

出生前グルココルチコイド投与による胎児ラットの心臓関連蛋白への影響

都築 慶光¹⁾, 武半 優子¹⁾, 熊井 俊夫¹⁾, 松本 直樹¹⁾
麻生健太郎²⁾, 村野浩太郎²⁾, 水野 将徳²⁾, 小林 真一¹⁾

聖マリアンナ医科大学薬理学¹⁾, 小児科学²⁾

Key words :
glucocorticoid, troponin T, GATA-4,
fetus, proteomics

Identification and Expression of Cardiac Contracty Protein Troponin T by Antenatal Glucocorticoid Therapy in Fetal and Infant Rats

Yoshimitsu Tsuzuki,¹⁾ Yuko Takeba,¹⁾ Toshio Kumai,¹⁾ Naoki Matsumoto,¹⁾ Kentaro Asoh,²⁾
Kohtarō Murano,²⁾ Masanori Mizuno²⁾ and Shinichi Kobayashi¹⁾

Departments of ¹⁾Pharmacology and ²⁾Pediatrics, St. Marianna University School of Medicine, Kanagawa, Japan

Background: We investigate the effects of antenatal glucocorticoid (GC) on the fetal and neonatal expression of a variety of proteins related to cardiac function.

Methods: Dexamethasone (DEX) was administered to pregnant Wistar rats and fetuses of 19 and 21 days gestation, and 1-3- and 5-day-old neonatal rats were sacrificed. We identified the differentiated proteins from the fetal and neonatal hearts using a liquid chromatography mass spectrometry/mass spectrometry (LC/MS/MS) technique.

Results: In vehicle control groups, troponin T expression decreased as the maturational age of the fetuses and neonates increased. Troponin T expression was increased significantly in the DEX group compared to vehicle controls in the 19- and 21-day fetuses. Furthermore, accompanying the increased troponin T expression, DEX increased the expression of cardiac-specific transcription factor GATA-4 in fetuses.

Conclusions: These results suggest that antenatal GC therapy increases expression of troponin T and may contribute to development on immature fetal myocardium.

要 旨

背景：出生前グルココルチコイド (GC) 投与が胎児および新生児の心臓関連蛋白にどのような影響をもたらすかを検討した。

方法：妊娠ラットにデキサメサゾン (DEX) を投与後、胎生19日、21日 (胎児) 群および日齢1日、3日、5日 (新生児) 群の心臓組織を二次元電気泳動し、胎児のDEX投与群で蛋白発現が増強したスポットを質量解析で同定した。同定した蛋白のなかで、troponin Tの蛋白発現をウエスタンブロット法と免疫組織染色で検討した。

結果：溶媒群のtroponin T発現は日齢1日群と比較して胎生19日群、21日群が有意に低値を示したが、DEXにより用量相関的に増加した。さらにtroponin Tの発現は5日齢の溶媒群とほぼ同等まで増強した。胎児群においてtroponin T発現を誘導する転写因子GATA-4の発現も、DEXにより増強した。

結論：出生前GC投与は胎児心臓でtroponin Tを増加し、未成熟な胎児心筋の発達に寄与することが示唆された。

緒 言

低出生体重児の分娩が予測される症例において、出産前の母体に対するグルココルチコイド (GC) 療法は、低出生体重児の呼吸窮迫症候群、心機能不全などのさまざまな疾患の発症率を抑制し、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、臨床ではその治

療法は推奨されている¹⁻³⁾。Naeyeらは、低出生体重児は副腎機能が低下し、血中のステロイドホルモンが正常出生児と比較し低下していることを報告した⁴⁾。1972年、LigginsとHowieが出生前にステロイドを投与した母体から生まれた新生児に呼吸障害が減少することを報告し¹⁾、その有用性が広く認められ臨床で一般的に行われるようになった。また出生前GC投与は胎児の肺胞細胞

平成19年9月21日受付
平成19年11月7日受理

別刷請求先：〒216-8511 神奈川県川崎市宮前区菅生 2-16-1
聖マリアンナ医科大学薬理学 都築 慶光

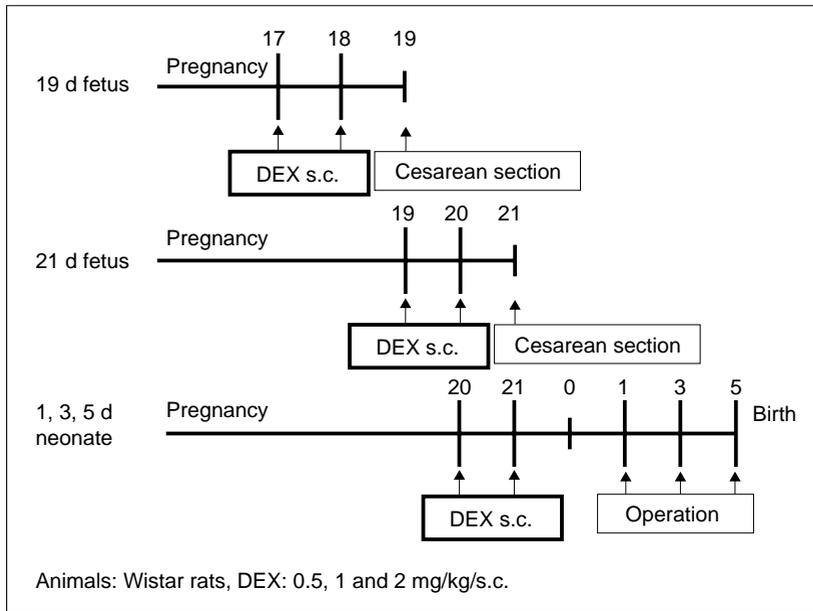


Fig. 1 Animals and experimental protocols. The pregnant rats were randomly divided into two groups to receive either DEX or vehicle (sesame oil) as a control at repeated doses of 0.5, 1 or 2 mg/kg s.c. twice daily on days 17 and 18 or 19 and 20 of gestation. Fetuses delivered by cesarean section on days 19 and 21 of gestation, and 1-, 3-, and 5-day-old neonates were euthanized under ether anesthesia, and the hearts were rapidly removed and immediately frozen at -80°C .

