

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09723

研究課題名(和文) 超低出生体重児の虚血性脳障害に関する新規モデルマウスを用いた病態および治療的研究

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of ischemic brain injury in extremely preterm infants

研究代表者

出口 貴美子 (Deguchi, Kimiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師(非常勤)

研究者番号：50227542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：開発した超低出生体重児のマウスモデルを用い、虚血性脳傷害による高次脳機能の病態解明と治療法の開発を行なった。組織学的解析によって、マウスモデルにおいて、神経細胞の移動の障害に伴う大脳層構造構築の異常、神経細胞の成熟度や回路形成についての変化が観察された。次いで、生後4から8週齢になったマウスモデルを用いて運動機能や記憶などの認知機能を解析したところ、認知機能の低下が認められた。治療法の開発のための基盤となる知見を得るために、低体温療法を行い、その有効性に関する評価を組織的および行動学的に検討した。少なくともモデルマウスにおいては、低体温療法によって認知機能低下が予防されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Many extremely preterm infants (EPIs) subsequently develop cognitive impairment of unknown etiology. We observed fewer neural progenitors and larger numbers of ectopic neurons in the white matter (WM) of human EPI brains and hypothesized that EPIs develop cognitive dysfunction because of altered neuronal generation and migration. To test our hypothesis we produced ischemic brain damage in mouse embryos by occluding maternal uterine arteries. The mice showed decreased proliferation of neuronal progenitors, delayed neuronal migration, and ectopic neurons in the WM. Similar to human EPIs the surviving mice exhibited abnormal cognitive function. Maternal hypothermia during the arterial occlusion period mitigated the neurodevelopmental damage. These findings supported our hypothesis that altered neuronal generation and migration underlie the serious risk of subsequent cognitive impairment of EPIs.

研究分野：小児科科学、神経発生学

キーワード：虚血 脳障害 神経細胞移動 マウスモデル 認知機能 大脳皮質 層構造 治療法開発

1. 研究開始当初の背景

我が国の周産期医療の発展とともに、超低出生体重児(在胎 28 週未満、出生体重 1000g 未満)の生存率は著しく向上した。しかしその一方で、虚血性脳障害による後遺症の頻度は 20-50%と高く、小児医療の大きな課題の一つとなっている。超低出生体重児の虚血性脳障害による神経学的後遺症の特徴としては、これまでは脳性麻痺などの運動発達障害が主に捉えられていたが、近年、認知障害等の頻度が高い事が注目されている。脳性麻痺の原因として、オリゴデンドロサイトの前駆細胞傷害による広範性の大脳白質障害が明らかになったが、一方で、認知障害などの高次脳機能障害に関しては、むしろ皮質の障害と関連があると推測されている。これまでの報告でも、MRI による画像解析で、脳室壁の不整、白質の容量減少などに加え、生後の大脳皮質の発達の障害が指摘されており、この所見と高次脳機能障害との関連性が示唆されている。しかし、なぜ皮質の発達の障害が起こるのかといった病態に関しては、ほとんどわかっていない。また、これが脳室周囲白質軟化症(PVL)の白質病変とどのように関連するのかという点についても不明であった。

我々は、超低出生体重児の死後直後から数ヶ月の剖検脳において、ほぼ全例で脳室周囲での神経前駆細胞が広く傷害されていることを明らかにしていた。さらに、超低出生体重児で生まれ、4-6歳の学童期前で亡くなった剖検脳においては、白質に残存する神経細胞(異所性ニューロン)が多数認められ、さらに皮質の層構造の異常を認めた。これらの所見から、神経前駆細胞および神経細胞の移動の異常が関与していると考え、これが超低出生体重児の高次脳機能障害の原因と成りうるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

- (1) ヒト剖検脳の解析で得られた所見とそれに基づく仮説を検証するために、これまで開発を試みてきた妊娠マウス子宮動脈結紮による胎児脳の虚血性障害モデルを用いて、微細な構造異常の検討を神経組織学的に行なう。
- (2) ヒトの学童期から成人期に一致する時期(生後4から8週間)のモデルマウスを用いて行動学的解析を行い、発達障害に一致する表現型の有無を解析する。
- (3) 胎児脳の虚血性障害モデルマウスを用いて、低体温療法を用いた治療法の開発を試みる。

