

クレーパーで回収し、1.5ml チューブに移した。0.2ml のクロロホルムを加え、転倒混和後、4°C、13500rpm、15 分間遠心し、上清のみを別の 1.5ml チューブに取った。これに、0.5ml のイソプロパノールを加え、10 分間室温に放置し、4°C、13000rpm、10 分間遠心の後、その上清を除去、さらに、ペレットに 1ml の 75%エタノールを加え、混和後 4°C、7500rpm、10 分間遠心し、再び上清を除去し、ペレットを得た。このペレットを風乾し、DEPC-treated water (Ambion, USA) を 10-20 μ l 加え、65°C、5 分間放置後、抽出した RNA の濃度を測定した。

cDNA の作成

TaKaRa の PrimeScript RT reagent Kit をプロトコールに従い、氷上で 20 μ l の反応液 [5X PrimeScript Buffer 4 μ l、PrimeScript RT Enzyme Mix I 1 μ l、50 μ l Oligo dT Primer 1 μ l、100 μ l Random 6 mers 1 μ l、total RNA 1 μ g 相当量を RNase Free dH₂O に溶解した液] を調製し、37°C・15 分間、

85°C・5 秒間の逆転写反応を行い、cDNA を作成した。

半定量 RT-PCR、定量 RT-PCR

胎生 19 日、21 日、生後 0 日の動脈管組織または大動脈組織、動脈管平滑筋初代培養細胞から作成した cDNA をテンプレートとして、以下のプライマーを用い、半定量 RT-PCR または定量 RT-PCR により AC アイソフォームの発現解析を行った。

AC2 (NM_031007) の PCR 反応液の組成は、2X TaqMan® Gene Expression Mastar Mix (Applied Biosystems, USA) 10 μ l、5 μ M TaqMan® probe [5'末端を FAM で、3'末端を TAMRA で修飾した 5'-tccacatgctgaatgaactctttgggaa -3' (NIPPON EGT、富山)] 1 μ l、10 μ M AC2 Forward: 5'-gctcccctggcgaactg-3' (NIPPON EGT) 1 μ l、10 μ M AC2 Reverse: 5'-ttaattctcatgcattcattctcctt-3' (NIPPON EGT) 1 μ l、cDNA 15 ng/6 μ l、DDW を合わせて 20 μ l とした。PCR 反応は、50°C・2 分間、95°C・

10 分間のステップの後、95°C・15 秒間、60°C・1 分間を 40 回サイクル行
った。

AC2 を除く AC アイソフォームは SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa)を用
いて行った。反応液の組成は、SYBR
Premix Ex Taq 10 μ l、10 μ M 各
Forward または Reverse プライマー
各 1 μ l、cDNA 15 ng/ 6 μ l、DDW
を合わせて 20 μ l とした。使用したプ
ライマーは次の通りである。AC1
(XM_223616) プライマーは
Forward:
5'-accagccaagaggatgaagtt-3'、
Reverse: 5'-acaccagcagcagcagg
acag-3' でプロダクトサイズは 446 bp、
AC3 (NM_130779) プライマーは
Forward: 5'-accgtaagcaccgaaagg-3'、
Reverse: 5'-caacatctcgtcagccaca-3'で
134 bp、AC4 (NM_019285)プライマ
ー は Forward:
5'-ggtcatctcatccctctcaca-3'、Reverse:
5'-caatgctcgtccatcag-3' で 163 bp、
AC5 (NM_022600) プライマーは
Forward: 5'-tgtccttgccctcagaaagt-3'、
Reverse: 5'-tccccgttcaggtagttgag-3'

で 132 bp、AC6 (L01115)プライマー
は Forward:

5'-caaaggaagggacgccgagagg-3'、
Reverse:

5'-tggggacagatcacgggactaggga-3' で
419 bp、AC7 (XM_226333)プライマ
ー は Forward:

5'-gctgctgctgaagccaagtt-3'、
Reverse: 5'-aatcactccagacatca

cagg-3' で 256 bp、AC8 (NM_017142)
プ ラ イ マ ー は Forward:

5'-ttcacttgagccta gcctcg-3'、Reverse:

5'-ggatgtagatgcggtggaac-3' で 627
bp、AC9 (NM_0011069 80)プライマ
ー は Forward:

5'-gacggtcttgtgtggcatc-3'、Reverse:

5'-ttagctgtctctc tttcaactggtc-3' で
227 bp を使用した。それぞれ 98%以
上のプライマー効率であることを確
認して使用した。また、それぞれの
PCR プロダクトは 2.5%アガロースゲ
ル電気泳動 (100 V、22 分間)にてサイ
ズを確認した。

また内因性コントロールとして
GAPDH のプライマー (Forward:

5'-cccatca ccatcttccaggagcg-3'、

Reverse: 5'-cccatca ccatcttccaggagcg-3'、

Reverse:

5'-gcagggatgatgttctgggctgcc-3') を使用した (Applied Biosystems, Foster City, CA)。

siRNA のトランスフェクション

siRNA はそれぞれ以下のものを使用した。AC2 siRNA は HPP Genome Wide siRNA SI00269507、AC5 siRNA は HPP Genome Wide siRNA SI01485715、AC6 siRNA は HPP Genome Wide siRNA SI00253246 を用い、全て QIAGEN より購入した。またコントロールとして All stars Negative Control siRNA 1027280 (QIAGEN) を用いた。

