

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ベオリン (カベオリン-1, -2, -3) がクローニングされている 5, 6). 細胞にカベオリンを過剰発現すると特徴的な陥凹構造を持つカベオラが細胞膜上に形成されることから、カベオリンがカベオラの主要な構成蛋白であると考えられている。カベオリン-1 と-3 はアミノ酸配列の相同性が高く、細胞内シグナルにおける機能も類似しているものの、この二つのサブタイプのカベオリンは組織分布が全く異なっている。カベオリン-1 は主に、内皮細胞、線維芽細胞、脂肪細胞などに発現しているが、カベオリン-3 は骨格筋細胞や心筋細胞、平滑筋細胞などの筋組織にのみ発現を認める。なお、カベオリン-2 はカベオリン-1 と共発現して

いるものの、細胞内シグナルにおける機能はほとんど分かっていない。

2. カベオラ、ラフトへのシグナル伝達分子の局在

これまでの研究から、細胞内シグナル関連分子の多くがカベオラ内に局在することが分かってきている 7). G 蛋白共役型受容体, 3 量体 G 蛋白質, Ras, NOS, アデニル酸シクラーゼ, プロテインキナーゼ C などの蛋白のカベオラ内への集積についての報告がある。これらの分子のカベオラへの局在は一般的に、シヨ糖密度勾配による低密度分画への回収や界面活性剤への難溶性で証明されるが、電子顕微鏡や免疫染色など形態学的にも証明された分子もある。シヨ糖密度勾配による精製で回収したカベオラ分画には細胞を構成する全蛋白質の数パーセントの量しか含まないが、このわずかな分画にカベオリンや上述したシグナル伝達分子が集合している。そのことから、カベオリンが様々なシグナル伝達分子の scaffold 蛋白として働く

可能性が示唆された 8,9)。すなわち、関連した蛋白がある特定のドメインに集合することにより、シグナル伝達の連鎖の効率を高めているものと考えられている。一方、細胞にはラフトと呼ばれるカベオラと近い性質を持つ細胞内ドメインが存在する。ラフトはカベオラと同様にコレステロールなどの低密度の脂質が集中する細胞膜ドメインであるが、カベオリンの発現がみられず、細胞膜の陥凹構造も持たない。このラフトにも様々なシグナル伝達分子が集中することが知られており、カベオラ、ラフト自身がシグナル伝達分子の集合に関与しているものと思われる。

3. カベオリンによるシグナル調節機構

前にも述べたように、カベオリンは scaffold 蛋白として働くだけでなく、カベオリンそのものが種々のシグナル伝達分子を調節する作用を持っている。その調節部位はカベオリンの scaffolding domain と呼ばれる配列で

あり、この部位が直接酵素などと相互作用することにより、活性を抑制することが知られており、G 蛋白質、アデニル酸シクラーゼ、NOS、PKC などで、その報告がある 7, 10-12)。

4. カベオリンとインスリンシグナル

カベオリンは一般的に多くのシグナルを抑制することは既に述べたが、カベオリンと相互作用するためには特異的なアミノ酸配列が必要となる。すなわち、 $\phi X\phi XXXX\phi$ あるいは $\phi XXXX\phi XX\phi$ (ϕ : 芳香族アミノ酸) という配列であり、インスリン受容体 β サブユニットにも存在する (WSFVVLW, 1193-1200)。この特異的な配列を持つ蛋白はカベオラに存在することが予想されるが、インスリン受容体もまたカベオラに存在し、カベオリンと相互作用することが複数の研究グループから細胞分画法、電子顕微鏡などの方法により報告された 4,13,14)。当初は他のシグナルと同様カベオリンはインスリンシグナルに

