

に入れた。微温湯で色だし(流水 10 分間)をし、DDW に入れた。ワーギンソン液(ピクリン酸:1%酸性フクシン液=100:15 の割合、武藤化学)に室温で 3 分間浸け、核を染色した。染色後、水洗、脱水、透徹、封入操作を行った。弾性線維の定量は、BIOREVO HS オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-9000 (KEYENCE、大阪)を用いて、染色の輝度を計測定量した。

免疫染色

脱パラフィン処理をしたパラフィン切片を、内因性ペルオキシダーゼ活性をブロッキングするために 0.3% H₂O₂(和光純薬)/メタノールに 30 分間浸した。30 分後、PBS で 5 分間(3 回)洗浄し、抗原性賦活化のためクエン酸による加熱処理法を行った。クエン酸による加熱処理法は、Citrate Buffer(pH6.0)[0.1M クエン酸(和光純薬)水溶液 9ml、0.1M クエン酸ナトリウム(和光純薬)水溶液 41ml]に入れた切片を 75W で 10 分間加熱する方法

(電子レンジ)を指す。加熱後は室温で 30 分間放置し、溶液が冷えたところで、PBS で 5 分間(3 回)洗浄した。3%BSA/PBS で 30 分-1 時間ブロッキングした後、1 次抗体を添加し、24 時間、4°C でインキュベートした。本研究において 1 次抗体は、EP4 Receptor (C-term) Polyclonal Antibody(Cayman Chemical、アメリカ)、Lox(Lox, Lysyl Oxidase, MGC105122, Protein-Lysine 6-Oxidase)(US Bio Logical、アメリカ)を 3%BSA/PBS に混合して使用した。24 時間後、PBS で 5 分間(3 回)洗浄した。VECTASTAIN Elite ABC IgG kit (Vector Laboratories、アメリカ)の 2 次抗体を添加し、30 分間、室温でインキュベートした。30 分間後、PBS で 5 分間(3 回)洗浄した。VECTASTAIN Elite ABC IgG kit のアビジン-ビオチン複合体溶液を添加し、30 分間、室温(遮光)でインキュベートした。30 分間後、PBS で 5 分間(3 回)洗浄した。ENVISION

kit/HRP(DAB)(Dako、デンマーク)の DAB 溶液を反応させた後、水道水で洗浄し、反応を停止させた。その後マイヤーヘマトキシリン溶液(和光純薬)に室温で 3 分間浸け、核を染色した。染色後、水洗、脱水、透徹、封入操作を行った。

蛍光免疫染色

動脈管平滑筋初代培養細胞をカバーガラス(Thermo Fisher Scientific、神奈川)を敷いた 24well plate にプレATINGし、5-7 日間、37℃、5%CO₂-21%O₂ のインキュベーターで培養した。その後、1%FBS を含む DMEM 溶液に各々薬剤を混合して細胞に添加し、10 日間、37℃、5%CO₂-21%O₂ のインキュベーターで培養した。10 日後、動脈管平滑筋初代培養細胞を PBS で 2 回洗浄し、10% Bufferd Formalin で固定した。100mM Glycine(pH 7.4)で 5 分洗い、0.1% Triton X(SIGMA)で 10 分間浸透させた。その後、PBS/0.1% Tween で

2 回洗い、1%BSA/PBS/0.1% Tween で 20 分間ブロッキングした。ブロッキング後、1 次抗体を添加し、24 時間、4℃でインキュベートした。1 次抗体は α -エラスチン抗体(invitrogen)を 1:100 の濃度で 1%BSA/PBS/0.1% Tween に混合して使用した。24 時間後、PBS/0.1% Tween で 5 分間(3 回)洗浄し、2 次抗体を添加して、1 時間、室温(遮光)でインキュベートした。本研究において、2 次抗体は Alexa Fluor 594 rabbit anti-goat IgG(H+L)(invitrogen)を 1:250 の濃度で 1%BSA/PBS/0.1% Tween に混合して使用した。1 時間後、PBS/0.1% Tween で 5 分間(6 回)洗い、PBS に混合した Hoechst 33342 trihydrochloride trihydrate(invitrogen)を 1:200 の濃度で添加し、20 分間、室温(遮光)でインキュベートした。20 分後、PBS で 5 分間(2 回)、DDW で洗い、Prolong Gold antifade reagent(invitrogen)を用いて封入した。染色像は顕微鏡

ECLIPS TE2000-E (Nikon、東京)、NIS-Elements AR 3.1 で撮影した。

統計処理

実験により得られた値は平均値±標準誤差(mean±SEM)で示し、2群間の統計には Student T-test、多群間の統計には One-way ANOVA を用い、 $P<0.05$ を有意とした。

(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。アデノウイ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

