

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：34305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K10200

研究課題名(和文) 子宮内低灌流に起因する低出生体重児の脳神経障害の発症機序解明

研究課題名(英文) Mechanisms how low birthweight caused by intrauterine hypoperfusion leads to neurological problems

研究代表者

辻 雅弘 (Tsuji, Masahiro)

京都女子大学・家政学部・教授

研究者番号：80579467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本モデルラットは、子宮全体を軽度の持続的低灌流状態にすることによって低出生体重の仔を得る。これまでの研究によって、ヒトの低出生体重児と同様に多動を呈することを見出していたが(Ohshima et al., 2016)、本課題の研究によって自閉症スペクトラム障害と同様な社会性欠如を呈することが明らかになった(論文投稿準備中)。脳の組織評価や髄液・血液でのサイトカイン等の測定において、脳内炎症・全身性炎症を呈する傾向は認められたものの、顕著な炎症は認めなかった(論文投稿準備中)。今後詳細な検討による確認が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先進国の中で日本は最も低出生体重児の割合が多く、低出生体重児は高率に注意欠如多動性障害(ADHD)や自閉症スペクトラム障害を来す。それらの障害の原因は不明で治療法は限定的である。まずは症状を再現したモデル動物を開発し、次にそのモデル動物を用いて原因を解明することが治療法開発への正攻法である。本研究課題では、我々が独自に開発したモデル動物を用いてそれらの障害の原因解明に向けた検討を行った。

研究成果の概要(英文)：This model rat yields low birthweight pups caused by a mild intrauterine hypoperfusion. Our previous studies have shown that the rats exhibit hyperactivity, which may reproduce hyperactivities observed in a subset of human low birthweight infants (Ohshima et al., 2016). In this subject, we have found that the model rat exhibits lack of sociality, which may reproduce human infants with autism spectrum disorders (paper in preparation). Histological evaluation of the brain and the measurement of cytokines in cerebrospinal fluid and serum showed that the model rat present a mild, but no significant, intracerebral inflammation and systemic inflammation (paper in preparation).

研究分野：栄養学

キーワード：神経発達障害 低出生体重児

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、胎児発育不全 (FGR)・早産・低出生体重児の脳障害、すなわち、未熟脳に起因する脳障害が増加している。重症例は脳室周囲白質軟化症 (PVL) を呈し、脳性麻痺や精神遅滞を来す。一方、軽症例では脳画像検査で軽微な異常 (白質容量の軽度減少) を呈するのみであるが、一部の児は学童期に発達障害と総称される注意欠陥多動性障害 (ADHD) や自閉症スペクトラム障害等を呈する (Back, *Clin Perinatal* 2014)。特に発達障害児の増加が著しく、育児や教育における負担は甚大である。しかし早期診断法や予防法・治療法は開発されていない。その理由として、適切なモデル動物が存在せず、脳障害の病態が充分理解されていないことが挙げられる。同障害は脳の未熟性に脳循環不全や感染等が加わり引き起こされるとされているが詳細は不明である。

重度の子宮内虚血 (一過性完全虚血負荷) モデル動物は多数存在するが、軽度の子宮内慢性低灌流モデルは、フランス CNRS (国立科学研究センター) の Coq らのモデルしかなかった。それは妊娠ラットの子宮動脈 1 か所を結紮 (= 血流遮断) し、血流勾配によって一部の胎仔に低灌流負荷を与えるもので (Basiliou, *Dev Med Child Neurol* 2015)、再現性の低さ・個体差の大きさが難点である。

本申請者は日本学術振興会「特定国派遣事業」の支援を受けて Coq らの研究室に滞在し、彼らの系結紮モデルの改変・改良を行った。子宮を灌流する全ての動脈 (左右の子宮動脈と卵巣動脈の計 4 本) に微小金属コイルを巻き付け、臨床病態に即した穏やかな子宮内低灌流負荷を全ての胎仔にかけることによって、形態学にも行動学的にもヒトと同様な症状を呈するモデルラットの開発に成功した (Ohshima, *Sci Rep* 2016) (右図)。本モデルは早産でほぼ全ての新生仔が -2SD 以下の低出生体重となる。明確な行動障害を呈すると共に、軽度だが明確な形態・組織学的変化を来す。すなわち、新生児反射の獲得遅延や小児期における自発運動の変化 (多動等) を呈し、大脳白質・皮質容量の減少 (脳梁の菲薄化や脳室拡大) を来す (しかし PVL のような組織壊死等は伴わない)。

