

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461628

研究課題名(和文) Subplate neuronの損傷が胎生期の脳皮質形成に与える影響の解析

研究課題名(英文) Potential role of subplate neuronal damage on the fetal cortical development

研究代表者

埴田 卓志 (HANITA, TAKUSHI)

東北大学・大学病院・助手

研究者番号：30400360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：サブプレート層は胎児期の脳皮質と皮質下白質の境界に存在し、皮質形成に重要な役割を果たしているが、この層に含まれる神経細胞群(サブプレート神経細胞)は炎症や酸化ストレスに対して脆弱であり、胎児期のサブプレート損傷は将来の皮質形成や脳回の発達抑制を引き起こす可能性が高い。本研究ではヒツジ胎仔における脳白質損傷モデルを用いて胎仔脳のMRI撮影を行い、サブプレート層が同定できることを確認した。また、サブプレート神経細胞の特異抗体であるNurr-1に対して免疫組織染色を行い、組織病的にもサブプレート層を同定できた。

研究成果の概要(英文)：Subplate layer is located between cerebral cortex and subcortical white matter only in the fetus. Since the subplate neurons are vulnerable against inflammation and oxidative stress, subplate injury in the developing brain might cause abnormal cortical development or disturbed gyral formation. Using our established model of cerebral white matter injury in the ovine fetus, we could determine the subplate layer in the MRI, where the subplate neuronal cells were detected in the immunohistochemistry against anti Nurr-1 antibody.

研究分野：医歯薬学 内科系臨床医学 胎児・新生児医学

キーワード：サブプレート 胎児 脳白質損傷 脳回形成 MRI

### 1. 研究開始当初の背景

周産期医療の飛躍的な発展により、極低出生体重児（出生体重<1,500 g）の救命率は過去 20 年間で目覚ましい改善を見せている。しかし、生存率の上昇にも関わらずその 5~10%には脳性麻痺が認められ、10~20%では学童期に発達障害を指摘されるなど、中枢神経系合併症の罹患率には十分な改善が見られない。したがって、高度に発達した現代の周産期医療においてさえ、発達段階にある胎児早産児の脳を障害から守ることは喫緊の課題である。

極低出生体重児における中枢神経系合併症の病像は近年大きな変化を遂げてきた。1990 年代に注目された脳室内出血や嚢胞性脳白質損傷などの組織破壊性病変は母胎管理ならびに新生児集中治療の発達に伴って著しく減少した。その一方で、核磁気共鳴像 (MRI) を用いた詳細な画像解析の導入によって、びまん性脳白質損傷、脳灰白質容量の減少、脳回形成異常など、明らかな組織破壊を伴わず脳の構造的発達を変容させる病変が臨床現場で徐々に認識され始めている。

さらに、学童期に発達障害（認知障害、自閉傾向、注意欠陥多動、学習障害）のみを指摘される早産児の存在が注目されている。こうした発達障害を従来の組織破壊性病変に基づいて説明することは難しく、上述した脳構造の変容、すなわち大脳皮質の構造的な発達異常が関連している可能性が高い。早産児は正期産児に比較して、脳回形成が不良で脳表面積が少なく、これが発達障害に関連する可能性が指摘されているからである。しかし、発達過程のどの時期にどの環境要因がこうした変化を引き起こすのか、その詳細なメカニズムは未だ明らかにされていない。

そこで本研究では、胎生期の大脳皮質と皮質下白質の境界に存在し皮質形成に重要な役割を果たしているサブプレート層に注目した。この層に含まれる神経細胞群は炎症や酸化ストレスに対して脆弱とされているばかりか、位置的に脳白質損傷の影響を受けやすい。しかも脳皮質と基底核群を連結する神経細胞に対する重要なガイド役を担っているため、これが障害されれば脳皮質への入力線維が減少して皮質構造の形成や脳回の発達が抑制される可能性が高い。

