

出生前ステロイド治療が妊娠ヒツジモデルにおける胎仔心機能へ与える有害な変化は用量依存性である

東北大学大学院医学系研究科 医科学専攻

発生・発達医学講座 周産期医学分野

熊谷 祐作

目次

I 要約	6
II 研究背景	9
III 研究目的	15
IV 研究方法	15
1.実験の概要	
2.実験動物の準備	
3.治療群	
4.心臓超音波検査	
5.剖検	
6.RNA (ribonucleic acid) 抽出	
7.リアルタイム PCR による遺伝子発現の定量的評価	
8.マイクロアレイ解析	
9.統計学的解析	
V 研究結果	21
1.特徴	
2.超音波による心機能の解析	
3.胎児心臓における遺伝子発現変化の qPCR 解析	
4.マイクロアレイ解析	

VI 考察	25
1.結果の要約	
2.循環管理におけるステロイドの有用性について	
3.超音波検査に対する考察	
4.遺伝学的検査に対する考察	
5.研究限界	
6.今後の課題と将来への展望	
7.考察のまとめ	
VII 結論	37
VIII 謝辞	38
IX 参考文献	39
X 図表	52
XI 図表説明	59

略語

ACS : antenatal corticosteroid

α MHC : myosin heavy chain-alpha

BH : Benjamini-Hochberg

Beta-Ac : betamethasone acetate

Beta-P : betamethasone phosphate

β MHC : myosin heavy chain-beta

dAo-Vmax : maximum systolic blood velocity (Vmax) of descending aorta

DAVID : Database for Annotation, Visualization and Interrogated Discovery

DEG : differential expressed gene

E/A ratio : early filling and late filling ratio

FDR : false discovery rate

FC : fold change

GADD45 γ : growth arrest and DNA damage inducible gamma

GRP78 : heat shock protein family A (Hsp70) member 5

MV : mitral valve

NPPB : natriuretic peptide B

NR3C1 : nuclear receptor subfamily 3 group C member 1

PCR : polymerase chain reaction

PGC1- α : PPARG coactivator 1 alpha

PLI : preload index of inferior vena cava

PPAR γ : peroxisome proliferator activated receptor gamma

RCT : randomized control test

TAC : transcriptome analysis console

TCD : total cardiac dimension

TV : tricuspid valve

I 要約

背景：

出生前ステロイド治療は早産期に出生する新生児の死亡率および罹患率を減少させるための標準的な医療である。しかし、この出生前ステロイドの投与方法および投与量は約 50 年間刷新されず、依然として最適化されているとは言い難い。さらに、*in vivo* および *in vitro* の研究では、出生前ステロイドは「プログラミング」効果があり、成人期以降の循環器疾患リスクの増加をもたらし、胎仔の心筋肥大を誘発することが示されている。本研究を行った豪州や、北米・欧州で出生前ステロイド治療に用いられる薬剤は急速に血中濃度を上昇させる薬剤：ベタメタゾンリン酸エステルと、不溶性でわずかに血中に溶解する薬剤：ベタメタゾン酢酸エステルの合剤である。我々は過去において出生前ステロイド治療の長期的な副作用を減じつつ効果を保持するといった出生前ステロイド治療の最適化を図るために、ヒツジ胎仔へ低用量ベタメタゾンをばく露したモデルを作成した。その結果、ヒツジ胎仔の肺成熟を促すのは低用量ベタメタゾンを一定期間持続的にばく露することであり、急速に血中濃度を上昇させ急速に血中濃度が低下するベタメタゾンリン酸エステルの筋肉内注射は肺成熟にあまり関与しないことが示唆された。また、急速に血中濃度を上昇させることは胎仔の肺や脳に有害な可能性が示唆された。しかしながら、この低濃度のベタメタゾンばく露が胎仔心臓へ与える効果はまだ検討されておらず、臨

床治療量の出生前ステロイド治療が胎仔心臓に与える影響の評価も未だ不十分である。

目的：

本研究は妊娠ヒツジを用いて、従来行っている出生前ステロイド治療の臨床治療量と、今回新たに作成したベタメタゾンの低濃度ばく露の2通りの治療が胎仔心臓の機能と遺伝子発現に与える影響について解析することとした。

研究方法：

妊娠 114 日（満期：147 日）の単胎の妊娠ヒツジ 18 頭に対し、1）母獣へベタメタゾンリン酸エステルナトリウム（Betnesol®）を持続的に静脈注射することで胎仔血中濃度を約 2 ng/ml に維持した低濃度静注法を 36 時間継続した治療（Beta-P Infusion 群）（n=6）、2）ベタメタゾン酢酸エステル・ベタメタゾンリン酸エステルナトリウムの合剤の臨床治療量（0.25 mg/kg Celestone Chronodose®）を母獣へ 24 時間毎に 2 回筋肉内注射した治療（臨床治療群）（n=6）、3）生理食塩水を母獣へ 24 時間毎に 2 回筋肉内注射した治療（Control 群）（n=6）を施行した。治療開始当日に、妊娠ヒツジに対して胎仔心臓超音波検査を施行して心機能を測定した。7 日間の観察期間の後、妊娠 121 日に帝王切開術で胎仔を娩出した後、採取した胎仔心筋に対してリアルタイム定量 PCR 検査並びにマイクロアレイ検査を施行した。また遺伝子発現の時間的経過を調べるため、妊娠 120 日の単胎妊娠ヒツジ 6

頭に対し、Beta-P Infusion 群の治療を施行してから2日後に胎仔を娩出させ、胎仔心筋のマイクロアレイ検査を施行した。

研究結果：

臨床治療群の胎仔の心機能評価において、僧帽弁と三尖弁の心室拡張期流入速度比が共に有意に低く、Control 群に対して心室の拡張障害パターンを示した。Beta-P Infusion 群の胎仔の心機能は全ての項目で、Control 群の胎仔の心機能と統計学的な有意差を認めなかった。定量 PCR 結果では、臨床治療群の胎仔において β MHC、GADD45 γ 、PPAR γ といった心筋肥大に関与する遺伝子の遺伝子発現に有意差を認めた。Beta-P Infusion 群の胎仔では、Control 群に対して定量 PCR 結果全てにおいて統計学的な有意差を認めなかった。マイクロアレイ解析では、Control 群に対して有意に発現変化を示した遺伝子の数は、2日目の Beta-P Infusion 群、7日目の Beta-P Infusion 群、7日目の臨床治療群でそれぞれ 2,375 個、1 個、25 個であった。

結論：

臨床治療群の胎仔では心機能評価で拡張障害を疑う変化を示し、定量 PCR 検査では一部の遺伝子に心筋肥大を示唆する遺伝子発現変化を示した。一方、低濃度のベタメタゾンにばく露した Beta-P Infusion 群の胎仔では、心機能評価と心筋の遺伝子発現変化への影響が Control 群と比べて統計学的な有意差を示さなかったため、胎仔心臓への有害性は臨床治療にばく露した胎仔より小さい可能性があると考えられ

た。参考文献より低濃度のグルココルチコイドばく露は、投与量を減じてでも肺成熟を保つことが知られており、出生前ステロイド治療の最適化のために低濃度の合成グルココルチコイド投与が検討されている。本研究から導き出された結果は、出生前の低濃度ベタメタゾンばく露は胎仔心臓に対して影響が小さいことが示唆されるため、前述の肺とグルココルチコイドのスキームと合わせて、出生前ステロイド治療の最適化の一助となり得ると考えた。

II 研究背景

早産児は世界で年間約 1,500 万人も出生している。さらに、機械的人工換気が必要な妊娠 32 週以下の早産児は年間およそ 200 万人、後遺症発症のリスクが高いといわれる妊娠 28 週未満の超早産児が年間およそ 50 万人も出生している¹⁾。このような現状の中、ここ 20 年の間、周産期医療の進歩に反して妊娠 27 週未満に分娩となった早産児の救命率は未だ改善しているとは言い難い²⁾。妊娠 22 週から妊娠 28 週の間生まれた超早産児の救命率が改善しない理由は、児の未熟性にあるのはもちろんだが、特に肺や心臓が未熟な超早産児にとって、胎盤でガス交換を行う胎児循環から肺でガス交換を行う新生児循環への急激な移行が容易ではないという点が挙げられる。超早産児の未熟性に起因する問題は多岐に渡るが、この呼吸と循環という 2 つのファクターが生命の維持にとって大きなウエイトを占めていることは

想像に難くない。この早産児の肺と循環に作用し、新生児死亡率の改善に最も寄与する治療の1つとして、合成グルココルチコイドを用いた出生前ステロイド (antenatal corticosteroid ; ACS) 治療がある³⁾。ACS 治療に用いられる薬剤のうち、欧米を中心に世界で広くエビデンスが得られている薬剤は2種類存在し、1つ目はベタメタゾン酢酸エステル・ベタメタゾンリン酸エステルナトリウムという合剤 (Celestone Chronodose®)、2つ目はデキサメタゾンリン酸エステル (Betnesol®) という単剤である。ACS 治療の肺への作用は、主に胎児の肺サーファクタント産生を増やし、肺胞壁を薄くすることである^{4), 5)}。また、同じく ACS 治療の循環への作用は、胎児血圧を上昇させ、分娩直後の新生児のカテコラミン使用率を下げることとされている⁶⁾。母体副腎皮質が産生したコルチゾールや母体へ投与したプレドニゾン⁷⁾は、主に胎盤に存在する酵素である 11 β hydroxy-steroid dehydrogenase type 2 (11 β -HSD2) の作用によって、それぞれ不活性型のコルチゾンやプレドニゾンに代謝されるために胎児にはほとんど作用しない。一方、合成グルココルチコイドであるデキサメタゾンやベタメタゾンは 11 β -HSD2 によって代謝される比率が低いために、胎児へ移行して作用すると考えられている⁷⁾。合成グルココルチコイドが選択的に作用するグルココルチコイド受容体は、肺、心筋、脈管に加え前頭葉皮質や後頭葉皮質、海馬、副腎そして骨など胎児の全身に発現しているため、ACS 治療が胎児の各臓器で治療効果を発揮すると考えられている⁷⁾。

ACS 治療は 1972 年に Liggins と Howie によって最初に考案された、早産

のリスクが非常に高い妊娠女性に投与し、早産児に対する効果を期待する非常に特徴的な治療法である⁴⁾。この治療法は、1960年代のヒツジを用いた研究結果を元に、Celestone Chronodose® (ベタメタゾンリン酸エステル (Beta-P) とベタメタゾン酢酸エステル (Beta-Ac) の 1:1 混合物；以下 Beta-P+Ac) 12mg を 24 時間毎に 2 回母体へ筋肉内注射する方法であり、現在でも米国、カナダ、豪州、ニュージーランド、英国を除く欧州で使用されている⁸⁾。英国ではデキサメサゾンリン酸エステル 6mg を 12 時間毎に 4 回筋肉内注射する方法を用いており、廉価な薬剤であるため WHO もこの投与方法を推奨している。両者の治療法はどちらも Roberts らによる 29 編の ACS 治療に関する無作為化比較試験 (RCT) のコクランレビューの中心的な治療法であるため、標準的な治療法といえる⁹⁾。このコクランレビューでは、下記 7 項目を減少させるという強力なエビデンスが示されている³⁾。

- ・ 周産期死亡率 (RR 0.72、95%CI 0.58-0.89；15 試験、6729 人の乳児)
- ・ 新生児死亡率 (RR 0.69、95%CI 0.59-0.81；22 試験、7188 人の乳児)
- ・ 呼吸窮迫症候群 (RR 0.66、95%CI 0.56-0.77；28 試験、7764 人の乳児)
- ・ 脳室内出血 (RR 0.55、95%CI 0.40-0.76；16 試験、6093 人の乳児)
- ・ 壊死性腸炎 (RR 0.50、95%CI 0.32-0.78；10 試験、4702 人の乳児)
- ・ 小児期の発達遅滞 (RR 0.49、95%CI 0.24~1.00；2 試験、518 人の乳児)
- ・ 小児期の脳性麻痺 (RR 0.60、95%CI 0.34-1.03。5 試験、904 人の乳児)

