

ために、PDE3 阻害薬の血管リモデリング、血管拡張について検討した。

B. 研究方法

動物と試薬

全ての動物実験は横浜市立大学の倫理的規約を遵守して行った。本実験では全て日本 SLC (静岡)より購入した妊娠 Wistar rat を使用した。動脈管および大動脈、肺動脈の組織は胎生 21 日の胎仔から摘出された。ミルリノン、PDGF-BB、MTT、trichloroacetic acid は和光純薬 (大阪、日本) から購入した。オルプリノン、シロスタゾール、ロリプラム、PGE1、PGE2、エラスターゼ II、トリプシン阻害薬、アルブミン、poly-L-lysine、ペニシリン・ストレプトマイシン液、無水酢酸、DMEM、HBSS はシグマ社 (St Louis、アメリカ) から購入した。コラゲナーゼ II は Worthington Biochemical 社 (Lakewood、アメリカ) から購入した。Collagenase/dispase は Roche 社 (スイス) から、FBS は Equitech-Bio 社 (Kerrville、アメリカ) からそれぞれ購入した。

ラット動脈管平滑筋細胞の初代培養

初代培養には胎生 21 日の Wistar rat の動脈管、大動脈、肺動脈を用いた。摘出した血管組織を 800 μ l の collagenase-dispase 混合試薬 [1.5

mg/ml の collagenase-dispase (Roche、スイス)と 0.5mg/ml の elastase type II-A (SIGMA)と 1mg/ml の trypsin inhibitor type I-S (SIGMA)と 2mg/ml の bovine serum albumin fraction V (SIGMA)を Hanks' balanced salt solution (SIGMA)に溶解した液]を 1.5ml チューブに入れ、37°Cで 15 分間反応させた。細胞懸濁液を 37°C、1000rpm で遠心し、上清を取り除き、collagenase II 混合試薬[1mg/ml の collagenase II (Worthington)と 0.3mg/ml の trypsin inhibitor type I-S (SIGMA)と 2mg/ml の bovine serum albumin fraction V (SIGMA)を Hanks' balanced salt solution (SIGMA)に溶解した液]を 1.5ml チューブに入れた。37°Cで 12 分間反応させ、数回ピペティングして、poly-L-lysine (SIGMA)でコーティングした 35mm 組織培養用ディッシュに播種し、37°C、5%CO₂-21%O₂のインキュベーターで培養した。培養液は 10%の fetal bovine serum :FBS (EQUITECH-BIO. INC)と 100 U/ml の penicillin・streptomycin (SIGMA、USA)を溶解した Dulbecco's Modified 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。動脈管、大動脈、肺動脈におけるPDE3a、PDE3b、EP4、IP（プロスタサイクリン）の発現を補足Figureに示す。

先天性心疾患患者からの動脈管組織

我々は生後0日から1か月のさまざまな先天性心疾患患者8例の動脈管と付随する大動脈組織を心臓血管手術時に採取した。すべての採取された組織は3時間以内に4%のparaformaldehydeで固定した。検体は横浜市立大学附属病院、神奈川県立こども医療センターでの手術症例より採取された。この研究は横浜市立大学、神奈川県立こども医療センターの倫理委員会で承認されている。患者の病名等をTable1にまとめた。

total RNA 抽出と定量 RT-PCR

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、転倒混和後、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、混和

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 μ l加え、65°C、5分間放置後、抽出したRNAの濃度を測定した。TaKaRaのPrimeScript RT reagent Kitをプロトコールに従い、氷上で20 μ lの反応液[5X PrimeScript Buffer 4 μ l、PrimeScript RT Enzyme Mix I 1 μ l、50 μ l Oligo dT Primer 1 μ l、100 μ l Random 6 mers 1 μ l、total RNA 1 μ g相当量をRNase Free dH₂O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。定量RT-PCRはSYBR Greenを使用して行った。定量RT-PCRに使用したプライマーを以下に示す。PDE3aは(NM_017337) (5'- CGC CTG AGA AGAAGT TTG C -3' と 5'- AGA CAG CAT AGG ACG AAG TGA AG -3'), PDE3bは(NM_017229.1) (5'- TCC AAA GCA GAG GTC ATC ATC -3' と 5'- GTA TCA AGA AAT CCT ACG GGT GA -3'), EP4は(NR_032076.3) (5'- CTC GTG GTG CGA GTG TTC AT -3' と 5'- AAG CAA TTC TGA TGG CCT GC -3'), IPは(NM_00177644.1) (5'- GGG CAC GAG AGG ATG AAG -3' と 5'- GGG CAC ACA GAC AAC

ACAAC-3')である。

急速全身凍結法

胎生 21 日の Wistar rat をジエチルエーテルで麻酔し、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、ただちにミルリノン (10mg/kg、1mg/kg、0.1mg/kg)、オルプリノン (5mg/kg、0.5mg/kg、0.05mg/kg)、PGE1 (10 μ g/kg) を投与し、37°C のホットプレート (アズワン株式会社、大阪) で管理した。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。投与後 30 分、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、8 時間、12 時間まで 37°C のホットプレート上で呼吸させ、液体窒素にてそれぞれの胎仔を急速に凍結させた。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) で冷却した滑走式ミクロトーム 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。

呼吸数測定

胎生 21 日の Wistar rat をジエチルエーテルで麻酔し、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、生直後または生後 2 時間でミルリノン (10mg/kg、1mg/kg)、オルプリノン (5mg/kg、0.5mg/kg)、PGE1 (10 μ g/kg) を投与し、37°C のホットプレート (アズワン株式会社、大阪) で管理した。呼吸数は卓上型数取器でラット胎仔の胸部の動きを見ながら測定した。

