

令和元年5月30日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04881

研究課題名(和文)胎児臓器の成長・損傷・適応の解析：ストレスに対する過成熟反応の意義を解明する

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of developmental fetal organ damage caused by stress-induced overmaturation

研究代表者

松田 直(MATSUDA, TADASHI)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：50361100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内炎症が胎仔のコルチゾル分泌能に与える影響を解析し、それが胎仔の脳、副腎皮質、動脈管壁の組織の成熟を促進させることをヒツジ胎仔を用いて検証した。対照群9例と炎症群11例のヒツジ胎仔にCRH負荷試験を実施した。CRH負荷に対するACTHの経時変化は、対照群と炎症群に有意差を認めなかった。一方でコルチゾルの変化は炎症群の方が有意に強かった($p=0.016$)。動脈管組織の成熟度スコアを比較すると2群間に有意差はなかった。本研究では子宮内炎症は動脈管の成熟を促進させる因子であるとは示せなかった。今後は脳や副腎皮質を組織学的に検討し、一過性に成熟を促進する反応がみられるかを確認する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児医療の進歩により、今日では極低出生体重児の合併症は組織損傷から成長障害へとその本態が移行してきていると言える。ストレス反応性のコルチゾルは胎児臓器組織の成熟を一過性に促進させるが、同時にその成長を抑制するため、長期的には臓器成長障害を誘導する危険性を有していることを本研究では検証した。今後の研究により、過度な成熟を適切に制御できれば極低出生体重児の合併症を減少させ、その長期予後を改善できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The study was performed to analyze the influence of intrauterine inflammation to adrenocortical ability and to make clear that the inflammation could promote the maturation of fetal brain, adrenal cortex and ductus arteriosus using chronically instrumented premature fetal sheep. The fetuses were divided into two groups; control ($n=9$) and inflammation groups ($n=11$). We carried out CRH loading test. There was no difference between the two groups in the change of ACTH concentration ($p=0.209$) over time, but a significant difference in the change of cortisol ($p=0.016$). In the histological examination of ductus arteriosus, no difference was found between the two in the developmental score. The results could not suggest that the intrauterine inflammation would promote intimal thickening development of fetal ductus arteriosus. There is a need for further histological examination of the brain and adrenal cortex to make clear the intrauterine inflammation could promote the fetal overmaturation.

研究分野：胎児生理学

キーワード：過成熟 子宮内炎症 コルチゾル ヒツジ 動脈管 CRH

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の周産期新生児医学の発展によって極低出生体重児の救命率は目覚ましく改善したものの、その合併症の発症率では未だ深刻な課題を抱えている。成育限界期に出生する早産児の増加にともない、その急性期には症候性動脈管開存、壊死性腸炎・腸管穿孔、相対的副腎不全の発症率が年々増加しており、一酸化窒素吸入療法の積極的な導入にも関わらず慢性肺疾患は減少せず (14-15%)、脳室内出血の減少にも関わらず脳性麻痺 (8.7%) や発達障害 (19.2%) の頻度は改善していない (Kusuda, *Pediatr Res* 2011; Kono, *Pediatr Int* 2011)。

その一方で、極低出生体重児の慢性肺疾患や中枢神経合併症の臨床像はこの 20 年間で大きく変容した。慢性肺疾患では気道損傷を主徴とする古典的な気管支肺異形成 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) が著しく減少し、2000 年代からはその本質的な病態として肺胞化の停滞を主徴とする new BPD の概念が提唱された (Jobe, *Am J Respir Crit Care Med* 2001)。また、中枢神経合併症では脳内出血や嚢胞性の脳白質損傷 (white matter injury, WMI) などの組織破壊性病変は大きく減少し、びまん性 WMI、脳回形成異常、脳容量減少など、明らかな組織破壊を伴わない構造的な脳発達異常の重要性が認識され始めている (Wong, *J Pediatr* 2013; Skranes, *Cortex* 2013)。すなわち、極低出生体重児の合併症は組織損傷から成長障害へとその本態が移行してきている。

