

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461641

研究課題名(和文) 新生児低酸素性虚血性脳症の予防に向けた胎児治療戦略に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Research on prevention strategy of hypoxic-ischemic encephalopathy of neonate

研究代表者

亀井 良政 (KAMEI, YOSHIMASA)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：00251265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：早産児の脳室周囲白質軟化症(PVL)における、後期オリゴデンドロサイト前駆細胞(pre-OLs)の損傷に対する低温の効果、in vivoラットPVLモデルとin vitro pre-OLs / 脊髄後根神経節ニューロン培養系を用いて検討した。低温はpre-OLsのアポトーシスを抑制し、低酸素虚血負荷によるリン酸化myelin basic protein (MBP)、特にexon2を含むアイソフォームの減少を抑制した。その作用機序として、低酸素虚血負荷によるERKリン酸化減少の抑制と、Ddx54を介したMBP mRNA発現抑制の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigate the effectiveness and mechanism of hypothermia for the inhibition of pre-OLs damage in PVL using in vivo and in vitro studies. For in vivo studies, the loss of myelin basic protein (MBP) was inhibited by hypothermia. For in vitro studies, hypothermia inhibited apoptosis of pre-OLs, and despite specific down-regulation of 21.5- and 17-kDa MBP mRNA expression during hypothermia, recovery of the expression after OGD was superior compared with normothermia. OGD caused disarrangement of MBP distribution, decreased levels of phosphorylated 21.5-kDa MBP, and disturbed the capacity to contact with neurons, all of which were restored by hypothermia. U0126 treatment during/after OGD significantly reduced the protective effects of hypothermia on apoptosis and myelination, respectively. These data suggest that phosphorylated exon 2-containing MBP isoforms may play critical roles in myelination via ERK1/2 phosphorylation.

研究分野：周産期医学

キーワード：脳室周囲白質軟化症 低酸素虚血性脳症 マイクログリア 脳低温療法 ミエリン塩基性蛋白

## 1. 研究開始当初の背景

周産期医療の進歩により早産児の救命率は改善しているが、新生児の低酸素性虚血性脳症(hypoxic ischemic encephalitis:HIE)は脳性麻痺の原因となり、障害なき生存は重要な課題である。正期産児のHIEに対しては、脳低温療法の有用性が証明され、全国的に普及が進められている。しかし、脳低温療法は生後6時間以内に開始することが条件となり、周産期センター以外で出生した症例では搬送に要する時間が問題となる。また、発達段階にある新生児の脳に対する、低温の保護効果について、基礎的なメカニズムは明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

- (1) 我々が初めて同定したオリゴデンドロサイト前駆細胞増殖に関わる新規細胞内シグナル伝達システムを検証し、従来有効とされてきた脳低温療法の仕組みを解明し、オリゴデンドロサイトの保護あるいは増殖刺激をもたらす新規化学物質を同定し、その効果を *in vivo* ならびに *in vitro* で確認する。
- (2) 低酸素虚血負荷によるPVLの *in vivo*, *in vitro* モデルを用いて、髄鞘形成過程において必須の蛋白であるMBPが、低酸素虚血により減少し、低温によって活性化されるような諸因子を同定する。
- (3) 低酸素性虚血性脳症の発症段階におけるミクログリアの関与のメカニズムを検討する。

## 3. 研究の方法

低温による OPC 保護作用の分子機構解明

妊娠 18 日ラット胎児より、大脳半球を摘出し、mixed glial culture を作成し、5 日後に OPC を単離し、OPC 初代培養系を既に確立した方法で作成する。低酸素無糖負荷を 37 または 31.5 のインキュベーターで 6 時間かける。低酸素状態から開放し

た 1 日後に、蛋白を回収し、ERK1/2 及び Phospho ERK1/2 発現の影響を検討する。

低温によるオリゴデンドロサイト分化に必要な候補因子の同定

(1)ラット PVL モデルにおいて MBP のどの isoform がPVLの病態及び低温による治療効果と関連するか調べる。

(2)MBP の各 isoform の mRNA 発現レベルを解析する。

ミクログリアの機能解析の検討

低酸素負荷の際にノルエピネフリンが増加することが知られている。選択的なノルエピネフリンの reuptake 阻害剤 Atomoxetine(ATM)が正期産児における低酸素虚血性脳症(HIE)に対する脳低温療法の代替薬物療法として有用であるかを検討した。