対する負の調節機能を持つものと予想されたが、我々の研究グループから予想外の結果が報告され、他の複数のグループからも同様の報告がなされた 4)。すなわち、カベオリン scaffolding domain の精製ペプチドと精製インスリン受容体キナーゼドメイン、それにインスリン受容体基質 (IRS) を用いた *in vitro* の系において、カベオリン scaffolding domain のペプチドがその濃度依存的にインスリン受容体のキナーゼ活性を上昇させることを明らかにした (図 1) 4)。この現象は、HEK293T にカベオリンを過剰発現した際にも認められた。つまり、一般的にシグナル抑制作用を持つカベオリンが、インスリンシグナルにおいては例外的に促進的に働くことが示されたのである。なお、これらの結果ではカベオリン-1および3に促進作用を認め、カベオリン-2はそのような作用を持たなかった。また、カベオリン-1 と比べ、カベオリン-3 の促進作用の方が強力であった。

5. カベオリン-3 ノックアウトマウスにおける糖代謝異常

そこで次に、我々はカベオリン-3 の欠損マウス (Cav3KO) を用いて、*in vivo* におけるカベオリン-3 のインスリンシグナル調節機構を検討した 15)。カベオリン-3 は筋組織特異的に発現を認めるサブタイプであり、骨格筋はインスリンの主要な標的臓器であるため、Cav3KO では骨格筋でのインスリンシグナルの活性抑制を介してインスリン抵抗性を呈しているものと予想された。実際、Cav3KO では、インスリンシグナルを構成する各分子 (IR, IRS-1, Akt) の骨格筋における発現に変化はみられなかったが、インスリン刺激後の IR, IRS-1 Akt のリン酸化は著明に低下していた (図 2)。

また、骨格筋への糖取り込みは Cav3KO で有意に減少しており、糖負荷試験で野生型と比べて Cav3KO で有意に血糖の上昇を認めた (図 3 A)。同時に測定した血清インスリン値は両者のマウスで変化はなく、血糖値の

上昇は骨格筋への糖の取り込み低下によるものと考えられた。さらに、ストレプトゾトシンという膵β細胞毒性物質を少量投与したところ、Cav3KOは野生型よりも激しい高血糖を呈した(図3B)。

このことは、Cav3KOが糖尿病に対するリスクファクターに対して脆弱となっていることを示唆している。また、Cav3KOは血清中性脂肪、遊離脂肪酸、総コレステロールが上昇しており、脂質代謝異常も合併していた(図4)。

これらの結果からCav3KOではいわゆるインスリン抵抗性の病態を示しているものと考えられた。興味深いことに、Cav3KOに対してアデノウイルスを用いてカベオリン-3を骨格筋に遺伝子導入すると、インスリンシグナルがある程度改善することも明らかとなった(図5)。

これらの研究結果により、カベオリンによるインスリンシグナル増強作用が*in vivo*でも証明されたのと同時に、

カベオリン-3の生体内での糖代謝における役割が初めて明らかとなった。このCav3KOにおける糖代謝異常は、骨格筋特異的なインスリン受容体ノックアウトマウスでみられる表現型と類似しているものである(16,17)。すなわち、骨格筋での糖取り込み能低下によりインスリン抵抗性を生じるが、その症状、特徴はCav3KOとほぼ同様で同程度であった。インスリンシグナルにおいて、最も中心的なシグナルであるインスリン受容体の欠損と同程度の症状をCav3KOでも起こし得ることは、糖代謝においてカベオリンがいかに重要な因子であるかということを示唆している。

近年、カベオリン-1ノックアウトマウス(Cav1KO)についての報告もされており(18)、脂肪組織の絶対的な減少とともに脂肪細胞でのインスリン受容体の発現量が著明に(90%以上)減少することにより、インスリン抵抗性を示すことが示されている。この報告ではカベオリン-1がインスリン受容体の蛋白の安定性に関与することを示

しており、カベオリンの欠損状態ではインスリン受容体の不安定性が上昇することによりインスリン受容体の発現量が著しく減少すると考えられる。Cav3KOではインスリン受容体をはじめとするインスリンシグナル関連分子の発現および細胞内局在に変化はみられず、カベオリン-1とカベオリン-3の機能はインスリンシグナルの増強効果という点では一致しているものの、その作用機序は多少異なっている可能性がある。また近年、グルコーストランスポーター4(GLUT4)のインスリン刺激による細胞膜へのトランスロケーションにカベオリン-3が関与しているとの報告(19)や、インスリンシグナルの負の制御因子であるPTP1Bなどの脱リン酸化酵素とカベオリンの相互作用の報告(20,21)もある。カベオラ/ラフトにおけるインスリンシグナルについて、現在までに明らかになっている機序を図6に示す。このように、カベオリンによるインスリンシグナル調節機序はまだ不明な点が多く、検討すべき課題は多いとい