これまでわれわれは動物実験モデルを開発して脳白質損傷の病態解析を進めてきた。ヒツジ胎仔のびまん性 WMI モデルでは、胎生期の低酸素性脳虚血や子宮内炎症などのストレスがコルチゾル分泌を刺激して、成熟オリゴデンドログリアによる脳白質の髄鞘化を一過性に促進させるものの、その起源となるオリゴデンドログリア前駆細胞を有意に枯渇させる現象が観察された (図 1. Saito, *Am J Obstet Gynecol* 2009; Kitanishi, *Tohoku J Exp Med* 2014)。これらの現象は、ストレス反応性のコルチゾルは胎児臓器組織の成熟を一過性に促進させるが、同時にその成長を抑制するため、長期的には臓器成長障害を誘導する危険性を示唆している。われわれはこのような適応現象を過成熟反応と名付け、こうした成長障害が上述した new BPD や脳発達異常の成因と密接に関連しており、これを適切に制御できれば極低出生体重児の合併症を減少させ、その長期予後を改善できるのではないかと考えた。

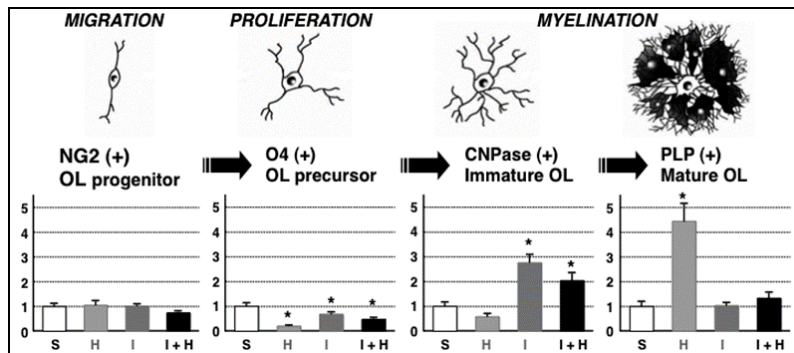


図 1. ヒツジ胎仔脳白質において脳虚血 (H) と炎症 (I) がオリゴデンドログリア (OL) 系細胞の増殖と分化に与える影響の解析

脳虚血と炎症は成熟した OL を増加させたが、同時に未熟な OL を有意に減少させた。

S 群：対照群，H 群：脳虚血群，I 群：子宮内炎症群，I+H 群：脳虚血+子宮内炎症群

2. 研究の目的

ヒツジ胎仔の慢性実験系を用いて、その妊娠中期に負荷された子宮内炎症が胎仔のコルチゾル分泌能に与える影響を解析するとともに、それが胎仔の主要臓器 (脳、動脈管、副腎皮質) にどのような過成熟反応を誘導するかを解析する。

3. 研究の方法

本研究は東北大学動物実験委員会の承認 (2015 医動-209) のもと東北大学医学部附属動物実験施設内において実施された。対象として妊娠期間が確定した Suffolk 種ヒツジの胎仔を用いる。ヒツジの発情期が夏期であるため実験は 10~3 月にかけて 4 年間で合計 22 回行った。

(1) 慢性実験系の作成

妊娠 91-97 日に全身麻酔下に母獣を開腹して子宮を切開し、胎仔の右腋窩動脈、腹部大動脈、上下大静脈、羊水腔内にカテーテルを留置、心電図電極を固定した後、胎仔を子宮内に戻して閉腹した。以後、胎仔動脈圧、中心静脈圧、羊水内圧を連続監視してパソコンに記録した。

(2) 母獣子宮内での負荷実験

手術後 48 時間を経た胎仔 (n=22) をランダムに 2 群に分けた (対照群、炎症群)。炎症群には術後 48 時間から 5 日間連日 granulocyte- colony stimulating factor (G-CSF; Neutrogen®) 50 µg/日を静注し、術後 96 時間に 1 回だけ羊水腔内に endotoxin (E. coli 055:B5) 20 mg を注入して胎仔に壊死性の臍帯炎を誘導した。対照群には G-CSF の代わりに生理食塩水を投与して、endotoxin を負荷しなかった。

(3) 子宮内炎症への曝露による胎仔のコルチゾル分泌能の評価 (CRH 負荷試験)

全ての対象胎仔に対して手術後 7 日 (負荷実験後) に CRH 負荷試験 (ヒツジ CRH, 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を実施した。負荷前, 15, 30, 45, 60, 90, 120 分後に採血し, CRH に対する ACTH とコルチゾルの反応性を 2 群間で統計学的に比較した。