2. 研究の目的

上記モデルは本研究課題開始当時は開発に成功したところであり、大きな発展性を有していると同時に未検討の事項も多かった。下記の検討を行うことによって、軽度の子宮内低灌流が脳障害を引き起こす機序を、組織学・生化学・行動学的に明らかにすることを目的とした。具体的には下記の 2 項目を検討目的とした。

- 1) 思春期・成人期の行動障害、特に社会性行動の障害の有無・特徴を明らかにする。
- 2) 脳障害の病態を、組織学的・電気生理学的・生化学的・および各種イメージング手法を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

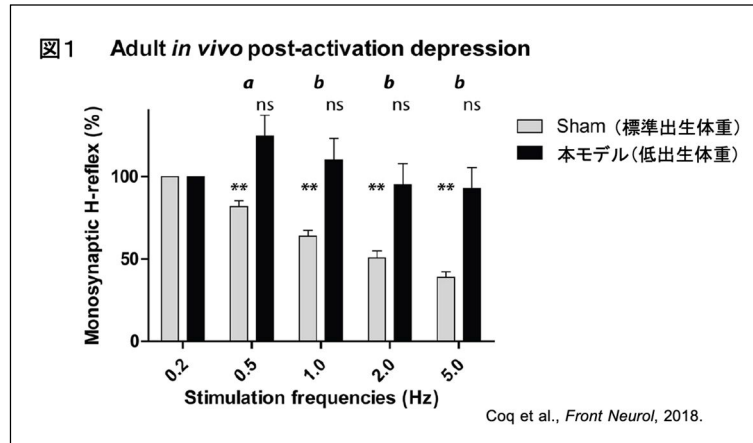
- I. <モデルラット作製>
妊娠 17 日齢 (通常の在胎日数は 23 日) (ヒト妊娠 20-25 週に相当) の Sprague-Dawley ラットを用いた。体温管理下・吸入麻酔下に、子宮動脈・卵巣動脈の根幹部にコイル (内径 0.24mm) を回して巻き付けた。
- II. <子宮内低灌流の評価>
モデル作製手術直前と直後に胎仔・胎盤の血流を Laser speckle 法によって評価した。
- III. <行動評価>
ヒトの思春期に相当する生後 4 週齢と成人期に相当する 7 週齢に以下の行動試験を順次実施し、子宮内低灌流が及ぼす影響を評価した。
評価項目: Open-field test (自発行動) 3-Chamber sociability test (社会性行動)。
- IV. <組織評価>
生後 8 週齢に脳を取り出し、免疫染色等によって組織障害を評価した。
- V. <生化学的評価>
別コホートをを用いて出生早期に血液と脳脊髄液を採取し、Interferon- γ や interleukin 1 などのサイトカイン濃度を測定した。
- VI. <電気生理学的評価>
さらに別なコホートをを用いて脊髄における反復電気刺激に対する monosynaptic Hoffmann reflex を評価した。これはフランス CNRS の J-Olivier Coq 上級研究員との共同研究としておこなった。