### 2. 研究の目的

われわれはすでにヒツジ胎仔の慢性実験系を用い、子宮内炎症によって巣状脳白質損傷を誘導する動物実験モデルの開発に成功している。また一方で、ヒツジ胎仔を用いてヒト胎盤循環を模した体外式ポンプレス補助循環システム（人工胎盤）を世界に先駆けて開発したが、その過程で巣状脳白質損傷を認めることがあった。そこで本研究では、これまでわれわれがヒツジ胎仔を用いて開発したこれらのモデルを応用し、子宮内炎症や人工胎盤管理によって巣状脳白質損傷のみ

ならずその近傍に存在するサブプレート神経細胞を損傷されるか、また脳回形成不全や脳灰白質容量の低下に代表される脳構造の発達変容を示す病変が誘導されるかを組織病理像ならびに MRI に基づいて解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究は東北大学動物実験委員会の承認もと（2014 医動-220, 2015 医動-209, 2016 医動-294）、東北大学医学部附属動物実験施設において平成 26~28 年度に実施された。牧場から購入した妊娠期間の確定したサフォーク種の妊娠ヒツジを動物実験施設に収容し、専用の手術設備と母獣胎仔の集中監視システムを用いて慢性実験系を作成した。

妊娠 91-100 日（満期 147 日）に全身麻酔下に母獣を開腹して子宮を切開し、胎仔の腹部大動脈、上下大静脈、羊水腔内にカテーテルを留置した後、胎仔を子宮内に戻して閉腹した。

手術後 48 時間を経て全ての胎仔を、炎症群 (n = 1)、人工胎盤群 (n = 7)、炎症+人工胎盤群 (n = 9)、対照群 (n = 1) に分けて、以下の負荷実験を行った。

炎症群では胎仔に顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 50  $\mu$ g/日を 5 日間連続で静注し、その 3 日目にエンドトキシン (LPS) 20 mg を羊水腔内投与して強力な子宮内炎症を誘導した。

人工胎盤群では手術後 7 日を経て帝王切開で胎仔を娩出し、われわれが新規に開発したポンプレス人工胎盤回路を装着、水温を 39°C に保たれた人工羊水の恒温槽に沈めて 72 時間維持した。（図 1）

炎症+人工胎盤群では炎症群と同様のプロトコールで子宮内炎症を誘導した後、手術後 7 日を経て帝王切開で胎仔を出生、人工胎盤群と同様に人工胎盤回路を装着して恒温槽にて 72 時間維持した。

対照群では炎症群と同様のプロトコールで生理食塩水を投与した。

胎仔の手術後 10 日を経て、胎仔をペントバルビタールの過量投与によって安楽死させ、直ちに脳 MRI を撮影した。平成 27 年度は静磁場強度 0.35 テスラの MRI 撮影装置を用いて T1/T2 強調像を 1 mm スライスで撮影した。平成 28 年度及び平成 29 年度は静磁場強度 7.0 テスラの MRI 装置を用い、T1/T2 強調像を 0.4 mm スライスで撮影した。

MRI 撮影後、直ちに中枢神経系を 10%ホルマリンで灌流固定した後に摘出し、組織病理学的解析に供した。脳は冠状断に分割し、(乳頭体を含む視床レベルに対して平行に 3 mm スライスで)、断面を肉眼的に観察した後、4  $\mu$ m に薄切した標本をヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色して組織診断した。サブプレート神経細胞の同定のために、その特異抗体である抗 Nurr-1 抗体を用いて免疫組織染色を行った。

