

Eagle Medium:DMEM (SIGMA)を使用した。培養液を 2-3 日毎に交換し、90%の細胞密度になった時点で継代を行い、本研究では 4 から 6 継代目の平滑筋細胞を使用した。

### total RNA 抽出

氷上において動脈管組織、培養平滑筋細胞を PBS で 1-2 回洗浄後、TRIzol® (Invitrogen)を加えてセルス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、転倒混合後、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、混合後 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  $\mu$ 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  $\mu$ l の反応液 [5X PrimeScript Buffer 4  $\mu$ l、PrimeScript RT Enzyme Mix I 1  $\mu$ l、50  $\mu$ l Oligo dT Primer 1  $\mu$ l、100  $\mu$ l Random 6 mers 1  $\mu$ l、total RNA 1  $\mu$ g 相当量を RNase Free dH<sub>2</sub>O 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  $\mu$ l、5  $\mu$ 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 μl、10 μM AC2 Forward: 5'-gctcccctggcgaaactg-3' (NIPPON EGT) 1 μl、10 μM AC2 Reverse: 5'-ttaattctcatgcattcattctcctt-3' (NIPPON EGT) 1 μl、cDNA 15 ng/6 μl、DDW を合わせて 20 μl 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 μl、10 μM 各 Forward または Reverse プライマー各 1 μl、cDNA 15 ng/6 μl、DDW を合わせて 20 μl 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'-acaccagcagcagagg

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'-ggtcattctcatccctctcaca-3'、 Reverse: 5'-caatgctcgtccatcag-3' で 163 bp、AC5 (NM\_022600) プライマーは Forward: 5'-tgtccttggcctcagaaagt-3'、 Reverse: 5'-tccccgttcaggtagttgag-3' で 132 bp、AC6 (L01115) プライマーは Forward: 5'-caaaggaagggacgccgagagg-3'、 Reverse: 5'-tggggacagatcacgggactagggga-3' で 419 bp、AC7 (XM\_226333) プライマーは Forward: 5'-gctgctgctgaagcccaagtt-3'、 Reverse: 5'-aatcactccagacatcacagg-3' で 256 bp、AC8 (NM\_017142) プライマーは Forward: 5'-ttcaacttgagccta gcctcg-3'、 Reverse: 5'-ggatgtagatgcggtggaac-3' で 627 bp、AC9 (NM\_0011069 80) プライマ

一 は Forward: 5'-gacggctctgtgtggcatc-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'-gcagggatgatgttctctgggctgcc-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 を使い、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ーティングした[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  $\mu$ l、(b)では各 200  $\mu$ l を、細胞をプレーティングした 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%CO<sub>2</sub>-21%O<sub>2</sub>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 μM PGE<sub>1</sub>を抗生剤なしのDMEMに混合して48時間、37°C、5%CO<sub>2</sub>-21%O<sub>2</sub>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。

### アデノウイルスによるACの過大発現

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。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%CO<sub>2</sub>-21%O<sub>2</sub>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。

PGE<sub>1</sub>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%CO<sub>2</sub>-21%O<sub>2</sub>のインキュベーターで培養した。24時間後、1 μM PGE<sub>1</sub>の0.5%FBSを含むDMEM 1

ml にメディウム交換を行い、更に 48 時間、37°C、5%CO<sub>2</sub>-21%O<sub>2</sub> 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、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

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%CO<sub>2</sub>-21%O<sub>2</sub> で培養した。また薬剤の刺激は培養液のみ

(CTRL)、10<sup>-5.5</sup> M FD1、10<sup>-5</sup> 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%CO<sub>2</sub>-21%O<sub>2</sub> 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。

### 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。

### 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

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  $\mu$ 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PGE<sub>1</sub> (100 ng/g body weight)、FD1 (10.8  $\mu$ g/g body weight)、FD6 (1.29  $\mu$ g/g body weight)を200  $\mu$ 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）で冷却した滑走式マイクローム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。

#### タンパク回収とタンパク定量(ブラッドフォード法)

氷上において動脈管平滑筋初代培

養細胞を PBS で 3 回洗浄後、Carbonate Buffer[150mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(和光純薬)、1mM EDTA(SIGMA)]を加えてセルスクレーパーで回収し、1.5ml チューブに移した。

