

# 周生期動脈管におけるEP<sub>1</sub>~<sub>4</sub>受容体の 発現動態とその機能

*Characterization of prostaglandin E<sub>2</sub> receptors(EP<sub>1-4</sub>) in ductus arteriosus in the perinatal rat*

白井明志, 有嶋和義, 山本雅子

麻布大学大学院獣医学研究科

Mitsuyuki Shirai, Kazuyoshi Arishima, Masako Yamamoto

Graduate School of Veterinary Science, Azabu University

**Abstract.** The expression of prostaglandin (PG) E<sub>2</sub> receptor subtypes in the ductus arteriosus (DA) was studied in the perinatal rat. In addition, the effects of EP<sub>2</sub> receptor selective agonist on the fetal DA were also examined.

In the first series of experiments, EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> and EP<sub>4</sub> receptor mRNA expressions were investigated in the DA in fetal (day 21 of gestation) and newborn (1 hour and 3 hours after delivery) rats by RT-PCR analysis. In the second series of experiments, pregnant rats were given intravenous injections of EP<sub>2</sub> receptor selective agonist (L-lysine (z)-7-[(1R, 2R, 3R, 5R)-5-chloro-3-hydroxy-2-[(E)-(S)-4-(1-ethylcyclobutyl)-4-hydroxy-1-butenyl] cyclopentyl]-5-heptenate) at 3, 10, and 30 mg/kg. The DA and pulmonary artery (PA) in the fetal rats were calibrated using a whole-body freezing method on day 21 of gestation. The results were follows: (1) all PGE<sub>2</sub> receptor subtypes were expressed in the DA in fetal and newborn rats. (2) The DA caliber and the DA/PA ratio of the EP<sub>2</sub> receptor selective agonist -treated group were not significantly different from those in the control group.

It was concluded that all PGE<sub>2</sub> receptor subtypes were expressed in the DA in both fetal and newborn rats and that EP<sub>2</sub> receptor selective agonist has no constrictive or dilating effects on the DA in fetal rats.

## 1. 目的

プロスタグランジン (PG) E<sub>2</sub>が胎生期にのみ存在する血管「動脈管」の胎生期での拡張維持及び出生後の収縮閉鎖に大きく関わっていることは広く知られている [1, 2]。PGE<sub>2</sub>の受容体には、EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub>及びEP<sub>4</sub>の4つのサブタイプが存在し、それぞれが全く異なる情報伝達系に共役していることが明らかにされている。EP<sub>1</sub>受容体は、イノシトール3リン酸系を介して血管を拡張させる, EP<sub>2</sub>受容体とEP<sub>4</sub>受容体はcAMP系を介して血管を拡張させる, EP<sub>3</sub>受

容体はcAMPを減少させ血管を収縮させることが報告されている [3]。一方, 周生期の動脈管におけるこれらのPGE<sub>2</sub>受容体の発現動態に関しては, ブタやヒツジにおいて, 胎生期の動脈管ではEP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub>及びEP<sub>4</sub>受容体が発現しているが, 新生子の動脈管ではEP<sub>2</sub>受容体は胎生期と同じレベルに発現しているのに対してEP<sub>3</sub>及びEP<sub>4</sub>受容体はその発現レベルは減少すると報告されている [4, 5, 6]。又, Segiら [7] が, EP<sub>4</sub>受容体欠損マウスが出生後の動脈管閉鎖が行われず動脈管開存症によって死亡することを報告してから, 動脈管の胎生期における拡張維持と

出生後の収縮閉鎖過程におけるPGE<sub>2</sub>受容体の機能が注目されている。そこで本研究は、出生前後のラット動脈管における4種のPGE<sub>2</sub>受容体の発現動態をRT-PCR法を用いて明らかにするとともにPGE<sub>2</sub>受容体の選択的作動薬を母体に投与しその子の動脈管の変化を観察した。

