

(2010.12.7, 大阪)

13. 横山詩子. 「動脈管閉鎖のメカニズム—from bench to bedside」  
第6回横浜小児先端医療セミナー (2010.9.3, 横浜)

14. 横山詩子. 「動脈管のリモデリング—酸素の役割」 小児心血管分子医学研究会 (2010.7.8, 千葉)

15. 横山詩子. 「Prostaglandin E2-activated Epac promotes neonatal formation of the rat ductus arteriosus by a process distinct from that of cAMP-dependent protein kinase A.」 第52回日本平滑筋学会総会 栗山熙賞受賞記念講演 (2010.7.1, 仙台)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得  
取得予定なし

2. 実用新案登録  
取得予定なし

3. その他

以下に参考文献と図を示す。(図は Yokoyama U, et al., Circ Res, 2010 からの抜粋)

### 参考文献

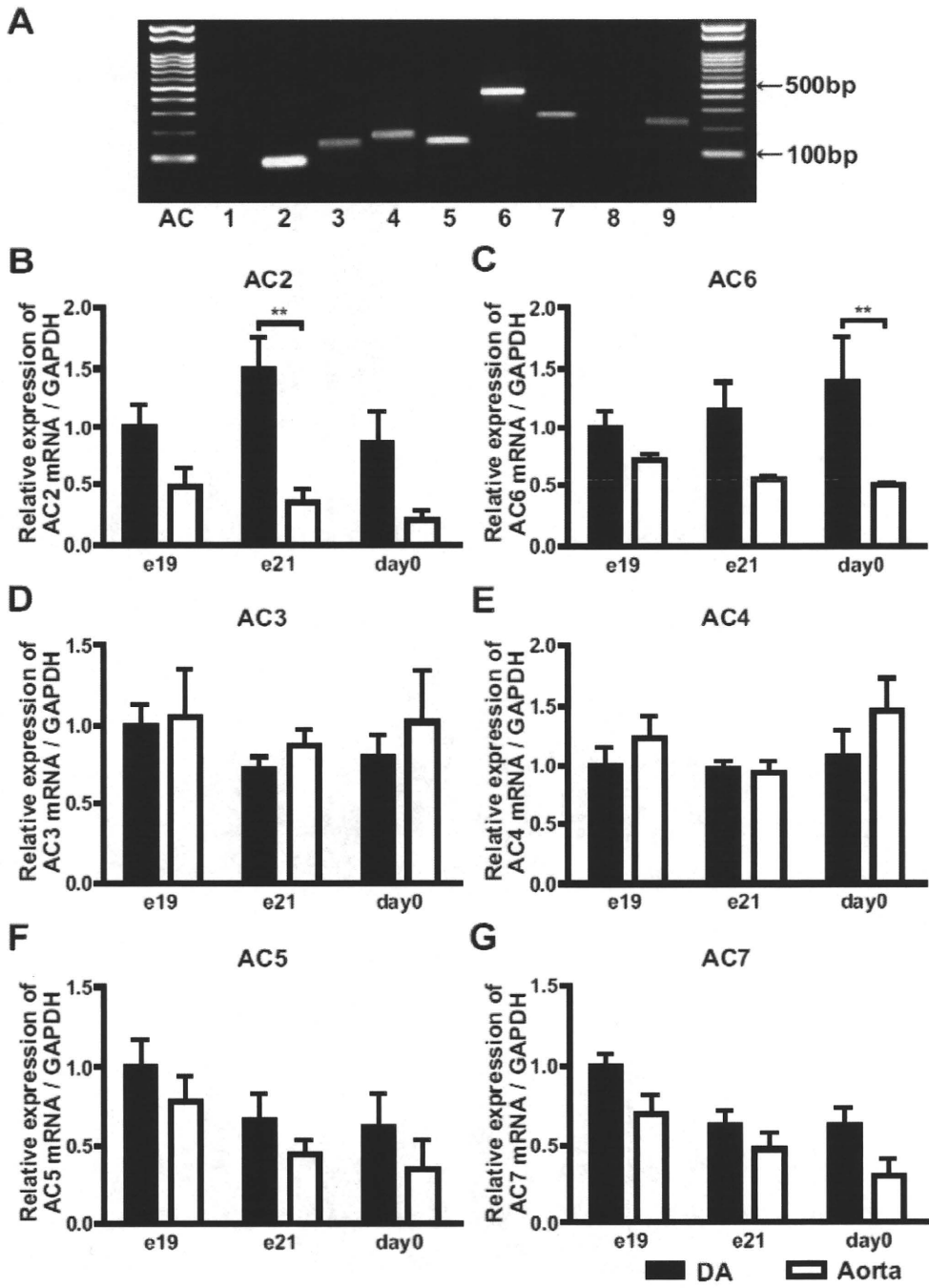
1. Smith GC. The pharmacology of the ductus arteriosus. *Pharmacol Rev.* 1998;50 (1):35-58.
2. Cyman RI. Mechanisms regulating the ductus arteriosus. *Biol Neonate.* 2006; 89: 330-335
3. Waleh N, Kajino H, Marrache AM, Ginzinger D, Roman C, Seidner SR, Moss TJ, Fouron JC, Vazquez-Tello A, Chemtob S, Clyman RI. Prostaglandin E2-mediated relaxation of the ductus arteriosus: effects of gestational age on g protein-coupled receptor expression, signaling, and vasomotor control. *Circulation.* 2004;110 (16):2326-2332.