3. 研究の方法

これまでに開発を試みてきた超低出生体重児のマウスモデルを用い、虚血性脳傷害による高次脳機能の病態解明と治療法の開発を行なった。

(1) 組織学的解析による神経細胞の移動、成熟度、機能性の障害に関する検討;

胎児脳の虚血性障害モデルにおいて、神経細胞の移動の障害に伴う大脳層構造構築の異常、神経細胞の成熟度や回路形成について、詳細な組織学的検討を行った。

(2) 行動学的解析による高次脳機能障害に関する表現型の検討;

生後4から8週齢になった虚血性脳障害モデルマウスを用いて行動学的解析を行い、運動機能や記憶などの認知機能を解析した。

(3) 低体温療法などを用いた治療とその評価;

虚血性脳傷害の後遺症としての高次脳機能障害の予防を目指して、治療法の開発のための基盤となる知見を得るために、低体温療法を行い、その有効性に関する評価を組織的および行動学的に検討した。

4. 研究成果

(1) 組織学的解析による神経細胞の移動、成熟度、機能性の障害に関する検討

脳の組織学的な解析の際には、神経細胞移動の遅れの結果としてもたらされる、脳の組織構築の微細な変化に注目した解析を行った。子宮内エレクトロポレーション法を用いることにより、緑色蛍光タンパク質(GFP)などの蛍光タンパク質を神経細胞に導入して、虚血性脳障害による影響の解析を行った。正常対照において移動が終了する状態においても虚血が誘導されたマウスではまだ移動中の神経細胞を数多く認めた。これらの神経細胞は最終的には脳表面近くに移動する細胞が多数を占めたものの、最終的な神経細胞が配置される位置に変化を認めた。また、例数を重ねて定量的な解析を行ったところ、神経細胞配置だけでなく、その配置が変化した神経細胞間で形成される神経回路網形成についても変化が起こることが明らかになった。

(2) 行動学的解析による高次脳機能障害に関する表現型の検討

行動解析として、オープンフィールドテストやソーシャルインタラクションテストに加えて、超早産児の後遺症として、認知機能障害が注目されているため、認知機能の評価に焦点を当てて解析を行った。Y字迷路試験において正常対照マウスと比較した際に有意な低下をみとめ、作業記憶の障害が示唆された。そこで、最終的な配置位置や神経回路網において変化を認めた神経細胞に、子宮内エレクトロポレーション法

を用いた遺伝子導入によって人工受容体を発現させ、人為的に神経細胞の活動を变化させることによって低下した作業記憶が改善するかどうかの検証を行った。

具体的には、子宮内エレクトロポレーション法を用いる際に、緑色蛍光タンパク質 (GFP) などの蛍光タンパク質のみならず、人工受容体を発現するプラスミドを神経細胞に導入しておき、生後にクロザピン N オキサイド (CNO) を投与して、人工受容体を発現する神経細胞に特異的に神経活動を活性化させる DREDD システムを用いた神経活動の制御を行った。その結果、Y 字迷路試験を行うモデルマウスにおいて、低下した作業記憶が有意に改善することが明らかになった。

さらに、DREDD システムを用いた神経活動の制御を行った際に、モデルマウスの脳波活動にどのような影響が生じるかの解析を行った。作成したモデルマウスでは、対照群のマウスと比較して、低周波数帯域の脳波活動が低下していることが、局所フィールド電位 (Local Field Potential) の測定によって明らかになった。そして、DREDD システムを用いた脳の部位特異的活性化を行った際には、低周波数帯域の脳波活動が対照群のマウスと同程度まで、有意に回復することが判明した。また、その際の前頭葉における c-Fos の発現も有意に改善していた。これらの所見から、DREDD システムを用いた神経活動の制御によって、モデルマウスにおいて低下していた前頭葉機能が改善することが示された。

このように、虚血性脳障害を伴う超早産児のモデルマウスの作成に成功し、そのモデルマウスで認められた認知機能障害が脳の部位特異的活性化によって回復することが明らかになった。

(3) 低体温療法などを用いた治療とその評価

超低出生体重児の高次脳機能の障害を予防するには、その病態を明らかにするとともに、治療法開発のための基盤となる知見を積み重ねることが必要である。これまでに満期産の低酸素性虚血性脳症に対して、低体温療法の有効性が臨床的に実証されているが、低出生体重児の脳障害の予防への適応に関しては今後の検討が必要になっている。そこで本研究では、これまでに見いだされた超低出生体重児の虚血性脳傷害モデルの病態に対して、低体温療法の有効性について検討し、本病態に対する治療法開発のための基盤となる知見を得ることを試みた。