える。

6. カベオリン-3による糖尿病遺伝子治療

我々は現在、カベオリンを用いた糖尿病の新規治療への可能性を検討している。内因性にカベオリンの発現をほとんど認めない肝組織においてカベオリン遺伝子を導入して過剰発現させることにより、肝組織における糖代謝の改善を認めることを確認し、昨年論文が受理された。この研究では、2型糖尿病を発症した肥満マウスに対して、カベオリン3の遺伝子をアデノウイルスを用いて導入することにより、血糖値の低下作用、肝臓での糖代謝の改善作用を示した。この研究はカベオリンが糖尿病に対する新規の治療薬としての可能性を示唆するものであった。この研究ではPTP1Bがカベオリンによる調節を受けてインスリンシグナルを制御していることが明らかになった(22)。また最近我々は、血管内皮細胞において、カベオリンにおけるPTP1Bの活性調節機構に

はカベオラにおける活性酸素が関与していることを報告した(23)。この報告では、カベオラで局所的に産生された活性酸素により PTP1B のシステイン残基が酸化状態(Cys-OH)となり、PTP1B の活性が低下することを示し

た。この結果は骨格筋細胞や肝細胞、脂肪細胞におけるインスリンシグナルにも応用できる可能性があると考えている。なお現在はより実際の治療の実用化に向け、ペプチドによる治療を目指した研究も進行中である。

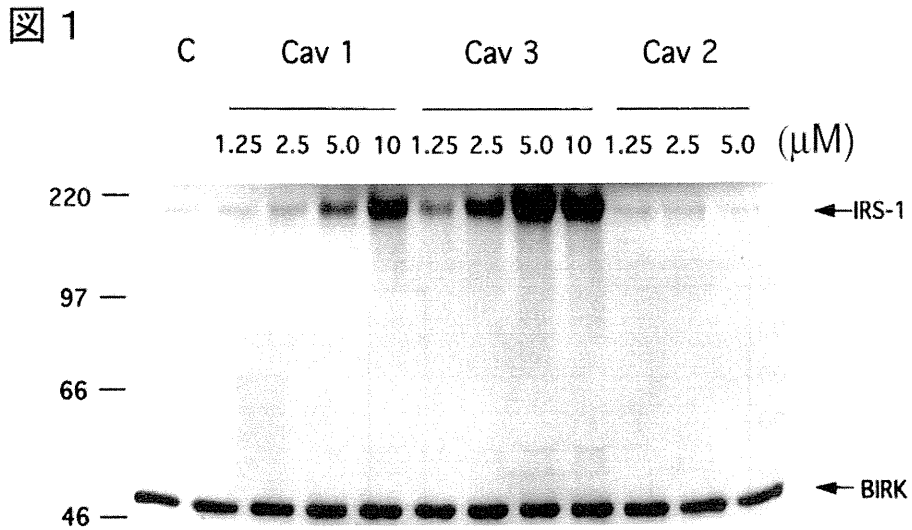
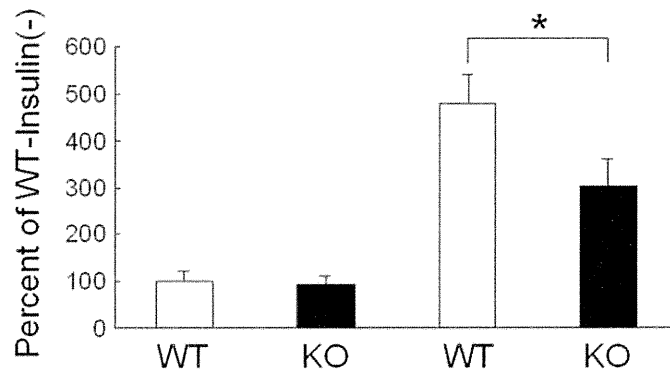
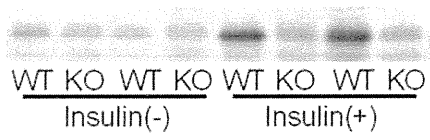