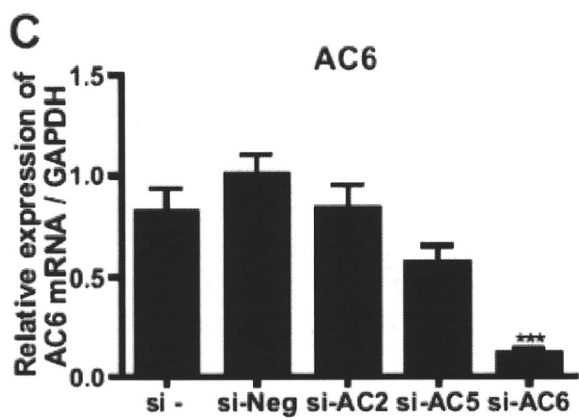
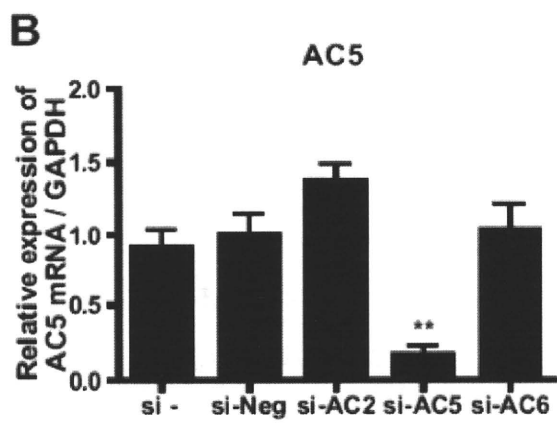
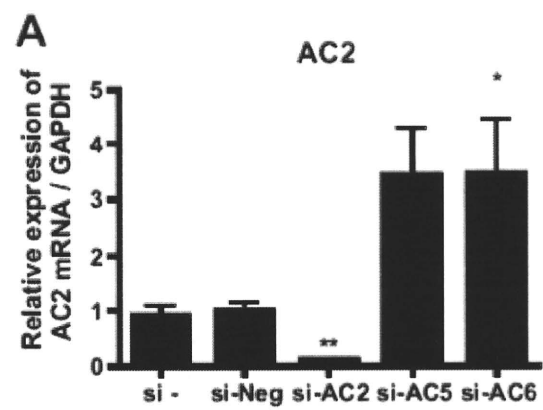
4. Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, Ghatak S, Akaike T, Segi-Nishida E, Iwasaki S, Iwamoto M, Misra S, Tamura K, Hori H, Yokota S, Toole BP, Sugimoto Y, Ishikawa Y. Chronic activation of the prostaglandin receptor EP4 promotes hyaluronan-mediated neointimal formation in the ductus arteriosus. *J Clin Invest.* 2006;116 (11):3026-3034.
5. Sunahara RK, Taussig R. Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol Interv.* 2002;2 (3):168-184.
6. Tang WJ, Gilman AG. Adenylyl cyclases. *Cell.* 1992;70 (6):869-872.
7. Ishikawa Y. Isoform-targeted regulation of cardiac adenylyl cyclase. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003;41 Suppl 1:S1-4.
8. Webb JG, Yates PW, Yang Q, Mukhin YV, Lanier SM. Adenylyl cyclase isoforms and signal integration in models of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;281 (4):H1545-1552.
9. Onda T, Hashimoto Y, Nagai M, Kuramochi H, Saito S, Yamazaki H, Toya Y, Sakai I, Homcy CJ, Nishikawa K, Ishikawa Y. Type-specific regulation of adenylyl cyclase. Selective pharmacological stimulation and inhibition of adenylyl cyclase isoforms. *J Biol Chem.* 2001;276 (51):47785-47793.
10. Iwatsubo K, Minamisawa S, Tsunematsu T, Nakagome M, Toya Y, Tomlinson JE, Umemura S, Scarborough RM, Levy DE, Ishikawa Y. Direct inhibition of type 5 adenylyl cyclase prevents myocardial apoptosis without functional deterioration. *J Biol Chem.* 2004;279 (39):40938-40945.
11. Sutkowski EM, Robbins JD,