マウス動脈管組織における弾性線維形成の検討

動脈管と大動脈組織における弾性線維形成を調べるため、胎生18.5日と生後0日のマウスの動脈管と大動脈の

組織切片のエラスチカ染色を行った。その結果、動脈管組織の弾性線維は、隣接する血管である大動脈や肺動脈と比べて低形成であった(図 1A)。エラスチカ染色した切片を用いて、弾性線維の輝度を定量すると、動脈管は大動脈と比べ、有意に弾性線維形成が低下していることが示された(図 1B)。

生後 0 日の野生型マウスと EP4 欠損マウスの動脈管組織のエラスチカ染色を行ったところ、EP4 欠損マウスの動脈管の弾性線維の形成は野生型マウスと比べて著明に亢進していた(図 2)。

EP4 刺激が弾性線維形成に及ぼす影響

(1)EP4 刺激は Lox の発現を低下させる

動脈管平滑筋初代培養細胞を用いて、PGE2-EP4 シグナルが Lox の発現に与える影響を検討するため、以下の実験を行った。動脈管および大動脈平滑筋初代培養細胞を PGE2(1 μ M)、EP4

刺激剤(1 μ M)、EP1/3 刺激剤(1 μ M)、EP2 刺激剤(1 μ M)で刺激し、回収した細胞のタンパクを用いて Lox のウエスタンブロッティングを行った。その結果、動脈管平滑筋初代培養細胞を PGE2 および EP4 刺激剤で刺激した細胞では、Lox タンパクの発現が有意に低下することが示された。しかしその他の EP サブタイプ(EP1/3, EP2)の刺激では Lox の発現が低下しなかった(図 3A-B)。

一方、EP4 の発現が少ない大動脈平滑筋初代培養細胞では PGE2 および EP4 刺激剤で Lox の発現は低下しなかった(図 3 A-B)。これらのことから、PGE2 の 4 つある受容体の中でも、EP4 刺激だけが Lox の発現を低下させることが示唆された。

(2)EP4 刺激は弾性線維の形成を低下させる

in vitro において EP4 が弾性線維の形成に与える影響を検討するため、動脈管平滑筋初代培養細胞を用いて以下

の実験を行った。動脈管平滑筋初代培養細胞を PGE₂、EP4 刺激剤、EP1/3 刺激剤、EP2 刺激剤、Lox 阻害剤 (500 μ M) で刺激して 10 日培養した。10 日間培養液は交換せず、10 倍濃度の薬剤を 3 日毎に添加した。10 日後、培養した細胞のエラスチン蛍光免疫染色を行った。その結果、コントロールでは弾性線維の形成が認められるが、EP4 刺激では *in vitro* での弾性線維形成が抑制することが示された(図 4A)。

また、EP4 刺激による弾性線維の形成を低下させているのが Lox の発現低下によるものかどうかを検討するため、以下の実験を行った。動脈管平滑筋初代培養細胞に Lox のアデノウイルス(10MOI)を用いて Lox を過大発現した上で、EP4 刺激を行い、10 日培養した細胞でエラスチン蛍光免疫染色を行った。その結果、Lox を過大発現した細胞では EP4 刺激をしても弾性線維形成の抑制が認められなかった(図 4B)。これらのことから、EP4

刺激が Lox の発現を低下させることで、弾性線維の形成が低下することが示唆された。

EP4 刺激が Lox の発現を低下させる細胞内シグナルの検討

(1)EP4 刺激は G β γ 、PLC、PKC を介して Lox の発現を低下させる
EP4 刺激が Lox を低下させる細胞内メカニズムを検討するため、以下の実験を行った。動脈管平滑筋初代培養細胞を EP4 刺激剤と非選択的 cAMP アナログである BrcAMP(50 μ M)、PKA の阻害剤である PKA inhibitor(10 μ M)、G β γ の阻害剤である gallein(10 μ M)、PLC の阻害剤である U73122(10 μ M)、PKC の阻害剤である bis(1 μ M)で刺激し、回収した細胞のタンパクを用いて Lox のウエスタンブロッティングを行った。その結果、BrcAMP で刺激した細胞のタンパクでは Lox の発現低下は認められず、EP4 刺激剤と PKA inhibitor を同時投与した細胞のタンパクでは Lox の発

現低下が認められた(図 5A-B)。これら
のことから、cAMP や PKA を介する
シグナル伝達は EP4 刺激が Lox を低
下させる経路に関与していないこと
が示された。一方、EP4 刺激剤と
gallein を同時投与すると、EP4 刺激
による Lox の発現低下が認められな
かった(図 5A-B)。同様に、EP4 刺激
剤と U73122 の同時投与、または EP4
刺激剤と bis の同時投与を行うと、
EP4 刺激による Lox の発現低下が認
められなかった(図 5C-E)。さらに、
PKC の活性剤である PMA(1 μ M)で刺
激した細胞のタンパクでは Lox の発
現低下が認められた(図 5D-E)。これら
のことから、EP4 刺激による Lox の
発現低下はよく知られている cAMP
の経路ではなく、G β γ 、PLC、PKC
を介していることが示唆された。