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。

平滑筋細胞遊走能測定

細胞遊走能測定は 24 well plate の中に入れられる 8 μ m の小さな穴が無数にあいた膜の上で 3 日間培養した。細胞は動脈管、大動脈および肺動脈の平滑筋細胞を用い、ミルリノン (10 μ M)、PGE1 (1 μ M)、PDGF-BB (10ng/ml)、ヒアルロン酸 (200ng/ml)、ミルリノン + ヒアルロン酸で刺激した。

平滑筋細胞増殖能測定

平滑筋細胞は 24well plate に 10 万 /well になるように培養した。1 日間 FBS なしの培地で培養した後、細胞遊走能と同じ薬剤を投与し、3 日間培養した。培地を吸引し、500 μ l の 0.1%MTT 溶液をそれぞれの well に 2 時間入れ上清を除去した後、2-プロパノールで溶解した 0.05M の塩酸を 500 μ l 入れ、溶解した。それぞれの溶解液を 100 μ l ずつ 96well plate に入れ、マイクロプレートリーダーを使用して 570nm の吸光度で測定した。

PDE3a と PDE3b 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。抗体は PDE3a (sc-20792, Santa Cruz、アメリカ)、PDE3b (sc-11835) を使用した。患者症例 1,4,5,8 で動脈管と大動脈の発現量を計測するために、BIOREVO bz-9000 (KEYENCE, 大阪、日本) を用いて色抽出を行った。

cAMP 測定

cAMP 測定は過去の文献に記載されているように行った。具体的には 24well plate に動脈管平滑筋細胞を培養し、1 日間の Starvation のあと、10 分または 20 分のミルリノンによる刺激を行った。培養液を吸引し、300 μ l の氷冷した 7.5% の trichloroacetic acid を加え、反応を終了させた。40 μ l のサンプルをアセチル化させ 125 I で標識した cAMP (Perkin Elmer) と 50 μ l の rabbit anti cAMP antibody を投与した。その後マグネットビーズで標識した anti-rabbit antibody (2 次抗体) を投与し 1 時間反応させたのち、ろ過し、radioactivity を測定した。

統計処理

実験より得られた値は平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SEM) で示し、二群間の有意差検定には Student t-test を、多群間は one-way ANOVA を用い、有意水準は $P < 0.05$ 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。

ヒト検体の採取にあたっては、検体患者に対する人権擁護上の配慮、研究対象者に対する不利益等の排除に対する説明と同意（インフォームド・コンセント）を行っている。また本研究は横浜市立大学および神奈川県立こども医療センターの倫理委員会の承認を得て行っている。

C. 研究結果

PDE3a、PDE3b の mRNA はラット動脈管に高発現していた

我々はまずはじめに PDE3 阻害薬のターゲットとなる PDE3a,3b が動脈管で高発現しているかどうか調べた。胎生 21 日のラットの動脈管、大動脈、肺動脈の組織を使用して定量 RT-PCR 法により PDE3s の mRNA の発現量を調べた (Figure 1)。PDE3a の mRNA は肺動脈より動脈管において有意に高発現していた。PDE3b の mRNA は肺動脈、大動脈より動脈管

において有意に高発現していた。我々は EP4 の mRNA が動脈管で高発現していることも確認した。これらのことから PDE3 のアイソフォームは肺動脈より、動脈管で高発現していることが示された。

ラット急速全身凍結モデルにおける PDE3 阻害薬の動脈管拡張効果

PDE3 阻害薬は新生児、小児領域においても先天性心疾患の術後や心筋炎のときの低心拍出量時に広く使用されている。我々はラット新生児を用いて急速全身凍結法でミルリノン、オルプリノンが動脈管を拡張させるかどうか検討した。ラット新生児は先天性心疾患の投与時期をまねて、生直後にいずれかの薬剤を腹腔内投与した。

10 μ g/kg の PGE1 の投与（この投与量はヒトでの 1 日当たりの投与量に相当する）は、投与後 30 分で最大血管拡張を得た。この血管拡張効果は 2 時間で消失した (Figure 2A)。10mg/kg のミルリノンの投与は血管拡張効果が 12 時間まで持続した (Figure 2B 2C)。1mg/kg のミルリノン（この投与量はヒトでの 1 日当たりの投与量に相当する）の血管拡張効果が 2 時間持続し、投与後 4 時間で動脈管拡張作用は消失した。0.1mg/kg の投与量では拡張作用は示せなかった。オルプリノンでも同様の実験を行った (Figure.

2D 2E)。5mg/kg、0.5mg/kg のオルプリノンの投与では（後者の量がヒトでの 1 日当たりの投与量に相当する）、血管拡張作用が 2 時間持続した。0.05mg/kg のオルプリノン投与では動脈管を拡張させなかった。投与後 2 時間においてミルリノンとオルプリノンは濃度依存性に拡張作用を示した (Figure 2F)。

PDE3 阻害薬は呼吸障害を引き起こさなかった

呼吸障害は PGE1 の代表的な副作用であるため、我々は PDE3 阻害薬が呼吸障害を起こさないかどうか調べた。ミルリノン、オルプリノン、PGE1、コントロールを投与したラット新生児の呼吸数を計測した。生直後にそれぞれの薬剤を投与したとき、PGE1 投与群では投与後 15 分、30 分で有意に呼吸数が減少した。他方で、ミルリノン投与群(10mg/kg, 1mg/kg)、オルプリノン投与群(5mg/kg, 0.5mg/kg)では生理食塩水投与群と比較して呼吸数の減少はみられなかった (Figure 3A)。PGE1 を投与した群が生まれつきの呼吸障害があった可能性を否定するために異なったタイミングで腹腔内投与した。我々はすべてのラット新生児が生後 1 時間で呼吸が確立していることを確認し、その 1 時間後にそれぞれの薬剤を腹腔内投与した。PGE1 投

