

平成22年 6月17日現在

研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2008～2009
課題番号：	20790777
研究課題名(和文)	脳室周囲白質軟化症発症へのプロゲステロンの関与とその抑制効果について
研究課題名(英文)	The contribution of progesterone deficiency to the pathogenesis of periventricular leukomalasia
研究代表者	
	山岡 繁夫 (Yamaoka Shigeo)
	大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：	90434779

研究成果の概要(和文)：妊娠後期ラットにLipopolysaccharide(LPS)を腹腔内投与し子宮内炎症モデルマウスを作成、これらをLPS投与群とし、control群には等容量のsalineを投与した。出産後、日齢7の新生児ラットより脳を摘出。Western blotによりprogesterone receptor(PR)及びprogesterone産生の律速酵素である 3β -hydroxysteroid dehydrogenase(3β -HSD)各々の蛋白発現を比較検討した。小脳及び大脳中PR及び 3β -HSD蛋白発現は二群間で明らかな差はみられなかった。さらに、PRの核内移行を比較するため、脳組織中の核蛋白を抽出。PR蛋白発現を同様にWestern blotにより解析したが、やはり二群間で明らかな差はみられなかった。

研究成果の概要(英文)：We made an intrauterine inflammation rat model by intraperitoneal injection of Lipopolysaccharide(LPS) to late gestational pregnant rats(LPS-treated group). The control group was injected with same volume saline. After birth, the brain tissues were harvested from 7 day-old rat pups of both groups. We examined the protein expression of progesterone receptors(PR) and 3β hydroxysteroid dehydrogenase(3β -HSD), rate-limiting enzyme in progesterone biosynthesis, by Western blot analysis, and compared those between two groups. Both PRs and 3β -HSD protein expression of cerebellum and cerebrum were almost similar between two groups. To analyze translocation of PRs to the nucleus, we extracted nuclear proteins from brain tissues, and examined the protein expression of PRs and 3β -HSD. However, there were no significant differences between two groups.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 胎児・新生児医学

キーワード：periventricular leukomalasia, progesterone, progesterone receptor, 3β -hydroxysteroid dehydrogenase, intrauterine infection

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳室周囲白質軟化症 (periventricular leukomalacia: PVL) は、早産児 (特に在胎 30 週未満) の脳室周囲白質に好発する病変で、未熟児の痙攣性四肢麻痺の原因の多くを占めるが、その明らかな原因、及び有効な治療法は未だ確立されていない。

現在、PVL の原因として考えられているものには、①脳血管構築の未熟性、②脳血管自動調節能の未熟性、③oligodendrocyte (希突起膠細胞) 前駆細胞の脆弱性、④胎児・新生児仮死に伴う脳血流低下、⑤虚血・再灌流による free radical 産生、⑥子宮内感染による各種炎症性メディエーターへの暴露、等が本疾患の重要な病因として推測されている。

中でも、oligodendrocyte 前駆細胞の脆弱性は、本疾患の主要因の一つと考えられており、近年、特に注目を集めている。

(2) oligodendroglia は、グリア細胞の一種で、中枢神経系における髄鞘形成を担っている。髄鞘形成は、在胎 24 - 25 週以降に開始されると言われており、PVL の risk の高い在胎 24-32 週の未熟児の白質では、ほとんどが髄鞘形成のなされていない未分化な oligodendrocyte であることが分かっている。

実際の PVL においても、広範に傷害されている細胞成分は、未分化な oligodendrocyte であり (de Vries LS et al, 1988)、培養細胞を用いた研究では、これら未分化な oligodendrocyte は、成熟した oligodendrocyte に比し、free radical 傷害、apoptosis 刺激に対してより脆弱あることが証明されている。(Back SA et al, 1998)

これらの事実より、oligodendrocyte の未熟性が、PVL の原因としてより重要であり、その成熟を促進することが、PVL の治療として有効である可能性が考えられる。

(3) 神経組織にはステロイドホルモンに対するレセプターが存在し、神経内で独自に合成されるステロイド化合物は特に “neuroactive steroid” と総称される。

“neuroactive steroid” には、①神経保護作用、②神経発達 (増殖・分化等) 作用、及び③記憶・学習など高次機能への作用等があると報告されているが、2005 年に

Neuroscience 誌に掲載された Ghoumari らの新生児ラット小脳培養組織を用いた論文では、「PROG の投与により、oligodendrocyte 前駆細胞の増殖及び成熟 oligodendrocyte への分化の促進作用がみられた」との報告がなされた。

PROG は、妊娠末期には胎盤で産生されるため、胎盤機能低下時には母体血中 PROG 濃度は低下する可能性があり、ステロイドホルモンの胎盤移行性及び脳血液関門の通過性が非常に高いことより、出生前の母体血中 PROG 濃度が低下すると胎児脳中 PROG 濃度も低下すると考えられる。

以上より、①「母胎血中 PROG 濃度の低下が PVL 発症を惹起する」、②「未熟児 or 母体への PROG の投与により PVL 発症が抑制される」、という 2 つの仮説が立てられる。

2. 研究の目的

「出生前の母体 PROG 濃度の低下が PVL の発症を惹起する」及び「未熟児 or 母体に対する PROG の投与により PVL 発症が抑制される」という仮説を検証し、PVL のメカニズムの解明及び新たな治療法の確立を本研究の目的とする。

3. 研究の方法

近年の研究において、未熟児に対する Progesterone + estradiol の補充療法では、PVL の発症率に有意差はなかった (Trotter A et al. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2007) とする報告がなされた。過去の研究において、progesterone による

oligodendrocyte 前駆体の髄消化の促進作用は progesterone receptor (PR) を介する

(Ghoumari et al. J Neurochem. 2003) という報告もあったため、未熟児においては、脳内 PR 発現が阻害されている可能性を考え、この原因として子宮内感染/炎症をその候補として仮定した。子宮内感染/炎症は早産の主要因として知られているが、これらが未熟脳への傷害や神経発達異常をも惹起することは臨床的にも動物実験においても証明されている。

