

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06870

研究課題名(和文)胎児脳障害に対する分子状水素の予防効果に関する研究

研究課題名(英文)Preventative effects of molecular hydrogen on fetal brain injury

研究代表者

今井 健史 (Imai, Kenji)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20778295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究に用いた母性免疫活性化(MIA)モデルマウスについて我々はすでに経母体的分子状水素(H₂)投与が胎児期の脳酸化ストレス障害および神経炎症を減弱させることを実証している。本研究ではH₂投与による児の長期予後改善効果を検討すべく、生後3-4週齢で行動実験を、5週齢でアストロサイト活性、ニューロンおよびオリゴデンドロサイト数を解析した。MIAモデルマウス出生仔では扁桃体および皮質でニューロンおよびオリゴデンドロサイトが減少、アストロサイトの活性化、短期記憶および社会性の障害を認めた。H₂はこれら異常に対して減弱効果を示した。H₂投与が神経保護効果を発揮し長期予後改善に貢献することを示した。

研究成果の概要(英文)：It has been demonstrated that, in our maternal immune activation (MIA) model mice, maternal administration of H₂ attenuates oxidative damage and neuroinflammation in the fetal brain. In the present study, behavioral ability were evaluated at postnatal 3 or 4 weeks. The number of neurons and oligodendrocytes was also analyzed at postnatal 5 weeks by immunohistochemical analysis. Offspring of the LPS-exposed dams showed deficits in short-term memory and social interaction, following neuronal and oligodendrocytic loss in the amygdala and cortex. Maternal H₂ administration markedly attenuated these LPS-induced abnormalities. Moreover, the number of activated astrocytes was increased in LPS-exposed offspring, but decreased in the offspring of H₂-administered dams. Overall, these findings indicate that maternal H₂ administration exerts neuroprotective effects and ameliorates MIA-induced neurodevelopmental deficits of offspring later in life.

研究分野：産婦人科

キーワード：胎児脳 炎症 ミクログリア アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

絨毛膜羊膜炎や羊水感染に代表される胎児期の感染・炎症曝露は児の予後に大きな影響を与える妊娠合併症である。特に感染・炎症に曝露され出生した児では出生後に長期的な脳障害；脳性麻痺や高次脳機能障害、統合失調症や自閉症の発症リスクが上昇することがわかっており、脳障害の予防に関する新規管理法の開発は社会的な要請度が極めて高い課題である。また、過剰に活性化した **Microglia** や **Astrocyte** から産生される炎症惹起性サイトカインや活性酸素種が **Neuron** や **Oligodendrocyte** 障害発生に重要(引用文献①)であること、そしてこれらの産生を制御することが予防・治療に有効であるとの報告がある。

我々はこの **Glia** の過剰活性化制御に着目した。また、分子状水素が抗酸化作用や抗炎症作用を有すること、および分子量が小さいため拡散により胎盤や脳血液関門を容易に通過できる特性を持つことに注目しており、すでに、経母体的な分子状水素投与が胎児脳障害予防の新規管理法として経母体的な分子状水素投与が有効である可能性を報告している(引用文献②)。

2. 研究の目的

本研究では分子状水素の有する抗炎症・抗酸化作用に着目し、分子状水素投与の炎症性胎児脳障害に対する障害低減効果の有無および胎児脳内 **Glia** 細胞 (**Microglia**, **Astrocyte**) 活性化に対する直接的効果とその作用機序の解明を目的とした。これら研究結果から得られた知見をもとに胎児脳障害予防への臨床応用を目指すものである。

(1) 動物モデルを用いた、分子状水素投与による児の脳障害保護効果に関する機能的評価：先行研究(引用文献②)で組織学的変化および分子状水素による軽減効果が確認された **LPS** 妊娠炎症モデルマウス (**ICR ; CD1**) を用い、これらマウスにおいて胎児期に認められる脳障害およびそれらに対する分子状水素の障害軽減効果が児出生後の発育成長過程でどのような影響をもたらすか、児の神経学的機能について行動実験を含めた検討を実施した。

(2) 胎児ないし新生仔脳から培養培養した初代 **Microglia**, **Astrocyte** 細胞を用いた分子学的機構の解明：**LPS** や各種炎症惹起性サイトカイン刺激による **Microglia** や **Astrocyte** 活性化、さらにはそれら活性化に対する分子状水素投与の影響およびその分子機構の解析を目的とした。

3. 研究の方法

(1) **LPS** 妊娠炎症モデルマウス (**ICR ; CD1**) を用いた動物実験を行った。分子状水素水 (**Hydrogen water; HW**) 投与による児の炎症性