(2)EP4 刺激による Lox の発現低下は
ERK のリン酸化の抑制に寄与してい
る
G β γ 、PLC、PKC のさらに下流の

シグナルを検討するために、EP4 刺激
をしたタンパクで ERK のリン酸化を
調べた。その結果、EP4 刺激が ERK
のリン酸化を有意に抑制することが
認められた(図 6A-C)。EP4 刺激が
ERK のリン酸化の抑制を介して Lox
を低下しているのかを検討するため、
以下の実験を行った。動脈管平滑筋初
代培養細胞を ERK の阻害剤である
U0126(20 μ M)で刺激し、回収した細
胞のタンパクを用いて Lox のウエス
タンブロットングを行った。その結
果、U0126 で刺激した細胞のタンパ
クでは、EP4 刺激と同様に Lox の発
現低下が認められた(図 6A-C)。

また、アデノウイルスを用いて ERK
の上流にある MEK1 を過大発現した
動脈管平滑筋初代培養細胞のタンパ
クを用いて Lox のウエスタンブロッ
ティングを行った。その結果、MEK1
を過大発現したタンパクでは、ERK
のリン酸化が抑制されず、Lox の発現
増加が認められた(図 6D-F)。これら
のことから、EP4 刺激による Lox の発

現低下は ERK のリン酸化の抑制によることが示唆された。

EP4 刺激が Lox を合成の段階で抑制しているのかの検討

EP4 刺激が Lox を合成の段階で抑制しているのかを検討するため、以下の実験を行った。Lox は細胞内で約 50kDa の pro-pre-Lox として合成される。その後、シグナル・ペプチド加水分解、酵素のグリコシル化、銅イオンの取りこみ、LTP(リジンチロシルクイオン)生成を経て、Lox propeptide となる。その後、BMP-1 によって切断され、活性化型の Lox と pro-Lox が形成される。そこで、動脈管平滑筋初代培養細胞を EP4 刺激剤で刺激し、回収した細胞のタンパクを用いて pre-pro-Lox、Lox propeptide のウエスタンブロッティングを行った。その結果、EP4 刺激による pre-pro-Lox、Lox propeptide の発現低下は認められなかった(図 7A-C)。Lox の前駆体である pre-pro-Lox や Lox propeptide

の発現は EP4 刺激によって変化がなかったことから、EP4 刺激は Lox の合成段階を抑制していないことが示唆された。

EP4 刺激が Lox の分解促進に寄与しているのかの検討

EP4 刺激が Lox の分解を亢進するかを検討するため、以下の実験を行った。動脈管平滑筋初代培養細胞を EP4 刺激剤とライソゾームの阻害剤である NH₄Cl(20mM)で刺激し、回収した細胞のタンパクを用いて Lox のウエスタンブロッティングを行った。その結果、EP4 刺激剤と NH₄Cl を同時投与すると、EP4 刺激による Lox の発現低下が抑制されなかった(図 8A-B)。この結果から、EP4 刺激が Lox をライソゾームで分解することで、Lox の発現を低下させることが示唆された。

ヒト動脈管における弾性線維形成の検討および EP4 と Lox の発現検討

ヒトの動脈管組織の弾性線維と EP4

の発現を検討するため、ヒトの動脈管組織のエラスチカ染色と EP4 と Lox の免疫染色を行った。その結果、ヒトの動脈管の弾性線維は隣接する血管である大動脈と比べて低形成であった。動脈管では EP4 が高発現しており、Lox が低発現であった(図 9)。これらの結果から、ヒトでも PGE2 は EP4 受容体を介して Lox の発現を低下させ、弾性線維の形成を抑制することが示唆された。

以上の結果から、PGE2 は EP4 受容体を介して Lox の発現を低下させ、弾性線維の形成を抑制することが明らかになった。この Lox の発現低下には $G\beta\gamma$ 、PLC、PKC、ERK が関与していることが示された。EP4 刺激から $G\beta\gamma$ 、PLC、PKC、ERK というシグナルが伝達することで、Lox が分解され、Lox の発現が低下すると考えられた。

D. 考察

今回の研究結果から、PGE2はEP4受容体を介してLoxの発現を低下させ、血管の弾性線維の形成を抑制することが明らかになった。EP4刺激が $G\beta\gamma$ 、PLC、PKC、ERKを介してシグナルが伝達することで、Loxを分解し、発現を低下させることも明らかになった。つまり、PGE2ホルモンが血管の弾性線維形成を負に制御していることが示唆された。