図 1, カベオリン由来ペプチドによる IRS-1 リン酸化の増強
 インスリン受容体キナーゼ (*BIRK*) を各種カベオリン由来ペプチド存在下 (*Cav 1*, caveolin-1; *Cav 2*, caveolin-2; *Cav 3*, caveolin-3, 0-10 μM) で $[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ と IRS-1 と反応させ, SDS-PAGE とオートラジオグラフィーを行った. 特に caveolin-3 においてインスリン受容体キナーゼ活性の増強が認められる.

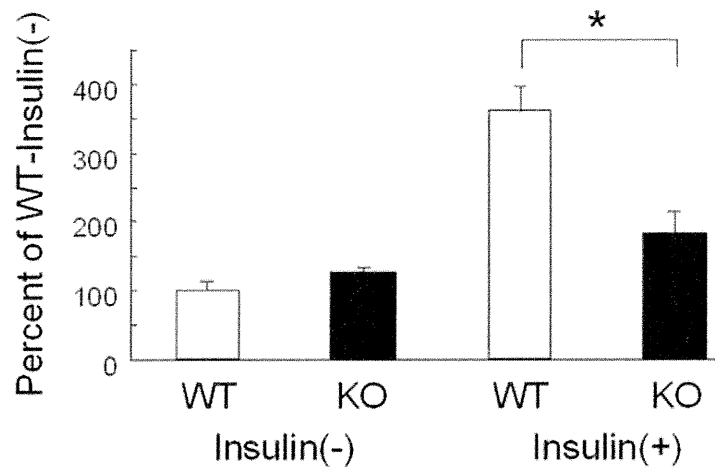
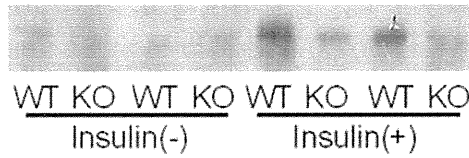
2 A

IP: IR β
IB: P-Tyr



B

IP: IRS1
IB: P-Tyr



C

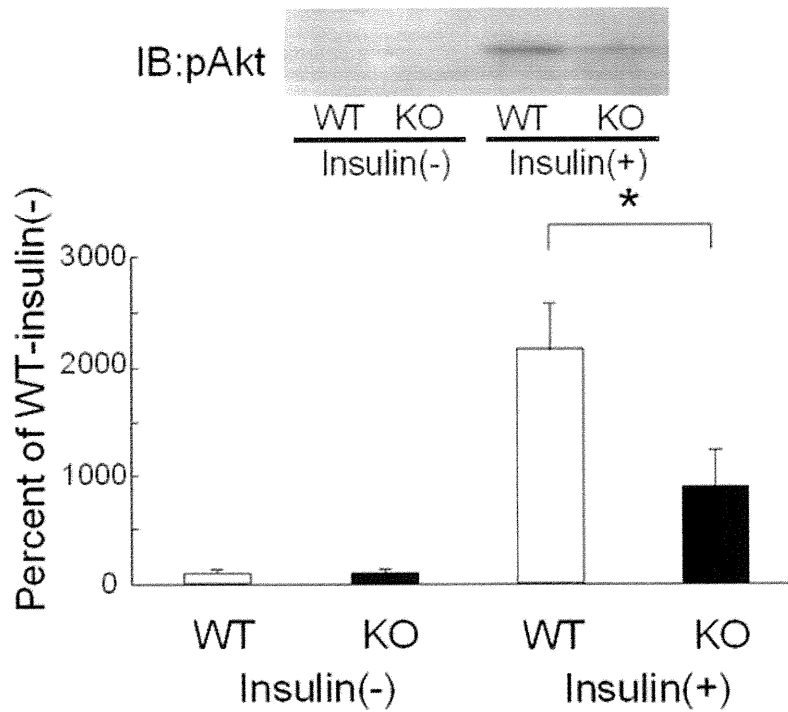


図2, カベオリン-3 ノックアウトマウスの骨格筋におけるインスリンシグナルの減弱

インスリン負荷前と負荷後の野生型(WT)とカベオリン-3 ノックアウトマウス(KO)における骨格筋におけるインスリン受容体(IR: A), IRS-1(B), Akt(C)のリン酸化を示す (*: $p < 0.05$).

