

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07855

研究課題名(和文) 超早産児の認知機能障害及び神経発達症に関する新規モデルマウスを用いた病態の解明

研究課題名(英文) Analysis of pathological mechanism of cognitive impairment and neurodevelopmental disorder observed in the new model mouse of extremely preterm infants

研究代表者

出口 貴美子 (DEGUCHI, Kimiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師(非常勤)

研究者番号：50227542

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)：妊娠マウスの子宮動脈の一時的な遮断によって作成した、生後に認知機能低下が生じる独自の虚血性脳障害モデルマウスを用いて、発達段階における虚血性脳障害によって生じる神経細胞の移動の障害が、シナプス伝達に関与するスパインの形態的障害をもたらしているか解析を行った。また、細胞移動の障害が生じる神経細胞の遺伝子発現プロファイルの変化についての解析を行った。次世代シーケンスを用いたトランスクリプトーム解析と、マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析の結果、共通する変化として、認知機能に関わる分子経路において、遺伝子発現プロファイルの変化が検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超早産児の虚血性脳障害による神経学的後遺症の特徴としては、これまでのような脳性麻痺などの運動発達障害が主体ではなく、認知機能障害や、自閉スペクトラム症や注意欠如多動症のような発達神経症(発達障害)の頻度が高い事が注目されている。本研究によって、発達段階における虚血性脳障害という環境要因によって、認知機能に関わる分子経路の遺伝子発現が変化して、これが生後の認知機能障害に関わる可能性が示された。これらの分子経路は、治療標的の候補となるため、今後、超早産児の虚血性脳障害による神経学的後遺症に対する治療開発を進めていく上で、基盤となる重要な所見が得られた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used our unique mouse model of ischemic brain damage, in which cognitive impairments occur after birth by temporarily occluding the uterine arteries in pregnant mice. This mouse model is considered as a good model for the neurological impairments of ischemic brain damage in extremely preterm infants. We analyzed whether impaired neuronal migrations caused by ischemic brain damage during development result in morphological changes in spines after birth. Furthermore, we analyzed the changes in gene expression profiles of neurons that show impaired migrations. As a result of transcriptome analysis using next generation sequencing and microarray analysis, changes in gene expression profiles were detected in molecular pathways related to cognitive functions. These changes might underlie cognitive impairments in extremely preterm infants and would be important as candidates for future therapeutic targets.

研究分野：小児科学

キーワード：超早産児 虚血性脳障害 神経学的後遺症 認知機能障害 自閉スペクトラム症 注意欠如多動症 発達神経症 細胞移動

1. 研究開始当初の背景

我が国の出生率は下降しているが、一方で出生体重 2500g 以下の低出生体重児の割合は年々高くなっている。特に、在胎 28 週未満（出生体重 1000g 未満）の超早産児の出生数は、この 35 年で 2 倍に増加し、年間約 3000 人が出生する。世界のトップレベルを誇る我が国の周産期医療の発展により、超早産児の周産期死亡率は諸外国に比べ極めて低いが、虚血性脳障害による後遺症の頻度は 20-50% と諸外国と同様に高く、我が国の小児医療の大きな課題の一つとなっている。超早産児の虚血性脳障害による神経学的後遺症の特徴としては、これまでのような脳性麻痺などの運動発達障害が主体ではなく、認知機能障害や、自閉スペクトラム症や注意欠如多動症のような発達神経症（発達障害）の頻度が高い事が注目されている。

2. 研究の目的

近年、自閉スペクトラム症の生物学的研究、特に網羅的遺伝子解析やモデルマウスを用いた病態解析の結果より、自閉スペクトラム症の根本的な病態が神経細胞のシナプスの形態的あるいは機能的障害を伴う神経回路網の異常であることが示唆されている。これらの研究で対象になっている遺伝性要因の高い神経発達症と本研究で対象にする超早産児の神経発達症は、臨床的には類似性の高いものであることから、超早産児の神経発達症においてもシナプスの形態的あるいは機能的な異常が関与しているのではないかと考えた。そこで本研究では、妊娠マウスの子宮動脈の一時的な遮断によって作成した、生後に認知機能低下が生じることが明らかになっている独自のモデルマウス（Kubo*/Deguchi*, et al., *JCI Insight*, 2017）を用いて、超早産児の虚血性脳障害によって生じる神経細胞の移動の障害が、大脳皮質の神経細胞の構築の異常やシナプス伝達に關するスパインの形態的あるいは機能的障害をもたらしているかについて明らかにする。さらに自閉スペクトラム症関連遺伝子の関与についての生物学的研究も行い、その病態の違いなどから超早産児の治療ターゲットを明らかにし、治療開発を進めていくことを目的とする。

