

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(Figure 14A-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(Figure 14C-E)。さらに、PKC の活性剤である PMA(1 $\mu$ 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(Figure 14D-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 $\beta$   $\gamma$ 、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 $\beta$   $\gamma$ 、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(Figure 15A-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 $\mu$ 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、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(Figure 15A-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(Figure 15D-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。

#### 【4】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 のウェ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(Figure 16A-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。

#### 【5】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 NH<sub>4</sub>Cl(20mM)で刺激し、回収した細胞のタンパクを用いて Lox のウェスタンブロッティングを行った。その結果、EP4 刺激剤と NH<sub>4</sub>Cl 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(Figure 17A-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。

#### 【6】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(Figure 18)。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

平成 22 年度の研究では、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 PGE<sub>1</sub> 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。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。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。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  $\beta$ -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。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。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。AC2は  $G_{\alpha_s}$  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  $G_{\alpha_s}$  のみに刺激され、抑制性Gタンパク質  $G_{\alpha_i}$ 、PKA および  $\mu M$  レベルの低濃度の

$Ca^{2+}$ に抑制される。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。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という報告がある。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が内膜肥厚を起こさず、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PGE<sub>1</sub>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。

### 弾性線維形成の機序解明

平成23年度の結果より、PGE<sub>2</sub>はEP<sub>4</sub>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。EP<sub>4</sub>刺激がGβγ、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、PGE<sub>2</sub>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EP<sub>4</sub>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、Gβγを介しているという結果が新しく得られた。Gβγは不活性状態ではGDPと結合したGαと会合して三量体Gタンパク質(α・β・γ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、GαからGDPが解離してGTPが結合する。GαにGTPが結合すると、GβγはGα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Gβγ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いえる。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。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いえる。

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

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 PGE<sub>1</sub> 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。  
さらに、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. 研究発表

### 1. 論文発表

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.

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

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.

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.

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.

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.* 286(22):19682-19692, 2011.

Sato M, Yokoyama U, Fujita T, Okumura S, Ishikawa Y. The Roles of Cytochrome P450 in Ischemic Heart Diseases. *Curr Drug Metab.* 12(6):526-532, 2011.

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 (TFE3) as a

receptor-independent activator of G{alpha}16: Gene regulation by nuclear G{alpha} subunit and its activator. *J Biol Chem.* 286(20):17766-17776, 2011.

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):167-179, 2011.

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):1882-1892, 2010.

Suzuki S, Yokoyama U\*, Abe T,

Kiyonari H, Yamashita N, Kurotani R, Sato M, Okumura S, Ishikawa Y. Differential roles of Epac in regulating cell death in neuronal and myocardial cells. *J Biol Chem.* 285(31):24248-24259, 2010.  
\*corresponding author

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

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.

総説

横山詩子、南沢享:目で見える胎児・新生児の病態 Visualized Fetal & Neonatal Disease 出生に関わる循環アダプテーション (3) 動脈管の分子生物学 Fetal & Neonatal Medicine メジカルビュー社、Vol.2 No.2 2010年7月号 (総説)

## 2. 学会発表

Shiraishi R, Yokota T, Yokoyama U, Minamisawa S. Stimulation of thromboxane A2 receptor induced the remodeling of rat ductus arteriosus. The 89<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2012.3.29-31, Matsumoto)

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 89<sup>th</sup> Annual

Meeting of the Physiological Society  
of Japan (2012.3.29-31,  
Matsumoto)

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  
89<sup>th</sup> Annual Meeting of the  
Physiological Society of Japan  
(2012.3.29-31, Matsumoto)

Jin MH, Yokoyama U, Ishiwata R,  
Minamisawa S, Ishikawa Y.  
Oxygenation-induced postnatal  
remodeling of the ductus arteriosus.  
The 89<sup>th</sup> Annual Meeting of the  
Physiological Society of Japan  
(2012.3.29-31, Matsumoto)

