

Figure 3

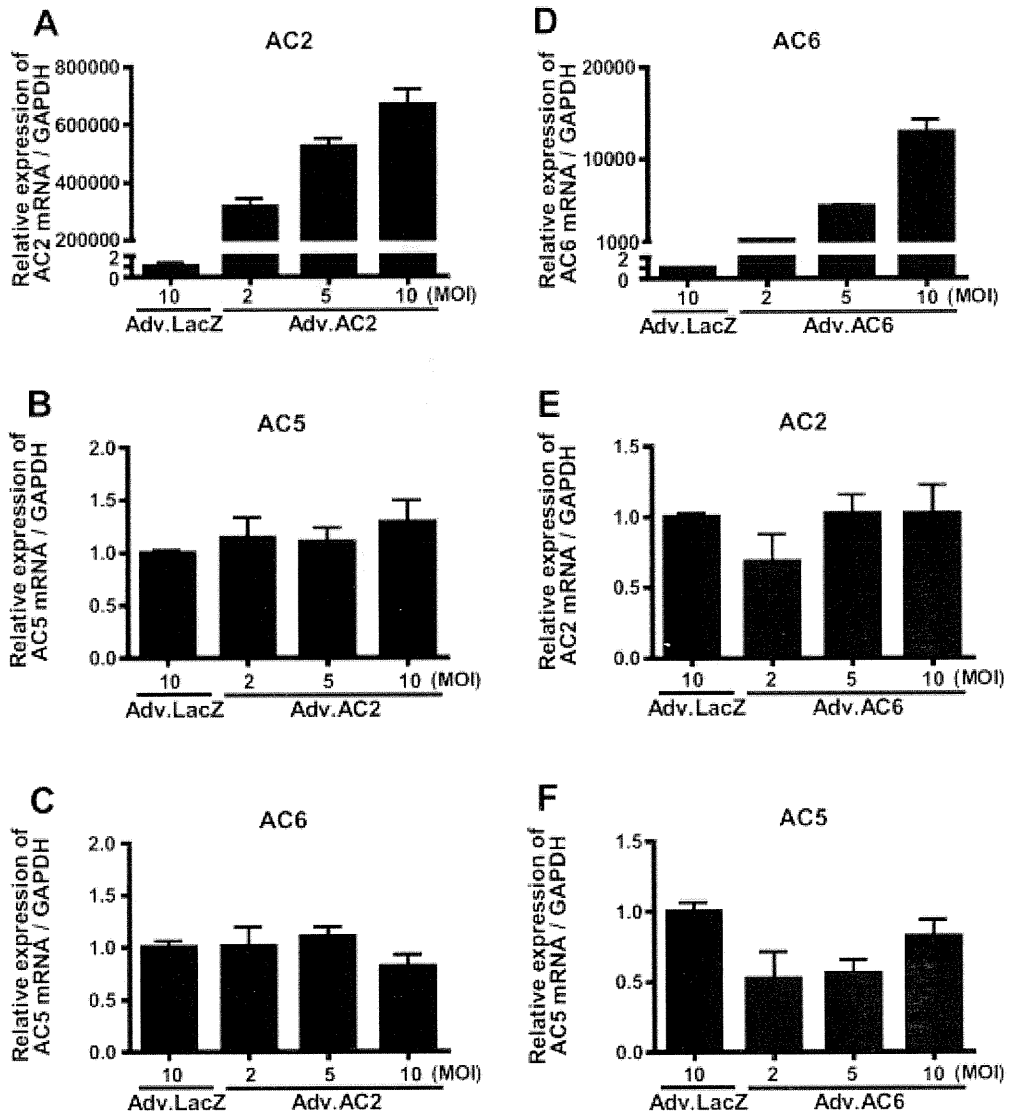


Figure 3. (A-C) AC2 アデノウイルスを用いて AC2 を過大発現させ、AC2、AC5、AC6 の発現を定量 RT-PCR により動脈管初代培養細胞を用いて確認した。(D-F) AC6 アデノウイルスを用いて AC6 を過大発現させ、AC2、AC5、AC6 の発現を定量 RT-PCR により動脈管初代培養細胞を用いて確認した。Adv.: アデノウイルス、Adv.LacZ: アデノウイルス LacZ コントロール、Adv.AC2: アデノウイルス AC2、Adv.AC6: アデノウイルス AC6。

Figure 4

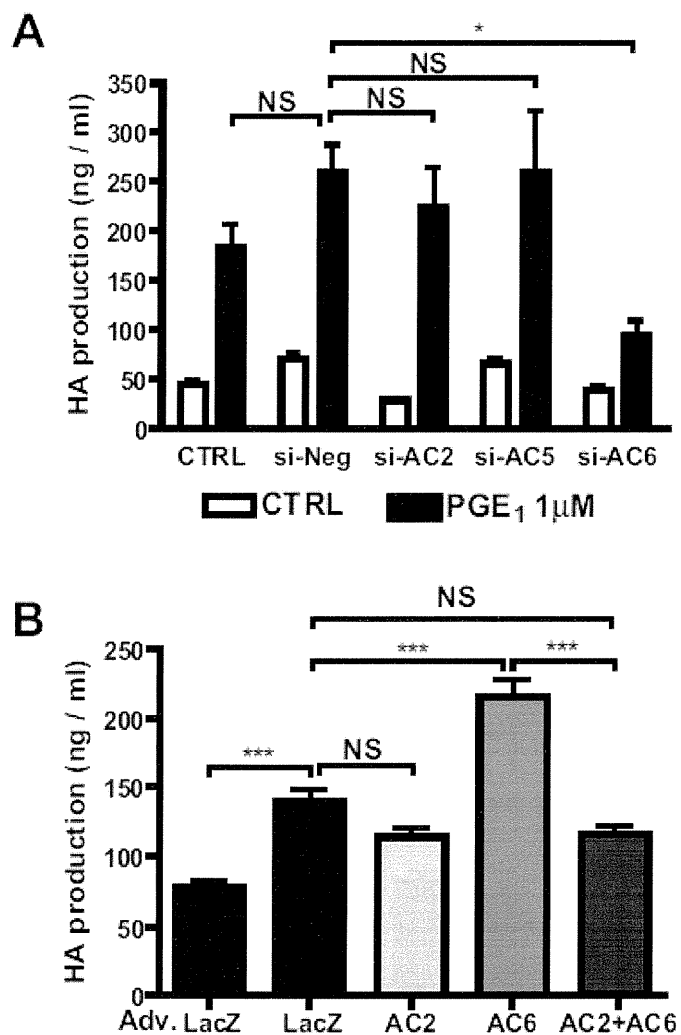


Figure 4. (A) 動脈管初代平滑筋細胞において各 AC アイソフォームを siRNA によって発現抑制し、PGE₁ で刺激した際のヒアルロン酸産生量の測定。(B) 動脈管初代平滑筋細胞における各 AC アイソフォームをアデノウイルスによって過大発現し、ヒアルロン酸産生量を測定した。CTRL: コントロール、si-Neg: siRNA ネガティブコントロール、si-AC2: AC2 を標的とした siRNA、si-AC5: AC5 を標的とした siRNA、si-AC6: AC6 を標的とした siRNA、Adv.: アデノウイルス、Adv.LacZ: アデノウイルス LacZ コントロール、Adv.AC2: アデノウイルス AC2、Adv.AC6: アデノウイルス AC6、Adv.AC2+AC6: Adv.AC2 と Adv.AC6 の過大発現。* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$

