

3) 治療の目標

腫瘍に対する放射線治療は、その目標からみて、主に以下の4つに分けられる。

a. 根治的治療

治癒を目的とした治療である。これは、原発病巣が進行していない、播種や遠隔転移がない、腫瘍の放射線感受性が低くない、腫瘍周囲に放射線感受性の高い重要な正常組織が存在していない、患者の全身状態がある程度保たれているなどの条件が満たされている場合である。腫瘍によっては、これらの条件が満たされ、①放射線を単独照射する場合、②腫瘍の放射線感受性が高いが、腫瘍サイズが大きすぎて外科的切除が困難な場合、③手術前に照射を行い、腫瘍の縮小後に外科的切除を行う場合、④低悪性度の腫瘍において外科的不完全切除後の顕微鏡病変に対する術後照射などがあてはまる。

b. 準根治的治療

根治的治療の対象以外で、手術など他に第一選択治療が存在するが、動物の年齢や全身状態により手術の適応とならない場合や、臓器の形態や機能の温存を重視する状況、飼い主が第一選択治療として手術を拒否する場合があてはまる。

なお、獣医療においては、b.であっても治癒が期待できるのであれば、a.の根治的治療に含むことが一般的である。

c. 緩和的治療

根治は期待できないが、動物のQOL(生活の質 quality of life)の向上を目的として治療を行うものがあてはまる。すでに転移が明らかであっても、たとえば骨転移に対する疼痛の緩和と病的骨折の防止などの目的で、また、転移はしていないが手術不適応で再発の可能性がきわめて高い場合に行う。

d. 予防的治療

現在転移はしていないが、腫瘍の挙動として高い転移率を示す場合、領域リンパ節に予防的照射する方法である。獣医療ではイヌの口腔内悪性黒色腫に対しては、口腔内原発巣とともに照射時に転移が確認されない場合でも領域リンパ節に予防的照射をしばしば行う。

(1)~3) : 藤田道郎

4) 照射方法

(1) 照射前処置(全身麻酔)

放射線治療では、日常生活あるいは通常の獣医臨床では全く考えられないほどの大線量の放射線が局所に照射される。それにもかかわらず、照射に伴う痛みや熱感は全く感じないことから、ヒトの放射線治療は無麻酔で行われる。毎回の放射線治療に要する照射時間は数分~10分間程度である。動物の場合、放射線を腫瘍に正確に照射するには、たとえ照射が短時間であっても全身麻酔またはそれに準じた不動化処置を行い、放射線治療装置の寝台に動物を正確に保定する必要がある。

また、発がんする動物は普通高齢であり、様々な基礎疾患を有し、さらに腫瘍の影響で全身状態が悪化している場合も珍しくない。そのような動物に対して、頻回の全身麻酔は動物の負担となるため、放射線治療を実施する際は注意が必要である。

なお、たとえ防護服を着用していても、放射線照射中に治療室に入ることはできない。

(2) 治療計画

放射線治療を実施するには、あらかじめ治療計画(プロトコル)を作成する。具体的には、放射線の選択(X線か電子線か)、総線量、照射回数(何方向から腫瘍に照射するか)、照射回数(これにより1回あたりの線量が決まる)、照射領域、照射間隔(何日おきに放射線治療を行うか)などを設定する。これらは治療効果や副作用発現の程度に大きく影響するため、治療計画は慎重に立てなければならない。

腫瘍に対する放射線治療の効果は、腫瘍に照射した総線量に依存する。しかし、1回あたりの線量を高くすると、腫瘍周囲の正常組織に晩発障害〔第3章 79頁 参照〕を引き起こす可能性が高くなる。晩発障害は不可逆性の障害であり、その多くは臨床的に非常に深刻な事態を招く。そこで、1回あたりの線量を低くし総線量を高くするためには、多数回にわたり繰り返して照射する必要がある(例:週3~5回で3 Gyを20回照射すると総線量は60 Gy)。

放射線ががんに照射する際、放射線の経路にあたる正常組織も被ばくしてしまう。そこで、同じ線量であっても、腫瘍に対して複数方向から分散して照射を行えば、正常組織への被ばく量を軽減することができる。このような照射方法を多門照射と呼ぶ。

a. 根治的治療

根治的治療とは腫瘍に対し高い総線量で放射線を照射し、腫瘍の根治を目指す治療方法である。したがって晩発障害を避けるため、前述のように週3~5回の頻度で照射し、分割回数を多く設定して実施される。

b. 緩和的治療

緩和的治療は1回あたりの線量を高くし(例:6~8 Gy)、週1回程度の頻度で、照射回数を3~6回に設定して実施される(例:8 Gyを4回照射すると総線量は32 Gy)。根治的治療と比較して緩和的治療は、総線量が低くなることから腫瘍に対する効果が劣ること、1回あたりの線量が高いことから晩発障害を引き起こす可能性が高くなる。したがって、緩和的治療を選択する場合は、腫瘍の性質、緩和的治療としての適応、症例の予後をよく考慮して、プロトコルを選択しなければならない。

(3) 外科手術との併用による放射線照射

外科手術に際しては、悪性腫瘍を体に残すことなく完全に切除することが理想である。しかし、発生部位によっては解剖学的あるいは機能的な制約により、完全切除は困難な場合もあり、腫瘍組織の一部を患部に残すこととなる。その例として、頭頸部は広汎な切除術を実施することが難しい。また、四肢の腫瘍においては断脚しないと、腫瘍の完全切除が達成できない症例も珍しくない。一方、放射線治療は機能や外貌をあまり損ねることがなく治療が可能である。しかし、放射線治療は小さな腫瘍に対する効果は高いものの(1 cm以下、理想的には肉眼ではみえない程度)、腫瘍が大きくなると、低酸素細胞が内部に増えるため、効果は急激に低下する。放射線治療で直径が2~3 cm以上になった腫瘍組織を死滅させるためには60 Gy以上の高線量が必要となり、放射線治療単独で大型腫瘍の根治を望むことは難しくなる。

そこで、外科手術と放射線治療を組み合わせると両者の欠点が埋め合わせられ、理想的な腫瘍の治療が理論的に可能となる。まず、外科手術で肉眼病変を切除する。そして、肉眼的な取り残し部位、周囲に浸潤した腫瘍、あるいは付属リンパ節に対して放射線治療を行う(術後照射)。また、外科手術で摘出が困難な大きさに増大した腫瘍に対して、外科手術に先行して放射線治療を行うこともある(術前照射)。これは放射線照射により腫瘍を縮小させて切除を容易にし、なおかつ腫瘍細胞の活性を低下させること

で、局所の再発や術中の転移を防止する効果がある。

さらに、手術中に照射を行うこともある。これは、腫瘍切除直後、手術創を開いたままの腫瘍床に対し電子線を1回照射し、残存する腫瘍細胞を死滅させることを目的として行われ、これを術中照射という。腫瘍を完全に切除できなかった場合、あるいは腫瘍の特徴として浸潤性が高く、手術計画の段階から完全切除が難しいと予測される腫瘍には、この術中照射が有効な場合がある。

5) 分割照射に関与する4R

分割照射を行うと照射された細胞あるいは組織においては、次の照射までの期間に様々な現象が起こる。この現象は治療期間中の照射のたびに繰り返されることとなり、放射線治療の効果を修飾(増強)する因子として重要である。この現象には修復repair, 同調reassortment, 再増殖repopulation, 再酸素化reoxygenationがあり、これらを総称して4Rと呼ぶ。

(1) 修復

総線量が同じであっても、複数回に分割して照射すると、放射線障害の程度は軽くなる。その理由は、各照射間において修復可能な障害が修復されるためである〔亜致死損傷sub-lethal damage(SLD)の修復:第3章 53頁 参照〕。細胞に放射線を照射した場合、細胞の生存率は次の照射までの間隔を長くするほど高くなる。一般に照射からおおむね6時間以上経過すると、修復過程は終了する。正常組織と比較して、腫瘍組織は損傷からの修復が遅い。したがって、分割回数を増やすと、正常組織と腫瘍組織との間に照射による障害の差が拡大され、殺腫瘍効果が高くなる。

(2) 同調

一般に細胞は分裂期(M期)で放射線感受性が高くなり、DNA合成期(S期)で低くなる。また、M期のあとからS期までの間をG₁期と呼ぶが、G₁早期は放射線抵抗性であるが、G₁後期からS期前期にかけては放射線感受性が高くなる。さらに、S期のあとからM期までの間をG₂期と呼ぶが、G₂期はM期と同様に放射線感受性が高い。細胞周期と細胞の放射線感受性については第3章 62頁 2)放射線作用を修飾する機構も参照されたい。

細胞に放射線照射を行うと、細胞周期がG₂/M期(G₂期とM期)にある細胞は放射線に対する感受性が高いために死滅するが、S期の細胞は抵抗性であるため残存する。残存した細胞は細胞周期の進行に伴ってG₂/M期へと移行する。ここで、腫瘍細胞ではG₂期チェックポイント機構が働き、細胞周期は進行せず、G₂/M期で停止する(遅延、G₂ブロック)。このため、組織内ではG₂/M期の割合が増加することとなり、細胞周期が部分的に同調する。しばらくすると、G₂ブロックが解除され、これらの細胞は一斉にM期に入る。しかし、遅延の程度は個々の細胞間で差があり、照射によって同調されていた細胞集団は、最終的に細胞周期上でほぼ元通りに一定の割合で再分布することとなる。G₂ブロックは線量に依存し、一般にG₂ブロックが長い細胞は死滅(分裂死)する確率が高い。

理論的には、様々な細胞周期を回っている細胞に対して分割照射を行うことにより、その細胞周期が同調する可能性があり、1回目の照射で細胞をG₂/M期に集積したうえで、次のG₂/M期に2回目の照射を行えば、がんの致死効果を増強できると考えられる。事実、培養系でのがん細胞を用いた実験では特定の時間間隔で照射すると、放射線に対する感受性が高くなるという現象が観察される。しかし、実

際の放射線治療では、個々のがんに対する適切な投与線量と照射間隔を予測することは困難なため、この現象を利用した有用な照射法はまだ開発されていない。そのため、予想よりもがんの致死効果が強く発現した時に、本現象の可能性が示唆される程度にとどまっている。

(3) 再増殖

照射によって細胞周期がG₂/M期で停止したのち、細胞は再度分裂を開始する。これを再増殖という。しかし、損傷の修復が起らなかった細胞については、分裂死が生ずる。

(4) 再酸素化

腫瘍は病理形態的には均一であっても、毛細血管を中心としてみた場合、内部の酸素および栄養供給は不均一である。毛細血管近傍の腫瘍細胞は、栄養分や酸素が十分に供給され、増殖能力は旺盛である。増殖が速い腫瘍は、容積が急速に増大することから、結果的に毛細血管の新生が間に合わなくなる。血管から離れた細胞は栄養分や酸素の供給が不十分となり、増殖能力は毛細血管から離れるほど低下し、約150 μ m以上離れると細胞は壊死に陥る。がん細胞は酸素に依存して増殖、そして壊死に陥る一連の過程をたどり、壊死組織周辺は慢性の低酸素状態と考えられる。このようながん細胞と毛細血管との組織学的構成を腫瘍コード(図4-3参照)という。

腫瘍内で発生する低酸素細胞の酸素分圧はかなり低く、3~4 mmHg以下である。低酸素細胞は酸素効果が期待できないため、酸素飽和細胞と比較して3倍程度の放射線抵抗性を示す。なお、酸素は今日までに知られている線量効果関係の修飾因子のうちで、最も修飾係数が大きい。