与によって 1 時間の呼吸数の減少がみられたが、ミルリノン投与、オルプリノン投与では呼吸数の減少はみられなかった (Figure 3B)。これらの結果から PDE3 阻害薬は呼吸障害を起こさないことがわかった。

ミルリノンはヒアルロン酸産生、平滑筋遊走能・増殖能を促進しなかった

PDE3 阻害薬が動脈管を拡張させることが示唆されたが、PDE3 阻害薬が動脈管の解剖学的閉鎖の鍵となる過程である内膜肥厚を引き起こすかどうかはわからないままである。PGE1 は動脈管でヒアルロン酸を産生し、平滑筋遊走を促進することは知られている。

我々は PDE3 阻害薬であるミルリノンはヒアルロン酸産生、細胞遊走能を調節しているか調べた。まずはじめに、ミルリノンが cAMP を産生するかどうか調べた。10 μ M のミルリノンは動脈管平滑筋細胞において有意に cAMP を増加させた (Figure 4A)。

(10 μ M のミルリノンは動脈管血管標本において有意に血管を拡張させた。) しかしながら動脈管平滑筋細胞において同じ濃度のミルリノンではヒアルロン酸の産生を誘導しなかった (Figure 4B)。我々は他の PDE3 阻害薬であるシロスタゾールでもヒアルロン酸産生を促進しないことを

確認した。さらにボイデンチャンバー法を用いて $1\mu\text{M}$ の PGE1 は動脈管平滑筋細胞の遊走を促進したが、ミルリノンは遊走能を促進しなかった (Figure 5A)。この実験で使用した平滑筋細胞は PGE1 で刺激されるとヒアルロン酸産生を促進し、PDGF-BB で刺激すると細胞遊走能を促進した。平滑筋の細胞増殖は動脈管における内膜肥厚において重要な役割を果たしているため、次に PDE3 阻害薬の平滑筋細胞において細胞増殖能を MTT アッセイを用いて調べた。10%FBS の存在下でも、非存在下でも、ミルリノンも PGE1 も動脈管において細胞増殖能を亢進させなかった (Figure 5B)。さらに我々は動脈管平滑筋細胞においてミルリノンはヒアルロン酸投与下での細胞遊走能、細胞増殖能に影響を与えなかった (Figure 6A 6B)。同様に大動脈平滑筋細胞、肺動脈平滑筋細胞ではミルリノンも PGE1 もヒアルロン酸産生、細胞遊走能・増殖能に影響を与えなかった (Figure 4B, 5A 5B)。これらの結果から PDE3 阻害薬は cAMP を増加させ、動脈管を拡張させる作用があるけれども、ヒアルロン酸産生能を増加させたり、細胞遊走能、細胞増殖能を増加させたりしないことが示唆された。

PDE3a と PDE3b はヒト動脈管平滑

筋層において高発現している

ヒト動脈管において PDE3a、PDE3b の発現パターンは不明である。我々は PDE3a と PDE3b タンパク発現を大動脈離断、大動脈縮窄、無脾症候群のようなさまざまな先天性心疾患の8例の動脈管について調べた。PDE3a、PDE3b の動脈管における発現はすべての症例で観察された。写真を Figure 7A に示す。PDE3a、PDE3b はラットやヒトの大動脈において高発現することは示されている。PDE3a と PDE3b の動脈管における発現は附属の大動脈組織と比較してほぼ同じくらいであった (Figure 7B)。このことは PDE3s が手術までに動脈管拡張薬の投与が必要なタイプの先天性心疾患患者の動脈管でも高発現していることを示している。

D. 考察

この研究で PDE3 阻害薬であるミルリノンとオルプリノンが呼吸障害なく PGE1 よりも長時間血管を拡張させることがわかった。これらの結果は PDE3 の発現が高発現している様々なヒトの先天性心疾患の動脈管に適用することが期待される。さらに重要なことにこの研究で内膜肥厚や動脈管の閉鎖を引き起こす過程で重要な動脈管におけるヒアルロン酸産生、平

滑筋細胞遊走能、平滑筋細胞増殖能にミルリノンには影響を与えないということを初めて示した。PDE3 阻害薬は動脈管拡張薬として好ましくない副作用が起こりにくいだらう。さらに、PDE3 阻害薬はヒトでほかの疾患にすでに使用されている。したがって PDE3 阻害薬は動脈管拡張薬として PGE1 の代替薬品となる可能性のある薬剤であるといえる。

PGE1 は G タンパクやアデニル酸シクラーゼを活性化させることによって cAMP を産生する。他方でミルリノンは cAMP の分解を抑制することで cAMP の細胞内濃度を上昇させる。PGE1 もミルリノンも cAMP を上昇させ動脈管を拡張させるけれども、PGE1 はヒアルロン酸産生を増加させ動脈管平滑筋細胞の遊走を亢進させるが、ミルリノンにはこのような作用がなかった。我々の研究では PGE1 と PDE3 阻害薬のこの違いの機序についてははっきりわからなかった。最近の研究から推測するとこの両者の違いは細胞内の分布の違いや、ほかの分子と結合しているかどうかの違い等が推測される。機序の違いにかかわらず、PGE1 と PGE2 は cAMP を増加させ、HAS2 の発現を亢進することでヒアルロン酸産生を亢進することが知られている。我々は PDE4 阻害薬で

