

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791125

研究課題名(和文) 早産児小脳障害と女性ホルモンの関与及び治療応用について

研究課題名(英文) Therapeutic effects of the female hormones against cerebellar white matter injury in the preterm infant

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内炎症モデルラットより出生した新生児ラットの小脳組織においては、白質髄鞘化の指標であるmyelin basic protein (MBP)及び2', 3'-cyclic nucleotide phosphodiesterase (CNP)の遺伝子発現は、controlに比し、有意に低下しており、子宮内炎症により小脳白質の髄鞘化が障害されることが示唆された。本モデルに対するprogesteroneの治療効果を検証したが、出生前及び出生後投与ともに小脳白質の髄鞘化障害に対して有意な改善は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：An intrauterine inflammation rat model was made by intraperitoneal injection of Lipopolysaccharide (LPS) to late gestational pregnant rats (LPS-treated group). The control rats were injected with the same volume of saline. After birth, the cerebellar tissues were harvested from 7 day-old rat pups of both groups. Real-time RT-PCR showed gene expression of myelinating markers, myelin basic protein (MBP) and 2', 3'-cyclic nucleotide phosphodiesterase (CNP) both decreased significantly in the cerebellar tissues of LPS rats compared to those of control rats. Decreased cerebellar gene expression of MBP and CNP in LPS-treated rats could not be reversed by intraperitoneal administration of progesterone to either mothers or neonates. We conclude that progesterone has no effect on myelination in the injured neonatal cerebellar white matter induced by intrauterine inflammation.

研究分野：新生児医学

キーワード：preterm infant cerebellar injury myelination female hormones progesterone

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 早産児における小脳の構造異常は、その神経発達予後に関与することが示唆されている。(Allin et al. Brain. 2001, Limperopoulos et al. Pediatrics. 2007, Messerschmidt et al. Eur J Pediatr. 2008) また、早産の一因と考えられている子宮内感染/炎症は、未熟脳への傷害や神経発達予後にも関与することが証明されており (Yoon BH et al. BJOG. 2003) 小脳傷害に関しても、羊胎児を用いた子宮内炎症モデルにおいて、胎児小脳内 apoptosis 細胞の増加、microglia の活性化とともに、小脳白質の成熟 oligodendrocyte 数の減少がみられているという報告がある。(Gavilanes AW et al. Am J Obstet Gynecol. 2009, Dean JM et al. Neuroscience. 2009)

(2) Neuron 及び glia には Steroid hormone receptor が存在し、末梢のステロイド産生臓器で産生された Steroid hormone は血液脳関門を透過、中枢神経へと到達し神経機能の制御に関与する。近年、脳自身がステロイドホルモンを合成し得ることが判明し、これら中枢神経で産生されるステロイドは "neurosteroid" と称されるようになった。(Melcangi RC et al. Neuroscience. 2006) "neurosteroid" の中枢神経における作用として、神経保護作用、神経発達作用、及び記憶・学習など高次機能に関する作用等、様々な機能に関与することが明らかになったが、我々はこれら "neurosteroid" の中でも性ステロイドである progesterone 及び estradiol の作用に着目した。

新生児ラットの脳 Purkinje 細胞は、estrogen receptor (ER) 及び progesterone receptor (PR) を発現し、また estradiol 及び progesterone の産生能を有するが、その receptor 発現及びホルモン産生は新生児期にピークを迎え、以後、急速に減衰することが知られている。(Ukena et al. Endocrinology. 1998, 1999, Sakamoto et al. Neurosci Lett. 2003, Endocrinology. 2003)

さらに、新生児ラットを用いた in vitro 及び in vivo study において、estradiol 及び progesterone は共に小脳 purkinje 細胞においては樹状突起の形成及び成熟を促進、シナプスを増加させ、さらに、これらの作用が各々の特異的レセプター (ER, PR) を介することが示唆された。(Sakamoto et al. J Neurosci. 2001, Endocrinology. 2003)

また、progesterone は小脳 oligodendrocyte において、前駆体の増殖及び髄鞘化を促進したが、これらの作用は progesterone receptor antagonist により阻害されたという報告も為されている。(Ghoumari et al. J Neurochem. 2003)

