

令和 5 年 5 月 7 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08220

研究課題名（和文）副腎不全とグリアに注目した脳室周囲白質軟化症の病態解明と新規予防法の確立

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenesis of adrenal insufficiency and periventricular leukomalacia with a focus on gliosis, and establishment of novel preventive measures

研究代表者

上田 博子 (Ueda, Hiroko)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：60528959

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：近年早産児にみられる晩期循環不全(LCC)が脳室周囲白質軟化症(PVL)の発症に関与していることが報告されているが、そのメカニズムは不明である。LCCモデルラットを作成し、さらに5%の低酸素負荷を行った。LCCモデルでは、有意な血清ナトリウム値は低下とCRH負荷試験でのコルチコステロンの誘導はみられなかった。5%の低酸素負荷によりLCC群はコントロール群に比べて有意に転倒回数が多く、脳室周囲のTUNEL陽性細胞は多かった。LCCモデルラットでは一過性副腎不全を呈することが明らかになり、マイルドな低酸素負荷で白質障害が誘導されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PVLは感染、炎症、低酸素虚血などにより、オリゴデンドロサイト前駆細胞が選択的障害を受け、脱髄が起きる疾患である。PVLについては国内外において、臨床、基礎の両面から多数の報告がなされているが、発症を完全に抑制することはできておらず、発症率は減少していない。本研究ではグリアの機能制御の観点から、LCCモデルラットを作成し解析した。本研究により、現在もなお予後不良疾患であるPVLの予防が期待できる。PVLの発症予防および症状の軽減を実現できれば、医療費の削減が可能となり、患者本人と患者を介護する家族の肉体的・精神的な苦痛が軽減される。

研究成果の概要（英文）：Late-onset circulatory failure (LCC), which has been reported to be involved in the development of periventricular leukomalacia (PVL) in premature infants in recent years, is not yet fully understood. A LCC model rat was created, and a 5% hypoxic load was applied. In the LCC model, there was a significant decrease in serum sodium levels and no induction of corticosterone in the CRH stimulation test. The LCC group had significantly more falls and more TUNEL-positive cells around the ventricles than the control group after a 5% hypoxic load. The LCC model rats showed transient adrenal insufficiency, and it was revealed that mild hypoxic load induced white matter damage.

研究分野：新生児学

キーワード：晩期循環不全 脳室周囲白質軟化症 早産児 副腎不全

1. 研究開始当初の背景

脳室周囲白質軟化症 (PVL) は感染、炎症、低酸素虚血などにより、オリゴデンドロサイト前駆細胞が選択的障害を受け、脱髄が起きる疾患である。PVL については国内外において、臨床、基礎の両面から多数の報告がなされているが、発症を完全に抑制することはできておらず、発症率は減少していない。PVL は将来の脳性麻痺や発達障害の原因となり、発症抑制は今日でも周産期医療においては大きな課題のひとつである。近年、周産期医療において PVL を高率に合併する晩期循環不全 (LCC) が注目されている。LCC は比較的新しい疾患概念である。これまでに症例報告や後方視的な臨床研究は散見される。しかしながら、LCC による PVL 合併のメカニズムに関しては明らかになっておらず、臨床、基礎研究ともない。さらに LCC の原因の一つと考えられる副腎機能不全に注目した、グリアの機能制御の観点から、PVL の発症メカニズムを検討した基礎研究はない。

2. 研究の目的

本研究の目的は副腎機能に注目した、PVL の発症メカニズム解明と新規予防法の確立である。さらに PVL の発症メカニズムを、内因性ステロイドによるグリアの機能制御という観点から解明することである。これまでも臨床、基礎の両面で PVL に関する多くの研究が発表されている。しかしながら PVL の発症率は減少していない。従来から指摘されている感染、炎症、低酸素虚血状態のコントロールのみでは、発症予防に限界があるのは明らかである。本研究ではこれまで得られた LCC の知見から、内因性ステロイド不足に着目した。さらにこの内因性ステロイドがグリアの機能制御に及ぼす影響を、モデル動物を用いて分子生物学的手法を用いて解析する点が独創的である。内因性ステロイドとグリアの機能制御の関係を明らかにすることで、PVL 発症のメカニズム解明、新規発症予防の確立を目的とした。