の分化増殖やサーファクタントの産生を誘導し、肺の成熟化を促進することが示唆されている^{5,6)}。しかしながら、この治療法に対する基礎的な検討が十分でないため、治療法の是非が問われている。基本的に低出生体重児および新生児の生命維持には、呼吸機能とならび循環機能の維持管理が重要である。

胎児は母体から胎盤を通してガス交換を行っている。つまり胎児循環は、右心室と左心室の両心室で血液を全身に送る並列循環であり、左心室拍出量は右心室拍出量よりも少ない^{7,8)}。しかし出生後は、肺循環の確立に伴い右心室 肺 左心室 全身に至る循環が変わるため左心室に対する負荷が増大し、胎児循環では低かった血管抵抗も増大する^{7,8)}。心臓の収縮能および拡張能が未熟である低出生体重児の心筋は、このような負荷に対応できず心不全に移行する可能性が高くなると考えられている⁹⁾。したがって低出生体重児は、肺機能の未発達だけでなく心臓機能の未発達が出生後の予後に影響すると考えられている⁹⁾。近年、出生前GC投与が胎児の心臓容量を増大することが報告されている¹⁰⁾。また後藤らはGCが胎児心臓において、血圧や電解質の調節に促進的に関与する心房性ナトリウム利尿ペプチドの遺伝子発現を増強させ、未熟な胎児の循環動態に適応し生命維持に関与する可能性を示唆している¹¹⁾。しかしながら、GCが胎児心臓にどのように影響するか、またその機序について検討した報告は少ない。

そこでわれわれは、出生前GC投与が胎児の心臓機能に影響を与える蛋白を明らかにする目的で、低出生体重児のモデルラットを作成し、出産前の妊娠ラットに

GCを投与し、胎児の心臓で変化する蛋白をプロテオーム解析により網羅的に探索した。

方 法

1. 実験動物

Wistar系妊娠ラットの妊娠17日目および19日目に、ゴマ油(Kanto Chemical, Tokyo)に溶解したデキサメサゾン(DEX: Wako, Osaka)を0.5mg, 1mgそして2 mg/kgを2日間皮下投与した。エーテル麻酔下で帝王切開した胎児19日目、21日目の胎児ラット(胎児群)の心臓組織を摘出した。また、妊娠20日目のラットにDEXを0.5mg, 1mgそして2mg/kgを2日間皮下投与し、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(新生児群)について同様に心臓を摘出した(Fig. 1)。本研究に用いたラットは、聖マリアンナ医科大学大学院附属実験動物飼育管理研究施設内で恒温($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$)、恒湿($55 \pm 5\%$)、人工照明(6~18時)、自由飲水で飼育した。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、承認を受けている。

2. 2-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis(2D-DISE)

摘出した心臓組織は、細胞溶解液(30mM Tris, 2M thiourea, 7M urea, 4% CHAPS)を加え、超音波細胞破碎機でホモジナイズし、 $15,000 \times g$, 4°C で10分間遠心し上清を回収した。抽出蛋白量は、Bio-Rad protein assay kit(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を用い

て、吸光度(595nm)で測定した。抽出した蛋白を溶媒群、DEX投与群および溶媒群とDEX投与群を等量で混合したものをそれぞれ10 μ gに対し400pmolの蛍光標識色素Cyanine dye(Cy2, Cy3そしてCy5(GH Healthcare, Buckinghamshire, UK)で標識した。標識した試料を混合し、膨潤液を追加して総量50 μ lとし、IPGゲル(ATTO, Tokyo)にのせて、一次元電気泳動を行った(300V \times 210分)。一次元電気泳動終了後、2.5% trichloro acetic acidに3分浸透し、SDS平衡化溶液(Tris-HCl 50mM, pH 6.8, 2% SDS, 0.001% bromophenol blue)で10分間平衡化した。二次元電気泳動は、12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE: ATTO)に平衡化したゲルをのせ、agaroseで封入し、二次元電気泳動を行った(300V \times 210分)。泳動終了後、浸透液(10% methanol, 7% acetic acid)で30分浸透し、Typhoon imager(GH Healthcare)を用いてスキャンスポットを検出した。溶媒群とDEX投与群で変動したスポットの決定は、2-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis(2D-DIGE: GH Healthcare)で定量し統計処理を行った。

3. Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry(LC/MS/MS)

2D-DIGEで使用した試料と同じ試料を同一設定で二次元展開した。2D-DIGEを同様の方法で二次元電気泳動を展開した後、SDS-PAGEゲルはSYPRO Ruby(Bio-Rad)で16時間、室温で染色した。2D-DIGEの結果と照合し変動スポットを決定した。このスポットをゲルごと切り抜き、In Gel Digest Kit(Millipore, Bedford, MA, USA)でペプチドサンプルを抽出し、LC/MS/MSシステムで分析した。LC/MS/MSはMAGIC 2002(Michrom BioResources, Brockville, Ontario, Canada)、およびLCQ Advantage(Thermo Finnigan, Yokohama)、PcoTipTM(New Objective, Woburn, MA, USA)を使用した。得られた結果はMascot software(Matrix Science, Boston, MA, USA)で解析し蛋白を同定した。

4. ウェスタンブロット法

心臓組織の全蛋白は、蛋白抽出溶液(50mM Tris HCl, pH 7.4, 1mM EGTA, 0.001% leupeptin)でホモジナイズし、15,000 \times g, 4 $^{\circ}$ Cで30分間遠心し上清を回収した。また核蛋白の抽出はNE-PER nuclear and cytoplasmic extraction kit(Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)を用いた。抽出した蛋白はBio-Rad protein assay kitを用いて、吸光度(595nm)で蛋白量を測定した。それぞれの蛋白量を30 μ gに調整し、SDSサンプル処理液と混合し、100 $^{\circ}$ Cで2分間煮沸して試料とした。試料は10% SDS-