(3) 上記 (1) (2) の事実と、新生児ラットの脳の成熟度はヒトの在胎 24 週 ~ 26 週に相当するという事実と併せ、ヒトにおいては、女性ホルモン (estradiol and

progesterone) は妊娠後期の胎児の小脳発達に関与し、それらの作用は小脳に存在する各々のレセプター (ER, PR) を介する可能性が考えられる。

以上より、「子宮内感染/炎症により新生児小脳における女性ホルモン産生及びそのレセプター発現は低下、それにより小脳の発達が遅延、成長後の学習・認知機能が低下する」、「早産児への女性ホルモンの投与が小脳の正常な発達を促進し、成長後の神経学的予後を改善する」という仮説が立てられる。

## 2. 研究の目的

「子宮内感染/炎症により新生児小脳における女性ホルモン産生及びそのレセプター発現は低下し、それにより小脳の発達が遅延、成長後の学習・認知機能が低下する」、「早産児への女性ホルモンの投与が小脳の正常な発達を促進し、成長後の神経学的予後を改善する」という仮説を検証し、早産児小脳傷害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

### 実験 1. 子宮内炎症モデル

妊娠ラットに胎齢 18, 19 に LPS (Lipopolysaccharide) 500 µg/kg を腹腔内投与し、出生後の産仔を LPS 群とする。同容量の生理食塩水を偽薬として内投与した母体より出生した産仔を control 群とし、日齢 7 に屠殺。小脳組織を採取する。新生児小脳より抽出した RNA 及び蛋白ホモジネートを用い、それぞれ、RT-PCR 及び Western blot analysis を行い、目的物質の遺伝子及び蛋白発現を測定。2 群間で比較検討した

### 実験 2. Progesterone 投与実験

#### 出生前 (母体) 投与

上記の LPS 及び偽薬投与妊娠ラットに、胎齢 18, 19, 20 に progesterone 20mg/kg 又は同容量の偽薬を連日投与 (腹腔内投与) する。ともに偽薬を用いたラットより出生した群を v (vehicle)-v (vehicle) 群、偽薬及び progesterone を投与したラットより出生した群を v-P 群、LPS 及び偽薬を用いた群を L-v 群、LPS 及び progesterone 投与を行ったラットより出生した群を L-P 群の 4 群に分け、実験 1 と同様に検体採取し各種測定項目を各群間で比較検討した。

#### 出生後 (新生児) 投与

上記の LPS 及び偽薬投与妊娠ラットより出生した産仔を、出生当日から日齢 7 まで progesterone 20mg/kg 又は同容量の偽薬を連日投与 (腹腔内投与) する。control 妊娠ラットより出生後、偽薬を投与した群を vehicle-post-vehicle (v-p-v) 群、control 妊娠ラットより出生後、progesterone を投与した群を vehicle-post-progesterone (v-p-P) 群、LPS 投与妊娠ラットより出生後、偽薬を投与した群を LPS-post-vehicle (L-p-v) 群、LPS 投与妊娠ラットより出生後、

progesterone を投与した群を LPS-post-progesterone(L-p-P) 群の 4 群に分け、実験 1 と同様に検体採取し各種測定項目を各群間で比較検討した。mRNA 及び蛋白発現は、それぞれ、GAPDH 及び  $\beta$ -actin を用いて補正し、各群間の測定値の比較には、統計解析ソフト(SAS 社 "JMP® 11 ") を用いて、多群間においては Kruskal-Wallis 検定、2 群間では Mann-Whitney 検定を行った。

#### 4. 研究成果

母体への LPS 投与により、新生児ラット小脳細胞のアポトーシスが増加することは preliminary study と同様、今回の実験でも再確認できた。また、LPS 母体投与により既報どおり出産仔数及び産仔出生体重は減少することも確認した。(産仔数:  $15 \pm 2.7$  v.s.  $10 \pm 5.2$ ,  $p=0.059$ , 産仔出生体重:  $6.6 \pm 0.4g$  v.s.  $4.8 \pm 0.2g$ , control 群 v.s. LPS 群,  $p<0.001$ )