低酸素細胞を含む腫瘍に対して放射線照射を行うと、十分な酸素下にある細胞が先に死滅する。これに血管の発育が伴って、これまで低酸素状態にあった細胞が毛細血管から酸素が供給され、再酸素化が起こると考えられている。分割照射を行うと、そのつど低酸素細胞の再酸素化が期待されるため、分割照射は悪性腫瘍に対する有効な治療法であると考えられる。

無酸素での放射線感受性と酸素分圧との関係は、10 mmHg程度までは急激に上昇する。しかし、放射線感受性が高まる酸素分圧は、空気中の酸素分圧と比較してかなり低く、20 mmHgあたりで酸素増感比(OER)が一定となる(第3章 62頁 (2)酸素効果も参照)。ヒトの正常組織における酸素分圧は40~100 mmHgであるとされている。したがって、再酸素化による効果は正常組織ではみられない。

6) リニアックと常用電圧放射線治療装置を用いた治療

(1) リニアックによる放射線治療

リニアックは現在、主流の外部放射線治療装置である。本装置は電子銃から発射された電子を直線軌道の加速管内で加速することから、正式な名称は直線加速器linear accelerator(LINAC)である。LINACという略称からリニアックとも呼ばれる。加速された電子線は、非常に高エネルギーであり、装置により2~20 MeVの電子線を照射することが可能である。

また、この電子線をターゲットに衝突させると高エネルギーのX線が発生し(装置により4~22 MV)、この高エネルギーX線が治療に用いられる。このX線の発生機構は、第1章 10頁 c.X線発生装置、第5章 111頁 X線撮影装置で述べるような、標的に電子を打ち込んで制動X線を生じさせるという原理の基本は同じである。しかし、リニアックの場合は、電位差ではなく加速管を用いて電子をきわ

めて高速に加速させることから、得られるX線のエネルギーは桁違いに大きいという特徴があり、より深部の腫瘍の治療に有効である。また、リニアックによる腫瘍の治療では、電子線とX線の特徴を生かしたそれぞれの放射線による治療法がある。

電子線の特徴は、飛程(第1章 20頁 参照)は短く、入射面から一定の深度で急激に減衰し、さらに入射する電子のエネルギーによって、到達度が決まることである。したがって、電子線は表在する病変への治療(例:皮膚腫瘍)に有用である。また病変の深部には放射線障害を起こしやすい正常組織が存在するために被ばくを避けたい場合にも適する(胸壁腫瘍、術中照射など)。リニアックでは治療に用いる電子線のエネルギーを選択することができる。軟部組織における電子線の最大線量が80%となる深度は、エネルギー値(MeV)を3で割った値(cm)となる。したがって、エネルギーが3 MeVの電子線を選択すれば、深度は1 cm程度となる。

一方、リニアックからのX線は、CTなどの断層像を利用して腫瘍の位置と形態を事前に読み込んで治療計画を立てると、深部の腫瘍に正確に照射したり、多方向からのX線ビームを腫瘍に集めて照射したりすることが可能である。リニアックで使用されている加速管は、真空中で電子を直線状にほぼ光速に近い速度に加速させる導波管の一種である。その原理は、マイクロ波の位相速度を電子の速度に合わせることにより、マイクロ波の加速電界に乗せた電子を連続的に加速させるものである。これはサーフボードのように波に乗って加速する様子に似ていることから、波乗り現象といわれる。

リニアック治療装置(図4-6)で発生した高エネルギーの電子線あるいはX線は、照射ヘッドから患部へ照射される。照射ヘッドはガントリーに乗せられた状態で360°回転するので、自由な角度から病巣部に照射を行うことができる。照射対象は照射野の中心で、なおかつガントリーの回転軸の延長線上(アイソセンター isocenter)におかれる。ここで腫瘍の形は照射する角度により投影像が変化することから、リニアックに装備されているマルチリーフコリメーター(多分割原体絞り装置 multi-leaf collimator: MLC)は、X線を腫瘍に限り絞り込み(コリメート)、周囲の正常組織への照射を最小限にとどめるうえで重要な役割を果たしている。

マルチリーフコリメーター(図4-7)は5~10 mm幅のタングステンスリットが多数組み合わせられた装置で、これをコンピューター制御によって自由に動かすことにより個々の腫瘍の形に対応した線量分布をもつ照射野を作ることができる。

(2) 常用電圧(オルソボルテージ)による放射線治療

X線管を線源とした治療装置は、その管電圧が10~300 kVの範囲にとどまることから、常用電圧(オルソボルテージ)放射線治療装置と称される。X線管から発生したX線は表層で吸収されやすく、皮膚などの体表腫瘍の治療に適している。その反面、体内深部には到達しにくく、強い皮膚障害を伴う可能性が高い。現在、医学領域では本装置による治療はほとんど行われていない。

7) 強度変調放射線治療、定位放射線照射

放射線治療の効果を上げるためには、腫瘍に照射する線量を高くすればよい。しかし、それは腫瘍周囲の正常組織にも強い機能障害をもたらすことにもつながる。そこで、腫瘍の形状に合わせた(原体照射)、あるいは腫瘍に集中した照射を行えば、高線量による理想的な治療が可能となる。原体性を高める照射を目的としたものとしては強度変調放射線治療 intensity modulated radiation therapy (IMRT),

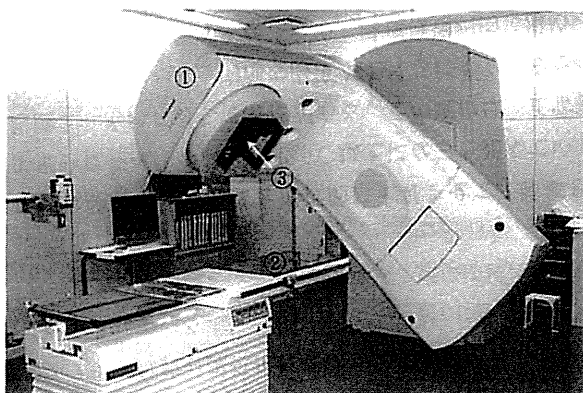


図4-6 リニアック治療装置

照射ヘッドを搭載したガントリー(①)は360°回転し、治療計画に応じて様々な方向からX線あるいは電子線を照射することができる。②は寝台、③は放射線が照射ヘッドから出る部位、その奥にマルチリーフコリメーター(MLC)が装備され、X線を腫瘍の形に合わせて絞り込む。

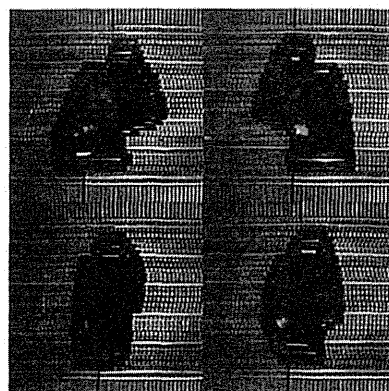


図4-7 マルチリーフコリメーター(MLC)

MLCはCT断層像から計算された照射方向からの腫瘍の形に応じて、コンピューター制御で自由に形が変わる。図は4つの照射方向それぞれのMLCによる腫瘍の輪郭を示す。

集中性を高めることを目的としたものとしては定位放射線照射stereotactic irradiation (STI)がある。

(1) 強度変調放射線治療

従来の放射線治療においては、各方向から腫瘍へ照射されるX線ビームそのものの強度は均一である。したがって、腫瘍塊に正常組織が入り混む複雑な形状を呈する腫瘍(例：凹形)に対して、腫瘍の形状に合わせて正確に照射することは困難であった。強度変調放射線治療は、コンピューターによりマルチリーフコリメーターを制御し、強さや形が異なるX線ビームを複数組み合わせ、強度が不均一なX線ビームを合成する方法である。強度変調放射線治療法の導入により、腫瘍の形に忠実に最適な線量分布が得られるようになった。また、1つの腫瘍内でも放射線抵抗性が高いと考えられる領域に、より高線量を照射することも可能である。従来は四角形に絞った照射野であったが、マルチリーフコリメーターを利用することにより高精度な原体照射および強度変調放射線治療が可能となり、放射線治療の精度が飛躍的に向上した。

(2) 定位放射線照射

定位放射線照射はきわめて正確な位置精度(誤差1mm以下)をもって、多方向から腫瘍を中心とした限局領域に高い線量の放射線を集中して照射する方法である。定位放射線照射法では近接する正常組織への照射線量を減らし(障害の軽減)、腫瘍には高い線量を与えることができる(高い効果)。定位放射線照射のうち、ガンマナイフに代表される1回の照射で治療が完結する方法を定位手術的照射stereotactic radiosurgery (SRS)、分割して照射を行うものを定位放射線治療stereotactic radiotherapy (SRT)と呼ぶ。

8) 放射線治療の増感作用

放射線治療は腫瘍が正常組織と比較して放射線に対する感受性がわずかに高いことを利用している。

放射線量を高くすれば腫瘍細胞は致死するが、周囲の正常組織も巻き添えとなり強い障害を受けてしまう。そこで、何らかの薬剤や手法を併用して、腫瘍に限定して放射線感受性を高めることができるのなら理想的である。

(1) 放射線増感剤

放射線増感剤とは、放射線と併用することによって放射線の効果を増強する薬剤のことである。このタイプの薬剤には、腫瘍細胞の線量効果曲線を左へシフトさせ、少ない放射線量で腫瘍を殺すことができる薬効が求められる。現在、放射線治療における放射線増感剤として、ハロゲン化ピリミジンと低酸素細胞増感剤の2種類の薬剤が知られている。

a. ハロゲン化ピリミジン

ハロゲン化ピリミジンであるBUdR(5-bromo-2'-deoxyuridine)は、構造がDNAの前駆物質であるチミジンに類似している。そのため、BUdRはチミジンと同様にDNAを合成しているS期の細胞に取り込まれる。そして、チミジンの代わりにBUdRを取り込んだ細胞に放射線が照射されると、通常よりもDNAが切断されやすくなり、放射線感受性が大きく増強される。

しかし、腫瘍組織内に存在する低酸素細胞は細胞周期のG₁期をゆっくり進行していたり、G₁期で停止していたりするため、放射線に抵抗性を示す。放射線治療においては、低酸素細胞の感受性を高めることが重要であるが、BUdRはこのような細胞周期にある細胞には取り込まれにくいいため、当初期待されたほどの有効性は得られていない。

b. 低酸素細胞増感剤

腫瘍は低酸素細胞を多数有することから、放射線に対する感受性は低い。低酸素細胞増感剤は酸素の代替となる強力な酸化剤であり、電子親和性が高く、低酸素細胞にもよく集積する性質を有する薬剤である。第3章 65頁 (5)放射線増感剤で述べられているが、ミソニダゾールは無酸素の細胞に対して大きな放射線増感効果を示し、一方で有酸素環境にある細胞に対しては増感効果を示さないという優れた特徴を有する。しかし、ミソニダゾールは腫瘍だけではなく、脳にもよく分布することから、神経毒性があることが明らかとなった。これまで多数のニトロイミダゾール系の化合物が研究されているが、まだ有効な低酸素細胞増感剤は開発されていない。

c. 抗がん剤との併用

放射線と抗がん剤との併用は、放射線抵抗性の腫瘍に対する放射線治療増強作用や、照射野外に広がった病巣に対して抗がん効果を期待して行われる。そこでDNA合成を阻害するタイプの抗がん剤と放射線治療を併用すると、S期にある細胞に対して放射線治療効果が増強されることが期待される。また、シスプラチンは放射線抵抗性を示す低酸素細胞に対して強い効果を示し、放射線治療増感作用があることが報告されている。