3. 研究の方法

1. 副腎不全モデルラットによる脳白質障害の検討

哺乳 3 日齢のラットの腹腔内にコルチコステロンの合成阻害剤であるメチラポンとアミノグルテチミドを投与し、LCC モデルラットを作成し、経時的に血清ナトリウム測定と corticotropin releasing hormone (CRH) 負荷試験を行う。免疫染色を行いオリゴデンドロサイトやニューロンの傷害を検討する。細胞傷害の検討には TUNNEL 染色を用いる。また同時に PVL の発症に関与していると考えられているアストロサイト、ミクログリアの活性化についても検討する。これらの病変の違いを副腎不全モデルラットと正常ラットで比較し、正常ラットで白質障害が起こらない程度の負荷で、副腎不全モデルラットで白質障害が起きるかを検討する。またモデルラットの脳内、血中での各種サイトカイン、EPO、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS)、活性酸素、興奮性アミノ酸の発現を定量的 RT-PCR 法、ウエスタンブロッティング法、ELISA 法を用いて、経時的に遺伝子、タンパクレベルで解析する。さらにこれらのラットの下肢の運動障害を中心とした行動解析を行い、神経症状についても検討する。

2. 細胞培養における解析

培養オリゴデンドロサイト、アストロサイト、ミクログリア、ニューロンの培養を行い、低酸素負荷およびブドウ糖無添加状態にして細胞傷害を加える。生体に侵襲が加わると通常は副腎から内因性のステロイドが分泌された状態になる。この状態を再現するため、低酸素・無糖状態にする際に培養液に各種ステロイドを添加し、細胞傷害の強さをステロイド添加なしの状態と比較検討する。また低酸素・無糖状態ならびにステロイド添加状態の培養細胞から、各種サイトカイン、EPO、iNOS、活性酸素、興奮性アミノ酸を遺伝子、タンパクレベルで測定する

さらにステロイドが低酸素・無糖状態のミクログリアの貪食能をはじめとする活性化調整のメカニズムに与える影響を検討する。ミクログリアの貪食能に関しては、蛍光ビーズの取り込みにより定量化する。さらにアストロサイト、ミクログリアが放出するケミカルメディエーターがオリゴデンドロサイト、ニューロンに与える影響を、低酸素・無糖状態、ステロイド添加で得られたコンディションメEDIUMを用いて検討する。また、細胞間の直接的な影響を調べるため、アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイト、ニューロンの共培養を行い、ニューロン、オリゴデンドロサイトの細胞傷害を調べる。

3. PVLの新規発症予防法の可能性

副腎不全モデルラットに対して、低酸素虚血前または後にヒドロコルチゾンを腹腔内投与し、白質障害の変化、神経症状の改善がみられるかを比較検討する。また上記の検討により脳障害、脳保護に関係すると考えられるケミカルメディエーター、特に iNOS、炎症性サイトカインである IL6、TNF、IL1 などについては、その阻害剤や抗酸化剤などを用い、白質障害、神経症状の改善がみられるかを検討する。

4. 研究成果

LCC モデルでは、コルチコステロン合成阻害剤投与2時間後で有意に血清ナトリウム値は低下したが、24時間後には回復した。CRH 負荷試験ではLCC 群はコルチコステロンの誘導はみられなかった。5%の低酸素負荷によりLCC 群はコントロール群に比べて有意に転倒回数が多く、脳室周囲のTUNEL 陽性細胞は多かった。LCC モデルラットでは一過性副腎不全を呈することが明らかになり、マイルドな低酸素負荷で白質障害が誘導されることが明らかになった。今後はさらに白質障害のメカニズム、治療法について検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	垣田 博樹 (Hiroki Kakita) (40528949)	愛知医科大学・医学部・講師 (33920)	
研究分担者	山田 恭聖 (Yamada Yasumasa) (60405165)	愛知医科大学・医学部・教授 (33920)	
研究分担者	青山 峰芳 (Aoyama Mineyoshi) (70363918)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・教授 (23903)	

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