Ichikawa Y, Yokoyama U, Ishikawa  
Y. Inhibition of Phosphodiesterase  
Type 3 Milrinone Dilate the Ductus  
Arteriosus without Forming Intimal

Thickening The 89<sup>th</sup> Annual Meeting  
of the Physiological Society of Japan  
(2012.3.29-31, Matsumoto)

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 76<sup>rd</sup>  
Annual Scientific Meeting of the  
Japanese Circulation Society  
(2012.3.16-18, Fukuoka)

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)

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)

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)

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)

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)

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)

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 2<sup>nd</sup> Molecular Cardiovascular Conference II (2011.9.2-4, Hokkaido)

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)

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)

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 Heart Forum (2011.7.8, Fukuoka)

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)

Yokota T, Aida T, Yokoyama U, Minamisawa S. Thromboxane A2 receptor stimulation induces closure

of the rat ductus arteriosus. The 114<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Pediatric Society (2011.4.15-17, Tokyo)

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 89<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2012.3.29-31, Matsumoto) (symposiast)

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)

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)

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)

横山詩子. 「臨床から基礎医学研究へ一豊かな感受性を持つ」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)

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)

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)

Kato Y, Yokoyama U, Okumura S, Minamisawa S, Sata M, Miyajima E, Ishikawa Y. Epac1 promotes vascular remodeling upon vascular injury *in vivo*. The 88<sup>th</sup> Annual

Meeting of the Physiological Society of Japan (2011.3.28-30, Yokohama)

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 88<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2011.3.28-30, Yokohama)

Aida T, Yokota T, Yokoyama U, Minamisawa S. Thromboxane A<sub>2</sub> Receptor Stimulation Specifically Causes Closure of the Rat Ductus Arteriosus. The 88<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2011.3.28-30, Yokohama)

Liu N, Yokota T, Maekawa S, Yokoyama U, Kato T, Minamisawa S. Successful Isolation of Vascular

Endothelial Cells from the Rat Ductus Arteriosus. The 88<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2011.3.28-30, Yokohama)

Jin MH, Yokoyama U, Akaike T, Shioda A, Ishiwata R, Kurotani R, Okumura S, Sato M, Minamisawa S, Ishikawa Y. Oxygen-induced basic fibroblast growth factor contributes to anatomical closure of the rat ductus arteriosus. The 75<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (2011.3.18- 20, Yokohama).

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 33<sup>th</sup> Annual Meeting of the Molecular Biological Society of Japan (2010.12.7-10, Kobe)

Yokoyama U, Shioda A, Kato Y, Asou T, Aoki H, Nakamura T, Minamisawa S, Ishikawa Y. Prostaglandin EP4 Signaling Negatively Regulates Vascular Elastic Fiber Assembly. The 84<sup>th</sup> Scientific Session, American Heart Association (AHA) (2010.11.13-11.17, Chicago, USA) Circulation. Oct. suppl.II; 2010 (Abstract)

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) チャンネルの役割」第55回未熟児新生児学会・学術集会(2010.11.5-7 神戸)

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)



Yokota T, Ozawa M, Yokoyama U,  
Minamisawa S. A Role of  
Thromboxane A2 Receptor in the  
Rat Ductus Arteriosus as a  
Vasoconstrictor. The 16<sup>th</sup>  
International Vascular Biology  
Meeting (2010.6.20-24, Los Angeles)

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 16<sup>th</sup>  
International Vascular Biology  
Meeting (2010.6.20-24, Los Angeles)

Jin MH, Yokoyama U, Akaike T,  
Qibin J, Yokota S, Minamisawa S,  
Ishikawa Y. The Role of basic  
Fibroblast growth factor in Vascular  
Remodeling in Rat Ductus  
Arteriosus. The 113<sup>th</sup> Annual  
Meeting of the Japan Pediatric  
Society. (2010.4. 23-25, 2010,  
Morioka).