このレビューにおいて Roberts らは、先進国などの医療水準が確保されている地域

で施行されている ACS 治療はエビデンスレベルの高い治療方法と断言できるため、同治療法の効果を検討するための RCT はこれ以上行われるべきではないと結論づけた。

欧米での ACS 治療は確証が得られた治療といえるが、アジアや発展途上国ではそうと言えない現状がある。Kemp らは欧米以外の国では Beta-P+Ac の合剤が使用されていない場合が多く、地域によって Beta-P 単剤を ACS 治療薬として合計 24mg を投与していると指摘した^{8),10)}。本邦では Beta-P+Ac と同等の薬剤は存在するが整形外科領域における関節内注射のみに適応が限られ、ACS 治療薬剤として保険適応の薬剤は Beta-P (リンデロン®注) であり、用量・用法は 12mg を 24 時間毎に 2 回、合計 24mg を筋肉内注射すると定められている。Beta-P と Beta-Ac は下記に詳述するが薬物動態が非常に異なるため、この区別はとても重要である。したがって、本邦で長年行ってきた ACS 治療による急性期での臨床効果や潜在的な有害性は、欧米の Beta-P+Ac による効果・有害性とは異なる可能性がある^{8),10)}。発展途上国における ACS 治療については医療資源上の問題や、新生児死亡率の低下と上昇の両者の結果が出ており^{11),12)}、日本を含む世界規模では ACS 治療の薬剤や用法が異なる点や有効性が示されないという点で問題といえる。

ACS 治療は、妊娠 24 週から妊娠 34 週までに 1 週間以内に分娩となることが予想される妊婦にとって一定のコンセンサスの得られた標準的な医療であり¹³⁾、未熟な早産児の急性期管理を乗り切るための必須治療であると言える³⁾。一方、数多

くの研究が ACS ばく露による長期的な弊害を指摘してきたが、それは胎児の発育不全^{14), 15)}や、認知障害^{16), 17)}、精神行動障害^{18), 19)}、過敏なストレス応答²⁰⁾、成人期のインスリン反応性の変化²¹⁾、三世代先へのエピジェネティックな遺伝子変化の可能性²²⁾などである。よって ACS 治療は治療を受けた胎児に対して、短期的には有益であるといえるが、長期的には有害な可能性がある。

胎児・胎仔の心血管系や心筋に関して、グルココルチコイドばく露もまた、様々な心臓の負の転機と関連している。たとえば、胎内でグルココルチコイドへ過剰にばく露すると、心筋に「プログラミング」効果をもたらし、成人期以降に心血管疾患のリスク増加につながる可能性がある^{23), 24), 25)}。さらに、ACS ばく露を受けた群は出生体重が約 1kg の十分にマッチした対照群と比較して 14 歳の非黒人女性被験者の心拍変動の減少と関連していること²⁶⁾、動物実験においてグルココルチコイドが胎仔のうっ血性心不全の主な原因である心肥大を誘発すること^{24), 27), 28)}や心筋肥大に関係する遺伝子発現変化を引き起こすこと^{29), 30), 31)}がそれぞれ報告されている。

さらに ACS 治療の問題点として、約 50 年前から臨床の現場で使用されているにもかかわらず、その効果を最適化する、つまり最小量の薬剤量で肺成熟効果と循環動態改善効果を促しつつ有害性を最小化するための投与経路や用量用法を検討する研究が全くなされていないことが挙げられる^{9), 10), 13), 32), 33)}。ACS 治療に用いられる薬剤の薬効動態については、Beta-P 成分は水溶性であるため母獣と胎仔の血中濃度を急速に上昇させるのに対して、Beta-Ac 成分は不溶性であるため徐々に血中へ

溶解し、Beta-P 成分より長時間胎仔へばく露することが分かっている。そのため Liggins らは ACS 治療薬として Beta-Ac が含まれる合剤 Beta-P+Ac を選択し治療方法を考案した歴史がある。しかしながら、近年、我々や他の研究者が動物実験モデルで Beta-Ac 成分自体の肺成熟作用を試験するまで、この Beta-Ac の「長時間ばく露」は臨床的反応に不可欠なものとして検証されたことはなかった^{9), 34), 35)}。また、ACS 治療の効果を得るための合剤「12mg」が適量であるかの検討はほとんどなされていない。早産を疑った時点での母体体重や妊娠週数（胎児の推定体重や未熟性）、早産を予期するに至った妊娠高血圧症候群や絨毛膜羊膜炎などの母体基礎疾患の有無によって投与量を検討した研究も存在しない。

我々は、妊娠ヒツジを用いたこれまでの研究において、従来の臨床治療である Beta-P+Ac の合剤 0.25 mg/kg をヒツジ母獣へ筋肉内注射をすると、ヒツジ胎仔の最大血中濃度は約 10 ng/ml に達すること、胎仔の血中濃度を約 2 ng/mL となるように母獣にベタメタゾンを 26 時間静脈内投与することによって、治療開始から 2 日目には胎仔の肺成熟を誘導するのに十分であることを導いており、ACS へのばく露量を減らしても胎仔肺の成熟を誘導し得ることを報告した^{36), 37)}。これらの研究では、ACS 治療による胎仔の肺成熟効果を得るためには、母獣および胎仔血中のベタメタゾン濃度の高いピークは不必要であるばかりでなく、胎仔肺への毒性のリスクを高める可能性があることが指摘された。

胎仔肺への毒性のリスクが軽減できるかもしれない低濃度の Beta-P 治療が

肺以外の臓器へ与える影響はどのようなものであろうか。今までこの低濃度 Beta-P 治療が胎仔心臓に与える影響について解析されたことはない。また従来の用量・用法における ACS 治療が胎仔心臓へ与える短期的および長期的な影響についての解析は未だ限定的である。

III 研究目的

本研究では、ACS の胎仔心臓への影響に着目した。本研究は、第 1 に従来の臨床治療量の ACS 治療が胎仔心機能や心筋肥大に関連する遺伝子発現に与える影響を調べることに、第 2 に低濃度の Beta-P Infusion 治療が、従来の ACS 治療と比較して、胎仔の心機能および心筋肥大に関連する遺伝子発現変化への影響が小さくなるという仮説を検証することを目的とした。以前に得られた薬物動態データを修正し、図 1 に示した。

IV 研究方法

1. 実験の概要

ACS が胎仔の心機能と、胎仔心筋の遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。先行研究で設計した胎仔血漿ベタメタゾン濃度 2 ng/ml を 36 時間持続静注にて投

与する群と、陽性対照として臨床治療に相当する群の2つの治療群を設け、それぞれを陰性対照の Control 群と比較した。胎仔の心機能測定には胎仔心臓超音波検査を行った。胎仔心筋の遺伝子発現変化を定量 PCR とマイクロアレイで測定した。

2. 実験動物の準備

動物実験は、西オーストラリア州パースにある、西オーストラリア大学 (approval RA/3/100/1378) の動物倫理委員会、マードック大学 (approval R3056/18) の動物倫理委員会による審査と承認に続いて、上記2施設で行われた。すべての妊娠ヒツジは単胎で、実験は通常の繁殖期に実施した。単胎妊娠の24頭の母獣ヒツジに、早産のリスクを軽減するために、メドロキシプロゲステロン酢酸エステル 150 mg (Depo-Ralovera® ; Pfizer、West Ryde、NSW、オーストラリア) を筋肉内注射した。5日後、母獣を Beta-P Infusion 群 (n=12)、臨床治療群 (n=6)、Control 群 (n=6) のいずれかに無作為に割り付けた。

3. 治療グループ

治療プロトコールを図2にまとめた。輸液治療のために、妊娠112日(満期=150日であり、ヒトに換算して妊娠30週相当)の6頭の母獣に対して全身麻酔下で外科的に内頸静脈カテーテルを留置した。2日後、これらの動物に対し、迅速に約2 ng/mlの胎仔血漿ベタメタゾン濃度とし、かつそれを維持するために、ベタメ

タゾンリン酸エステル (Beta-P) (Betnesol[®], Focus Pharmaceutical、ロンドン、英国) の投与を 0.028 mg/kg 静脈内急速静注+0.144 mg/kg/36 時間の持続静注という投与方法で始めた (Beta-P Infusion D7 群)³⁸⁾。低濃度の持続静注を行う先行研究の中で、ヒツジ胎仔の肺成熟を確認した最長の薬剤投与期間は 36 時間であり、薬剤ばく露時間が長いほど心筋への有害性が生じることを仮定したため本研究でも持続静注期間を 36 時間と設定した。陽性対照として、6 頭の母獣 (妊娠 114 日) に対して、体重 60kg のヒトへの臨床治療に相当する投与量の 0.25mg/kg のベタメタゾン酢酸エステル・ベタメタゾンリン酸エステルナトリウム (Beta-P+Ac) の 1:1 混合物 (Celestone Chronodose[®], Merck, Sharp and Dohme, Macquarie Park, NSW, Australia) を、24 時間の間隔をあけて 2 回、筋肉内注射を施行した (臨床治療 D7 群)。陰性対照として、6 頭の母獣 (妊娠 114 日) に対して生理食塩水の筋肉内注射を施行した (Control D7 群)。これら 3 群計 18 頭の母獣に対し、治療開始から 7 日後に帝王切開術を行った。また、Beta-P 治療による遺伝子発現の時間依存性を調べるため、本研究の Beta-P 治療法と同じ治療法で、妊娠 120 日の母獣に治療を開始し、治療開始から 2 日後に帝王切開術を行なったコホートを追加した (Beta-P Infusion D2 群)。本研究で用いた全ての母獣は、妊娠 119～124 日の間に分娩となった。

4. 心臓超音波検査

超音波評価は、ACS 治療が開始されてから 8 時間後に 1 人の検者によって実行された。測定は、Philips CX50 system, S5-1 phased-array probe (両者とも Philips Healthcare, Best, The Netherlands)、および関連する産科用ソフトウェアを使用して実施した。測定のために、母獣を背臥位の状態で保持し、検者が腹側から胎仔の位置を確認した。超音波画像では、図 3 に示すように、6 つの心機能パラメータを確認するために、四腔断面像、3 vessel trachea 像、または矢状断面像を表示した。超音波ビームと血管／血流との間のインソネーション角度は 60°以内とし、流速を求める項目 (図 3D; dAo-Vmax) に対してアングル補正を行った。

5. 剖検

母獣へ硬膜下脊椎麻酔を行い、帝王切開術にて胎仔を娩出し、臍帯動脈血の pH を測定した。左心室心筋を採取し、冷凍保存した³⁶⁾。

6. RNA 抽出

製造元のプロトコルに従って、total RNA の抽出は、70–80 μg の左室心筋を TRIZOL Reagent 750 μl とともにホモジュナイズし、200 μl のクロロホルムを添加後、取り出した水層から 2-プロパノールで沈殿させた。沈殿物を 70 % エタノールで 2 回洗浄後、ゲノム DNA を除去するため DNase 処理を行い、RNase free

蒸留水を加え再度 70%エタノールで洗浄後、70%エタノールを除去し DEPC

(Diethyl pyrocarbonate) 処理滅菌水に溶解した。RNA の品質は、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を用いて検証し、RIN 値が 7 以上であることを使用条件とした。