今までEP4シグナルはGsタンパク質に共役し、アデニル酸シクラーゼを活性化しcAMPの産生が亢進することでシグナルが伝達すると報告されている。またcAMP以外の経路では、EP4受容体からPI3キナーゼを介してシグナルが伝達するという報告もなされている。しかし本研究の結果から、EP4刺激によるLoxの発現低下にはGs-cAMPシグナルまたPI3キナーゼシグナルは関与しておらず、 $G\beta\gamma$ を介しているという結果が新しく得られた。 $G\beta\gamma$ は不活性状態ではGDPと結合

したG α と会合して三量体Gタンパク質($\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$ サブユニット)として存在している。Gタンパク質共役レセプターが刺激剤と結合して活性化すると、G α からGDPが解離してGTPが結合する。G α にGTPが結合すると、G $\beta \gamma$ はG α から解離して、下流にシグナルが伝達すると言われている。そのことから、PGE₂はEP4受容体を介してG $\beta \gamma$ を活性化することでLoxの発現を低下させると考えられる。

また今回の研究から、EP4刺激がLoxの発現を低下させるためには、PLC、PKC、ERKを介したシグナル伝達が重要であると示唆された。

今までホルモンレベルで弾性線維形成の制御がなされるという報告はなく、PGE₂ホルモンが弾性線維形成を低下させるという今回の研究結果は、新たな弾性線維の形成のメカニズムを示したものと見える。また、ヒトのサンプルでもマウス、ラットの実験で得られた結果を確認することが出来たことも重要な所見である。

また本研究を通して、LoxがEP4刺激により分解される可能性が示唆された。Loxの生合成については以下のことが知られている。Loxは細胞内で約50kDaのpro-pre-Loxとして合成され、その後、シグナル・ペプチド加水分解、酵素のグリコシル化、銅イオンの取りこみ、LTP(リジンチロシルクイオン)生成を経て、Lox propeptideとなる。その後、BMP-1によって切断され、活性化型のLoxとpro-Loxが形成される⁷⁾。しかしLoxの分解のメカニズムはほとんど解明されていなかった。今回の研究結果は、Loxの分解にPGE₂-EP4シグナルが関与しているという、新たなLoxの分解メカニズムを示したものと見える。

一般的にタンパク質の分解には、以下のことが関与している。①タンパク質分解酵素(プロテアーゼ)による分解、②オートファジー-ライソゾーム系の分解、③エンドソーム-ライソゾーム系の分解、④ユビキチン-プロテアソ

ーム系の分解である。我々の結果からは、Loxはライソゾームで分解されると考えられるが、オートファジーのマーカーであるLC3BやBeclin-1の抗体を用いたウエスタンブロッティングでは、EP4刺激によるオートファジー陽性は認められなかった。そのことから、EP4刺激によるLoxの分解にはオートファジーは関与していないのではないかと考えられる。また今回の結果に示さなかったが、プロテアソームの阻害剤であるMG132とEP4刺激剤を同時投与した細胞のタンパクにおいてLoxの発現を確認したところ、Loxの発現増加が認められなかったことから、ユビキチン-プロテアソーム系の分解も関与していないと考えられる。ライソゾームによるLoxの分解機序の更なる解明は今後の課題であると考えている。

E. 結論

今回の研究結果から、PGE2-EP4シグ

ナルはGβγを活性化し、PLC、PKC、ERKを介してLoxを分解し、その結果、弾性線維の架橋結合が阻害され、弾性線維の形成が低下することが示唆され、ホルモンによる血管弾性線維の制御を新たに示すことができた。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yokota T, Aida T, Ichikawa Y, Fujita T, Yokoyama U, Minamisawa S. Low-dose Thromboxane A2 Receptor Stimulation Promotes Closure of the Rat Ductus Arteriosus with Minimal Adverse Effects. *Pediatr Res*, in press, 2012.

2. Yokoyama U*, Ishiwata R, Jin MH, Kato Y, Suzuki O, Jin H, Ichikawa Y, Kumagaya S,

- Katayama Y, Fujita T, Okumura S, Sato M, Sugimoto Y, Aoki H, Suzuki S, Masuda M, Minamisawa S, Ishikawa Y. Inhibition of EP4 signaling Attenuates Aortic Aneurysm Formation. PLoS ONE, 7(5):e36724, 2012.
- *corresponding author
3. Fukumura H, Sato M, Kezuka K, Sato I, Feng X, Okumura S, Fujita T, Yokoyama U, Eguchi H, Ishikawa Y, Saito T. Effect of ascorbic acid on reactive oxygen species production in chemotherapy and hyperthermia in prostate cancer cells. J Physiol Sci. 62(3):251-257, 2012.
 4. Insel PA, Murray F, Yokoyama U, Romano S, Yun H, Brown L, Snead A, Lu D, Aroonsakool N. Cyclic AMP and Epac in the regulation of tissue fibrosis. Br J Pharmacol. 166(2):447-456, 2012.
 5. 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. 23 (1-4): 63-79, 2012.
2. 学会発表
1. Shiraishi R, Yokota T, Yokoyama U, Minamisawa S. Stimulation of thromboxane A2 receptor induced the remodeling of rat ductus arteriosus. The 89th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2012.3.29-31, Matsumoto)