PAGEに負荷し電気泳動した。電気泳動したゲルをHybond-ECL(GH Healthcare)に転写後、2~5% skim milkで、4 $^{\circ}$ Cで一晩ブロッキング処理を行った。その後Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20(TTBS) 0.1% (v/v) Tween 20含有20mM Tris緩衝液, pH 7.5)で200倍に希釈した抗troponin Tマウスモノクローナル抗体、抗GATA-4ヤギポリクローナル抗体および抗 α -tubulinウサギポリクローナル抗体を用いて室温で2時間反応させた後、TTBSの洗浄を10分間、3回行った。さらに、5,000倍希釈したhorseradish peroxidase標識抗マウスIgG、抗ヤギIgGおよび抗ウサギIgG(ICN Pharmaceuticals Inc., Aurora, OH, USA)にそれぞれ1時間室温で反応させ、ECL plus(Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK)を用いて発光させ、Fuji Film Las-300(Fuji film, Tokyo)でバンドを検出した。検出したバンドはImage Gauge(Fuji Film)で測定し、統計処理をした。

5. 組織学的検索

心臓組織を乳頭筋レベルで短軸方向に切断し、10% formalin固定しパラフィン包埋ブロック薄切切片を作成した。Hematoxylin-eosin染色した切片はLeica Qwin Analyzer(Leica Microsystems, Tokyo)で心筋断面積を計測した。免疫組織染色はxyleneとethanolにて脱パラフィンし、DAKO Envision system kit(DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA)を用いて行った。0.1%過酸化水素水で内因性パーオキシダーゼを除去後、ウシ血清でブロッキング処理した。1:100倍に希釈した抗troponin Tマウスモノクローナル抗体および抗GATA-4ヤギポリクローナル抗体を添加し、4 $^{\circ}$ Cで一晩かけて反応させた。洗浄液(200mM Tris pH 7.5, 300mM NaCl, 0.1% Tween 20)で洗浄後、抗ウサギIgGまたは抗ヤギIgGの二次抗体を30分室温で反応した。洗浄後、ストレプトアビジンによる反応を15分間行った後、3,3'-diaminobenzidine(DAB)で発色させた。最後にhematoxylinで核染色し、光学顕微鏡にて観察した。

6. 統計解析

統計解析Stat View(ver.5.0)を使用し、得られた結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。多群間の比較は分散分析(analysis of variance: ANOVA)で分散を確認後、Fisher法を用いて行った。分散していない場合は、Mann-Whitney-U検定を用いた。危険率5%未満を有意差ありとした。

結 果

1. 出生前DEX投与による胎児および新生児ラットの心臓組織断面積の比較

各群の心臓組織について乳頭筋レベルで短軸方向に

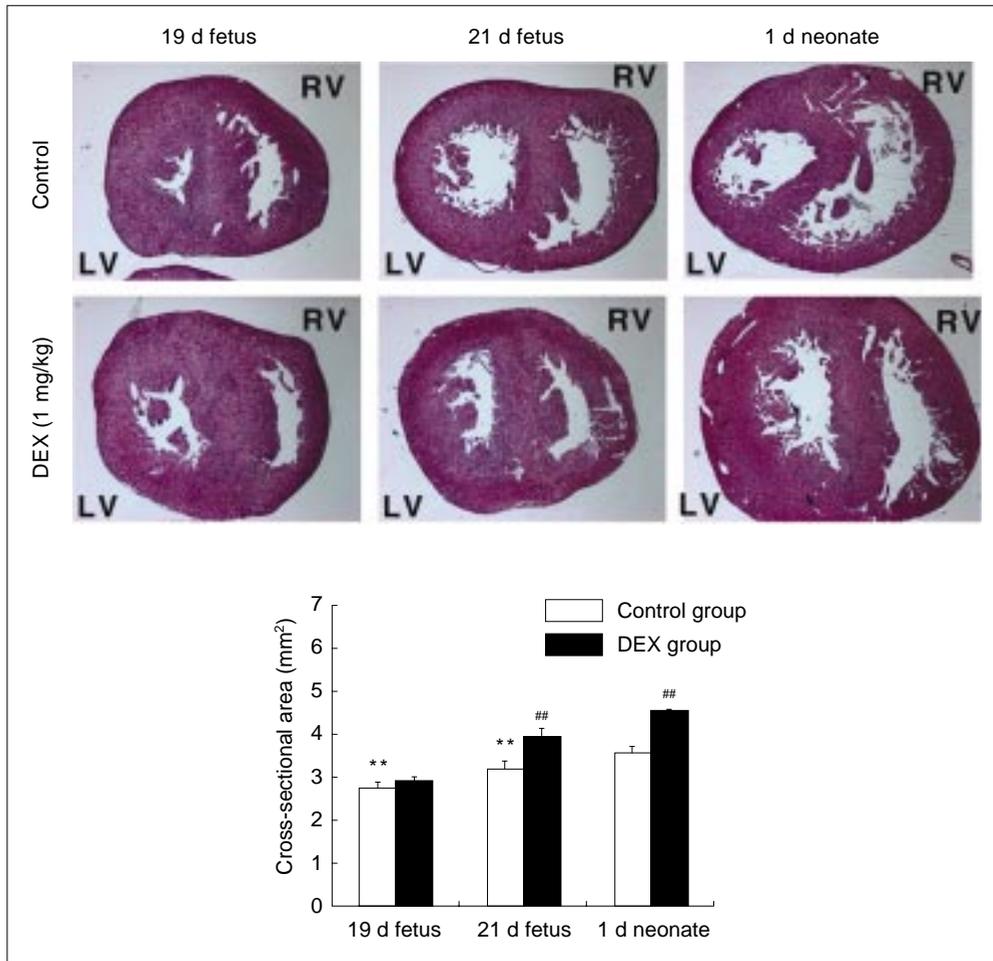


Fig. 2 Morphological changes in fetal and neonatal ventricular myocardium.
 A: Hearts were sectioned in the transverse axial direction to the level of the papillary muscle. Hematoxylin-Eosin staining. Original magnification $\times 40$.
 B: Cross-sectional areas of ventricular myocardium excluding the ventricular chamber were measured using a Leica Qwin Image Analyzer. Data are representative of four independent experiments. Details are described in Materials and Methods. Data are representative of six independent experiments ($n = 6$). **: $p < 0.005$ vs. 1-day-old neonatal control group. #: $p < 0.005$ vs. respective control groups.
 LV: left ventricle, RV: right ventricle