4. 研究成果

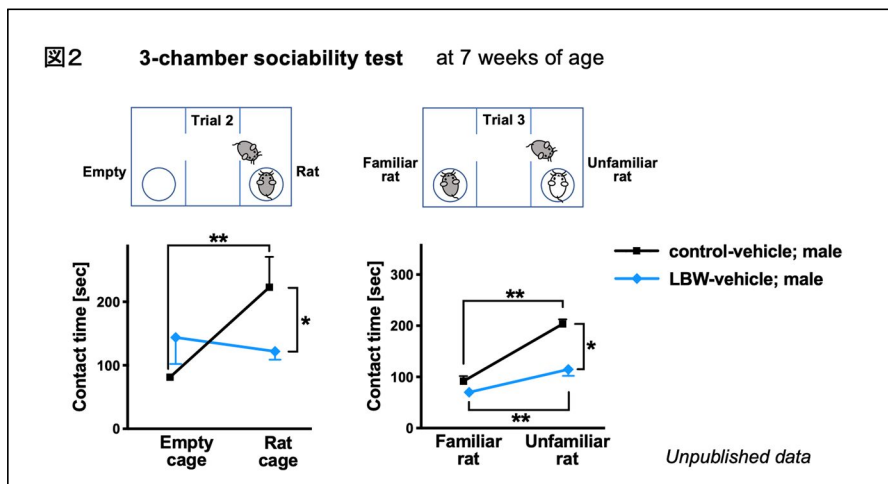
本モデルラットが広く使用されることを期待して、作製方法をビデオ論文として公表した (Tsuji, *J Vis Exp* 2018)。

子宮内低灌流負荷前後の子宮血流を Laser speckle 法で各胎仔毎に定量したところ、胎仔間での個体差を軽度認めるものの、大多数の胎仔においてはある程度均質な低灌流負荷がかかっていることが確認できた (Coq, *Front Neurol* 2018)。

sham 手術を受けた標準出生体重の個体で認める脊髄の反復電気刺激に対する monosynaptic Hoffmann reflex における post-active depression が、本モデルでは弱まっている、すなわち脊髄は反復刺激に対する過敏性を示すことを明らかにした (図 1)。成人期には抑制性である GABA ニューロンは、新生仔期にはニューロンにおける Cl⁻イオンの細胞外排出を行う輸送体蛋白である KCC2 の働きが弱いため細胞内 Cl⁻イオン濃度が高く、GABA ニューロンは興奮性である。本モデルで KCC2 の量を解析したところ、標準出生体重仔よりも減少しており、これが脊髄の過敏性の要因であると考えられた (Coq, *Front Neurol* 2018)。



Open-field test では以前の評価結果と同じく、本モデルは多動性を示すことが確認できた。3-Chamber sociability test の結果から、さらに本モデルは自閉症スペクトラム障害と同様な社会性欠如を呈することが明らかになった (図 2) (論文投稿準備中)。



脳の組織評価において脳内炎症の一つの指標である Iba-1 陽性細胞 (ミクログリア) の割合が本モデルでは増加していることを予想していたが、生後 8 週齢での評価では増加していなかった (Itoh, *Pediatr Int* in press)。新生仔期の髄液・血液でのサイトカイン等の測定において、脳内炎症・全身性炎症を呈する傾向は認められたものの、顕著な炎症は認めなかった (論文投稿準備中)。