2. Kumagaya S, Yokoyama U, Iwai K, Nishihara H, Ishikawa Y, Minamisawa S. Prostaglandin E2-EP4 signaling may play a role in intimal thickening that precedes atherosclerosis. The 89th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2012.3.29-31, Matsumoto)
3. Ishiwata R, Yokoyama U, Kadowaki K, Matsusaki M, Akashi M, Ishikawa Y, Minamisawa S. 3D cellular multi-layers of rat smooth muscle cells has a potential as a novel ex vivo vascular model. The 89th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2012.3.29-31, Matsumoto)
4. Jin MH, Yokoyama U, Ishiwata R, Minamisawa S, Ishikawa Y. Oxygenation-induced postnatal remodeling of the ductus arteriosus. The 89th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2012.3.29-31, Matsumoto)
5. Ichikawa Y, Yokoyama U, Ishikawa Y. Inhibition of Phosphodiesterase Type 3 Milrinone Dilate the Ductus Arteriosus without Forming Intimal Thickening The 89th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2012.3.29-31, Matsumoto)
6. Yokoyama U, Jin MH, Kato Y, Ishiwata R, Suzuki S, Masuda M, Asou T, Aoki H, Sugimoto Y, Nakamura T, Minamisawa S, Ishikawa Y. Inhibition of EP4 Signaling Attenuates Mouse Aortic Aneurysm Formation. The

- 76rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (2012.3.16-18, Fukuoka)
7. 石渡 遼, 横山 詩子, 熊谷 駿, 金 美花, 加藤 優子, 鈴木 伸一, 益田 宗孝, 青木 浩樹, 杉本 幸彦, 南沢 享, 石川 義弘 「EP4シグナル抑制による大動脈瘤治療」新学術領域研究「脂質マシナリー」若手ワークショップ (2012.2.2, 東京)
8. 青木理加、横山詩子、市川泰広、南沢享、石川義弘「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」心血管イオンチャネル・トランスポーター研究の新展開 --基礎研究と臨床研究の融合-- (生理学研究所研究会) (2011.11.29-30, 岡崎)
9. 青木理加、横山詩子、岩崎志穂、関 和男、西巻滋、横田俊平、石川義弘「動脈管収縮における出生後の血清浸透圧低下の役割」第56回日本未熟児新生児学会学術集会 (2011.11.13-15, 東京)
10. 横田知大、劉孟佳、前川峻、加藤尚志、横山詩子、南沢享 「動脈管内皮細胞の遺伝子プロファイリング」第10回心臓血管発生研究会 (2011.10.7-8, 郡山)
11. 金美花、横山詩子、石渡遼、南沢享、石川義弘 「酸素による動脈管リモデリング」第10回心臓血管発生研究会 (2011.10.7-8, 郡山)
12. Minamisawa S, Yokoyama U. Prostaglandin EP4 Signaling Plays a Critical Role in Vascular Elastic Fiber Disruption in the Ductus Arteriosus. The 7th Federation of Asian and

- Oceanian Physiological Societies
(2011.9.11-14 Taipei)
13. Yokoyama U, Kato Y, Suzuki S, Masuda M, Asou T, Aoki H, Sugimoto Y, Nakamura T, Minamisawa S, Ishikawa Y. Prostaglandin EP4 Signaling Negatively Regulates Vascular Elastic Fiber Assembly. The 2nd Molecular Cardiovascular Conference II (2011.9.2-4, Hokkaido)
14. 加藤 優子、横山 詩子、奥村 敏、南沢 享、佐田 政隆、宮島 栄治、石川 義弘「Epac1は血管障害時の内膜肥厚形成を促進する」 第53回日本平滑筋学会 (2011.8.3-4, 東京)
15. Yokota T, Aida T, Yokoyama U, Minamisawa S. Selective Vasoconstriction of the Ductus Arteriosus in the Rat by Stimulation of Thromboxane A2 Receptor. Basic Cardiovascular Science 2011 Scientific sessions (2011.7.18-21, New Orleans)
16. Ishiwata R, Yokoyama U, Kadowaki K, Matsusaki M, Akashi M, Ishikawa Y, Minamisawa S. Three dimensional cellular multi-layer technology utilized evaluation of elastic fiber formation and phenotype of rat vascular smooth muscle cells. The 7th Japan-China-Korea Pediatric Heat Forum (2011.7.8, Fukuoka)
17. 市川泰広、青木理加、横山詩子、岩本眞理、南沢享、石川義弘 「出生後の血清浸透圧低下は動脈管収縮を促進させる」 第47回日本小児循環器学会総会・学術集会 (2011.7.6-8, 福岡)

