

## 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

高木 泰

専攻分野：内科学

コース：循環器内科

指導教授：明石 嘉浩

主論文の題目：

Implication of Cyclic AMP/cAMP-responsive Element Binding Protein Pathway Contributes both Surfactant Protein B Production and Lung Cell Proliferation in the Preterm Infant Lung with Antenatal Glucocorticoid Administration

(出生前グルココルチコイド投与によるラット早産仔の肺サーファクタント B 産生および肺細胞増殖に対する CREB の関与)

共著者：

Yuko Takeba, Kenzo Sakurai, Masanori Mizuno, Yoshimitsu Tsuzuki, Yosuke Osada, Kentaro Asoh, Yoshihiro Akashi, Naoki Matsumoto

緒言

新生児の呼吸窮迫症候群 (respiratory distress syndrome: RDS) は、肺サーファクタントの欠乏による呼吸障害で、早産児における発症率は高い。早産児の RDS または急性疾患の予防に臨床応用されている妊娠母体に対する出生前グルココルチコイド (GC) 療法は、新生児肺の成熟または肺サーファクタント産生の促進のために推奨されている。今回は、出生前 GC 投与による胎児や新生児への肺サーファクタント産生と肺成熟に関与する因子を明らかにする目的で、出生前 GC 投与を行った早産仔ラット肺のサーファクタント蛋白の発現と肺細胞増殖に関与する因子について検討した。

## 方法・対象

Wistar 系妊娠ラット(日本クレア、東京)の妊娠 19 日目および 21 日目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 日、3 日そして 5 日目の新生児ラット (新生仔群) を作成した。またそれぞれの群で、出産 2 日前の妊娠ラットにデキサメサゾン (DEX : 0.5, 1.0, 2.0mg/kg) を 2 日間皮下投与した胎仔および新生仔群の肺を摘出した。

肺組織より mRNA を抽出し、肺サーファクタントプロテイン (SP) -A, B, C および D の mRNA 発現を real-time RT-PCR で解析した。肺組織のパラフィン切片を作成し SP-B, cAMP responsive element binding protein (CREB), phosphorylated CREB および細胞増殖マーカー Ki-67 の蛋白発現を免疫組織化学染色で解析した。また、肺組織の cAMP 量を ELISA 法 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を用いて測定した。DEX 投与による SP-B mRNA 発現および肺細胞増殖への作用が受容体または CREB を介するかどうかを、ラットの胎児肺由来細胞を用いて検討した。GC 受容体拮抗薬 (RU-486) 10  $\mu$  M または cAMP 阻害剤 (Rp-cAMPS) 100nM を細胞に前処置後、DEX 1  $\mu$  M を添加し 24 時間培養した。SP-B mRNA 発現および肺細胞増殖反応は MTS 法で評価した。

なお本研究は、聖マリアンナ医科大学実験動物委員会(承認 1308002 号)の承認を受け本学動物倫理指針に準拠し行った。統計解析は Steel-Dwass 法を用いた。

## 結果

胎仔ラットの肺組織における SP-A, B, C mRNA 発現は新生仔に比較し発現が有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。SP-D mRNA に関しては、今回の実験条件では検出されなかった。また、19 日および 21 日胎仔ラットの DEX 投与群は、非投与群に比較し SP-B mRNA の発現が有意に増強した

( $P < 0.05$ )。免疫組織染色において、21 日胎仔ラットの肺組織における SP-B 陽性細胞は新生仔の肺組織と比較し有意に少なかった ( $P < 0.05$ )。また DEX 投与により 21 日胎仔ラットの SP-B 陽性細胞は非投与群と比較し有意に増加した ( $P < 0.05$ )。また Ki-67 陽性細胞は、19 日胎仔ラット DEX 投与群で非投与群と比較し約 3 倍増加した。また肺組織の cAMP 量は胎仔ラットで新生仔ラット (3 日目) と比較し有意に低値を示し ( $P < 0.05$ )、19 日および 21 日胎仔ラットの DEX 投与群では cAMP 産生量は非投与群と比較し有意に増加した ( $P < 0.05$ )。DEX 投与群の 21 日胎仔ラットの肺組織における CREB 陽性細胞は免疫組織染色において、非投与群と比較し有意に多く認められた ( $P < 0.05$ )。phosphorylated CREB に関して、DEX 投与により 19 日胎仔ラットの肺組織において有意な発現増強が認められた ( $P < 0.05$ )。

ラットの胎児肺由来細胞に DEX を添加すると SP-B mRNA の発現増強効果および細胞増殖作用が認められるが、この作用は RU-486 および Rp-cAMPS 前処置により有意に抑制された ( $P < 0.05$ )。

## 考察

妊娠母体に対する出生前 GC 療法は、新生児肺の肺サーファクタント産生および肺の成熟促進作用により RDS の発症を予防することが証明されている。GC による SP 発現の機序や、肺成熟に対する作用については明らかにされてきたが、両者の関与する因子を十分精査した報告は少ない。本研究では臨床での 34 週以前の母体を想定し、妊娠ラットの 17 日目および 19 日目に DEX を投与し、SP-A や C ではなく SP-B mRNA および蛋白発現の増強を確認できたことは、意義のある事と考えられた。

また、SP-B 遺伝子のプロモーター領域には CREB 結合部位が報告されている。PKA シグナル経路の主要な転写因子である CREB は、肺の成熟を促進する因子として肺内皮細胞の分化等に寄与している。本研究では、GC 投与による胎仔肺の cAMP 量の上昇と CREB、そして phosphorylated

CREB の発現増強が認められ、自然分娩の新生仔群と同等レベルまで達する事がわかった。また GC 投与による CREB の発現増強や GC が直接受容体を介して SP-B 産生や肺細胞増殖を促進することを確認するため、胎児由来肺細胞に GC 受容体拮抗薬や、CREB 阻害薬を前処置して GC を添加すると SP-B 産生や肺細胞増殖が抑制された。これらの結果から CREB が GC 投与による SP 発現および肺細胞増殖作用両方に関わる可能性を見出した。GC 投与による SP 発現増強および肺細胞増殖作用両者に CREB の活性化が必要であることが考えられた。

### 結論

以上の結果より、出生前 DEX 投与による早産仔の肺での SP-B 産生の増加および肺細胞の増殖に cAMP/CREB の関与が重要であることが示唆された。