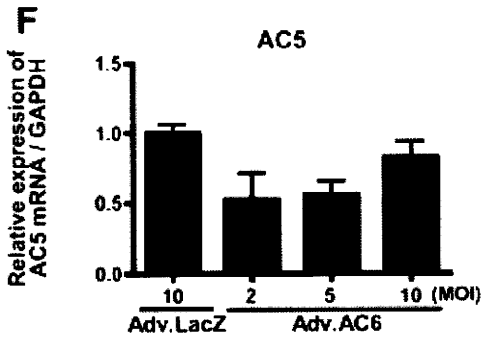
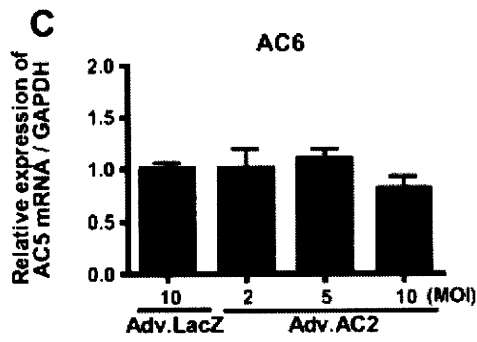
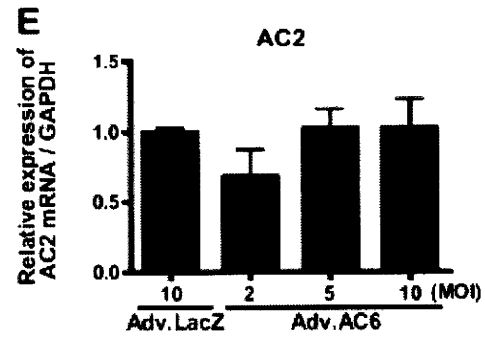
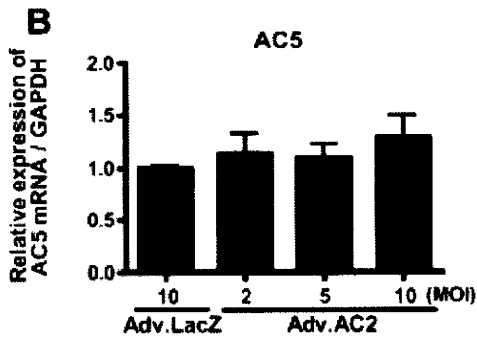
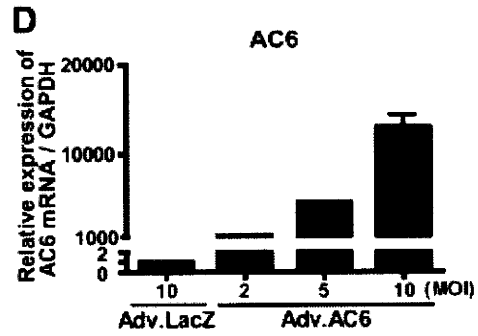
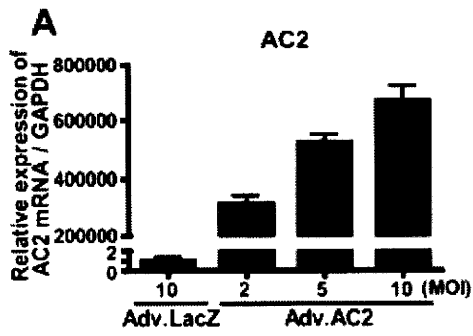
- Tang WJ, Seamon KB. Irreversible inhibition of forskolin interactions with type I adenylyl cyclase by a 6-isothiocyanate derivative of forskolin. *Mol Pharmacol.* 1996;50 (2):299-305.
12. Okumura S, Takagi G, Kawabe J, Yang G, Lee MC, Hong C, Liu J, Vatner DE, Sadoshima J, Vatner SF, Ishikawa Y. Disruption of type 5 adenylyl cyclase gene preserves cardiac function against pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100 (17):9986-9990.
13. Tang T, Gao MH, Lai NC, Firth AL, Takahashi T, Guo T, Yuan JX, Roth DM, Hammond HK. Adenylyl cyclase type 6 deletion decreases left ventricular function via impaired calcium handling. *Circulation.* 2008;117 (1):61-69.
14. 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  $\alpha$ 1-subunits and a novel spliced variant of the  $\alpha$ 1C-subunit in rat ductus arteriosus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290 (4):H1660-1670.
15. Gao M, Ping P, Post S, Insel PA, Tang R, Hammond HK. Increased expression of adenylyl cyclase type VI proportionately increases beta-adrenergic receptor-stimulated production of cAMP in neonatal rat cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95 (3):1038-1043.
16. Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, Akaike T, Suzuki S, Jin M, Jiao Q, Watanabe M, Otsu K, Iwasaki S, Nishimaki S, Sato M, Ishikawa Y. Prostaglandin E<sub>2</sub>-activated Epac promotes

- neointimal formation of the rat ductus arteriosus by a process distinct from that of cAMP-dependent protein kinase A. *J Biol Chem.* 2008;283(42):28702-28709.
17. Momma K, Toyoshima K, Takeuchi D, Imamura S, Nakanishi T. *In vivo* reopening of the neonatal ductus arteriosus by a prostanoid EP4-receptor agonist in the rat. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2005;78(1-4):117-128.
18. Rabinovitch M, Beharry S, Bothwell T, Jackowski G. Qualitative and quantitative differences in protein synthesis comparing fetal lamb ductus arteriosus endothelium and smooth muscle with cells from adjacent vascular sites. *Dev Biol.* 1988;130(1):250-258.
19. Tepe NM, Lorenz JN, Yatani A, Dash R, Kranias EG, Dorn 2nd GW, Liggett SB. Altering the receptor-effect ratio by transgenic overexpression of type V adenylyl cyclase: Enhanced basal catalytic activity and function without increased cardiomyocyte  $\beta$ -adrenergic signaling. *Biochemistry.* 1999; 38: 16706-16713
20. Roth DM, Gao MH, Lai NC, Drumm J, Dalton N, Zhou JY, Zhu J, Entrikin D, Hammond HK. Cardiac-directed adenylyl cyclase expression improves heart function in murine cardiomyopathy. *Circulation.* 1999; 99: 3099-3102
21. Wang T, Brown MJ. Differential expression of adenylyl cyclase subtypes in human cardiovascular system. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2004; 223: 55-62
22. Wong ST, Baker LP, Trinh K, Hetman M, Suzuki LA, Storm DR, Bornfeldt KE. Adenylyl cyclase 3 mediates prostaglandin