3. 研究の方法

妊娠マウスの子宮動脈の一時的な遮断によって作成した独自の虚血性脳障害モデルマウス（Kubo*/Deguchi*, et al., *JCI Insight*, 2017）を用いて、以下の検討を行った。

(1) シナプスに関する検討

虚血性脳障害モデルマウスを作成する過程で、妊娠後期（E16.5 前後）マウスの胎児脳室内に GFP 発現ベクターを注入し、これを子宮内エレクトロポレーションで脳室壁の神経幹細胞に遺伝子導入した後、一定時間による子宮動脈結紮により胎児脳に虚血負荷を掛けた。虚血を解除した後、胎児を子宮内に戻し、出生後から生後 8 週まで経時的に脳組織を採取し、凍結切片を作製した。特に前頭前皮質で形成されるシナプスに注目して、形態学的な解析を行った。

(2) フラッシュ・タグ法を改変した新たな手法を用いた検討

最近確立した、フラッシュ・タグ（FlashTag）法を独自に改変した新たな手法（Yoshinaga et al., *iScience*, 2021）を用いて、脳内の異なる領域の細胞移動を同時に可視化して、虚血性脳障害モデルマウスにおける神経細胞移動についての解析を行った。

(3) 遺伝子発現変化の検討

マウス子宮内胎児電気穿孔法を用いて、発達中のマウス胎仔脳の神経細胞に蛍光タンパク質を発現するプラスミドを導入することによって、あらかじめ神経細胞の可視化を行った。生後の虚血性脳障害モデルマウスと対照群のマウスの大脳皮質から、蛍光タンパク質を用いてセルソーターによって虚血時に移動中の神経細胞を抽出したのち、それらの細胞から RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行った。また、生後の虚血性脳障害モデルマウスと対照群のマウスの大脳皮質から、RNA を抽出して、次世代シーケンズを用いたトランスクリプトーム解析を行った。

(4) 異なる時期の虚血による影響の検討

上記の独自に確立した虚血性脳障害のモデルマウスを基にして、発生段階における異なる時期の虚血による影響を検証するため、妊娠マウスの子宮動脈の一時的な遮断の時期と時間を変えて、条件検討を行った。

4. 研究成果

(1) シナプスに関する検討

虚血性脳障害モデルを作成する過程で、妊娠後期(E16.5 前後)マウスの胎児脳室内に GFP 発現ベクターを注入し、これを子宮内エレクトロポレーションで脳室壁の神経幹細胞に遺伝子導入した後、一定時間による子宮動脈結紮により胎児脳に虚血負荷を掛けた。虚血を解除した後、胎児を子宮内に戻し、出生後から生後 8 週まで経時的に脳組織を採取し、凍結切片を作製した。この手法を用いることによって、神経細胞の樹状突起や軸索が GFP で可視化され、シナプスを含めた微細な構造異常について共焦点レーザー顕微鏡を用いて、詳細に捉えることができた。特に前頭前皮質の II/III 層の神経細胞を標的としてスパインの数、形態を定量的に解析したところ、形成されるシナプスの数や形状には、有意な変化は認められなかった。このモデルマウスには、生後に認知機能低下が生じることが明らかになっているが、その要因として、形成されるシナプスの数や形状というよりは、形成されたシナプスの動態が変化している可能性が考察された。

(2) フラッシュ・タグ法を改変した新たな手法を用いた神経細胞移動の検討

これまでに確立したマウス子宮内電気穿孔法を用いた部位特異的神経細胞ラベル法に加えて、最近確立した、フラッシュ・タグ法を独自に改変した新たな手法(Yoshinaga et al., *iScience*, 2021)を用いて、脳内の異なる領域の細胞移動を同時に可視化して、虚血性脳障害モデルマウスにおける神経細胞移動についての解析を行った。この手法を用いることにより、脳室に面して分裂する細胞は、部位を問わずラベルされるため、電極の方向に依存する子宮内電気穿孔法よりも、より広い範囲で神経細胞をラベルすることができた。