18. Yokota T, Aida T, Yokoyama U, Minamisawa S. Thromboxane A2 receptor stimulation induces closure of the rat ductus arteriosus. The 114th Annual Meeting of the Japan Pediatric Society (2011.4.15-17, Tokyo)
19. Yokoyama U, Shioda A, Ishiwata R, Suzuki S, Masuda M, Asou T, Aoki H, Sugimoto Y, Nakamura T, Minamisawa S, Ishikawa Y. Molecular mechanism of the regulation of vascular elastic fiber formation. The 89th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2012.3.29-31, Matsumoto) (symposiast)
20. 横山詩子. 「動脈管の閉鎖機序と新生児循環管理」第9回日本周産期循環管理研究会 (2011.11.26, 仙台)(招請講演)
21. 横山詩子. 「動脈管の閉鎖、開存の分子メカニズムと治療開発」横浜市立大学医学部小児科同門会 (2011.11.10, 横浜) (招請講演)
22. 横山詩子. 「胎生期から始まる血管リモデリングの分子機序」第9回腫瘍病理学分野・探索病理学講座セミナー (2011.9.1, 札幌) (招請講演)
23. 横山詩子. 「臨床から基礎医学研究へ—豊かな感受性を持とう」基礎研究者育成プロジェクト 第1回リトリート (2011.8.19-20, 東京) (招請講演)
24. 横山詩子. 「動脈管を制御する分子メカニズム」第1回 新生児循環基礎・臨床コラボレーションカンファレンス in YOKOHAMA (2011.6.22, 横浜) (招請講演)

25. 横山詩子. 「動脈管を制御する分子
メカニズム」 第8回RSV Japan
Global Expert Meeting
(2011.6.18, 東京) (招請講演)

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

図 1.