## 4. 研究成果

**低温は、低酸素虚血負荷による白質障害を軽減した**

**低温は、*in vivo* PVL モデルにおいて、17 と 21.5kDa リン酸化 MBP を有意に維持した**

**低温は脳室周囲白質においてアポトーシスを抑制した**

**低温はオリゴデンドロサイトの ERK1/2 リン酸化レベルを維持した**

**低温は、*in vitro* で pre-OLs のアポトーシスを抑制した**

**低温は、MBP の細胞内分布を細胞突起まで維持した**

**21.5kDa MBP は、オリゴデンドロサイトと DRG ニューロン共培養系において、髄鞘形成の初期段階でリン酸化を受けた**

**低温は、オリゴデンドロサイトの、ニューロンとの接触能を OGD 負荷から保護した**

**低温は ERK リン酸化レベルを維持した**

**低温によりアポトーシス抑制効果には、ERK1/2 リン酸化が関与していた**

**低温の、オリゴデンドロサイトのニューロンとの接触能維持効果には、ERK1/2 リン酸化が関与していた**

**MBP exon2 を含む mRNA は低温により発現が抑制され、OGD 負荷の後に常温に戻すことで回復した**

**MBP mRNA の発現調節に関与する候補遺伝子のうち、Ddx54 は低温下で発現が増加していた**

**Ddx54 は、NIH3T3、NG108-15、FBD-102b 細胞株において、MBP の転写活性を抑制した**

**低酸素性虚血性脳症(HIE)モデルの新生児ラットを用いた検討では、選択的ノルエピネフリン再取り込み阻害剤アトモキセチンを使用して、転写因子 CREB のリン酸化亢進とアポトーシスの抑制を認め、組織学的に脳障害が軽減した。**

**ミクログリア初代培養系を用いた検討では NE が LPS によるミクログリア IL-1 $\beta$  蛋白産生を抑制し、低酸素によるミクログリア iNOS/Arg1 mRNA 発現比を低下させた。**

## 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9件)

Otsuki K, Nakai A, Matsuda Y, Shinozuka N, Kawabata I, Makino Y, Kamei Y, Iwashita M, Okai T.

Randomized trial of ultrasound-indicated cerclage in singleton women without lower genital tract inflammation.

J Obstet Gynaecol Res. 査読有 2015 Dec 3.

doi: 10.1111/jog.12880

Dharajiya NG, Namba A, Horiuchi I, Miyai S, Farkas DH, Almasri E, Saldivar JS, Takagi K, Kamei Y.

Uterine leiomyoma confounding a noninvasive prenatal test result.

Prenat Diagn. 査読有 2015 Oct;35(10):990-3.

doi: 10.1002/pd.4629

Tamaru S, Mizuno Y, Tochigi H, Kajihara T, Okazaki Y, Okagaki R, Kamei Y, Ishihara O, Itakura A.

MicroRNA-135b suppresses extravillous trophoblast-derived HTR-8/SVneo cell invasion by directly down regulating CXCL12 under low oxygen conditions.

Biochem Biophys Res Commun. 査読有 2015 May 29;461(2):421-6.

doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.055

Nishiyama M, Yan J, Yotsumoto J, Sawai H, Sekizawa A, Kamei Y, Sago H.

Chromosome abnormalities diagnosed in utero: a Japanese study of 28 983 amniotic fluid specimens collected before 22 weeks gestations.

J Hum Genet. 査読有 2015 Mar;60(3):133-7.

doi: 10.1038/jhg.2014.116

Nakagami H, Kajihara T, Kamei Y, Ishihara O, Kayano H, Sasaki A, Itakura A.

Amniotic components in the uterine vasculature and their role in amniotic fluid embolism.