その結果、虚血性脳障害モデルマウスにおいて、新皮質に加えて、これまでに注目していなかった海馬においても神経細胞移動の変化を見出した。また、その過程で、これまで均一とされていた新皮質における細胞移動が、実は新皮質の領域によって、かなり違いが大きいことを見出した。また、この差が明瞭な時期と、さほど違いが明瞭でない時期があることも新たに明らかにした。このように、時期と領域による神経細胞移動の違いについて、新規手法を用いて詳細に観察し、その結果をまとめて、論文として発表した(Yoshinaga et al., *iScience*, 2021)。

また、このような、発生過程における神経細胞移動は、超早産児の虚血性脳障害による神経学的後遺症にも関わる可能性がある。このため、ヒトとマウスの大脳皮質の発生過程について比較を行いつつ、これまでに得られた知見を俯瞰した総説を執筆して発表した(Kubo and Deguchi, *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 2020)。

(3) 遺伝子発現変化の検討

我々が独自に開発した、虚血性脳障害モデルマウス(Kubo*/Deguchi*, et al., *JCI Insight*, 2017)を用いて、細胞移動の障害が生じる神経細胞の遺伝子発現プロファイルの変化についての解析を進めた。実際には、マウス子宮内胎児電気穿孔法等を用いて、発達中のマウス胎仔脳の神経細胞に蛍光タンパク質を発現するプラスミドを導入することによって、あらかじめ神経細胞の可視化を行っていた。生後の虚血性脳障害モデルマウスと対照群のマウスの大脳皮質から、蛍光タンパク質を用いてセルソーターによって移動中の神経細胞を抽出したのち、それらの細胞から RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行った。また、生後の虚血性脳障害モデルマウスと対照群のマウスの大脳皮質から、RNA を抽出して次世代シーケンズを用いたトランスクリプトーム解析も行った。

これらの次世代シーケンズを用いたトランスクリプトーム解析と、マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析で、共通する経路の変化が観察された。特に、発現変化が生じている遺伝子として、代表的な MAP キナーゼである、ERK1/2 や、PI3 キナーゼが検出された。MAP キナーゼや PI3 キナーゼの経路は、知的能力障害における認知機能障害を生じる遺伝的な要因として知られている。

これらの結果から、発生段階の虚血という環境要因によって、認知機能に関わる遺伝子の発現が変化して、これが生後の認知機能低下に関わる可能性が示された。これらの分子経路は、治療標的の候補となるため、今後、超早産児の虚血性脳障害による神経学的後遺症に対する治療開発を進めていく上で、基盤となる重要な所見であると考えられる。

(4) 異なる時期の虚血による影響の検討

また、上記の独自に確立した虚血性脳障害のモデルマウスを基にして、発生段階における異なる時期の虚血による影響を検証するため、さらに条件検討を行った。その結果、以前に報告した虚血性脳障害モデルマウス(Kubo*/Deguchi*, et al., *JCI Insight*, 2017)とは異なる時期の虚血によって、出生直後の大脳新皮質において、特徴的な組織構築の変化が生じることを見出した。さらに、その条件を用いて作成したマウスが成育したのちに、どのような動物行動への影響が生じるかを解析した。具体的には、オープンフィールド試験、Y 字迷路試験、三室社交性試験、新奇物