図 3

A



B

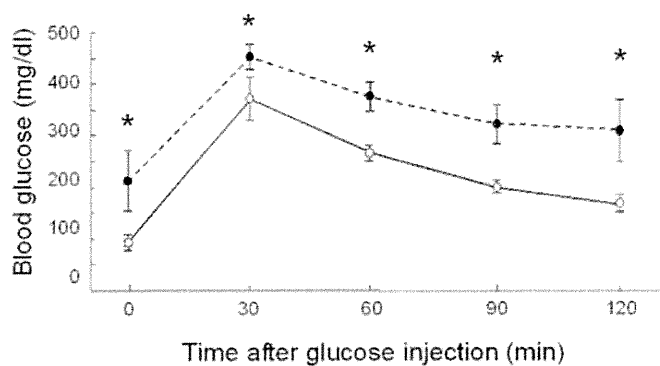


図 3, 糖負荷試験

A. 糖負荷 (矢印) 後の野生型 (○) と Cav3KO (●) の血糖値の変化を示す. B. ストレプトゾトシン処理後の糖負荷試験 (*: $p < 0.05$).

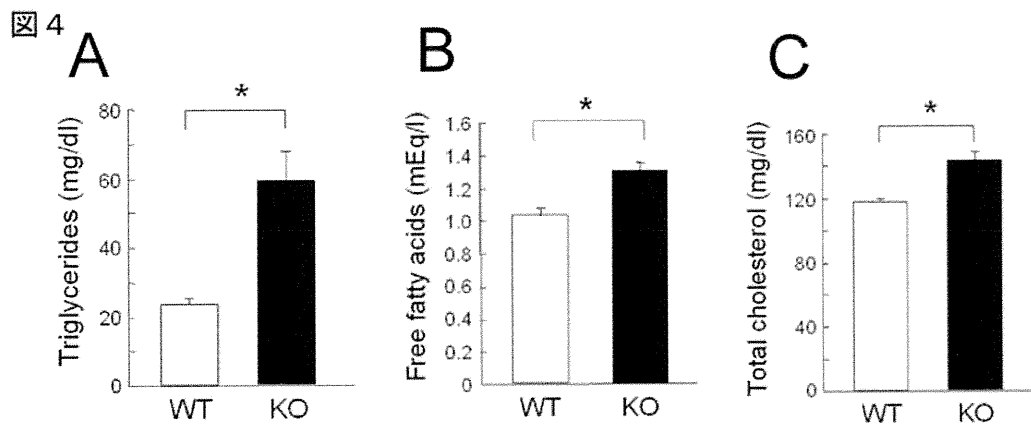


図4, 血清中の空腹時中性脂肪 (triglyceride), 遊離脂肪酸 (free fatty acid), 総コレステロール(total cholesterol) (*: $p < 0.05$).