切断した心筋断面積を計測した。日齢1日の溶媒群を基準として各群について比較すると、胎生19日および21日の胎児群の心筋断面積は有意に低下していた。胎生21日および日齢1日のDEX投与群の心筋断面積は溶媒群に比較し有意に増加した(Fig. 2)。

2. 出生前DEX投与による胎児および新生児ラットの心臓組織中における変動蛋白の同定

各群の心臓組織より抽出した蛋白を二次元電気泳動でSDS-PAGEゲル上に展開した結果、等電点5~10、分子量26~175kDaの範囲で146スポットを確認した(Fig. 3)。これらのスポットのなかで、胎児(胎生19日、21日)群と

新生児(日齢1日、3日、5日)群をそれぞれ比較し、そのなかで増加した蛋白、さらに溶媒群に対しDEX投与群で約1.5倍以上発現が増加したスポットを検出した。検出したスポットは5つあり、質量分析で解析した結果、1) troponin T, 2) α -enolase, 3) creatine kinase-M type, 4) β -tubulin, 5) ATP synthase β 鎖が同定され、いずれも心臓機能に関連する蛋白であった(Fig. 3)。そこで、われわれはpH8前後、32.5~47.5kDaの間に同定した心筋の収縮蛋白として知られるtroponin Tに注目した(Table 1)。

3. Troponin Tの蛋白発現

質量分析で同定したtroponin Tの蛋白発現をウエスタ

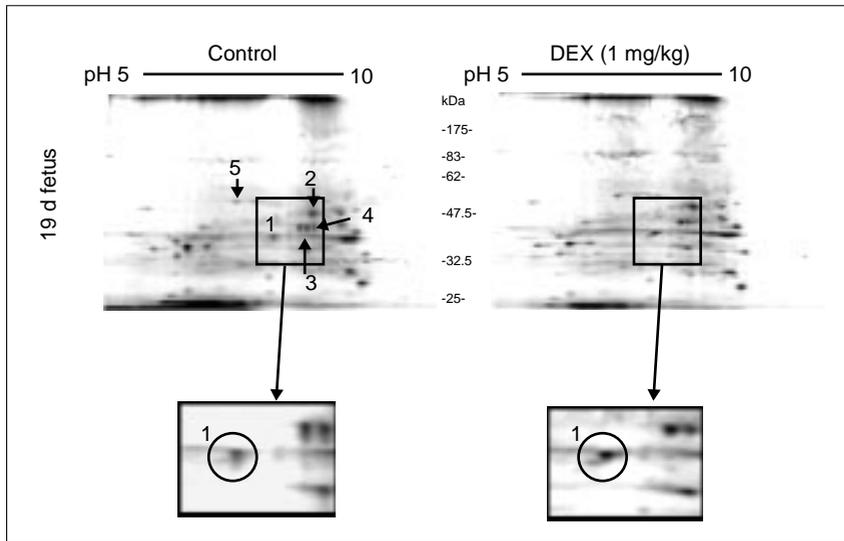


Fig. 3 Patterns of protein expression after two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) in fetal and neonatal rat cardiac tissues after antenatal dexamethasone (DEX) administration. Details are described in Materials and Methods. Data are representative of six independent experiments ($n = 6$). Positions of protein spots were identified using liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS). The protein spots that showed at least 1.5-fold alteration in density between the control and DEX group were excised for further identification. Troponin T is a regulatory protein of myocardial contraction.

Table 1 Spot density of troponin T after antenatal dexamethasone (DEX) administration in fetal and neonatal groups

	19 d fetus		21 d fetus		1 d neonate	
	control	DEX	control	DEX	control	DEX
Troponin T	87.39 ± 8.47	152.59 ± 2.37	94.18 ± 5.60	161.34 ± 3.73	100 ± 9.70	165.45 ± 10.09

Percentage change of spot density in mean DEX group compared to mean control group ($n = 4$).

ンプロット法で確認した。母体にDEXを0.5mg, 1mgおよび2mg/kg投与し, 胎児および新生児の心臓におけるtroponin Tの蛋白発現を検討した (Fig. 4A)。DEX 1mg/kg, 2mg/kg投与したときのtroponin Tの蛋白発現は, 胎生19日, 21日, 日齢1日群のどの群においても溶媒群に比し有意に増加していた。胎生21日群, 日齢1日群は, DEX 0.5mg/kg投与でも有意に増加し, DEXの用量相関的に発現が増強することを確認した (Fig. 4A)。

Fig. 4BはDEX 1mg/kg投与における胎生19日から日齢5日までのtroponin Tの発現量の変化を示した。溶媒群における胎生19日 ($73.74 \pm 3.58\%$) および胎生21日 ($90.20 \pm 12.24\%$) のtroponin Tの蛋白発現は, 日齢3日群 ($120.49 \pm 10.31\%$) および日齢5日群 ($203.20 \pm 16.05\%$) に対し有意に低下していた ($p < 0.005$)。一方, 胎生19日 ($203.45 \pm 14.52\%$) と胎生21日 ($211.52 \pm 11.23\%$) のDEX投与群は, 溶媒群と比較し, troponin Tの有意な増加を認め, その発現は日齢5日の溶媒群とほぼ同等であった。胎生19日から日齢3日まではDEX投与によりtroponin Tの有意な増加を認めたが, 日齢5日群では溶媒群と比較して有意な差は認められなかった (Fig. 4B)。

さらに心臓組織におけるtroponin Tの発現を免疫組織化学染色で検討した。心臓組織の左心室壁, 右心室壁

について陽性細胞の発現を確認した。胎生19日および日齢1日群のtroponin T陽性細胞は, 溶媒群と比較し, DEX投与群で両心室壁のtroponin T陽性細胞が増加した (Fig. 5)。

4. GATA-4の蛋白発現

胎児期においてtroponin Tの発現に関する転写因子としてGATA-4が報告されている^{12, 13})。核蛋白のGATA-4発現について, ウエスタンプロット法で確認した。溶媒群と比較すると, 胎生19日および胎生21日群のGATA-4の蛋白発現は, DEX投与により有意に増加した (Fig. 6A)。