7. リアルタイム PCR による遺伝子発現の定量的評価

定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) は、ヒッジ特異的 TaqMan プローブおよびプライマーセット (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて、ユーザーマニュアルに従ってステップワンリアルタイム PCR システムを用いて実施した。以下の 8 つの標的遺伝子に対する mRNA 転写物を測定した。MYH7_seq08593 (MYH7; XM_027977118.1; Oa04885566_m1) ; myosin-6 (LOC101120580) (MYH6; XM_027971620.1 ; Oa04758573_g1) ; growth arrest and DNA damage inducible gamma (GADD45G ; XM_015093022.2 ; Oa04906954_g1) ; peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARG ; NM_001100921. 1 ; Oa04658387_m1) ; PPARG coactivator 1 alpha (PGC1- α ; XM_004009738.4 ; Oa02631739_m1) ; heat shock protein family A (Hsp70) member 5 (HSPA5 ; XM_004005637. 3; Oa04856974_g1) ; natriuretic peptide B (NPPB; NM_001160026.1; Oa04931155_g1) ; および nuclear receptor subfamily 3 group C member 1 (NR3C1; NM_001114186.4;

Oa04657789_m1)。各遺伝子の増幅データは、内部基準としてリボソームタンパク質 18s RNA を用いて正規化された。

8. マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析は、Control D7 群、臨床治療 D7 群、Beta-P Infusion D2 群、Beta-P Infusion D7 群の 4 つの各群について 6 つの biological replicates を用いて行った。100 ng の総 RNA を、マニュアルに従って WTPlus Kit (Affymetrix) を用いて処理した。断片化され、標識された一本鎖 DNA を GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit (Affymetrix) を用いてハイブリダイズし、22,141 個の遺伝子を含むヒツジ特異的マイクロアレイ分析 (Ovine Gene 1.1 ST 24 Array plate; Affymetrix, Santa Clara, CA) を施行した。アレイデータは、Transcriptome Analysis Console (TAC) 4.0.1 (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて、robust multiarray average 法、バックグラウンド補正、Quantile 正規化、および遺伝子レベルのプローブセットサメーションを用いて前処理した。それぞれの治療群の中で Control D7 群に比べて特異的な発現を示した遺伝子 (DEG; differential expressed gene) を、偽発見率 (FDR) 補正を調整した Benjamini-Hochberg (BH) 法による p 値によって同定した。FDR が 0.1 未満のものを有意であると考え、BH 法による p 値 < 0.05 を満たした遺伝子を DEG とした。パスウェイ解析は、DAVID (Database for Annotation, Visualization and Interrogated

Discovery) を用いて行った³⁹⁾。その有意項目も BH 法による p 値 < 0.05 とした。マイクロアレイ解析は、ニューサウスウェールズ大学の遺伝学、Ramaciotti Centre によって行われた。

9. 統計学的解析

統計解析は、IBM SPSS for Windows, version 20.0 (IBM Corp, Armonk, NY)を用いて行った。多重比較として、Control D7 群に対する各治療群について、Dunnett の検定を行った ($p < 0.05$)。

V 研究結果

1. 特徴

妊娠年齢、出生体重、性別、臍帯血 pH において、各治療群と Control D7 群との間に有意差を認めなかった (表 1)。

2. 超音波による心機能の解析

胎仔の心機能に及ぼすグルココルチコイドばく露の影響を評価するために、治療開始から 8 時間後の胎仔の心臓超音波解析を施行して胎仔心機能を測定した。パルスドプラ画像を用いて、心房室弁、下大静脈、下行大動脈、動脈管を通る血流

の方向と波形を検出し、それぞれ僧帽弁または三尖弁の心室拡張期流入波形より MV-E/A 比と TV-E/A 比、下大静脈の preload index; PLI, 下行大動脈の最大速度 dAo-Vmax を測定した (図 4 説明文参照)。また四腔断面像より総心横径 (total cardiac dimension ; TCD) を測定した。全 18 胎仔の動脈管の血流は、肺動脈から下行大動脈へ流れる順行性 (右から左) の血流であり、また動脈管が開存していることを確認した。Control D7 群と比較すると、臨床治療 D7 群では MV-E/A 比、TV-E/A 比が有意に低値を示した (それぞれ p 値 0.04、0.01) が、Beta-P Infusion D7 群ではこれらの項目は統計学的な有意差を認めなかった。PLI 値、Ao-Vmax、TCD は、対照群と治療群の胎仔において統計学的な有意差を認めなかった (図 4)。

3.胎仔心臓における遺伝子発現変化の qPCR 解析

得られた total RNA 濃度は、542-942 (平均 688) ng/ul だった。

臨床治療 D7 群が胎仔の心筋機能に有意な影響を与えることが示されたことから、心筋機能のうち心筋肥大に関連する遺伝子 7 つ、すなわち β MHC (NYH7)、 α MHC (MYH6)、GADD45 γ (GADD45G)、PPAR γ (PPARG)、PGC1- α 、GRP78 (HSPA5)、NPPB に加え、グルココルチコイド受容体の遺伝子 NR3C1 の遺伝子発現変化を測定し統計学的に検討した。胎仔心筋肥大の評価に有用であるため、得られた結果より β MHC/ α MHC 比を算出した。

Control D7 群における β MHC、 α MHC、GADD45 γ 、PPAR γ 、PGC1- α 、GRP78、NPPB、NR3C1 の平均 Raw CT 値は順に、23.06、23.41、24.03、26.96、23.67、21.27、22.39、23.85（小数点以下 3 桁を四捨五入）だった。

Control D7 群、臨床治療 D7 群、Beta-P Infusion D7 群の 18s rRNA の平均 CT 値はそれぞれ、6.85、7.11、6.80 だった。

臨床治療 D7 群では Control D7 群と比較して、 β -MHC および GADD45 γ の発現が有意に増加し、PPAR γ の発現が有意に減少した（それぞれ $p=0.003$ 、 $p=0.01$ 、 $p=0.03$ ）。しかし、 β MHC/ α MHC の比率は、臨床治療 D7 群では Control D7 群と比較して有意ではなかった（ $p=0.6$ ）。Beta-P Infusion D7 群では Control D7 群と比較し β -MHC、GADD45 γ 、PPAR γ の有意差は統計学的に認められなかった。その他の遺伝子（PGC1- α 、NR3C1、GRP78、NPPB）については、Control D7 群と各ステロイド治療群との間に統計学的な有意差を認めなかった（図 5）。

4. マイクロアレイ解析

定量 PCR 検査によって、臨床治療 D7 群における心筋 RNA 中の心筋肥大に関わる遺伝子発現への影響は実証されたので、さらに胎仔心筋におけるグローバルなトランスクリプトーム変化を調査した。Beta-P 治療を受けた動物の急性変化を調べるために、Control D7 群、臨床治療 D7 群、Beta-P Infusion D7 群に Beta-P

Infusion D2 群を加えた 4 群の心筋 RNA に対してマイクロアレイを行った。合計 22,141 個のプローブがマイクロアレイプレートに含まれていた。FDR を 0.1 とし、Fold Change (FC) の閾値を設定せず、より小さな変化の検出を試みた。ボルケーノプロットおよびベン図 (図 6 A~ 6 D) に示したが、Control D7 群と比較して有意に遺伝子発現を示した遺伝子 (differential expressed gene; DEG) の数は、臨床治療 D7 群では 25 個、Beta-P Infusion D2 群では 2,375 個、そして Beta-P Infusion D7 群では 1 個のみであった。2 つの Beta-P 治療 (図 6 B と図 6 C) を比較すると、治療 2 日目で 2,375 個の DEG が治療 7 日目には 1 個に減少した。Beta-P Infusion D7 群の唯一の DEG は、Beta-P Infusion D2 群の DEG のリストに含まれており、mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2 という名前の、c-Jun アミノ末端キナーゼシグナル伝達経路の調節に関与していると考えられる足場タンパク質をコードしている遺伝子であり心筋肥大との関連は示されなかった。7 日目に娩出した臨床治療 D7 群と Beta-P Infusion D7 群 (図 6 A と図 6 C) を比較すると、DEG の数は臨床治療 D7 群の方が多かった。しかし臨床治療 D7 群の 25 個の DEG に、心筋肥大に関わる遺伝子は含まれなかった。図 6 D および 6 E に示すように、臨床治療 D7 群と Beta-P Infusion D2 群との間には 10 個の共通 DEG があり、FC の値を互いに比較した。

これらの DEG の生物学的機能を解析するために、DAVID を用いてパスウェイ解析を行った³⁹⁾。臨床治療 D7 群の 25 個の DEG および臨床治療 D7 群と Beta-

P Infusion D2 群に共通する 10 個の DEG、どちらに対しても有意なパスウェイは認められなかった。よって臨床治療 D7 群の遺伝子発現変化は、数的に Beta-P Infusion D7 群より多いという結果であった。次に Beta-P Infusion D2 群の DEG 2,375 個を機能解析したところ、有意なパスウェイが検出された。FC が 1.5 以上の遺伝子を遺伝子発現が増加した遺伝子として選択し、得られた 230 個の遺伝子に対してパスウェイ解析を施行したところ、炭素・アミノ酸・脂肪酸代謝、PPAR シグナル伝達経路、神経疾患に関与する遺伝子ネットワークが有意に関連した。一方、FC が-1.5 未満の遺伝子は遺伝子発現が低下した遺伝子として 564 個が選ばれ、DNA、ヒストン、ヌクレオソームなどの核に関わる経路や上皮細胞増殖因子と有意に関連した。得られた遺伝子ネットワークの上位 30 個を表 2 に示した。

VI 考察

1. 結果の要約

本研究の目的の 1 点目は従来の臨床治療による心臓への有害性の評価を行うことであった。従来の臨床治療 D7 群では、心臓超音波による心機能検査において拡張障害を示唆する所見があり、心筋肥大のマーカーとなる遺伝子の一部に有意な遺伝子発現変化を認め、包括的な解析では Beta-P Infusion D7 群の 1 個より多い 25 個の遺伝子発現変化を認めた。本研究の目的の 2 点目は、Beta-P Infusion とい

う低用量のベタメタゾンばく露が従来の臨床治療に比べて胎仔心臓への影響が少ないかどうかを検討することであった。本研究の結果から、Beta-P Infusion D7 群において Control D7 群と比較して胎仔心機能や心筋肥大のマーカーとなる遺伝子の遺伝子発現に統計学的な有意差は認められず、また網羅的な解析において Beta-P Infusion D7 群ではわずか 1 個の遺伝子しか発現変化を示さなかったため、Beta-P Infusion D2 群で遺伝子発現変化を示した 2,375 個の遺伝子のうち 2,374 個の遺伝子は一過性の発現変化であると考えられた。よって、臨床治療と同等の ACS 治療が胎仔心臓にストレスを与えた可能性が示唆されたが、Beta-P Infusion D7 群による ACS 治療では胎仔心臓にストレスを与えたとはいえない可能性が示唆された。

2. 循環管理における出生前ステロイドの有用性について

ACS のばく露が胎仔および分娩直後の新生児/新生仔の心血管系に与える短期的な有益性を示した文献として、胎仔の大腿動脈抵抗の上昇と関連した胎仔の血圧上昇作用⁴⁰⁾、分娩直後の新生児昇圧薬使用率の大幅な減少⁶⁾、糸球体濾過率の安定化⁴¹⁾、水ナトリウムの恒常性⁴²⁾が挙げられた。ACS 治療は総じて早産で産まれた未熟な新生児/新生仔の循環動態安定化につながると考えられる。ACS 治療を受けた新生児の心機能悪化や心疾患を統計学的に論じた文献は見当たらないため、ACS 治療が急性期の循環動態を悪化させるかどうかについての評価は難しい。ACS 治療を受