体認識試験、高架式十字迷路試験等の行動試験を行った。このうち、新奇物体認識試験において、認知機能の低下傾向を認めた。発生段階の環境要因によって、認知機能障害を生じ、かつ、特徴的な組織構築の変化を示す、新たなモデルマウスとなる可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kubo Ken ichiro	4. 巻 74
2. 論文標題 Increased densities of white matter neurons as a cross disease feature of neuropsychiatric disorders	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Psychiatry and Clinical Neurosciences	6. 最初と最後の頁 166 ~ 175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pcn.12962	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 -
1. 著者名 Shin M, Kitazawa A, Yoshinaga S, Hayashi K, Hirata Y, Dehay C, Kubo KI, Nakajima K	4. 巻 527
2. 論文標題 Both excitatory and inhibitory neurons transiently form clusters at the outermost region of the developing mammalian cerebral neocortex.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Comp Neurol.	6. 最初と最後の頁 1577-1597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.24634.	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 Kubo Ken ichiro, Deguchi Kimiko	4. 巻 46
2. 論文標題 Human neocortical development as a basis to understand mechanisms underlying neurodevelopmental disabilities in extremely preterm infants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 2242 ~ 2250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.14468	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 -
1. 著者名 Yoshinaga Satoshi, Shin Minkyung, Kitazawa Ayako, Ishii Kazuhiro, Tanuma Masato, Kasai Atsushi, Hashimoto Hitoshi, Kubo Ken-ichiro, Nakajima Kazunori	4. 巻 24
2. 論文標題 Comprehensive characterization of migration profiles of murine cerebral cortical neurons during development using FlashTag labeling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102277 ~ 102277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102277	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 Inoue Seika, Hayashi Kanehiro, Fujita Kyota, Tagawa Kazuhiko, Okazawa Hitoshi, Kubo Ken-ichiro, Nakajima Kazunori	4. 巻 39
2. 論文標題 Drebrin-like (Dbnl) Controls Neuronal Migration via Regulating N-Cadherin Expression in the Developing Cerebral Cortex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 678 ~ 691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1634-18.2018	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 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Kimiko Deguchi, Ken-ichiro Kubo, Kazunori Nakajima, Ken Inoue
2. 発表標題 Extremely preterm infants with brain injury leads to cognitive dysfunction due to neuronal brain network damage
3. 学会等名 15th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology (AOCCN) & 41st Malaysian Paediatric Association Annual Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保 健一郎, 出口 貴美子, 井上 健, 仲嶋 一範
2. 発表標題 神経細胞移動の障害が超早産児の認知機能低下に関与する可能性についての検討
3. 学会等名 第24回認知神経科学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保 健一郎, 出口 貴美子, 井上 健, 仲嶋 一範
2. 発表標題 脳の細胞構築に注目して精神疾患の病態を理解する試みについて
3. 学会等名 第115回 日本精神神経学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiniko Deguchi, Ken-ichiro Kubo, Kazunori Nakajima, Ken Inoue
2. 発表標題 New aspects of extremely preterm infants with brain injury
3. 学会等名 The 20th Annual Meeting of Infantile Seizure Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 出口 貴美子、久保 健一郎、井上 健、仲嶋 一範
2. 発表標題 超早産児脳の最近の知見 NICUのその後をどう育むか? 在胎20 - 28週のヒト脳の脆弱性
3. 学会等名 第4回小児ニューロリハビリテーション研究会・第4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 久保 健一郎, 出口 貴美子, 井上 健, 仲嶋 一範
2. 発表標題 超早産児虚血モデルマウスの開発と応用
3. 学会等名 第4回小児ニューロリハビリテーション研究会・第4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 久保健一郎、出口貴美子、ハズラ デバプラタ、吉永怜史、井上健、仲嶋一範
2. 発表標題 超早産児虚血性脳障害モデルマウスの解析と治療戦略
3. 学会等名 日本新生児生育医学会・学術集会サテライトセミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保健一郎、出口貴美子、石井一裕、井上健、仲嶋一範
2. 発表標題 神経発達症モデルマウスの作成とその神経回路の解析
3. 学会等名 2018年度生理学研究所研究会 「情動の神経回路機構とその破綻」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kimiko Deguchi, Ken-ichiro Kubo, Ken Inoue, and Kazunori Nakajima
2. 発表標題 Pathogenesis of neurodevelopmental disorders in extremely preterm infants
3. 学会等名 11th FENS Forum of Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kimiko Deguchi, Ken-ichiro Kubo, Ken Inoue, and Kazunori Nakajima
2. 発表標題 Pathophysiology of neuronal network damage in the mouse model of extremely preterm infants
3. 学会等名 第60回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kimiko Deguchi, Ken-ichiro Kubo, Ken Inoue, and Kazunori Nakajima
2. 発表標題 Neuronal network damage in mouse model of extremely preterm infants with brain injury
3. 学会等名 22nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (ISDN2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 出口貴美子、久保健一郎、井上健、仲嶋一範
2. 発表標題 超早産児における神経発達症の新たな知見と治療戦略
3. 学会等名 第121回日本小児科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保健一郎、出口貴美子、吉永怜史、野々村美康、大島鴻太、高杉聡、北澤彩子、井上健、仲嶋一範
2. 発表標題 発生段階における虚血等による脳傷害が脳の発達に与える影響の解析
3. 学会等名 第123回日本小児科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔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	久保 健一郎 (KUBO Ken-ichiro) (20348791)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授 (32612)	

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
---------	---------