通常モデル作成時には、子宮動脈結紮による虚血負荷時の母体体温を約 37 度に維持する (コントロール群) が、低体温療法群では体温を 3~4 度低く維持した。この

温度は、ヒトにおける低体温療法に準ずるものである。低体温療法の有効性の評価については、これまで実施して来た組織学および行動学的な解析法を用いて行った。組織学的解析では、神経幹細胞の分裂の異常と神経細胞の移動の異常において、低体温療法群で有意な改善を認めた。また、行動学的には、Y 字迷路試験と新奇物体認識試験において、低体温療法群で有意な改善を認めた。

本治療法は、必ずしも臨床応用に直結するものではないが、これまでに治療法が無かった超低出生体重児の神経学的後遺症に対する治療の可能性を示唆する点で意義深いと考えられた。さらに、このモデルマウスにおいて、生後に神経細胞移動障害が生じている時期の脳において遺伝子発現を対照群のマウスと比較すると、炎症性反応のネットワークにおいて最も有意な差を見いだした。低体温療法は、これらの炎症性反応も抑制に効果があった可能性があると考えられた。この結果を Public データベースに deposit した。

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 4 件)

1. Ken-ichiro Kubo, Kimiko Deguchi, Taku Nagai, Yukiko Ito, Keitaro Yoshida, Toshihiro Endo, Seico Benner, Wei Shan, Ayako Kitazawa, Michihiko Aramaki, Kazuhiro Ishii, Minkyung Shin, Yuki Matsunaga, Kanehiro Hayashi, Masaki Kakeyama, Chiharu Tohyama, Kenji F. Tanaka, Kohichi Tanaka, Sachio Takashima, Masahiro Nakayama, Masayuki Itoh, Yukio Hirata, Barbara Antalffy, Dawna D. Armstrong, Kiyofumi Yamada, Ken Inoue, and Kazunori Nakajima. Association of impaired neuronal migration with cognitive deficits in extremely preterm infants. *JCI Insight*, 査読有, 2 (10), e88609 (2017). (K. Kubo and K. Deguchi are co-first authors)
DOI: 10.1172/jci.insight.88609
DOI: 10.3389/fnins.2015.00135.
2. Kazuhiro Ishii, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima. Reelin and neuropsychiatric disorders. *Front. Cell. Neurosci.*, 査読有, 10, Article 229 (2016).
DOI: 10.3389/fncel.2016.00229
3. Kanehiro Hayashi, Ken-ichiro Kubo, Ayako Kitazawa, and Kazunori

- Nakajima. Cellular dynamics of neuronal migration in the hippocampus. *Front. Neurosci.*, 査読有, 9, Article 135 (2015).
4. Kazuhiro Ishii[#], Ken-ichiro Kubo[#], Toshihiro Endo, Keitaro Yoshida, Seico Benner, Yukiko Ito, Hidenori Aizawa, Michihiko Aramaki, Akihiro Yamanaka, Kohichi Tanaka, Norio Takata, Kenji F. Tanaka, Masaru Mimura, Chiharu Tohyama, Masaki Kakeyama, and Kazunori Nakajima. Neuronal heterotopias affect the activities of distant brain areas and lead to behavioral deficits. *J. Neurosci.*, 査読有, 35 (36), 12432-12445 (2015). (K. Ishii[#] and K. Kubo[#] are co-first authors)
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3648-14.2015

〔学会発表〕(計 17 件)

