

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20127

研究課題名(和文) ラット脳性麻痺モデルを使ったプロゲステロンの脳障害回避効果の検証と作用機序の解析

研究課題名(英文) Progesterone is a new therapeutic agent for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy.

研究代表者

河原井 麗正 (KAWARAI, Yoshimasa)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90634957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：新生児低酸素性虚血性脳症(HIE)は運動発達障害の原因になる。本研究はモデルラットでプロゲステロン(P4)による治療効果を示した。

妊娠ラットの子宮動脈を一時的挟鉗し、自然分娩でモデルラットを得た。各群にP4、プロゲステン製剤メドロキシプロゲステロンアセテート(MPA)、P4の代謝産物でGABA受容体のアロステリック・アクティベータであるアロプレグナノロン(Allo)を投与した。モデルラットは運動障害と脳組織損傷を示し、P4とAlloはこれらを回復させたがMPAには効果がなかった。P4がAlloに代謝され、GABA受容体を介して脳症を治癒したと推測した。

研究成果の概要(英文)：Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy (HIE) is a general term of brain damages that lead to behavioral and learning disorders. Recently, some studies revealed progesterone (P4) has neuroprotective effects due to the action of allopregnanolone (Allo), which is a metabolite of P4, to GABA receptors. In this study the therapeutic effect for the brain damage of P4 was investigated using a rat HIE model, which was suffered by transient uterine artery ligation. After birth, P4, medroxyprogesterone acetate (MPA), or Allo were administered to each group. Brain damages were evaluated by the histological analyses and the motor coordinate test (the rotarod test). The impaired latency of the rotarod test in HIE models were restored by P4 and Allo, but not MPA. Histologically, brain lesions were recognized as decreased neurons and so on. P4 and Allo also restored these histological lesions. Collectively, our study indicates that P4 can restore the brain damages of HIE via GABA receptors.

研究分野：周産期

キーワード：低酸素性脳虚血性脳症 脳神経保護 新生児 周産期 プロゲステロン GABA受容体

1. 研究開始当初の背景

周産期での低酸素侵襲は、新生児の低酸素性虚血性脳症 (HIE) を引き起こし、再灌流障害や浮腫、脳圧上昇、自己調節能の障害の原因となる。これらの脳障害が神経発達に影響を及ぼし、癲癇や行動障害、学習障害、脳性麻痺を発症させ、それらは完治することなく終生続く。特に、胎児発育不全による低出生体重児、早産児が HIE のハイリスクとなる。HIE の治療法に低体温療法があるが、対象が在胎 36 週以降の新生児であることなど、適応が限られ、早産児の HIE に対する治療法は確立していない。

プロゲステロンは非妊娠時の 100 倍ほどの血中濃度となり、子宮収縮の抑制など妊娠維持に寄与し、周産期では重要なステロイドホルモンである。また、プロゲステロンは脳外傷や脳虚血、脊髄損傷などの神経学的疾患動物モデルの予後を改善したという報告がある。そこで我々は、新生児 HIE ラットモデルを用いて、プロゲステロンの脳障害回避効果を検討した。

2. 研究の目的

ラット HIE モデルを用いて、プロゲステロンの脳障害の回避効果を検討した。

3. 研究の方法

妊娠 18 日目に麻酔下で開腹し、妊娠子宮動脈を 30 分間血管クリップで遮断し (HIE 手術)、その後自然経膈分娩に至った新生児ラットを HIE モデルラットとした。また、コントロールラット (Sham 手術) として、開腹をして 30 分間そのまま麻酔下に観察をしていた妊娠ラットから、自然分娩された新生児を用いた。出生 1 日目より、プロゲステロン (0.10 mg/day または 0.01 mg/day)、メドロキシプロゲステロンアセテート (MPA、0.12 mg/day)、アロプレグナノロン (0.10 mg/day) もしくはそれらの溶媒であるセサミオイルを生後 9 日目まで皮下投与し、HIE ラットと Sham ラット、各々の薬物投与群を比較検討した。