## 2. 方法

### 1) RT-PCRによる周生期の動脈管におけるPGE<sub>2</sub>受容体の発現動態

動物は、動物は交配時に12～15週齢に達した雌のWistarラットを用いた。動物の飼育は、温度21±2℃、湿度55±5%に設定された動物室で行った。飼料として固形飼料及び水道水を自由給与した。妊娠動物を得るために、雌雄のラットを終夜同じケージに同居させ、翌朝雌の膈垢内の精子の存在を調べて、精子の確認された日を妊娠0日とした。胎齢21日の胎子動脈管の採取は妊娠21日目の13:00に行った。新生子動脈管の採取は、妊娠21日目の13:00に帝王切開によって得た新生子から出生後1時間及び3時間に行った。採取した動脈管より、Isogen(日本ジーン)を用いてtotal RNAを抽出した。RT-PCRはSUPERSRIPT™ One-Step RT-PCR with PLATINUM Taq (Invitrogen)を用いて実施した。cDNA合成は50℃, 30分, 1サイクルで行い, 94℃, 2分間で逆転写反応を不活性化した。各々のPCR反応は, cDNAの加熱変性を94℃, 30秒, アニールングを60℃, 30秒, DNA鎖の伸長反応を72℃, 30秒で行い, これを35サイクル行った。使用したプライマーの塩基配列は, EP<sub>1</sub>受容体 forward; TGTATACTGCAGGACGTGCGCCC, EP<sub>1</sub>受容体 reverse; GGGCAGCTGTGGTTGAAGTGATG, EP<sub>2</sub>受容体 forward; CCGCGCGTGTACCTATTTTCGC, EP<sub>2</sub>受容体 reverse; GCTCCGAAGCTGCATGCGAA, EP<sub>3</sub>受容体 forward; GCCGGGAGAGCAAACGCAAAA, EP<sub>3</sub>受容体 reverse; ACACCAGGGCTTTGATGGTTCGCCAGG, EP<sub>4</sub>受容体 forward; TTCCGCTCGTGGTTCGAGTGTTTC, EP<sub>4</sub>受容体 reverse; GAGGTGGTGTCTGCTTGGGTCAGである。得られたPCR産物は, 3%アガロースゲル上で電気泳動し, ethidium bromideで染色し観察を行った。

### 2) EP<sub>2</sub>受容体作動薬の胎子動脈管に及ぼす影響

動物は、交配時に12～15週齢に達した雌のIGS系ラットを用いた。動物の飼育は、実験1と同じ条件にて行った。EP<sub>2</sub>受容体作動薬(L-lysine (z)-7-[(1R, 2R, 3R, 5R)-5-chloro-3-hydroxy-2-[(E)-(S)-4-(1-ethylcyclobutyl)-4-hydroxy-1-butenyl] cyclopentyl]-5-heptenate)の投与量は3, 10及び30 mg/kgとし、投与経路は静脈内(尾静脈)投与とした。妊娠21日目の13:00を剖検日時と定め、投与は、各投与量のEP<sub>2</sub>受容体作動薬を生理的食塩水に溶解したものを投与液として、剖検時間の3, 6及び24時間前に1回行った。又、生理的食塩水5 mL/kgを剖検時間の3時間前に同様に投与した群を対照群とした。剖検の際、母体を断頭法によって安楽死させた後、帝王切開により速やかに胎子を取り出し、無呼吸のもとに、冷却器によって-45～-50℃に調節されたアセトン中に胎子を投入し凍結させた。凍結した胎子は、観察まで-28℃にて保存した。動脈管の観察には、急速全身凍結法を用いた。まず、頭部及び剣状突起部より後方を切断して除去し、残りの胸部を簡易凍結器の凍結台の上に背面を上にして乗せ、動脈管が水平面に対してほぼ垂直になるように、胎子の胴体の下に水滴をたらし、向きを調節し固定した。この固定した胎子胸部の背面を、実体顕微鏡下でメスを用いて水平に僅かに切り削ぐと胸椎が白く見え、左右の肋骨も確認される。更に切り進めていくと、中央に胸大動脈そして食道が連続して切断面に現れる。食道を削っていくと動脈管と大動脈の連結部が見られ、ついには動脈管と大動脈が分離する。動脈管が大動脈から完全に分離したところで、実体顕微鏡の接眼レンズに挿入したマイクロメーターを用いて、動脈管の内径を測定した。又、この部位からもう少し切り進め、左右の肺動脈の起始部を認め、更に1本の肺動脈となったところで肺動脈の内径を同様に測定した。得られた動脈管及び肺動脈の内径から、“動脈管内径/肺動脈内径”比(以下DA/PA比)を算出した。統計学的解析は、studentのt検定によって行った。

## 3. 結果と考察

RT-PCRによって胎子及び新生子動脈管におけるPGE<sub>2</sub>受容体の発現動態を検討したところ、胎齢21日の胎子動脈管、出生後1及び3時間の新生子動脈管において、すべてのPGE<sub>2</sub>受容体の発現がみられた。

EP<sub>1</sub>, EP<sub>3</sub>及びEP<sub>4</sub>受容体は観察したすべての時間でほぼ同等の発現量を示していたのに対して, EP<sub>2</sub>受容体は胎齢21日の胎子及び出生後1時間の新生子と比較して, 出生後3時間の新生子ではその発現量が減少する傾向がみられた。又, EP<sub>2</sub>受容体作動薬を母体に投与した実験では, 雌雄ともにEP<sub>2</sub>受容体作動薬を投与したすべての群において, 対照群と比較して胎子動脈管内径及び胎子肺動脈内径に有意な変化はみられず, 動脈管の拡張・収縮の程度を最もよく示す指標であるDA/PA比においても対照群, 全てのEP<sub>2</sub>受容体作動薬投与群ではほぼ1の値を示していた。