各 siRNA 導入は、以下の手順で行った。導入前日、動脈管平滑筋初代培養細胞をプレATINGした [siRNA 導入確認実験(a)では 6-well plate に各 20 万個、ヒアルロン酸測定用のサンプル(b)では 12-well plate に各 8 万個]。導入当日に、Opti-MEM Reduced Serum Medium (Invitrogen) と siRNA [(a)150 pmol、(b)30 pmol] の混合液と、別に Opti-MEM と

Lipofectamine™ RNAiMAX Reagent (Invitrogen) の混合液を穏やかに攪拌して 5 分間室温でインキュベートした。5 分間のインキュベーションの後に両者を混合し、タッピングを 20 回程度した後、20 分間室温で静置した。その後、この混合液を (a) では各 500 μ l、(b) では各 200 μ l を、細胞をプレATINGした 6-well plate に加え、10% の FBS を添加した DMEM (抗生剤なし) で最終容量を (a) では 2ml、(b) では 1 ml とした。24 時間、37°C、5%CO₂-21%O₂ のインキュベーターで培養した。24 時間のトランスフェクション後、(a) では抗生剤なしの DMEM に、(b) では抗生剤なしの DMEM (CTRL)、1 μ M PGE₁ を抗生剤なしの DMEM に混合して 48 時間、37°C、5%CO₂-21%O₂ のインキュベーターで培養した。48 時間後、(a) では、細胞を TRIzol® にて回収し、RNA 抽出、cDNA の作成の後、定量 RT-PCR により発現解析を行った。(b) では、上清を回収し、ラテックス凝集法によりヒアルロン酸測定を行った (方法は後述)。

アデノウイルスによる過大発現

ラット AC2 をコードする cDNA の全長を AdenoX adenovirus construction kit (Clontech、東京) を使って、アデノウイルスベクターに組み込んだ。AC6 を組み込んだアデノウイルスは Kirk Hammond 博士より譲渡された¹⁵⁾。

AC2、AC6 アデノウイルスの過大発現の確認は、以下の手順に従って行った。トランスフェクション前日、動脈管平滑筋初代培養細胞を 10 cm dish、1 プレートあたり 10% FBS を含む DMEM 8 ml に 100 万個プレATINGした。翌日、計算したウイルス量 (2 MOI、5 MOI、10 MOI) の Adv.AC2、Adv.AC6 を細胞に添加し、48 時間、37°C、5%CO₂-21%O₂ のインキュベーターで培養した。48 時間のトランスフェクション後、氷上で PBS により 1 回洗浄後、TRIzol® 1 ml にて回収し、RNA 抽出、cDNA の作成の後、定量 RT-PCR により発現解析を行い、Adv.LacZ コントロールの比較により過大発現の確認を行った。

PGE₁ 刺激下でのヒアルロン酸産生量の測定は、以下の手順に従って行った。翌日、動脈管平滑筋初代培養細胞を 12-well plate に 1 well あたり 8 万個プレATINGした。トランスフェクション当日に、5 MOI の Adv.AC2、Adv.AC6 を細胞に添加し、24 時間、37°C、5%CO₂-21%O₂ のインキュベーターで培養した。24 時間後、1 μM PGE₁ の 0.5%FBS を含む DMEM 1 ml にメEDIUM交換を行い、更に 48 時間、37°C、5%CO₂-21%O₂ のインキュベーターで培養した。48 時間後、細胞培養上清を回収し、ヒアルロン酸測定を行った。

ヒアルロン酸測定

ヒアルロン酸量の測定は、細胞培養上清を用いて、ヒアルロン酸結合タンパク感作ラテックスとヒアルロン酸を特異的に結合させるラテックス凝集法で測定し⁴⁾、測定は保健科学研究所 (神奈川) に委託した。

動脈管器官培養^{4) 16)}

胎生 19 日の胎仔より動脈管、主肺

動脈、大動脈弓と心室の上部 1/3 を結合したまま摘出し、0.5%FBS を添加した DMEM の培養液に 25 万 plaque-forming unit/ml の AC2、AC6、LacZ アデノウイルス (Adv.AC2、Adv.AC6、Adv.LacZ) 添加し 2 時間感染させ、その後培養液を交換し、48 時間、37°C、5%CO₂-21%O₂ で培養した。また薬剤の刺激は培養液のみ (CTRL)、10^{-5.5} M FD1、10⁻⁵ M FD6 を 0.1%FCS を添加した DMEM の培養試薬に混合して 48 時間、37°C、5%CO₂-21%O₂ 培養した。その後 10% ホルマリン緩衝液で固定し、パラフィン包埋した。エラスチカ染色後に、ImageJ を用いて内膜肥厚の定量 [血管内膜肥厚部/血管中膜 (intimal thickening/ media thickening) の相対比] を行った。

パラフィン切片の作成

ラットまたはマウスの動脈管は 10% Bufferd Formalin で 4°C、1 日固定し、70%エタノールに移した。次に自動固定包埋装置 (サクラファインテックジャパン、東京) で、各 2 時間 (6 回) 脱水後、レモゾール A (和光純薬、