(4) 子宮内炎症により誘発される胎仔の主要臓器の組織学的変化

胎仔脳の MRI 撮影

ヒツジ胎仔脳の MRI は東北大学加齢医学研究所が保有する動物実験専用装置 (7.0 Tesla, PharmaScan, Bruker-biospin, Germany) を用いて撮影した。内径 6.0 cm の rat body coil を用いて T1 および T2 強調像を 0.4 mm 間隔で撮影した。撮影された画像は解析ソフト (Image J 1.33u, NIH, USA) を用いて, 脳の各構造物 (皮質, subplate, 白質, 深部灰白質) の容量ならびに脳表面積を測定している。

動脈管における内膜肥厚の組織学的評価

手術後 10 日に母獣を帝王切開して, 胎仔を剖検に供し, 動脈管の組織像を 2 群間で以下の 2 通りの方法で比較した。動脈管組織は肺動脈と大動脈の中間位から採取し, エラスチカ・ワンギーソン染色を用いた。

1) 面積比による内膜肥厚の評価

動脈管の短軸切片 (輪切り切片) において内腔を除いた断面積 (Aa) と内膜肥厚面積 (Ai) を計測し, その比 (Ai/Aa) をそれぞれ比較した。

2) 内膜肥厚の成熟度スコアを用いた評価

動脈管の短軸切片において内腔を 6 等分し, それぞれの部位の成熟度を以下のようにステージ分類し, スコア化した。その合計点を成熟度を表す指標として比較した。

ステージ 0 (0 点): 内弾性板の断裂を認めない

ステージ 1 (1 点): 内弾性板の二重化を認める

ステージ 2 (2 点): 内弾性板の断裂と内腔への平滑筋細胞の遊走を認める

ステージ 3 (3 点): 平滑筋細胞の遊走により顕著な内膜肥厚を認める

副腎皮質における胎児層から移行層への成熟

副腎皮質移行層を抗 3β -hydroxysteroid dehydrogenase 抗体で免疫染色陽性の区域と定義し, 胎児層/移行層の容積比を 2 群間で比較する。これにより子宮内炎症によるストレスが胎児の副腎皮質の成熟を促進するかを検証する。

(5) 統計学的解析

組織学的評価における対照群と炎症群の有意差の検定には Mann-Whitney U-test を用いた。また CRH 負荷試験における群間の有意差の検定には Two-way Repeated measure ANOVA を用いた。いずれも $p < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 子宮内炎症への曝露による胎仔のコルチゾル分泌能の評価 (CRH 負荷試験)

4 年間で合計 22 例のヒツジ胎仔を本実験のために準備し, 結果として 20 例 (対照群 9 例, 炎症群 11 例) を解析に用いることができた。除外された 3 例の内訳は, 不受胎 2 例, 実験開始前の子宮内胎仔死亡 1 例であった。対象の基礎データを表 1 に示した。

表 1. 対象の基礎データ

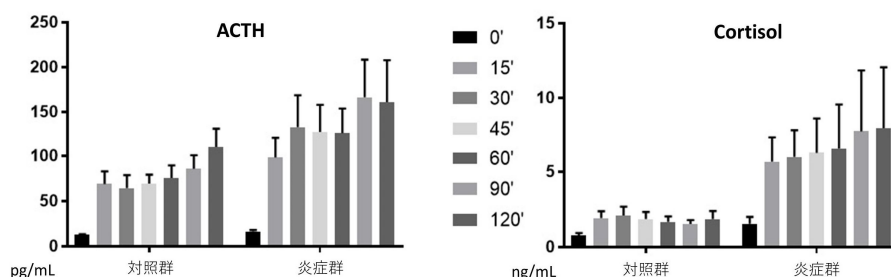
群 (例数)	対照群 (n=9)	炎症群 (n=11)	P 値
単胎/多胎	8/1	8/3	
雄/雌	4/5	4/7	
妊娠日齢	98.0 \pm 0.8	97.1 \pm 0.8	0.429
体重 (kg)	1.21 \pm 0.10	1.13 \pm 0.07	0.697

数値データはいずれも「平均 \pm 標準誤差」で示した。

2 群間において負荷試験を行った妊娠日齢と体重に有意差を認めなかった。

図 2 に CRH 負荷試験における ACTH とコルチゾルの経時的変化を示した。

図 2. CRH 負荷試験における ACTH およびコルチゾルの経時的変化



CRH 負荷に対する ACTH の経時的変化は、対照群と炎症群に有意差を認めなかった ($p=0.209$) . 一方でコルチゾールは、炎症群の方が CRH に対する反応が有意に強かった ($p=0.016$) .