HIE 手術による胎児への負荷を生仔獲得率 (妊娠胎児数に対する生仔数) や体重で評価した。

脳障害評価は 50 日齢でのロタロッド試験、0、5、9、30、50 日齢での脳組織学的検索で行った。

統計学的処理について、ラットの体重や免疫染色陽性細胞の細胞数比較については、2 群間ではウィルコクソンの順位和検定、3 群以上はスティーールドウワスの多重比較検定を用いた。ロタロッド試験では回転シリンダー上に止まることが出来た時間 (秒) を『生存時間』(T) と見なして、カプランマイヤー法で評価した。いずれも、p 値が 0.05 未満で

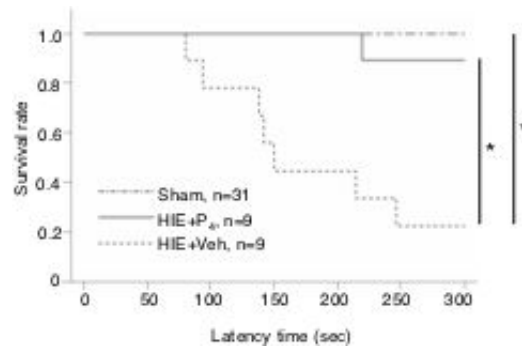
有意差ありと判定した。

4. 研究成果

< 結果 >

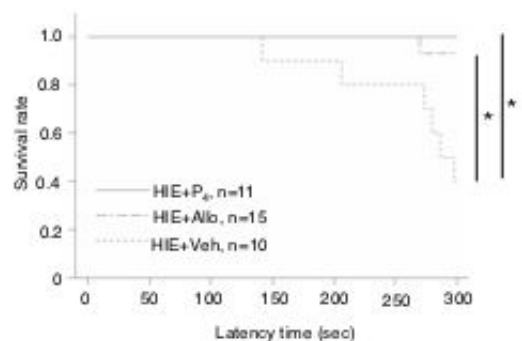
妊娠 18 日目の HIE 手術による低酸素性虚血性ストレスにより、生仔獲得率は有意に減少した。また、1 日齢の HIE ラットは Sham 手術を受けた母獣から出生したラット (Sham ラット) よりも明らかに低体重であった。その有意差は 50 日齢でも観察された。

50 日齢でのロタロッド試験では、Sham ラットに対しプロゲステロンは毒性も付加的効果も示さなかった。HIE ラットの T は有意に短縮したが、プロゲステロン投与により、Sham ラットのレベルまで回復させた (ロタロッド検定、 $p < 0.001$) (図 1-1)。低濃度のプロゲステロンでも T の改善がみられた。プロゲステロンの代謝産物であるアロプレグナノロンでは T は回復したが (図 1-2)、プロゲステロン受容体作動薬で人工合成物の MPA では T の改善を示さなかった (図 1-3)。



(図 1-1) ロタロッド試験

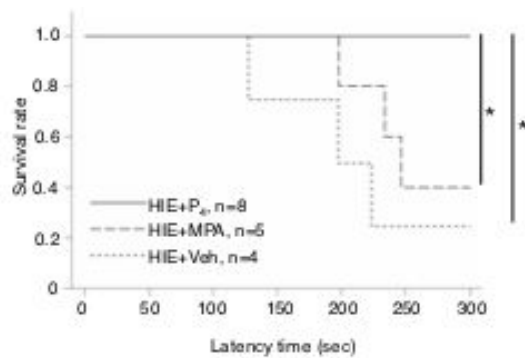
HIE ラットにプロゲステロンが投与された群 (HIE+P₄) は、Sham ラットと同等レベルまで、回転シリンダー上にとどまっていた時間 (Latency time) が長かった。HIE ラットにセサミオイルが投与された群 (HIE+Veh) は、回転シリンダーに長くともどまることができず、試験開始早期に落下した。



