

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16939

研究課題名（和文）SGA児の血小板減少の機序解明と血小板制御による神経発達改善への治療戦略

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of thrombocytopenia in SGA infants and therapeutic strategy for improving neurodevelopment by controlling platelets

研究代表者

竹下 覚（Takeshita, Satoru）

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：20715875

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：妊娠高血圧症候群など子宮内慢性低酸素環境により胎児発育は停滞し、SGA（Small for gestational age）児として出生する。本邦でSGA児は増加傾向で、合併症の予防と治療は重要性を増している。これまでに申請者は、ヒトSGA児で生じる血小板減少は、血清トロンボポエチン（TPO）濃度の低下に伴う血小板産生抑制によることを明らかにした。また、SGAモデルラットを用いてTPO低下の原因は未熟肝臓によるTPO発現低下であり、TPO受容体作動薬の投与で血小板減少を改善できることを明らかにした。これらの結果を論文として報告した。現在はSGA児の神経予後改善を目指してさらに研究を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在日本で臨床使用されているTPO受容体作動薬はエルトロンボパグとロミプロスチムのみで、適応は主に成人の慢性血小板減少性紫斑病である。新生児血小板減少症の原因が分子生物学的レベルで解明され、TPOの動向が明らかになれば、TPO受容体作動薬が新生児血小板減少症の新規治療薬となる可能性がある。血小板輸血の代替治療は、輸血に伴う感染症などのリスクを回避するだけでなく、貴重な医療資源の負担を軽減することができる。さらに、SGA児の合併症の予防と治療は、SGA児本人だけでなく家族や社会全体にも利点が大きく、新たな治療は我が国の将来を担う子どもと子どもを支える社会の両方に恩恵を与えると期待できる。

研究成果の概要（英文）：Fetal growth is retarded due to chronic hypoxic conditions in the uterus, such as gestational hypertension, and small for gestational age (SGA) infants are born. The number of SGA infants is increasing in Japan, and prevention and treatment of complications are becoming increasingly important. We have shown that thrombocytopenia in human SGA infants is due to the suppression of platelet production associated with a decrease in serum thrombopoietin (TPO) levels. Using a rat model of SGA, they also showed that the cause of TPO reduction is decreased TPO expression due to immature liver, and that administration of a TPO receptor agonist can improve thrombocytopenia. These results are reported in the paper. Currently, further studies are underway to improve the neuro-prognosis of SGA infants.

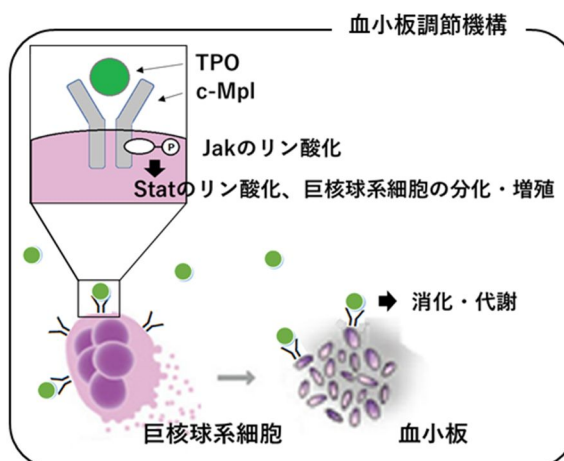
研究分野：新生児学

キーワード：新生児学 胎児発育遅滞 SGA児 血小板減少 トロンボポエチン 神経保護

## 1. 研究開始当初の背景

新生児血小板減少症は  $150 \times 10^3/\mu\text{L}$  未満と定義され、新生児集中治療室 (NICU) に入院する新生児の **18~35%** にみられる頻度の高い病態である。特に早産児や、子宮内の慢性的な酸素欠乏によって低身長・低体重となる不当軽量児 (**SGA** 児) では、出生早期に血小板減少症をきたすことが多い。その多くは自然回復するが、頭蓋内出血をきたすことがあり神経学的予後を悪化させる重要な病態である。