また免疫組織染色においてGATA-4陽性細胞は心筋細胞の細胞質内および核内で認められ, 胎生19日のDEX投与群ではGATA-4の発現が増加していた (Fig. 6B)。

考 察

低出生体重児は, 胎児循環から新生児の肺循環への環境変化に順応できずに呼吸障害や心不全を発症することが多い。また自然分娩で出生した新生児と比較して各臓器が未成熟であることもその原因の一つと考えられている。出生前GC療法は, 臨床で妊娠34週前の低

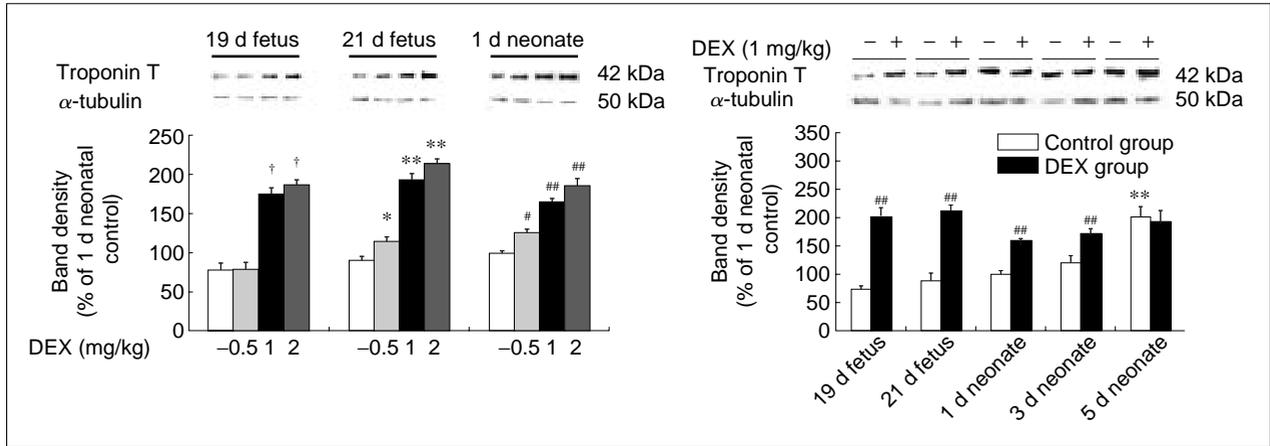


Fig. 4 Western blotting of troponin T protein in fetal and neonatal rat cardiac tissues after antenatal dexamethasone (DEX) administration. Quantitative results of detected proteins determined by densitometric analysis are shown. Protein levels are expressed as the percentage of the values in the 1-day-old neonatal control group. Data are expressed as mean \pm S.E.M. Details are described in Materials and Methods.
 A: Troponin T levels were evaluated at three different DEX doses (0.5, 1, and 2 mg/kg) in 19-day and 21-day fetal and 1-day-old neonatal tissues. Data are representative of six independent experiments ($n = 6$). α -Tubulin was used as the control. †: $p < 0.005$ vs. 19-day neonatal control group. *: $p < 0.01$ and **: $p < 0.005$ vs. 21-day fetus control group. #: $p < 0.01$ and ##: $p < 0.005$ vs. 1-day-old neonatal control group.
 B: Troponin T levels were evaluated in 19-day fetal to 5-day-old neonatal tissues after DEX 1 mg/kg administration. Data are representative of 10 independent experiments ($n = 10$). α -Tubulin was used as the control. **: $p < 0.005$ vs. 1-day-old neonatal control group. ##: $p < 0.005$ vs. respective control groups.

A | B

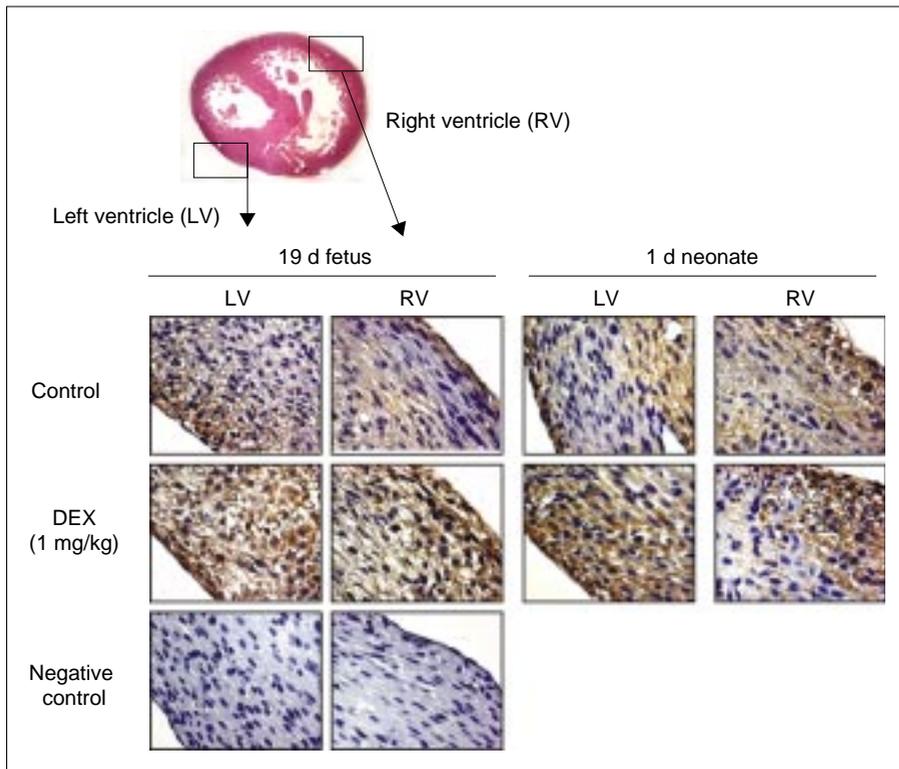


Fig. 5 Expression of troponin T in fetal and neonatal cardiac tissues after antenatal dexamethasone (DEX) administration. Expression of troponin T in cardiac tissues was evaluated using immunohistochemical staining. For control, goat serum was used. Each immunostained cell appeared brown. Troponin T-positive cells had stained cytoplasm, and troponin T-positive cells were increased in fetal groups with antenatal DEX administration compared with the fetal and neonatal control groups. Original magnification $\times 400$. Details are described in Materials and Methods.