Figure 5

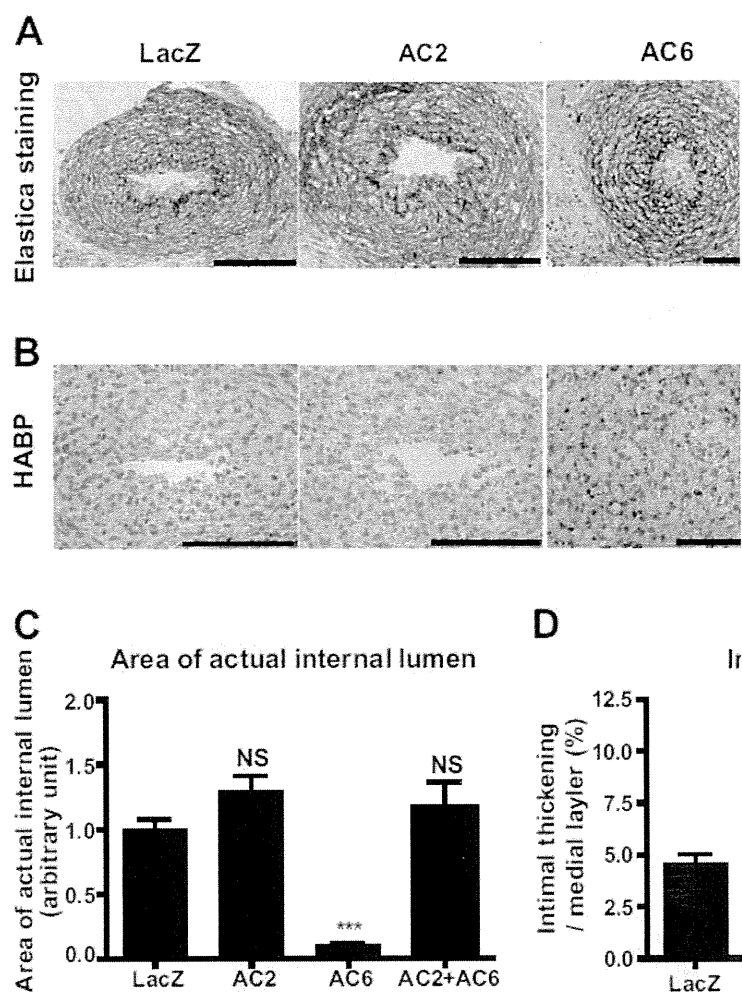


Figure 5. アデノウイルスを用いたラット動脈管(胎生 19 日)の器官培養。(A) エラスチカ染色。(B) HABP (ヒアルロン酸結合タンパク)染色。(C)動脈管の内腔面積の測定。(D) 動脈管の内膜肥厚の定量。si-Neg: siRNA ネガティブコントロール、si-AC2: AC2 を標的とした siRNA、si-AC5: AC5 を標的とした siRNA、si-AC6: AC6 を標的とした siRNA、Adv: アデノウイルス、Adv.LacZ: アデノウイルス LacZ コントロール。*** $P < 0.001$ 、Scale Bars: 100 μ m。