回収したタンパクはブラッドフォード法によって定量した。色素として Bio-Rad Protein Assay(Bio-Rad Laboratories Inc.、アメリカ)を用いた。

#### ウエスタンブロッティング用サンプル調製

タンパク定量したサンプル、4× SDS サンプルバッファー [0.125M Tris (SIGMA)-HCl(和光純薬) (pH6.8)、4% SDS(和光純薬)、10% Glycerol(和光純薬)、0.01% BPB(和光純薬)]、2-Mercaptoethanol(和光純薬)を 6.5:2.5:1.0 の割合で混合し、100℃で 5 分間加熱した。

#### ウエスタンブロッティング

ウエスタンブロッティングに用いるアクリルアミドゲル(2 枚分)の組成

は以下の通りである。10%分離ゲルは 4×Gel Buffer(pH8.8) [0.375M Tris、0.1% SDS] 4ml、30% アクリルアミド(和光純薬) 5.33ml、DDW 6.67ml、10%APS 160μl、TEMED(和光純薬) 8μl から成る。濃縮ゲルは 4×Gel Buffer(pH6.8) [0.125M Tris、0.1% SDS] 1.68ml、30% アクリルアミド 1ml、DDW 4.26ml、10%APS 75μl、TEMED 7.5μl から成る。10%分離ゲルをガラス板に流し込んで固めた後に、濃縮ゲルを流し込んでコームを挿し、アクリルアミドゲルを作製した。

アクリルアミドゲルを泳動槽 Novex Mini-Cell(invitrogen、アメリカ)にセットして 1× Loading Buffer[0.25M Tris、1.92M Glycine(和光純薬)、1% SDS]を入れた。泳動槽を氷で冷やししながら、サンプルをアプライし、200V、80mA(1 枚なら 40mA)、25W、60 分の条件でランニングを行った。ランニング後、ゲルに展開したタンパクをメンブレンに転写するため、ガラス板からはがしたアクリルアミドゲルをスポンジとろ紙の上に乗



せた。その上にメンブレンを乗せ、ろ紙とスポンジではさんだものを泳動槽にセットした。1× Transfer Buffer[0.1M Tris、0.192M Glycine、20%メタノール(和光純薬)]を入れ、60V、200mA、17W、60 分の条件でトランスファーを行った。トランスファー後、3% BSA(SIGMA)/TBS/0.1%Tween(SIGMA)を入れ、1時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、一次抗体をかけ4°Cでインキュベートした。本研究において一次抗体は、Rabbit Polyclonal to Lox(abcam、イギリス)、Lox propeptide Antibody (Novus Biologicals, Inc.、アメリカ)、Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)(Thr202/Tyr204) Antibody(cell signaling、アメリカ)、GAPDH(Santa Cruz Biotechnology、アメリカ)を用いた。一次抗体をインキュベートしたメンブレンをTBS/0.1%Tween で洗った後、二次抗体を1:5000の割合になるように混合し、メンブレンに1時間、室温でイン

キュベートした。1時間後洗浄し、LAS-3000 mini(FUJIFILM、東京)にて現像した。現像液には Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection System(GE Healthcare、アメリカ)、または Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents(GE Healthcare)を用いた。

### アデノウイルスによるLox過大発現

Loxを組み込んだアデノウイルスは久留米大学の青木浩之教授より譲渡して頂いた。MEK1を組み込んだアデノウイルスはカリフォルニア大学ロサンゼルス校の Yi-Bin 教授より譲渡して頂いた。

Lox、MEK1 アデノウイルスの過大発現の確認は以下の手順に沿って行った。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6cm dish にプレーティングした。1dishあたり、10%FBSを含むDMEM溶液4mlに80万個の細胞数になるようにプレー

ティングした。トランスフェクション当日、計算したウイルス量(1MOI、5MOI、10MOI、100MOI)の Adv.LoX、Adv.MEK1 を細胞に添加し、48 時間、37°C、5%CO<sub>2</sub>-21%O<sub>2</sub> 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、氷上にて PBS で 3 回洗浄後、Carbonate Buffer を加えて細胞をセルスクレーパーで回収し、1.5ml チューブに移した。サンプル調製後、Lox と MEK1 のウエスタンブロットティングにより、発現解析を行った。Adv.LacZ コントロールと比較することで Lox および MEK1 の過大発現を確認した。