出生体重児の分娩が予想される症例に対し一般的に行われている。多施設ランダム化臨床試験では、GC療法が低出生体重児の死亡率低下や急性呼吸機能障害を減

少させるだけでなく、胎児および新生児の臓器重量の増加を促進し、未熟な臓器の発達を促進させる可能性を報告している¹⁴⁻¹⁶。また出生前のGC療法は、新生児

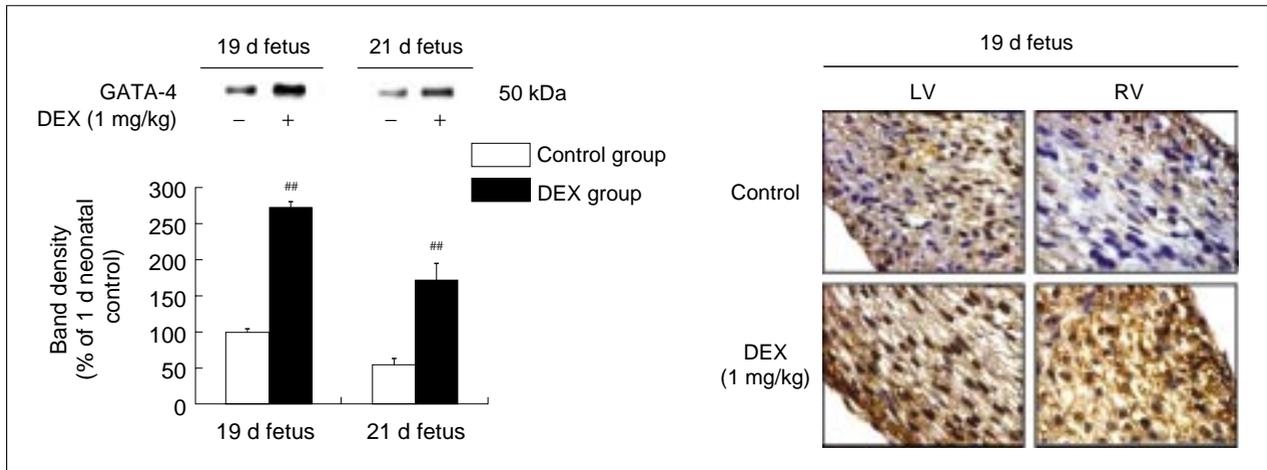


Fig. 6 The expression of GATA-4 in fetal rat cardiac tissues after antenatal dexamethasone (DEX) administration. Data are expressed as mean \pm S.E.M. Details are described in Materials and Methods.

A: GATA-4 levels were evaluated at a DEX dose (1 mg/kg) in 19-day and 21-day fetal tissues by Western blotting. Quantitative results of detected proteins determined by densitometric analysis are shown. Protein levels are expressed as the percentage of the values in the 19-day fetal control group. Data are representative of six independent experiments ($n = 6$). ##: $p < 0.005$ vs. respective control groups.

B: Expression of GATA-4 in 19-day fetal cardiac tissues was evaluated using immunohistochemical staining. GATA-4-positive cells had stained cytoplasm or nucleus, and GATA-4-positive cells were increased in fetal groups with antenatal DEX administration compared with the control groups. Original magnification $\times 400$. Details are described in Materials and Methods.

のカテコラミン産生を増加し、血圧、心拍数の上昇など未熟な心-血管機能を促進することも報告されているが^{17, 18)}、心臓機能にかかわる因子またはその役割については明らかにされていない。

本研究では、低出生体重児のモデルとして、妊娠17日と19日目の母体ラットにDEXを2日間投与し、胎児および新生児の心臓組織でどのような蛋白が変動するかを網羅的に検索し同定した。胎生19日および21日の胎児心筋断面積は、自然分娩児の心筋断面積より有意に小さく発達段階の途中であると考えられる。この時期に母体にDEXを投与すると胎児の心筋は新生児の心筋とほぼ同等レベルまで増大し、DEXは胎児の心筋に影響することが明らかになった (Fig. 2)。胎児期における心筋の増大は心筋細胞の増殖に依存した生理的な肥大であり、また心筋の細胞内では、形態学的変化に関与する蛋白または心臓機能を増強させる蛋白が変化していることが予想されている^{19, 20)}。そこでわれわれはDEXが心臓組織中のどの蛋白に影響したのかを検討するためにプロテオーム手法を用いて同定した。各群の蛋白をそれぞれ二次元電気泳動で展開し、146個のスポットを確認し、これらのスポットのなかで胎児(胎生19日、21日)群と新生児(日齢1日、3日、5日)群をそれぞれ比較し、そのなかで増加した蛋白、さらに溶媒群に対しDEX投与群で約1.5倍以上発現が増加したスポットを検出した。そして検出したスポットを質量分析で解析した結果、1) troponin T, 2) α -

enolase, 3) creatine kinase-M type, 4) β -tubulin, 5) ATP synthase β 鎖が同定され、これらはいずれも心臓の収縮またはエネルギー代謝に関連する蛋白であることが明らかになった (Fig. 3)。GC投与が胎児心筋に与える影響は、この5つの蛋白のみでは説明できないが、DEXが心筋の発達に関与している、心筋の収縮蛋白であるtroponin Tについて検討した²¹⁾。

心筋の収縮はアクチン(細い線維)とミオシン(太い線維)の2種類の収縮蛋白がATPをエネルギー源として架橋を形成し滑り込むことにより生じる。アクチンフィラメントはactinとtropomyosinとtroponinで構成されている。troponinはtroponin T, troponin Cそしてtroponin Iの3つのサブユニットで構成され、心筋の収縮の引き金となる細胞内 Ca^{2+} と結合し、アクチンとミオシンの架橋形成と心筋の収縮を調節している重要な蛋白である²²⁾。tropomyosinと結合するtroponin Tは細胞内 Ca^{2+} 結合に対する感受性を変化させる蛋白で、3つの蛋白のなかで一番分子量が大きい²²⁾。