けた胎児の潜在的な心筋障害が出生後の新生児期及び乳児期に感知できるものかは、今後の疫学的な調査が必要であると思われる。

3. 胎仔心臓超音波検査に対する考察

上記の利点に関する報告がある一方で、ACS のばく露は一過性に中大脳動脈と臍帯動脈の血管抵抗の指標である Pulsatility Index を低下させることが報告されている^{43), 44)}。母獣由来の過剰なグルココルチコイドにばく露した胎仔⁴⁵⁾、母体の糖尿病合併妊娠や妊娠糖尿病にばく露した胎児⁴⁶⁾など、長期ばく露や慢性疾患の胎仔/胎児の心機能評価において、E/A 比が減少したために娩出直後の新生仔/新生児の心臓が拡張障害を呈したという複数の報告が認められる。しかし本研究と同様の、ACS ばく露後の急性期変化として、我々の結果と同様の E/A 比が減少するという報告はない。

胎児/胎仔における E/A 比の意味を論じるにあたり、まず胎児期/胎仔期の心機能の発達に言及する必要がある。房室弁を通過する心室拡張期のドプラ波形は 2 相性であり、早期の E 波、末期の A 波に分類され、E/A 比で定量化される。E/A 比は胎児の拡張機能を表すといわれる。スペクトルドプラの E 波成分は、心室の心筋弛緩の過程における受動的な心室流入を表す。スペクトルドプラの A 波成分は、心房収縮に伴う能動的な心室流入を表す。胎児期の拡張機能は、成人と比較して心筋のコンプライアンスが低いため、主に心房収縮に依存している。しかし妊娠の進行

に伴って心筋が成熟すると、僧帽弁・三尖弁を通過する最大 E 波速度は増加するが、最大 A 波速度は妊娠期間中大きくは変化しない。よって E/A 比は妊娠 13 週で約 0.5 から妊娠 36~38 週で 0.8~0.9 にまで徐々に増加することが分かっている⁴⁷⁾。⁴⁸⁾ この E 波速度の増加は、胎児の全身血管系の発達による後負荷の減少と、心筋の硬さの改善並びに心筋弛緩作用の増強による心室拡張の改善という 2 つの複合的な効果を反映していると考えられる。この 2 つの複合的な効果が心室拡張期の心室内圧を低下させるため、胎児の成長とともに拡張早期の受動的流入にあたる E 波が増強されると考えられている⁴⁷⁾。

胎児の心血管系機能や遺伝子発現の変化はベタメタゾンの直接的な影響によるものである可能性があるが³⁰⁾、ACS 投与後の胎児循環系の変化のメカニズムは明らかではない。そのメカニズムを説明したものとして、Derks らは合成グルココルチコイドをヒツジ母獣へ持続投与した結果、ヒツジ胎仔末梢血管抵抗と血圧が上昇し、心拍数が低下したことを報告した⁴⁰⁾。Clifton らは胎盤コルチコトロピン放出ホルモンの分泌増加が一酸化窒素を媒介とした血管拡張を引き起こし、結果として胎盤血管抵抗が減少する可能性⁴⁹⁾を指摘した。また、グルココルチコイドとグルココルチコイド受容体シグナリングの直接的かつ動的な役割のために、急性期の心筋機能を損なう mRNA レベルの変化の可能性も考えられる^{30), 31), 50)}。

臨床的に E/A 比の低下は心筋の拡張障害を示す重要なパラメータの一つである可能性が示唆されているが、胎児の心機能を総合的に評価する際に E/A 比から得

られる情報だけでは限られているといえる。臨床治療 D7 群では TCD や PLI などの前負荷所見や心不全の心筋マーカーである NPPB に有意な影響を認めなかったことから、臨床治療 D7 群では心室の拡張障害を示唆しつつも心機能全体の悪化を認めたと推察するには至らなかった。Beta-P Infusion D7 群では Control D7 群に比べて全てのパラメータが統計学的な有意差を示さなかったため、コントロールと同等の心機能といえる可能性が高い。本研究は、子宮内環境の悪化などのために早産が予測されることが背景となる胎児の心機能評価を念頭においている。子宮内感染や胎盤機能低下などの子宮内環境の悪化時には、胎児の心機能に影響が出ることが指摘されている^{51), 52)}。このような胎児の心機能評価の際には、複数の胎児心機能パラメータを組み合わせ、子宮内ストレス下の胎児の拡張機能・収縮機能の理解に努めることが重要である⁵³⁾。したがって、ACS 治療後は特に、超音波検査による胎児の集中的なサーベイランスを行い、病態を評価する必要があると考える。

超音波の撮像方法だが、超音波によるドプラ機能を用いた心機能計測をより正確に行うため、血管の描出をする際に 2D の断面に血管の最大径が映る断面で血管の長軸を正確に描出することと、インソネーション角をできるだけ 0° に近づけることが重要である。

超音波評価を行った時期は薬剤投与開始から 8 時間後としたが、その根拠として 1 つの文献を参考にした。Derks らの研究では、10 $\mu\text{g}/\text{h}$ のペースで betamethasone を胎仔へ持続投与したところ、約 24 時間後に血中濃度が 10 ng/ml

と最大となり、血圧は 33 時間後、大腿動脈血管抵抗は 35 時間後に最大となるまで上昇した。この結果からヒツジ胎仔の血圧と大腿動脈血管抵抗は、血中濃度が 10 ng/ml 以下の条件では betamethasone の濃度上昇に伴って徐々に増大し、濃度が一定となった後も数時間増大することが確認された⁴⁰⁾。この結果を踏まえ、我々はヒツジ胎仔の血中濃度上昇が最大となってから数時間遅れて胎仔の血行動態が最も影響を受けると考えた。具体的には、図 1 を参考にすると臨床治療 D7 群の血中濃度が最大となる開始 2 時間後より後で、かつ Beta-P InfusionD7 群の血中濃度を上回っている開始 10 時間までの中から、薬剤開始から 8 時間後を選択して胎仔心機能を測定することとした。

本研究では侵襲的な操作を減らすため、胎仔の血圧や心拍数モニタリングは行っておらず、ACS ばく露による心拍数の変化が超音波による心機能評価に影響を与えた可能性については評価は困難であった。Derks らは合成グルココルチコイド作用でヒツジ胎仔の血圧は上昇し心拍数低下は低下すると報告した。よって、本研究でも

4. 遺伝学的検査に対する考察

in vivo と *in vitro* の両方の研究において、うっ血性心不全の主な原因である心肥大の発生にグルココルチコイドが関与していると報告された^{24), 27), 29), 30), 54)}。心肥大を生理的なタイプと病的なタイプの心肥大に分けることができるかどうかとい

う長年の議論が存在するが^{55), 56)}、病的な肥大の機序の1つは、たとえば、後負荷増大時に心臓が適応しようと強く収縮することによる高血圧や後負荷そのものによって引き起こされるといわれる。この病的肥大における遺伝子的な特徴として、 α MHC レベルの低下、および β MHC レベルの増加が挙げられる。対照的に、生理的肥大を誘発する例として運動、または甲状腺ホルモンの作用の増加によって誘導されるといわれる。この生理的肥大の遺伝子的な特徴は、 α MHC レベルが増加し、 β MHC レベルが減少するとの報告があり病的肥大と反対の結果である⁵⁵⁾。さらに、デキサメタゾンの胎仔心臓への影響は、 α MHC 発現の点で新生仔心臓とは異なるといわれる。すなわち、ばく露後の胎仔心筋で α MHC の発現は減少するが、新生仔の心筋ではこの遺伝子発現が増加したという報告がある²⁷⁾。また、胎仔心筋の β MHC レベルや β MHC/ α MHC 比の増加は心肥大と関連したという報告もある^{30), 55)-57)}。本研究における臨床治療 D7 群では β -MHC の遺伝子発現が有意に増加したため、臨床治療 D7 群における心筋の病的な肥大が示唆された。

母獣の栄養制限⁵⁸⁾、デキサメタゾン治療⁵⁹⁾そして高血圧⁶⁰⁾による胎仔発育不全や心拡大の原因として、エネルギー代謝に関与する心筋遺伝子の発現変化が関与している可能性がある。peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) はエネルギー代謝やミトコンドリア機能関連遺伝子に関与しているが、心筋肥大における PPAR γ の重要な役割は複数の研究で示されており、心筋肥大と PPAR γ の発現低下は関連づけられる⁶¹⁾。Yamamoto らは、PPAR γ の活性化が心筋細胞の肥大

を抑制することを報告している⁶²⁾。本研究における臨床治療 D7 群においても PPAR γ の発現が低下したため、心筋肥大が示唆されたと考えた。The growth arrest and DNA-damage-inducible 45 family は、3つのアイソフォーム： α 、 β および γ (GADD45 γ) を含み、多面発現効果を誘発し、細胞周期停止、DNA修復、および生理学的ストレスに応答して最終的にアポトーシスを促進することが知られている。Lucas らは、心筋細胞における GADD45 γ の過剰発現が p38 MAPK シグナル伝達経路の活性化に影響を与え、心不全の発症に関与することを報告している⁶³⁾。本研究の臨床治療 D7 群において GADD45 γ の発現増加は心筋肥大を示唆したと考えた。Wyrwoll らは、マウス母獣由来の過剰なグルココルチコイドにばく露したマウス胎仔において、心臓超音波検査における E/A 比の低下と心筋細胞における α MHC と PPAR γ の発現低下を示したと報告した⁴⁵⁾。我々は世界で初めて ACS 投与に対する GADD45 γ の過剰発現効果を示した。

5. 研究限界

胎仔心臓超音波検査を行ったのは薬剤投与開始から 8 時間後の 1 時点のみであった。しかしより詳細に薬剤による効果を調べるために、投与前、また投与数日後など超音波検査を複数回行うことで、同一個体内での薬剤による心機能変化がより確実性をもって解析できた可能性がある。この点については、今後臨床研究とし

て著者の勤める施設においてリンデロン®投与前後の胎児心機能を測定することで解析が可能であると考え。

胎児心機能測定時には考察の 2. で前述した通り胎仔の血圧上昇、末梢血管抵抗上昇、心拍数低下が伴っていた可能性があり、それらの変化が胎児心機能結果に影響した可能性は否めないが、本研究では母獣への手術侵襲を減ずるためと胎児への手術侵襲を与えないため、そして何より胎仔の超音波検査目的に開腹術直後の母獣を背臥位することは術後管理の安全性と倫理的な理由で困難であるため、母獣の開腹・子宮切開、胎仔娩出、胎仔動脈カテーテル留置や体表心電図装着、末梢血管用プローベの装着などは行わなかった。また母獣が ACS ばく露直後に血圧上昇などの循環動態の変化を来す可能性について、妊娠女性や妊娠母獣の昇圧効果などバイタル変化についての文献は見当たらず、健康な成獣のヒツジへの合成グルココルチコイドのばく露がもたらすバイタルの急性期変化は認められなかった⁶⁴⁾。よって母獣への ACS ばく露が胎盤循環に与える影響についてもわずかなものと考え、母獣の循環動態がヒツジ胎仔へ与えた影響については検討しなかった。

本研究はヒツジ胎仔の心機能低下と心筋の遺伝子発現変化を調べた結果、心筋障害の可能性を指摘したが、Severinova らのラットを用いた報告にあるように心筋の病理学的評価や蛋白発現解析は心筋障害を評価する上で有用であった可能性がある³¹⁾。実際にさらなる包括的な評価を本研究で行うことは難しいが、今後の ACS