Figure 6

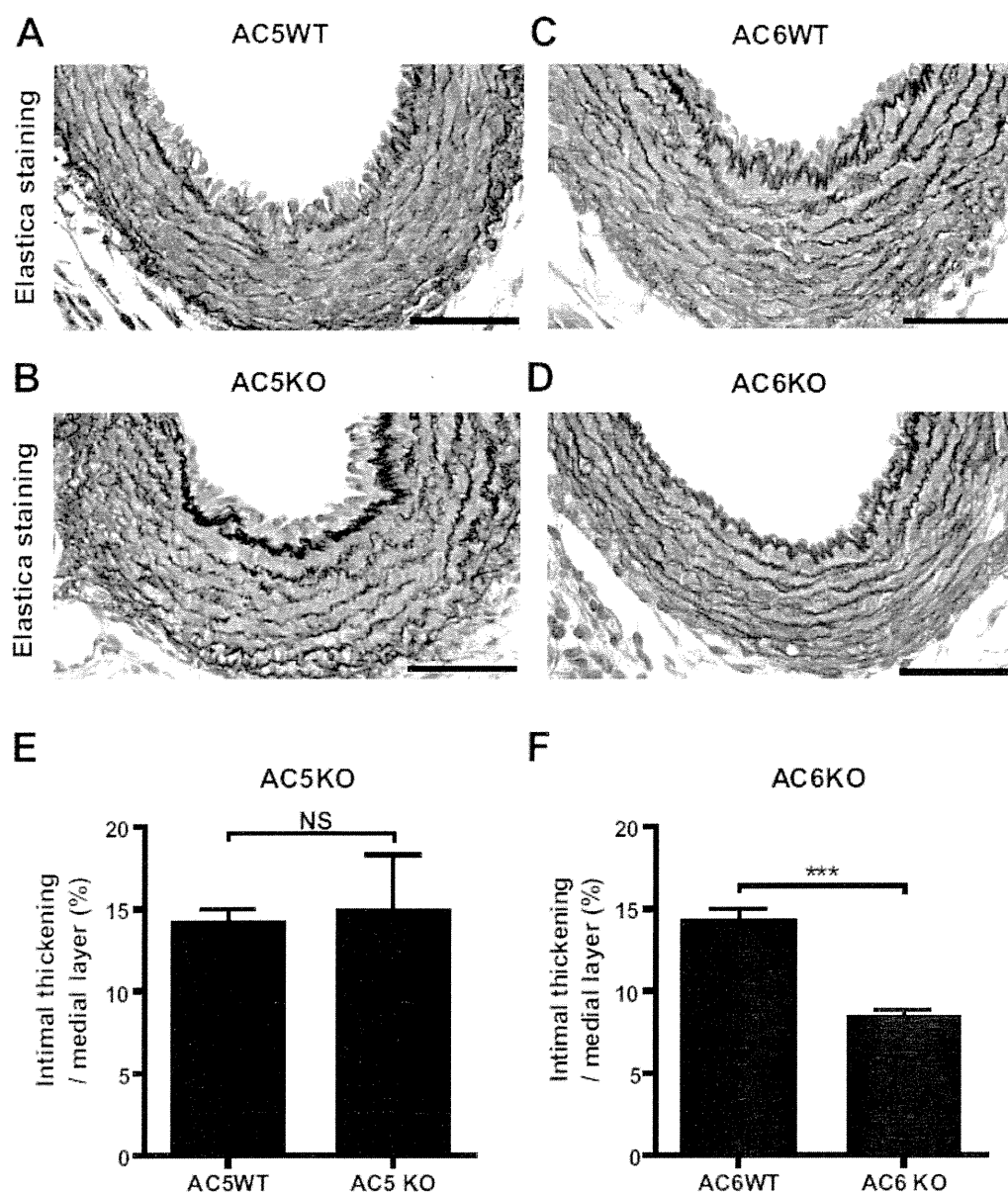


Figure 6. AC5 および AC6 ノックアウト(AC5KO、AC6KO)マウスの動脈管(胎生 18.5 日)の器官培養。(A-D) エラスチカ染色。(E) AC5KO マウスの動脈管の内膜肥厚の定量。(F) AC6KO マウスの動脈管の内膜肥厚の定量。WT: 野生型。*** $P < 0.001$ 、NS: 有意差なし、Scale Bars: 50 μ m。

Figure 7

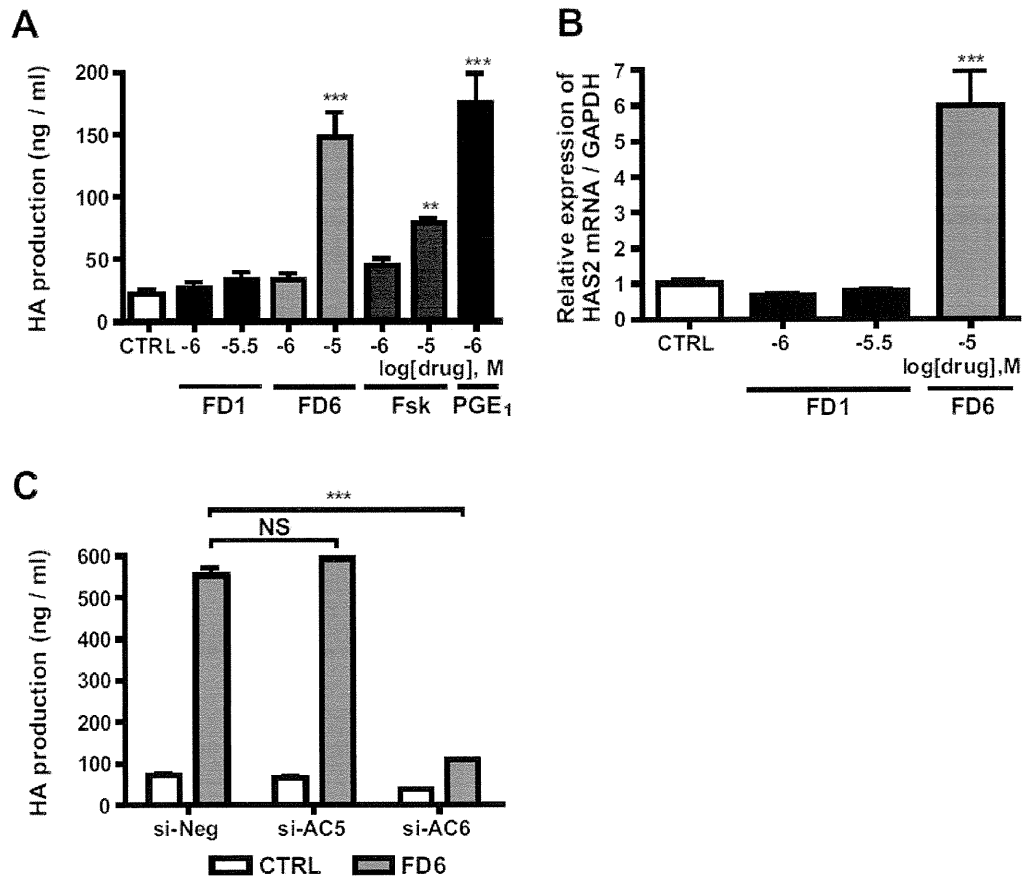


Figure 7. (A) AC2/6 刺激薬である FD1、AC5/6 刺激薬である FD6、フォルスコリン(Fsk)、PGE₁ 刺激下における動脈管初代平滑筋細胞のヒアルロン酸産生量。(B) FD1、FD6 刺激下におけるヒアルロン酸合成酵素 2 型である HAS2 mRNA の発現解析。(C) AC5、AC6 を標的とした siRNA で FD6 刺激下におけるヒアルロン酸産生量。NS: 有意差なし、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$