胎生19日および胎生21日群のtroponin Tの蛋白発現は、日齢3日および日齢5日群に比較して有意に低下していたが、胎生群にDEXを投与すると、troponin Tの著大な増加を認め、その発現は日齢5日とほぼ同等であった (Fig. 4)。また免疫組織学的検討より、胎児心臓組織のtroponin Tの発現は右心室および左心室とも発現が同等に低く、DEX投与でその発現が増強することがわかった。以上の結果から、未成熟な胎児期にDEXを

投与するとtroponin Tの発現を増強し、細胞内のCa²⁺の結合能を活性化させ心筋の収縮力が増強すると推測した。McAuliffeとRobbinsは、胎児期においてtroponin Tの増加は心筋の発達を促進することを報告した²³⁾。このことはDEXが未熟な心筋を発達させる可能性があることを示唆している。

われわれの結果では、DEX投与による胎児群のtroponin Tの増加は顕著であるが、新生児群では胎児群よりも顕著な増加を示さなかった。これはFig. 2で示したように、胎児期ではDEXが心筋細胞の増加を誘導している可能性があり、その心筋細胞の増加に伴って、心筋に発現するtroponin T発現の増加もより顕著に現れたのではないかと考えた。しかし、新生児群では心筋細胞の増加はほとんどみられないため²⁴⁾、troponin T発現に顕著な増加がみられなかったと考えられる。さらにDEXの投与時期の違いにより、胎児のtroponin T発現に対する反応に違いが出るのかもしれない。troponin Tには5つのアイソフォームが存在し、胎児、新生児期から成人に至る過程でアイソフォームの発現が変化することが知られている^{25, 26)}。ウサギの心筋では、troponin T1が胎児、新生児から成人まで恒常的に発現しており、この発現量はCa²⁺結合能の感受性と関連があるといわれている^{22, 27)}。troponin T2～troponin T5は新生児期を過ぎ成人になる過程で、徐々に発現が減少することが明らかになってきた²⁸⁾。また胎児期においては、troponin T2が妊娠初期から発現し後期では減少し、troponin T4は妊娠後期で発現が増強し、心筋の発達と関係することが示唆されている²⁸⁾。胎児期においてDEXがtroponin T1のアイソフォームを誘導するなら心筋の発達に関与していると推測できる。しかし、今回の結果からDEXによるtroponin Tの発現増強が、どのアイソフォームと関連しているかを明らかにすることができなかった。

本研究のモデルにおいてDEXが心筋の発達と関係していることを明らかにするためには、アイソフォームの検討が重要であると考えられる。

心筋の発達には、troponin T遺伝子の発現の活性化が重要である²⁹⁾。DEXによるtroponin T発現の増加に遺伝子発現が関与していると考えられる。心筋細胞のtroponin T遺伝子プロモーター活性にはGATA-4やmonocyte enhancer factor(MEF)の転写活性が必要であると報告されている^{13, 30)}。OesterreicherとHenningらは、新生児マウスにDEXを投与すると小腸の発育が促進することを示し、DEXがGATA-4の転写活性を誘導することを報告している³¹⁾。そこで出生前GC投与が、胎児心筋においてGATA-4の発現に影響するかを検討した。心筋細胞の核蛋白におけるGATA-4の蛋白発現は、DEX投与群で、胎

生19日と21日の溶媒群と比較し、有意な増強を認めた(Fig. 6)。このことからDEXは胎児心臓においてもGATA-4の発現を誘導し、さらにtroponin Tの発現増強に関与している可能性が示唆された。

GATAはZnフィンガー型の核内転写因子で、心臓にはサブタイプとしてGATA-4が存在している。GATA-4は胎児期の早期から発現しており成人期に至るまで発現が認められるが、心臓の形成過程では、心筋の細胞を分化し、その細胞を遊走し左右の心臓原基の正中線で融合させheart tube形成に重要な転写因子であることが示されてきた³²⁾。また胎児心臓におけるGATA-4の役割は心房性ナトリウム利尿ペプチドなど心臓の機能に関与する生理活性物質の促進、また心筋の α -cardiac myosin heavy chain 遺伝子発現の誘導などさまざまな役割があることが知られてきた³³⁻³⁵⁾。しかし出生前GC投与が胎児心筋のGATA-4の転写活性やGATA-4を介してtroponin Tの発現に与える影響は明らかではない。今後、DEXによる胎児心臓に対するtroponin T発現増強についてGATA-4を介した一連の機序を明らかにする必要があるが、本研究は興味深い結果をもたらしたといえる。われわれは以前、同じ実験モデルでDEXが胎児心臓でナトリウム利尿ペプチドの遺伝子発現を増強することを示した¹¹⁾。このことから、DEXによるGATA-4の発現増強は未熟な心筋の発達に密接に関与することが考えられた。

以上のことから、出生前GC投与は低出生体重児のような未熟な心臓に対し心筋発達を促し、心機能を高める可能性が示唆された。心筋の収縮力の増大は血圧上昇や末梢循環動態を維持するのに重要である。本研究の実験モデルを臨床に置き換えることができれば、より心臓の発達または機能維持に対して有効な治療法が確立できると考える。

謝辞 稿を終えるにあたり、本研究のご指導をいただきました聖マリアンナ医科大学診断病理学の田所 衛教授、ならびに本学大学院附属先端医学研究施設の西川裕之、小島良子両研究技術員に深くお礼申し上げます。

【参考文献】

- 1) Jiggins GC, Howie RN: A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* 1972; 50: 515-525
- 2) Crowley PA: Antenatal corticosteroid therapy: A meta-analysis of the randomized trials, 1972 to 1994. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 322-335
- 3) Ozdemir H, Guvenal T, Cetin M, et al: A placebo-controlled comparison of effects of repetitive doses of betamethasone and dexamethasone on lung maturation and lung, liver, and body