治療の研究の中で心筋の病理学的評価、ウェスタンブロットによる解析やプロテオーム解析による蛋白発現評価を検討したい。

6. 今後の課題と将来の展望

ACS にばく露した胎児心臓へのプログラミング効果として、IIの研究背景でも引用した通り心臓の自律神経の発達に影響を認めたことが分かっているが、これは女性への影響が強く、また黒人への影響が弱かった²⁵⁾。Mzayek らは7歳から21歳の白人とアフリカ系アメリカ人に対するACSばく露と心血管リスク因子の関連を調査した結果、人種差を認めたと指摘した⁶⁵⁾。Gabory らは胎児の発達プログラミングは配偶子形成、性ステロイドホルモン、そして性染色体の影響を受けることで性別ごとに細かく調整されていること、3世代先まで伝達されるエピジェネティックな効果は性に特異的な方法で伝達されることが近年の研究で分かってきていると指摘した⁶⁶⁾。また新たな視点として、我々はACSばく露による肺成熟効果を認めたヒツジ胎仔とそれを認めなかったヒツジ胎仔の個体差を生む原因に迫る研究も行っている⁶⁷⁾。このように、ACSばく露による影響は性別や人種を含む個体差があるといった指摘が散見されることから、ACS投与量を個人に合わせたパーソナライズド医療とする必要性、またACSばく露による長期的な有害性も個体差があることを考慮する必要性を念頭におくべきである。

本研究は Beta-P を点滴で持続投与することで ACS 治療の最適化を胎仔心臓という 1 面から検討したが、点滴による持続投与は患者負担や医療コスト、医療レベルの地域格差の点において治療コンプライアンスが低いと言わざるをえない。貼付薬や内服薬への変更により最適化された ACS 治療のコンプライアンスは従来の筋肉内注射より大幅に改善すると予想できる。実際に妊娠ヒツジを対象とした内服薬による低用量 ACS 治療研究で胎仔肺の成熟が実証され^{34), 68)}、また妊娠サルを対象とした研究では低用量の ACS 治療は胎仔の効率的な肺成熟に加え海馬への影響が筋肉内注射された臨床治療より少ないことが示された³⁵⁾。このように利便性の高い治療方法を用いた ACS 治療の最適化の研究が今後も加速すると思われる。

従来の ACS 治療により胎仔の種々の臓器や遺伝への影響を調べた大多数の研究に比べて、ACS 治療の最適化を図る研究は始まったばかりである。ACS 治療の最適化を図る研究がグルココルチコイド受容体を有する様々な臓器に与える影響を解析することで、ACS 治療を最適化するという試みの利点がさらに明確となる可能性がある。この研究は現時点では大動物を用いた研究のみであるが、研究デザインによっては汎用性が高い小動物を用いた方が良い場合もあるだろう。そういった大/小動物での最適化の研究結果を基に、ヒトへの臨床研究が行われることが今後期待される。

7. 考察のまとめ

我々は本研究において、2つの異なる ACS 治療法がもたらす作用が胎仔心機能や胎仔心筋に対してどのように異なるのか、また、その心筋ストレスが時間経過の中でどのように変化するかを解析した。臨床治療 D7 群の胎仔において、心筋細胞の病的肥大を示唆する β MHC の発現増加、PPAR γ の発現低下そして GADD45 γ 発現増加は、胎仔心筋細胞の肥大ストレスを示唆していた。Beta-P Infusion D2 群では、PPAR γ が関連する PPAR シグナル伝達経路や他のエネルギー代謝に機能的な影響を示したが、Beta-P Infusion D7 群ではこれらの変化は消失したと考えた。以上の結果から、本研究で解析した心筋肥大効果は、臨床治療 D7 群の胎仔で認められたが、Beta-P Infusion D7 群の胎仔では統計学的に見出すことが出来なかった。

現在の ACS 治療が胎児の心機能や動物モデルでの心筋細胞へ与える影響を調べる研究はまだ少ない。ACS 治療を最適化するためには ACS 治療が心臓に与える影響について継続的に調査していくことが重要である。本研究のように ACS 治療を最適化することを目標とした研究において、その都度心筋肥大効果を含む心筋へのストレスを評価することで、ACS 治療の心臓への有害性を減らすことを加味した、ACS 治療の最適化が実現できると考える。

VII 結論

出生前ステロイドの臨床治療は未熟なヒツジ胎仔に対して、急性期における心室拡張障害および治療開始から7日目の心筋細胞の肥大に関して有意に影響した可能性があるが、Beta-Pの低用量ばく露は急性期における心機能および治療開始から7日目の心筋細胞の肥大への影響を統計学的に認めなかった。これらの結果から、Beta-Pの低用量ばく露は胎仔心臓への毒性を低下させ、ACS治療の最適化に貢献する可能性があることが示唆された。

VIII 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました東北大学大学院医学系研究科発生・発達医学講座婦人科学分野の八重樫伸生教授、同障害科学専攻胎児病態学分野/発生・発達医学講座周産期医学分野の齋藤昌利教授、西オーストラリア大学産婦人科教授 Matthew W. Kemp 教授に深甚なる謝意を表します。

本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました西オーストラリア大学産婦人科教授 John P. Newnham 教授、シンシナティ小児病院小児科 Alan H. Jobe 教授に厚く御礼申し上げます。

同じ実験室に所属する東北大学病院周産母子センター（新生児科）の埴田卓志先生、渡邊真平先生、白田治夫先生、佐藤信一先生、池田秀之先生には実験中のご指導を賜っただけでなく様々な苦難を共に乗り越えてくださいました。厚く御礼申し上げます。

西オーストラリア大学産婦人科の実験室でご指導を賜りました東北大学産婦人科の高橋司先生、高橋友貴先生、マイアミ大学小児科の Augusto F. Schmidt 先生、西オーストラリア大学産婦人科所属の Erin L. Fee 氏、Sean Carter 先生、Lucy Furfaro 氏に厚く御礼申し上げます。

マイクロアレイ解析を行うにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました東北大学病院産婦人科濱田裕貴先生に厚く御礼申し上げます。

大学院生として臨床診療を行う最中、オーストラリアや日本での研究活動を

行えたのは、産科病棟の医師をはじめとした産婦人科学分野の皆様のおかげです。

充実した研究生生活を送ることができたことに心から感謝申し上げます。

本研究で使用した妊娠ヒツジを提供してくれた Sara Richie 氏 と Andrew Richie 氏 (Icon Agriculture, Darkan, Western Australia) に感謝の意を表します。

最後に、研究生生活を笑顔で支えてくれた、妻の茜と娘のこはるに、この場を借りて心からの感謝を伝えます。ありがとうございました。

IX 参考文献

1. HOWSON CP, KINNEY MV, MCDUGALL L, et al. :Born too soon: preterm birth matters. *Reprod Health* 2013;10 Suppl 1:S1.
2. STOLL BJ, HANSEN NI, BELL EF, et al. :Trends in Care Practices, Morbidity, and Mortality of Extremely Preterm Neonates, 1993-2012. *Jama* 2015;314:1039-51.
3. ROBERTS D, BROWN J, MEDLEY N, et al. :Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;3:CD004454.
4. LIGGINS GC, HOWIE RN. :A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* 1972;50:515-25.
5. MASSARO D, MASSARO GD. :Dexamethasone accelerates postnatal alveolar wall thinning and alters wall composition. *Am J Physiol* 1986;251:R218-24.
6. DEMPSEY EM. :What Should We Do about Low Blood Pressure in Preterm Infants. *Neonatology* 2017;111:402-07.

7. SECKL JR, HOLMES MC. :Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology. Nat Clin Pract Endocrinol Metab 2007;3:479-88.
8. KEMP MW, JOBE AH, USUDA H, et al. :Efficacy and safety of antenatal steroids. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2018;315:R825-R39.
9. JOBE AH, KEMP M, SCHMIDT A, et al. :Antenatal corticosteroids: a reappraisal of the drug formulation and dose. Pediatr Res 2020.
10. KUMAGAI Y, KEMP MW, YAEGASHI N, et al. :Contemporary Challenges and Developments: Antenatal Corticosteroid Therapy. Current Obstetrics and Gynecology Reports 2019;8:115-22.
11. JOBE AH, KEMP MW, KAMATH-RAYNE B, et al. :Antenatal corticosteroids for low and middle income countries. Semin Perinatol 2019;43:241-46.
12. OLADAPO OT, VOGEL JP, PIAGGIO G, et al. :Antenatal Dexamethasone for Early Preterm Birth in Low-Resource Countries. N Engl J Med 2020.
13. JOBE AH, GOLDENBERG RL. :Antenatal corticosteroids: an assessment of anticipated benefits and potential risks. Am J Obstet Gynecol 2018;219:62-74.

14. IKEGAMI M, JOBE AH, NEWNHAM J, et al. :Repetitive prenatal glucocorticoids improve lung function and decrease growth in preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:178-84.
15. ASZTALOS EV, MURPHY KE, WILLAN AR, et al. :Multiple courses of antenatal corticosteroids for preterm birth study: outcomes in children at 5 years of age (MACS-5). *JAMA Pediatr* 2013;167:1102-10.
16. STUTCHFIELD PR, WHITAKER R, GLIDDON AE, et al. :Behavioural, educational and respiratory outcomes of antenatal betamethasone for term caesarean section (ASTECS trial). *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2013;98:F195-200.
17. ALEXANDER N, ROSENLOCHER F, DETTENBORN L, et al. :Impact of Antenatal Glucocorticoid Therapy and Risk of Preterm Delivery on Intelligence in Term-Born Children. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101:581-9.
18. SAVOY C, FERRO MA, SCHMIDT LA, et al. :Prenatal betamethasone exposure and psychopathology risk in extremely low birth weight survivors in the third and fourth decades of life. *Psychoneuroendocrinology* 2016;74:278-85.

19. RÄIKKÖNEN K, GISSLER M, KAJANTIE E. :Associations Between Maternal Antenatal Corticosteroid Treatment and Mental and Behavioral Disorders in Children. *Jama* 2020;323:1924-33.
20. ALEXANDER N, ROSENLOCHER F, STALDER T, et al. :Impact of antenatal synthetic glucocorticoid exposure on endocrine stress reactivity in term-born children. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:3538-44.
21. DALZIEL SR, WALKER NK, PARAG V, et al. :Cardiovascular risk factors after antenatal exposure to betamethasone: 30-year follow-up of a randomised controlled trial. *The Lancet* 2005;365:1856-62.
22. CONSTANTINOF A, MOISIADIS VG, KOSTAKI A, et al. :Antenatal Glucocorticoid Exposure Results in Sex-Specific and Transgenerational Changes in Prefrontal Cortex Gene Transcription that Relate to Behavioural Outcomes. *Sci Rep* 2019;9:764.
23. BAL MP, DE VRIES WB, VAN DER LEIJ FR, et al. :Neonatal glucocorticosteroid treatment causes systolic dysfunction and compensatory dilation in early life: studies in 4-week-old prepubertal rats. *Pediatr Res* 2005;58:46-52.
24. DE VRIES WB. :Alterations in Adult Rat Heart after Neonatal Dexamethasone Therapy. *Pediatric Research* 2002;52:900-06.

25. DOYLE LW, FORD GW, DAVIS NM, et al. :Antenatal corticosteroid therapy and blood pressure at 14 years of age in preterm children. *Clinical Science* 2000;98:137-42.
26. NIXON PA, WASHBURN LK, MICHAEL O'SHEA T, et al. :Antenatal steroid exposure and heart rate variability in adolescents born with very low birth weight. *Pediatr Res* 2017;81:57-62.
27. MUANGMINGSUK S, INGRAM P, GUPTA MP, et al. :Dexamethasone induced cardiac hypertrophy in newborn rats is accompanied by changes in myosin heavy chain phenotype and gene transcription. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2000;209:165-73.
28. GAY MS, LI Y, XIONG F, et al. :Dexamethasone Treatment of Newborn Rats Decreases Cardiomyocyte Endowment in the Developing Heart through Epigenetic Modifications. *PLoS One* 2015;10:e0125033.
29. WHITEHURST RM, ZHANG M, BHATTACHARJEE A, et al. :Dexamethasone-induced hypertrophy in rat neonatal cardiac myocytes involves an elevated L-type Ca²⁺ current. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1999;31:1551-58.

