

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10169

研究課題名（和文）胎生期のsubplate neuron損傷が脳の成長発達に与える影響の解析

研究課題名（英文）Potential role of subplate neuronal damage on the fetal brain development

研究代表者

埴田 卓志（HANITA, TAKUSHI）

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：30400360

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：サブプレート層は胎児期の脳皮質と皮質下白質の境界に存在し、皮質形成に重要な役割を果たしているが、この層に含まれる神経細胞群（サブプレート神経細胞）は炎症や酸化ストレスに対して脆弱であり、胎児期のサブプレート損傷は将来の皮質形成や脳回の発達抑制を引き起こす可能性が高い。本研究ではヒツジ胎仔における脳白質損傷モデルを用いて胎仔脳のサブプレート層が同定できることを確認した。しかしながら、MRI画像のコントラストの問題で定量的評価は行えなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の周産期医学の進歩に伴って、極低出生体重児に認められる脳室内出血や脳白質損傷などの明らかな組織破壊性の中枢神経合併症は減少している。にもかかわらず、脳性麻痺や知的障害の発生率に明らかな改善は認められない。さらに、学童期以降に顕在化する発達障害も大きな問題と認識されるようになった。これらの極低出生体重児に発生する中枢神経合併症の責任病変としてsubplate損傷や皮質形成の変容などが注目されている。本研究の進展により、周産期のストレスがsubplateや皮質形成に与える影響を解析することは、極低出生体重児の中枢神経合併症を予防する治療法開発への礎となる。

研究成果の概要（英文）：Subplate layer is located between cerebral cortex and subcortical white matter in fetal life. Since the subplate neurons are vulnerable against inflammation and oxidative stress, subplate injury in the developing fetal brain might cause abnormal cortical development or disturbed gyral formation. Using our established model of cerebral white matter injury in the ovine fetus, we could determine the subplate layer in the MRI. Since the contrast of the MRI was not strong enough, however, we could not perform quantitative measurement of the brain development in the current research period.

研究分野：新生児学

キーワード：subplate 脳回形成 胎児 MRI

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

周産期医療の飛躍的な発展により、極低出生体重児 (出生体重<1,500 g) の救命率は過去 20 年間で目覚ましい改善を見せている。しかし、生存率の上昇にも関わらずその 5~10%には脳性麻痺が認められ、10~20%では学童期に発達障害を指摘されるなど、中枢神経系合併症の罹患率には十分な改善が見られない¹⁾。したがって、高度に発達した現代の周産期医療においてさえ、発達段階にある胎児早産児の脳を障害から守ることは喫緊の課題である。

極低出生体重児における中枢神経系合併症の病像は近年大きな変化を遂げてきた。1990 年代に注目された脳室内出血や嚢胞性脳白質損傷などの組織破壊性病変は母胎管理ならびに新生児集中治療の発達に伴って著しく減少した。その一方で、核磁気共鳴像 (MRI) を用いた詳細な画像解析の導入によって、びまん性脳白質損傷、脳灰白質容量の減少、脳回形成異常など、明らかな組織破壊を伴わず脳の構造的発達を変容させる病変が臨床現場で徐々に認識され始めている¹⁾。さらに、学童期に発達障害 (認知障害、自閉傾向、注意欠陥多動、学習障害) のみを指摘される早産児の存在が注目されている²⁾。こうした発達障害を従来の組織破壊性病変に基づいて説明することは難しく、上述した脳構造の変容、すなわち大脳皮質の構造的な発達異常が関連している可能性が高い。早産児は正期産児に比較して、脳回形成が不良で脳表面積が少なく、これが発達障害に関連する可能性が指摘されているからである³⁾。しかし、発達過程のどの時期にどの環境要因がこうした変化を引き起こすのか、その詳細なメカニズムは未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、胎生期の大脳皮質と皮質下白質の境界に存在し皮質形成に重要な役割を果たしている subplate 層に注目する⁴⁾。この層に含まれる神経細胞群は炎症や酸化ストレスに対して脆弱とされているばかりか、位置的に脳白質損傷の影響を受けやすい。しかも脳皮質と基底核群を連結する神経細胞に対する重要なガイド役を担っているため、これが障害されれば脳皮質への入力線維が減少して皮質構造の形成や脳回の発達が抑制される可能性が高いからである。われわれがヒツジ胎児を用いて開発した炎症もしくは虚血による脳白質損傷モデルを応用して⁵⁾、炎症や虚血が subplate neuron を損傷し、脳構造の発達変容を示す病変が誘導されるかどうかを組織病理像ならびに MRI に基づいて解析する。検証する仮説は、(1) 胎生期の炎症もしくは虚血性ストレスは皮質下の subplate neuron 数を減少させる、(2) subplate neuron 数の減少は脳皮質の容量と表面積を減少させ脳回脳溝の形成を変化させる、の二つである。

3. 研究の方法

東北大学動物実験委員会の承認のもと、東北大学医学部附属動物実験施設において平成 29 年~31 年度に実施された。牧場から購入した妊娠期間の確定したサフォーク種の妊娠ヒツジを動物実験施設に収容し、専用の手術設備と母獣胎児の集中監視システムを用いて慢性実験系を作成した。