大阪) で各 1 時間 (3 回) 透徹を行った。その後 65°C 下で、パソプレップ 580 (和光純薬) を各 2 時間 (2 回) 組織に浸透させ、パラフィン溶解/包埋装置 (Leica Microsystems Japan、東京) を用いて包埋を行った。パラフィンブロックを回転式マイクロトーム (Leica Microsystems Japan) を用いて 4 μm で薄切し、MAS コートの施されたスライドグラス (松浪硝子、大阪) に乗せて、組織切片を作成した。

染色前の脱パラフィン操作と染色後の脱水、透徹、封入操作

脱パラフィン操作として、パラフィン切片をキシレン (和光純薬) に各 3 分間 (3 回) 浸せきし、パラフィン除去後、エタノール系列で脱水を行った。すなわち、100%エタノールに 3 分間 (2 回)、90%エタノールに 3 分間 (1 回)、80%エタノールに 3 分間 (1 回)、70%エタノールに 3 分間 (1 回) の順で浸水し、最終的に超純水 (DDW) で洗浄した。

脱水、透徹、封入の操作は、エタノールを用いて、70%エタノールに 3 分

間 (1回)、80%エタノールに3分間 (1回)、90%エタノールに3分間 (1回)、100%エタノールに3分間 (2回)、の条件で脱水を行い、キシレンを用いて各3分間 (3回)の条件で透徹後、ソフトマウント (和光純薬)を用いて封入を行った。

エラスチカ染色

パラフィン切片からパラフィンを除き、1%塩酸 70%エタノールで切片を2分間馴染ませた後、ワイゲルトレゾルシンフクシン液 (武藤化学、東京)に室温で1時間弾性線維を染色した。水道水で余分な染色液を落とし、1%塩酸 70%エタノールで分別し、DDWに入れた後、ワイゲルト鉄ヘマトキシリン液 (武藤化学)内で3分間、筋線維、細胞質、赤血球を染色した。水道水ですすぎ、0.5%塩酸水で軽く分別し、DDWに入れ、微温湯で色だし (流水で8分間)した後、DDWに移した。ワーギンソン液 (ピクリン酸 100: 1%酸性フクシン液 15の割合、武藤化学)で3分間、核を染色した。染色後、水洗、脱水、透徹、封入操作を行った。

ヒアルロン酸の免疫染色

パラフィン切片からパラフィンを除き、流水で1分間アルコールを落とし、DDWに入れた。サンプルに peroxidase block を一滴ずつかけ、5分間放置し、DDWに入れた。PBSで5分、3回洗い、ビオチン標識結合タンパク (Calbiochem)で2時間反応させた。PBSで5分3回洗い、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ニチレイ、東京)を一滴ずつかけて室温で30分放置した。PBSで5分3回洗い、DAB (ペルオキシダーゼ基質、シンプルステイン DAB 溶液: ニチレイ)で1.5分反応させ、流水で3分間洗い、DDWに入れた。マイヤーヘマトキシリン溶液 (和光純薬)で15秒間反応させた後、流水で10分間洗い、DDWに入れた。染色後、水洗、脱水、透徹、封入操作を行った。

急速全身凍結法¹⁷⁾

胎生21日の Wistar rat を Somnopentyl® (シェリング・プラウ・アニマルヘルスケア社、USA)で

麻酔し、帝王切開で胎仔を摘出した。摘出した胎仔は、すぐに母親から離してキムワイプで身体を拭き、37°Cのホットプレート（アズワン株式会社、大阪）で1時間管理した。臍の緒から出血する胎仔には、High Temperature Power Handle Bovine® (AARON MEDICAL、USA)で止血した。フォルスコリン誘導体であるFD1およびFD6の濃度依存性の検討では、生後1時間後に200 μ lの生理食塩水中に溶解した各濃度のFD1もしくはFD6を腹腔内投与し、30分間、37°Cのホットプレート上で呼吸させ、液体窒素にて胎仔を急速に凍結させた。薬剤の持続時間の検討では、生後1時間後に、動脈管の内径が最大に拡張した最小濃度のPGE₁ (100 ng/g body weight)、FD1 (10.8 μ g/g body weight)、FD6 (1.29 μ g/g body weight)を200 μ lの生理食塩水中に溶解し、腹腔内投与した。37°Cのホットプレート上で30分間、2時間、4時間、8時間、24時間呼吸させ、各経過時間で液体窒素にて胎仔を急速に凍結させた。生後0時間のラット動脈管の計測では、帝王切

開後すぐに胎仔を液体窒素にて凍結した。また、生後1時間後のラット動脈管の計測では、帝王切開後、1時間呼吸させた後に液体窒素にて凍結させた。

凍結した胎仔はピラニア鋸（ピラニアツール、広島）で切断した。胎仔の胸部前額面をTissue-Tek® Optimal Cutting Temperature (O.C.T.) Compound (Sakura Finetek、東京)を使って液体窒素で少しずつ凍結させ、ユニ・カセット (Sakura Finetek)に固定した。カセットに固定したサンプルをカセットクーラー (OMRON、京都)で冷却した滑走式ミクロトーム SM2000R (LEICA、ドイツ)で薄切し、動脈管、大動脈、肺動脈をNikonの顕微鏡用デジタルカメラセット DIGITAL SIGHTで撮影し、各内径をImage Jにより計測した。