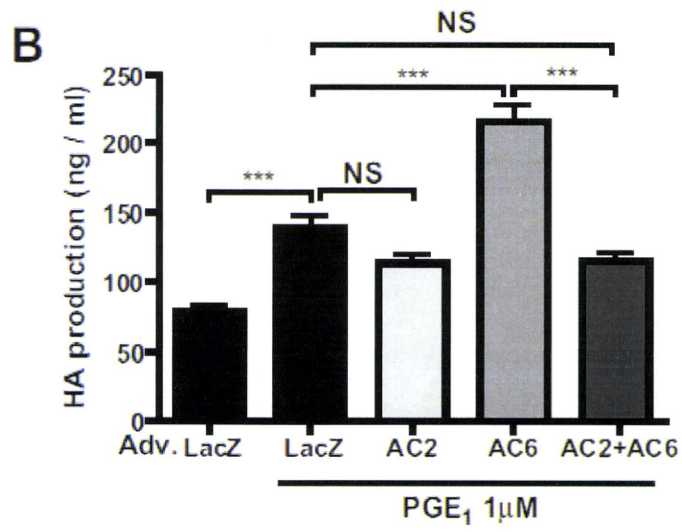
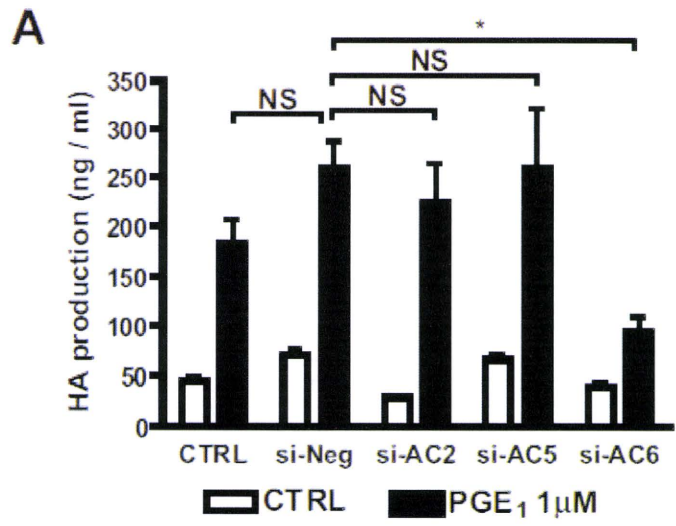
- E (2)-induced growth inhibition in arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2001; 276 (36):34206-34212.
23. Gros R, Ding Q, Chorazyczewski J, Pickering JG, Limbird LE, Feldman RD. Adenylyl cyclase isoform-selective regulation of vascular smooth muscle proliferation and cytoskeletal reorganization. *Circ Res.* 2006; 99 (8):845-852.
24. Moelling K, Schad K, Bosse M, Zimmermann S, Scweneker M. Regulation of Raf-Akt Cross-talk. *J Biol Chem.* 2002; 277: 31099-31106
25. Kao S, Jaiswal RK, Kolch W, Landreth GE. Identification of the Mechanisms regulating the differential activation of the MAPK cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem.* 2001; 276: 18169-18177

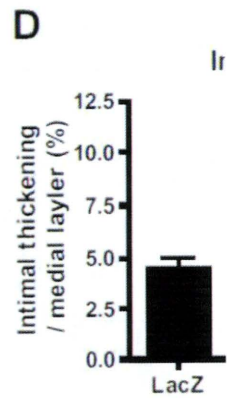
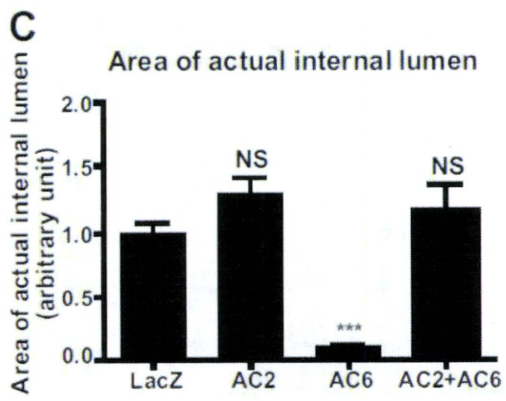
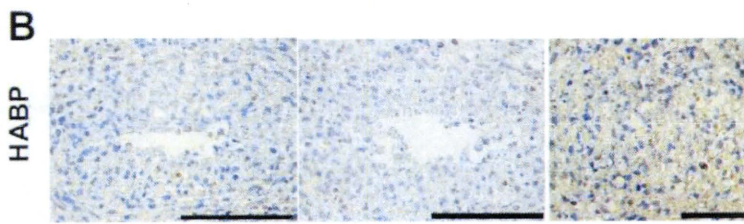
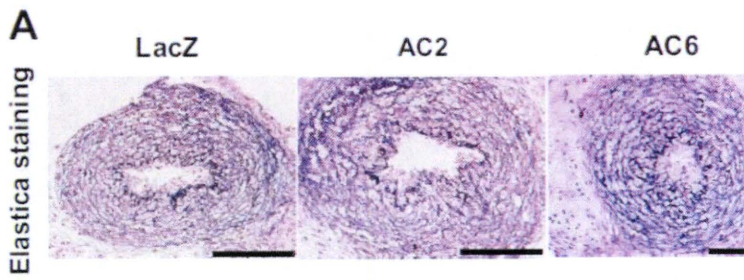