妊娠 95 - 100 日 (満期 147 日) に全身麻酔下に母獣を開腹して子宮を切開し、胎児の腹部大動脈、上下大静脈、羊水腔内にカテーテルを留置した後、胎児を子宮内に戻して閉腹した。

手術後 48 時間を経て全ての胎児を、炎症群 (n = 5)、対照群 (n = 4) に分けて負荷実験を行った。炎症群では胎児に顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 50 µg/日を 5 日間連続で静注し、その 3 日目にエンドトキシン (LPS) 5 mg を羊水腔内投与して強力な子宮内炎症を誘導した。対照群では炎症群と同様のプロトコールで生理食塩水を投与した。

胎児の手術後 10 日を経て、胎児をペントバルビタールの過量投与によって安楽死させた。平成 29 年度は、胎児の安楽死ののち直ちに脳 MRI を撮影 (静磁場強度 7.0 テスラの MRI 装置を用い、T1/T2 強調像を 0.4 mm スライスで撮影) し、その後中枢神経系を 10%ホルマリンで灌流固定した後に摘出した。しかしながら、還流固定前の MRI では撮影にかけられる時間が短く、画像のコントラストが不十分で解析に不相当であった。平成 30 年~31 年度は実験方法を変更し、胎児の安楽死後直ちに中枢神経系の還流固定を行い、その後脱ホルマリン化して MRI を撮影した。

4. 研究成果

実験群の基本情報を以下の表に示した。

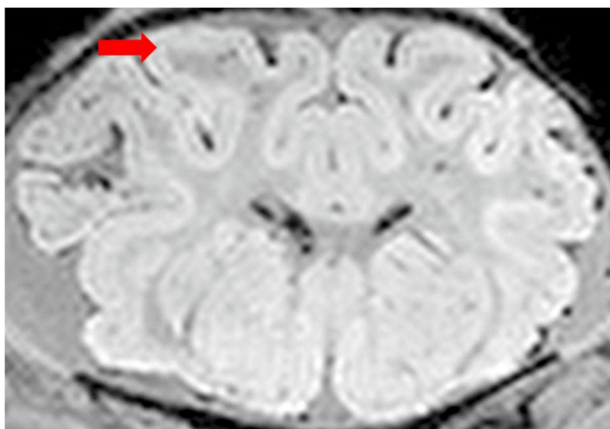
表. 実験群の基本情報

	雄/雌	手術日齢 (日)	剖検日齢 (日)	剖検時体重 (kg)
炎症群 (n = 5)	1 / 4	96 ± 2.2	106 ± 2.2	1.34 ± 0.12
対照群 (n = 4)	2 / 2	95 ± 0.0	105 ± 0.0	1.31 ± 0.13

数値データは「平均 ± 標準偏差」で表した。

胎仔の性別，手術日齢，剖検日齢，剖検時体重で両群間に有意差は認められなかった．また，LPS 群において実験負荷試験中に著しい低酸素を認めたものの，著しい徐脈や低血圧は認めず実験は遂行された．

(図)



図に還流固定前に撮影された MRI の T1 強調像を示す．皮質の高信号層と白質の低信号層の間に高信号の層が検出され，解剖学的構造から subplate 層を示していると考えられた．

しかしながら，この撮影条件では十分に subplate 層の厚さや大脳皮質容量や表面積を定量的に解析して変化をとらえるには不十分と考え，胎仔の安楽死後，直ちに中枢神経を還流固定し，その後に脱ホルマリン化して MRI を撮影することを試みた．しかしながら，新しい MRI 撮影条件の確立が遅れたため，本研究期間では MRI を用いた subplate 層，ならびに大脳皮質容量や脳回

の定量的評価は行えなかった．

<参考文献>

- 1) Kono Y, Mishina J, Yonemoto N, Kusuda S, Fujimura M. Outcomes of very-low-birthweight infants at 3 years of age born in 2003-2004 in Japan. *Pediatr Int* 2011; 53: 1051-1058.
- 2) Wong HS, Huertas-Ceballos A, Cowan FM, Modi N; Medicines for neonates investigator group. Evaluation of early childhood social-communication difficulties in children born preterm using the quantitative checklist for autism in toddlers. *J Pediatr* 2013 (ahead of print)
- 3) Skranes J, Lohaugen GC, Martinussen M, Hagerg A, Brubakk AM, Dale AM. Cortical surface area and IQ in very-low-birth-weight (VLBW) young adults. *Cortex* 2013; 49: 2264-2271.
- 4) Pogledic I, Kostovic I, Fallet-Bianco C, Adle-Biassette H, Gressens P, Verney C. Involvement of the subplate zone in preterm infants with periventricular white matter injury. *Brain Pathol* 2014; 24: 128-41.
- 5) Saito M, Matsuda T, Okuyama K, Kobayashi Y, Kitanishi R, Hanita T, Okamura K. Effect of intrauterine inflammation on fetal cerebral hemodynamics and white matter injury in chronically instrumented fetal sheep. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 200: 663.e1-663.e11.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	齋藤 昌利 (Saito Masatoshi) (00451584)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	
研究分担者	北西 龍太 (Kitanishi Ryuta) (20436116)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師 (11301)	
研究分担者	松田 直 (Matsuda Tadashi) (50361100)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師 (11301)	
研究分担者	渡邊 真平 (Watanabe Shimpei) (70509413)	東北大学・大学病院・助手 (11301)	