統計処理

実験より得られた値は平均値±標準誤差 (mean±SEM)で示し、二群間の有意差検定にはStudent t-testを、多群間はone-way ANOVAを用い、有

意水準は $P < 0.05$ とした。

(倫理面への配慮)

本研究は、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)及び横浜市立大学医学部で定めた倫理規定等を遵守し行った(承認番号10-14)。動物を用いた実験は、動物実験の講習を修了し、十分な知識と経験を有するものだけに従事させた。

本研究における全ての遺伝子組換え実験ならびに遺伝子組換え生物等の譲渡、移動等は、カルタヘナ議定書、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、ならびに研究施設の属する自治体の条例等を遵守し、遺伝子組換え実験安全委員会等において審議され大臣承認または機関承認された実験計画書にもとづいて、遺伝子組換え実験登録施設において適切な拡散防止措置のもと実施された。アデノウィルスベクターやプラスミドを用いた遺伝子組み換え操作、遺伝子改変動物使用

(承認番号57, 58, 59)に関する承認も同大学から受けており、適切な拡散防止措置のもと実験が行われた。

C. 研究結果

【1】 AC アイソフォームの動脈管における役割の検討

1-1. ラット動脈管での各 AC アイソフォームの発達段階における発現

胎生19日、21日、生後0日のラット動脈管および大動脈の組織におけるACアイソフォームの発現解析を半定量RT-PCRおよび定量RT-PCRを用いて検討した。まず、半定量RT-PCRでは、ラット胎生21日の動脈管で1型、8型AC(AC1、AC8)以外のアイソフォームは発現していた。胎生21日の大動脈の組織も同様に、AC1およびAC8は発現していなかった。また、動脈管ではAC2、AC5、AC6が多く発現していた(Figure 1A)。したがって、AC1およびAC8が動脈管組織で発現しないのは、動脈管特異的ではなく、血管平滑筋の性質

であると考えられた。さらにラット動脈管および大動脈の組織で AC2 から AC7 までの定量 RT-PCR による発現解析を行ったところ、動脈管における AC2 と AC6 の mRNA が、発達の段階を通して大動脈に比べて有意に高発現していた(Figure 1B-G)。動脈管における AC2 の発現は胎生 21 日で最大となり、AC6 の発現は発達段階とともに上昇した。

1-2. AC アイソフォームが血管リモデリングに及ぼす作用の検討

(1) 動脈管平滑筋初代培養細胞において AC6 はヒアルロン酸産生に寄与する

先行研究において、胎生後期に動脈管でおこる PGE 受容体 EP4 シグナルは血管拡張作用に加えて、ヒアルロン酸産生を促進させることが明らかにされている⁴⁾。そこで、本研究では動脈管平滑筋初代培養細胞で AC アイソフォームのヒアルロン酸産生への効果について siRNA およびアデノウイルスを用いて検討した。

まず、動脈管平滑筋初代培養細胞に

おける AC2、AC5、AC6 をそれぞれ標的とした siRNA による各 AC アイソフォームの発現抑制の確認を定量 RT-PCR によって行った。この結果、AC2 を標的とした siRNA (si-AC2) は AC2 mRNA の発現を 60% 減少させ、AC5、AC6 の siRNA (si-AC5、si-AC6) も同様に、それぞれのアイソフォームを 85%、91% 減少させた(Figure 2)。

次に、動脈管平滑筋初代培養細胞にアデノウイルスを用いて AC2、AC6 を過大発現 (Adv.AC2、Adv.AC6) し、各 AC アイソフォームの過大発現の確認を定量 RT-PCR によって行った。この結果、Adv.AC2 と Adv.AC6 により AC2、AC6 の mRNA の過大発現が濃度依存的に増強されることが確認された(Figure 3)。

siRNA を用いて AC6 の発現を抑制すると PGE₁ によるヒアルロン酸産生が有意に抑制された。しかし AC2 または AC5 の発現抑制下では PGE₁ によるヒアルロン酸産生は抑制されなかった (Figure 4A)。

アデノウイルスを用いて AC2、AC6 の過大発現を行い、ヒアルロン酸産生

の検討を行った。動脈管平滑筋初代培養細胞にアデノウイルスを用いて AC6 を過大発現し、PGE₁ で刺激すると、コントロールの LacZ に比べてヒアルロン酸産生が有意に上昇したが、AC2 ではヒアルロン酸産生は認められず、さらに AC2 過大発現では AC6 によるヒアルロン酸産生を抑制した (Figure 4B)。

(2) ラット動脈管の器官培養による内膜肥厚形成作用の検討

動脈管の内膜肥厚形成作用を検討するため、アデノウイルスを用いて動脈管器官培養を行った。

まず、アデノウイルスを用いて、動脈管組織に AC6 を過大発現させるとヒアルロン酸産生亢進をともなう内膜肥厚形成作用が促進されるか検討した。内膜肥厚を起こしていない胎生 19 日のラット動脈管を器官培養し、アデノウイルスで AC6 を過大発現させると、ヒアルロン酸産生亢進を伴う内膜肥厚形成が LacZ コントロールの過大発現に比べて著明に認められ (Figure 5A、B、D)、Adv.AC6 で処理