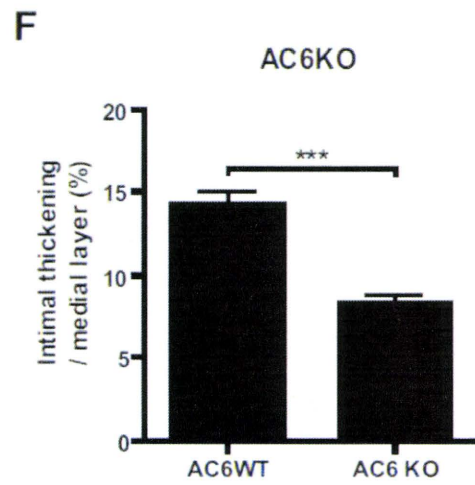
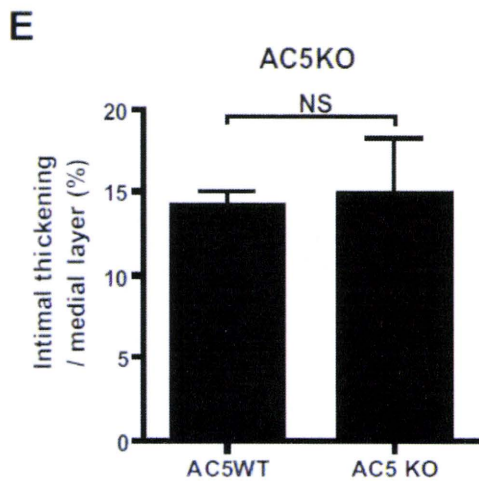
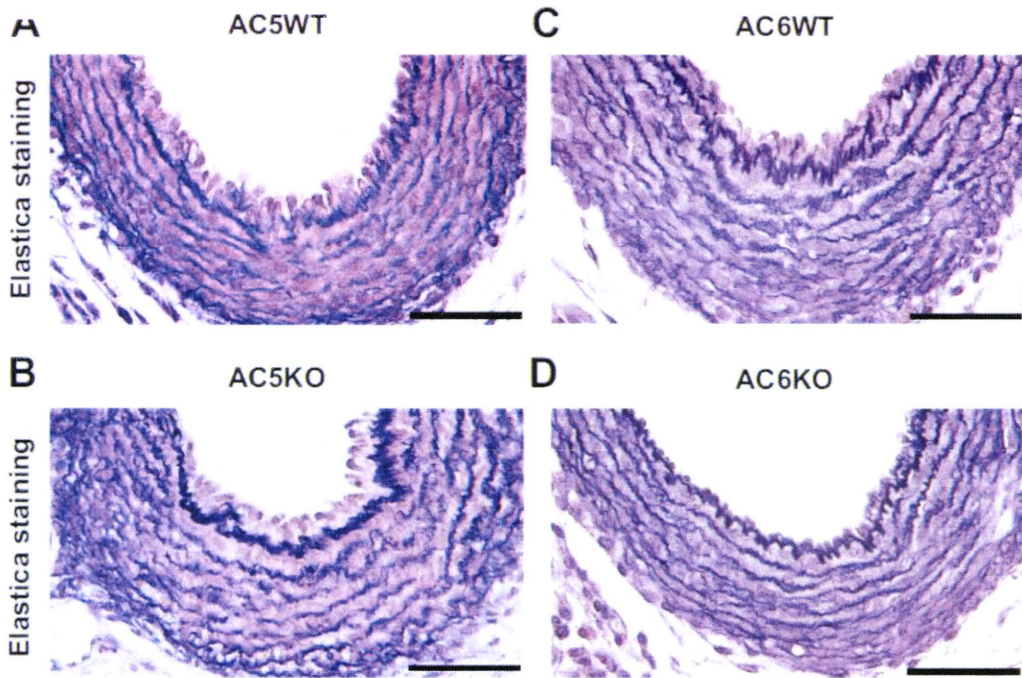


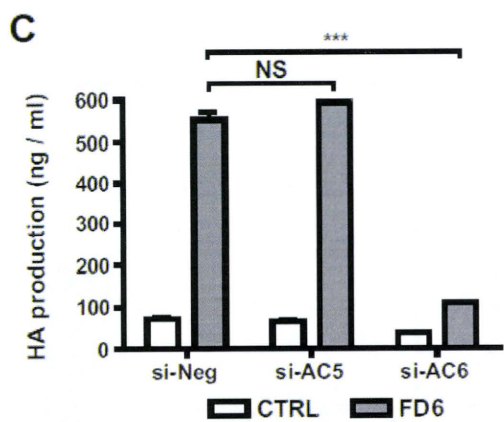
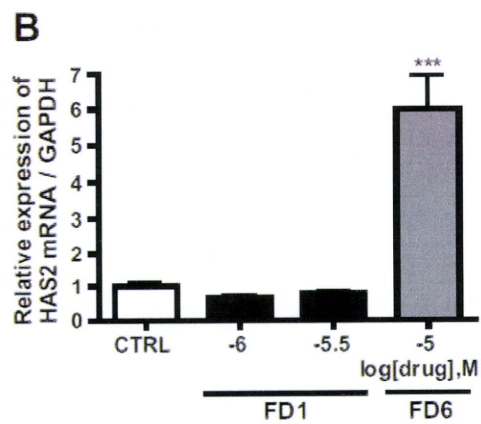
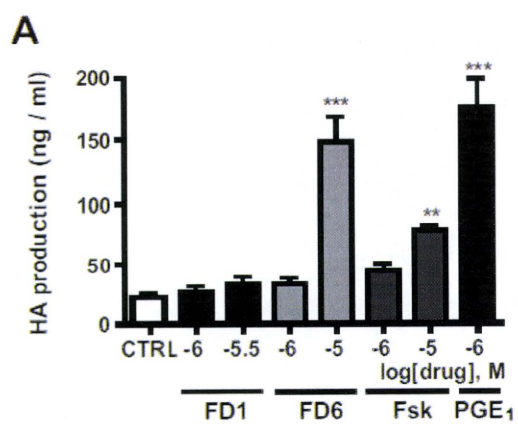