子宮内炎症による胎児小脳の髄鞘化への影響をみるため、成熟 Oligodendrocyte にのみ発現する myelin basic protein (MBP) 及び 2', 3' -cyclic nucleotide phosphodiesterase (CNP) mRNA 発現を測定した。新生児ラット小脳中 MBP 及び CNP mRNA 発現は control 群に比し LPS 投与群において有意に低下しており (MBP 遺伝子相対発現:  $1.0 \pm 0.2$  v.s.  $0.6 \pm 0.3$ ,  $p=0.02$ , CNP 遺伝子相対発現:  $1.0 \pm 0.4$  v.s.  $0.7 \pm 0.2$ ,  $p=0.04$ , control 群 v.s. LPS 群) 子宮内炎症により新生児小脳の髄鞘化は障害される可能性が示唆された。(図 1, 2)

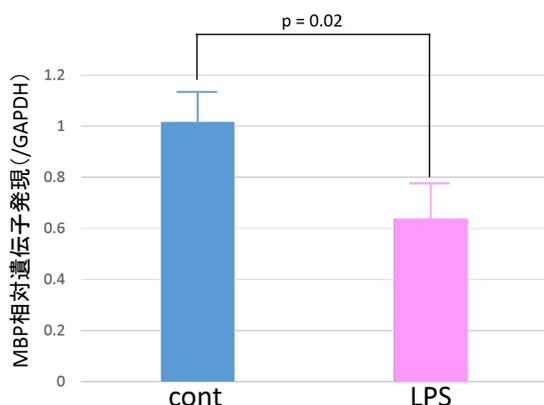


図1. 新生児ラット小脳中MBP遺伝子発現

※値=平均±標準誤差  
※cont=cotrol群(n=6), LPS=LPS群(n=7)

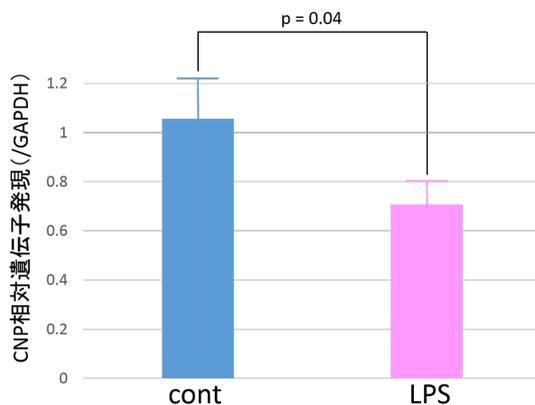


図2. 新生児ラット小脳中CNP遺伝子発現

※値=平均±標準誤差  
※cont=cotrol群(n=6), LPS=LPS群(n=8)

日齢 7 の新生児ラット小脳中 progesterone receptor (PR) 及び progesterone 産生の律速酵素である 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) の蛋白及び mRNA 発現は LPS 投与群と control 群では有意差はみられず、小脳内 progesterone 受容体発現及び progesterone 産生は、子宮内炎症の影響を受けないと考えられた。

次に、子宮内炎症モデルにおける progesterone 投与効果を検証した。(実験 2) Progesterone 投与は、出生前(母体)及び出生後(新生児)投与を行い、各々の効果を検証した。

#### 出生前(母体)投与

出産仔数は LPS 投与により減少する傾向がみられたが、progesterone 投与による差はみられなかった。産仔出生体重は、progesterone 投与により有意に増加していた。(v-v 群 v.s. v-P 群 v.s. L-v 群 v.s. L-P 群;  $6.1 \pm 0.6g$  v.s.  $6.9 \pm 0.4g$  v.s.  $5.6 \pm 0.5g$  v.s.  $6.3 \pm 0.3g$ ,  $p < 0.001$ : v-v 群 v.s. v-P 群,  $p=0.01$ : L-v 群 v.s. L-P 群,  $p < 0.005$ : v-v 群 v.s. L-v 群) 小脳組織中 MBP 及び CNP mRNA 発現は、母体 LPS 投与により有意に低下していたが、出生前 progesterone 投与による有意な変化はみられず、むしろ、その発現はさらに低下する傾向がみられた。(MBP 遺伝子相対発現:  $1.0 \pm 0.2$  v.s.  $0.8 \pm 0.5$ ,  $p=0.54$ , CNP 遺伝子相対発現:  $1.0 \pm 0.4$  v.s.  $0.9 \pm 0.7$ ,  $p=0.38$ , L-v 群 v.s. L-P 群)