30. REN R, OAKLEY RH, CRUZ-TOPEPE D, et al. :Dual role for glucocorticoids in cardiomyocyte hypertrophy and apoptosis. *Endocrinology* 2012;153:5346-60.
31. SEVERINOVA E, ALIKUNJU S, DENG W, et al. :Glucocorticoid Receptor-Binding and Transcriptome Signature in Cardiomyocytes. *J Am Heart Assoc* 2019;8:e011484.
32. ROMEJKO-WOLNIEWICZ E, TELIGA-CZAJKOWSKA J, CZAJKOWSKI K. :Antenatal steroids: can we optimize the dose? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2014;26:77-82.
33. KEMP MW, SCHMIDT AF, JOBE AH. :Optimizing antenatal corticosteroid therapy. *Semin Fetal Neonatal Med* 2019;24:176-81.
34. SCHMIDT AF, KEMP MW, RITTENSCHOBBER-BOHM J, et al. :Low-dose betamethasone-acetate for fetal lung maturation in preterm sheep. *Am J Obstet Gynecol* 2018;218:132 e1-32 e9.
35. SCHMIDT AF, KANNAN PS, BRIDGES JP, et al. :Dosing and formulation of antenatal corticosteroids for fetal lung maturation and gene expression in rhesus macaques. *Sci Rep* 2019;9:9039.
36. KEMP MW, SAITO M, USUDA H, et al. :Maternofetal pharmacokinetics and fetal lung responses in chronically catheterized sheep receiving constant,

- low-dose infusions of betamethasone phosphate. *Am J Obstet Gynecol* 2016;215:775 e1-75 e12.
37. KEMP MW, SAITO M, USUDA H, et al. :The efficacy of antenatal steroid therapy is dependent on the duration of low-concentration fetal exposure: evidence from a sheep model of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2018;219:301 e1-01 e16.
38. KEMP MW, SAITO M, SCHMIDT AF, et al. :The duration of fetal antenatal steroid exposure determines the durability of preterm ovine lung maturation. *Am J Obstet Gynecol* 2020;222:183 e1-83 e9.
39. HUANG DA W, SHERMAN BT, LEMPICKI RA. :Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009;4:44-57.
40. DERKS JB, GIUSSANI DA, JENKINS SL, et al. :A comparative study of cardiovascular, endocrine and behavioural effects of betamethasone and dexamethasone administration to fetal sheep. *J Physiol* 1997;499 (Pt 1):217-26.
41. ERVIN MG, BERRY LM, IKEGAMI M, et al. :Single dose fetal betamethasone administration stabilizes postnatal glomerular filtration rate and alters endocrine function in premature lambs. *Pediatr Res* 1996;40:645-51.

42. OMAR SA, DECRISTOFARO JD, AGARWAL BI, et al. :Effects of prenatal steroids on water and sodium homeostasis in extremely low birth weight neonates. *Pediatrics* 1999;104:482-8.
43. EKIN A, GEZER C, SOLMAZ U, et al. :Effect of antenatal betamethasone administration on Doppler velocimetry of fetal and uteroplacental vessels: a prospective study. *J Perinat Med* 2016;44:243-8.
44. URBAN R, LEMANCEWICZ A, PRZEPIESC J, et al. :Antenatal corticosteroid therapy: a comparative study of dexamethasone and betamethasone effects on fetal Doppler flow velocity waveforms. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005;120:170-4.
45. WYRWOLL CS, NOBLE J, THOMSON A, et al. :Pravastatin ameliorates placental vascular defects, fetal growth, and cardiac function in a model of glucocorticoid excess. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:6265-70.
46. DERVISOGLU P, KOSECIK M, KUMBASAR S. :Effects of gestational and pregestational diabetes mellitus on the foetal heart: a cross-sectional study. *J Obstet Gynaecol* 2018;38:408-12.
47. HARADA K, RICE MJ, SHIOTA T, et al. :Gestational age- and growth-related alterations in fetal right and left ventricular diastolic filling patterns. *Am J Cardiol* 1997;79:173-7.

48. ROZMUS-WARCHOLINSKA W, WLOCH A, ACHARYA G, et al. :Reference values for variables of fetal cardiocirculatory dynamics at 11-14 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010;35:540-7.
49. CLIFTON VL, READ MA, LEITCH IM, et al. :Corticotropin-releasing hormone-induced vasodilatation in the human fetal-placental circulation: involvement of the nitric oxide-cyclic guanosine 3',5'-monophosphate-mediated pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2888-93.
50. AGNEW EJ, GARCIA-BURGOS A, RICHARDSON RV, et al. :Antenatal dexamethasone treatment transiently alters diastolic function in the mouse fetal heart. *J Endocrinol* 2019;241:279-92.
51. ROMERO R, ESPINOZA J, GONCALVES LF, et al. :Fetal cardiac dysfunction in preterm premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2004;16:146-57.
52. CRISPI F, COMAS M, HERNANDEZ-ANDRADE E, et al. :Does pre-eclampsia influence fetal cardiovascular function in early-onset intrauterine growth restriction? *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009;34:660-5.
53. HERNANDEZ-ANDRADE E, BENAVIDES-SERRALDE JA, CRUZ-MARTINEZ R, et al. :Evaluation of conventional Doppler fetal cardiac function

- parameters: E/A ratios, outflow tracts, and myocardial performance index. *Fetal Diagn Ther* 2012;32:22-9.
54. LA MEAR NS, MACGILVRAY SS, MYERS TF. :Dexamethasone-induced myocardial hypertrophy in neonatal rats. *Biol Neonate* 1997;72:175-80.
55. LEE KN, LU X, NGUYEN C, et al. :Cardiomyocyte specific overexpression of a 37 amino acid domain of regulator of G protein signalling 2 inhibits cardiac hypertrophy and improves function in response to pressure overload in mice. *J Mol Cell Cardiol* 2017;108:194-202.
56. PERRINO C, NAGA PRASAD SV, MAO L, et al. :Intermittent pressure overload triggers hypertrophy-independent cardiac dysfunction and vascular rarefaction. *J Clin Invest* 2006;116:1547-60.
57. SHEN Z, ZHANG Z, WANG X, et al. :VEGFB-VEGFR1 ameliorates Ang II-induced cardiomyocyte hypertrophy through Ca(2+) -mediated PKG I pathway. *J Cell Biochem* 2018;119:1511-20.
58. CHAN LL, SÉBERT SP, HYATT MA, et al. :Effect of maternal nutrient restriction from early to midgestation on cardiac function and metabolism after adolescent-onset obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009;296:R1455-63.

59. LANGDOWN ML, HOLNESS MJ, SUGDEN MC. :Early growth retardation induced by excessive exposure to glucocorticoids in utero selectively increases cardiac GLUT1 protein expression and Akt/protein kinase B activity in adulthood. *J Endocrinol* 2001;169:11-22.
60. IEMITSU M, MIYAUCHI T, MAEDA S, et al. :Cardiac hypertrophy by hypertension and exercise training exhibits different gene expression of enzymes in energy metabolism. *Hypertens Res* 2003;26:829-37.
61. WANG KC, LIM CH, MCMILLEN IC, et al. :Alteration of cardiac glucose metabolism in association to low birth weight: experimental evidence in lambs with left ventricular hypertrophy. *Metabolism* 2013;62:1662-72.
62. YAMAMOTO K, OHKI R, LEE RT, et al. :Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit cardiac hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation* 2001;104:1670-5.
63. LUCAS A, MIALET-PEREZ J, DAVIAUD D, et al. :Gadd45gamma regulates cardiomyocyte death and post-myocardial infarction left ventricular remodelling. *Cardiovasc Res* 2015;108:254-67.
64. DODIC M, MCALINDEN AT, JEFFERIES AJ, et al. :Differential effects of prenatal exposure to dexamethasone or cortisol on circulatory control

- mechanisms mediated by angiotensin II in the central nervous system of adult sheep. *J Physiol* 2006;571:651-60.
65. MZAYEK F, SHERWIN R, FONSECA V, et al. :Differential association of birth weight with cardiovascular risk variables in African-Americans and Whites: the Bogalusa heart study. *Ann Epidemiol* 2004;14:258-64.
66. GABORY A, ATTIG L, JUNIEN C. :Sexual dimorphism in environmental epigenetic programming. *Mol Cell Endocrinol* 2009;304:8-18.
67. TAKAHASHI T, SAITO M, SCHMIDT AF, et al. :Variability in the efficacy of a standardized antenatal steroid treatment was independent of maternal or fetal plasma drug levels: evidence from a sheep model of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2020;223:921.e1-21.e10.
68. SCHMIDT AF, JOBE AH, KANNAN PS, et al. :Oral antenatal corticosteroids evaluated in fetal sheep. *Pediatr Res* 2019;86:589-94.

X 図表

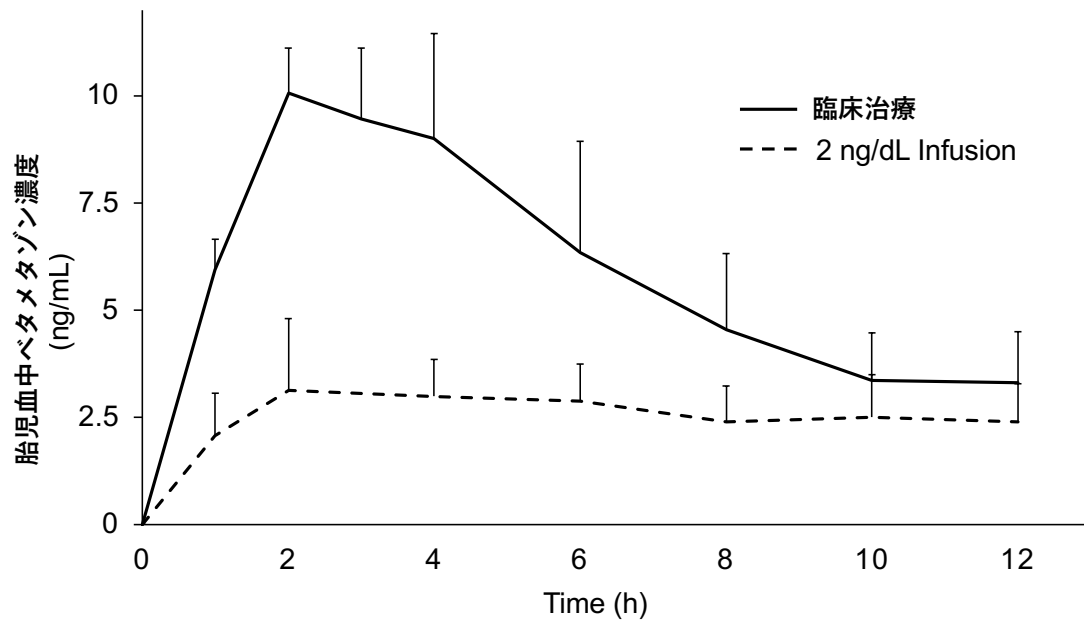
表 1

治療各群	N	分娩日数(日)	出生体重 (kg)	性別 (オス/メス)	臍帯動脈pH
Beta-P Infusion D7	6	120.7±0.3	2.6±0.2	2/4	7.3±0.0
Beta-P Infusion D2	6	122.5±0.2	2.5±0.4	2/4	7.3±0.0
臨床治療D7	6	122.5±0.7	2.8±0.3	2/4	7.3±0.0
Control D7	6	121.2±0.5	2.5±0.3	4/2	7.3±0.1