した動脈管内腔は有意に狭くなっていた (Figure 5C)。しかし AC2 および AC2+AC6 の過大発現では内膜肥厚は誘導されなかった。このことは、AC2 が AC6 によるヒアルロン酸産生および内膜肥厚形成作用を抑制することが示唆され、この結果は Figure 4B と一致している。以上の結果から、これらの結果は動脈管において、AC6 は内膜肥厚形成に寄与し、AC2 は AC6 の内膜肥厚形成作用を抑制することが示唆された。

(3) AC6 欠損マウスの動脈管では内膜肥厚が減少した

本実験では AC6 のみが動脈管の内膜肥厚形成に関して主要なアイソフォームであることを示した。しかしながら、AC5 と AC6 のアミノ酸配列は非常に高いホモロジーを保存しているため、AC5 および AC6 欠損 (AC5KO、AC6KO) マウスを用いて AC6 が内膜肥厚において重要な役割を果たすのかを *in vivo* でも検証した。AC5KO および AC6KO マウス (胎生 18.5 日) の動脈管をエラスチカ染色し、

内膜肥厚形成を計測したところ、AC5KO マウスでは野生型マウスと同様の内膜肥厚形成が認められた (Figure 6A、B、E)。また、AC5KO マウスの動脈管は生後閉鎖していたことを確認している。一方、AC6KO マウスの動脈管は野生型マウスに比べて、内膜肥厚形成が有意に低下していた (Figure 6C、D、F)。この結果は AC5 ではなく、AC6 が内膜肥厚形成に重要であることを裏付けている。

[2] AC アイソフォーム選択的刺激薬の薬剤への応用

2-1. 内膜肥厚形成作用の検討 (in vitro)

(1) 動脈管平滑筋初代培養細胞における AC アイソフォーム選択的刺激薬のヒアルロン酸産生への効果

ヒアルロン酸産物の産生における AC アイソフォーム選択的刺激薬の効果をヒアルロン酸測定、定量 RT-PCR を用いて検討した。

動脈管平滑筋初代培養細胞に刺激薬である 6-[N-(2-isothiocyanatoethyl)

aminocarbonyl] forskolin (FD1)、AC5/6 刺激薬である 6-[3-(dimethylamino) propionyl]-14-15-dihydroforskolin (FD6)、Fsk、PGE₁ で刺激しヒアルロン酸測定を行った。FD6 を用いて AC5 および AC6 を刺激すると、Fsk、PGE₁ と同様にヒアルロン酸産生が有意に促進された (Figure 7A)。しかし FD1 刺激ではヒアルロン酸産生は促進されなかった。

また、FD1 または FD6 刺激をした動脈管平滑筋初代培養細胞から RNA を抽出し、ヒアルロン酸合成酵素 2 型 (HAS2) の発現解析を、定量 PCR を用いて行った。FD6 10⁻⁵ M 刺激を行った動脈管平滑筋初代培養細胞では、2 型ヒアルロン酸合成酵素 (HAS2) の mRNA が、CTRL および高濃度の FD1 刺激の動脈管平滑筋初代培養細胞に比べて有意に高発現していたことを確認した (Figure 7B)。しかし、FD1 刺激による HAS2 の mRNA の増加はなかった。

さらに、AC5 および AC6 を標的とした siRNA を用いて、FD6 が AC5

または AC6 を介したヒアルロン酸産生を亢進するか検討した。AC6 の発現を抑制し、FD6 刺激を行うと、ヒアルロン酸産生が有意に抑制され (Figure 7C)、FD6 は AC5 ではなく、AC6 を介してヒアルロン酸産生を促進させることが示唆された。

(2) 器官培養を用いた AC アイソフォーム選択的刺激薬の内膜肥厚への効果の検討

動脈管の器官培養を行い、FD1 および FD6 の内膜肥厚作用の検討を行った。胎生 19 日のラット動脈管を器官培養し、FD6 刺激をすると、ヒアルロン酸産生亢進を伴う内膜肥厚形成が顕著に認められ、動脈管の内腔も狭小化した (Figure 8)。一方、FD1 刺激によるヒアルロン酸産生および内膜肥厚形成は誘導されなかった。

2-2. 血管拡張作用の検討 (in vivo)

(1) 血管拡張における AC アイソフォーム選択的刺激薬の効果

PGE₁ は AC の活性化を介し動脈管を拡張させるため、AC アイソフォー

ム選択的刺激薬も同様に動脈管に対して強い拡張作用を示すことが考えられる。そこで血管拡張に対する AC アイソフォーム選択的刺激薬の効果の検討を行った。急速全身凍結法によって *in vivo* で FD1 および FD6 の血管拡張効果を検討した。動脈管は生後すぐに大きく開存し、生後 1 時間で完全に閉鎖した (Figure 9A)。また、動脈管の内径が最大に開存する、最小濃度の FD1、FD6 の各投与量を決定するために、生後 1 時間のラット胎児に濃度の違う FD1、FD6 をそれぞれ投与し、投与 30 分後に凍結させ、動脈管の内径を測定した (Figure 9B)。その結果、FD1 を 10.8 $\mu\text{g/g}$ 、FD6 を 1.29 $\mu\text{g/g}$ 投与することに決定した。また、FD1 および FD6 の持続時間を調べるために、生後 1 時間のラット胎児に PGE₁、FD1、FD6 を投与し、時間を追って凍結させ、動脈管の内径を測定した。先行研究¹⁷⁾と一致して、PGE₁ は腹腔内投与後 30 分で最大に拡張し、2 時間以内に完全に閉鎖した (Figure 9C、D)。FD1 は最大 4 時間で動脈管の最大拡張を誘導し、無呼吸