Figure 8

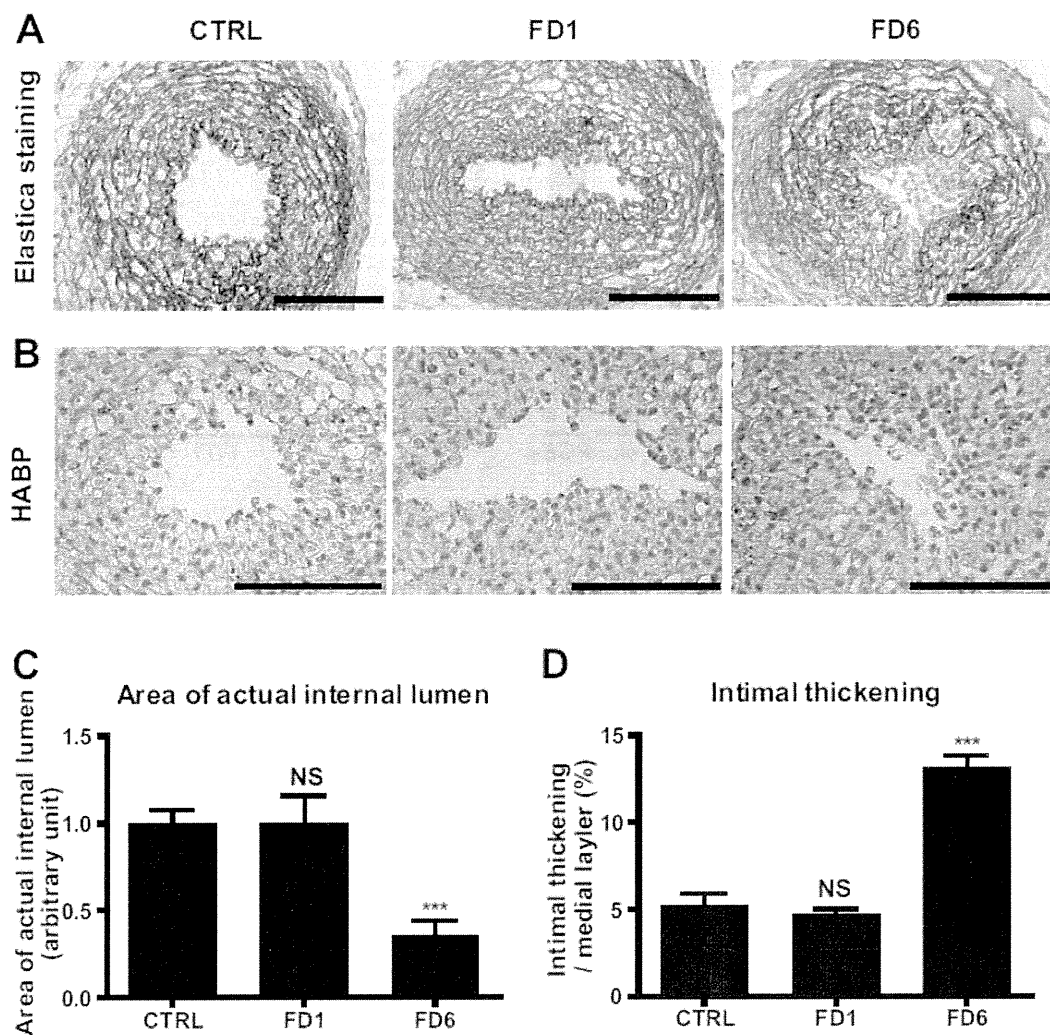


Figure 8. AC2/6 刺激薬の FD1 および AC5/6 刺激の FD6 を用いたラット動脈管(胎生 19 日)の器官培養。(A) エラスチカ染色。(B) HABP(ヒアルロン酸結合タンパク)染色。(C) 動脈管の内腔面積の測定。(D) 動脈管の内膜肥厚の定量。*** $P < 0.001$ 、NS: 有意差なし、Scale Bars: 100 μm 。

Figure 9

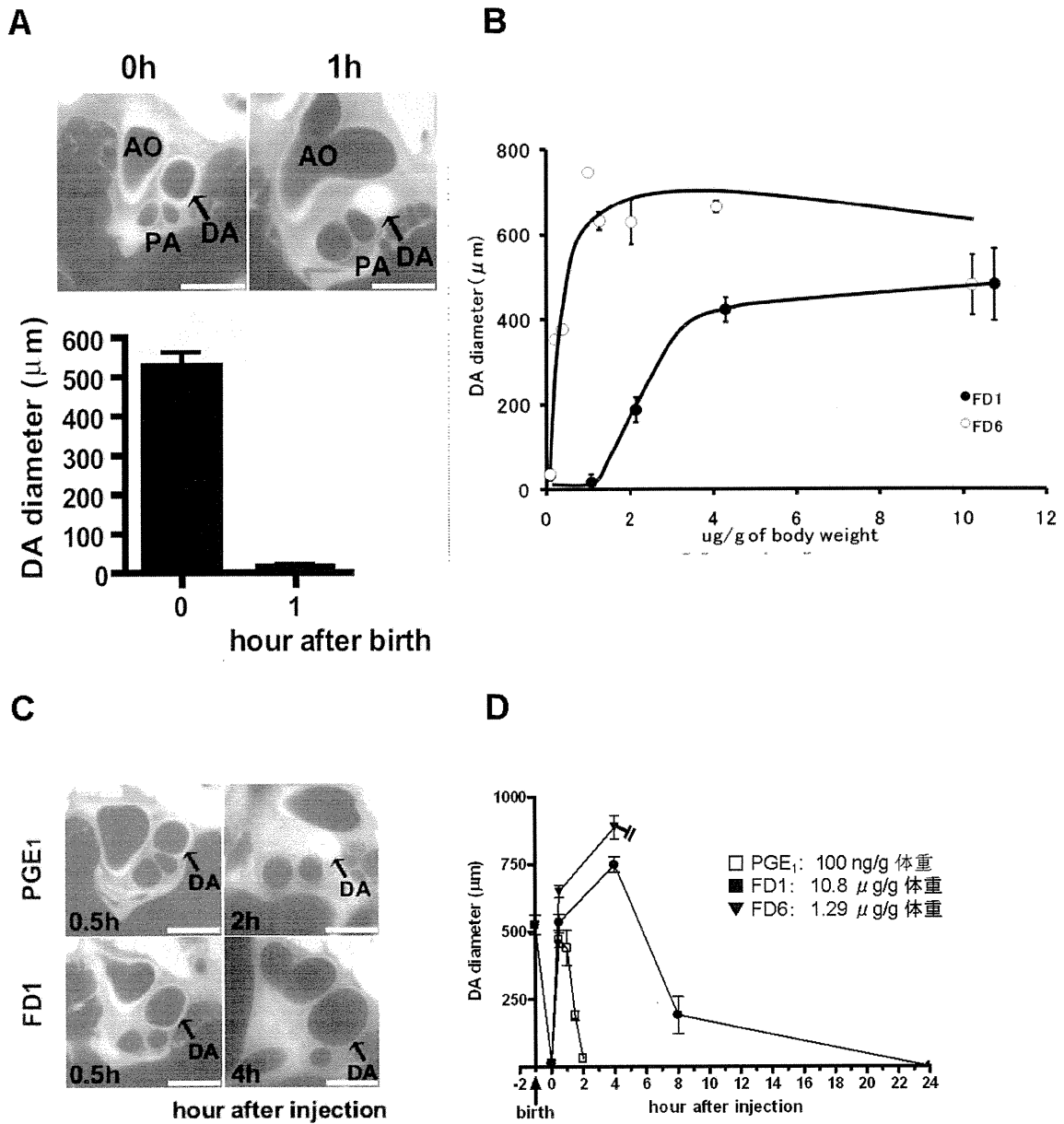


Figure 9. 急速全身凍結法を用いたラット動脈管に対する AC2/6 刺激薬である FD1 および AC5/6 刺激薬である FD6 の血管拡張作用の検討。(A) 生後 0 時間および 1 時間の動脈管の内径。(B) FD1 および FD6 の濃度決定。(C) PGE₁ および FD1 の時間ごとの動脈管の図。(D) ラット動脈管における FD1、FD6 の持続時間の測定。DA: 動脈管。Scale Bars: 1 mm