J Obstet Gynaecol Res. 査読有 2015 Jun;41(6):870-5.

doi: 10.1111/jog.12650

Ichinose M, Kamei Y, Iriyama T, Imada S, Seyama T, Toshimitsu M, Asou H, Yamamoto M, Fujii T.

Hypothermia attenuates apoptosis and protects contact between myelin basic protein-expressing oligodendroglial-lineage cells and neurons against hypoxia-ischemia.

J Neurosci Res. 査読有 2014 Oct;92(10):1270-85.

doi:10.1002/jnr.23418

Yamamoto Y, Yamashita T, Tsuno NH, Nagamatsu T, Okochi N, Hyodo H, Ikeda T, Kawabata M, Kamei Y, Nagura Y, Sone S, Fujii T, Takahashi K, Kozuma S. Safety and efficacy of preoperative autologous blood donation for high-risk pregnant women: experience of a large university hospital in Japan.

J Obstet Gynaecol Res. 査読有 2014 May;40(5):1308-16.

doi: 10.1111/jog.12348

Nagamatsu T, Kamei Y, Yamashita T, Fujii T, Kozuma S.

Placental abnormalities detected by ultrasonography in a case of confined placental mosaicism for trisomy2 with

severe fetal growth restriction.

J Obstet Gynaecol Res. 査読有 2014 Jan;40(1):279-83.

doi: 10.1111/jog.12145

Namba A, Nishiyama M, Weiser JJ, Wyatt P, Kimura M, Niizawa R, Miki A, Ishihara O, Itakura A, Kamei Y.

Prenatal diagnosis of complex rearrangement of chromosome 21: The significance of interphase and metaphase fluorescence in situ hybridization and comparative genomic hybridization.

Clin Case Rep. 査読有 2013 Dec;1(2):50-3.

doi: 10.1002/ccr3.22

〔学会発表〕(計5件)

利光 正岳, 亀井 良政, 市瀬 菜里, 瀬山 貴博, 今田 信哉, 入山 高行, 藤井 知行  
新生児低酸素性虚血性脳症モデルラットを用いた神経伝達物質ノルエピネフリンの脳保護効果の検討

第50回日本周産期・新生児医学会学術集会

H26.7.13-15

浦安市、シェラトン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル

田丸 俊輔, 板倉 敦夫, 梶原 健, 亀井 良政, 石原 理

胎盤関連の分子 妊娠初期絨毛外栄養膜細胞において酸素濃度により発現変動するマイクロRNAとその標的遺伝子の網羅的解析と細胞浸潤能への関与

第66回日本産科婦人科学会学術講演会

H26.4.18-20

東京、東京国際フォーラム

利光正岳、亀井良政、市瀬菜里、瀬山貴博、今田信哉、入山高行、藤井知行  
周産期脳障害モデルラットを用いた神経伝

達物質ノルエピネフリンの保護効果の検討  
第 51 回日本周産期・新生児医学会学術集  
会 2015.7.10-12  
福岡、ヒルトン福岡シーホーク

亀井良政、瀧間浄宏、日本胎児心臓病学  
会データベース委員会  
レベル 2 胎児心臓超音波検査 多施設  
Online 全国登録について  
第 51 回日本周産期・新生児医学会学術集  
会  
2015.7.10-12  
福岡、ヒルトン福岡シーホーク

利光正岳、亀井良政、市瀬茉莉、瀬山貴  
博、今田信哉、大須賀穰、藤井知行  
周産期脳障害モデルラットを用いた神経伝  
達物質ノルエピネフリンの保護効果の検討  
第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会  
2015.4.9-12  
横浜、パシフィコ横浜

〔図書〕(計 2 件)

堤治、武谷雄二、石原理、平原史樹、小  
笹由香、末岡浩、亀井良政、川名敬、水沼  
英樹、佐世正勝(共同執筆)  
金原出版  
助産学講座(2)基礎助産学(2)母子の  
基礎科学 第 5 版、2014、286

亀井良政 他(分担執筆)

メディカルビュー社  
プリンシプル産婦人科学 2 産科編  
2014、742

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

亀井 良政(KAMEI, Yoshimasa)  
埼玉医科大学・医学部・教授