(2) 温熱療法

温熱療法は腫瘍細胞の温度を選択的に上昇させて、腫瘍を死滅させることを目的とした治療法である。腫瘍細胞は組織内の温度が42.5℃以上になると死んでいく。さらに組織レベルで考えると正常組織は腫瘍組織よりも熱に対して耐性がある。その理由は、正常組織が温められると血管拡張が起こり、血流によって温度が奪われ、内部の温度が上昇しにくくなるためである。これに対して、腫瘍内の血管は温められても十分に拡張できないため、腫瘍は選択的に温められる。

温熱に対する感受性は、細胞周期で変動することが知られ、M期およびS期で温熱感受性が高い。放射線に対して最も抵抗性を示すS期後半が最も温熱感受性であることから、温熱療法を併用すると、放射線の効果が高められることが知られている。

— テレコバルト治療装置、重粒子線治療装置 —

テレコバルト(コバルト遠隔)治療装置：線源に ^{60}Co からの γ 線を使用する装置である。 ^{60}Co からの γ 線のエネルギーは高く、1.17 MeVおよび1.33 MeVであることから、本装置は高エネルギー放射線治療の先駆けとなった。日本では1953年に導入後、全国的に普及した。装置には線源が1個内蔵されシャッターの開閉により γ 線の照射が行われる。 ^{60}Co の半減期は5.3年で、線源強度が減衰するため、1回の治療時間が次第に長くなる。したがって、定期的な線源の交換が必要であるが、その入手が困難であるため、現在ではほぼリニアックにおき代わっている。

重粒子線治療装置：重粒子線治療とは、電子より重い粒子である陽子、重イオン、中性子などを使用する外部放射線治療の総称である。現在は陽子線治療と炭素線治療が主に行われている。治療に際して、これらの粒子線を深部に到達させるためには、シンクロトロンやサイクロトロンなどの加速器を利用して高い運動エネルギーを付与する必要がある。非常に大規模な施設を要するため、現状では治療施設は限られている。なお、核子あたりの運動エネルギーは200～300 MeVであり、高LET放射線に分類される。X線などの低LET放射線による治療では、 G_1 期およびS期後期において、放射線による損傷修復能力が高いことから、放射線抵抗性を示す。この点で高LET放射線が細胞に照射された場合、これらの修復が効率的に進まないことから、細胞周期依存性が低LET放射線と比較して低い。

陽子線や重イオン線は、ビームコースに様々な厚さのエネルギー吸収体を挿入して、体内入射時の運動エネルギーを調整することで飛程が決まる。さらに、飛程終端近くでエネルギー付与により最大の電離を起こす(ブラッグピーク：第1章 20頁 参照)。このことから、がん組織を飛程の終端の位置になるように調整すれば、深部のがん組織に対して選択的に致死線量を与えることが可能となる。なお、ブラッグピークは他の放射線にはない特徴である。したがって、重粒子線治療は周囲の正常組織に対する障害を最小限に抑えながら、標的領域に局限して高線量を集中投与できる先端的ながん治療法である。

(4)～8)：中山智宏]

演習問題

1. 腫瘍の増殖に関する因子として誤っているのはどれか。
 - a. 腫瘍の増殖細胞分画
 - b. 腫瘍の細胞喪失率
 - c. 腫瘍の倍加時間
 - d. 腫瘍コード
 - e. 腫瘍の細胞周期時間

2. 治療可能比を上げる方法のうち、腫瘍致死線量(TLD)を左方にする因子として誤っているのはどれか。
 - a. 多分割照射法
 - b. 放射線増感剤の併用
 - c. 酸素効果の利用
 - d. 温熱治療の併用
 - e. 抗がん剤の併用

3. 外部放射線治療で電子線が選択される対象部位はどれか。
 - a. 皮膚
 - b. 脳
 - c. 鼻腔
 - d. 骨盤腔内臓器
 - e. 縦隔


4. リニアックから発生する放射線は次のうちどれか。
 - a. 中性子線
 - b. γ 線
 - c. α 線
 - d. X線
 - e. 重粒子線

(正解と解説は171頁)

獣医学教育モデル・コア・カリキュラム準拠
放射線生物学

発行 2015年3月20日 初版発行
編集 獣医放射線学教育研究会
発行者 菅原律子
発行所 株式会社 近代出版
〒150-0002 東京都渋谷区渋谷2-10-9
電話：03-3499-5191 FAX：03-3499-5204
e-mail：mail@kindai-s.co.jp
DTP 株式会社 西崎印刷
印刷所 研友社印刷株式会社

ISBN978-4-87402-213-9 ©2015 Printed in Japan

 (社)出版者著作権管理機構委託出版物

本書の無断複写は、著作権法上での例外を除き禁じられています。
本書を複写される場合は、そのつど事前に(社)出版者著作権管理
機構(電話 03-3513-6969, FAX 03-3513-6979, e-mail: info@jcopy.or.jp)
の許諾を得てください。

Prostaglandin E₂ Inhibits Elastogenesis in the Ductus Arteriosus via EP4 Signaling

Utako Yokoyama, MD, PhD; Susumu Minamisawa, MD, PhD; Aki Shioda, MS;
Ryo Ishiwata, MS; Mei-Hua Jin, PhD; Munetaka Masuda, MD, PhD;
Toshihide Asou, MD, PhD; Yukihiro Sugimoto, PhD; Hiroki Aoki, MD, PhD;
Tomoyuki Nakamura, MD, PhD; Yoshihiro Ishikawa, MD, PhD

Background—Elastic fiber formation begins in mid-gestation and increases dramatically during the last trimester in the great arteries, providing elasticity and thus preventing vascular wall structure collapse. However, the ductus arteriosus (DA), a fetal bypass artery between the aorta and pulmonary artery, exhibits lower levels of elastic fiber formation, which promotes vascular collapse and subsequent closure of the DA after birth. The molecular mechanisms for this inhibited elastogenesis in the DA, which is necessary for the establishment of adult circulation, remain largely unknown.

Methods and Results—Stimulation of the prostaglandin E₂ (PGE₂) receptor EP4 significantly inhibited elastogenesis and decreased lysyl oxidase (LOX) protein, which catalyzes elastin cross-links in DA smooth muscle cells (SMCs), but not in aortic SMCs. Aortic SMCs expressed much less EP4 than DAsMCs. Adenovirus-mediated overexpression of LOX restored the EP4-mediated inhibition of elastogenesis in DAsMCs. In EP4-knockout mice, electron microscopic examination showed that the DA acquired an elastic phenotype that was similar to the neighboring aorta. More importantly, human DA and aorta tissues from 7 patients showed a negative correlation between elastic fiber formation and EP4 expression, as well as between EP4 and LOX expression. The PGE₂-EP4-c-Src-phospholipase C (PLC) γ -signaling pathway most likely promoted the lysosomal degradation of LOX.

Conclusions—Our data suggest that PGE₂ signaling inhibits elastogenesis in the DA, but not in the aorta, through degrading LOX protein. Elastogenesis is spatially regulated by PGE₂-EP4 signaling in the DA. (*Circulation*. 2014;129:487-496.)

Key Words: elasticity ■ muscle, smooth ■ pediatrics ■ prostaglandins ■ signal transduction

Elastic fibers are the largest structures in the extracellular matrix. Beginning with the onset of pulsatile blood flow in the developing aorta and pulmonary artery, smooth muscle cells (SMCs) in the vessel wall produce a complex extracellular matrix that ultimately defines the mechanical properties that are critical for proper function of the neonatal and adult vascular system.¹ As such, hemodynamics and mechanical stress are considered to be the main regulators in the formation of the vascular elastic fiber system during development.²

Clinical Perspective on p 496

The ductus arteriosus (DA) and its connecting elastic arteries (ie, the descending aorta and the main pulmonary trunk) are exposed to essentially the same mechanical forces and hemodynamics. However, since 1914, it has been widely recognized in multiple species that the DA exhibits sparse elastic fibers in the middle layer compared with adjacent elastic arteries, as

well as disassembly and fragmentation of the internal elastic lamina.³⁻⁸ In the human fetal aorta, newly synthesized uncrosslinked elastin appears at 23 weeks of gestational age to be unevenly distributed on the surface of microfibrils, where it forms continuous strips of variable width.⁹ However, the DA exhibits fewer elastic fibers than the aorta.^{4,6} This decreased elastogenesis is the hallmark of the vascular remodeling of the DA in humans and a variety of other species.³⁻⁷ It has been suggested that this muscular phenotype of the DA allows it to collapse easily at birth when prostaglandin E₂ (PGE₂) is withdrawn and blood flow between the aorta and the pulmonary artery is reduced, thereby permitting immediate postnatal closure of the DA. Conversely, it is known that abnormalities of elastic fibers and elastic lamina are primarily responsible for the persistence of the DA in some human cases.^{10,11} These abnormalities likely prevent intimal cushion formation and make it difficult to collapse the arterial wall. Therefore, it is

Received July 2, 2013; accepted October 7, 2013.

From the Cardiovascular Research Institute, Yokohama City University, Yokohama, Japan (U.Y., S.M., A.S., R.I., M.-H.J., Y.I.); the Department of Life Science and Medical Bioscience, Waseda University Graduate School of Advanced Science and Engineering, Tokyo, Japan (S.M., R.I.); the Department of Cell Physiology, Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan (S.M.); the Department of Surgery, Yokohama City University, Yokohama, Japan (M.M.); the Department of Cardiovascular Surgery, Kanagawa Children's Medical Center, Yokohama, Japan (T.A.); the Department of Pharmaceutical Biochemistry, Kumamoto University, Kumamoto, Japan (Y.S.); Cardiovascular Research Institute, Kurume University, Kurume, Japan (H.A.); and the Department of Pharmacology, Kansai Medical University, Osaka, Japan (T.N.).

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://circ.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.004726/-DC1>.

Correspondence to Susumu Minamisawa, MD, PhD, Department of Cell Physiology, Jikei University School of Medicine, Tokyo 105-8461, Japan. E-mail sminamis@jikei.ac.jp

© 2013 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://circ.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.004726

important to understand the molecular mechanisms of how elastogenesis is regulated in the DA. Although Hinek et al^{12,13} have demonstrated that truncated 52-kDa tropoelastin and the reduction of elastin binding protein negatively regulates elastic fiber formation in the DA, the mechanisms for impaired elastogenesis in the DA wall are not yet fully understood, despite nearly a century of research.⁸

During mid- to late gestation, fetuses are exposed to abundant PGE₂ that is released from the placenta¹⁴ in accordance with the time course of impaired elastic fiber formation in the DA. The biological effects of PGE₂ depend on the prostanoid EP receptor subtypes EP1 through EP4¹⁵. Among the EP subtypes, EP4 is highly expressed in the DA of multiple species, including mice, rats, and humans, and regulates the DA muscular tone.^{16–19} In addition to the DA muscular contraction, remodeling of the extracellular matrix during the fetal and neonatal period is necessary to complete the anatomical closure of the DA.^{16,20,21} Our previous studies have demonstrated the role of PGE₂-EP4 signaling in DA remodeling, in which EP4 stimulation promotes intimal thickening, which is characteristic of the remodeling of the DA, in a hyaluronan-dependent and -independent manner.^{16,21–23}

In this context, we hypothesized that PGE₂ inhibits elastogenesis in the DA through PGE₂-EP4 signaling. In the present study, we examined the molecular mechanisms of the inhibitory regulation of elastogenesis in human DA tissues and rodent DASMCs. We demonstrated that activation of EP4 promoted degradation of the mature lysyl oxidase (LOX) protein, a cross-linking enzyme for elastic fibers, only in the DA (and not in the aorta), leading to poor elastogenesis.