血小板産生を調節する機構は、成人では明らかになっている (図)。主に肝臓で産生されるトロンボポエチン (**TPO**) と、巨核球前駆細胞から血小板までの巨核球系細胞と赤血球前駆細胞の表面に発現している **TPO** 受容体である **c-Mpl** (**Myeloproliferative leukemia protein**) が機構の主な担い手である。**TPO** は肝臓で一定量産生され、**mRNA** レベルの調節は受けない。**c-Mpl** は二量体を形成して **TPO** をリガンドとして結合すると、**Jak/Stat** のリン酸化のシグナル伝達を介して巨核球系細胞の分化と増殖を促進する。一方で **c-Mpl** は血小板表面にも発現しており、血液中に遊離している **TPO** は血小板表面の **c-Mpl** に結合すると消化され代謝される。再生不良性貧血のように血小板産生が減少する病態では、血小板表面で捕捉される **TPO** が減少するため遊離 **TPO** が増加する。これにより巨核球前駆細胞や巨核球で多くの **TPO** が **c-Mpl** と結合するため、血小板産生が亢進する。



しかし、これらの機構解明は成人での報告であり、早産児、特に **SGA** 児での研究は報告されていなかった。また、モデル動物を用いた分子生物学的な検討もなされていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、今まで未知であった新生児血小板減少症のメカニズムを分子生物学的レベルで明らかにすることである。

現在日本で臨床使用されている **TPO** 受容体作動薬はエルトロンボパグとロミプロスチムのみで、適応は主に成人の慢性血小板減少性紫斑病である。新生児血小板減少症の原因が分子生物学的レベルで解明され、**TPO** の動向が明らかになれば、**TPO** 受容体作動薬が新生児血小板減少症の新規治療薬となる可能性がある。血小板輸血の代替治療は、輸血に伴う感染症などのリスクを回避するだけでなく、貴重な医療資源の負担を軽減することができる。新生児医療における治療の選択肢に新たな一石を投じるものである。

## 3. 研究の方法

### 新生児の血清TPO濃度の動向

本学周産期母子医療センターに入院した早産児を対象とし、前方視的観察研究を行った。生後 **72** 時間以内で血小板数が最低値となった時点での血小板数や幼弱血小板比率 (**IPF**) など臨床データを収集した。また、生後 **7** 日目と **14** 日目の血小板数も収集した。また、生後 **72** 時間以内に血小板数が最低値となった時点での血清を用いて **ELISA** 法で血清 **TPO** 濃度を測定した。

## SGAモデルラットを用いた血小板調節機構の解明とロミプロスチムの有効性検証

### 1) SGAモデルラットの作成

妊娠 8 日目の Wistar/ST ラットに、NO 合成酵素阻害薬 L-NAME を充填した Alzet 浸透圧ポンプ(室町機械株式会社)を皮下埋伏した。L-NAME の用量は 50 mg/kg/日とした。L-NAME の持続皮下投与によりラットの血圧が上昇し、子宮脱落膜へ栄養膜細胞の侵入不全が生じて胎盤が低形成になる。胎盤が低形成になった胎仔は母ラットから栄養を十分に享受することができず、これにより出生するラットを SGA モデルラットとして作成できた。

### 2) SGAモデルラットの血小板減少の機序解明

SGA モデルラットの P1、P3、P7、P14 で採血し、血小板数を測定する。次に、新生仔の肝臓に発現する TPO と c-Mpl をそれぞれ RT-PCR 法で測定した。血清 TPO タンパク濃度を ELISA 法で測定した。また、同日齢の SGA モデルラットで肝臓の重量を測定し、肝組織を HE 染色で評価した。肝臓における Alb 遺伝子の発現を RT-PCR 法で測定した。

### 2) エルトロンボパグの投与効果

P1 の SGA モデルラットに TPO 受容体作動薬ロミプロスチム 20µg/kg を腹腔内投与した。P3、P7、P14 に血小板数を測定し、TPO 受容体作動薬の効果を検証した。