1. Ken-ichiro Kubo, Improvement of cognitive deficits observed in a mouse model of extremely preterm infants with brain injuries, 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2018 年
2. Ken-ichiro Kubo, Analysis of cortical development in a newly established mouse model of extremely preterm infants with brain injuries, Society for Neuroscience, Neuroscience 2017 meeting, 2017 年
3. 久保健一郎, 超早産児に生じる脳障害のマウスモデル作成の試み, 第 52 回 TOKYO ニューロサイエンス研究会、2017 年
4. 久保健一郎, マウスにおける神経発達障害モデルの作成とその解析, 第 39 回日本生物学的精神医学会・第 47 回日本神経精神薬理学会合同年会、2017 年
5. Ken-ichiro Kubo, 認知機能障害を伴うマウスモデルの作成とその脳における細胞構築の解析, 第 60 回日本神経化学会大会、2017 年
6. Ken-ichiro Kubo, Establishment of a mouse model of extremely preterm infants with brain injuries and analysis of neuronal migration, 第 40 回日本神経科学大会、2017 年
7. 出口貴美子, 超早産児における虚血性脳障害は、大脳皮質形成に影響し、認知機能障害の原因となりうる, 第 62 回日本新生児成育医学会学術集会、2017 年
8. 出口貴美子, 胎内脳虚血が大脳皮質の発達に与える影響、胎内脳虚血が大脳皮質の発達に与える影響、第 120 回日本小児科学会、2017 年
9. Kimiko Deguchi, Abnormal neuronal migration with ischemic brain injuries in extremely preterm infants underlies subsequent cognitive impairment, 12th European Paediatric Neurology Society (EPNS) Congress, 2017 年
10. 久保健一郎, 超早産児脳障害のモデルマウス脳における組織構築の解析, 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017 年
11. Kimiko Deguchi, Abnormal neuronal migration with ischemic brain injuries in extremely preterm infants underlies subsequent cognitive impairment, 第 59 回日本小児神経学会学術集会、2017 年
12. Ken-ichiro Kubo, Why does cognitive impairment frequently develop later in extremely preterm infants, Cell Symposia: Big Questions in Neuroscience, 2016 年
13. 久保健一郎, 環境要因としての虚血ストレスが大脳皮質の発達に与える影響, フォーラム 2016: 衛生薬学・環境トキシコロジー、2016 年
14. Kimiko Deguchi, Reelin coupled with myelin may play a role in long term maintenance of myelin, 第 58 回日本小児神経学会学術集会、2016 年
15. Kimiko Deguchi, Reelin coupled with myelin may play a role in long term maintenance of myelin, 21st Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (ISDN2016), 2016 年
16. 久保健一郎, 異所性灰白質は離れた脳部位の神経活動に影響を与えて行動の異常を引き起こす, 日本解剖学会関東支部 第 103 回学術集会、2015 年
17. Ken-ichiro Kubo, Application of the in utero electroporation technique to the study of the pathological mechanism of focal heterotopias in the brain, Cell Symposia: Big Questions in Neuroscience, 2015 年

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

プレスリリース
超早産児に生じる認知機能障害に脳の神経細胞の移動障害が関与 - その予防・治療法の新規開発に期待 -
<https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2017/5/19/28-20697/>

報道関連情報

- ・ 2017年5月19日 日刊工業新聞 朝刊 21面に掲載「超早産児の認知機能障害 脳神経移動障害と関連 慶大」
- ・ 2017年5月19日 長崎新聞 朝刊 24面に掲載「虚血が神経細胞に影響 超早産児の認知機能障害 米医学雑誌に発表」
- ・ 2017年5月23日 QLifePro 医療NEWSにて紹介「超早産児の認知機能障害、脳神経細胞の移動障害が関与-慶大」
- ・ 2017年5月24日 医療介護CB newsにて紹介「超早産児の認知機能障害に脳神経移動障害が関与 慶大・NCNP 研究グループが解明」
- ・ 2017年5月31日 日経産業新聞 朝刊8面に掲載「超早産児 脳の血液不足 慶大など 機能障害の仕組み解明」
- ・ 2017年6月2日 NHK ニュースにて紹介「超早産児の脳障害 神経細胞が正常な位置に到達せず」
- ・ 2017年6月9日 科学新聞 6面に掲載「超早産児の認知機能障害 脳神経細胞の移動障害が関与」
- ・ 2017年6月25日 中国新聞 朝刊11面に掲載「脳の血流不足が要因 超早産の認知機能障害 神経細胞正常に移動せず」
- ・ 2017年7月22日 河北新報 朝刊21面に掲載「超早産で出生 認知機能障害の赤ちゃん 神経細胞正常に移動せず - 慶大などのチーム解明- 不十分な血流が要因」
- ・ 2017年7月27日、Keio Research Highlightsにて紹介「Born before their time」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

出口 貴美子 (DEGUCHI, Kimiko)
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師
(非常勤)

研究者番号：50227542

(2) 研究分担者

久保 健一郎 (KUBO, Ken-ichiro)
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授
研究者番号：20348791

(3) 連携研究者

井上 健 (INOUE, Ken)
国立精神・神経センター・神経研・疾病二部・室長
研究者番号：30392418

(4) 研究協力者

石井 一裕 (ISHII, Kazuhiro)