状態にならずに徐々に減少していった。このことから、FD1の動脈管拡張効果はPGE₁と同等で持続時間も長いことが確認された。一方、FD6は投与後30分で動脈管を拡張させるが、投与後約4時間で全ての新生児はPGE₁による副作用と同様の呼吸抑制により死亡した。

以上をまとめると、本実験の結果は動脈管において① AC6はヒアルロン酸産生をともなう内膜肥厚形成に重要な役割を果たしていることと、② AC2はAC6によるヒアルロン酸産生および内膜肥厚形成作用を抑制する効果を持つということを明らかにした。AC2、AC6の刺激薬であるFD1は、動脈管依存性先天性心疾患患者の薬理的治療への応用が期待される。

D. 考察

本研究では、次の2点を明らかにした。①動脈管ではACアイソフォームが内膜肥厚形成に重要な役割を果たしている。AC6はヒアルロン酸産生および内膜肥厚形成の促進に重要であ

る一方、AC2はAC6を介するヒアルロン酸産生および内膜肥厚形成作用を抑制することを明らかにした。また、②AC2/6刺激薬であるFD1刺激は、ヒアルロン酸産生によって生じる内膜肥厚形成を起こすことなく、臨床で使用されているPGE₁刺激と効果が同等かつ血管拡張作用が長く持続した。

AC2、AC6の動脈管における役割

出生前から開始される動脈管の血管リモデリングは正常な発達に重要である^{4) 18)}。先行研究では、PGE受容体であるEP4シグナルが動脈管平滑筋細胞でヒアルロン酸産生を伴う内膜肥厚形成を誘導することを明らかにしている⁴⁾。しかし、ACアイソフォーム別における内膜肥厚形成の制御は未解明である。そこで本研究では、ACアイソフォームの違いによって動脈管の内膜肥厚形成を選択的に制御できるかを検討するために以下の実験を行った。半定量および定量RT-PCRを用いて発現解析を行ったところ、動脈管ではAC2およびAC6が発達段階を通して大動脈に比べて

有意に高発現していたことを明らかにした。AC2 は脳、骨格筋、心臓に多く、AC6 は脳、心臓に多く、その他の組織にも広範囲に発現している^{5) 6)}。また、AC5 と AC6 は心臓で多く発現しているアイソフォームであるが、AC6 が心拍と収縮に関する心臓のβ-アドレナリン受容体による制御や、心保護に作用しているが AC5 はこれらに関与していないことが、AC5、AC6 を過大発現させたトランスジェニックマウスを用いた実験で証明されている^{19) 20)}。このように、AC アイソフォームには発現部位や役割に特異性がある。

本実験では、AC2、AC5、AC6 を標的とした siRNA、AC2、AC6 を過大発現させるアデノウイルスおよび AC5KO、AC6KO マウスを用いて行った。その結果、AC6 はヒアルロン酸産生および内膜肥厚形成の促進することが明らかになり、AC6 が血管リモデリングに重要な役割を持つことが示唆された。一方、AC2 は AC6 を介するヒアルロン酸産生および内膜肥厚形成作用を抑制することが明らか

になり、AC2 は血管リモデリングに寄与しないことが示唆された。

また、本実験では、胎生後期の AC6KO マウスの動脈管は内膜肥厚形成を起さないことを示した。この結果から、EP4 シグナルを介したヒアルロン酸産生および内膜肥厚形成において、AC6 が重要な役割を果たしていると考えられる。先行研究では、EP4KO マウスの動脈管は生後も開存し続けていた⁴⁾。しかし、AC6KO マウスの動脈管は出生後、野生型(WT)マウスと同様に動脈管が閉鎖した。この原因として、以下の 2 点が考えられる。① AC6 が欠損していても、その他の AC アイソフォームの代償作用により、内膜肥厚がおこり動脈管が閉鎖すること、あるいは② AC アイソフォームを介し cAMP を産生する経路以外の EP4 シグナルが EP4KO マウスの動脈管が開存に関与している可能性もある。この機序の解明は今後の課題であると考えている。

AC2、AC6 の下流シグナルとヒアルロン酸産生に伴う内膜肥厚形成作用の

関係

本研究では、先に述べたように、AC6 はヒアルロン酸産生および内膜肥厚形成を促進し、AC5/6 刺激薬である FD6 もこれらの作用を亢進することを明らかにした。一方、AC2 過大発現は AC6 によるヒアルロン酸産生および内膜肥厚形成を抑制し、この結果は AC2/6 刺激薬である FD1 刺激下においてヒアルロン酸産物および内膜肥厚形成を促進しなかった結果と一致している。

