

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日 現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591823

研究課題名（和文） 新生児脳障害に特異的な病態の解明～胎児脳における甲状腺ホルモン関連分子の重要性～

研究課題名（英文） The involvement of thyroid hormones and related molecules in neuroprotective mechanisms in the developing brain.

研究代表者

富松 拓治（ TOMIMATSU TAKUJI ）

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30346209

研究成果の概要（和文）：

甲状腺ホルモンは胎児の中枢神経発達に必要なさまざまな作用、すなわち神経細胞の分化等に必須の役割を果たしていることが明らかにされており、これらの障害が起きることで胎児・新生児の中枢神経に不可逆的な障害を来すと考えられています。しかしながら、胎児・新生児における脳障害・脳保護の基礎的メカニズムにおける甲状腺ホルモンのかわりについてはほとんどわかっていません。

今回の研究では、新生児低酸素性虚血性脳症に対して強力な保護効果を示す、**Hypoxic-preconditioning(HPC)**（あらかじめ軽度な低酸素刺激を与えておくこと、重度な低酸素に対して耐性ができるという作用のこと）の脳保護のメカニズムに、脳内の甲状腺ホルモン、甲状腺核内レセプター(**TRa, TRb**)、甲状腺脱ヨード酵素活性(**Dio2, Dio3**)が深くかかわっていることを新生児ラットを用いた研究にて明らかにしました。

**Hypoxic-preconditioning(HPC)**により、新生児ラットの脳内では甲状腺ホルモンの値は上昇し、また甲状腺ホルモンの下流にあると考えられる **myelin basic protein (MBP)**や、**Glutamate transporter 1(GLT1)**の発現も上昇していました。甲状腺ホルモン値の上昇は甲状腺脱ヨード酵素活性(**Dio2**)の上昇によるものと考えられました。

今回の研究成果から、胎児・新生児脳障害・脳保護のメカニズムに甲状腺ホルモンおよびその関連分子が深くかかわっていることが明らかとなり、成人における脳障害とは異なるメカニズムの存在が明らかとなりました。また、妊娠中の母体・胎児甲状腺機能のコントロールの重要性が示唆される結果と考えられます。

研究成果の概要（英文）：

Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) is one of the major causes of neurodegeneration and mortality in the neonatal period. Although hypoxic preconditioning (HPC) provided strong neuroprotection against HIE in an animal model, the mechanism underlying this effect is not fully understood especially in the immature brain. Here, we investigated whether thyroid hormones (THs), which are essential during normal brain development, contribute to the neuroprotective mechanisms of HPC by using an established model of HPC in neonatal rats. HPC treatment (8% O<sub>2</sub> for 2.5 h at 37° C) was performed in immature rats at postnatal day 6 (P6). Subsequently, we investigated the levels of THs, TH receptors (TRs) and type 2 and 3 deiodinases (D2 and D3) mRNA, and myelin basic protein (MBP) at 24 h after HPC treatment at P7. The local level of triiodothyronine (T3) was upregulated 24 h after HPC treatment in the developing rat brain, probably via the upregulation of D2. In addition, the expression of MBP, which is the downstream protein of T3, was significantly increased 24 h after HPC treatment. The present study indicates that thyroid hormones and their associated molecules may play a significant role in neuroprotective mechanisms during the developmental period.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：産科学、新生児脳障害、甲状腺ホルモン、脳性麻痺

### 1. 研究開始当初の背景

甲状腺ホルモンは胎児の中枢神経発達に必要なさまざまな作用、すなわち神経細胞の分化等に必須の役割を果たしていることが明らかにされており、これらの障害が起きることで胎児新生児の中枢神経に不可逆的な障害を来すことが広く知られています。しかしながら、胎児・新生児における低酸素性虚血性脳障害の対する脳保護の基礎的メカニズムにおける甲状腺ホルモンのかかわりについてはほとんどわかっていません。

### 2. 研究の目的

今回の研究の目的は、新生児低酸素性虚血性脳症に対して強力な保護効果を示す、**Hypoxic-preconditioning(HPC)** (あらかじめ軽度な低酸素刺激を与えておくと、重度な低酸素に対して耐性ができるという作用のこと)の脳保護のメカニズムに、脳内の甲状腺ホルモン、甲状腺核内レセプター(**TRa, TRb**)、甲状腺脱ヨード酵素活性(**Dio2, Dio3**)が深くかかわっていることを新生児ラットを用い明らかにすることです。