(図 1-2) ロタロッド試験

HIE ラットにアロプレグナノロンが投与された群 (HIE+Allo) も、HIE にプロゲステロンが投与された群 (HIE+P₄) と同等レベルまで、回転シリンダー上にとどまっていた時間

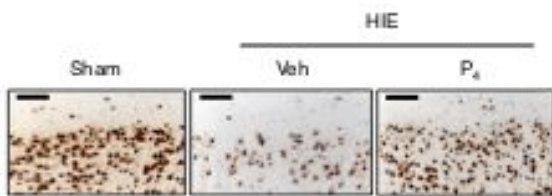
(Latency time) が長かった。



(図 1-3) ロタロッド試験

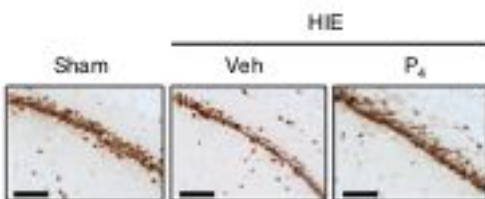
HIE ラットに MPA が投与された群 (HIE+MPA) は、回転シリンダー上に長くともどまることができず、HIE にセサミオイルが投与された群 (HIE+Veh) と同様に、早期に回転シリンダーから落下した。

組織学的評価では、HIE ラットで大脳皮質・海馬 CA1 領域の神経細胞数と、脳梁のオリゴデンドロサイト数の減少、大脳皮質の第 2-3 層の層構造に乱れが認められた (図 2-1, 図 2-2, 図 2-3)。



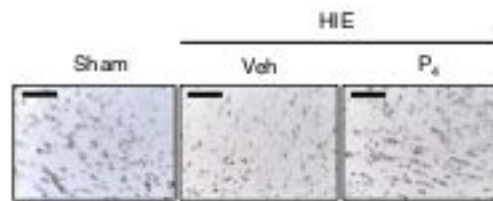
(図 2-1) 大脳皮質の神経細胞

HIE ラットでプロゲステロンを投与されたラット (P₄) は Sham ラットと同様のレベルまで神経細胞数が回復していた。HIE ラットでセサミオイルを投与されたラット (Veh) では、神経細胞数が明らかに少なかった。



(図 2-2) 海馬 CA1 領域の神経細胞

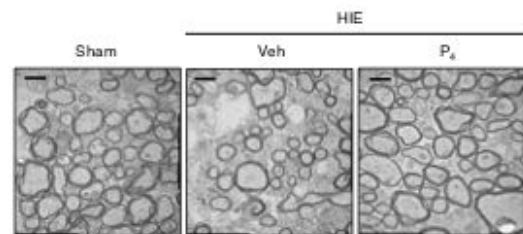
HIE ラットでプロゲステロンを投与されたラット (P₄) は Sham ラットと同様のレベルまで神経細胞数が回復し、CA1 領域の厚みが保たれていた。HIE ラットでセサミオイルを投与されたラット (Veh) では、神経細胞数が明らかに少なく、CA1 領域は菲薄していた。



(図 2-3) 脳梁のオリゴデンドロサイト

HIE ラットでプロゲステロンを投与されたラット (P₄) は Sham ラットと同様のレベルまでオリゴデンドロサイト数が回復していた。HIE ラットでセサミオイルを投与されたラット (Veh) では、オリゴデンドロサイト数が明らかに少なかった。

また脳梁のミエリン鞘も菲薄化していた (図 3)。



(図 3) 脳梁のミエリン鞘

電子顕微鏡で観察した。HIE ラットでプロゲステロンを投与されたラット (P₄) は Sham ラットと同様のレベルまでミエリン鞘の厚さは回復していた。また、軸索の数も多かった。しかしながら、HIE ラットでセサミオイルを投与されたラット (Veh) では、ミエリン鞘は菲薄し、軸索も減少していた。