## 4. 研究成果

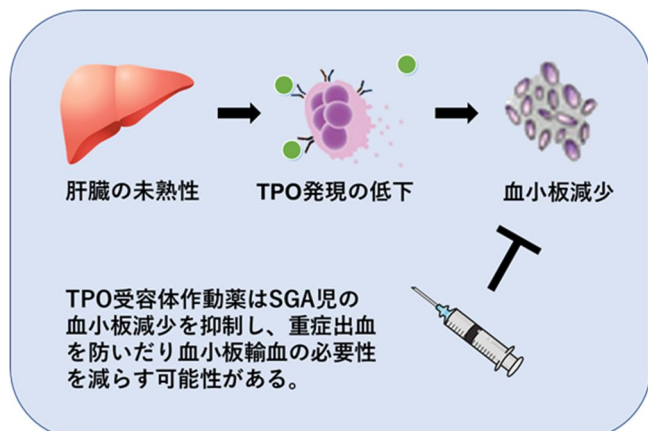
### 新生児の血清TPO濃度の動向

生後 72 時間以内の SGA 児は、有意なヘモグロビン増加と血小板減少がみられ、血小板は生後 7 日、14 日には上昇傾向となり有意差は消失した。非 SGA 児では IPF は血小板と負の相関があり、血小板減少時に血小板産生が亢進していたが、SGA 児では相関がなく血小板産生の亢進はなかった。SGA 児の血小板減少は血小板産生能の低下であると推測された。また、非 SGA 児は TPO も血小板と負の相関があったが、SGA 児では TPO の相関はなかった。SGA 児の血小板減少は、TPO 発現の低下によってもたらされたと示唆された。

### SGAモデルラットを用いた血小板調節機構の解明とロミプロスチムの有効性検証

TPO 遺伝子発現は、P1~3 の SGA ラットで低下しており、P3 では cMpl 遺伝子の代償的発現上昇がみられた。血清 TPO 濃度も、P3 の SGA ラットで低下していた。また、SGA ラットは肝臓重量が低下しており、生後早期は肝細胞内の空胞が目立ち細胞密度が疎であった。両群とも成長とともに肝小葉が成熟した。Alb 遺伝子の発現は P1 で低下していた。ロミプロスチム投与後は P3 で血小板が上昇し始め、P7 で有意な上昇を認めた。