Methods

Expanded methods are described in the online-only Data Supplement.

Animals and Tissues

We used Wistar rat fetuses from timed-pregnant mothers (SLC Inc., Hamamatsu, Japan). Pooled tissues of the DA, aorta, and pulmonary arteries were obtained from rats on day 21 of gestation (n>60). Generation and phenotypes of EP4-knockout mice have been described previously.¹⁷ All mice were C57BL/6 background littermates from heterozygote crosses. All animal studies were approved by the institutional animal care and use committees of Yokohama City University and Waseda University.

Human Tissues of the DA

Human DA tissues were obtained from Yokohama City University Hospital and Kanagawa Children's Medical Center at the time of corrective operations. Detailed patient information is summarized in Table I in the online-only Data Supplement. The study was approved by the human subject committees at both Yokohama City University and Kanagawa Children's Medical Center. All samples were obtained after receiving written informed parental consent.

Tissue Staining and Immunohistochemistry

Elastic fiber formation was evaluated by Elastica van Gieson staining. Immunohistochemical analysis was performed as previously described.¹⁶ A color extraction method using BIOREVO bz-9000 and associated software (KEYENCE, Osaka, Japan) was performed to quantify elastic fiber formation and expression of EP4 and LOX. Three serial paraffin-embedded sections per each patient were subjected to elastica staining and immunohistochemistry. More than 19 fields in the smooth muscle layer of the DA and aorta were examined

in each slide. The area stained dark purple indicated elastic fibers and diaminobenzidine (DAB)-stained colors, EP4- or LOX-positive areas, were extracted from matched area and counted using the software. Correlations of elastic fiber formation and EP4 and LOX expression were examined using >19 independent fields within 1 patient. We examined sections from a total of 7 patients, and the correlation coefficient and *P* value of each patient are shown in Table II in the online-only Data Supplement.

Immunocytochemistry

Vascular SMCs were plated on glass coverslips in 10% FBS in DMEM. The culture medium was then changed to 10% FBS in DMEM/F-12 alone, PGE₂, AE1-329, sulprostone, butaprost, or β-aminopropionitrile fumarate (day 1). Each drug was added on day 4. To examine the effect of silencing EP4 on elastic fiber formation, reverse transfection of DASMCs with EP4-targeted siRNA was performed according to the manufacturer's instructions on days 1 and 4, and treated with AE1-329 on days 2 and 5. To examine the effect of overexpression of LOX or EP4, the cells were infected with adenoviruses at 10 multiplicities of infection on days 1 and 4. AE1-329 was added to the cells on days 2 and 5. All cells were fixed in 10% buffered formalin on day 7. The fixed cells were stained with anti-elastin antibody as previously described.²² All images were taken using a Nikon TE2000 (Nikon Instruments Inc, Tokyo, Japan) and processed under the same settings.

Quantitative Measurement of Insoluble Elastin

Newly synthesized insoluble elastin was measured as previously described.²⁴ Briefly, DASMCs were subconfluently plated on 60-mm dishes. Three days after plating, 20 μCi [³H]valine was added to each dish (day 0). AE1-329 (1 μmol/L) or phosphate-buffered saline was added on days 0 and 4. The cells were harvested in 0.1 mol/L acetic acid on ice on day 7. The cells were boiled in 0.1N NaOH for 1 h. The insoluble pellets were boiled with 5.7N HCl for 1 h. The radioactivity was measured with a scintillation counter.

Statistical Analysis

Data are shown as the mean±SEM of independent experiments. The Mann-Whitney *U* test, Kruskal-Wallis test, and Pearson correlation coefficient were used to determine the statistical significance of the data. A value of *P*<0.05 was considered significant.

Results

EP4 Signaling Inhibits Elastogenesis in the DA In Vivo

In the late gestation period, the DA exhibits disassembly and fragmentation of the internal elastic lamina and sparse elastic fibers in the middle layer compared to its two connecting arteries, the aorta and the pulmonary artery (Figure 1A), despite the fact that they are exposed to essentially the same hemodynamics. The expression of rat EP4 is greater in the DA than in the aorta and the pulmonary artery on the 21st day of gestation (day 21; Figure 1B).¹⁶ We examined the association between the expression of EP4 mRNA and elastogenesis in developing mouse fetuses (Figure 1C). In day 12.5 mice, organized elastic fibers were not observed in either the DA or the aorta, whereas *in situ* hybridization analysis revealed that the expression of EP4 mRNA was clearly higher in the DA than in the aorta or the pulmonary artery. In day 16.5 and day 18.5 mice, the formation of elastic fibers was observed more clearly in the aorta than in the DA. In these developing stages, obvious abundant expression of EP4 mRNA was observed in the DA, but not in the aorta. To examine the effect of EP4

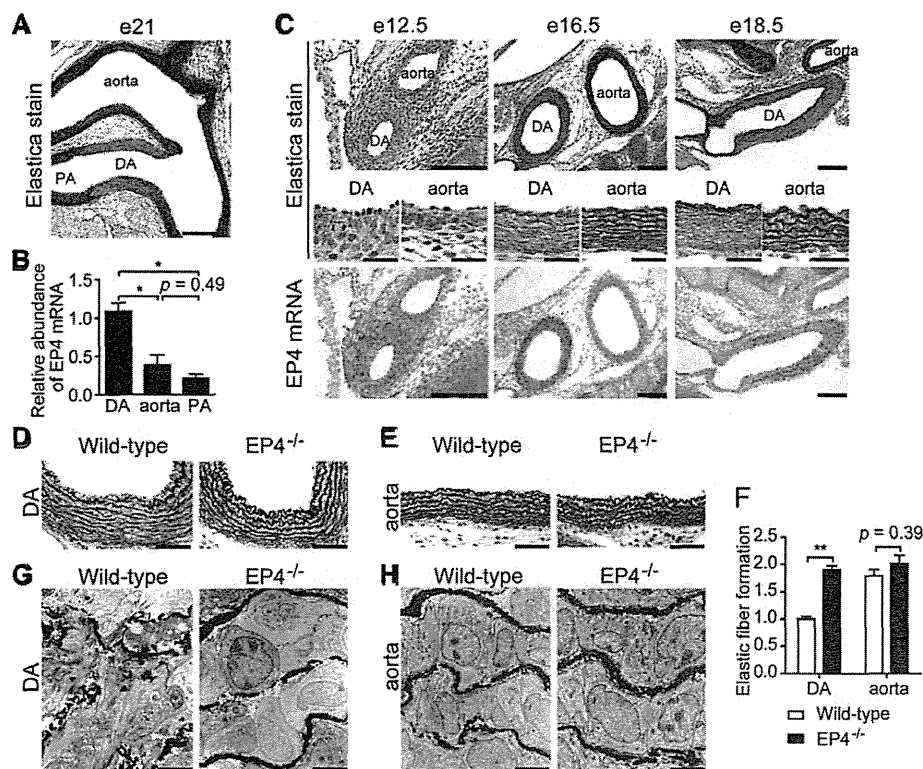


Figure 1. EP4 signaling attenuated elastic fiber formation in vivo. **A**, Elastica van Gieson stain (elastica stain) of rat fetus on day 21 of gestation (e21). **B**, Expression of EP4 mRNA of the rat ductus arteriosus (DA), aorta, and pulmonary artery (PA) on day 21 of gestation. $n=6$. **C**, Developmental changes in elastic fiber formation and EP4 mRNA by in situ hybridization in mouse fetus on days 12.5 (e12.5), 16.5 (e16.5), and 18.5 (e18.5) of gestation. Expression of EP4 mRNA was higher in the DA than in the aorta and pulmonary artery. Conversely, elastic fiber formation is sparser in the DA than in the other arteries. **D**, **E**, **G**, and **H**, Elastica stain and electron microscopic images of wild-type and EP4^{-/-} mice on day 18.5 of gestation. Elastic fiber formation was restored in the DA of EP4^{-/-} mice. **F**, Quantification of the elastic fiber formation of **D** and **E** using a color extraction method. $n=8$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Scale bars, 200 μm (**A**); 100 μm (**C**, upper and lower); 50 μm (**D**, **E**); 20 μm (**C**, middle); 5 μm (**G**, **H**).

on elastogenesis in vivo, we examined elastic fiber formation in the DA of EP4^{-/-} mice. In EP4^{-/-} mice, which die postnatally as a result of persistent patent DA (PDA),^{17,25} we found that the DA acquired an elastic phenotype that was similar to that of the neighboring aorta, as determined by elastica staining (Figure 1D and 1E), a color extraction method of elastica staining (Figure 1F), and electron microscopic examination (Figure 1G and 1H).

Human Vascular Tissues Show a Negative Correlation Between Elastic Fibers and EP4 Expression

We also investigated the relationship between elastic fiber formation and EP4 expression in surgical samples from 7 patients with coarctation of the aorta who underwent surgical repair of aortic narrowing (Figure 2A, Table I in the online-only Data Supplement). In concurrence with the findings in rodents, there was less elastic fiber formation in the DA than in the normal aorta, and the cells stained with anti-EP4 antibody were far more abundant in the DA (Figure 2B). Indeed, statistical analysis revealed that the correlation was significant between the amount of EP4 expression and the degree of inhibited elastic fiber formation (Figure 2C, Table II in the online-only Data Supplement). Thus, elastogenesis is inhibited when EP4 is abundant. Taken together, these in vivo data

suggest that EP4 plays a primary role in the inhibition of elastogenesis of the DA in humans and rodents.

EP4 Signaling Inhibits Elastogenesis in DASMCs

To clarify the role of EP4 in elastogenesis in detail, we evaluated the elastic fiber assemblies in rat DASMCs using an in vitro system, as reported previously.²⁴ In the control group, DASMCs developed an abundant meshwork of elastic fibers (Figure 3A). In the presence of PGE₂ or the EP4 agonist ONO-AE1-329, however, DASMCs developed a poor meshwork of elastic fibers. Neither the EP1/3 agonist sulprostone nor the EP2 agonist butaprost had any effect on elastic fiber development. LOX is a cross-linking enzyme that forms insoluble mature elastic fibers. Its specific small molecule inhibitor β -aminopropionitrile fumarate impaired elastic fiber formation (Figure 3A). To quantify the amount of mature (ie, cross-linked) elastic fibers inhibited by EP4 stimulation, we metabolically labeled newly synthesized elastin with [³H] valine, and measured the incorporation of [³H]valine in the NaOH-insoluble fraction of these cells, which reflects the amount of newly synthesized mature elastic fibers.²⁴ As shown in Figure 3B, in DASMCs, we detected a significant decrease in the incorporation of [³H]-valine into the insoluble fraction when ONO-AE1-329 was added to the medium (Figure 3B). When the expression of EP4 mRNA was decreased by 89%