Figure 10

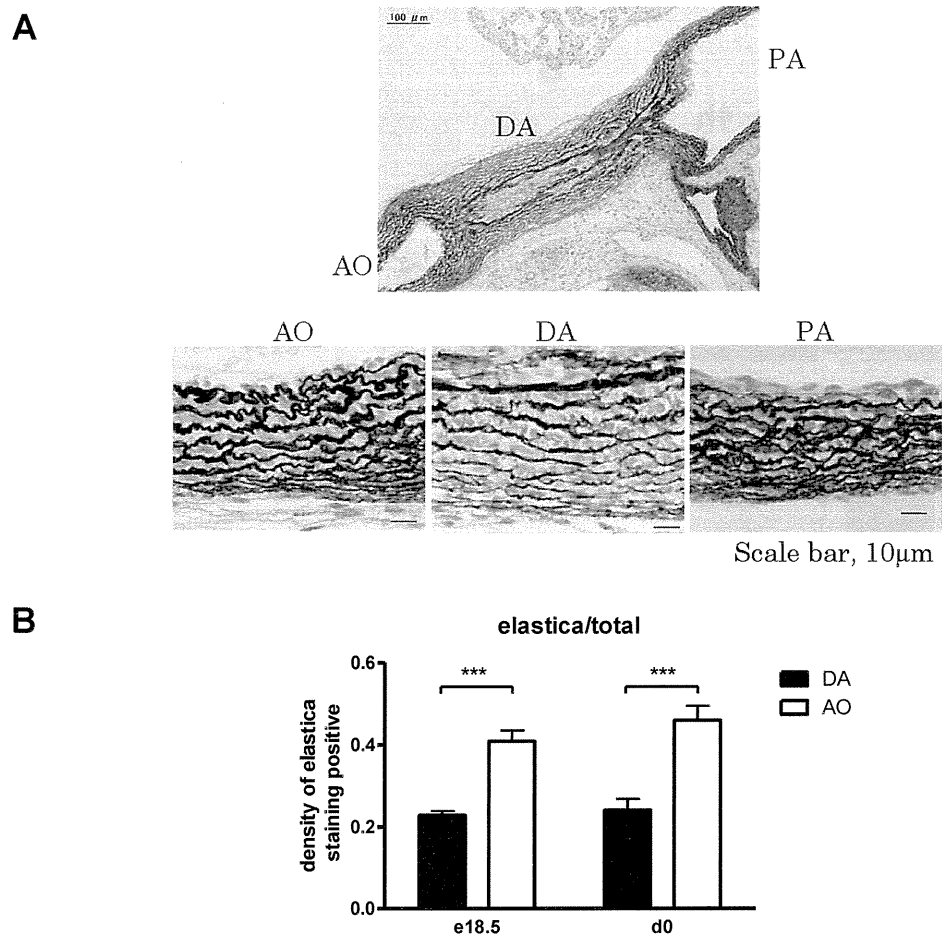


Figure 10. 胎生 18.5 日のマウス組織のエラスチカ染色。
(A)エラスチカ染色。(B)動脈管と大動脈の弾性線維の定量。n=6. *** $P < 0.001$.
AO:大動脈、DA:動脈管、PA:肺動脈、e18.5:胎生 18.5 日、d0:生後 0 日。