Yokoyama U, Minamisawa S,  
Ishikawa Y. Regulation of vascular  
remodeling of the ductus arteriosus.  
The 88<sup>th</sup> Annual Meeting of the  
Physiological Society of Japan  
(2011.3.28-30, Yokohama)  
(symposiast)

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 (2010.12.7,  
大阪) (招請講演)

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) (招請講演)

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) (招請講演)

横山詩子。「Prostaglandin  
E2-activated Epac promotes  
neointimal 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) (招  
請講演)

G. 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

Figure 1

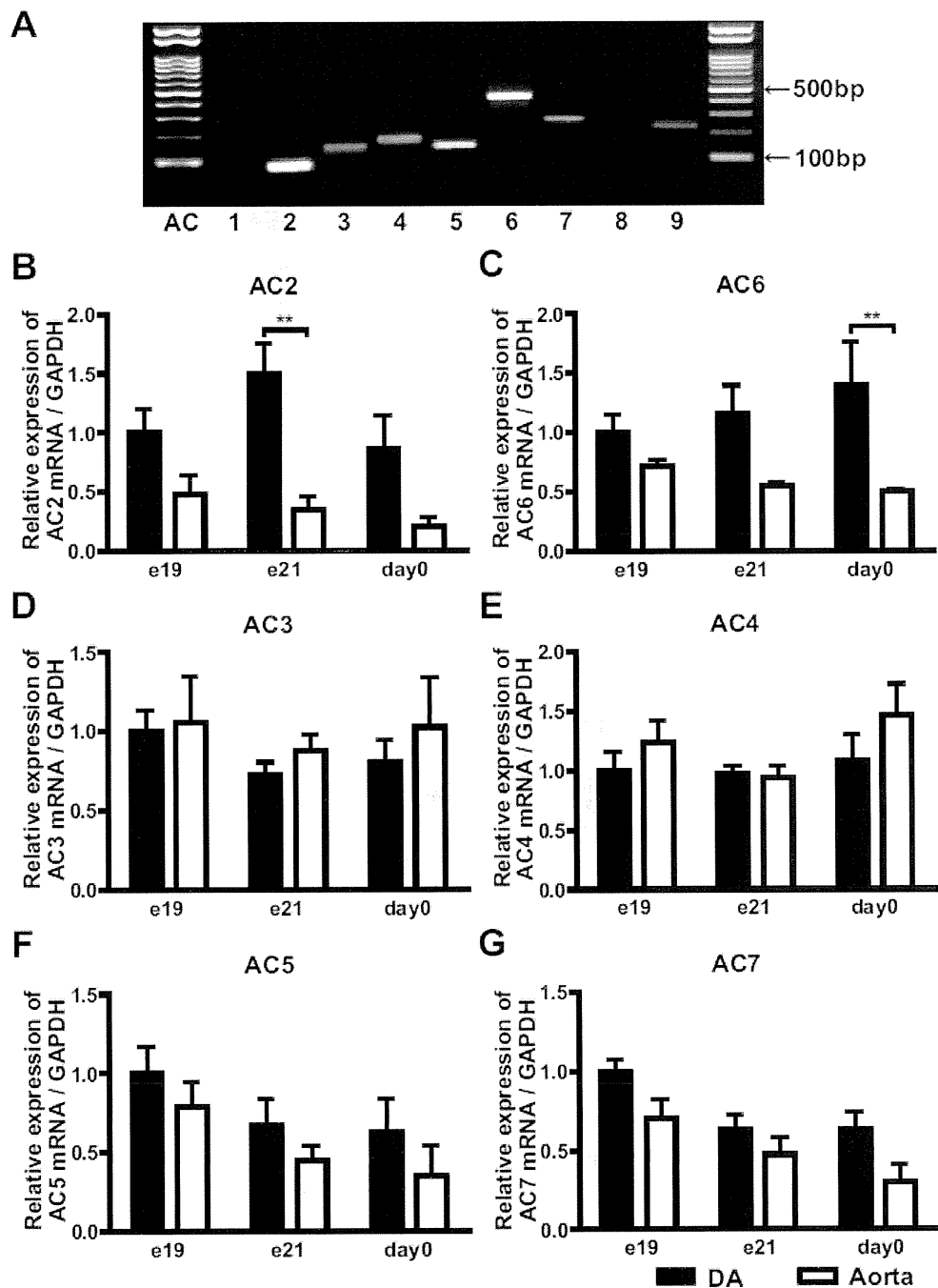


Figure 1. (A) 胎生 21 日のラット動脈管におけるアデニル酸シクラーゼ(AC)アイソフォームの半定量 RT-PCR を用いた発現解析。(B-G) 定量 RT-PCR による AC アイソフォームの発現解析。e19: 胎生 19 日、e21: 胎生 21 日、day0: 生後 0 日、DA: 動脈管、Aorta: 大動脈。 \*\* $P < 0.01$

Figure 2

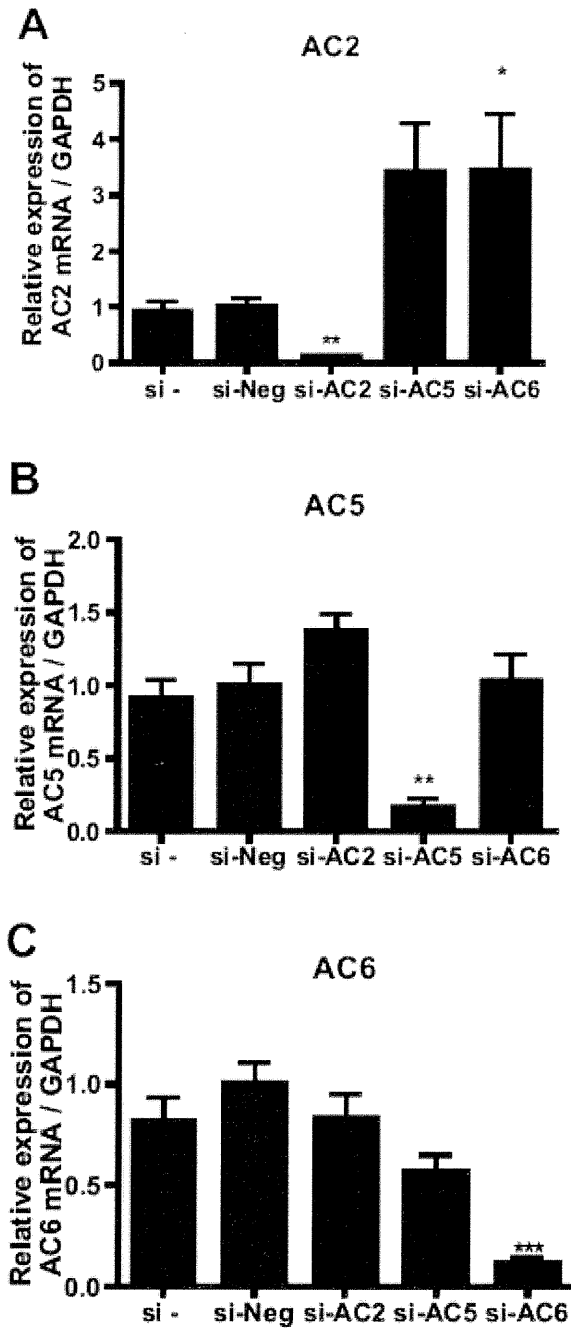


Figure 2. (A-C)各 AC アイソフォームを標的とした siRNA の抑制効果を定量 RT-PCR により動脈管初代培養細胞を用いて確認した。si-: siRNA を加えていないコントロール、si-Neg: siRNA ネガティブコントロール、si-AC2: AC2 を標的とした siRNA、si-AC5: AC5 を標的とした siRNA、si-AC6: AC6 を標的とした siRNA。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$