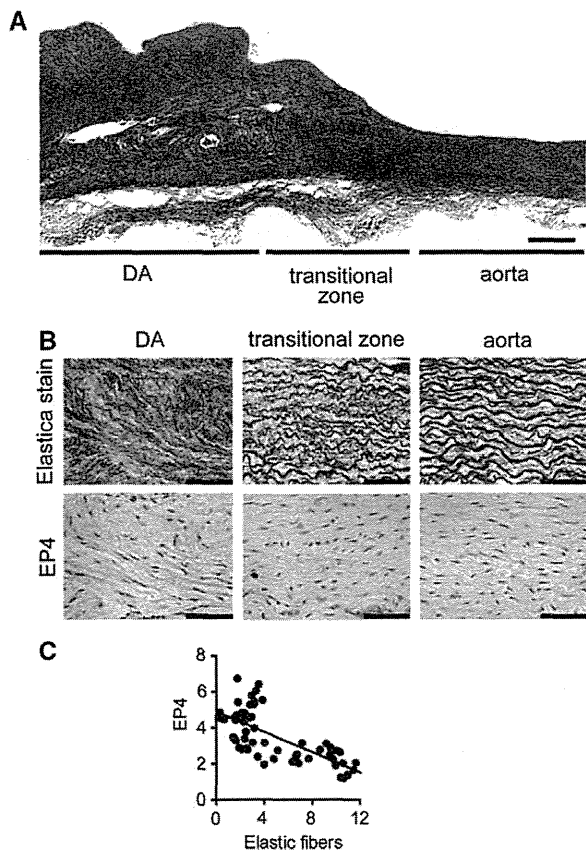


Figure 2. Human vascular tissues show a negative correlation between elastic fibers and EP4 expression. **A**, A representative image of the elastica stain of a human neonatal vessel. **B**, Elastica stain and immunohistochemistry for EP4 in human neonatal vessels. **C**, Representative results of quantification of elastic fiber formation and EP4 protein expression using a color extraction method. Values are shown in arbitrary units. Scale bars, 200 μ m (**A**); 50 μ m (**B**).

by RNA interference, DASMCs developed elastic fiber formation even in the presence of ONO-AE1-329 (Figure 3C). To further confirm the existence of EP4-mediated impaired elastic fiber formation, we used rat aortic SMCs, which express much less EP4 than DASMCs (Figure 3D). When EP4 was forcibly expressed in aortic SMCs by EP4 gene transfer, elastogenesis was markedly impaired by ONO-AE1-329, whereas ONO-AE1-329 did not attenuate elastic fiber formation in the LacZ control (Figure 3E). These *in vitro* results indicate that PGE₂-EP4 stimulation is responsible for the impaired elastogenesis of the DA.

EP4 Signaling Inhibits Elastic Fiber Formation by Decreasing LOX Protein

In the process of elastic fiber assembly, soluble elastin precursors (tropoelastin) are deposited on microfibrils.^{1,26} They are then cross-linked by LOX, which confers elastic properties to elastic fibers.²⁷ Inactivation of the *LOX* gene is known to cause structural alterations in the arterial walls, leading to cardiovascular abnormalities.²⁸ In this context, we investigated the expression of LOX protein in human surgical samples. In contrast to EP4, there were significantly fewer cells stained with

anti-LOX antibody in the DA (Figure 4A). When elastic fiber formation and the expression of EP4 and LOX were quantified, LOX expression was positively correlated with elastic fiber formation, whereas it was negatively correlated with EP4 expression (Figure 4B, Table II in the online-only Data Supplement). Interestingly, elastic fiber formation and EP4- or LOX-positive cells in the transitional zone appeared intermediate between the DA and aorta. We think that this finding supports previous reports that suggested that the coarctative ridge, a narrowed pathological segment in the aorta, is formed by mixed tissues from the native aorta and migrated tissues of DA origin.^{29,30}

Next, we examined the effect of EP4 stimulation on LOX protein expression. We found that the amount of mature LOX form was significantly decreased in the culture media of DASMCs and DASMC lysates in the presence of PGE₂ and ONO-AE1-329 (Figure 4C and 4D). The effects of ONO-AE1-329 were dose- and time-dependent (Figure 4E and 4F). Other EP isoform-specific agonists had little effect. Interestingly, stimulation of EP4 did not change the expression levels of tropoelastin and fibrillin-1 proteins, which are the main components of elastic fibers (Figure IA–ID in the online-only Data Supplement). In the next LOX detection, we used whole cell lysate containing both intracellular and extracellular LOX protein. Although these EP4-mediated effects were not detected in aortic SMCs (ASMCs), the EP4 agonist significantly decreased the expression of LOX protein in ASMCs when EP4 expression was induced using the adenovirus (Figure 4G and 4H). When LOX expression was induced using the adenovirus (Figure IIA and IIB in the online-only Data Supplement), elastogenesis was largely restored in the ONO-AE1-329-treated DASMCs (Figure 4I). Thus, the reduction in LOX played a primary role in the EP4-mediated impairment of elastogenesis. The expression levels of matrix metalloproteinases and their activity were not altered in the DASMCs by EP4 stimulation (Figure IIIA and IIIB in the online-only Data Supplement). Nor was there any difference in matrix metalloproteinase 2 activity between rat tissues of the DA and aorta (Figure IIIC in the online-only Data Supplement), suggesting that EP4 signaling plays a role in inhibiting elastogenesis, but not in promoting elastolysis in the DA.

The c-Src-PLC Signal Pathway Plays a Role in the PGE₂-EP4-Induced Reduction in LOX Protein

Next, we examined the downstream signal pathway responsible for the EP4-mediated reduction in LOX protein expression levels. Although our previous studies have demonstrated that cAMP and its downstream pathways play a primary role in EP4-mediated DA remodeling,^{16,22,23} the cAMP-protein kinase A or cAMP-exchange protein activated by the cAMP pathway did not play a role in the EP4-mediated reduction in LOX protein (Figure 5A and 5B). Instead, we found that the EP4-induced reduction in LOX protein was restored by the PLC inhibitor U73122 (Figure 5C–5E), but not by G β γ , protein kinase C, or phosphoinositide 3-kinase inhibitors (galein, bisindolylmaleimide I, LY294002; Figure 5C and 5D). Furthermore, the PLC activator *m*-3M3FBS significantly decreased the expression levels of LOX protein in DASMCs

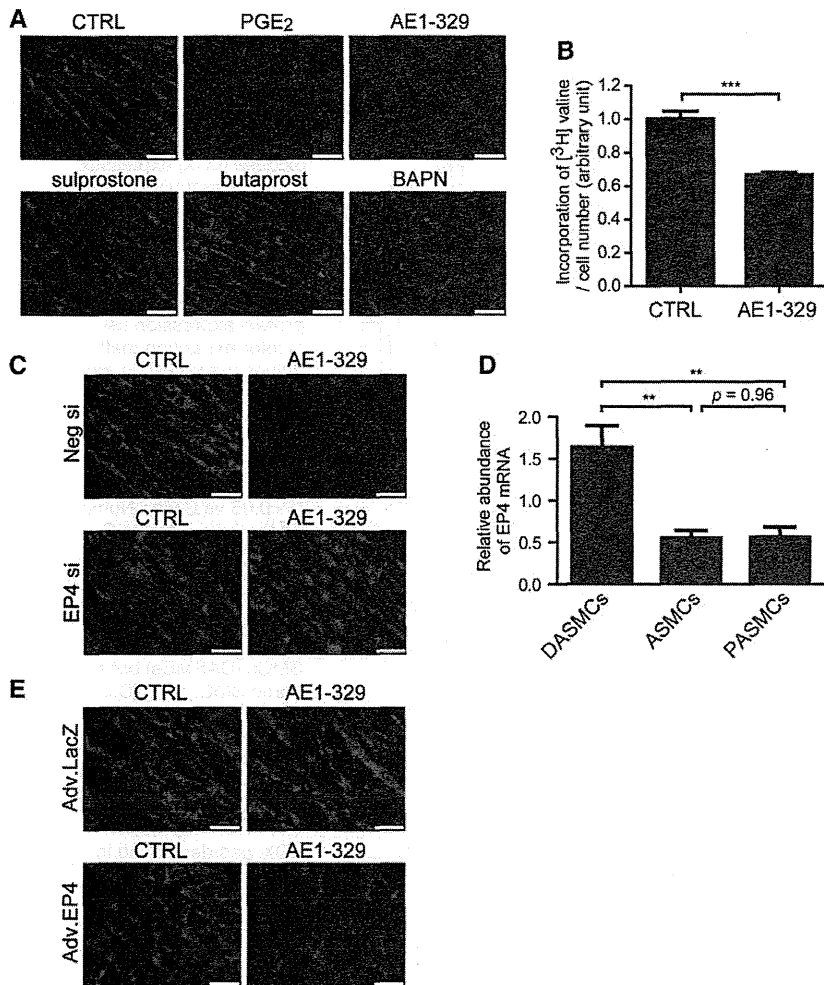


Figure 3. EP4 signaling attenuated elastic fiber formation in vitro. **A** and **C**, Immunostaining for elastin (red) and DNA (blue) of ductus arteriosus smooth muscle cells (DASMCS) treated with each drug indicated or EP4-targeted siRNA (EP4 si). AE1-329 indicates ONO-AE1-329; CTRL, control; and Neg si, negative control siRNA. Pharmacological activation of EP4 by ONO-AE1-329 attenuated elastic fiber formation. **B**, Incorporation of [³H]valine was quantified in DASMCS treated with or without AE1-329. n=8, ****P*<0.001. **D**, Expression of EP4 mRNA in DASMCS, aortic SMCs (ASMCS), and pulmonary SMCs (PASMCS). n=6, ***P*<0.01. **E**, Immunostaining for elastin (red) and DNA (blue) of the EP4- or LacZ-overexpressing ASMCS treated with or without AE1-329. Activation of EP4 did not affect elastic fiber formation in LacZ-overexpressing ASMCS, whereas it decreased elastic fiber formation in EP4-overexpressing ASMCS. Each drug was used at 1 μmol/L. Scale bars, 20 μm.

(Figure 5F). Because several recent studies have demonstrated that PGE₂ promotes cancer cell migration via the EP4-c-Src signal pathway^{31,32} and that c-Src plays a critical role in the phosphorylation of PLCγ in several cell types,^{33,34} we hypothesized that the c-Src-PLCγ signal pathway may be involved. We found that ONO-AE1-329 significantly increased PLCγ1 phosphorylation (Figure 5G). In contrast, the Src-family kinase inhibitor PP2 significantly decreased PLCγ1 phosphorylation (Figure 5H and 5I) and restored the reduction in LOX protein induced by ONO-AE1-329 (Figure 5J and 5K). These results support our hypothesis that the c-Src-PLCγ signal pathway plays a primary role in the PGE₂-EP4-induced reduction in LOX protein.

EP4 Signaling Promotes LOX Degradation in Lysosomes

Although ONO-AE1-329 decreased the expression of LOX protein in DASMCS, we found that ONO-AE1-329 did not decrease the mRNA expression of LOX (Figure 6A). Active LOX is synthesized as a 50-kDa inactive LOX proenzyme (pro-LOX), which is secreted into the extracellular space. Pro-LOX is then processed by proteolysis into a functional 32 kDa enzyme LOX and an 18-kDa propeptide.^{27,35} Using a pro-LOX-specific antibody, we found that the pro-LOX protein

itself was not decreased by ONO-AE1-329 (Figure 6B and 6C), indicating that LOX was decreased post-translationally. BMP1 is a major protease that cleaves pro-LOX in the extracellular space.²⁷ However, ONO-AE1-329 did not change the expression of BMP1 mRNA or protein in DASMCS (Figure 6A and 6B in the online-only Data Supplement). Instead, we found that lysosomal degradation inhibitors, such as NH₄Cl and bafilomycin, eliminated the EP4-induced reduction in LOX protein (Figure 6D and 6E). These lysosomal degradation inhibitors also restored the PLC-mediated reduction in LOX protein (Figure 6F and 6G). Furthermore, we found that the clathrin-mediated endocytosis inhibitors chlorpromazine and phenylarsine oxide similarly restored the EP4-induced reduction in LOX protein (Figure 6H–6J). Administration of chlorpromazine also restored the PLC-induced reduction in LOX protein (Figure 6K and 6L). In comparison, the caveolar endocytosis inhibitor methyl-beta-cyclodextrin (MβCD), the macropinocytosis inhibitor ethylisopropylamiloride (EIPA), and the proteasomal inhibitor MG132 showed little or no effect on LOX protein reduction (Figure 6A–6C in the online-only Data Supplement). These data suggest that PGE₂-EP4-PLC stimulation promotes the degradation of the LOX protein in lysosome through clathrin-mediated endocytosis.