(2) 副腎皮質における胎児層から移行層への成熟

(1) に示した対象の胎仔全例から剖検の際に副腎を摘出した . 今後は副腎皮質移行層を抗 3β -hydroxysteroid dehydrogenase 抗体で免疫染色陽性の区域と定義し、胎児層/移行層の容積比を 2 群間で比較する . これにより子宮内炎症によるストレスが胎児の副腎皮質の成熟を促進するかを検証する . また (1) で示された CRH に対する炎症群の有意なコルチゾール値の上昇について原因を考察する予定である .

(3) 胎仔脳の MRI 撮影

(1) に示した対象に CRH 負荷試験を実施したあとに、帝王切開で胎仔を娩出し、すみやかに脳 MRI を撮影した . 図 3 に抗 Nurr1 抗体で免疫染色した脳切片像と脳 MRI 像を示した .

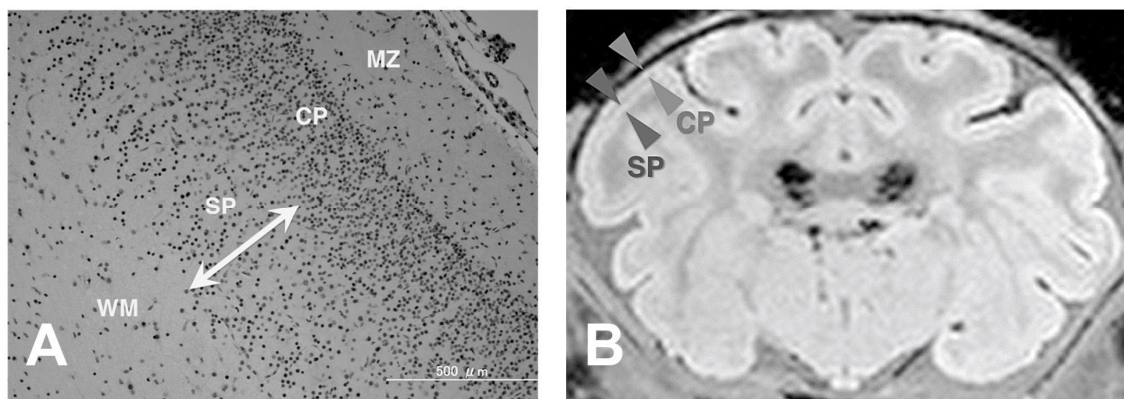


図 3. ヒツジ胎仔の subplate 層 (妊娠 103 日)

(A) subplate neuron に特異的な抗 Nurr1 抗体で免疫染色した脳切片像 . 矢印間が subplate 層を示す (200 倍) . (B) MRI (7.0 tesla, T1 強調画像) で同定された subplate 層 (矢頭間) . 脳表では本来は一層の cortical plate だけが高信号で観察されるが、その下方にもう一層の subplate が認められ、二層構造として観察された . MZ, marginal zone; CP, cortical plate; SP, subplate; WM, white matter (intermediate zone) .

対象の胎仔全例に脳 MRI を撮影し、脳の各構造物 (皮質、subplate、白質、深部灰白質) の容量ならびに脳表面積を測定中である . 今後は胎生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 subplate 層に注目する . subplate 層が組織学的にも MRI 上でも観察できるのは妊娠 100-120 日であり、この層に含まれる神経細胞群が損傷や過成熟により減少すれば、脳皮質への入力線維が減少して脳回の発達が抑制される可能性がある .

(4) 動脈管における内膜肥厚の組織学的評価

子宮内炎症が動脈管組織を成熟させるかの検証には、3 年間で合計 15 例のヒツジ胎仔を準備し、結果として 10 例 (対照群 5 例、炎症群 5 例) を解析に用いることができた . 除外された 5 例の内訳は、不受胎 2 例、実験開始前の子宮内胎仔死亡 2 例、慢性実験系の作成手術時の術中死亡 1 例であった . 対象の基礎データを表 2 に示した .

表 2. 対象の基礎データ

群 (例数)	対照群 (n=5)	炎症群 (n=5)
単胎/多胎	4/1	4/1
雄/雌	2/3	4/1
剖検時妊娠日齢	102.6 ± 0.4	103.8 ± 1.0
剖検時体重 (kg)	1.13 ± 0.14	1.11 ± 0.08

数値データはいずれも「平均 ± 標準誤差」で示した .