#### 出生後(新生児)投与

出産仔数は各群間で有意差は無かったが、L-p-P 群においては生後 7 日までの死亡率は他群に比べ有意に高かった (Log-rank test,  $p=0.01$ )。産仔の死亡状況より、progesterone の中枢神経鎮静作用が LPS 前投与により増強した結果、呼吸抑制により死に至った可能性が考えられた。出生後の新生児ラットへの progesterone 投与により小脳組織中 CNP mRNA 発現に有意な変化はみられなかった。(CNP 遺伝子相対発現:  $1.0 \pm 0.1$  v.s.  $1.4 \pm 1.3$ ,  $p=0.66$ , L-p-v 群 v.s. L-p-P 群)(図

3,4,5)

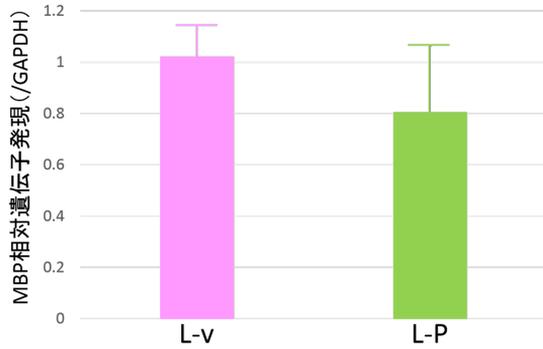


図3. 新生児ラット小脳中MBP遺伝子発現

※値=平均±標準誤差  
※L-v=母体LPS+偽薬投与群 (n=4),  
L-P=母体LPS+Progesterone投与群 (n=5)

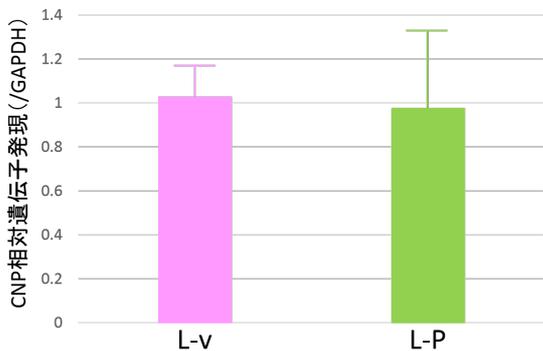


図4. 新生児ラット小脳中CNP遺伝子発現

※値=平均±標準誤差  
※L-v=母体LPS+偽薬投与群 (n=4),  
L-P=母体LPS+Progesterone投与群 (n=5)

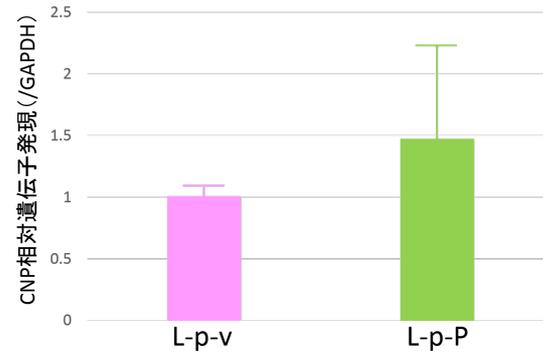


図5. 新生児ラット小脳中CNP遺伝子発現

※値=平均±標準誤差  
※L-v=母体LPS+新生児偽薬投与群 (n=3),  
L-P=母体LPS+新生児Progesterone投与群 (n=3)

以上より、子宮内炎症モデルにおける progesterone の治療効果は明らかでなく、むしろ有害である可能性が考えられた。

### 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)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔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(新生児科)・助教  
研究者番号：90434779