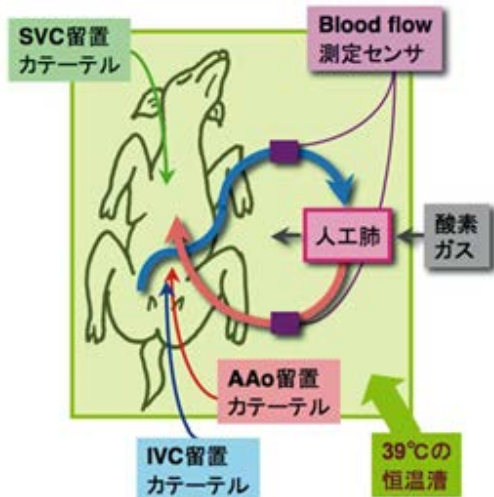


図1. 人工胎盤システムの概念図

臍帯動脈から脱血した静脈血を膜型人工肺で動脈血化し、胎仔心ポンプ駆動で臍帯静脈に返血する。

#### 4. 研究成果

4群の基本的情報を表1に示した。

表1. 4群の基本情報

|            | 炎症群<br>(n=1) | 人工胎盤群<br>(n=7) | 炎症+人工胎盤群<br>(n=9) | 対照群<br>(n=1) |
|------------|--------------|----------------|-------------------|--------------|
| 雄/雌        | 0/1          | 3/4            | 4/5               | 1/0          |
| 手術日齢 (日)   | 100 ±0.0     | 92.6 ±1.1      | 93.8 ±2.0         | 95 ±0.0      |
| 剖検日齢 (日)   | 110 ±0.0     | 102.6 ±1.1     | 103.9 ±2.1        | 105 ±0.0     |
| 剖検時体重 (kg) | 1.16 ±0.0    | 1.15 ±0.27     | 1.06 ±0.19        | 1.8 ±0.0     |
| 脳白質損傷 (%)  | 1/1 (100)    | 1/7 (14.3)     | 4/9 (44.4)        | 0/1 (0)      |

数値データは「平均±標準偏差」で表した。

胎仔の性別、手術日齢、剖検 (MRI 撮影) 日齢、剖検時の体重で4群間に有意な差はなかった。炎症群の1例 (100%)、人工胎盤群の1例 (14.3%)、炎症+人工胎盤群の4例 (44.4%) に巣状脳白質損傷が観察された。

平成27年度に用いたMRIにおいて巣状脳白質損傷はいずれも「T1強調画像で高信号か

つ T2 強調画像で低信号」の異常信号として明瞭に検出できた。(図2) これらの病変はHE染色において凝固壊死巣として確認された。(図3)

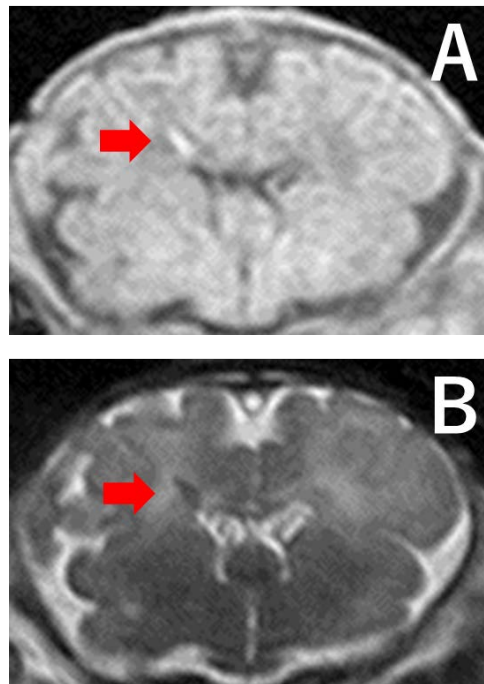


図2. ヒツジ胎仔脳に誘導された巣状脳白質損傷病変のMRI異常信号。

病変はいずれもMRIにて、T1強調画像で高信号かつT2強調画像で低信号の異常信号として明瞭に検出できた(矢印)。A: 冠状断のT1強調画像, B: 冠状断のT2強調画像。