以上より、新たに「子宮内感染/炎症により未熟児脳内 PR 発現は低下する」という仮説

が立てられ、この仮説の検証のために以下の方法で実験を行った。

(1) LPS 投与

胎齢 15 の妊娠ラット (Sprague-Dawley rat) を購入。

胎齢 18, 19 に妊娠ラットを①LPS 投与群、②control 群に分け、①LPS 投与群には LPS 500 μ g/kg を、②control 群には等容量の saline を腹腔内投与。

LPS or saline 投与前後 (日齢 18, 日齢 20) に尾部より血液採取。血清分離後、母体血中 progesterone 濃度を ELISA kit を用いて測定した。

(2) 新生児脳摘出

日齢 7 の新生児ラットに 50mg/kg のペントバルビタール腹腔内投与により麻酔。開胸後、左心室より Phosphate buffered saline (PBS) にて灌流後、断頭。頭蓋骨切開し全脳摘出する。脳は正中断により半球に分割。さらに小脳とその他全脳とに分け、液化窒素に浸け-80°C にて保存。

脳組織ホモジェナイズ

凍結脳組織を 9 倍容量の氷冷バッファー

(0.25M sucrose, 50mM Tris-HCl, 5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.05% Nonidet P-40, 1mM PMSF) 中でテフロンホモジェナイザーを用いてホモジェナイズ。ホモジェネートを遠心 (15000 \times g, 4°C, 20 分) し、上清採取。測定まで-80°C にて保存。

核蛋白抽出

脳組織ホモジェネートより核蛋白抽出キット (NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents; Thermo Scientific) を用いて抽出した。

(3) Western blot

各組織蛋白を調整後、polyacrylamido gel に泳動後、PVDF membrane に blotting を行った。一次抗体として、抗 progesterone receptor 抗体 (rabbit polyclonal antibody, sc-539; Santa Cruz) 及び抗 β -hydroxysteroid dehydrogenase 抗体 (rabbit polyclonal antibody, sc-28206; Santa Cruz) を用いた。一次抗体反応後、HRP-conjugated anti-rabbit antibody を用いて二次抗体反応。ECL detection system により信号強度を解析。 β -actin 蛋白信号強度で標準化後、各サンプル間で比較を行った。

4. 研究成果

(1) 母体 LPS 投与による胎児及び新生児への影響

日齢 18 (LPS or vehicle 投与前) における母ラットの体重は control 群 v. s. LPS 投与群: 431 \pm 27g v. s. 420 \pm 27g (mean \pm SD, n=6 v. s. 8) で有意差はなかった (p=0.6)。出産子数は control 群 v. s. LPS 投与群: 15 \pm 2.7 v. s. 10 \pm 5.2 (mean \pm SD, n=6 v. s. 8) で LPS 投与群でやや少ない傾向であった (p=0.059)。産子の出生体重は control 群 v. s. LPS 投与群: 6.6 \pm 0.4 g v. s. 4.8 \pm 0.2 g (mean \pm SD, n=35 v. s. 30) で、LPS 投与群で体重は有意に低かった (p<0.001)。

(2) 母体血中 PROG 濃度

母体血中 progesterone 濃度は LPS or saline 投与前→後 (日齢 18→20) で、control 群: 9.1 \pm 0.3 ng/ml \rightarrow 4.9 \pm 1.3 ng/ml (mean \pm SD, n=2)、LPS 投与群: 7.9 ng/ml \rightarrow 7.2 ng/ml (n=1) であり、control 群においては日齢 18→20 にかけて血中 PROG 濃度は減少傾向であるのに対して、LPS 投与群においてはほぼ不変であった。

(3) Western blot

新生児ラットにおける PROG の作用はとりわけ小脳において顕著であり (Sakamoto et al. J Neurosci. 2001. Ghomari et al. J Neurochem. 2003)、本研究と同様の LPS 投与による子宮内炎症モデル動物において小脳白質内成熟 oligodendrocyte 数の減少が報告されている (Gavilanes AW et al. Am J Obstet Gynecol. 2009 Dean JM et al. Neuroscience. 2009)。このため、まず、小脳における PR 発現を①LPS 投与群、②control 群それぞれの新生児ラットにおいて検証したが、Western blot による PR 発現は 2 群間で明らかな差はみられなかった。PR はステロイド受容体、すなわち核内受容体型転写因子群であり、その作用発現には、リガンド結合後、①核内に移行、②特異的 DNA 配列に結合、③標的遺伝子の転写促進、という過程を要する。これらより、子宮内炎症モデル新生児ラットにおいては、小脳内 PR の核内移行が阻害されている可能性が考えられたため、次に、小脳ホモジェネートより核蛋白を抽出。核蛋白中 PR 発現を 2 群間で比較したが、これに関しても明らかな差はみられなかった。小脳を除く脳組織ホモジェネート蛋白においても同様の結果であった。

次に、脳局所における PROG 産生を検証するため、PROG 産生の律速酵素である 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD) の蛋白発現を、抗 3β -HSD 抗体を用いて western blot にて検証した。新生児ラット小脳及び大脳蛋白中 3β -HSD 発現は LPS 投与群、control 群で明らかな差はみられなかった。

以上より、子宮内炎症モデルにおいて、新生児脳内 progesterone 産生及び PR 発現は明らかな影響を受けないと結論付けられた。

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 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岡 繁夫 (Yamaoka Shigeo)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：90434779