

## 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

桜井 研三

専攻分野：小児科学

コース：

指導教授：山本 仁

主論文の題目：

Antenatal Glucocorticoid Administration Enhances Sarcoplasmic Reticulum Calcium Transport ATPase 2a and Phospholamban Expression in The Immature Fetal Rat Heart

(出生前グルココルチコイド投与によるラットの胎仔心筋小胞体蛋白発現の増強)

共著者：

Yuko Takeba, Masanori Mizuno, Kentaro Asoh,

Yoshimitsu Tsuzuki, Naoki Matsumoto, Hitoshi Yamamoto

緒言

早産児の分娩が予想される妊娠母体における出生前の母体に対するグルココルチコイド(GC)療法は、出生児の呼吸窮迫症候群や心不全などの様々な疾患の発症を抑制し、また出生後の死亡率を低下させることが報告されており、臨床においてその治療法は推奨されている。出生前GC療法が肺を成熟させることはすでに報告されているが、心臓への作用についてはこれまで出生前GC投与におけるラットの胎仔心筋への影響を検討し、心筋の収縮に関わるトロポニン T の発現を増強させること、ATP生成に関与する creatine kinase の発現を増強させることを明らかにしてきた。しかし心筋の収縮弛緩に関わるカルシウムイオンの調節機能については明らかではない。心臓の収縮弛緩は筋小胞体でのカルシウムイオンの出入りによって主に調節されている。特に筋小胞体  $Ca^{2+}$ ATPase (SERCA2a) は重要な因子であり、その調節蛋白である phospholamban とともに重要な役割を果たしていることが明らかになっ

てきた。そこで本研究では出生前 GC 投与が、ラットの胎仔心筋の SERCA2a や phospholamban 発現に影響を与えるかを検討した。

## 方法

Wistar 系妊娠ラットの妊娠 17 日および 19 日にデキサメタゾン (DEX: 0.5, 1.0, 2.0mg/kg) を 2 日間投与し、妊娠 19 日および 21 日に帝王切開で取り出した胎仔ラット (早産胎仔群) および自然分娩させた日齢 1 の新生仔ラット (新生仔群) の心臓組織を実験に供した。心臓組織より蛋白を抽出して、胎仔 19 日、21 日、新生仔 1 日の SERCA2a と phospholamban の蛋白発現を免疫染色とウエスタンブロット法により比較検討した。また DEX の投与による心臓への作用が GC 受容体からの直接作用かを確認するため、ラット心筋培養細胞に DEX および GC 受容体阻害薬 (RU486) を添加し SERCA2a 蛋白発現や心筋細胞内カルシウム濃度を検証した。なお本研究は “guiding principles for the care and use of laboratory animals” (The Japanese Pharmacological Society) に準拠し、聖マリアンナ医科大学実験動物委員会による審査、承認を受けて行った (承認番号 1306005)。統計は Steel-Dwass の多重比較検定を用いた。

## 結果

SERCA2a の蛋白発現は、胎仔 19 日で DEX 投与群の 1.0mg/kg ( $95.75 \pm 7.58\%$ ) と 2.0mg/kg ( $123.49 \pm 15.74\%$ ) において非投与群 ( $39.22 \pm 2.30\%$ ) と比較し有意に増強した ( $P < 0.05$ )。胎仔 21 日では、DEX 投与群の 1.0mg/kg ( $170.72 \pm 5.51\%$ ) において非投与群 ( $67.75 \pm 6.69\%$ ) と比較し有意に増強した ( $P < 0.05$ )。免疫組織染色では DEX 投与により胎仔 19 日と胎仔 21 日で右心室、左心室ともに SERCA2a の陽性細胞数が有意に増加した ( $P < 0.05$ )。また phospholamban における蛋白発現は、胎仔 19 日と胎仔 21 日では DEX 1.0mg/kg ( $107.29 \pm 8.97\%$ ,  $103.09 \pm 5.74\%$ ) と 2.0mg/kg ( $110.01 \pm 17.06\%$ ,  $105.73 \pm 7.65\%$ ) の投与により非投与群 ( $69.92 \pm 8.81$ ,  $90.22 \pm 8.76\%$ ) と比較し有意に増強した ( $P < 0.05$ )。免疫組織染色では DEX 投与により胎仔 19 日と胎仔 21 日で右心室、左心室ともに陽性細胞数が有意に増加した ( $P < 0.05$ )。In vitro においては、新生仔 1 日初代培養心筋細胞に DEX を投与すると SERCA2a 陽性細胞数は有意に増加し ( $P < 0.05$ )、GC 受容体阻害薬 (RU486) の投与によってそれらは有意に抑制された ( $P < 0.05$ )。この時の細胞内カルシウム濃度も DEX 投与で有意な上昇を認め ( $P < 0.05$ )、RU486 の投与によって有意に抑制された ( $P < 0.05$ )。

## 考察

早産児は胎児循環から新生児の肺循環への環境変化に順応出来ずに

呼吸障害や心不全を発症することが多い。それらは自然分娩で出生した新生児と比較し各臓器が未熟であることが原因の一つと考えられている。出生前 GC 投与は肺の成熟や心筋エネルギーの増強を促すことが明らかになってきたが、胎児心筋小胞体への影響に関してはまだ不明である。本研究では出生前 GC 投与が未熟心筋に影響を及ぼす因子として、カルシウム調節に重要な役割を担う心筋小胞体の SERCA2a や phospholamban の発現に注目し検討した。免疫組織染色とウエスタンブロット法において SERCA2a と phospholamban はともに胎仔 19 日と胎仔 21 日で DEX 投与により発現が増強したことを確認した。また初代培養心筋細胞に DEX を添加すると SERCA2a の発現増強や細胞内カルシウム濃度の上昇を認めた。そしてこの上昇はあらかじめ GC 受容体阻害薬の添加により抑制され、DEX の作用が心筋への直接作用であることが分かった。DEX 1.0mg/kg を投与された胎仔 19 日と DEX 0.5mg/kg を投与された胎仔 21 日の心筋の SERCA2a 蛋白発現量は、新生仔 1 日の非投与群と同等のレベルまで増強した。Phospholamban に関しては、DEX 1.0mg/kg を投与された胎仔 19 日、21 日の蛋白発現量は、新生仔 1 日の非投与群と同等のレベルまで増強し、DEX は筋小胞体蛋白の発現増強を促したことが明らかになった。

心不全の状態にある筋小胞体では、心不全の原因に関わらず SERCA2a 発現が低下しており、さらに遺伝子治療などによって SERCA2a 発現を増強させると心機能の改善がみられることが報告されている。心筋の収縮と弛緩は、細胞内カルシウムの移動量とそのタイミングなどにより規定されている。SERCA2a と phospholamban は弛緩時に細胞内カルシウムを筋小胞体に取り込む働きを担っており、これらの機能低下は心筋の弛緩能を減弱させるとともに、筋小胞体内のカルシウム量を減らすことで収縮時に筋小胞体から細胞内に移動するカルシウム量も減らし収縮能の低下も招く。従って我々の結果のように、胎仔心筋の SERCA2a と phospholamban 発現が増加することは、早産仔の心不全発症の要素となり得る胎仔の未熟な筋小胞体機能が、DEX 投与により正常な新生仔レベルまで改善し、出生後の心機能に貢献している可能性がある。つまり、出生前 GC 投与は胎仔期の未熟心筋に対して SERCA2a と phospholamban の発現を増強させ筋小胞体機能を増強させ得る。

## 結論

出生前 GC 療法は、胎仔の未熟心筋におけるカルシウム調節機能の発達に寄与する可能性が明らかとなった。