あるロリプラムにおいてもヒアルロン酸を産生しないことを示した (Figure 4B)。cGMP の増加が関与しているのかもしれない。この問題はさらなる研究が必要である。

過去の研究で PDE3 阻害薬であるミルリノン、アムリノン、シロスタゾールがインドメタシンで収縮させたラットやヒツジの動脈管を拡張させるのを効果的に示している。これに対して我々の研究では PDE3 阻害薬の拡張作用をより臨床で使用する条件で、インドメタシンを使用しない状況で評価した。我々は比較的新しい血管拡張薬であるオルプリノンが動脈管を拡張させることも初めて示した。PDE3 阻害薬がヒアルロン酸産生を増加しないことも過去の研究では示されておらず、このことも新しい発見である。

この研究で動脈管平滑筋細胞において、ミルリノンは細胞遊走能、増殖能を亢進しないことを示した (Figure 5, 6)。過去の文献と照らし合わせてみると我々の結果は動脈管以外の平滑筋細胞にも当てはまることが示された。PDE3 阻害薬は血管平滑筋細胞において細胞増殖能、細胞遊走能を抑制すること、障害血管の内層に存在する血管平滑筋細胞の増加を抑制すること等が過去の文献で示されている。

同様に末梢肺動脈でも PDE3 と PDE4 の阻害は肺動脈平滑筋細胞の遊走を抑制することもしめされている。さらに PDE3a の欠損は細胞周期における G0/G1 周期の停止を引き起こすこともいわれている。

動脈管拡張薬として現在 PGE1 のみ臨床使用されているが、PGE1 を使用した先天性心疾患患者のうち約 18% が無呼吸や、呼吸障害をおこしている。PGE1 を投与した 2000g に満たない低出生体重児では 42% が何らかの呼吸障害を引き起こしている。本研究ではミルリノン、オルプリノンが呼吸障害を引き起こさないことを示した (Figure 3)。さらに過去の症例報告をみると PDE3 阻害薬を投与して呼吸障害が生じた報告は調べた限りではない。したがって、PDE3 阻害薬は動脈管拡張薬として使用したとき呼吸に関して好ましくない作用が出る可能性が少ないことが示唆された。一方で PDE3 阻害薬も低血圧、不整脈などの副作用が報告されている。ミルリノンは先天性心疾患手術後に生じる低拍出量症候群の危険度を低下させるが、ミルリノンの使用は頻脈性不整脈の独立したリスクファクターであることが知られている。本研究では使用した動物がラット新生児であり小さく、不整脈や血圧の変化を調べる

ことができなかった。副作用を調べるにあたって注意深いさらなる研究が必要であると考えられる。

PDE3a と PDE3b のタンパクの発現に関しては、採取した患者の日齢、病名、手術時期等にかかわらず、すべての動脈管検体において、平滑筋層および内膜肥厚部で高発現していた (Figure 7)。過去の症例報告で PDE3 阻害薬は未熟児の遷延性肺高血圧症の患者の動脈管閉鎖を阻害しているという症例があった。このようなことからこの研究で PDE3 阻害薬は内膜肥厚なしに動脈管を拡張させることが示唆され、現在先天性心疾患の治療に使用されている PDE1 の代替薬剤になる可能性があることも示唆された。

E. 結論

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、現在先天性心疾患の治療に使用されている PDE1 の代替薬剤になる可能性があることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ichikawa Y, Yokoyama U,

- Iwamoto M, Oshikawa J, Okumura S, Sato M, Yokota S, Masuda M, Asou T, Ishikawa Y, Inhibition of Phosphodiesterase Type 3 Dilates the Rat Ductus Arteriosus Without Inducing Intimal Thickening, *Circulation Journal*, in press
2. Ichikawa Y, Iwamoto M, Yanagi S, Masuda M, Intrapericardial and Retrocardial Implantation of Implantable Cardioverter Defibrillator Lead in a Child with Type 3 Long QT Syndrome, 2011, 32 (7): 1048-52, *Pediatric Cardiology*.
3. Kobayashi Y, Hirawa N, Tabara Y, Muraoka H, Fujita M, Miyazaki N, Fujiwara A, Ichikawa Y, Yamamoto Y, Ichihara N, Saka S, Wakui H, Yoshida S, Yatsu K, Toya Y, Yasuda G, Kohara K, Kita Y, Takei K, Goshima Y, Ishikawa Y, Ueshima H, Miki T, Umemura S. Mice lacking hypertension candidate gene ATP2B1 in vascular smooth muscle cells show significant blood pressure elevation, 2012 ;59(4):854-60. *Hypertension*
4. 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, 2012 ;7(5):e36724. *PLoS One*.
5. 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, *Pediatric Research*, in press
2. 学会発表
1. 市川泰広、青木理加、岩本眞理、南沢亨、横山詩子、石川義弘、出生後の血清浸透圧の変化が動脈管収縮に及ぼす作用の検討、2011年7月、福岡、日本小児循環器学会、ポスター
2. 市川泰広、金晶恵、咲間裕之、西澤崇、岩本眞理、難治性上室性頻拍に対するアミオダロン使用例の検討、2011年7月、福岡、日本小児循環器学会、ポスター
3. 市川泰広、PDE3 阻害薬は内膜肥厚を起こさずに動脈管を拡張させる、2011年8月、横浜、合同夏季研修会、口演
4. 市川泰広、横山詩子、石川義弘、PDE3阻害薬の動脈管拡張薬としての検

