

氏 名 (本 籍) 岡 本 暢 彦 (京都府)
学 位 の 種 類 博 士 (医 学)
学 位 記 番 号 博 士 (論) 第 3 2 0 号
学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 6 年 3 月 2 5 日
学 位 論 文 題 目 Teratogenic effects of bis-diamine on the developing myocardium
(ビスダイアミンが心筋増殖に与える影響について)

審 査 委 員 主 査 教 授 堀 江 稔
副 査 教 授 浅 井 徹
副 査 教 授 松 浦 博

論文内容要旨

※整理番号	323	氏名 <small>(ふりがな)</small>	岡本 暢彦 <small>おかもと のぶこ</small>
学位論文題目	Teratogenic effects of bis-diamine on the developing myocardium (ビスダイアミンが心筋増殖に与える影響について)		
<p>【研究の目的】ファロー四徴症や総動脈幹症等の動脈幹分割異常に基づく心奇形では、正常心に比し右室の肥大と左室の低形成がみられる。これらの心室の非対称性は発生過程にある胎児の心臓ですでに認められるという報告があるが、これらの心奇形の発生過程における心筋の成長パターンについては十分解明されていない。</p> <p>動脈幹の分割には神経堤細胞が重要な役割を果たしている。以前よりビスダイアミンを妊娠ラットに投与した場合、胎仔に高率にファロー四徴症や総動脈幹症などの心奇形が認められることが知られており、ビスダイアミンは神経堤細胞の心臓への移動を妨げ動脈幹分割異常をきたすと推察されている。そこで本研究では、心奇形発生過程における心筋の成長パターンを明らかにするため、この動物モデルを用い、cardiotrophin-1 (CT-1)、 hepatocyte growth factor (HGF) および myocyte enhancer factor 2 (MEF-2) の心筋細胞増殖因子の発現、心筋細胞の DNA 合成とアポトーシスについてそれぞれビスダイアミン投与胎仔と正常胎仔を比較検討した。</p> <p>【方法】Wistar 系ラットを交配し、膣スメアで精子を確認した日の午前0時を妊娠0日と定義した。妊娠9.5日にビスダイアミン200mgを経口投与し、妊娠10.5日から18.5日までエーテル深麻酔下に母ラットを屠殺し、ただちに胎仔を摘出した。ビスダイアミンを投与しない群を正常群とし、両群とも屠殺1時間前に5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を投与した。胎仔を4%パラホルムアルデヒドで固定後パラフィン包埋し、6μmの連続切片を作成した。これらの切片についてHE染色を</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

行い心臓の形態を観察した。また胎生 14.5 日から 16.5 日の心臓については Nikon 社製デジタルカメラ, DXM1200 を用いて心室径や壁厚を計測した。抗 HGF 抗体、及び抗 CT-1 抗体を用いて ABC 法により免疫組織染色を行った。さらに両群の胎仔の心臓から totalRNA を抽出、cDNA を作製し、これを GAPDH を基準とした semiquantitative PCR にて HGF, CT-1, MEF-2mRNA の発現を比較検討した。また塩酸処理した切片を用いて、抗 BrdU 抗体で ABC 法により染色し、陽性細胞の比率 (標識率) を算出した。また TUNEL 法と DNA ladder 法によりアポトーシス細胞を検討した。

【結果】①正常群では胎生 15.5 日から左心室自由壁、心室中隔で DNA 合成の急激な増加がみられ、これに伴い左心室壁の厚さが増したが、ビスダイアミン投与群では壁が菲薄で胎生 15.5 日以降の DNA 合成は正常群に比し低下していた。

②正常群では HGF の発現は胎生 10.5 日に原始心房、心室にみられたが、ビスダイアミン投与群では ED10.5 には発現を認めず、胎生 11.5 日に始めて正常群の 10.5 日と同部位に発現が観察された。HGF mRNA もビスダイアミン投与群では胎生 10.5 日では発現がみられず、発現時期が正常群より遅れていた。

③ CT-1 は両群の心室、心房心筋において胎生 10.5 日から 14.5 日まで続けて発現がみられたが、15.5 日以後の左室心筋壁で発現の低下が観察された。CT-1mRNA の発現ピークは正常群では胎生 10.5 日、ビスダイアミン投与群では胎生 11.5 日で、発現時期が正常群より遅れていた。また胎生 11.5 日以後ではビスダイアミン投与群で正常群に比し CT-1 mRNA が増加していた。

④MEF-2 mRNA は胎生期を通じて発現しており両群で有意差はみられなかった。

⑤TUNEL 陽性細胞は胎生 13.5 日以後に正常群の truncal cushion と少数ではあるが流出路の一部や肉柱部の心筋にも認められたが、ビス

ダイアミン投与群では TUNEL 陽性細胞は正常群に比し少数であった。DNA ladder の発現においても両群で同様の傾向がみられた。

【考察】今回の実験でビスダイアミン投与直後に HGF や CT-1 といった心筋増殖因子の発現が抑制されていたことから、ビスダイアミンは発生早期の心筋に対して、直接的に影響を及ぼしている可能性が示唆された。胎生 11.5 日以後にはこれらの増殖因子の発現は増強されているが、胎生 15.5 日から DNA 合成の低下と左室の菲薄化がみられ、これに対応した DNA 合成の増加は明らかではなかった。それと同時に DNA 合成の低下がみられた。西島らはビスダイアミンが心外膜の正常な発生を阻害する事を報告した。冠動脈の発生に心外膜が密接に関わっていることが報告されており、ビスダイアミンにより冠動脈の正常な発生が妨げられた結果として、胎生 15.5 日以後の心筋の発育が阻害されていることが考えられた。ビスダイアミン投与群でのアポトーシスの低下は、動脈幹の分割異常に関わっていると考えられた。

【結論】ビスダイアミンは神経堤細胞の移動を阻害し心血管奇形を惹起するが、それ以外に心筋の分化、増殖及びアポトーシスを阻害することが明かとなった。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	323	氏名	岡本 暢彦
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>本研究は心奇形モデルラット胎仔の心臓における心筋の DNA 合成、増殖因子の発現、アポトーシスについて心奇形発生の観点から検討を行ったものである。</p> <p>妊娠 9.5 日の母ラットにビスダイアミンを投与し、摘出した胎仔の心臓の形態、心筋細胞の DNA 合成 (BrdU による標識)、心筋増殖因子 (HGF、CT-1、MEF-2) の発現、アポトーシスについてコントロールと比較検討した。</p> <p>その結果、次の事が明らかになった。ビスダイアミン投与ラット胎仔では胎内死亡が多く、心奇形が大きな原因と考えられた。組織学的には左室壁の菲薄化が観察され、心筋の DNA 合成が低下していた。HGF と CT-1 の発現はコントロールに比しビスダイアミン投与群で遅れていた。一方、アポトーシスはビスダイアミン投与群で減少していた。</p> <p>本研究はビスダイアミン投与ラットでの心筋の成長異常について形態学的にはじめて明らかにした論文で、ヒトの心奇形での心筋細胞増殖の過程を知る上で重要であり学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>なお本学位授与申請者は、平成 16 年 2 月 4 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>			
(平成 16 年 2 月 20 日)			