### 3. 研究の方法

新生児低酸素性虚血性脳症に対して強力な保護効果を示す、**Hypoxic-preconditioning(HPC)**のモデルを使用した。具体的には、低酸素虚血負荷前24時間前に軽度の低酸素負荷(8%酸素に2.5時間暴露するものである)。

その後24時間後にHPC群とコントロール群に対して低酸素虚血負荷(左総頸動脈結紮、

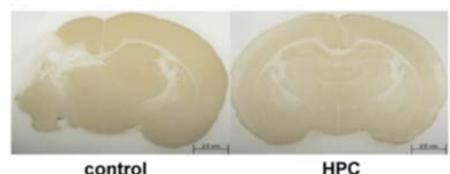
8%酸素に1時間暴露)を行い、14日後にMAP-2[microtubule-associated protein 2:神経細胞のマーカー]およびMBP[myelin basic protein:グリア細胞のマーカー]の免疫組織染色を行い、**Hypoxic-preconditioning(HPC)**の効果を測定した。(研究1)

次に**Hypoxic-preconditioning(HPC)**のモデル作成後24時間での、甲状腺ホルモン(triiodothyronine:T3, thyroxine:T4)及びその関連因子TH receptors(甲状腺ホルモン受容体:TRs)、type 2 and 3 deiodinase(D2 and D3) mRNA, glutamate transporter 1(GLT1)を測定し、**Hypoxic-preconditioning(HPC)**と甲状腺関連分子との関連を明らかにし、脳保護メカニズムと甲状腺ホルモンおよびその関連分子の関連を検討した。(研究2)

### 4. 研究成果

(研究1)

**Hypoxic-preconditioning(HPC)**のモデル作成後24時間後に低酸素虚血負荷(左総頸動脈結紮、8%酸素に1時間暴露)を行い、14日後にMAP-2[microtubule-associated protein 2:神経細胞のマーカー]の免疫組織染色をした結果、**Hypoxic-preconditioning(HPC)**を行った群で有意にMAP-2染色領域が保たれていた。

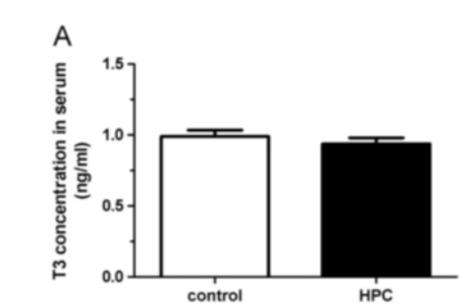


Hypoxic-preconditioning(HPC) のモデル作成後 24 時間後に低酸素虚血負荷 (左総頸動脈結紮、8%酸素に 1 時間暴露) を行い、14 日後に MBP[myelin basic protein: グリア細胞のマーカー] の免疫組織染色を行った結果、こちらにも Hypoxic-preconditioning(HPC) を行った群で有意に MBP の染色領域が保たれていた。

これらの結果からは、従来言われてきたように Hypoxic-preconditioning(HPC) は神経細胞やグリア細胞の虚血性低酸素性の障害に対して強力な脳保護作用があることが確認された。

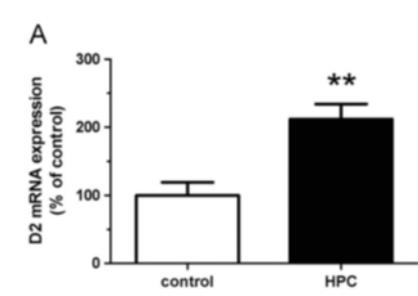
### (研究 2)

次に Hypoxic-preconditioning(HPC) のモデル作成後 24 時間での、甲状腺ホルモン (triiodothyronine :T3, thyroxine :T4) の脳内の濃度を測定した結果、Hypoxic-preconditioning(HPC) を行った群で有意に T3 の濃度が上昇していた。また T4 濃度はコントロール群に比して変化がなかった。