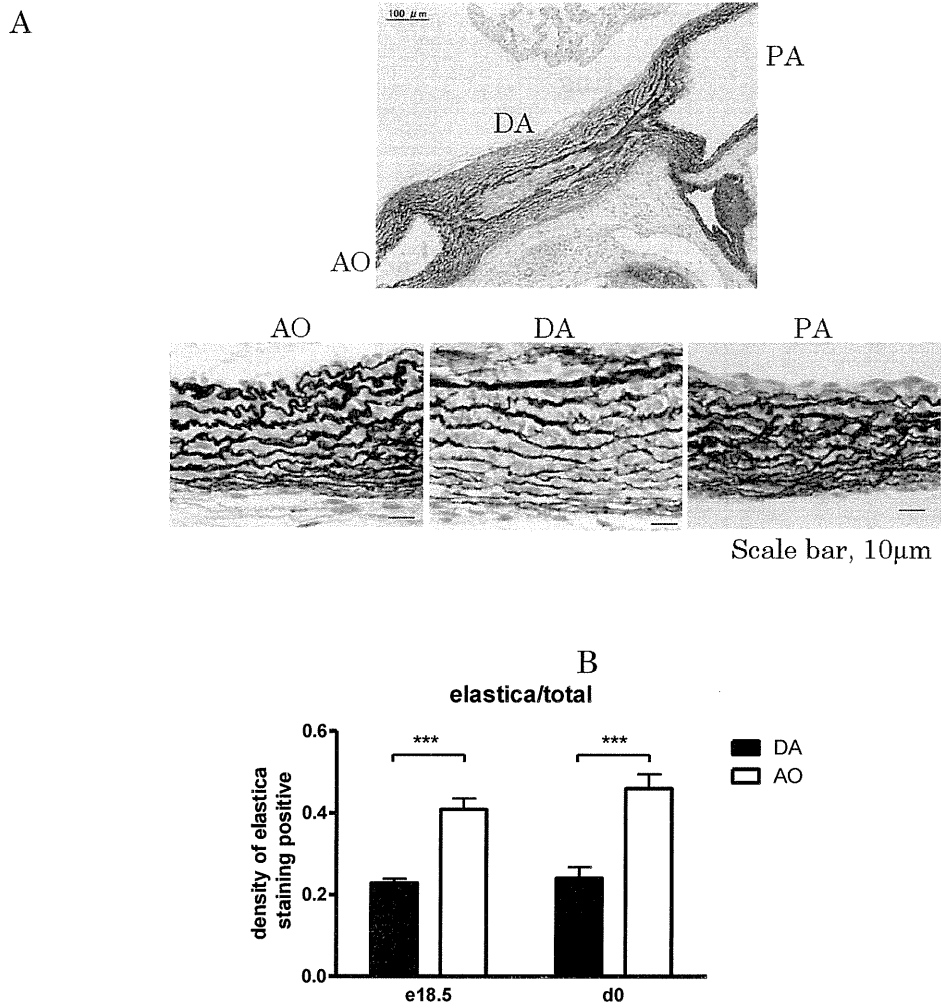


図 1. 胎生 18.5 日のマウス組織のエラスチカ染色。

(A)エラスチカ染色。(B)動脈管と大動脈の弾性線維の定量。n=6. *** $P < 0.001$.

AO:大動脈、DA:動脈管、PA:肺動脈、e18.5:胎生 18.5 日、d0:生後 0 日。

図 2.

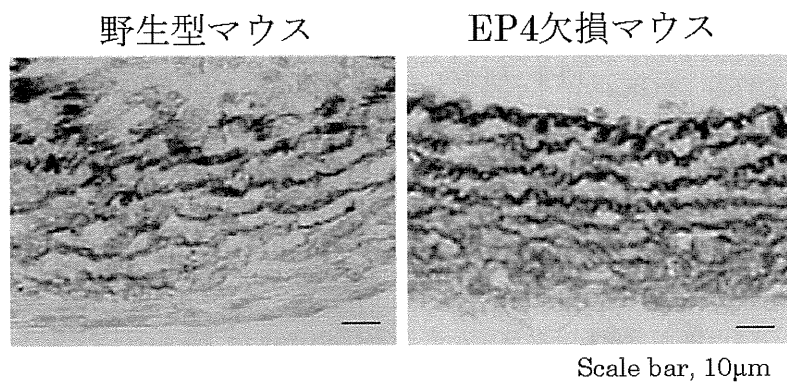


図 2. 生後 0 日の EP4 欠損マウスと野生型マウス動脈管のエラスチカ染色。

図 3.