表 2

順位	Category	Term	Gene	P-Value	Beniamini
UP-REGULATED (Fold Change \geq 1.5)					
1	GOTERM_CC_DIRECT	mitochondrion	40	5.50E-14	6.80E-12
2	KEGG_PATHWAY	Carbon metabolism	17	3.20E-12	5.40E-10
3	KEGG_PATHWAY	Metabolic pathways	48	1.90E-11	1.60E-09
4	KEGG_PATHWAY	Biosynthesis of antibiotics	17	4.70E-08	2.60E-06
5	KEGG_PATHWAY	Biosynthesis of amino acids	9	6.00E-06	2.50E-04
6	KEGG_PATHWAY	Fatty acid degradation	7	1.60E-05	5.40E-04
7	KEGG_PATHWAY	Fatty acid metabolism	7	5.90E-05	1.70E-03
8	KEGG_PATHWAY	2-Oxocarboxylic acid metabolism	5	7.20E-05	1.70E-03
9	KEGG_PATHWAY	Parkinson's disease	10	1.60E-04	3.40E-03
10	KEGG_PATHWAY	Alzheimer's disease	10	5.50E-04	1.00E-02
11	KEGG_PATHWAY	Oxidative phosphorylation	9	6.50E-04	1.10E-02
12	GOTERM_CC_DIRECT	peroxisome	6	2.90E-04	1.70E-02
13	KEGG_PATHWAY	Citrate cycle (TCA cycle)	5	1.20E-03	1.80E-02
14	KEGG_PATHWAY	Huntington's disease	10	1.50E-03	2.10E-02
15	KEGG_PATHWAY	PPAR signaling pathway	6	2.70E-03	3.50E-02
DOWN-REGULATED (Fold Change \leq -1.5)					
1	KEGG_PATHWAY	Systemic lupus erythematosus	47	7.40E-36	1.40E-33
2	KEGG_PATHWAY	Alcoholism	37	7.70E-22	7.50E-20
3	UP_KEYWORDS	nucleosome	19	1.90E-16	3.40E-14
4	UP_KEYWORDS	Chromosome	21	1.20E-15	9.30E-14
5	KEGG_PATHWAY	Viral carcinogenesis	33	1.00E-14	6.70E-13
6	GOTERM_CC_DIRECT	nucleosome	20	9.50E-15	2.40E-12
7	UP_KEYWORDS	DNA-binding	45	5.10E-13	2.60E-11
8	KEGG_PATHWAY	Cell cycle	24	7.90E-13	3.90E-11
9	INTERPRO	Histone-fold	19	6.00E-13	2.40E-10
10	INTERPRO	Histone core	16	5.70E-13	4.60E-10
11	GOTERM_MF_DIRECT	DNA binding	41	1.80E-10	4.70E-08
12	GOTERM_CC_DIRECT	midbody	17	1.40E-09	1.80E-07
13	UP_KEYWORDS	Nucleus	48	7.40E-09	2.80E-07
14	GOTERM_CC_DIRECT	nucleus	91	2.20E-07	1.80E-05
15	INTERPRO	Histone H2A	8	2.50E-07	6.70E-05
16	INTERPRO	Histone H2B	8	2.50E-07	6.70E-05
17	SMART	H2A	8	1.50E-06	3.30E-04
18	SMART	H2B	8	1.50E-06	3.30E-04
19	GOTERM_CC_DIRECT	spindle pole	11	5.40E-06	3.30E-04
20	KEGG_PATHWAY	Staphylococcus aureus infection	11	2.60E-05	1.00E-03
21	GOTERM_CC_DIRECT	spindle microtubule	7	4.50E-05	2.20E-03
22	UP_KEYWORDS	Signal	87	8.40E-05	2.60E-03
23	GOTERM_CC_DIRECT	kinetochore	9	7.90E-05	2.80E-03
24	GOTERM_CC_DIRECT	centrosome	22	1.10E-04	2.90E-03
25	GOTERM_CC_DIRECT	cytoplasm	88	7.20E-05	3.00E-03
26	GOTERM_CC_DIRECT	condensed nuclear chromosome outer kinetochore	4	1.00E-04	3.20E-03
27	KEGG_PATHWAY	Leishmaniasis	11	1.10E-04	3.60E-03
28	GOTERM_BP_DIRECT	regulation of attachment of spindle microtubules to kinetochore	5	5.50E-06	4.30E-03
29	INTERPRO	EGF-like calcium-binding	13	2.20E-05	4.40E-03
30	UP_KEYWORDS	EGF-like domain	12	2.00E-04	5.00E-03

図 1



2018 Kemp.ら The efficacy of antenatal steroid therapy is dependent on the duration of low-concentration fetal exposure: evidence from a sheep model of pregnancy より改変。