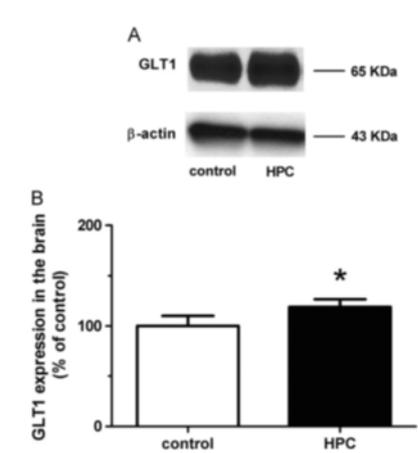


Hypoxic-preconditioning(HPC) のモデル作成後 24 時間での、TH receptors (甲状腺ホルモン受容体: TRs) の脳内の発現を RT-PCR にて測定した結果、Hypoxic-preconditioning(HPC) を行った群で有意に TR $\alpha$  の発現が上昇していた。

Hypoxic-preconditioning(HPC) のモデル作成後 24 時間での、type 2 および type 3 deiodinase (D2 and D3) mRNA の発現を測定した結果、Hypoxic-preconditioning(HPC) を行った群で有意に D2 の発現が上昇していた。D3 発現には差が見られなかった。



Hypoxic-preconditioning(HPC) のモデル作成後 24 時間での、glutamate transporter 1 (GLT1) 発現を測定した結果、Hypoxic-preconditioning(HPC) を行った群で有意に glutamate transporter 1 (GLT1) の発現が上昇していた。



今回の研究によって、新生児低酸素性虚血性脳症に対して強力な保護効果を示す、Hypoxic-preconditioning(HPC) (あらかじめ軽度な低酸素刺激を与えておくと、重度な低酸素に対して耐性ができるという作用のこと) の脳保護のメカニズムに、胎児脳内の甲状腺ホルモン、甲状腺核内レセプター (TR $\alpha$ , TR $\beta$ )、甲状腺脱ヨード酵素活性 (Dio2, Dio3) が深くかかわっていることを新生児ラットを用いた研究にて明らかにしました。

Hypoxic-preconditioning(HPC) により、新生児ラットの脳内では甲状腺ホルモンの値は上昇し、また甲状腺ホルモンの下流にあると考えられる myelin basic protein (MBP) や、Glutamate transporter 1 (GLT1) の発現も上昇していました。甲状腺ホルモン値の上昇は甲状腺脱ヨード酵素活性 (Dio2) の上昇によるものと考えられました。このことが、脳保護メカニズムにつながっていることが考えられました。

今回の研究成果から、胎児・新生児脳障害・脳保護のメカニズムに甲状腺ホルモンおよびその関連分子が深くかかわっていることが明らかとなり、成人における脳障害とは異なるメカニズムの存在が明らかとなりました。また、妊娠中の母体・胎児甲状腺機能のコントロールの重要性が示されました。

## 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 3 件)

1)

Minato K, Tomimatsu T, Mimura K, Jugder O, Kakigano A, Kanayama T, Fujita S, Taniguchi Y, Kanagawa T, Endo M, Kimura T.

Hypoxic preconditioning increases triiodothyronine (T3) level in the developing rat brain.

Brain Res. 2013 ;1501:89-97. doi: 10.1016/j.brainres.2013.01.036. 査読有

2)

Tomimatsu T, Kakigano A, Mimura K, Kanayama T, Koyama S, Fujita S, Taniguchi Y, Kanagawa T  
Kimura T

Maternal hyperventilation during labor revisited: its effects on fetal oxygenation.

Reprod Sci. 2012 ;19(11):1169-74. doi: 10.1177/1933719112443881. 査読有

3)

富松拓治

母体甲状腺機能と出生児の中樞神経発達  
産婦人科の進歩

産婦人科の進歩 64 巻 3 号  
Page426-429(2012.09) 査読なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

富松拓治 (TOMIMATSU TAKUJI)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30346209

(2)研究分担者

金川武司 (KANAGAWA TAKESHI)

大阪大学 医学系研究科・助教

研究者番号：40346218

谷口 友基子 (TANIGUCHI YUKIKO)

大阪大学 医学系研究科・助教

研究者番号：60423175