低出生体重児で自閉症スペクトラム障害や ADHD を来している児の大多数は、検査において明確な形態的脳障害や脳内・全身の炎症を認めないということを考えると、本研究における以上の結果から、本モデルは、低体重で出生し自閉症スペクトラム障害や ADHD を来している児の臨床的特徴をかなりよく再現したモデルと言える。発達障害を来す原因病態として子宮内炎症・脳内炎症の関与が提唱されているが、今回の検討では明確な脳内炎症は認めなかった。今後は脳内の代謝産物や神経伝達物質なども含めて特殊イメージング手法などを用いてさらに詳細な検討を行うとともに、発達障害の治療・予防法開発に向けた検討も行う計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Coq JO, Kochmann M, Lacerda DC, Khalki H, Delcour M, Toscano AE, Cayetanot F, Canu MH, Barbe MF, Tsuji M	4. 巻 63
2. 論文標題 From cerebral palsy to developmental coordination disorder: Development of preclinical rat models corresponding to recent epidemiological changes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Phys Rehabil Med	6. 最初と最後の頁 422-430
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.rehab.2019.10.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tsuji M, Sizonenko SV, Baud O	4. 巻 10
2. 論文標題 Editorial: Preventing developmental brain injury; from animal models to clinical trials	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Neurol	6. 最初と最後の頁 775
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fneur.2019.00775	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Tsuji M, Coq JO, Ogawa Y, Yamamoto Y, Ohshima M.	4. 巻 131
2. 論文標題 A rat model of mild intrauterine hypoperfusion with microcoil stenosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Vis Exp	6. 最初と最後の頁 e56723
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/56723	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Coq JO, Delcour M, Ogawa Y, Peyronnet J, Castets F, Turle-Lorenzo N, Montel V, Bodineau L, Cardot P, Brocard C, Liabeuf S, Bastide B, Canu MH, Tsuji M, Cayetanot F.	4. 巻 9
2. 論文標題 Mild intrauterine hypoperfusion leads to lumbar and cortical hyperexcitability, spasticity and muscle dysfunctions in rats: implications for prematurity.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Neurol	6. 最初と最後の頁 423
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fneur.2018.00423	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 辻 雅弘、小川優子、藤井律子、佐藤義朗、Jacques-Olivier Coq
2. 発表標題 低出生体重 - 多動モデルラットを用いた神経発達障害のメカニズム解明
3. 学会等名 2019年度 自然科学研究機構分野融合型共同研究事業「運動・行動から紐解く脳神経回路発達メカニズムの異分野融合研究による解明」
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 辻 雅弘、小川優子、藤井律子、佐藤義朗、Jacques-Olivier Coq
2. 発表標題 低出生体重 - 多動モデルラットにおける病態解析
3. 学会等名 日本発達神経科学学会 第8回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻 雅弘
2. 発表標題 子宮内低灌流による低出生体重モデルラットを用いた行動障害の機序検討と治療法開発への応用
3. 学会等名 第64回日本新生児育成医学会・学術集会 サテライトシンポジウム 第5回超早産児神経発達症研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masahiro Tsuji, Yuko Ogawa, Emi Tanaka, Yoshiaki Sato, Ritsuko Fujii, Jacques-Olivier Coq
2. 発表標題 Fetal growth restriction caused by mild intrauterine hypoperfusion reproduces neurodevelopmental disorders in rats
3. 学会等名 IPOKRATES 2019: Protecting and Developing the Brain (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masahiro Tsuji
2. 発表標題 intrauterine hypoperfusion in rats reproduces neurodevelopmental disorders associated with prematurity
3. 学会等名 Reproductive & Perinatal Biology Seminar, University of Florida (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masahiro Tsuji, Jacques-Olivier Coq, Kentaro Otani, Yuko Ogawa, Emi Tanaka, Yoshiaki Sato, Makiko Ohshima.
2. 発表標題 A novel rat model of mild intrauterine hypoperfusion presenting with fetal growth restriction and neurodevelopmental disorders.
3. 学会等名 44th Annual Meeting Fetal and Neonatal Physiological Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 辻 雅弘、Jacques-Olivier Coq、大谷健太郎、小川優子、服部頼都、佐藤義朗、田中えみ、猪原匡史、斯波真理子、大嶋麻妃子
2. 発表標題 子宮内低灌流は軽度であってもモデルラットにおいて胎児発育不全と脳障害を来す
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 辻 雅弘、佐藤義朗
2. 発表標題 子宮内低灌流による胎児発育不全の病態：新規モデルラットでの検討
3. 学会等名 第120回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都女子大学 辻研究室
https://tsuji-lab.org/

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	小川 優子 (Yuko Ogawa) (00454497)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・非常勤研究員 (84404)	
研究分担者	大谷 健太郎 (Kentaro Otani) (50470191)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員 (84404)	
研究分担者	梅澤 雅和 (Masakazu Umezawa) (60615277)	東京理科大学・研究推進機構総合研究院・研究員 (32660)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
フランス	CNRS (国立科学研究センター)	エクス=マルセイユ 大学	
スイス	ジュネーヴ大学	EPFL (スイス連邦工科大学ローザンヌ校)	