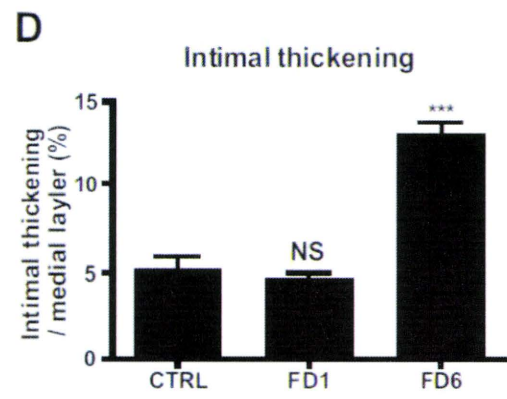
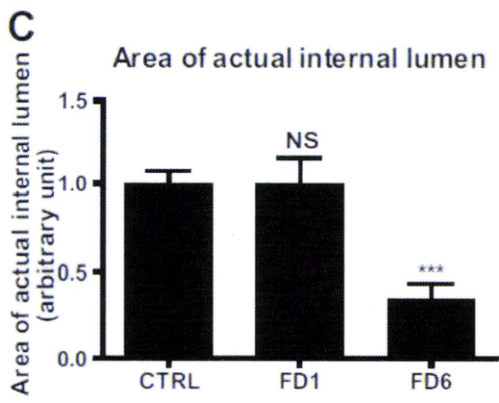
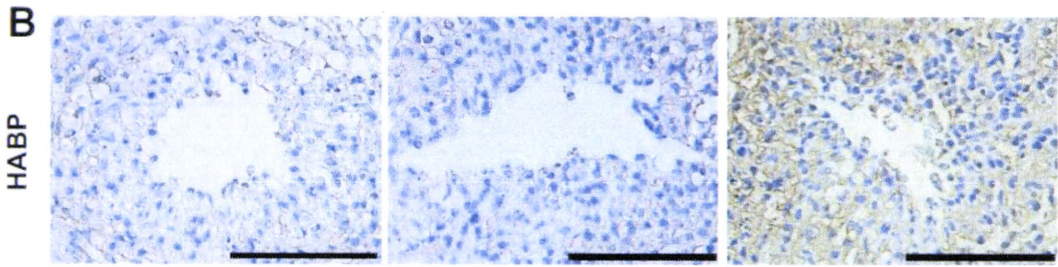
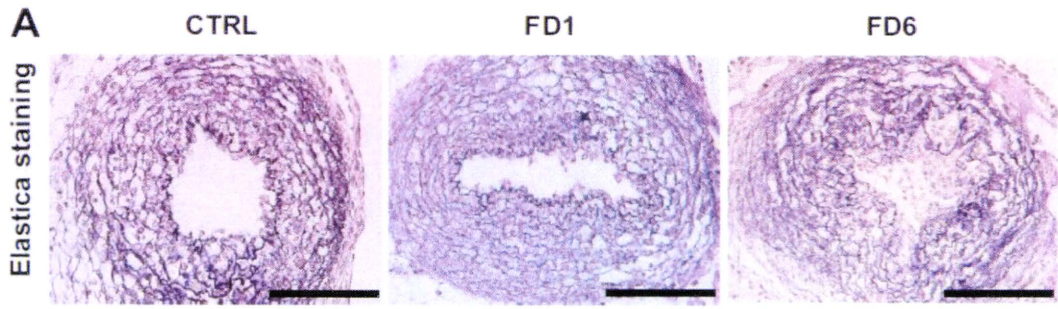


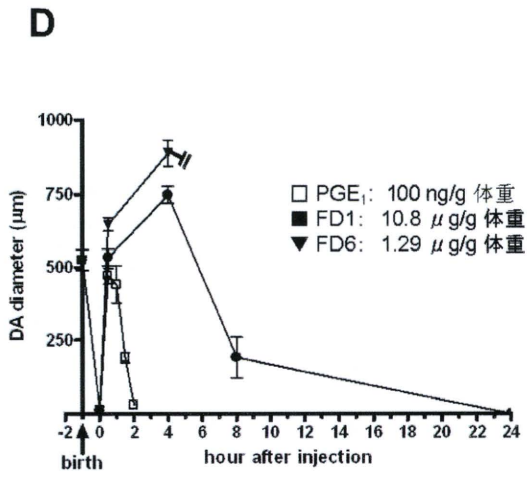
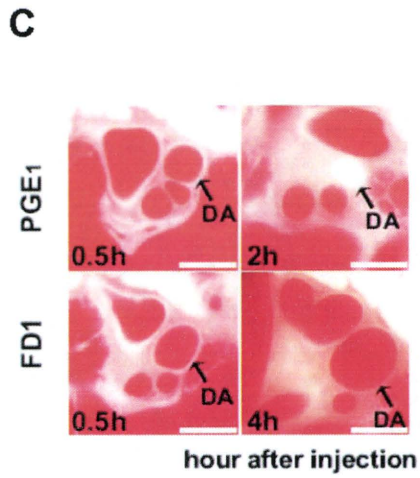
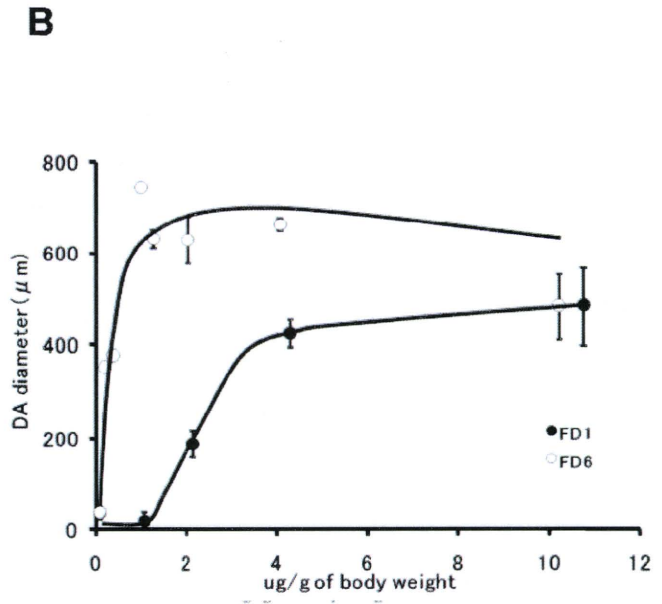
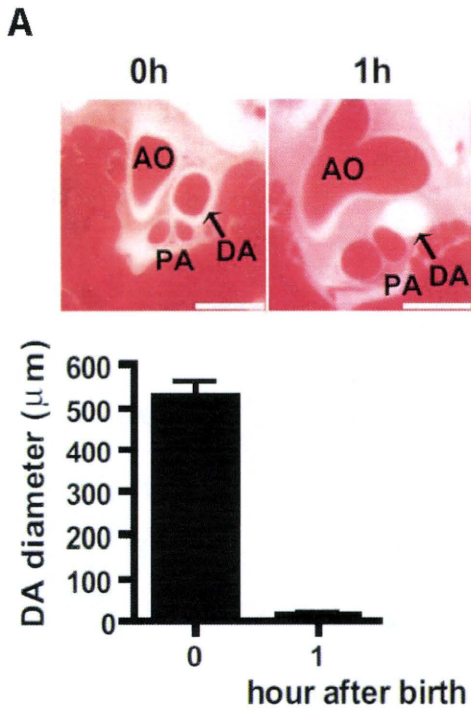












厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

細胞実験による検討を中心とした内臓錯位症候群に対する  
新規治療薬の開発に関する研究

研究分担者 押川 仁 横浜市立大学医学部循環器腎臓内科学 助教

研究要旨

内臓錯位症候群に合併する先天性心疾患では、しばしば生後動脈管を開存させておく必要がある。動脈管を拡張させる細胞内メカニズムは、プロスタグランジンE受容体EP4を介するシグナルが最も強力なものとして知られている。しかしながら、EP4シグナルは血管を拡張させる作用と、ヒアルロン酸を産生して血管内膜肥厚を誘導し血管を狭小化させる相反する作用を併せ持つため、理想的な血管拡張剤とはいえない。本研究では、アデニル酸シクラーゼサブタイプ別の血管内膜肥厚誘導作用の有無を検討し、石川らの開発した薬剤が、動脈管拡張作用を持つが、血管内膜肥厚作用を持たないことを明らかにした。

A. 研究目的

プロスタグランジンEは動脈管を開存させる作用を持つため、プロスタグランジンE製剤は大血管転位、肺動脈閉鎖を合併した複雑心奇形、大動脈離断といった動脈管依存性先天性心疾患の治療で広く使われている。プ

ロスタグランジンEは、プロスタグランジンE受容体のうち、動脈管に多く発現するEP4を介して環状アデノシンリン酸(cAMP)を増加させ、動脈管を拡張させる作用を持つ。先行研究で、PGE受容体EP4シグナルは動脈管の拡張だけではなく、ヒアルロ

ン酸の産生亢進による内膜肥厚形成にも関与していることが明らかになった。EP4 シグナルの下流で cAMP を産生する酵素であるアデニル酸シクラーゼ (AC)アイソフォームは 9 種類あり、その役割や発現部位に特異性がある。しかし、動脈管での AC アイソフォームの役割は明らかにされていない。そこで、内臓錯位症候群に伴う、動脈管依存性先天性心疾患に対する治療開発の基礎データとして、本研究では、各 AC アイソフォームの動脈管における血管拡張作用および、ヒアルロン酸産生と内膜肥厚形成への作用を検討することを目的とした。

## B. 研究方法

本研究室では、非特異的 AC 刺激薬であるフォルスコリンの新規誘導体である 200 以上合成し、その中から AC アイソフォーム特異的フォルスコリン誘導体を同定した。これにより、動脈管組織で発現している AC アイソフォームを、アイソフォーム別に評価することが可能になった。AC2 および AC6 刺激薬である FD1 および AC5 および

AC6 刺激薬である FD6 は、*in vivo* での血管張力の検討や内膜肥厚形成における AC アイソフォーム別の役割の検討に使用した。本研究では、AC アイソフォーム選択的刺激薬である FD1 および FD6、AC2、AC5、AC6 の過大発現をするアデノウイルス、AC2 または AC6 の発現抑制をする siRNA、AC5 および AC6 欠損マウスを用いて、動脈管の血管張力および血管内膜肥厚の制御における AC アイソフォームの動脈管における役割の検討および、AC アイソフォーム選択的刺激薬の薬剤への応用について検討した。

## (倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験は、横浜市立大学医学部倫理委員会の承認を得て行った。

## C. 研究結果

プロスタグランジン E 受容体 EP4 刺激を受けてアデニル酸シクラーゼが活性化するが、動脈管では、アデニル酸シクラーゼサブタイプのう



ち2型と6型が他の動脈に比べて有意に多く発現していた。動脈管では、6型アデニル酸シクラーゼの刺激により、血管拡張に関与する細胞内蛋白のリン酸化が認められ、ヒアルロン酸合成の亢進が認められた。2型と6型アデニル酸シクラーゼを同時に刺激すると、血管拡張に関与する細胞内蛋白のリン酸化が認められたが、ヒアルロン酸の合成亢進は認められなかった。

#### D. 考察

動脈管は胎生期に肺動脈と大動脈を結ぶバイパス血管であり、胎盤からの血液を体循環に送る役割を持つ<sup>1)</sup>。したがって、胎児の正常な発達のために、胎生期に動脈管は開存していることが必須であり、出生後は速やかに閉鎖する必要がある。動脈管の閉鎖過程では、次の2つの機序が関与している<sup>1)</sup>。① 血中の酸素濃度の上昇、② プロスタグランジンE (PGE)の濃度の低下、③ プロスタグランジンE<sub>2</sub>受容体の減少、④ 動脈管内の血圧低下によって血管収縮（機能的閉鎖）が生後の

肺呼吸の開始とともに直ちに起こる。さらに、出生前から、動脈管の構造変化である内膜肥厚が生じる。発達とともに PGE 刺激により平滑筋細胞からヒアルロン酸産生が分泌されることにより、血管平滑筋細胞が内皮側に遊走することで内膜肥厚を起し、血管内腔面が閉鎖し、血流が遮断され、最終的に動脈管は索状の線維性組織へと変化し、完全に閉鎖する（解剖学的閉鎖）。動脈管の収縮する速度には種差があり、小動物では速やかでラットでは生後1時間で閉鎖するが、ヒトでは約15時間かかる。また、ヒト動脈管の完全な閉鎖には2~3日を要する。閉鎖した動脈管は、はじめは低酸素症、あるいはプロスタグランジンEの注入などに反応して拡張するが、閉鎖して数日経つとその反応性がなくなる。それは次第に動脈管壁に線維化と変性が生じて、器質的な閉鎖となるためである。

