が可能な

#### アデノウイルスベクターの開発

成人の約60%はヒト5型アデノウイルス(サブグループCに属する)に対する抗体を保持していることが知られている。また、アデノウイルスベクターを投与された個体は、抗アデノウイルス抗体を生じるため、2回目以降のベクターの全身投与では遺伝子発現をほとんど示さない<sup>7)</sup>。主要キャプシドタンパク質のヘキソンに対する抗体が液性免疫の主体であることから、ヘキソン改変ベクターが、この問題を克服するために開発されている<sup>19)</sup>。また、異なった血清型(サブグループBに属する11型や35型)や異なった種(チンパンジー、イヌ、ヒツジ、トリ、ウシ、マウスなど)に属するアデノウイルスベクターが開発されており、これらのなかには、CAR以外の受容体を認識して感染するものもあり、感染域を変えることも可能になる。例えば、われわれはすべての構造タンパク質が35型アデノウイルスからなるベクターの開発に成功したが<sup>5)</sup>、35型アデノウイルスに対する成人の抗体保持率は低く、本ベクターは5型アデノウイルス抗体存在下でも高い遺伝子発現を示す。35型アデノウイルスはCD46を受容体として感染し、造血幹細胞などの5型アデノウイルスベクターでの遺伝子導入が困難な細胞への遺伝子導入に優れ

ていることが明らかとなっている<sup>5)20)</sup>。

### 3. 基礎研究への応用

アデノウイルスベクターはわれわれが開発したプラスミド構築に基づいた簡便なベクター作製法が開発されたこと<sup>21)22)</sup>(クローンテック社よりキット化)、高力価のウイルス液が得られること、遺伝子発現効率が高いことなどから、遺伝子機能解析などの基礎研究のための貴重なツールとして広く利用されている。さらに、前述した改良型ベクターにより、従来のベクターでは遺伝子導入が困難であった多くの細胞種への劇的な遺伝子導入効率の改善が可能になっており、汎用性は益々高くなっている。

アデノウイルスベクターは全身投与した場合には、肝臓に90%以上のベクターが移行し、100%の肝細胞で遺伝子発現が起こる。また、臓器局所にベクターを投与した場合には、投与部位での高効率な遺伝子発現が期待できる。目的組織がCAR陰性の場合には、ファイバーを改変したベクターを用いることで遺伝子発現効率の上昇が期待できる。例えば、CAR陰性のB16メラノーマの腫瘍内にベクターを投与した場合には、RGDペプチドを付与したファイバー改変ベクターでは従来型ベクターに比べ約40倍もの遺伝子発現を示す<sup>23)</sup>。また、遺伝子導入が物理的な問題により容易でない膵臓ランゲルハンス島(膵島)β細胞に対しては、腹腔動脈からアデノウイルスベクターを*in vivo*投与し、その後膵島を初代培養することで高効率な遺伝子発現が得られることが明らかになっており(ランゲルハンス島の内部の細胞においても、高効率な遺伝子発現が得られる)<sup>24)</sup>。糖尿病の分子メカニズムの解明や治療に向けた研究分野への強力なツールになると期待される。さらに、35型アデノウイルスの受容体であるCD46を全身の臓器で発現しているトランスジェニックマウス(CD46は齧歯類ではほとんど発現していない)を用いた各組織局所への35型ベクターを用いた遺伝子導入系は、基礎研究における実験系としてきわめて有効で

\*7: 局所投与された場合は、複数回の投与でも有効である。

ある。

## おわりに

本稿で紹介したように、アデノウイルスベクターの改良はさまざまな方向から精力的に進められている。最終的には、前述の各種改変技術を組み合わせたり、化学的手法によるベクター改変や組織特異的プロモーターの利用、導入する個々の遺伝子（あるいはsiRNA発現ベクターとして）の特性を考慮に入れて活用することで、アデノウイルスベクターは遺伝子治療への応用や基礎研究のツールとして益々有効な技術になると考えられる。今後、このような改良型アデノウイルスベクターの開発が、遺伝子治療臨床研究の成功や遺伝子治療の普及、さらには生命科学の発展という成果となって現れることを期待している。

## 参考文献

1) Bergelson, J. M. et al. : Science, 275 : 1320-1323, 1997  
 2) Okegawa, T. et al. : Cancer Res, 61 : 6592-6600, 2001

3) Mizuguchi, H. et al. : Gene Ther., 8 : 730-735, 2001  
 4) Koizumi, N. et al. : J. Gene Med., 5 : 267-276, 2003  
 5) Sakurai, F. et al. : Gene Ther., 10 : 1041-1048, 2003  
 6) Rea, D. et al. : J. Immunol., 166 : 5236-5244, 2001  
 7) Mizuguchi, H. et al. : Hum. Gene Ther., 15 : 1022-1033, 2004  
 8) Shayakhmetov, D. M. et al. : J. Virol., 79 : 7478-7491, 2005  
 9) Kurachi, S. et al. : Gene Ther., 14 : 266-274, 2007  
 10) Koizumi, N. et al. : J. Virol., 77 : 13062-13072, 2003  
 11) Koizumi, N. et al. : Hum. Gene Ther., 17 : 264-279, 2006  
 12) Koizumi, N. et al. : J. Immunol., 178 : 1767-1773, 2007  
 13) Yamaguchi, T. et al. : submitted  
 14) Donna, J. P. et al. : Hum. Gene Ther., 16 : 1-16, 2005  
 15) Palmer, D. et al. : Mol. Ther., 8 : 846-852, 2003  
 16) Yant, S. R. et al. : Nature Biotechnol., 20 : 999-1005, 2002  
 17) Ehrhardt, A. et al. : Mol. Ther., 15 : 146-156, 2007  
 18) Kubo, S. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103 : 8036-8041, 2006  
 19) Roberts, D. M. et al. : Nature, 441 : 239-243, 2006  
 20) Sakurai, F. et al. : Gene Ther., 12 : 1424-1433, 2005  
 21) Mizuguchi, H. et al. : Hum. Gene Ther., 9 : 2577-2583, 1998  
 22) Mizuguchi, H. et al. : Hum. Gene Ther., 10 : 2013-2017, 1999  
 23) Mizuguchi, H. et al. : Cancer Gene Ther., 9 : 236-242, 2002  
 24) Mukai, E. et al. : J. Cont. Rel. in press  
 25) Sakurai, F. et al. : Gene Ther., 13 : 1118-1126, 2006



## 水口裕之 (Hiroyuki Mizuguchi)

独立行政法人医薬基盤研究所基盤研究部遺伝子導入制御プロジェクトプロジェクトリーダー、1991年大阪大学薬学部薬学科卒業、1996年大阪大学大学院薬学研究科博士課程修了（薬学博士）、1996年大阪大学微生物病研究所研究員、1997年米国ワシントン大学医学部 Senior Fellow (Dr. Mark A. Kay)、1998年国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部研究員、2002年同研究所遺伝子細胞薬部主任研究官、2005年より現職。2005年より大阪大学大学院薬学研究科招聘助教授。ベクター開発研究を軸に、遺伝子治療学、再生医療（幹細胞生物学や細胞治療）、免疫学、ウイルス学、分子生物学などの境界領域の研究を展開中。筆者らと共にこの最も重要でチャレンジングな研究に参画してくれる熱意ある大学院生（修士・博士：大阪大学連携大学院）を募集中であり、気軽にお問い合わせ下さい。研究室 HP (<http://www.nibio.go.jp/Proj3HP/index.html>)。