Figure 11

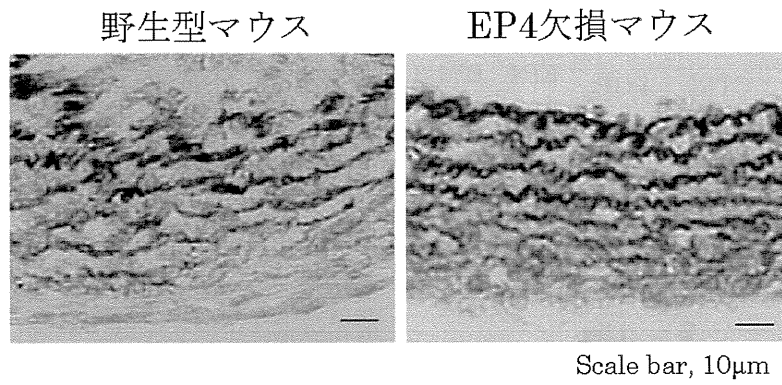


Figure 11. 生後0日のEP4欠損マウスと野生型マウス動脈管のエラスチカ染色。

Figure 12

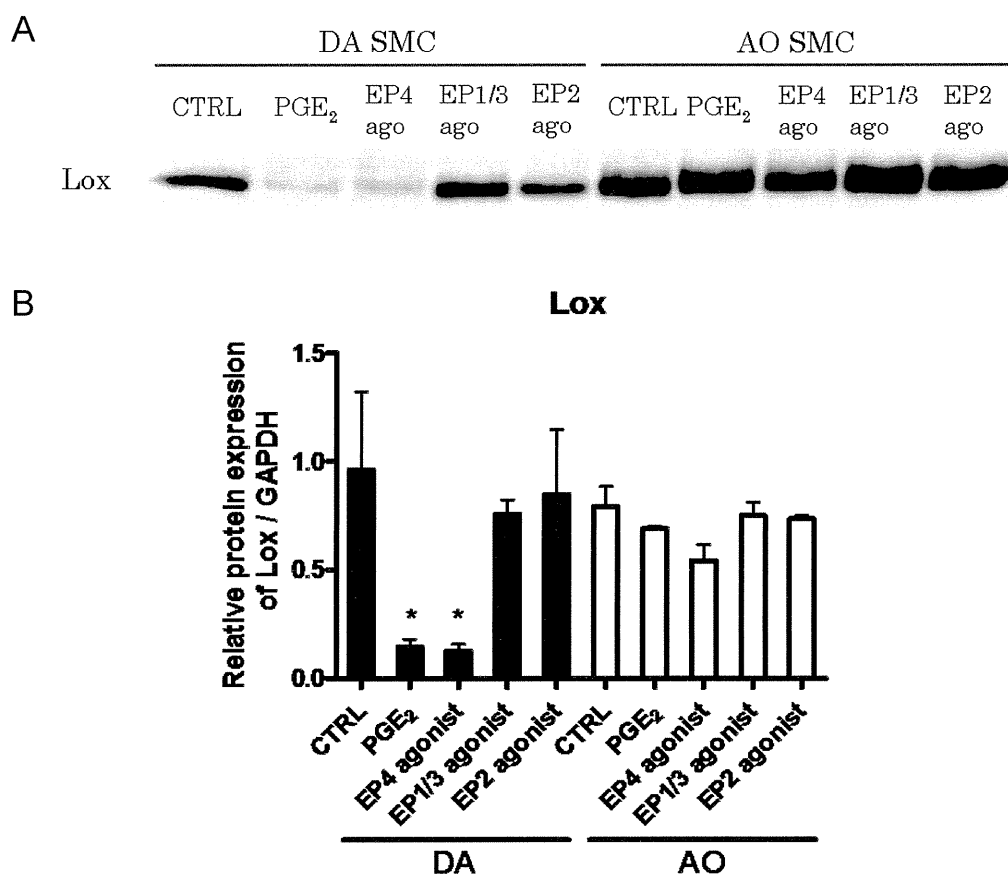


Figure 12. PGE₂-EP4 シグナルにおける Lox の発現の検討。

(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。

Figure 13

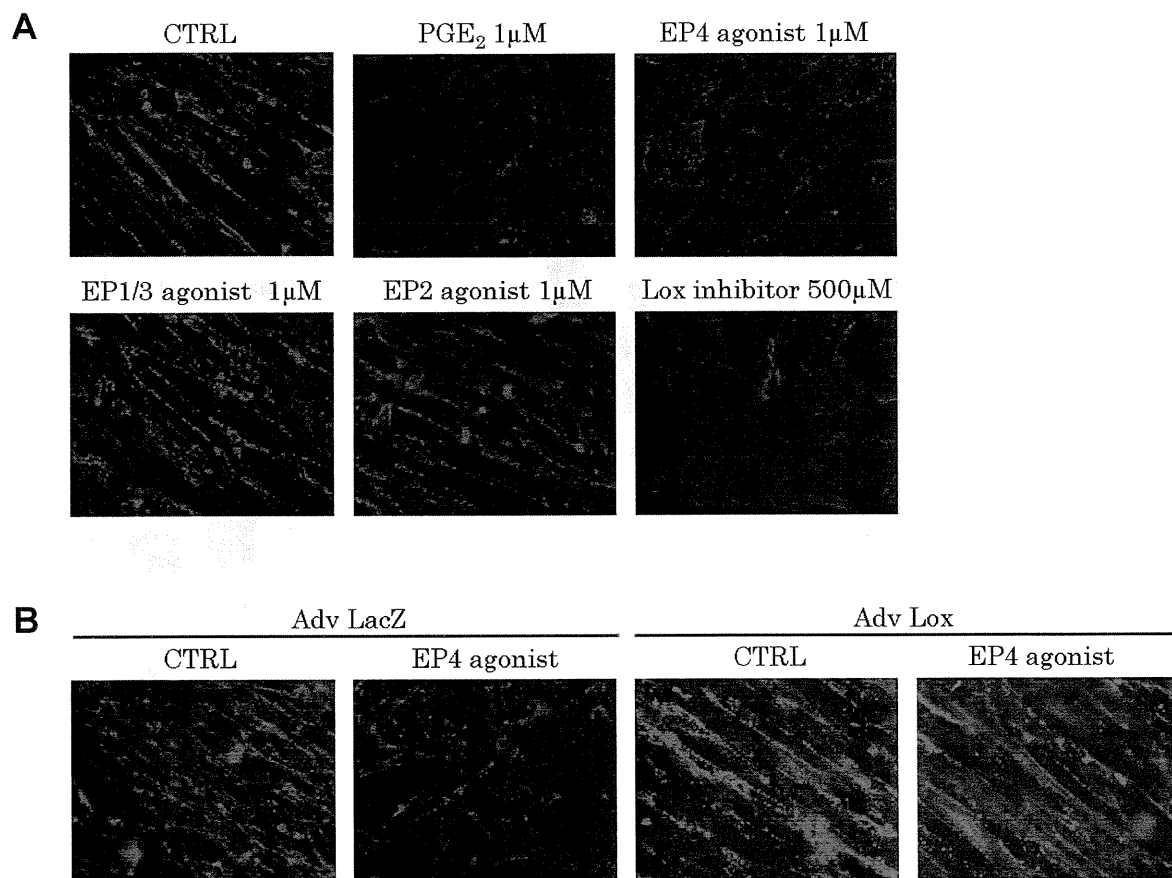


Figure 13. EP4 刺激が弾性線維の形成に与える影響の検討。

(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。

Figure 14

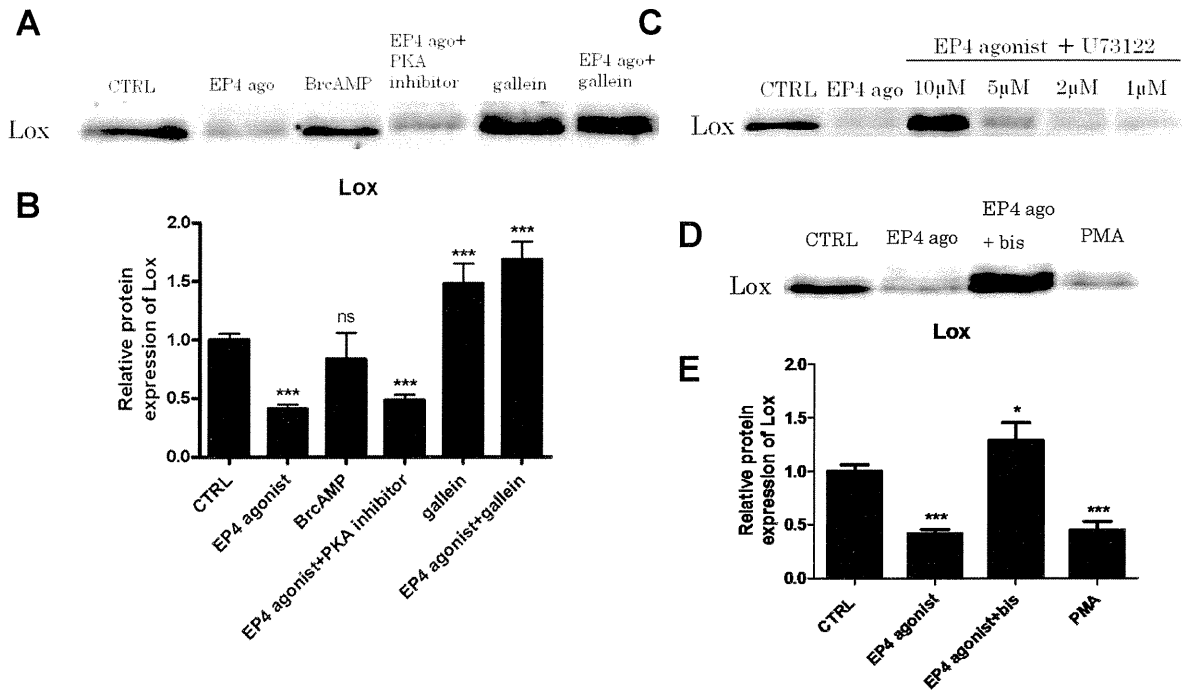


Figure 14. EP4 刺激による Lox の発現低下に關与する下流シグナルの検討。
 (A)動脈管平滑筋初代培養細胞を EP4 刺激剤、BrcAMP、PKA 阻害剤、gallein で刺激した細胞のタンパクを用いて、Lox の抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。(B)A のウエスタンブロットの定量解析。n=4-16. *** $P < 0.001$ vs CTRL, respectively. (C)動脈管平滑筋初代培養細胞を EP4 刺激剤、U73122 で刺激した細胞のタンパクを用いて、Lox の抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。