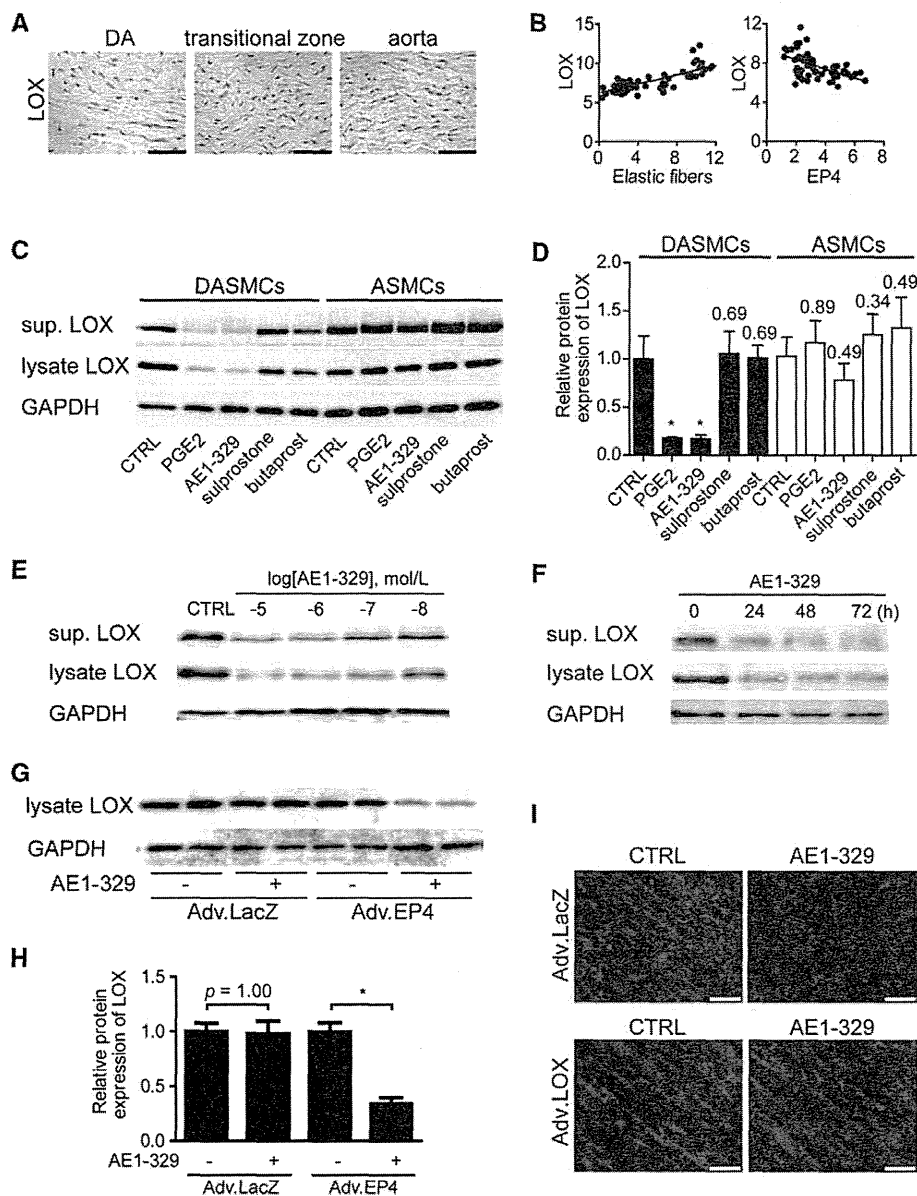


Figure 4. EP4 signaling attenuated elastic fiber formation via decreased lysyl oxidase (LOX) expression. **A**, Representative images of immunohistochemistry for LOX in human neonatal vessels. **B**, Representative results of quantification of elastic fiber formation, LOX, and EP4 protein expression using a color extraction method. Values are shown in arbitrary units. **C**, Western blotting for LOX in supernatant (sup.) and lysate of smooth muscle cells (SMCs) treated for 72 h. **D**, Quantification of **C**. n=4, *P<0.05 vs CTRL. Numbers on the bars indicate P values. Administration of prostaglandin E₂ (PGE₂) or the EP4 agonist AE1-329 decreased the mature LOX form in both supernatant and lysate of ductus arteriosus SMCs (DASMCS) but not in aortic SMCs (ASMCS). **E**, Dose-dependent effects of AE1-329 (24 h incubation) on LOX protein in DASMCS. **F**, Time-dependent reduction in LOX protein in DASMCS. **G**, Protein expression of LOX was decreased in EP4-overexpressing ASMCS (Adv. EP4) treated with AE1-329 for 24 h. **H**, Quantification of **G**. n=4, *P<0.05 vs CTRL. **I**, Immunostaining for elastin (red) and DNA (blue) of the LOX- or LacZ-overexpressing DASMCS treated with or without AE1-329. Each drug was used at 1 μmol/L. Scale bars, 50 μm (**A**); 20 μm (**I**).

Discussion

Although it is widely recognized in multiple species that the DA exhibits sparse elastic fibers in the middle layer and disassembly and fragmentation of the internal elastic lamina, the molecular mechanism for these has not yet been identified. The current study demonstrated a novel role of PGE₂ in spatially regulating elastogenesis by LOX protein degradation via the EP4-c-Src-PLCγ signal pathway in the DA, which contributes to the transition from fetal to neonatal circulation. Previous studies have demonstrated that abnormalities of elastic fibers are primarily responsible for PDA in some human cases.^{10,11} According to the Gittenberger-de Groot group's¹⁰ observation, there are several types of abnormal elastogenesis that can cause PDA. The following 2 types are of particular importance: (1) thickened subendothelial elastic lamina with sparse or slightly increased elastic fibers in the media, and (2) aortification of the ductal wall. PDA with aortification of the

ductal wall in EP4-knockout mice resembles the latter phenotype. These abnormalities of elastic fibers are likely to prohibit intimal cushion formation and make it difficult to collapse the arterial wall. This suggests that the control of elastogenesis is clinically important. Pharmacological treatment for PDA, such as indomethacin after birth, may have an adverse effect on the inhibition of elastic fiber formation in the DA, especially in premature infants. This should be further investigated in a future study.

The EP4 receptor is highly expressed in the DA compared to the adjacent arteries¹⁶; it is coupled to G_{αs} and increases intracellular cAMP formation. The roles of EP4-cAMP signaling have been well studied in the DA. We and others have demonstrated that EP4 signaling induces vasodilation and hyaluronan-mediated vascular remodeling of the DA through cAMP-dependent protein kinase A^{16,21,23} and that it promotes the migration of DASMCS and subsequent intimal thickening

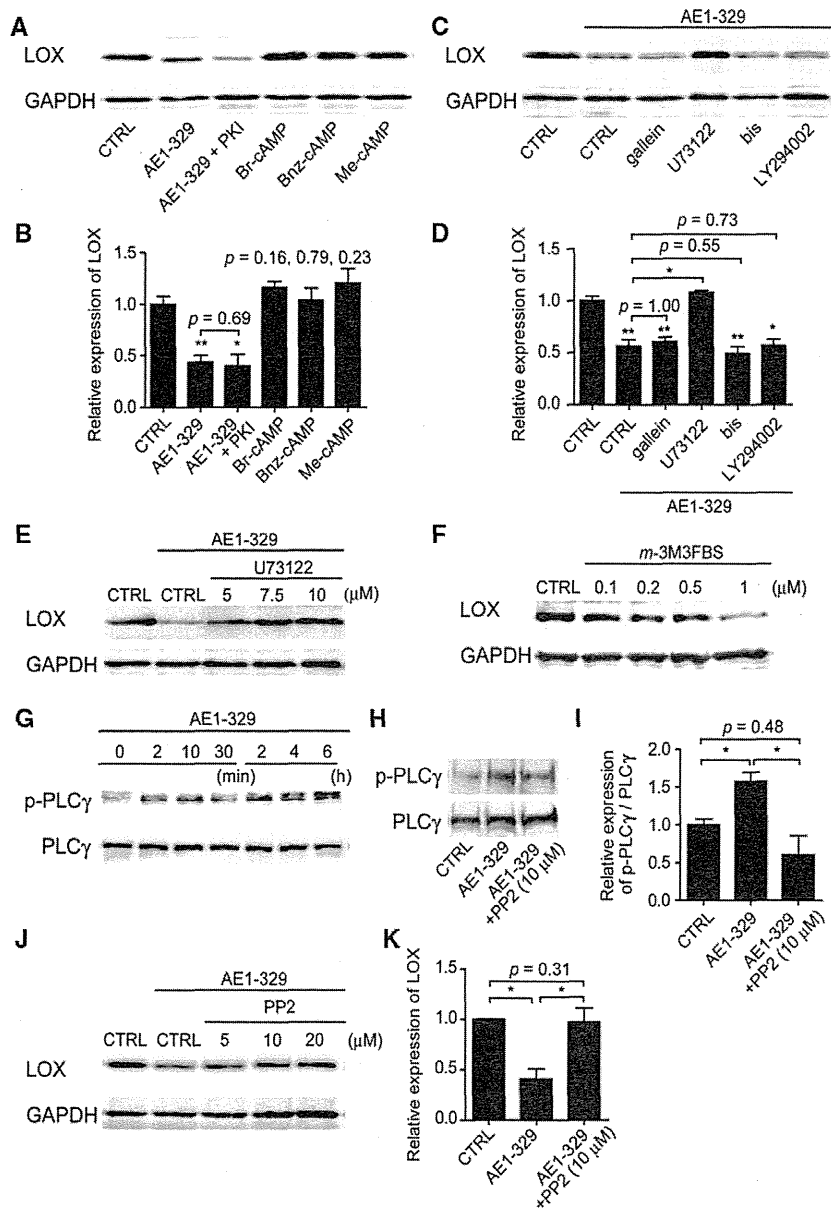


Figure 5. EP4 signaling decreased lysyl oxidase (LOX) protein via the c-Src-PLC γ pathway in ductus arteriosus smooth muscle cells (DASMCs). **A**, LOX protein expression in DASMCs treated with nonselective (Br-cAMP, 50 μ mol/L), protein kinase A (PKA)-selective (Bnz-cAMP, 50 μ mol/L) or Epac-selective (Me-cAMP, 50 μ mol/L) cAMP analogs for 24 h. The AE1-329 was administered in the presence or absence of the PKA inhibitor PKI (10 μ mol/L). **B**, Quantification of **A**, n=4–6, *P<0.05, **P<0.01 vs CTRL. cAMP signaling did not affect the EP4-mediated reduction of LOX protein. **C**, LOX protein expression in DASMCs treated with gallein (G β γ inhibitor, 10 μ mol/L), U73122 (PLC inhibitor, 10 μ mol/L), bis (bisindolylmaleimide: PKC inhibitor, 10 μ mol/L), or LY294002 (PI3K inhibitor, 1 μ mol/L) in the presence of AE1-329. **D**, Quantification of **C**, n=4–6, *P<0.05, **P<0.01 vs CTRL. Inhibition of PLC eliminated the EP4-mediated reduction of LOX protein. **E**, Dose-dependent effect of U73122 in DASMCs treated with AE1-329. **F**, Dose-dependent inhibitory effect of m-3M3FBS on LOX protein expression. **G** and **H**, Phosphorylation of PLC γ in DASMCs treated with PP2 (Src inhibitor) or AE1-329. **I**, Quantification of **H**, n=4–6, *P<0.05. Inhibition of Src attenuated the EP4-mediated phosphorylation of PLC γ . **J**, PP2 attenuated the EP4-mediated reduction of LOX protein. **K**, Quantification of **J**, n=4–6, *P<0.05. Whole cell lysate was used for LOX detection. AE1-329 was used at 1 μ mol/L.

through exchange protein activated by the cAMP.²² Additional downstream signaling pathways of EP4 have been demonstrated in other cell types. EP4 uses G α i and phosphoinositide 3-kinase, which are generally activated by G β γ .³⁶ In addition to these well-known signaling pathways of EP4, our findings revealed c-Src-PLC γ signaling as a novel EP4 downstream pathway, as well as the inhibitory role played by EP4 signaling in elastogenesis. This EP4-signaling pathway was found to be independent of cAMP signaling, including protein kinase A and exchange protein activated by the cAMP, and G β γ and phosphoinositide 3-kinase. Studies using colorectal and lung cancer cells have suggested that β -arrestin1 bound to EP4 activates c-Src.^{31,32} In the DA, however, we did not identify an association between EP4–c-Src signaling and β -arrestin1 using β -arrestin1-targeted siRNA (data not shown). Ma et al³⁷ clearly demonstrated that G α s and G α i proteins directly

stimulate the kinase activity of c-Src. Because the EP4 receptor is coupled to G α s and G α i, direct association between these G proteins and c-Src may activate its downstream signaling in EP4-mediated degradation of LOX protein. This possibility should be validated in a future study.