ACアイソフォームは刺激性Gタンパク質 G_s に刺激され、 Ca^{2+} /カルモジュリンやプロテインキナーゼに調節され、cAMP を産生する²¹⁾。AC2 は G_{α_s} が活性化により、cAMP を産生する。また、AC2 はプロテインキナーゼ C (PKC) によっても活性化され、プロテインキナーゼ A (PKA) によって抑制される。一方、AC6 は G_{α_s} のみに刺激され、抑制性Gタンパク質 G_{α_i} 、PKA および μM レベルの低濃度の Ca^{2+} に抑制される^{5) 22)}。さらに、各ACアイソフォームのcAMP産生効率とは関係なく、血管平滑筋の増殖や細

胞骨格の再構築をACアイソフォーム特異的に制御されていることが知られている²³⁾。本研究では、FD6 はFD1 よりもヒアルロン酸産生を促進する作用は高いことを示したが、先行研究では、FD6 よりもFD1の方が同じ濃度でもcAMPを効率よく産生することを明らかにした。したがって、AC2 がAC6によるヒアルロン酸産生および内膜肥厚形成作用を抑制するのは、上記の報告²³⁾と同様にcAMPの産生量には比例していないと考えられる。また、以下の2つの報告がある。1つは、インスリン様増殖因子 I (IGF-I) に対する応答が、リガンド濃度により全く逆の効果をもたらすという報告²⁴⁾がある。もう1つは、ラット副腎皮質由来の褐色細胞腫細胞において、EGF と NGF に対する応答は上皮細胞成長因子 EGF と神経成長因子 NGF に対する応答ではいずれも同じシグナル系 (Raf/MEK/ERK) が活性化されるにも関わらず、その応答は逆になる。その違いはこれらの系の活性化が「一過性に」起こるか、「持続的に」起こるかによって違ってくる

いう報告²⁵⁾がある。これらの報告から、時間を細かく振って分子応答を調べてみると、2つの刺激に対する反応の違いが見えてくるかもしれない。AC2、AC6の下流のシグナルおよび、AC6の下流のシグナルをAC2が抑制する細胞内メカニズムについては不明な点が多く、現在検討中である。

ACアイソフォーム選択的刺激薬の臨床への応用

現在薬理的治療では、動脈管の開存にはPGEを、動脈管の閉鎖にはPGH合成酵素阻害薬広く使われている。これらの治療方法はPGEの血漿濃度および局所濃度、血漿濃度または局所濃度を変化させるため、ターゲットでない平滑筋や組織の収縮状態や細胞応答にも作用してしまい、体系的組織において重篤な副作用をきたす。さらに、PGEは持続時間が短く、長期的にはヒアルロン酸産生を介する内膜肥厚形成を誘導する問題がある。本研究では、動脈管において、PGEシグナルの下流のAC2およびAC6を刺激するFD1が内膜肥厚を起さず、

血管張力のみに作用することを示した。また、FD1刺激はコントロールと同様に肺動脈および大動脈の拡張に作用しないことを確認しており、さらに、FD1はPGE₁と薬理的効果が同等かつ長時間持続することを明らかにした。

E. 結論

本研究によって、動脈管ではAC2、AC6が大動脈に比べて高発現し、AC6は動脈管平滑筋におけるヒアルロン酸産生を促進し、生後の閉鎖に重要な内膜肥厚形成を促進し、AC2はこれらの作用を抑制した。AC6の下流シグナルをAC2が抑制する細胞内メカニズムについては不明な点が多く、現在検討中である。

AC2およびAC6の刺激薬であるFD1は動脈管平滑筋初代培養細胞でのヒアルロン酸産生を介する内膜肥厚を誘導せず、*in vivo*で動脈管のPGE₁と同等の効果かつ長時間にわたる拡張作用を有することを明らかにしたため、動脈管拡張剤として使用できる可能性がある。したがって、FD1

は動脈管依存性先天性心疾患患者の現在の PGE 治療にかわる新しい治療方法になると期待できる。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Jin MH, Yokoyama U, Akaike T, Shioda A, Ishiwata R, Okumura S, Sato M, Minamisawa S, Ishikawa Y Oxygenation-induced remodeling of postnatal ductus arteriosus with basic fibroblast growth factor signaling. *Nature Medicine* submitted, 2011

2. Kurotani R, Okumura S, Matsubara T, Yokoyama U, Buckley JR, Tomita T, Kezuka K, Nagano T, Esposito D, Taylor TE, Gillette WK, Ishikawa Y, Abe H, Ward JM, Kimura S. Secretoglobin 3A2 suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis by TGFbeta signaling

down-regulation. *J Biol Chem.* 2011 Apr 10. [Epub ahead of print]

3. Sato M, Yokoyama U, Fujita T, Okumura S, Ishikawa Y. The Roles of Cytochrome P450 in Ischemic Heart Diseases. *Curr Drug Metab.* 2011 Apr 8. [Epub ahead of print]

4. Sato M, Hiraoka M, Suzuki H, Bai Y, Kurotani R, Yokoyama U, Okumura S, Cismowski MJ, Lanier SM, Ishikawa Y. Identification of transcription factor E3 (TF E3) as a receptor-independent activator of G α 16: Gene regulation by nuclear G α subunit and its activator. *J Biol Chem.* 286 (20) :17766-17776,2011 .