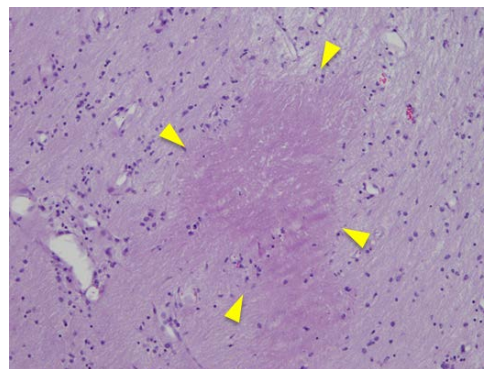


図3. ヒツジ胎仔脳に誘導された巣状脳白質損傷のHE染色画像。

MRIで同定された脳白質損傷は病理組織学的に凝固壊死巣として同定された(矢頭)。

しかしながら、平成27年度に用いた静磁場強度0.35テスラのMRI装置では、解像度とコントラストが低くサブプレート層を同定することは出来なかった。

そこで、平成28年度からはMRI装置を変更し、静磁場強度7.0テスラのMRI装置で撮影を行ったところ、T1強調画像で皮質の高信号層と白質の低信号層の間に高信号の層が検

出され、解剖学的構造よりサブプレート層を表していると考えられた (図 4).

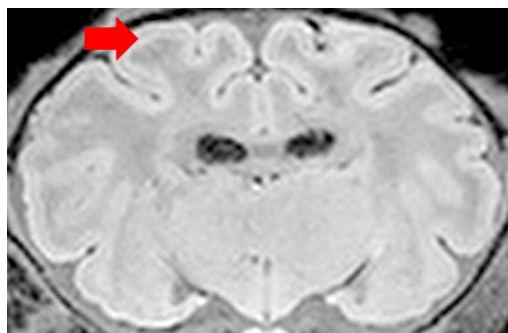


図 4. ヒツジ胎仔脳の MRI 画像におけるサブプレート層.

ヒツジ胎仔脳のサブプレート層は MRI の T1 強調画像 (冠状断) において皮質の高信号層と白質の低信号層の間にあるもう一つの高信号層として検出された (矢印).

MRI (7.0 テスラ) の T1 強調画像で皮質と白質の間に存在する高信号層がとして検出された層がサブプレート層を表しているか確認するため、組織標本をサブプレート神経細胞の特異抗体である抗 Nurr-1 抗体を用いて免疫組織染色を行った。この染色において、皮質下に Nurr-1 陽性細胞が多数認められた (図 5)。この部位は MRI の T1 強調画像において皮質の高信号と白質の低信号の間に存在したもう一つの高信号層と一致しており、サブプレート層が検出されていることが確認された。

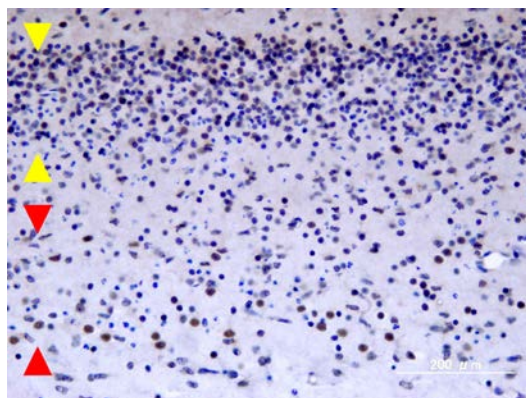


図 5. 脳組織の抗 Nurr-1 抗体による免疫組織染色画像.