LOX is a copper-dependent amine oxidase that catalyzes the cross-linking of elastin and collagen and ensures the stability of the extracellular matrix.³⁸ Because LOX is the isoform responsible for 80% of the LOX activity in aortic SMCs,³⁹ it is essential to the maintenance of the tensile and elastic features of the vascular system.³⁸ LOX is synthesized as a pre-protein. After signal peptide hydrolysis, enzyme glycosylation, copper incorporation, and lysine tyrosylquinone generation, the enzyme is released into the extracellular space. Then, BMP-1 processes LOX, yielding the mature LOX form and its propeptide.²⁷ The mechanisms of the transcriptional regulation of

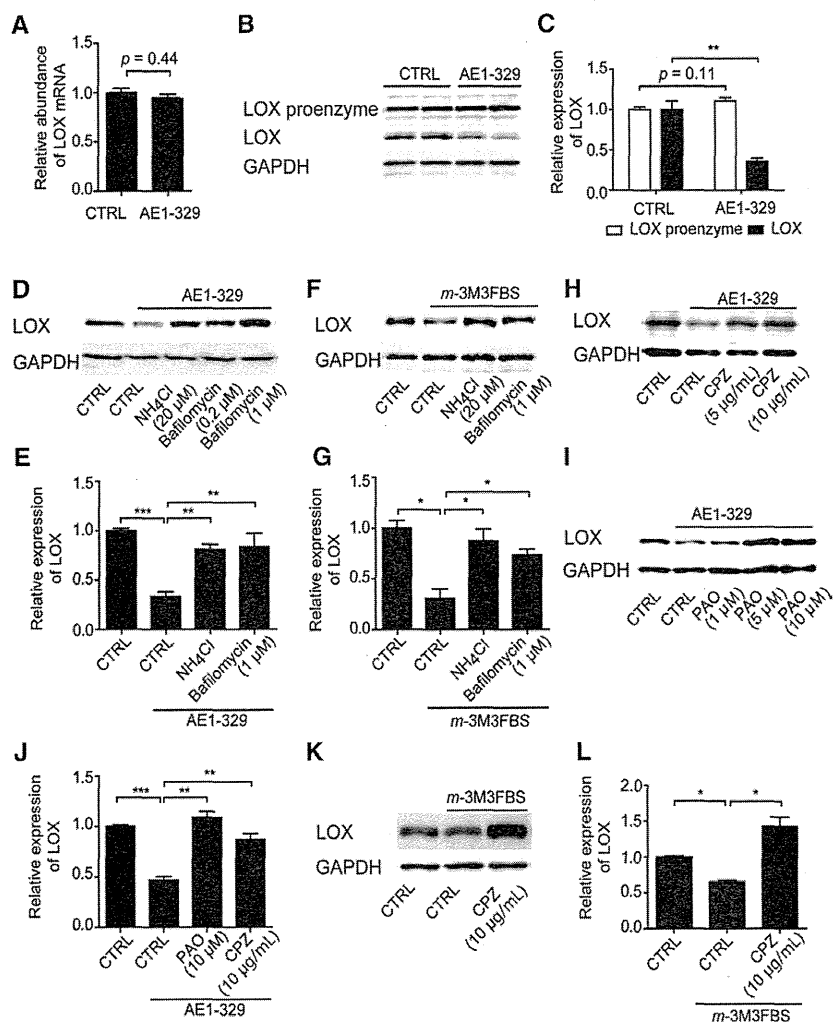


Figure 6. EP4 signaling decreased lysyl oxidase (LOX) protein through lysosomal degradation. **A** and **B**, Expression of LOX mRNA, pro-LOX, and LOX protein in ductus arteriosus smooth muscle cells (DASMCs) treated with AE1-329. mRNA of LOX and pro-LOX protein were not decreased by EP4 agonist in DASMCs. **C**, Quantification of **B**. n=4. **D** and **F**, Administration of lysosomal inhibitors (NH₄Cl or bafilomycin) for 24 h restored the AE1-329- or m-3M3FBS (0.5 μmol/L)-induced reduction of LOX protein. **E** and **G**, Quantification of **D** and **F**, respectively. n=6. **H** and **I**, Administration of clathrin-mediated endocytosis inhibitors (chlorpromazine or phenylarsine oxide) for 24 h restored the AE1-329-induced reduction of LOX protein. **J**, Quantification of **H** and **I**. n=4-6. **K**, Administration of chlorpromazine for 24 h restored the m-3M3FBS (0.5 μmol/L)-induced reduction of LOX protein. **L**, Quantification of **K**. *P<0.05, **P<0.01. ***P<0.001. Whole cell lysate was used for LOX detection. AE1-329 was used at 1 μmol/L.

LOX have been extensively studied. Interferon- γ , transforming growth factor- β , platelet-derived growth factor, connective tissue growth factor, and angiotensin II induce LOX gene expression via the interferon regulatory factor 1 transcriptional factor in multiple tissues, including blood vessels.^{40,41} On the other hand, atherogenic concentrations of low-density lipoprotein and tumor necrosis factor α reduce LOX mRNA.^{42,43} Song et al⁴⁴ have also shown that interferon- γ inhibits LOX gene expression through binding to the antagonistic transcriptional factor, interferon regulatory factor 2, in vascular SMCs.

In contrast to our understanding of these transcriptional regulations of LOX, little is known regarding LOX protein metabolism. In the present study, we demonstrated for the first time that the PGE₂-EP4 signal promoted lysosomal degradation of LOX protein. Recently, 1 study that used lysosomal inhibitors and Vps18-deficient mice demonstrated that LOX protein was degraded through lysosomes in Purkinje cells.⁴⁵ However, the detailed molecular mechanisms triggering the degradation of LOX protein have not been reported and should be examined in future studies. Once LOX is cleaved from the proenzyme, it acts as a highly reactive enzyme. The mature LOX form catalyzes an oxidative deamination of lysine and hydroxylysine residues to peptidyl α -amino adipic- δ -semialdehydes. These

highly reactive semialdehydes can spontaneously condense to form intra- and intermolecular covalent cross-linkages.²⁷ Elastic fiber formation must be highly regulated to ensure the integrity of vascular and other tissues. Therefore, in addition to transcriptional regulation, the existence of protein regulation of LOX that we demonstrated in this study is physiologically reasonable.

The Rabinovitch group has extensively studied the molecular mechanisms of the sparse elastic fiber formation in the medial layer of the DA. Their studies have demonstrated that LOX activity does not differ between the lamb DA, aorta, and pulmonary artery.⁴⁶ Our study demonstrated that LOX protein was dramatically decreased by EP4 signaling in rodents and humans, suggesting that LOX activity is decreased in these DAs. Currently, we do not have a clear explanation for the apparent inconsistency in terms of LOX expression and activity. Further research is required to determine the species difference in LOX protein metabolism and activity. The Rabinovitch group also demonstrated that there is decreased insolubilization of elastin in the DA that is associated with the truncated 52-kDa tropoelastin that lacks the C terminus,¹² which is unrelated to heightened elastolytic activity.⁴⁶ Similarly, our results showed that matrix metalloproteinase 2

activity does not differ between the DA and the aorta, suggesting that impaired elastogenesis rather than enhanced elastolytic activity provides a muscular arterial property to the DA.

The present study demonstrated that LOX expression is important during development. However, LOX expression is known to be markedly responsive to a variety of pathological states, including wound repair, aging, and tumorigenesis.⁴¹ In particular, strong evidence exists regarding the involvement of a reduction in LOX activity in the pathogenesis of vascular diseases characterized by destructive remodeling of the arterial wall. Previous reports demonstrated that aortic aneurysm and coronary dissections were related to a disturbance in LOX expression in animal models and humans.^{47,48} Therefore, the regulation of LOX expression is considered an attractive therapeutic target. In this study, it should be noted that there seems to be a threshold value for EP4 expression to induce a decrease in elastic fibers and LOX (Figures 2C and 4B). In our previous report, analyses of human aortic aneurysmal tissues demonstrated that EP4 expression is greater in aneurysmal lesions than that in nondiseased areas.⁴⁹ Further studies are required to investigate whether EP4-mediated LOX regulation plays a role in pathological conditions.

Taken together, these findings suggest that PGE₂-EP4 signaling inhibits elastogenesis in the DA by degrading LOX protein. The PGE₂-EP4-mediated LOX protein regulation via a previously unrecognized signaling pathway may also provide the basis for therapeutic strategies that target vascular elastogenesis.

Acknowledgments

We thank Professor S. Narumiya (Department of Pharmacology, Kyoto University Faculty of Medicine, Kyoto, Japan) for kindly providing EP4^{-/-} mice. We thank Professor S. Morita and Dr M. Taguri (Department of Biostatistics and Epidemiology, Yokohama City University, Yokohama, Japan) for assistance with statistical analysis. The adenoviruses of EP4 and LOX were kindly provided from Dr Y. Kobayashi (Matsumoto Dental University, Matsumoto, Japan) and Dr K. Yoshimura (Yamaguchi University, Yamaguchi, Japan), respectively. We also thank Yuka Sawada for histological analyses.

Sources of Funding

This work was supported by grants from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan (Y.I.), the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan (Y.I., U.Y., S.S., M.M., S.M.), a Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas (23116514 and 25116719 to U.Y., 22136009 to Y.I.), the Kitsuen Kagaku Research Foundation (Y.I.), the Foundation for Growth Science (S.M.), the Yokohama Foundation for Advanced Medical Science (U.Y., S.M.), the "High-Tech Research Center" Project for Private Universities: MEXT (S.M.), MEXT-Supported Program for the Strategic Research Foundation at Private Universities (S.M.), the Vehicle Racing Commemorative Foundation (U.Y., S.M.), Miyata Cardiology Research Promotion Funds (U.Y., S.M.), the Takeda Science Foundation (Y.I., U.Y., S.M.), the Japan Heart Foundation Research Grant (U.Y.), the Kowa Life Science Foundation (U.Y.), the Sumitomo Foundation (U.Y.), and the Shimabara Science Promotion Foundation (S.M.).