- weights of mouse pups. *Pediatr Res* 2003; 53: 98–103
- 4) Naeye RL, Harcke HT Jr, Blanc WA: Adrenal gland structure and the development of hyaline membrane disease. *Pediatrics* 1971; 47: 650–657
 - 5) Durham PL, Wohlford-Lenane CL, Snyder JM: Glucocorticoid regulation of surfactant-associated proteins in rabbit fetal lung in vivo. *Anat Rec* 1993; 237: 365–377
 - 6) Ballard PL, Ballard RA: Scientific basis and therapeutic regimens for use of antenatal glucocorticoids. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 254–262
 - 7) Grant DA, Hollander E, Skuza EM, et al: Interactions between the right ventricle and pulmonary vasculature in the fetus. *J Appl Physiol* 1999; 87: 1637–1643
 - 8) Rudolph AM: Aortopulmonary transposition in the fetus: Speculation on pathophysiology and therapy. *Pediatr Res* 2007; 61: 375–380
 - 9) 豊島勝昭, 川滝元良, 佐藤義朗, ほか: 極低出生体重児における左室壁応力・心筋短縮速度の経時的変化と肺出血・脳室内出血・脳室周囲白質軟化症の関連性について. *日本未熟児新生児学会雑誌* 2002; 14: 45–52
 - 10) Bensky AS, Kothadia JM, Covitz W: Cardiac effects of dexamethasone in very low birth weight infants. *Pediatrics* 1996; 97: 818–821
 - 11) 後藤建次郎, 熊井俊夫, 麻生健太郎, ほか: 妊娠ラットへのデキサメサゾン投与による胎児心臓中のナトリウム利尿ペプチド遺伝子発現の変化. *聖マリアンナ医科大学雑誌* 2004; 32: 291–300
 - 12) Vyas DR, McCarthy JJ, Tsika RW: Nuclear protein binding at the beta-myosin heavy chain A/T-rich element is enriched following increased skeletal muscle activity. *J Biol Chem* 1999; 274: 30832–30842
 - 13) Azakie A, Fineman JR, He Y: Myocardial transcription factors are modulated during pathologic cardiac hypertrophy in vivo. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 132: 1262–1271
 - 14) Effect of corticosteroids for fetal maturation on perinatal outcomes. *NIH Consens Statement* 1994; 12: 1–24
 - 15) Crane J, Armson A, Brunner M, et al: Executive Committee of the Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada: Antenatal corticosteroid therapy for fetal maturation. *J Obstet Gynaecol Can* 2003; 25: 45–52
 - 16) Kumar P, Seshadri R: Neonatal morbidity and growth in very low birth-weight infants after multiple courses of antenatal steroids. *J Perinatol* 2005; 25: 698–702
 - 17) Padbury JF, Polk DH, Ervin MG, et al: Postnatal cardiovascular and metabolic responses to a single intramuscular dose of betamethasone in fetal sheep born prematurely by cesarean section. *Pediatr Res* 1995; 38: 709–715
 - 18) Berry LM, Polk DH, Ikegami M, et al: Preterm newborn lamb renal and cardiovascular responses after fetal or maternal antenatal betamethasone. *Am J Physiol* 1997; 272: R1972–1979
 - 19) Komuro I, Kaida T, Shibasaki Y, et al: Stretching cardiac myocytes stimulates protooncogene expression. *J Biol Chem* 1990; 265: 3595–3598
 - 20) Komuro I, Katoh Y, Kaida T, et al: Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1991; 266: 1265–1268
 - 21) Anderson PA, Malouf NN, Oakeley AE, et al: Troponin T isoform expression in humans. A comparison among normal and failing adult heart, fetal heart, and adult and fetal skeletal muscle. *Circ Res* 1991; 69: 1226–1233
 - 22) Nassar R, Malouf NN, Kelly MB, et al: Force-pCa relation and troponin T isoforms of rabbit myocardium. *Circ Res* 1991; 69: 1470–1475
 - 23) McAuliffe JJ, Robbins J: Troponin T expression in normal and pressure-loaded fetal sheep heart. *Pediatr Res* 1991; 29: 580–585
 - 24) 伊藤 宏: 心不全と細胞周期. *日薬理誌* 2005; 126: 381–384
 - 25) Townsend PJ, Barton PJ, Yacoub MH, et al: Molecular cloning of human cardiac troponin T isoforms: Expression in developing and failing heart. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 2223–2236
 - 26) Mesnard L, Logeart D, Taviaux S, et al: Human cardiac troponin T: Cloning and expression of new isoforms in the normal and failing heart. *Circ Res* 1995; 76: 687–692
 - 27) Anderson PA, Oakeley AE: Immunological identification of five troponin T isoforms reveals an elaborate maturational troponin T profile in rabbit myocardium. *Circ Res* 1989; 65: 1087–1093
 - 28) Anderson PA, Moore GE, Nassar RN: Developmental changes in the expression of rabbit left ventricular troponin T. *Circ Res* 1988; 63: 742–747
 - 29) Mar JH, Iannello RC, Ordahl CP: Cardiac troponin T gene expression in muscle. *Symp Soc Exp Biol* 1992; 46: 237–249
 - 30) Ip HS, Wilson DB, Heikinheimo M, et al: The GATA-4 transcription factor transactivates the cardiac muscle-specific troponin C promoter-enhancer in nonmuscle cells. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 7517–7526
 - 31) Oesterreicher TJ, Henning SJ: Rapid induction of GATA transcription factors in developing mouse intestine following glucocorticoid administration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G947–953
 - 32) Molkenin JD, Lin Q, Duncan SA, et al: Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 1997; 11: 1061–1072
 - 33) Grépin C, Dagnino L, Robitaille L, et al: A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 3115–3129
 - 34) Thuerauf DJ, Hanford DS, Glembotski CC: Regulation of rat brain natriuretic peptide transcription. *J Biol Chem* 1994; 269: 17772–17775
 - 35) Molkenin JD, Kalvakolanu D, Markham BE: Transcription factor GATA-4 regulates cardiac muscle-specific expression of the alpha-myosin heavy-chain gene. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 4947–4957