図 2

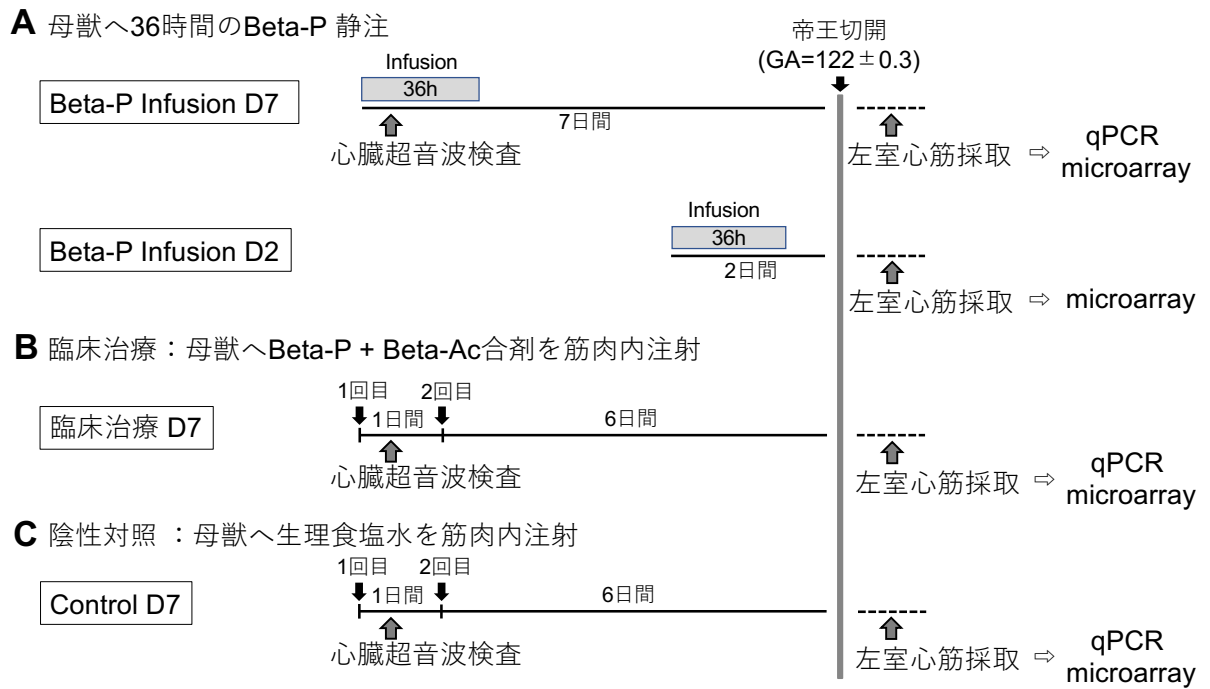


图 3

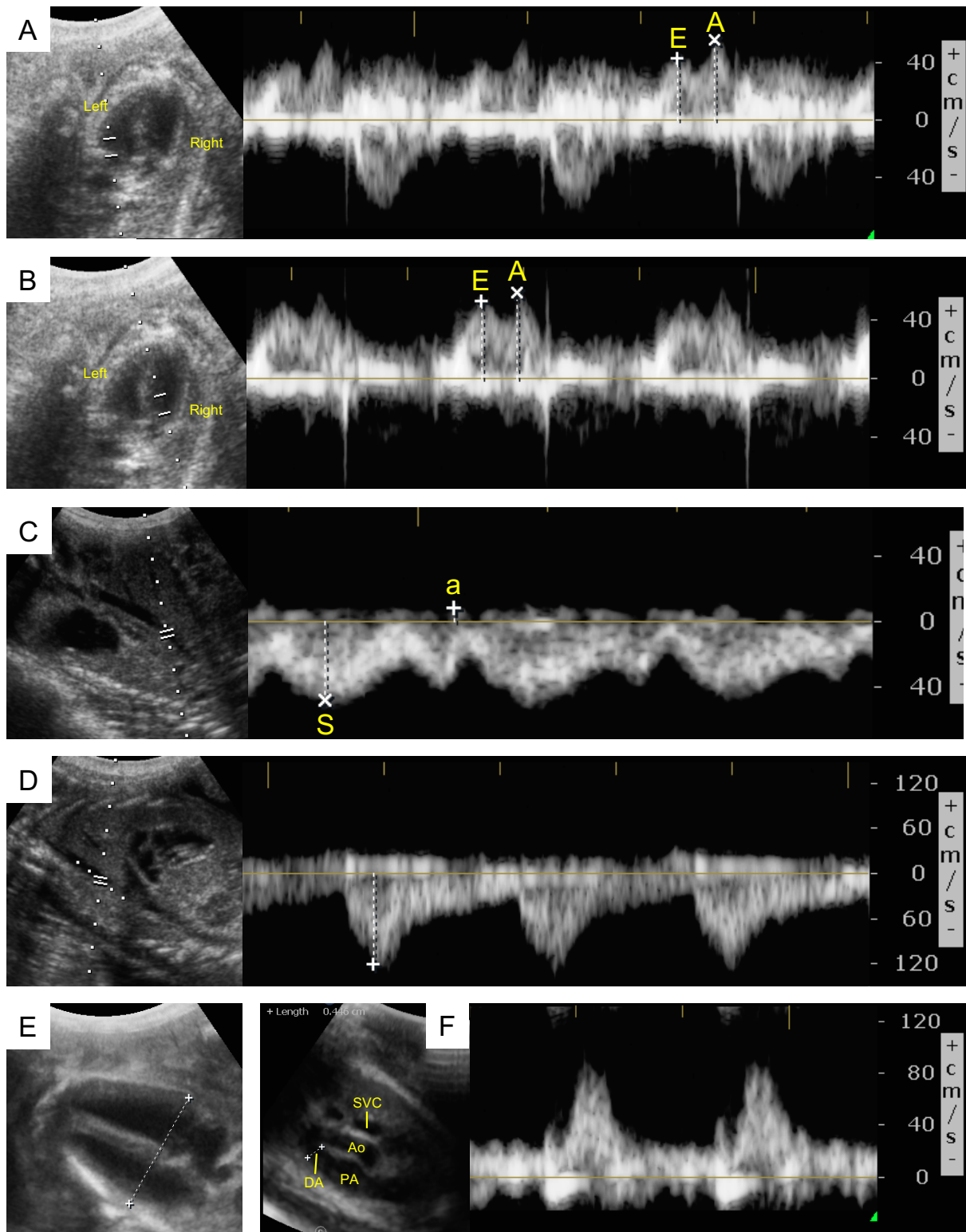


圖 4

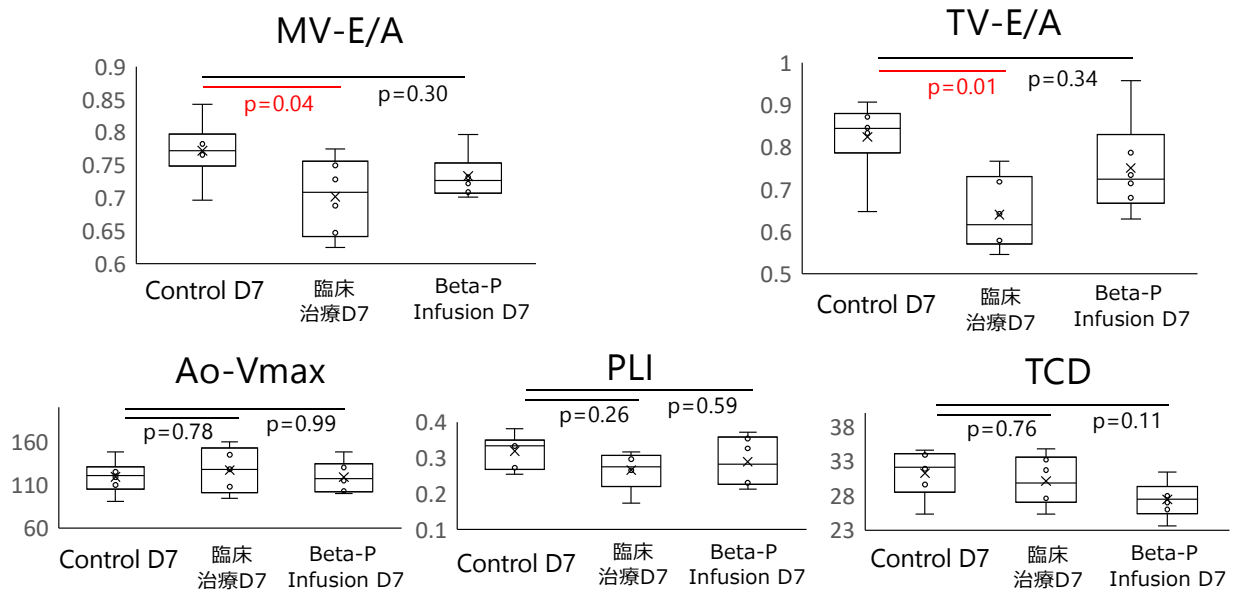


圖 5

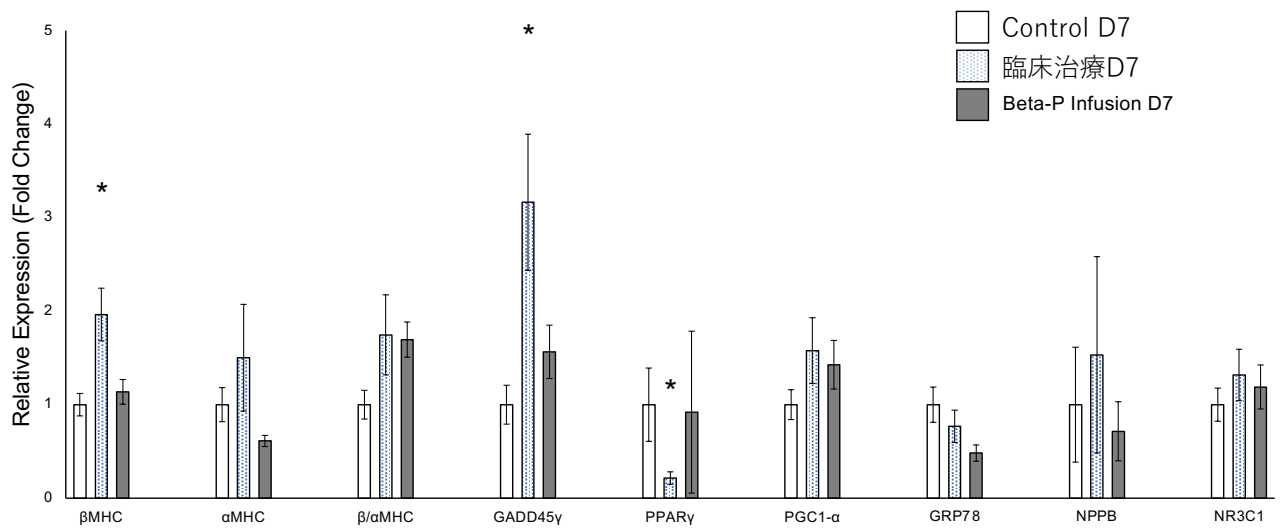
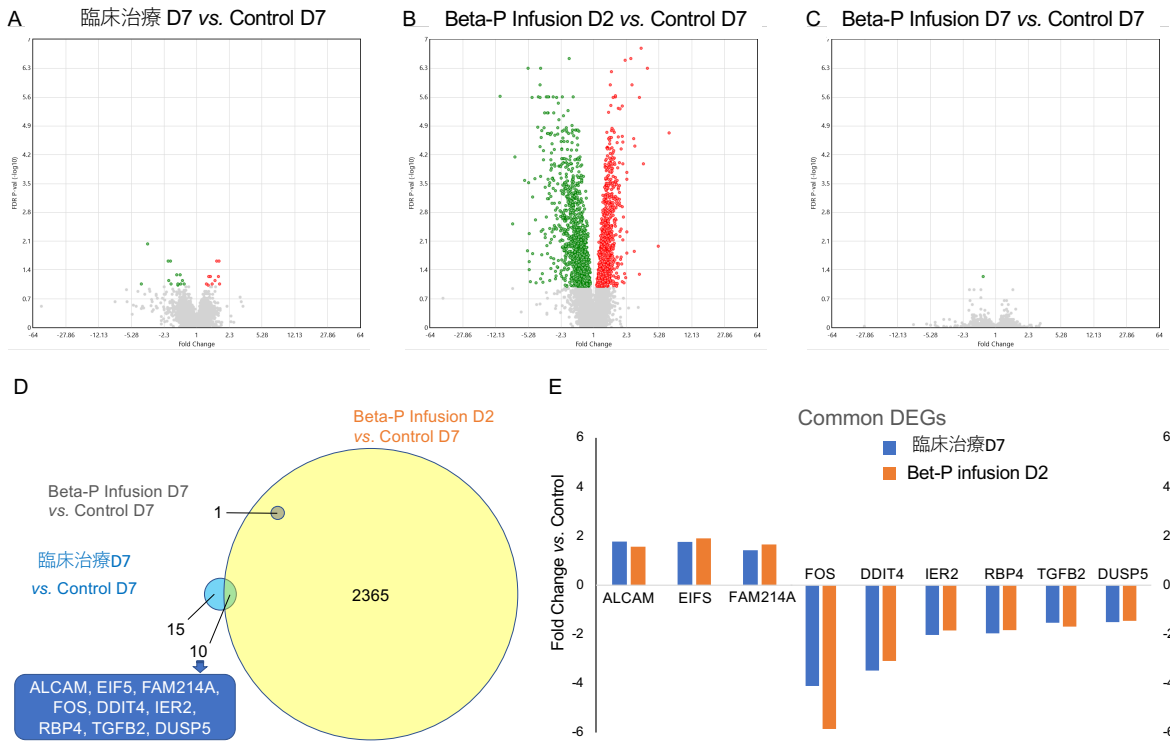


図 6



XI 図表の説明

表 1. 各群の特徴

対照群および治療群の新生仔データ。値は平均値±1 標準誤差として表している。

表 2 : DAVID バイオインフォマティクスリソースを用いた特異的に調節された遺伝子の機能注解表 Beta-P Infusion D2 群の上位 30 位

Beta-P Infusion D2 群で特異的に調節されている遺伝子を DAVID バイオインフォマティクスリソースにアップロードし、機能注釈を行った。表は、DAVID によって同定されたアップまたはダウンレギュレーションの各トップ 30 のカテゴリーを示している。

図 1 : ステロイド治療群の血中濃度の推移 (過去の文献より改変)

本研究における治療法を説明するために、当研究室の以前の薬物動態学研究を引用・改訂した。0.25mg/kg 臨床治療量の筋肉内注射を受けた母獣の胎仔血中濃度 (実線)。胎仔血漿中のベタメタゾン濃度を 2 ng/mL に 12 時間維持するよう、ベタメタゾンリン酸エステルを静脈注射を受けた母獣の胎仔血中濃度 (破線)。データポイントはグループの平均値を示す。エラーバーは 1 標準偏差を表す。

図2：研究群の模式図

A, 2 群の妊娠母獣にカテーテルを留置し、低用量のベタメタゾンリン酸エステルを 36 時間点滴静注した後、投与開始から 2 日後または 7 日後に未熟新生仔を娩出させた。B, 無作為に割り付けられた 1 群の妊娠母獣を、0.25 mg/kg のベタメタゾン酢酸エステル・ベタメタゾンリン酸エステルナトリウムの合剤を 24 時間間隔で筋肉内注射し、治療開始 7 日後に未熟新生仔を分娩させた。C、生理食塩水を筋肉内注射した母獣を対照とした。

図3：胎仔の心臓超音波検査の代表的な画像

四腔断面像 (A,B,E) 、矢状断 (C,D) 、 3 vessel trachea 像 (F) を示す断面図。

A と B、拡張期における僧帽弁 (A) と三尖弁 (B) を横断するドプラ波形。二相性ドプラ波形では、E は拡張早期最大速度に対応し、A は心房収縮に一致する拡張末期最大速度に対応している。E/A 比は、房室弁全体のドプラ波形の定量化に用いられる。C、下大静脈のドプラ波形。S は収縮期最大速度、a は心房収縮時の逆流波を表す。a/S 比を計算して preload Index を求めた。D、横隔膜レベルでの下行大動脈 (dAo) のドプラ波形。最大収縮期血流速度 (Vmax) を測定した。E、心外膜上の僧帽弁の付着部から心外膜上の三尖弁の付着部までの距離を四腔断面で測定し、総心横径 (TCD) とした。F、動脈管のドプラ波形。SVC ; 上大静脈、Ao ; 大動脈、PA ; 肺動脈、TCD : Total cardiac dimension

図4：超音波による胎仔心機能の差異

臨床治療（0.25mg/kg ベタメタゾン酢酸エステル・ベタメタゾンリン酸エステルの筋肉内投与、24時間ごとに2回）により、E/A比はともに低下した。胎仔血漿中のベタメタゾン濃度が2 ng/mlになるようにベタメタゾンリン酸エステル（Beta-P）を36時間点滴しても統計学的に有意な差は認められなかった。A、僧帽弁 E/A 比。 B、三尖弁 E/A 比。 C、下大静脈の preload index。 D、下行大動脈の最大収縮期血流速度（Vmax）。 E、総心横径。*、 $p < 0.05$ vs. Control D7 群。

図5：mRNAの特異的な発現変化（心筋細胞）

NR3C1（GR）および心臓肥大マーカー遺伝子； β MHC、 α MHC、GADD45 γ 、PPAR γ 、PGC1- α 、GRP78、およびNPPBのmRNAレベルをリアルタイムPCRにより決定し、リボソーム18sにより正規化した。GR；グルココルチコイド受容体、Beta-P；ベタメタゾンリン酸エステル、*； $p < 0.05$ vs. Control D7 群

図6：マイクロアレイデータ解析

ABC、各ステロイド治療群 vs. Control D7 群のボルケーノプロット（|Fold change| ≥ 1.5 、 $p < 0.05$ ；Benjamini-Hochberg 多重検定補正）。D、Beta-P Infusion D2 群、Beta-P Infusion D7 群、臨床治療 D7 群における特異的発現遺伝子の数を示すベン図。Beta-P Infusion D2 群と臨床治療 D7 群との間の10個の共通な特異的発

現遺伝子 (DEG) から 9 個を下記図 5D および図 5E に示す。E、Beta-P Infusion D2 群 vs. Control D7 群、および臨床治療 D7 群 vs. Control D7 群の 9 個の DEGs の相対的な Fold change を示す。