動脈管の異常に基づく疾患には次のようなものがある。動脈管の収縮が不十分で、完全には閉鎖しない状態で内腔が残る動脈管開存症は、未熟児で

循環不全などを引き起こし、生命予後を左右するため直ちに閉鎖させる必要がある。在胎週数が少なく、出生体重が 1 kg 未満の低出生体重児ほど、動脈管の自然閉鎖率は低下する。一方、体または肺循環経路に高度狭窄や閉鎖を有する複雑心奇形患児は、肺血流または体血流を動脈管に依存している。肺血流が動脈管に依存している疾患群は生後 1~2 日で動脈管が収縮すると同時に高度のチアノーゼを生じる。また、体血流を動脈管に依存している疾患群では、新生児期に動脈管が収縮すると体血圧を維持できなくなる。つまり、動脈管依存性先天性心奇形児は生命を維持するための初期治療として、動脈管を開存させたままにして、必要な体または肺血流を補う必要がある。したがって、動脈管閉鎖の詳細な機序を理解することは、小児医療上、非常に重要である。

現在内臓錯位症候群に伴う、動脈管依存性先天性心疾患に用いられるプロスタグランディン E<sub>1</sub> の持つ動脈管拡張作用は短時間であり、長期にわたる使用で内膜肥厚を誘導する。また、

プロスタグランディン E<sub>1</sub> 製剤の使用による無呼吸発作などの副作用も問題となっている。したがって、内膜肥厚を起こさず、血管拡張効果のある長時間作用の薬剤の開発ができれば、プロスタグランディン E 治療の適応を有する患者にとって有益であると考えられる。

#### E. 結論

本研究では、2 型と 6 型アデニル酸シクラーゼに対して選択性のある薬剤を開発し、その薬剤が動脈管を効果的に開存させる効果があることを明らかにした。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Oshikawa J, Urao N, Kim HW, Kaplan N, Razvi M, McKinney RD, Poole LB, Fukai, T, Ushio-Fukai M: Extracellular SOD-Derived

- H2O2 Promotes VEGF Signaling in Caveolae/Lipid Rafts and Post-Ischemic Angiogenesis in Mice. *PLoS ONE* 5: e10189, 2010
2. Otsu K, Toya Y, Oshikawa J, Kurotani R, Yazawa T, Sato M, Yokoyama U, Umemura S, Minamisawa S, Okumura S, Ishikawa Y: Caveolin gene transfer improves glucose metabolism in diabetic mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 298: C450-C456, 2010
  3. Asino T, Sudhakar V, Urao N, Oshikawa J, Chen GF, Wang H, Finney L, Vogt S, McKinney RD, Maryon EB, Kaplan JH, Ushio-Fukai M, Fukai T: Unexpected role of the copper transporter ATP7A in PDGF-induced vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res* 107: 787-799, 2010.
  4. Urao N, Razvi M, Oshikawa J, McKinney RD, Chavda R, Bahou WF, Fukai T, Ushio-Fukai M: IQGAP1 is involved in post-ischemic neovascularization by regulating angiogenesis and macrophage infiltration. *Plos ONE* 5: e13440, 2010.
2. 学会発表
1. Caliceti C, Oshikawa J, Razvi M, Urao N, McKinney RD, Fukai T, Ushio-Fukai M: p66shc Mediates VEGF Receptor Signaling Linked to Production of ROS from Mitochondria and NO from AMPK-eNOS Involved in Endothelial Cell Migration and Proliferation. Scientific Sessions of American Heart Association 2010. Chicago, IL USA. 2010.11
  2. Varadarajan S, Urao N, Oshikawa J, McKinney RD, Ushio-Fukai M, Fukai T: Role of Extracellular Superoxide Dismutase,

Copper Transporter ATP7A and Caveolae/lipid rafts in Endothelial Dysfunction in Type I Diabetic Mice. Scientific Sessions of American Heart Association 2010. Chicago, IL USA. 2010.11

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

取得予定なし

##### 2. 実用新案登録

取得予定なし

##### 3. その他

関連研究

アデニル酸シクラーゼやホスホジエステラーゼを含め、多くのシグナル伝達分子が他の分子と相互作用を持ち、活性を調節されている。また、これらのシグナル伝達分子は細胞内で特異的な局在を持つことが知られている。こうした相互作用、細胞内局在に深く関与しているのが細胞膜ドメ

インの一つであるカベオラである。細胞膜にはカベオラ (caveolae) とよばれる 50~100nm 程度の陥凹構造がみられることは、1950 年代から電子顕微鏡による観察で認識はされていたものの、その生理学的な機能は長く明らかにされなかった。1990 年代に入り、カベオラの構成蛋白であるカベオリン (caveolin) の cDNA がクローニングされたことにより、カベオラにおけるシグナル伝達調節機能が次々に明らかにされてきた 1-3)。その調節機構の多くはカベオリンによるシグナル伝達抑制作用、つまり、あるシグナル伝達分子にカベオリンが直接結合して、その分子の酵素活性を抑制するというものである。一方、我々の研究により、インスリンシグナルにおいては例外的にカベオリンがシグナル促進作用を持つことが明らかにされた 4)。ここでは、インスリンシグナルにおけるカベオリンの調節機構について述べる。

##### 1. カベオリンのサブタイプ

現在までに、3つのサブタイプのカ