

## 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

長田 洋資

専攻分野：小児科学

コース：

指導教授：山本 仁

主論文の題目：

出生前グルココルチコイド投与による胎仔心筋肥大における Akt1 および c-Myc の関与

共著者：

武半 優子、水野 将徳、桜井 研三、都築 慶光、麻生 健太郎、山本 仁、松本 直樹

緒言

我々は早産が予想される妊娠母体に対する出生前グルココルチコイド(GC)投与が、胎児の心臓の心筋収縮関連蛋白発現の増加や ATP 産生能を増強し、心臓の成熟を促進することを示してきた。また心筋断面積が増大することも確認した。しかし、心筋肥大がおきるメカニズムは不明であった。胎仔および新生仔の心臓における Akt-1 と、その下流で細胞増殖に関与する c-Myc に着目し解析を行った。

方法・対象

8 週齢の妊娠ラットの胎生 17 日、19 日にデキサメタゾン(DEX)0.5,

1. 0, 2. 0mg/kg を 2 日間皮下投与し、胎生 19 日、21 日に帝王切開で心臓を摘出した(胎仔群)。また胎生 20 日に DEX を 2 日間投与し、自然分娩で出生した日齢 1 の新生仔ラットの心臓も摘出した(新生仔群)。対照群には DEX の溶媒を同容量投与した。心臓肥大や細胞増殖に関与する Akt および c-Myc の蛋白発現は、免疫組織染色法およびウエスタンブロット法で検討した。

また初代培養心筋細胞に GC 受容体阻害薬(RU486)を前処理後、DEX を添加し培養後、c-Myc mRNA 量を Realtime RT-PCR で解析した。

なお本研究は聖マリアンナ医科大学実験動物委員会による審査、承認を受けた(承認番号: 1406013)。統計は Steal-Dwass 法を用いた。

## 結果

Akt-1 の生理的な蛋白発現量は、胎生 19 日(42.96 ± 9.46%)の胎仔に比べ日齢 1, 3 および 5(日齢 1:100.00 ± 11.08%, 日齢 3:106.84 ± 9.03%、日齢 5 : 121.00 ± 10.25%)の新生仔で有意に増加した。胎生 19 日の非投与群(33.50 ± 7.43%)と比較し DEX 2.0mg/kg の投与(117.21 ± 9.59%)で有意な増加を認めた。胎生 21 日においても非投与群(43.02 ± 4.81%)と比較し DEX 1.0mg/kg (95.08 ± 6.79%)および 2.0mg/kg 投与(96.88 ± 13.27%)で有意に Akt-1 の発現が増強した。

DEX 非投与群の c-Myc の蛋白発現は、日齢 1(100.00 ± 70.56%)と比較して胎生 19 日、21 日(19 日 : 422.74 ± 9.78%, 21 日 : 348.16 ± 26.73%)が有意に高値を示した。また非投与群に比べ DEX 0.5mg/kg、1.0mg/kg および 2.0mg/kg のいずれの群においても用量依存的に増強した(19 日 0.5mg; 1.0mg; 2.0mg: 866.60 ± 10.27%; 1290.29 ± 69.96%; 2158.14 ± 112.72%, 21 日 0.5mg; 1.0mg; 2.0mg: 500.53 ± 13.05%; 647.98 ± 54.51%; 1785.80 ± 70.85%, 日齢 1 0.5mg; 1.0mg; 2.0mg: 388.14 ± 66.26%; 581.69 ± 12.21%; 979.44 ± 24.86%)。また c-Myc 蛋白の局在を免疫組織染色で確認すると、両心室

で均等に認められ、DEX 投与群で c-Myc 陽性細胞は有意に増加した。

ラット初代心筋培養細胞における DEX 添加群の c-Myc mRNA 量( $1.58 \times 10^{-3}$ )は非添加群( $1.18 \times 10^{-3}$ )に比べ有意に増加し、RU486 を前処置すると c-Myc mRNA 量の増加が抑制された。

## 考察

我々は以前出生前GC投与が形態学的な心筋断面積の増加を報告した。その増加に関わる分子機構は不明であった。本研究ではその分子機構を明らかにした。

心肥大に重要な伝達系にPI3K-Akt系がある。Akt-1は出生後の生理的心筋肥大に関与し、Aktとその下流の因子は心筋細胞増殖や生理的心肥大を促進することが知られている。日齢毎にAkt-1の蛋白発現量を比較すると、胎生19日ではAkt-1発現量は低く、日齢が進むにつれ有意に増加した。また胎生19日、21日のDEX投与群ではAkt-1の蛋白発現量は有意に増加し、日齢1の非投与群と同等レベルまで増加していた。しかし日齢1の新生仔ではDEX投与による変化はなく、新生仔ではAkt-1の発現が十分量に達しているため、DEXに対する感受性が低くなったと考えられた。胎生期の早い段階で母体に投与したDEXは、胎仔心臓のAktの発現を促進し、心肥大を誘導する。Aktは下流のGSK-3をリン酸化し脱活性化する。GSK-3が様々な基質をリン酸化することで脱活性するが、その基質にc-Mycが含まれる。c-Mycの発現は、心筋細胞の増殖を介した肥大に関与することが報告されている。

今回胎仔および新生仔ともにDEX投与によりc-Mycの蛋白発現量は増加した。胎児期の心筋細胞増殖は出生後に低下することが報告されており、出生後のc-Mycなどの細胞増殖因子の低下により増殖能を失う。胎生期の生理的な心筋の肥大は心筋細胞増殖が主たる変化である。心筋細胞増殖に伴いc-Mycの蛋白発現量が増加し、生理的な心筋の成長を促すことが示されており、以上よりDEX投与は心筋細胞の成長や増殖を促進

する生理的肥大を誘導している可能性があると考えた。

## 結論

出生前 GC 投与による胎児心筋の断面積増加には、Akt-1、c-Myc の発現増加が関与し、心筋細胞増殖能を高め、成長を促進していることが示唆された。すなわち GC は未熟な心筋を自然分娩時に備わっている心臓へ発達させる一助となるかもしれない。