サブプレート細胞は抗 Nurr-1 抗体による免疫組織染色において褐色に染色されている。Nurr-1 陽性細胞は皮質層 (黄色の矢頭) にも認められるが、皮質と白質の間にも特異的に集積した層が認められ (赤色の矢頭)、サブプレート層と考えられた。

本研究において、(1) 静磁場強度 7.0 テスラの MRI を用いれば、ヒツジ胎仔脳においてサブプレート層を同定できることが確認された。また、(2) 抗 Nurr-1 抗体に対する免疫

組織染色を行うことで、サブプレート神経細胞は同定可能であり、サブプレート層を組織病理学的にも同定できることが確認された。

しかしながら、MRI 画像を用いた白質、サブプレート層の容量計測、並びに脳回形成の定量的解析を行うシステムの開発が遅れたため、本研究期間においてはこれら MRI の定量的解析が行えなかった。また、Nurr-1 に対する免疫組織染色の定量的解析は、全ての症例を同じ条件で染色する必要があるため、全ての実験終了後に行われる。そのため、本研究期間においては実施が不可能であった。

現在、MRI 画像解析システムは開発段階にあるが、将来的には脳灰白質、サブプレート層の容量測定並びに脳回形成の定量的解析が可能となる見通しである。これと併せて病理組織学的にサブプレート損傷を評価すれば、研究当初の仮説である「子宮内炎症や人工胎盤管理によって巣状脳白質損傷のみならずその近傍に存在するサブプレート神経細胞を損傷され、脳回形成不全や脳灰白質容量の低下に代表される脳構造の発達変容を引き起こす」ことが検証可能となる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Hanita T, Matsuda T, Saito M, Kitanishi R, Cho K, Harding R, Kobayashi Y. Potential role of prenatal inflammation in the impairment of lung development following mechanical ventilation of preterm lambs. *Reprod Sci* 2017; 24: 478-87. doi: 10.1177/1933719116660846. (査読あり)
2. Miura Y, Matsuda T, Usuda H, Watanabe S, Kitanishi R, Saito M, Hanita T, Kobayashi Y. A parallelized, pumpless artificial placenta system significantly prolonged survival time in a preterm lamb model. *Artif Organs* 2016; 40: E61-8. doi: 10.1111/aor.12656. (査読あり)
3. De Matteo R, Ishak N, Hanita T, Harding R, Sozo F. Respiratory adaptation and surfactant composition of unanesthetized male and female lambs differ for up to 8 h after preterm birth. *Pediatr Res* 2016; 79: 13-21. doi: 10.1038/pr.2015.175. (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

1. Hanita T, Matsuda T, Usuda H, Kitanishi R, Saito M, Watanabe S, Kobayashi Y. Magnetic resonance imaging is useful for detecting acute phase of cerebral white matter injury in preterm ovine foetus. *43rd Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society* (Cambridge, UK); Sep 17-20, 2016.
2. Watanabe S, Matsuda T, Usuda H, Kitanishi R, Saito M, Hanita T, Kobayashi Y. The redistribution of cardiac output by vasopressin



infusion in the premature fetal sheep. **43rd Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society 2016** (Cambridge, UK); Sep 17-20, 2016.

3. Hanita T, Matsuda T, Miura Y, Usuda H, Watanabe T, Kitanishi R, Saito M, Kobayashi Y. A parallelized, pumpless artificial placenta system significantly prolonged survival time in preterm ovine fetus. **42nd Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society 2015** (Vancouver, Canada); Aug 9-12, 2015.
4. Saito M, Matsuda T, Usuda H, Watanabe S, Kitanishi R, Hanita T, Yaegashi N. The reaction of fetal cortisol against intra-uterine inflammation and fetal circulatory insufficiency in fetal sheep. **Society for Reproductive Investigation 62nd Annual Scientific Meeting** (San Francisco, USA); Mar 25-28, 2015.

〔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

<http://www.ped.med.tohoku.ac.jp/newborn/lineup/uwa.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

埴田 卓志 (HANITA TAKUSHI)  
東北大学・病院・助手  
研究者番号：30400360

### (2) 研究分担者

松田 直 (MATSUDA TADASHI)  
東北大学・病院・准教授  
研究者番号：50361100

齋藤 昌利 (SAITO MASATOSHI)  
東北大学・病院・助教  
研究者番号：00451584

北西 龍太 (KITANISHI RYUTA)  
東北大学・病院・助手  
研究者番号：20436116