SGA ラットは生後早期に TPO の遺伝子およびタンパク発現が低下しており、血小板減少の原因であると思われる。これは、SGA 児が子宮内で慢性的な低酸素虚血に暴露されているため、肝臓が成熟不全となっていることに起因すると推測される。TPO 受容体作動薬を早期に投与すると、血小板減少の期間を短縮することができた。TPO 受容体作動薬は、SGA 児の重症出血を防ぎ血小板輸血の機会を減らす可能性がある。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Numoto Shingo, Kakita Hiroki, Takeshita Satoru, Ueda Hiroko, Kondo Tomoko, Kurahashi Hirokazu, Wakatsuki Akihiko, Yamada Yasumasa, Okumura Akihisa	4. 巻 64
2. 論文標題 Effects of maternal magnesium sulfate treatment on newborns	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 e14747.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ped.14747	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 Ichimura Shintaro, Kakita Hiroki, Asai Shimpei, Mori Mari, Takeshita Satoru, Ueda Hiroko, Kondo Tomoko, Ohashi Wataru, Okumura Akihisa, Yamada Yasumasa	4. 巻 63
2. 論文標題 Acetaminophen elevates unbound bilirubin levels by the glucose oxidase peroxidase method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 1069 ~ 1074
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ped.14608	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 Takeshita Satoru, Kakita Hiroki, Toriuchi Kohki, Aoki Hiromasa, Ueda Hiroko, Wakatsuki Akihiko, Yamada Yasumasa, Aoyama Mineyoshi	4. 巻 192
2. 論文標題 Insufficient thrombopoietin due to hepatic dysmature results in thrombocytopenia in small for gestational age rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 e105-e108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bjh.17294	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 Kimura Tomoka, Toriuchi Kohki, Kakita Hiroki, Tamura Tetsuya, Takeshita Satoru, Yamada Yasumasa, Aoyama Mineyoshi	4. 巻 41
2. 論文標題 Hypothermia Attenuates Neuronal Damage via Inhibition of Microglial Activation, Including Suppression of Microglial Cytokine Production and Phagocytosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 459 ~ 468
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10571-020-00860-z	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 Toriuchi Kohki, Kakita Hiroki, Tamura Tetsuya, Takeshita Satoru, Yamada Yasumasa, Aoyama Mineyoshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Prolonged astrocyte-derived erythropoietin expression attenuates neuronal damage under hypothermic conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12974-020-01831-3	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 Takeshita Satoru, Kakita Hiroki, Asai Shimpei, Asai Takafumi, Mori Mari, Ueda Hiroko, Aoki Hiromasa, Aoyama Mineyoshi, Yamada Yasumasa	4. 巻 93
2. 論文標題 Thrombocytopenia and insufficient thrombopoietin production in human small-for-gestational-age infants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatric Research	6. 最初と最後の頁 619 ~ 624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41390-022-02107-7	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 Toriuchi Kohki, Kihara Toshie, Aoki Hiromasa, Kakita Hiroki, Takeshita Satoru, Ueda Hiroko, Inoue Yasumichi, Hayashi Hidetoshi, Shimono Yohei, Yamada Yasumasa, Aoyama Mineyoshi	4. 巻 24
2. 論文標題 Monocyte-Derived miRNA-1914-5p Attenuates IL-1 ?Induced Monocyte Adhesion and Transmigration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2829 ~ 2829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24032829	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 Asai Takafumi, Kakita Hiroki, Nakamura Nami, Asai Shimpei, Mori Mari, Takeshita Satoru, Ueda Hiroko, Mizuno Yuki, Tomita Akiko, Aoyama Mineyoshi, Yamada Yasumasa	4. 巻 119
2. 論文標題 Hyperglycemia and Lactic Acidosis Associated with Linezolid Therapy in an Extremely Premature Infant	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neonatology	6. 最初と最後の頁 781 ~ 784
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000526702	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鳥内 皐暉, 木村 友香, 垣田 博樹, 青木 啓将, 田村 哲也, 竹下 覚, 山田 恭聖, 青山 峰芳
2. 発表標題 低温培養はミクログリアの活性化を制御し神経細胞死を抑制する
3. 学会等名 (一社)日本生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鳥内 皐暉, 木村 友香, 垣田 博樹, 青木 啓将, 田村 哲也, 竹下 覚, 山田 恭聖, 青山 峰芳
2. 発表標題 miR-126-3pは血管内皮細胞の単球接着性を变化させ動脈硬化の病変形成に關与する
3. 学会等名 (一社)日本生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 市村 信太郎, 浅井 慎平, 森 麻里, 竹下 覚, 垣田 博樹, 山田 恭聖
2. 発表標題 INSURE後の呼吸管理についての検討
3. 学会等名 (公社)日本新生児成育医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹下 覚, 垣田 博樹, 浅井 慎平, 浅井 貴文, 森 麻里, 上田 博子, 山田 恭聖
2. 発表標題 SGAラットの血小板減少は、肝臓の成熟不全に起因するトロンボポエチンの発現低下によって引き起こされる
3. 学会等名 日本新生児成育学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅井 貴文, 垣田 博樹, 中村 奈見, 浅井 慎平, 森 麻里, 竹下 覚, 上田 博子, 山田 恭聖
2. 発表標題 超低出生体重児にリネゾリド投与中生じた高血糖と乳酸アシドーシス
3. 学会等名 日本新生児成育学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 垣田 博樹, 中村 奈見, 浅井 慎平, 浅井 貴文, 森 麻里, 竹下 覚, 上田 博子, 山田 恭聖, 青山 峰芳, 青木 啓将, 鳥内 皐暉
2. 発表標題 低温状態はミクログリアの炎症性サイトカイン、iNOS発現および食欲能抑制することで神経保護効果を発揮する
3. 学会等名 日本新生児成育学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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