討、2011年9月、横浜、厚生労働省科学研究費成果発表会、口演

5. Ichikawa Y, Yokoyama U, Ishikawa Y, Inhibition of Phosphodiesterase Type 3 Milrinone Dilate the Ductus Arteriosus without Forming Intimal Thickening、2012年3月、松本、第89回日本生理学会、ポスター

6. Ichikawa Y, Yokoyama U, Ishikawa Y, Inhibition of PDE3 dilate the ductus arteriosus without forming intimal thickening, 2012年3月、福岡、第76回日本循環器学会、口演 (Featured research session)

7. Ichikawa Y, Yokoyama U, Masuda M, Asou T, Ishikawa Y, Phosphodiesterase Type 3 Inhibitor, Milrinone, Dilates the Rat Ductus Arteriosus without Inducing Intimal Thickening、2012年5月、ソウル、8th Asian Society for Pediatric Research、口演

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

参考文献

1. Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, Ghatak S, Akaike T, Segi-Nishida E, et al. Chronic activation of the prostaglandin receptor EP4 promotes hyaluronan-mediated neointimal formation in the ductus arteriosus. *J Clin Invest* 2006; **116**: 3026-3034.

2. Yokoyama U, Minamisawa S, Katayama A, Tang T, Suzuki S, Iwatsubo K, et al. Differential regulation of vascular tone and remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus. *Circ Res* 2010; **106**: 1882-1892.

3. Smith GC. The pharmacology of the ductus arteriosus. *Pharmacol Rev* 1998; **50**: 35-58.

4. Yokoyama U, Minamisawa S, Ishikawa Y. Regulation of vascular tone and remodeling of the ductus arteriosus. *J Smooth Muscle Res* 2010; **46**: 77-87.

5. Sussmann M, Sarbia M, Meyer-Kirchrath J, Nusing RM,

- Schorr K, Fischer JW. Induction of hyaluronic acid synthase 2 (HAS2) in human vascular smooth muscle cells by vasodilatory prostaglandins. *Circ Res* 2004; **94**: 592-600.
6. Mitani Y, Takabayashi S, Sawada H, Ohashi H, Hayakawa H, Ikeyama Y, et al. Fate of the "opened" arterial duct: Lessons learned from bilateral pulmonary artery banding for hypoplastic left heart syndrome under the continuous infusion of prostaglandin E1. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; **133**: 1653-1654.
7. Maurice DH, Palmer D, Tilley DG, Dunkerley HA, Netherton SJ, Raymond DR, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. *Mol Pharmacol* 2003; **64**: 533-546.
8. Begum N, Hockman S, Manganiello VC. Phosphodiesterase 3A (PDE3A) deletion suppresses proliferation of cultured murine vascular smooth muscle cells (VSMCs) via inhibition of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling and alterations in critical cell cycle regulatory proteins. *J Biol Chem* 2011; **286**: 26238-26249.
9. Klein L, O'Connor CM, Leimberger JD, Gattis-Stough W, Pina IL, Felker GM, et al. Lower serum sodium is associated with increased short-term mortality in hospitalized patients with worsening heart failure: results from the Outcomes of a Prospective Trial of Intravenous Milrinone for Exacerbations of Chronic Heart Failure (OPTIME-CHF) study. *Circulation* 2005; **111**: 2454-2460.
10. Niemann JT, Garner D, Khaleeli E, Lewis RJ. Milrinone facilitates resuscitation from cardiac arrest and attenuates postresuscitation myocardial dysfunction. *Circulation* 2003; **108**: 3031-3035.
11. Greenberg B. Acute decompensated heart failure - treatments and challenges. *Circ J* 2012; **76**: 532-543.
12. Thomas SS, Nohria A. Hemodynamic classifications of acute heart failure and their clinical application: - an update. *Circ J* 2012; **76**: 278-286.

13. Bassler D, Choong K, McNamara P, Kirpalani H. Neonatal persistent pulmonary hypertension treated with milrinone: four case reports. *Biol Neonate* 2006; **89**: 1-5.
14. Bassler D, Kreutzer K, McNamara P, Kirpalani H. Milrinone for persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Cochrane Database Syst Rev* 2010: CD007802.
15. Toyoshima K, Momma K, Imamura S, Nakanishi T. In vivo dilatation of the fetal and postnatal ductus arteriosus by inhibition of phosphodiesterase 3 in rats. *Biol Neonate* 2006; **89**: 251-256.
16. Liu H, Manganiello V, Waleh N, Clyman RI. Expression, activity, and function of phosphodiesterases in the mature and immature ductus arteriosus. *Pediatr Res* 2008; **64**: 477-481.
17. Yokoyama U, Minamisawa S, Adachi-Akahane S, Akaike T, Naguro I, Funakoshi K, et al. Multiple transcripts of Ca²⁺ channel alpha1-subunits and a novel spliced variant of the alpha1C-subunit in rat ductus arteriosus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; **290**: H1660-1670.
18. Akaike T, Jin MH, Yokoyama U, Izumi-Nakaseko H, Jiao Q, Iwasaki S, et al. T-type Ca²⁺ channels promote oxygenation-induced closure of the rat ductus arteriosus not only by vasoconstriction but also by neointima formation. *J Biol Chem* 2009; **284**: 24025-24034.
19. Yokoyama U, Patel HH, Lai NC, Aroonsakool N, Roth DM, Insel PA. The cyclic AMP effector Epac integrates pro- and anti-fibrotic signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 6386-6391.
20. Hoffman TM, Wernovsky G, Atz AM, Kulik TJ, Nelson DP, Chang AC, et al. Efficacy and safety of milrinone in preventing low cardiac output syndrome in infants and children after corrective surgery for congenital heart disease. *Circulation* 2003; **107**: 996-1002.
21. Taoka M, Shiono M, Hata M, Sezai A, Iida M, Yoshitake I, et al. Child with fulminant myocarditis survived by ECMO Support--report of a child case. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2007; **13**: 60-64.