図 5

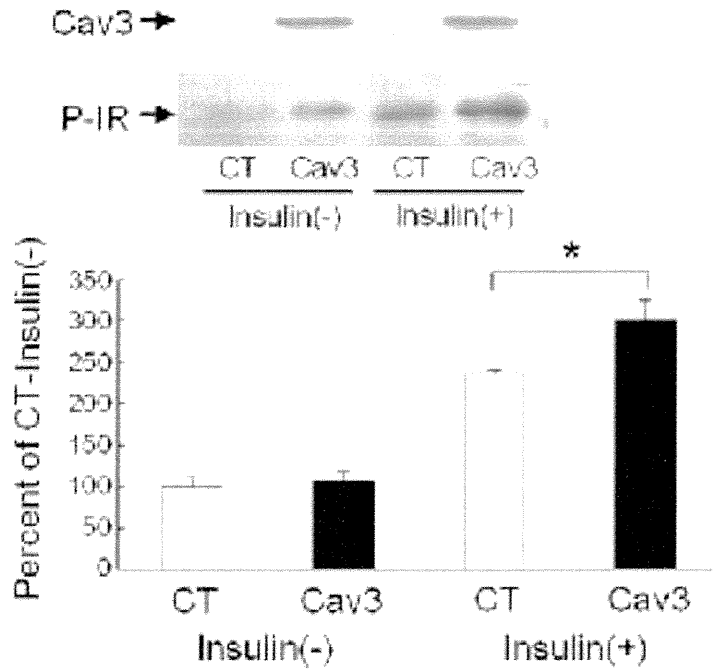
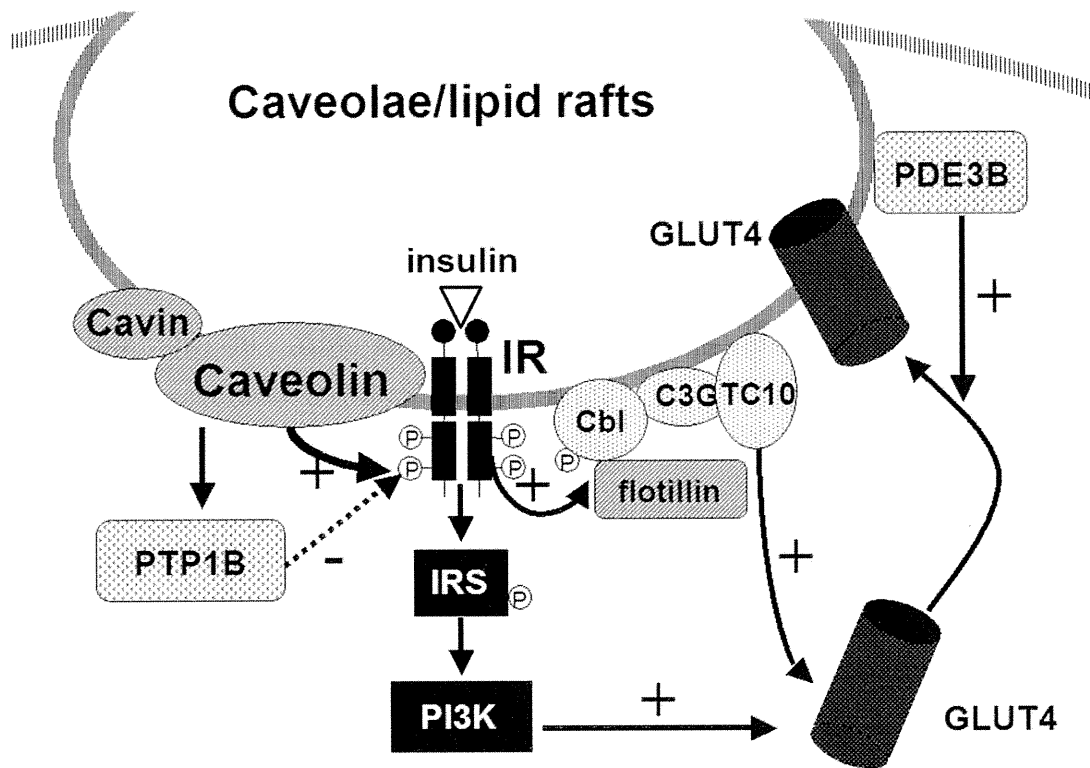


図 5, アデノウイルスによる骨格筋へのカベオリン-3 遺伝子導入によるインスリンシグナルの増強. コントロール(CT)とカベオリン-3(Cav3)を発現するアデノウイルスを骨格筋に筋肉内注射し, 48 時間後にインスリン受容体(IR)のリン酸化を観察した.