(D)動脈管平滑筋初代培養細胞を EP4 刺激剤、bis、PMA 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。(E)D のウエスタンブロットの定量解析。n=4-14. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs CTRL, respectively. ago:アゴニスト(agonist)、CTRL:コントロール。

Figure 15

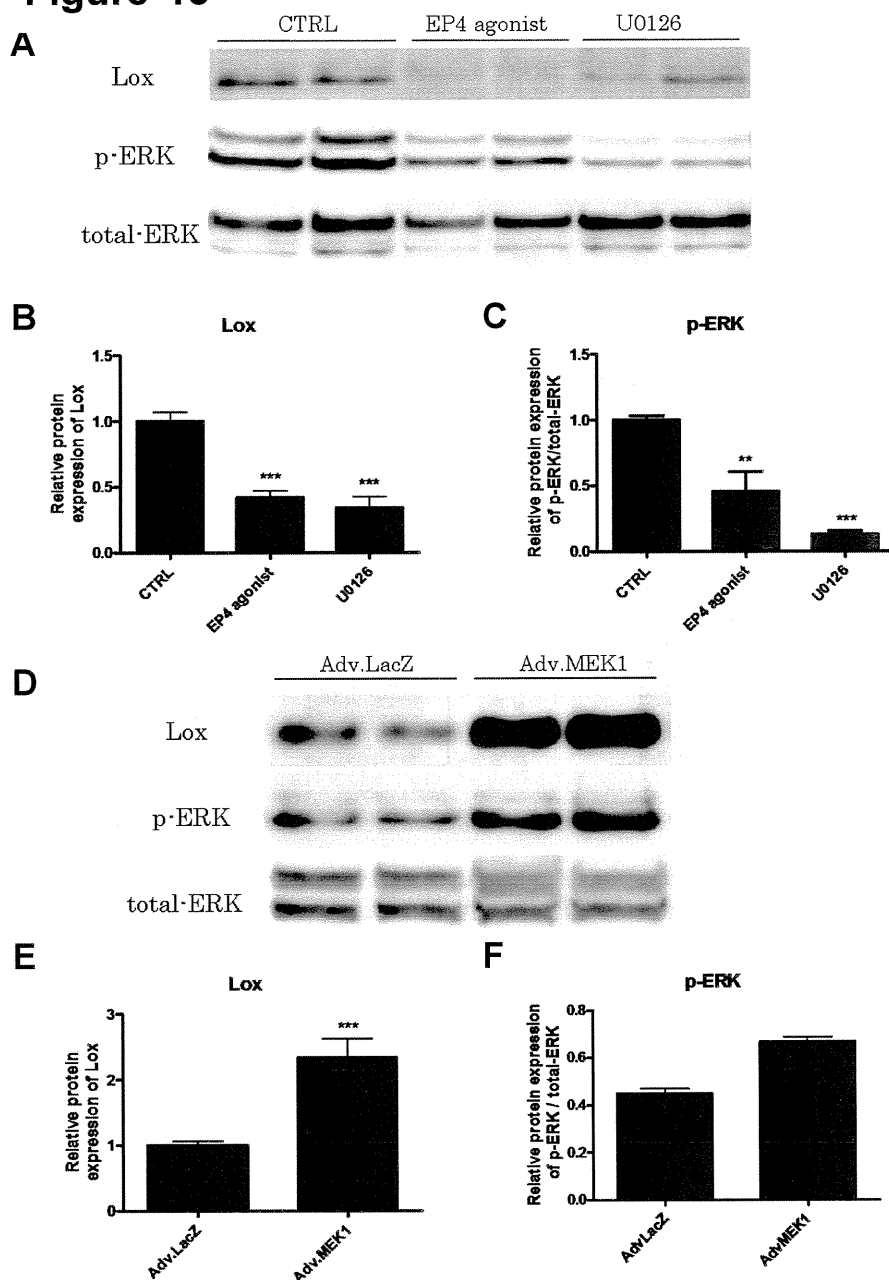


Figure 15. EP4 刺激による Lox の発現低下に ERK シグナルが介するかの検討。(A) 動脈管平滑筋初代培養細胞を EP4 刺激剤、U0126 で刺激した細胞のタンパクを用い、Lox、p-ERK、total-ERK の抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。(B-C)A のウエスタンブロットの定量解析。n=4. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs CTRL, respectively. (D) LacZ および MEK1 を過大発現させた動脈管平滑筋初代培養細胞のタンパクを用い、Lox、p-ERK、total-ERK の抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。(E-F)D のウエスタンブロットの定量解析。E:n=7. *** $P < 0.001$ vs CTRL. F:n=2. CTRL:コントロール。