Lox 過大発現下での弾性線維の形成を検討するために、以下の実験を行った。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 24well plate にプレATINGした。1well あたり、10%FBS を含む DMEM 溶液 1ml に 10 万個の細胞数になるようにプレATINGした。トランスフェクション当日に 10MOI の Adv.LoX を細胞に添加し、10 日間、37°C、5%CO<sub>2</sub>-21%O<sub>2</sub>

のインキュベーターで培養した。培養してから 5 日目に再びトランスフェクションを行った。10 日後、エラスチンの細胞免疫染色を行った。

MEK1 の過大発現下での Lox の発現を検討するため、以下の実験を行った。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 6cm dish にプレATINGした。1dish あたり、10%FBS を含む DMEM 溶液 4ml に 80 万個の細胞数になるようにプレATINGした。トランスフェクション当日、30MOI の Adv.MEK1 を細胞に添加し、2 日間、37°C、5%CO<sub>2</sub>-21%O<sub>2</sub> のインキュベーターで培養した。2 日後、DMEM 溶液にメEDIUM交換を行い、さらに 24 時間、37°C、5%CO<sub>2</sub>-21%O<sub>2</sub> のインキュベーターで培養した。24 時間後、氷上において PBS で 3 回洗浄し、Carbonate Buffer を加えてセルスクレーパーで回収した。サンプルを調製した後、Lox のウエスタンブロットティングを行った。

## エラスチカ染色

パラフィンを取り除いたパラフィン切片を 1%塩酸 70%エタノールに 2 分間馴染ませた。その後、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 時間浸し、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。その後ワイゲルト鉄ヘマトキシリン液(武藤化学)に室温で 3 分間浸け、筋線維、細胞質、赤血球を染色した。染色後、水道水ですすぎ、0.5%塩酸水で軽く分別し、DDW 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クするために 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(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 時間ブロックした後、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)洗淨した。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)洗淨した。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)洗淨した。ENVISION kit/HRP(DAB)(Dako、デンマーク)の DAB 溶液を反応させた後、水道水で洗淨し、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 にプレティングし、5-7 日間、37℃、5%CO<sub>2</sub>-21%O<sub>2</sub> 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%CO<sub>2</sub>-21%O<sub>2</sub> 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 回洗淨し、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  $\alpha$ -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)洗淨し、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**

#### **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

#### 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<sup>4)</sup>。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 PGE<sub>1</sub> 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 PGE<sub>1</sub> 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、PGE<sub>1</sub> 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)。

#### 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 とも一致している。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。

### 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*)

#### 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生アロロン酸測定、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、



PGE<sub>1</sub> 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、PGE<sub>1</sub> 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<sup>-5</sup> 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。

### 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)

#### 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

PGE<sub>1</sub> 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 PGE<sub>1</sub>、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<sup>17)</sup>と一致して、PGE<sub>1</sub> 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 PGE<sub>1</sub> 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 PGE<sub>1</sub> 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。

次に動脈管における弾性線維形成の機序についての結果を記す。

### **【1】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(Figure 10A)。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(Figure 10B)。

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(Figure 11)。

## 【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 $\mu$ M)、EP4

刺激剤(1 $\mu$ M)、EP1/3 刺激剤(1 $\mu$ M)、EP2 刺激剤(1 $\mu$ 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(Figure 12A-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(Figure 12A-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 PGE<sub>2</sub>、EP4 刺激剤、EP1/3 刺激剤、EP2 刺激剤、Lox 阻害剤 (500 $\mu$ 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 (Figure 13A)。

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 (Figure 13B)。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。

### 【3】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 $\beta$ $\gamma$ 、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 $\mu$ M)、PKA の阻害剤である PKA inhibitor (10 $\mu$ M)、G $\beta$  $\gamma$  の阻害剤である gallein (10 $\mu$ M)、PLC の阻害剤である U73122 (10 $\mu$ M)、PKC の阻害剤である bis (1 $\mu$ 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 (Figure 14A-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