本研究では, ラットにおいて周生期動脈管におけるPGE<sub>2</sub>受容体の発現動態がブタやヒツジといった動物と異なり, EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub>及びEP<sub>4</sub>のすべての受容体が胎子期にも新生子期にも発現していることを明らかにした。ヒト新生子動脈管においても, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub>及びEP<sub>4</sub>受容体が発現している [8] ことから, 動物種によって各PGE<sub>2</sub>受容体の周生期動脈管における発現動態は異なるのであろう。又, 前述のとおり, ブタやヒツジでEP<sub>4</sub>受容体が出生後減少することから, EP<sub>4</sub>受容体の減少がPGE<sub>2</sub>に対する動脈管の感受性を減少させ動脈管の収縮閉鎖機構に関与すると考える研究グループもあるが, 本研究では, ラットにおいては出生後動脈管が急速に収縮を始める出生後1時間, 動脈管がほぼ完全に閉鎖する出生後3時間においても, EP<sub>4</sub>受容体の発現動態に変化はみられていない。更に, ラット新生子においてEP<sub>4</sub>選択的作動薬が動脈管の再拡張作用を持つという [9]。従って, ラットにおいてEP<sub>4</sub>受容体は出生後も発現しており又機能していることから, 動脈管の出生後の収縮閉鎖機構におけるEP<sub>4</sub>受容体の関わりについては, 今後さらなる検討が必要と考えられた。

一方, EP<sub>2</sub>受容体選択的作動薬を母ラットに投与し, その子の動脈管の変化を調べてみたが, 何ら影響を観察することができなかった。

以上のとおり, 本研究ではラットにおいてはこれまでに報告のあったブタやヒツジと異なり, 胎子及び新生子動脈管にすべてのPGE<sub>2</sub>受容体が発現していることを明らかにした。

#### 4. 要約

動脈管の胎生期における拡張維持と出生後の収縮

閉鎖過程においてプロスタグランジン (PG) E<sub>2</sub>が大きく関与していることは広く知られている。PGE<sub>2</sub>の受容体は, EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub>及びEP<sub>4</sub>の4つのサブタイプの存在しているが, ラットにおいて周生期動脈管におけるこれらの各PGE<sub>2</sub>受容体の発現動態に関する報告は未だなされていない。そこで本研究は, 出生前後のラット動脈管における4種のPGE<sub>2</sub>受容体の発現動態をRT-PCR法を用いて明らかにするとともにPGE<sub>2</sub>受容体選択的アゴニストを母体に投与しその子の動脈管の変化を観察した。その結果, ラット胎子及び新生子動脈管において, すべてのEP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub>及びEP<sub>4</sub>受容体が発現していることが明らかとなった。一方, EP<sub>2</sub>受容体選択的作動薬の母ラットへの投与は, その子の動脈管に何ら影響を及ぼさなかった。

#### 文 献

- 1) Coceani, F., Olley, P. M. *Can J Physiol Pharmacol*, 51: 220-225, 1973.
- 2) Clyman, R. I., Manuary, F., Roman, C., Pudolph, A. M. *Prostaglandins*, 16: 259-264, 1978.
- 3) Coleman, R. A., Smith, W. L., Narumiya, S. *Pharmacol Rev*, 46: 205-29, 1994.
- 4) Bhattacharya, M., Asselin, P., Hardy, P., Guerguerian, A. M., Shichi, H., Hou, X., Varma, D. R., Bouayad, A., Fouron, J. C., Clyman, R. I., Chemtob, S. *Circulation*, 100: 1751-1756, 1999.
- 5) Bouayad, A., Bernier, S. G., Asselin, P., Hardy, P., Bhattacharya, M., Quiniou, C., Fouron, J. C., Guerguerian, A. M., Varma, D. R., Clyman, R. I., Chemtob, S. *Semin Perinatol*, 25: 70-75, 2001
- 6) Bouayad, A., Kajino, H., Waleh, N., Fouron, J. C., Andelfinger, G., Varma, D. R., Skoll, A., Vazquez, A., Gobeil, F. Jr., Clyman, R. I., Chemtob, S. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280: H2342-H2349, 2001.
- 7) 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. *Biochem Biophys Res Commun*, 246: 7-12, 1998.
- 8) Leonhardt, A., Glaser, A., Wegmann, M., Schranz, D., Seyberth, H., Nusing, R. *Br J Pharmacol*, 138: 655-659, 2003.
- 9) Momma, K., Toyoshima, K., Takeuchi, D., Imamura, S., Nakanishi, T. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 78: 117-128, 2005.