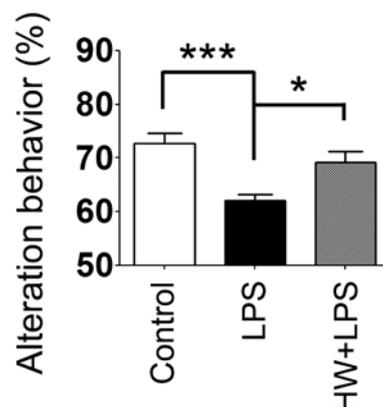
脳障害の軽減効果の有無につき検討した。分子状水素の投与期間・方法は引用文献②にて確立した方法を用いた。**LPS** 投与の有無および経母体的な **HW** 投与の有無によりマウスを **3** 群；正常 **control** 群、**LPS** 投与群、**HW+LPS** 群に分けて検討した。各群とも **E18.5** に自然分娩となり、出生した児を **3** 週齢～**5** 週齢まで成長させた後に行動実験を行った。行動実験では運動障害や記憶障害の有無、統合失調症や自閉症などにみられる社会性障害の有無などを中心に関連する項目を検討すべく、**3** 週齢で **Y-maze** テスト、**4** 週齢で **3 chamber sociability and social novelty** テストおよび **Prepulse inhibition** テストを行った。その後の **5** 週齢で児の脳組織を回収。免疫染色を行い **Neuron**、**Oligodendrocyte** の障害程度や **Microglia**、**Astrocyte** 活性化の程度を解析し、脳障害の責任病変を検討した。

(2) 平成 29 年度は前年度の実験を継続実施するとともに、**Microglia** および **Astrocyte** 初代培養細胞について機能解析、細胞内転写因子やシグナル伝達系に対する分子状水素の影響を評価検討した。特に **Ca** シグナリングの関与や **Suppressor of cytokine signalling(SOCS)** ファミリーの関与などを検討した。**Astrocyte** については、マクロアレイ解析を用いて網羅的な検討を実施、**LPS** および分子状水素の影響を検討した。

4. 研究成果

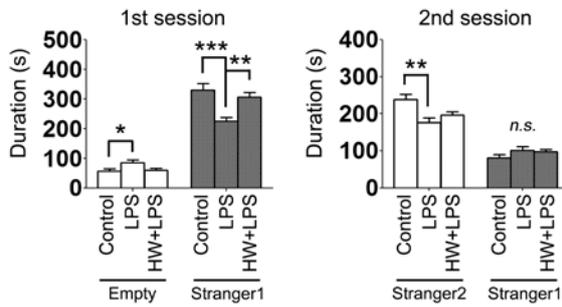
(1) 正常 **control** 群に比して **LPS** 投与群では **3** 週齢での **Y-maze** テストでの交替行動率が有意に減少、**HW+LPS** 群では **control** 群と同等程度まで改善した。これは **LPS** 投与群における短期(空間)記憶障害が **HW** 投与により軽減されたことを意味する (図 1)。

図 1)



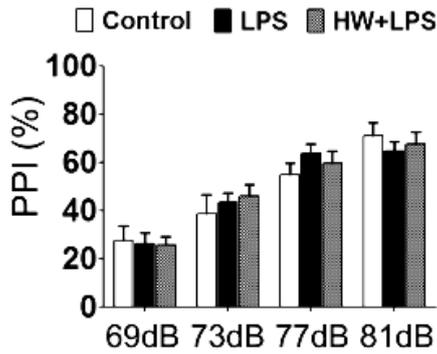
また、**4** 週齢で行った **3 chamber sociability and social novelty** テストにおいて、正常 **control** 群に比して **LPS** 投与群では社会性および認識記憶能が有意に低下したが、やはり **HW** 投与によりこれらが軽減された。これは **LPS** 投与群における社交性の障害が **HW** 投与により軽減されたことを意味する (図 2)。

図 2)



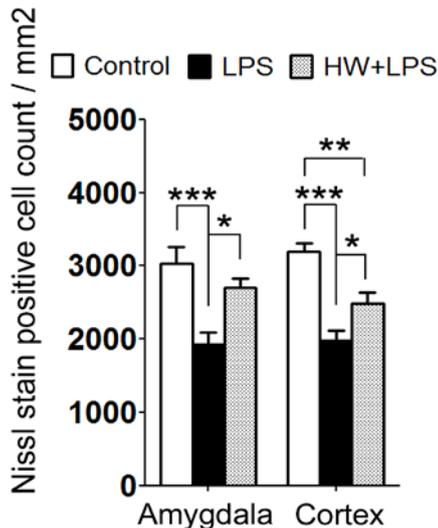
社交性障害は自閉症／統合失調症における症状のひとつである。胎児期炎症に伴い出生児における自閉症／統合失調症の将来的な罹患率が上昇することは既知の事実であり、分子状水素がこれらに対する軽減効果を有する可能性が示唆される。なお、Prepulse inhibition テストでは3群間に有意差を認めなかった (図 3)。

図 3)