22. Lewis AB, Freed MD, Heymann MA, Roehl SL, Kensey RC. Side effects of therapy with prostaglandin E1 in infants with critical congenital heart disease. *Circulation* 1981; **64**: 893-898.
23. Tananari Y, Maeno Y, Takagishi T, Sasaguri Y, Morimatsu M, Kato H. Role of apoptosis in the closure of neonatal ductus arteriosus. *Jpn Circ J* 2000; **64**: 684-688.
24. Boudreau N, Rabinovitch M. Developmentally regulated changes in extracellular matrix in endothelial and smooth muscle cells in the ductus arteriosus may be related to intimal proliferation. *Lab Invest* 1991; **64**: 187-199.
25. Reinhardt RR, Chin E, Zhou J, Taira M, Murata T, Manganiello VC, et al. Distinctive anatomical patterns of gene expression for cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Clin Invest* 1995; **95**: 1528-1538.
26. Palmer D, Maurice DH. Dual expression and differential regulation of phosphodiesterase 3A and phosphodiesterase 3B in human vascular smooth muscle: implications for phosphodiesterase 3 inhibition in human cardiovascular tissues. *Mol Pharmacol* 2000; **58**: 247-252.
27. Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; **41**: 661-690.
28. Houslay MD. Underpinning compartmentalised cAMP signalling through targeted cAMP breakdown. *Trends Biochem Sci* 2010; **35**: 91-100.
29. Netherton SJ, Jimmo SL, Palmer D, Tilley DG, Dunkerley HA, Raymond DR, et al. Altered phosphodiesterase 3-mediated cAMP hydrolysis contributes to a hypermotile phenotype in obese JCR:LA-cp rat aortic vascular smooth muscle cells: implications for diabetes-associated cardiovascular disease. *Diabetes* 2002; **51**: 1194-1200.
30. Souness JE, Hassall GA, Parrott DP. Inhibition of pig aortic smooth muscle cell DNA synthesis by selective type III and type IV cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors. *Biochem Pharmacol*

1992; **44**: 857-866.

31. Pullamsetti S, Krick S, Yilmaz H, Ghofrani HA, Schudt C, Weissmann N, et al. Inhaled tolafentrine reverses pulmonary vascular remodeling via inhibition of smooth muscle cell migration. *Respir Res* 2005; **6**: 128.

32. Meckler GD, Lowe C. To intubate or not to intubate? Transporting infants on prostaglandin E1. *Pediatrics* 2009; **123**: e25-30.

33. Shin DD, Brandimarte F, De Luca L, Sabbah HN, Fonarow GC, Filippatos G, et al. Review of current and investigational pharmacologic agents for acute heart failure syndromes. *Am J Cardiol* 2007; **99**: 4A-23A.

34. Smith AH, Owen J,

Borgman KY, Fish FA, Kannankeril PJ. Relation of Milrinone After Surgery for Congenital Heart Disease to Significant Postoperative Tachyarrhythmias. *Am J Cardiol* 2011; **108**: 1620-1624.

35. Yasuda K, Koyama N, Nomura T, Suzuki Y. Effects of phosphodiesterase 3 inhibitors to premature PDA. *Journal of Japan Society for Premature and Newborn Medicine* 2004; **16**: 395 (Japanese).

36. Nakamura M, Yamanouchi T, Taguchi T, Suita S. Effect of phosphodiesterase III inhibitor on persistent pulmonary hypertension of neonate associated with congenital diaphragmatic hernia: a case report. *J Jpn Soc Pediatr Surg* 2001; **37**: 1073-1077 (Japanese).

Fig. 1

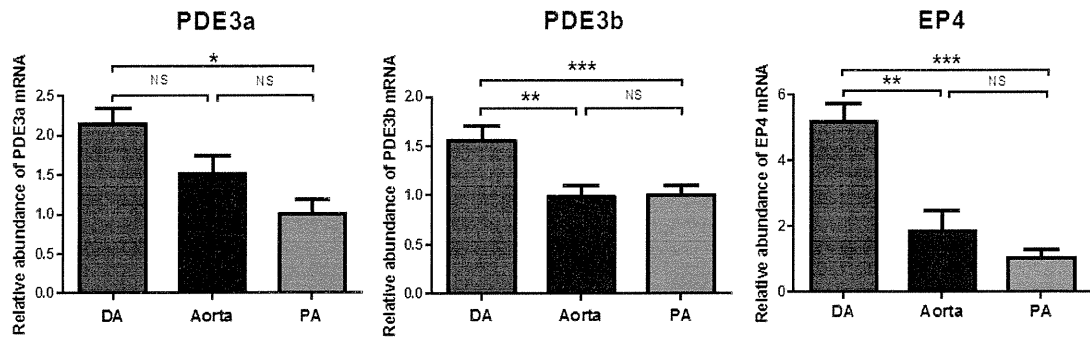


Figure 1

胎生 21 日ラット動脈管 (DA)、大動脈 (Aorta)、肺動脈(PA)における PDE3a、PDE3b、EP4 の定量 RT-PCR 解析。n = 4-5, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NS indicates not significant.