このような HIE ラットにみられた脳障害所見は出生直後より観察され、50 日齢でもこれらの所見は引き続き確認された。プロゲステロンとアロプレグナノロン投与群では、これらの神経細胞やオリゴデンドロサイト数、ミエリン鞘厚を Sham ラットと同等のレベルまで回復させ、特にオリゴデンドロサイト数は、プロゲステロン投与によって比較的早期に回復した。

中枢神経の免疫担当細胞として知られるミクログリアについては、HIE 手術により有意差はないが、総数の減少傾向が認められ、さらに静止型の減少が認められた。これはプロゲステロン投与により変化が認められなかった。

< 考察 >

今までに、低酸素性虚血性脳障害モデルラットは数多くの種類が作成されている。代表的なものに、頸動脈結紮モデルがあり、多くは 7 日齢で頸動脈を結紮しモデルを作成する。このモデルは長期生存が難しいので、数日後

に脳を摘出し組織学的評価を受けることになる。本研究では、胎児期での一過性の子宮動脈遮断モデルを採用した。この方法は、自ら哺乳でき自活できる程度の、軽症から中等度の新生児 HIE を発症させ、長期生存が可能である。したがって、本研究は、HIE ラットに対するプロゲステロン投与の遠隔期での効果を評価した、初の実験である。

本研究では、低濃度のプロゲステロン (0.01 mg/body) でも脳機能の回復を示した。この濃度は、ヒトで 0.123-0.5 mg/kg/day に相当し、ヒトでの臨床応用に十分活用できる濃度である。

プロゲステロン代謝産物であるアロプレグナノロンは GABA_A 受容体のアロステリック・アクティベータと言われている。プロゲステロン受容体アゴニストである MPA の効果が乏しいことから、プロゲステロンによる脳障害の改善は、GABA_A 受容体を介する効果と推測された。実際、オリゴデンドロサイトの前駆体には GABA_A 受容体があり、それはオリゴデンドロサイトの分化や増殖に働き、髄鞘形成不全や小脳発達の崩壊を抑制する。本研究の結果から、プロゲステロンもしくはアロプレグナノロンは、オリゴデンドロサイト前駆体の GABA_A 受容体に働きかけてオリゴデンドロサイトの分化や増殖を促し、オリゴデンドロサイトはミエリンに働きかけて神経を保護したと推測された。また、ミクログリアは HIE 手術により活動型の増加が認められたが、プロゲステロン投与によりその数の変化はなく、抗炎症作用は認められなかった。

髄鞘形成の時期について、ラットでは生後より、ヒトでは在胎 32 週頃から始まる。本実験では、プロゲステロンをラットの 1 日齢から 9 日齢まで投与したが、それはヒトの早産時期に相当する。したがって、プロゲステロンはヒト早産児の髄鞘形成を促進する可能性を示した。

< 結論 >

本研究は、プロゲステロンが新生児 HIE モデルラットの脳機能を改善させたことを示した。その作用はオリゴデンドロサイト上の GABA_A 受容体を介する作用であることを示唆した。

低酸素性虚血ストレスによる脳障害は軽度な場合でも、注意欠陥多動症や自閉症など行動発達障害等の発症と関連が示唆されている。その傾向は早産児に強く認められる。早産児や、出生時の低酸素性虚血ストレスに暴露された新生児への、出生直後からのプロゲステロン投与は、それらの発症を予防できる可能性がある。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

(1) Yoshimasa Kawarai, Hiroshi Ishikawa, Hirokazu Tanaka and Makio Shozu. Brain damage-preventive effects of progesterone in a cerebral palsy rat model. 68th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology. 東京国際フォーラム (東京都・千代田区). 2016 年 4 月 21 日-24 日.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

河原井 麗正 (KAWARAI, Yoshimasa)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号 : 90634957