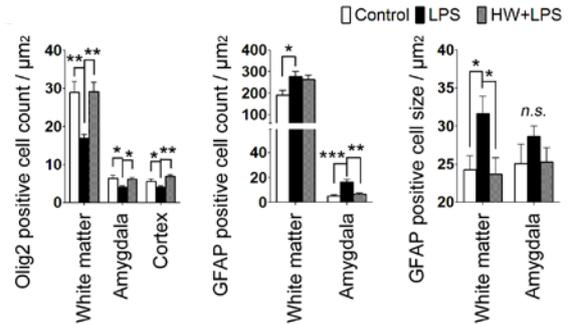
Nissl 染色を用いた脳神経細胞数の検討においては、Control 群に比して LPS 群では、扁桃体および大脳皮質における Neuron 数が有意に減少していた (図 4)

図 4)



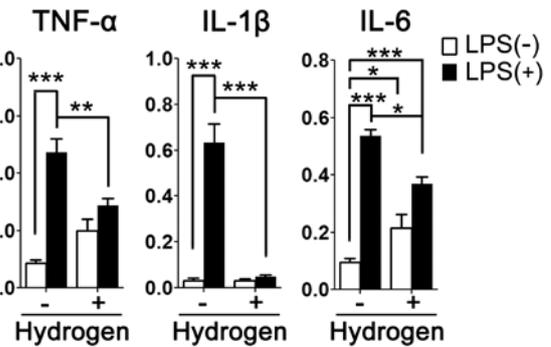
次いで、Olig2 抗体、GFAP 抗体を用いて Oligodendrocyte および Astrocyte の免疫染色を実施。Control 群に比して LPS 群において扁桃体および白質での Oligodendrocyte の有意な減少および Astrocyte の集積、活性化を示唆する形態変化を認めた。一方で、HW+LPS 群ではこれら所見が control 群と同等程度に保たれていた (図 5)。これら結果から行動実験の要因および責任病変の一つとして Astrocyte 活性化による慢性炎症の関与および扁桃体障害の可能性が示唆された。

図 5)



(2) *in vitro* 実験にて Astrocyte に対する LPS 投与は炎症惹起性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6) の発現を増加させたが、分子状水素の前投与によりこれらが抑制されることがわかった (図 6)。

図 6)

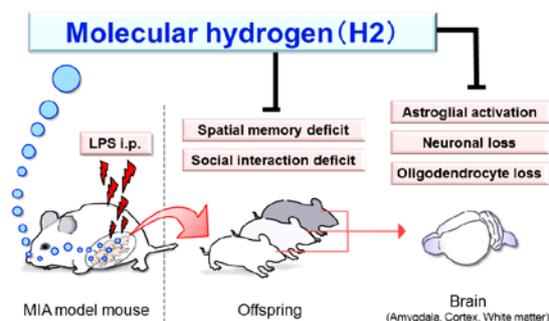


なお、この Astrocyte 結果に Ca シグナリングに関与する可能性を検討したが、明らかな結果は得られなかった。また、Microglia への分子状水素の結果に SOCS3 発現が上昇することがわかり、これが抗炎症効果の一要因である可能性が示唆された。

control 群、LPS 群、HW+LPS 群の各群新生仔から初代培養 Astrocyte を分離培養し各群から RNA を抽出、マイクロアレイ検査を実施した。種々の遺伝子で発現の変化を認めたものの、分子状水素の示した抗炎症効果に関する責任遺伝子を同定するには至らなかった。

これら結果から分子状水素の経母体的投

与が児の脳障害、具体的には胎児期炎症に伴う自閉症／統合失調症様の行動異常に対して機能保護効果を有する可能性が示された。そして、それら責任病変として、扁桃体および大脳皮質における Neuron や Oligodendrocyte の減少、Astrocyte の慢性的な活性化が関与すること、およびそれらに対して経母体的な分子状水素投与が障害軽減効果を示すことが一つの機序と考えられた。



<引用文献>

①Hagberg H et al. The role of inflammation in perinatal brain injury. Nat Rev Neurol. (2015)

②Imai K et al. Neuroprotective potential of molecular hydrogen against perinatal brain injury via suppression of activated microglia. Free Radic Biol Med. (2016).

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

①今井健史, 小谷友美, 伊藤由美子, 森山佳則, 平光志麻, 牛田貴文, 諸井博明, 澤田雅子, 中野知子, 津田弘之, 炭竈誠二, 吉川史隆, 胎児脳障害低減への試み～分子状水素投与による長期的予後改善効果の検討～ 第68回日本産科婦人科学会学術集会 2017年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権] なし

○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]
 ホームページ等:なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

今井 健史 (IMAI Kenji)
 名古屋大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：20778295

(2)研究分担者

なし
 研究者番号：

(3)連携研究者

なし
 研究者番号：

(4)研究協力者

なし