Figure 2

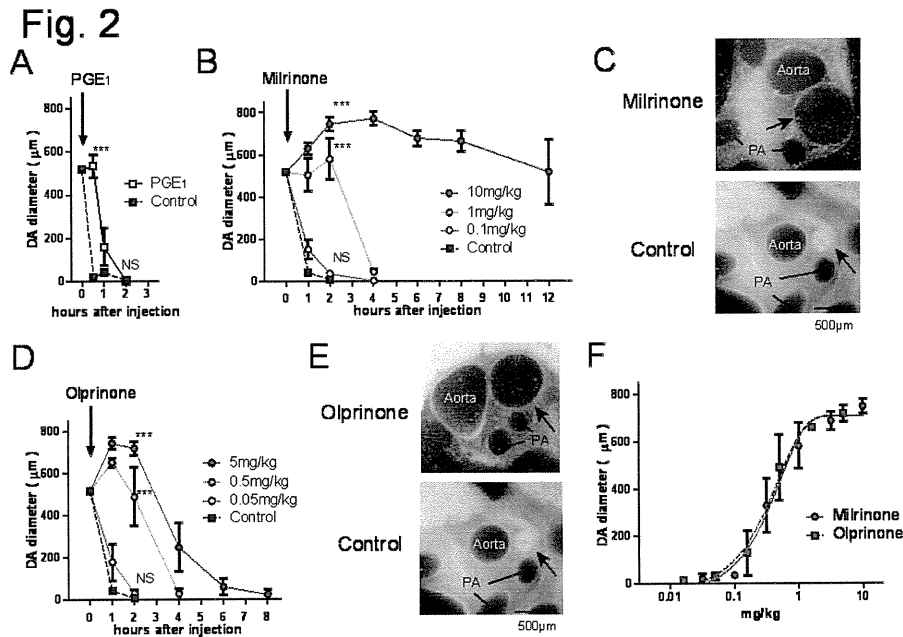
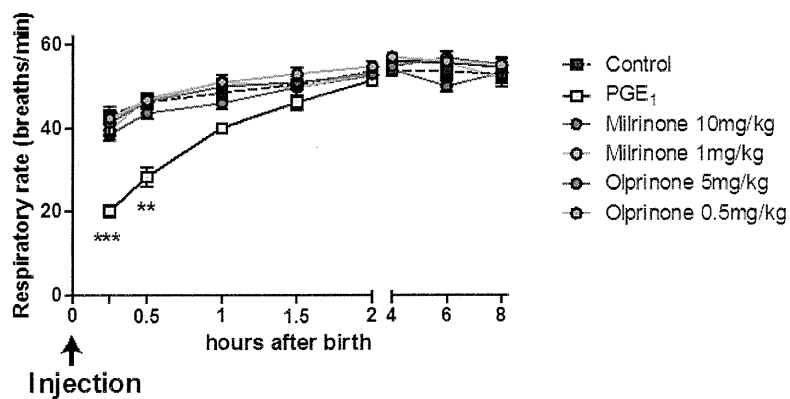


Figure 2 急速全身凍結法によって得られたミルリノンとオルプリノンの動脈管拡張効果。(A) PGE1 (10µg/kg) のラット動脈管拡張効果 (n = 4-6)。(B) ミルリノンのラット動脈管拡張効果。ラット新生児は腹腔内投与によってミルリノンを投与された (n = 4-6)。(C) 急速全身凍結法を用いて 10 mg/kg のミルリノン、コントロールを投与したときの写真。(矢印が動脈管) (D) オルプリノンのラット動脈管拡張効果。ラット新生児は腹腔内投与によってオルプリノンを投与された (n = 4-6)。(E) 急速全身凍結法を用いて 5 mg/kg のミルリノン、コントロールを投与したときの写真。(矢印が動脈管) (F) ミルリノン、オルプリノンともに濃度依存性に拡張作用を有する。血管拡張効果は PDE3 阻害薬を投与後 2 時間で計測した (n = 4-6)。*** $p < 0.001$ and NS vs. control. NS indicates not significant.

Figure 3

Fig. 3

A



B

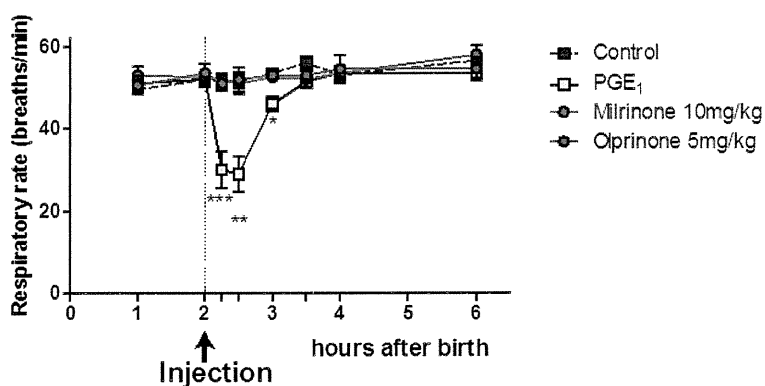


Figure 3 PDE3 阻害薬と PGE₁ の呼吸抑制作用。(A) 生直後にそれぞれの薬剤を投与したときのラット新生児の呼吸回数。Figure 2 と同じタイミングで投与した (n = 6–9)。(B) 生後 2 時間にそれぞれの薬剤を投与したときのラット新生児の呼吸回数 (n = 4)。**p* < 0.05, ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001 vs. control. No mark indicates not significant vs. control.