2 群間において、胎仔数、単胎双胎比、剖検時の妊娠日齢、剖検時の体重に差はなかったが、性別では対照群で雌が多く、炎症群で雄が多く、偏りが認められた .

内膜肥厚の組織学的評価の結果を表3に示した。

表3. 内膜肥厚の組織学的評価

群 (例数)	対照群 (n=5)	炎症群 (n=5)	P 値
短軸断面積 : Aa (μm^2)	5543299 \pm 444748	5190722 \pm 330807	0.691
内膜肥厚面積 : Ai (μm^2)	2103385 \pm 33784	165594 \pm 16384	0.310
内膜肥厚の割合 : Ai/Aa	0.0372 \pm 0.0034	0.0322 \pm 0.0032	0.151
成熟度スコア合計点	8.4 \pm 1.1	6.4 \pm 0.7	0.222

数値データはいずれも「平均 \pm 標準誤差」で示した。

面積比による内膜肥厚の評価では、内膜肥厚の割合 (Ai/Aa) の平均値は有意差を認めなかったが、対照群の方が高値であった。また成熟度スコアを用いた評価においても、有意差を認めなかったが、平均値は対照群の方が高スコアであった。そのため子宮内炎症に曝されると動脈管の成熟が促され、内膜肥厚が進むという当初の仮説を証明することはできなかった。

妊娠 103 日で組織を採取した予備実験では、内弾性板の断裂は認めなかった。しかし今回の対照群 (妊娠 102.6 \pm 0.4 日) で採取された組織では内膜肥厚を認めるものが多く、内弾性板の断裂に加え、平滑筋細胞の遊走を確認できるものもあった。この成熟度の違いを生んだ原因として、高乳酸血症の関連が示唆された。ヒツジ胎子を胎内でモニタリングした慢性実験中の乳酸値の最高値は、平均で 93.2 \pm 25.2 mg/dL と高く、組織の慢性的な低酸素状態が動脈管組織の成熟を促進した可能性がある。

今後は今回の検討と同じく妊娠 103 日前後で、慢性低酸素やアシデミアの影響を除外した対照群の組織学的評価が必要である。また妊娠高血圧症候群などの慢性低酸素に曝されていた胎児においても動脈管組織の成熟が促進されている可能性があり、今後の検討課題と考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Usuda H, Watanabe S, Miura Y, Saito M, Musk GC, Rittenschober-Böhm J, Ikeda H, Sato S, Hanita T, Matsuda T, Jobe AH, Newnham JP, Stock SJ, Kemp MW. Successful maintenance of key physiological parameters in preterm lambs treated with ex vivo uterine environment therapy for a period of 1 week. *Am J Obstet Gynecol* 2017; 217(4): 457.e1-457.e13. (査読あり)

DOI: 10.1016/j.ajog.2017.05.046

Kemp MW, Saito M, Usuda H, Molloy TJ, Miura Y, Sato S, Watanabe S, Clarke M, Fossler M, Schmidt A, Kallapur SG, Kramer BW, Newnham JP, Jobe AH. Maternofetal pharmacokinetics and fetal lung responses in chronically catheterized sheep receiving constant, low-dose infusions of betamethasone phosphate. *Am J Obstet Gynecol* 2016; 215(6): 775.e1-775.e12. (査読あり)

DOI: 10.1016/j.ajog.2016.08.017

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* 2016; 24(3): 478-87.

DOI: 10.1177/1933719116660846. (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

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.

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 2016 (Cambridge, UK); Sep 17-20, 2016.

[その他]

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

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

研究分担者氏名：松田 直

ローマ字氏名：(MATSUDA, tadashi)

所属研究機関名：東北大学

部局名：医学系研究科

職名：非常勤講師

研究者番号(8桁)：50361100

(2) 研究分担者

研究分担者氏名：齋藤 昌利

ローマ字氏名：(SAITO, masatoshi)

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学病院

職名：講師

研究者番号(8桁)：00451584

研究分担者氏名：埴田 卓志

ローマ字氏名：(HANITA, takushi)

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学病院

職名：助教

研究者番号(8桁)：30400360

研究分担者氏名：北西 龍太

ローマ字氏名：(KITANISHI, ryuta)

所属研究機関名：東北大学

部局名：医学系研究科

職名：非常勤講師

研究者番号(8桁)：20436116

研究分担者氏名：渡邊 真平

ローマ字氏名：(WATANABE, shimpei)

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学病院

職名：助手

研究者番号(8桁)：70509413