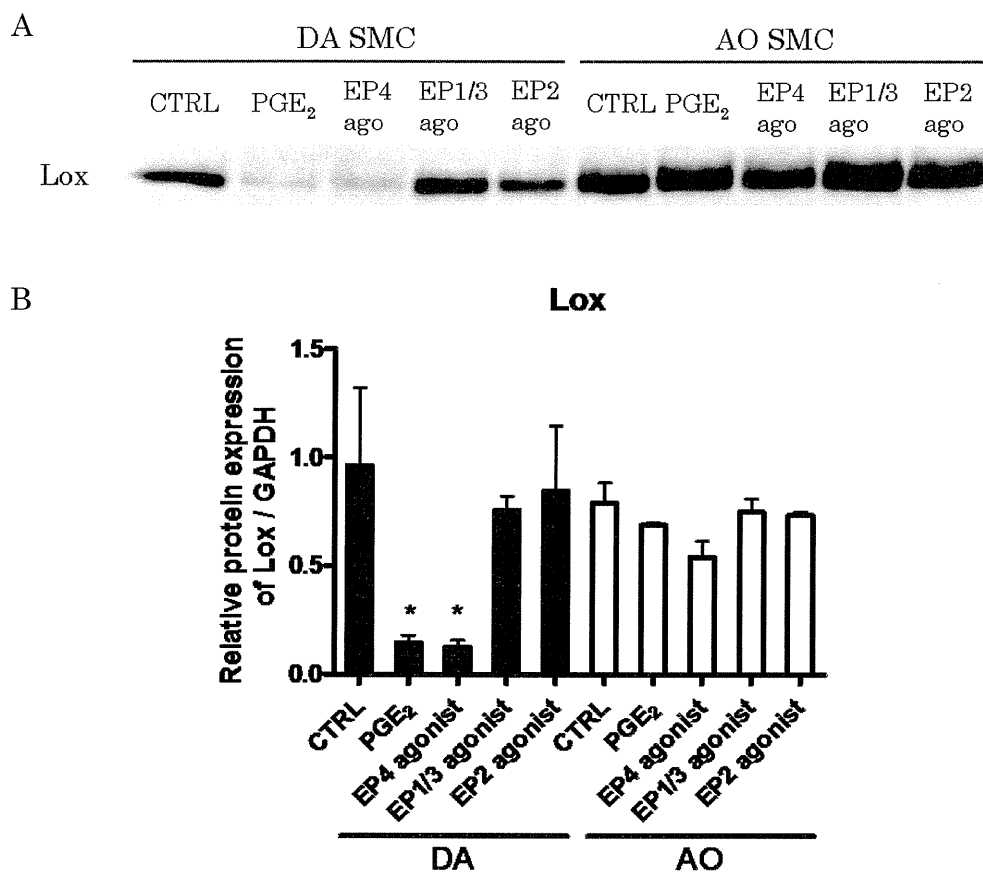


図 3. PGE₂-EP4 シグナルにおける Lox の発現の検討。

(A)動脈管および大動脈平滑筋初代培養細胞を PGE₂、EP4 刺激剤、EP1/3 刺激剤、EP2 刺激剤で刺激した細胞のタンパクを用いて、Lox の抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。(B)A のウエスタンブロットの定量解析。n=4. * $P < 0.05$ vs CTRL, respectively. DA SMC:動脈管平滑筋初代培養細胞、AO SMC:大動脈平滑筋初代培養細胞、ago:アゴニスト (agonist)、CTRL:コントロール。

図 4.

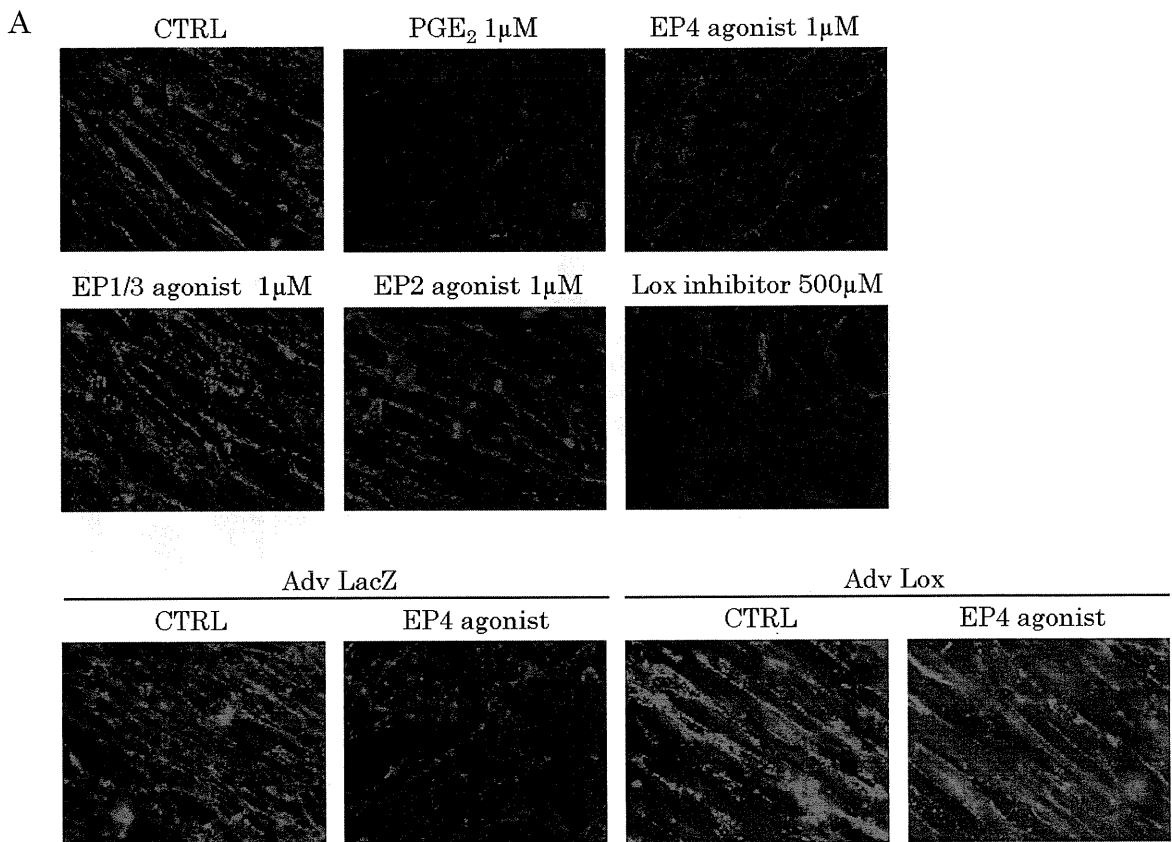


図 4. EP4 刺激が弾性線維の形成に与える影響の検討。

(A)動脈管平滑筋初代培養細胞を PGE₂、EP4 刺激剤、EP1/3 刺激剤、EP2 刺激剤、Lox 阻害剤で刺激して 10 日培養した細胞のエラスチン蛍光免疫染色。

(B)動脈管平滑筋初代培養細胞にアデノウイルスを用いて LacZ と Lox を過大発現した上で、EP4 刺激を行い、10 日培養した細胞のエラスチン蛍光免疫染色。

CTRL:コントロール、Adv.LacZ:LacZ アデノウイルス、Adv.MEK1:MEK1 アデノウイルス。