

## 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：中村 悠城

専攻分野：臨床薬理学

指導教授：松本 直樹

主論文の題目：

Yap Contributes to Cardiomyocyte Proliferation in the Fetal Rat Heart Epicardium with Antenatal Glucocorticoid Administration

(Yap は出生前グルココルチコイド投与によりラット胎仔心臓の心外膜における心筋細胞増殖に寄与する)

共著者：

Yuko Takeba, Tsukasa Kobayashi, Masanori Ootaki, Yuki Ohta, Keisuke Kida, Kenzo Sakurai, Keishi Gen, Minoru Watanabe, Taroh Iiri, Naoki Matsumoto

緒言

心筋細胞が胎児期に持つ増殖能は、出生後に速やかに失われ、成人期には増殖能を持たない。成人で発症する心筋梗塞後、心筋再生は困難であるが、胎児の心筋細胞の増殖機構の理解が、成人の再生医療に応用できる可能性がある。以前より出生前 Glucocorticoid (GC) 投与による胎仔心臓への影響を研究してきた。GC 投与は心臓の生理的肥大を誘導し、それは心筋細胞増殖に伴うこと、その機構の一部に Akt/GSK3 $\beta$ / $\beta$  カテニン経路の関与を報告した。Hippo-Yap 経路も細胞増殖および臓器サイズを制御する主要な因子で、胎児の心筋細胞における Yap の核内移行と細胞周期調節因子の増加が心筋細胞増殖に関連するとの報告がある。また、細胞外 Matrix 中の agrin が Yap を核内へ移行させ、心筋細

胞増殖を惹起する。しかし、出生前 GC 投与による影響は不明である。本研究では、この系へのラット胎仔心筋細胞における出生前 GC 投与の Yap と agrin への作用を明らかにすることを目的とした。

#### 方法・対象

8週齢の Wistar 系ラットの妊娠 17 日と 19 日に dexamethasone (DEX) (0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg, 2.0 mg/kg) を 2 日間連続投与した。非投与群は溶媒のごま油を同量投与した。帝王切開による日齢 19 日 (19F) と 21 日 (21F) のそれぞれの胎仔、および、妊娠 19 日から 2 日連続で DEX を投与し、自然分娩させた新生仔 (1N) から心臓を摘出した。心臓組織は免疫組織化学染色を行い、cyclin D1、Ki-67、Yap の局在を心外膜および心内膜から 200  $\mu$ m の領域および中線から両側へ各 100  $\mu$ m の区画毎の領域を観察し、核内陽性細胞率を求めた。agrin の蛋白質発現はウエスタンブロット法で評価した。なお、動物実験は聖マリアンナ医科大学実験動物委員会の承認を受けた(承認番号 2002008 号)。統計は JMP 13(SAS 社)を使用し、Tukey-Kramer 検定を用いた。

#### 結果

心筋細胞の核内の細胞周期調節因子 cyclin D1 および増殖マーカー Ki-67 陽性細胞率を観察した。心内膜側の 19F~1N までの cyclin D1 と Ki-67 は、ともに約 40~70%前後であった。心外膜側の cyclin D1 は、19F、21F、1N でそれぞれ約 23%、約 46%、約 48%と漸増した。その後、3N、5N と漸減し、成熟心臓ではほぼ発現がなかった。これは左心室と右心室に同様にみられ、Ki-67 は 19F、21F、1N でそれぞれ約 20%、約 45%、約 50%と漸増し、19F の cyclin D1 と Ki-67 に正の相関を認めた ( $R^2=0.7335$ )。DEX 投与は、19F 心内膜側および心筋中層では Ki-67 が有意に減少した。心外膜側では cyclin D1 が 2.0 mg/kg、Ki-67 が 1.0 および 2.0 mg/kg で有意に増加し、19F 心外膜側の cyclin D1 と Ki-67

に有意な相関を認めた ( $R^2=0.5346$ )。

核内 Yap は、cyclin D1 (19F,  $R^2=0.7535$ ; 21F,  $R^2=0.6403$ ) および Ki-67 (19F,  $R^2=0.8524$ ; 21F,  $R^2=0.5992$ ) に相関を示したが、DEX 投与は、cyclin D1 および Ki-67 に相関関係がなかった。

agrin 蛋白質発現量は 19F、21F、1N とともに発現量はほぼ同等であった。一方、19F DEX 2.0 mg/kg 投与で有意に増加した。

## 考察

DEX 投与は、19F 心内膜側の Ki-67 陽性細胞を有意に減少させ、この変化は、成長に伴う細胞増殖能の減少によると考えられた。一方、DEX 投与は 19F 心外膜側の Ki-67 を有意に増加させた。心外膜側の cyclin D1 と Ki-67 は正の相関を認め、胎仔の心外膜心筋細胞の増殖が活性化したと考えられた。心外膜由来前駆細胞は、冠動脈平滑筋細胞、線維芽細胞、内皮細胞、および間葉系細胞など、様々な細胞へ分化し、増殖又は分化能を有するとされる。19F 心外膜側の心筋細胞増殖能は DEX で促進することを示唆した。心外膜の成熟は、哺乳類の心臓の発達に不可欠である。心室壁の拡張は、心筋細胞増殖と、胎児の発育中に壁肥厚を起こす形態形成で促進される。以前に胎仔心筋の拡大は心筋細胞の増殖と血管新生に起因することを示しており、特に 19F 心外膜側心筋細胞が増殖能を保持することが示唆された。

Yap は心筋細胞数と心臓のサイズを増加させる。胎仔での核内 Yap は、cyclin D1 および Ki-67 とそれぞれ強く相関したが、DEX 投与による有意な相関は認めなかった。GC は、乳がん細胞の GC 受容体を介した Yap 活性化に直接作用すると報告がある。心臓の成熟には心外膜側の Yap 核内移行が必要で、早産の新生仔マウスの Yap 核内移行は成熟期に心臓病の発症リスクを低下させると報告されている。心外膜側の核内 Yap の増加は、細胞増殖および心臓の発達、冠動脈の発達や線維芽細胞の増殖などに関与する可能性がある。しかし、DEX 投与による Yap 活性化は、細

胞増殖以外の他の機能に寄与する可能性が考えられた。

Agrin は Yap 核内移行を促進する報告がある。DEX 投与により、19F DEX 2.0 mg/kg で agrin が有意に増加した。agrin の増加は Yap の核内移行を促進し細胞増殖に寄与すると考えられた。agrin と Yap との直接的な機構は今後の証明が必要である。

#### 結論

出生前 GC 投与は胎仔心外膜側の心筋細胞増殖を促進した。心外膜側心筋における胎仔の心筋細胞の増殖に関与する機構の1つである Yap 活性化が、出生前 GC 投与による心臓の発達に寄与する可能性があることを示唆した。心外膜側心筋細胞の増殖能を、損傷心筋の再生医療に応用できる可能性がある。