Figure 4

Fig. 4

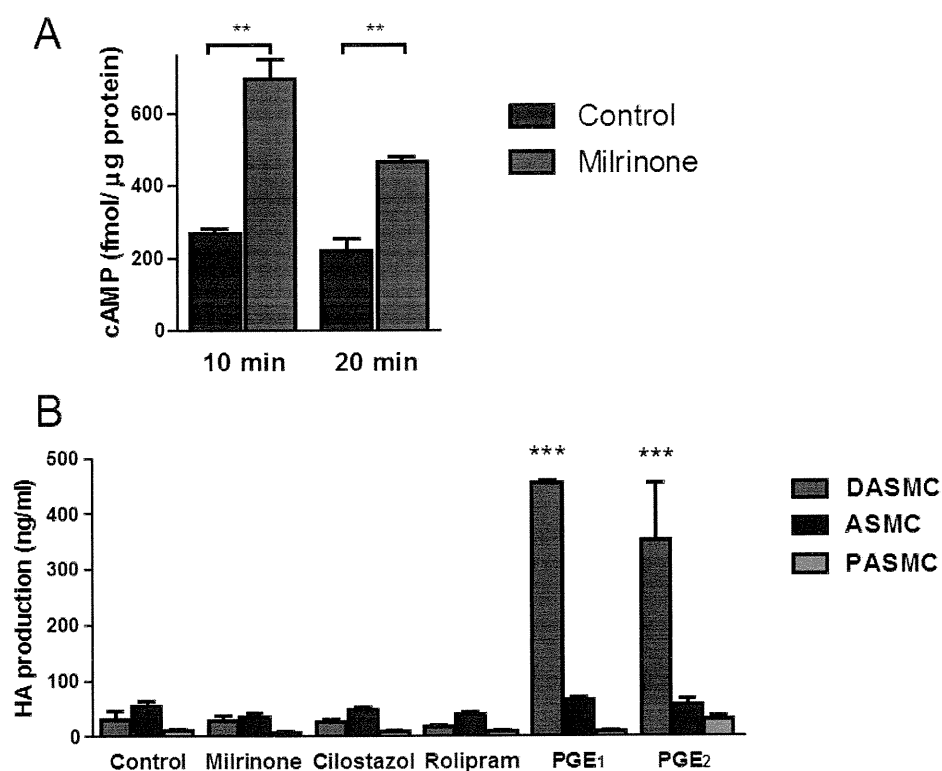


Figure 4 ミルリノン は cAMP の産生を増加させるが、ヒアルロン酸産生を誘導しない。(A) 10 μ M のミルリノンは動脈管平滑筋細胞において cAMP を有意に増加させる。(B) さまざまな薬剤で平滑筋細胞を刺激したときのヒアルロン酸の産生。milrinone (ミルリノン; 10 μ M), cilostazol (シロスタゾール; 10 μ M), rolipram (ロリプラム; 10 μ M), PGE₁ (1 μ M), or PGE₂ (1 μ M) (n = 4–6). Cilostazol: PDE3 inhibitor. Rolipram: PDE4 inhibitor. ** p < 0.01 and *** p < 0.001 vs. control. No mark indicates not significant vs. control. DASMC:動脈管平滑筋細胞、ASMC:大動脈平滑筋細胞、PASMC:肺動脈平滑筋細胞。

Figure 5

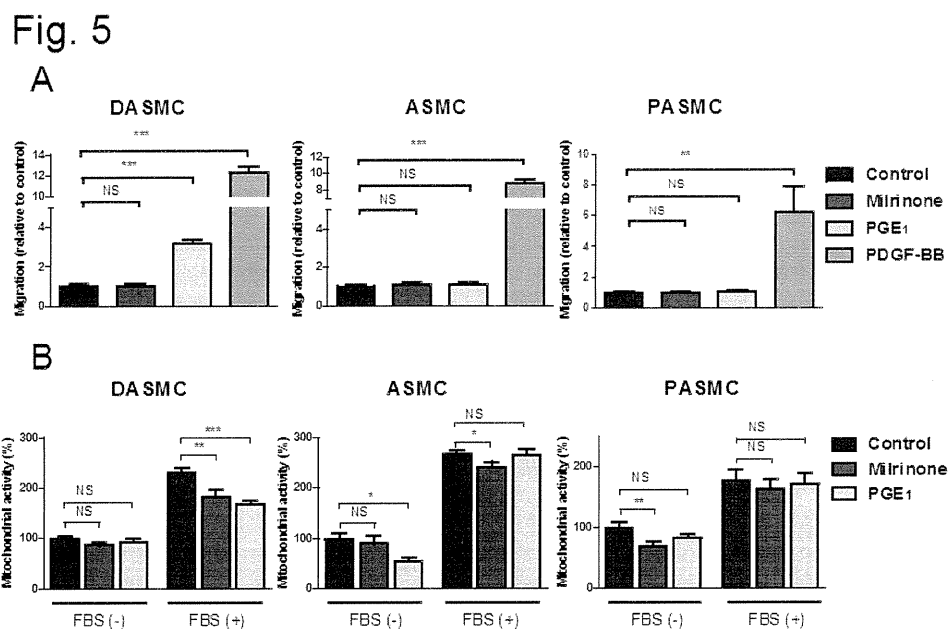


Figure 5 ミルリノン平滑筋細胞において細胞遊走能、細胞増殖能を促進しない。(A) ボイデンチャンバー法を用いてミルリノン (10 μ M), PGE₁ (1 μ M), PDGF-BB (10 ng/ml)で刺激したときの血管平滑筋の細胞遊走能 (n = 4–5)。(B) MTT アッセイでミルリノン (10 μ M), PGE₁ (1 μ M) で刺激したときの細胞増殖能 (n = 5–9)。* p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001. NS indicates not significant. DASMC:動脈管平滑筋細胞、ASMC:大動脈平滑筋細胞、PASMC:肺動脈平滑筋細胞。