Disclosures

None.

References

1. Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev.* 2009;89:957–989.
2. Wagenseil JE, Ciliberto CH, Knutsen RH, Levy MA, Kovacs A, Mecham RP. The importance of elastin to aortic development in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;299:H257–H264.
3. Jager BV, Wollenman OJ. An Anatomical Study of the Closure of the Ductus Arteriosus. *Am J Pathol.* 1942;18:595–613.
4. de Reeder EG, van Munsteren CJ, Poelmann RE, Patterson DF, Gittenberger-de Groot AC. Changes in distribution of elastin and elastin receptor during intimal cushion formation in the ductus arteriosus. *Anat Embryol (Berl).* 1990;182:473–480.
5. Ho SY, Anderson RH. Anatomical closure of the ductus arteriosus: a study in 35 specimens. *J Anat.* 1979;128(pt 4):829–836.
6. Toda T, Tsuda N, Takagi T, Nishimori I, Leszczynski D, Kummerow F. Ultrastructure of developing human ductus arteriosus. *J Anat.* 1980;131(pt 1):25–37.
7. Tada T, Kishimoto H. Ultrastructural and histological studies on closure of the mouse ductus arteriosus. *Acta Anat (Basel).* 1990;139:326–334.
8. Schaeffer JP. The behavior of elastic tissue in the postfetal occlusion and obliteration of the ductus arteriosus (BOTALLI) in SUS SCROFA. *J Exp Med.* 1914;19:129–142.
9. Jaques A, Serafini-Fracassini A. Morphogenesis of the elastic fiber: an immunoelectronmicroscopy investigation. *J Ultrastruct Res.* 1985;92:201–210.
10. Gittenberger-de Groot AC. Persistent ductus arteriosus: most probably a primary congenital malformation. *Br Heart J.* 1977;39:610–618.
11. Gittenberger-de Groot AC, Moulart AJ, Hitchcock JF. Histology of the persistent ductus arteriosus in cases of congenital rubella. *Circulation.* 1980;62:183–186.
12. Hinek A, Rabinovitch M. The ductus arteriosus migratory smooth muscle cell phenotype processes tropoelastin to a 52-kDa product associated with impaired assembly of elastic laminae. *J Biol Chem.* 1993;268:1405–1413.
13. Hinek A, Mecham RP, Keeley F, Rabinovitch M. Impaired elastin fiber assembly related to reduced 67-kD elastin-binding protein in fetal lamb ductus arteriosus and in cultured aortic smooth muscle cells treated with chondroitin sulfate. *J Clin Invest.* 1991;88:2083–2094.
14. Mitchell MD, Lucas A, Etches PC, Brunt JD, Turnbull AC. Plasma prostaglandin levels during early neonatal life following term and pre-term delivery. *Prostaglandins.* 1978;16:319–326.
15. Woodward DF, Jones RL, Narumiya S. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress. *Pharmacol Rev.* 2011;63:471–538.
16. Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, Ghatak S, Akaike T, Segi-Nishida E, Iwasaki S, Iwamoto M, Misra S, Tamura K, Hori H, Yokota S, Toole BP, Sugimoto Y, Ishikawa Y. Chronic activation of the prostaglandin receptor EP4 promotes hyaluronan-mediated neointimal formation in the ductus arteriosus. *J Clin Invest.* 2006;116:3026–3034.
17. Segi E, Sugimoto Y, Yamasaki A, Aze Y, Oida H, Nishimura T, Murata T, Matsuoka T, Ushikubi F, Hirose M, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S, Ichikawa A. Patent ductus arteriosus and neonatal death in prostaglandin receptor EP4-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;246:7–12.
18. Smith GC, Wu WX, Nijland MJ, Koenen SV, Nathanielsz PW. Effect of gestational age, corticosteroids, and birth on expression of prostanoid EP receptor genes in lamb and baboon ductus arteriosus. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001;37:697–704.
19. Leonhardt A, Glaser A, Wegmann M, Schranz D, Seyberth H, Nüsing R. Expression of prostanoid receptors in human ductus arteriosus. *Br J Pharmacol.* 2003;138:655–659.
20. Rabinovitch M. Cell-extracellular matrix interactions in the ductus arteriosus and perinatal pulmonary circulation. *Semin Perinatol.* 1996;20:531–541.
21. Yokoyama U, Minamisawa S, Ishikawa Y. Regulation of vascular tone and remodeling of the ductus arteriosus. *J Smooth Muscle Res.* 2010;46:77–87.
22. Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, Akaike T, Suzuki S, Jin M, Jiao Q, Watanabe M, Otsu K, Iwasaki S, Nishimaki S, Sato M, Ishikawa Y. Prostaglandin E2-activated Epac promotes neointimal formation of the rat ductus arteriosus by a process distinct from that of cAMP-dependent protein kinase A. *J Biol Chem.* 2008;283:28702–28709.
23. 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.* 2010;106:1882–1892.
24. Hirai M, Ohbayashi T, Horiguchi M, Okawa K, Hagiwara A, Chien KR, Kita T, Nakamura T. Fibulin-5/DANCE has an elastogenic organizer activity that is abrogated by proteolytic cleavage in vivo. *J Cell Biol.* 2007;176:1061–1071.

25. Nguyen M, Camenisch T, Snouwaert JN, Hicks E, Coffman TM, Anderson PA, Malouf NN, Koller BH. The prostaglandin receptor EP4 triggers remodelling of the cardiovascular system at birth. *Nature*. 1997;390:78–81.
26. Nakamura T, Lozano PR, Ikeda Y, Iwanaga Y, Hinek A, Minamisawa S, Cheng CF, Kobuke K, Dalton N, Takada Y, Tashiro K, Ross J Jr, Honjo T, Chien KR. Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo. *Nature*. 2002;415:171–175.
27. Rodríguez C, Martínez-González J, Raposo B, Alcudia JF, Guadall A, Badimon L. Regulation of lysyl oxidase in vascular cells: lysyl oxidase as a new player in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*. 2008;79:7–13.
28. Mäki JM, Räsänen J, Tikkanen H, Sormunen R, Mäkilallio K, Kivirikko KI, Soininen R. Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction, and perinatal death in mice. *Circulation*. 2002;106:2503–2509.
29. Elzenga NJ, Gittenberger-de Groot AC. Localised coarctation of the aorta. An age dependent spectrum. *Br Heart J*. 1983;49:317–323.
30. Jimenez M, Daret D, Choussat A, Bonnet J. Immunohistological and ultrastructural analysis of the intimal thickening in coarctation of human aorta. *Cardiovasc Res*. 1999;41:737–745.
31. Kim JJ, Lakshmikanthan V, Frlot N, Daaka Y. Prostaglandin E2 promotes lung cancer cell migration via EP4-betaArrestin1-c-Src signalsome. *Mol Cancer Res*. 2010;8:569–577.
32. Buchanan FG, Gorden DL, Matta P, Shi Q, Matrisian LM, DuBois RN. Role of beta-arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:1492–1497.
33. Wang J, Yin G, Menon P, Pang J, Smolock EM, Yan C, Berk BC. Phosphorylation of G protein-coupled receptor kinase 2-interacting protein 1 tyrosine 392 is required for phospholipase C-gamma activation and podosome formation in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:1976–1982.
34. Mazharian A, Thomas SG, Dhanjal TS, Buckley CD, Watson SP. Critical role of Src-Syk-PLC(gamma)2 signaling in megakaryocyte migration and thrombopoiesis. *Blood*. 2010;116:793–800.
35. Min C, Kirsch KH, Zhao Y, Jeay S, Palamakumbura AH, Trackman PC, Sonenshein GE. The tumor suppressor activity of the lysyl oxidase propeptide reverses the invasive phenotype of Her-2/neu-driven breast cancer. *Cancer Res*. 2007;67:1105–1112.
36. Regan JW. EP2 and EP4 prostanoid receptor signaling. *Life Sci*. 2003;74:143–153.
37. Ma YC, Huang J, Ali S, Lowry W, Huang XY. Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell*. 2000;102:635–646.
38. Kagan HM, Li W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem*. 2003;88:660–672.
39. Mäki JM, Sormunen R, Lippo S, Kaarteenaho-Wiik R, Soininen R, Myllyharju J. Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues. *Am J Pathol*. 2005;167:927–936.
40. Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Fujii K, Akiyama N, Furutani A, Hoshii Y, Tanaka N, Ricci R, Ishihara T, Esato K, Hamano K, Matsuzaki M. Regression of abdominal aortic aneurysm by inhibition of c-Jun N-terminal kinase. *Nat Med*. 2005;11:1330–1338.
41. Smith-Mungo LI, Kagan HM. Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol*. 1998;16:387–398.
42. Rodríguez C, Alcudia JF, Martínez-González J, Raposo B, Navarro MA, Badimon L. Lysyl oxidase (LOX) down-regulation by TNFalpha: a new mechanism underlying TNFalpha-induced endothelial dysfunction. *Atherosclerosis*. 2008;196:558–564.
43. Rodríguez C, Raposo B, Martínez-González J, Casaní L, Badimon L. Low density lipoproteins downregulate lysyl oxidase in vascular endothelial cells and the arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1409–1414.
44. Song YL, Ford JW, Gordon D, Shanley CJ. Regulation of lysyl oxidase by interferon-gamma in rat aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:982–988.
45. Peng C, Yan S, Ye J, Shen L, Xu T, Tao W. Vps18 deficiency inhibits dendritogenesis in Purkinje cells by blocking the lysosomal degradation of Lysyl Oxidase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;423:715–720.
46. Zhu L, Dagher E, Johnson DJ, Bedell-Hogan D, Keeley FW, Kagan HM, Rabinovitch M. A developmentally regulated program restricting insolubilization of elastin and formation of laminae in the fetal lamb ductus arteriosus. *Lab Invest*. 1993;68:321–331.
47. Nakashima Y, Sueishi K. Alteration of elastic architecture in the lathyrus rat aorta implies the pathogenesis of aortic dissecting aneurysm. *Am J Pathol*. 1992;140:959–969.
48. Sibon I, Sommer P, Lamaziere JM, Bonnet J. Lysyl oxidase deficiency: a new cause of human arterial dissection. *Heart*. 2005;91:e33.
49. 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*. 2012;7:e36724.

CLINICAL PERSPECTIVE

The ductus arteriosus (DA) is a fetal bypass artery between the aorta and the pulmonary artery. Although the DA closes immediately after birth, it remains open in some infants, a condition known as patent DA. Patent DA remains a frequent problem among premature infants with significant morbidity and mortality. Both vascular contraction and remodeling (ie, intimal thickening) are required for complete anatomical closure of the DA. Decreased elastogenesis is known as a hallmark of DA remodeling and is thought to contribute to intimal thickening of the DA. However, the molecular mechanisms of decreased elastogenesis are not fully understood. Herein, we show that prostaglandin E₂ (PGE₂) receptor EP4 signaling promotes degradation of the mature lysyl oxidase protein, a cross-linking enzyme for elastic fibers, only in the DA, leading to decreased elastogenesis. The newly recognized PGE-EP4-c-Src-PLCγ-signaling pathway most likely contributes to the lysosomal degradation of lysyl oxidase. Based on these data, it appears that PGE-EP4 signaling is required for DA remodeling and that inhibition of this signaling by cyclooxygenase inhibitors may attenuate DA remodeling after birth, especially in premature infants in which the DA is not fully remodeled. Activation of the c-Src-PLCγ signaling pathway may be an additional strategy to promote anatomical closure of the immature DA.