6



参考文献

- (1) Glenney JR Jr: Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *J Biol Chem*, 264: 20163-20166, 1989.
- (2) Glenney JR Jr, Soppet D: Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 10517-10521, 1992.
- (3) Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG: Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*, 68: 673-682, 1992.
- (4) Yamamoto M, Toya Y, Schwencke C, Lisanti MP, Myers MG Jr, Ishikawa Y: Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. *J Biol Chem*, 273: 26962-26968, 1998.
- (5) Tang Z, Scherer PE, Okamoto T, et al: Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem*, 271: 2255-2261, 1996.
- (6) Way M, Parton RG: M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Lett*, 376: 108-112, 1995.
- (7) Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, et al: Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol*, 19: 7289-7304, 1999.
- (8) Schwencke C, Yamamoto M, Okumura S, Toya Y, Kim SJ, Ishikawa Y: Compartmentation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signaling in caveolae. *Mol Endocrinol*, 13: 1061-1070, 1999.
- (9) Xiang Y, Rybin VO, Steinberg SF, Kobilka B: Caveolar localization dictates physiologic signaling of beta 2-adrenoceptors in neonatal cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 277: 34280-34286, 2002.
- (10) Toya Y, Schwencke C, Couet J, Lisanti MP, Ishikawa Y: Inhibition of adenylyl cyclase by caveolin peptides. *Endocrinology*, 139: 2025-2031, 1998.
- (11) Oka N, Yamamoto M,

- Schwencke C, et al: Caveolin protein kinase C. Isoenzyme-dependent regulation of kinase activity by the caveolin scaffolding domain peptide. *J Biol Chem*, 272: 33416-33421, 1997.
- (12) Fujita T, Otsu K, Oshikawa J, et al: Caveolin-3 inhibits growth signal in cardiac myoblasts in a Ca²⁺-dependent manner. *J Cell Mol Med*, 10: 216-224, 2006.
- (13) Gustavsson J, Parpal S, Karlsson M, et al: Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocyte plasma membrane. *FASEB J*, 13: 1961-1971, 1999.
- (14) Smith RM, Harada S, Smith JA, Zhang S, Jarett L: Insulin-induced protein tyrosine phosphorylation cascade and signalling molecules are localized in a caveolin-enriched cell membrane domain. *Cell Signal*, 10: 355-362, 1998.
- (15) Oshikawa J, Otsu K, Taya Y, et al: Insulin resistance in skeletal muscles of caveolin-3-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 12670-12675, 2004.
- (16) Bruning JC, Michael MD, interaction with Winnay JN, et al: A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell*, 2: 559-569, 1998.
- (17) Wojtaszewski JF, Higaki Y, Hirshman MF, et al: Exercise modulates postreceptor insulin signaling and glucose transport in muscle-specific insulin receptor knockout mice. *J Clin Invest*, 104: 1257-1264, 1999.
- (18) Cohen AW, Razani B, Wang XB, et al: Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285: C222-C235, 2003.
- (19) Fecchi K, Volonte D, Hezel MP, Schmeck K, Galbiati F: Spatial and temporal regulation of GLUT4 translocation by flotillin-1 and caveolin-3 in skeletal muscle cells. *FASEB J*, 20: 705-707, 2006.
- (20) Caselli A, Mazzinghi B, Camici G, Manao G, Ramponi G: Some protein tyrosine phosphatases

target in part to lipid rafts and interact with

caveolin-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 296: 692-697, 2002.

(21) Lee H, Xie L, Luo Y, et al: Identification of phosphocaveolin-1 as a novel protein tyrosine phosphatase 1B substrate. *Biochemistry*, 45:234-240, 2006.

(22) 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.