Figure 16

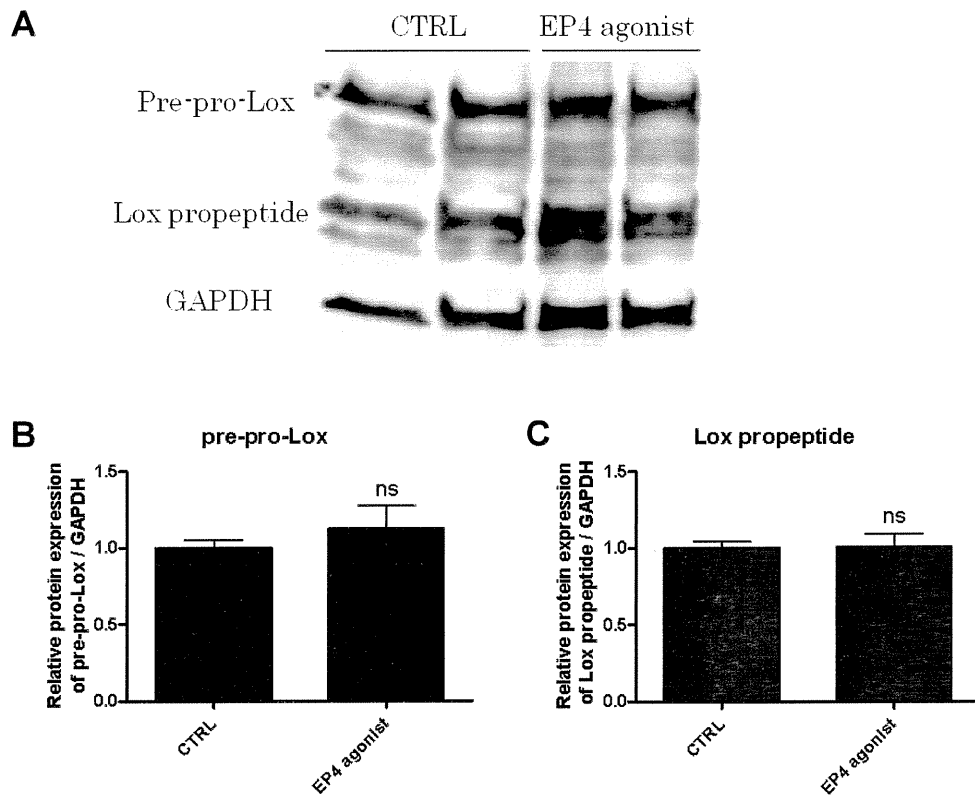


Figure 16. EP4 刺激が Lox を合成の段階で抑制しているのかの検討。
(A)動脈管平滑筋初代培養細胞を EP4 刺激剤で刺激した細胞のタンパクを用い、Pre-pro-Lox、Lox propeptide の抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。(B-C)A のウエスタンブロットの定量解析。CTRL:コントロール。

Figure 17

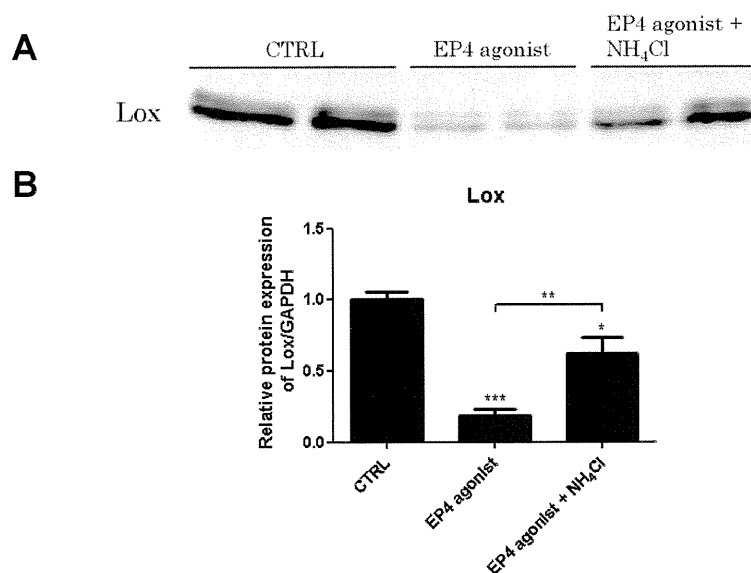


Figure 17. EP4 刺激が Lox の分解促進に寄与しているかの検討。
(A)動脈管平滑筋初代培養細胞を EP4 刺激剤、NH₄Cl で刺激した細胞のタンパクを用い、Lox の抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。(B)A のウエスタンブロットの定量解析。n=3-4. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs CTRL, respectively. CTRL:コントロール。

Figure 18

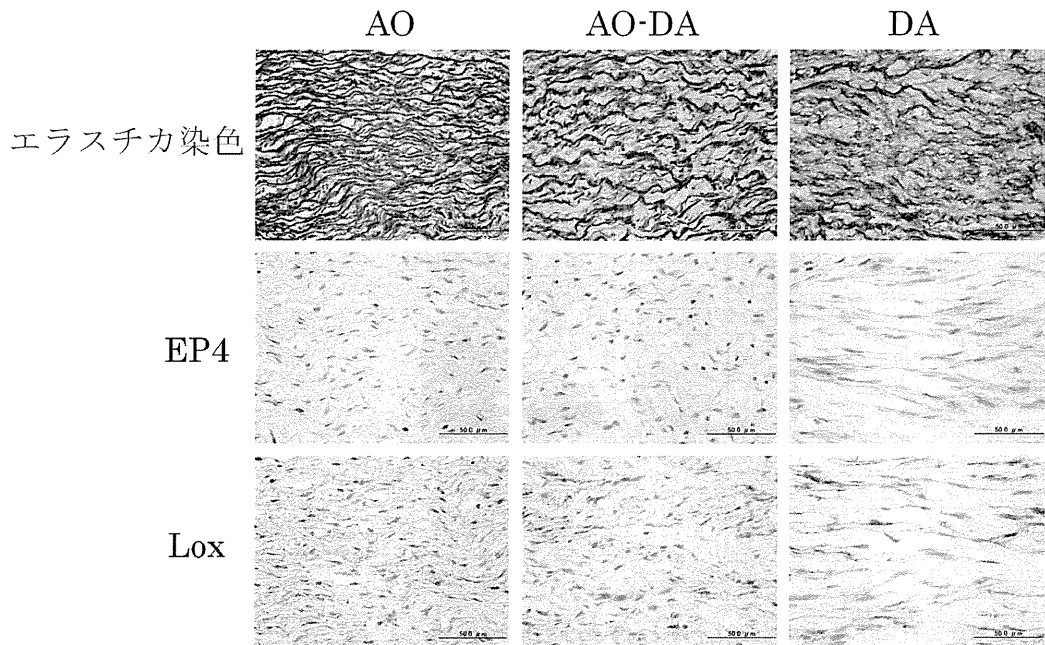


Figure 18. ヒトの動脈管組織のエラスチカ染色と EP4 と Lox の免疫組織染色。
AO:大動脈、AO-DA:移行部、DA:動脈管。

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、プロスタグランディン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

プロスタグランディンEは動脈管を開存させる作用を持つため、プロスタグランディン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

ロスタグランディンEは、プロスタグランディン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ーリン酸(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を 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

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¹⁾。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¹⁾。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E₂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 E₁ 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 E₁ 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