5. Jin MH, Yokoyama U, Sato Y, Shioda A, Jiao Q, Ishikawa Y, Minamisawa S. DNA microarray profiling identified a new role of

- growth hormone in vascular remodeling of rat ductus arteriosus. *J Physiol Sci.* 61(3):167-79, 2011
6. Yokoyama U, Minamisawa S, Katayama A, Tang T, Suzuki S, Iwatsubo K, Iwasaki S, Kurotani R, Okumura S, Sato M, Yokota S, Hammond HK, Ishikawa Y. Differential regulation of vascular tone and remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus. *Circ Res* 106(12):1882-92, 2010
7. Suzuki S, Yokoyama U*, Abe T, Kiyonari H, Yamashita N, Kurotani R, Sato M, Okumura S, Ishikawa Y. Differential roles of E pac in regulating cell death in neuronal and myocardial cells. *J Biol Chem.* 285(31):24248-59, 2010 *corresponding author
8. Yokoyama U*, Minamisawa S, Ishikawa Y. Regulation of vascular tone and remodeling of the ductus arteriosus. *J Smooth Muscle Res.* 46(2):77-87, 2010 [Review] *corresponding author
9. Matsusaki M, Kadowaki K, Adachi E, Sakura T, Yokoyama U, Ishikawa Y, Akashi M. Morphological and Histological Evaluations of 3D-Layered Blood Vessel Constructs Prepared by Hierarchical Cell Manipulation. *J Biomater Sci Polym Ed.* (in press, 2010)
10. 岩本 眞理、西澤 崇、渡部 重朗、市川 泰宏、志水 直、山口 和子、赤池 徹、横山 詩子、瀧間 浄宏、佐近 琢磨、安井 清、柴田 利満、新村 一郎、横田 俊平：運動誘発性発作を呈するQT延長症候群の運動負荷心電図の特徴について。日本小児循環器学会雑誌 第26巻 第1号p67-72, 2010
2. 学会発表

1. Kato Y, Yokoyama U, Okumura S, Minamisawa S, Sata M, Miyajima E, Ishikawa Y. Epc1 promotes vascular remodeling upon vascular injury in vivo. The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2011.3.28-30, Yokohama)
2. Ishiwata R, Yokoyama U, Kadowaki K, Matsusaki M, Akashi M, Ishikawa Y, Minamisawa S. Serum depletion and three-dimensional multilayer composition induce elastic fiber formation and a contractile phenotype of rat vascular smooth muscle cells. The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2011.3.28-30, Yokohama)
3. Aida T, Yokota T, Yokoyama U, Minamisawa S. Thromboxane A2 Receptor Stimulation Specifically Causes Closure of the Rat Ductus Arteriosus. The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2011.3.28-30, Yokohama)
4. Liu N, Yokota T, Maekawa S, Yokoyama U, Kato T, Minamisawa S. Successful Isolation of Vascular Endothelial Cells from the Rat Ductus Arteriosus. The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2011.3.28-30, Yokohama)
5. Shioda A, Yokoyama U, Kato Y, Asou T, Aoki H, Nakamura T, Minamisawa S, Ishikawa Y. Prostaglandin EP4 Signaling Negatively Regulates Vascular Elastic Fiber Assembly. The 33th Annual Meeting of the Molecular Biological Society of Japan (2010.12.7-10, Kobe)
6. Yokoyama U, Shioda A, Kato Y, Asou T, Aoki H, Nakamura T, Minamisawa S, Ishikawa Y. P

- rostaglandin EP4 Signaling Negatively Regulates Vascular Elastic Fiber Assembly. The 84th Scientific Session, American Heart Association (AHA) (2010.11.13-11.17, Chicago, USA) *Circulation*. Oct. suppl. I; 2010 (Abstract)
7. 青木理加、横山詩子、岩崎志穂、西巻滋、横田俊平、石川義弘 「ラット動脈管閉鎖における低浸透圧センサーTransient Receptor Potential Melastatin 3 (TRPM3) チャネルの役割」第55回未熟児新生児学会・学術集会(2010.11.5-7 神戸)
8. 岩崎志穂、青木理加、西巻滋、横田俊平、南沢享、横山詩子 「ラット動脈管内膜肥厚におけるアデニル酸シクラーゼアイソフォームの役割の検討」第46回日本周産新生児医学会 (2010.7.11-13 神戸)
9. Yokota T, Ozawa M, Yokoyama U, Minamisawa S. A Role of Thromboxane A2 Receptor in the Rat Ductus Arteriosus as a Vasoconstrictor. The 16th International Vascular Biology Meeting (2010.6.20-24, Los Angeles)
10. Minamisawa S, Yokoyama U, Akaike T, Hammond K, Ishikawa Y. Counteracting regulation of vascular remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus. The 16th International Vascular Biology Meeting (2010.6.20-24, Los Angeles)
11. Yokoyama U, Minamisawa S, Ishikawa Y. Regulation of vascular remodeling of the ductus arteriosus. The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2011.3.28-30, Yokohama) (symposiast)
12. 横山詩子. 「炎症性メディエーターによる血管弾性線維と細胞外基質の制御」大阪大学明石研セミナー