(23) 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

分担研究報告書

フォスホジエステラーゼ 3 型阻害薬の動脈管拡張薬としての可能性の検討

研究分担者 市川 泰広 横浜市立大学医学部循環制御医学助教

研究要旨

動脈管依存性先天性心疾患では内膜肥厚を起こさずに動脈管を開存させることが重要である。現行の動脈管拡張薬である PGE₁ は cAMP を介して動脈管を拡張させるが、同時に cAMP を増加させ内膜肥厚を誘導するヒアルロン酸を増加させる。無呼吸等の副作用も臨床上問題である。cAMP の下流に作用する PDE3 阻害薬に着目し、動脈管拡張作用と内膜肥厚作用を検討した。定量 PCR 法で胎齢 21 日ラット胎仔における PDE3 の mRNA は肺動脈、大動脈よりも動脈管で高発現していた。ミルリノン、オルプリノンをラット胎仔に腹腔内投与後、急速全身凍結法で観察すると有意に動脈管は拡張していた。また拡張時間は PGE₁ より 2-4 倍持続し、無呼吸はなかった。ラット動脈管平滑筋細胞 (DASMC) ではミルリノンは cAMP を増加させたが、ヒアルロン酸の産生を増加させなかった。さらに DASMC を用いて Boyden chamber 法で遊走能を、MTT アッセイで増殖能を測定したがミルリノンはいずれも促進しなかった。内臓錯位症候群を含めた、ヒトの先天性心疾患の手術症例 8 例の動脈管で PDE3a、PDE3b の発現を免疫組織染色法で調べると、どの症例も平滑筋層に高発現していた。PDE3 阻害薬は内膜肥厚や無呼吸を起こさずに動脈管を拡張させることが示唆された。PDE3 阻害薬は内臓錯位症候群を含めた先天性心疾患患者に使用できる可能性がある。

A. 研究目的

内臓錯位症候群の先天性心疾患にお

いて動脈管は重要な役割を果たす。下行大動脈と肺動脈のバイパスとなる

動脈管は胎児循環を維持するために必要である。生後動脈管は2つのメカニズムで閉鎖する。1つは血管収縮、もう一つは内膜肥厚である。生後数時間で動脈管が収縮する。これは自発呼吸による血中酸素分圧の上昇、胎盤が取れることでPGE2が減少するために引き起こされる。しかしこの機能的動脈管収縮の後に解剖学的閉鎖に重要である血管リモデリング、内膜肥厚が引き起こされる。

動脈管の内膜肥厚は多くの細胞が関与するプロセス、例えば平滑筋細胞の遊走、増殖、内膜層のヒアルロン酸の産生、弾性線維の減少などの結果として引き起こされる。我々はPGEがcAMP, protein kinase Aを介して引き起こされるヒアルロン酸の産生、平滑筋の遊走を促進し、その結果内膜肥厚を生じることを示した。

肺動脈閉鎖、大動脈弓の奇形（大動脈縮窄、大動脈離断等）のような動脈管依存性の先天性心疾患では生後の動脈管開存が生存に必要である。PGE1は細胞内cAMPを増加させ動脈管を開存させるため、先天性心疾患の動脈管開存維持のため広く使用されている。しかし、PGE1は同時にヒアルロン酸によって誘導される内膜肥厚を引き起こし、長期使用で動脈管を狭小化させる。またPGE1は短時間

作用型であったり、無呼吸・呼吸障害、低血圧等の副作用があることも手術までPGE1を使用することを難しくしている。このような理由でPGE1の代わりとなる動脈管拡張薬が必要とされている。

フォスホジエステラーゼ（PDE）はcAMPやcGMPを水酸化、分解する作用があり、少なくともPDE1からPDE11の11の遺伝子ファミリーがある。PDE3はPDE3AとPDE3Bの2つのサブファミリーからなり、両者ともにおもにcAMPに作用する。PDE3阻害薬はアメリカ食品医薬品局（FDA）によって心不全治療薬、血管拡張薬として認可されている。PDE3阻害薬であるミルリノンとオルプリノンは新生児に対しても、心不全治療薬、肺血管拡張薬として幅広く使用されている。過去の研究でPDE3阻害薬であるミルリノン、アムリノン、シロスタゾールはインドメタシンで収縮させた動脈管を拡張させることが報告されている。このことからPDE3阻害薬は単独で動脈管拡張作用があるのかもしれないといえる。しかしながら、PDE阻害薬がPGE1の大きな問題であるヒアルロン酸が関与する内膜肥厚を引き起こすかどうかは不明である。この研究で我々はPDE3阻害薬をPGE1治療のかわりに使用する