

令和元年6月16日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10106

研究課題名(和文) 新生児低酸素性虚血性脳症におけるマイクログリアの機能解析と臨床応用への基礎的研究

研究課題名(英文) Fundamental and clinical research of microglia in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy

研究代表者

亀井 良政 (Kamei, Yoshimasa)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：00251265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：新生児低酸素性虚血性脳症HIEにおけるマイクログリアの機能解析において、臨床知見を基盤とし相同性を有し、その投影が可能な動物モデルの開発が重要である。そこで、所属機関で自家繁殖の系を立ち上げながら、その霊長類コモン・マーモセット・モデルの開発を試みた。新生児機能的神経学マーカーとして臨床上で汎用される原始反射行動検査系は、HIEでその異常が認められる。これを投影するモデルとして、低酸素環境を暴露した出生直後の新生仔の行動解析系を開発した。障害モデルに至る生理学的確認指標の探索を行なった。その結果、血中山荘飽和度が有用な指標である示唆を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

周産期医療の最難治性の疾患のひとつである新生児低酸素性虚血性脳症は、分子生物学的手法などの積極的治療法開発や、投薬、機能支援などの包括治療法開発が、この問題の解決をもたらすと考えられている。実験動物モデル、特に、齧歯類と臨床研究を繋ぐ霊長類モデルは、多くの中枢神経系等を標的とする創薬での成功で知られる通り、解決の鍵となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Microglia's function researches in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy, HIE, require some suitable experimental animal models comparatively reflected the clinical information. We attempted to develop a common marmoset neonatal model operated by hypoxic environmental regulation and the behavioral examination model according to the developmental milestones in neonatal neurology. Our HIE model marmosets showed the behavioral difficulties in the anti-gravity examination and the disorder primate group revealed physiological difference significantly in the blood oxygen saturation measurement in the hypoxic environmental regulation. These evaluation results suggested not only the useful model but also the perinatal specific neuro-mechanism in the circulatory modulation.

研究分野：産婦人科学

キーワード：マイクログリア コモン・マーモセット 低酸素 酸素飽和度 原始反射行動

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

1. 研究開始当初の背景

周産期医療の進歩により新生児死亡率は改善したが、神経学的後遺症である脳性麻痺の発症率は1,000出生対2.3という高率なままで、治療法としては支持療法が主体であった。新生児の低酸素性虚血性脳症(hypoxic ischemic encephalitis:HIE)は脳性麻痺の原因となり、障害なき生存は重要な課題である。正期産児のHIEに対しては、脳低温療法の有用性が証明され、全国的に普及が進められている。しかし脳低温療法の効果は未だ限定的で約15%の症例に有効であるに過ぎず、また、生後6時間以内に開始することが条件となるに周産期センター以外で出生した症例では搬送に要する時間が問題となる。

現在、脳性麻痺児の約半数以上を早産児が占め、早産児の脳性麻痺の主要な原因は脳室周囲白質軟化症(Periventricular leukomalacia; PVL)である。その中心的病態は、子宮内での低酸素虚血と炎症により、脳室周囲白質軟化症(PVL)を来すが、多様なストレスによるオリゴデンドロサイト前駆細胞(oligodendrocyte precursor cell:OPC)の細胞死である(図1)。これによりOPCは成熟したオリゴデンドロサイトへ分化できず、髄鞘形成が阻害され、軸索変性によりニューロンも細胞死に至る。PVLに対する根本的な治療法はなく、今日の脳性麻痺の最重要疾患となっている(*J. Volpe, Ann Neurol 70:525-9, 2011*)が、低温による副作用が問題となり、またその有用性を示す基礎的なデータも少なく、適応拡大には課題が多い。

2. 研究の目的

PVLにおける病態進行の仕組みとミクログリアの関与の検討

胎児期の脳白質は主にオリゴデンドロサイト系細胞(OL)とミクログリアなどのグリア細胞で構成される。OLは髄鞘形成を担当し、ミクログリアは刈り込みと呼称される不要なシナプスや余剰のOLを除去する。OLとミクログリアが相互的に発達することで脳回路が成熟していく。PVLはこの脳回路の構築が盛んな胎児期において虚血ならびに感染による炎症が契機となり、最終的に脆弱なOLが細胞死を引き起こし発症すると考えられている(*J. Volpe et al, Int. J. Devl Neuroscience 29:423-440, 2011*)。動物のPVLモデルにOLを移植して神経学的予後が改善したという報告があり(*Webber.O.J.et al, The American Journal of pathology 24:171-189, 2009*)、OLを保護することがPVLの基本治療戦略と認識されている。

我々のグループも、PVLの治療法開発のためOLに焦点を当てて研究を行っており、in vitro OPC初代培養系を確立し、低温によりOPCが増殖し、細胞膜に存在するvoltage-dependent anion channel 1 (p1-VDAC1)を介するシグナル伝達系が関与すること、OPCが低酸素無糖負荷によりapoptosisに至り、低温によりそれが抑制されること、さらにこの過程においてERK1/2リン酸化が深く関与していることを明らかとしてきた。しかし、ヒト臨床応用可能な治療法の確立までには至っていない。この原因の一つとして、発達期の脳白質にはOLだけでなくミクログリアが豊富に存在し、虚血や感染による炎症機転がどのようにミクログリアへ作用し、最終的にOLの細胞死につながるか否か解明されていないからである。

近年のヒト剖検脳や動物モデルの検討にて脳障害部位にミクログリアが観察され、PVLの発症や病態の進展にミクログリアが大きく関与していると考えられている(*J. Volpe et al, Int. J. Devl Neuroscience 29:423-440, 2011*)。ミクログリアは発達期脳においては神経回路の淘汰・維持・再構築などを活発に行い正常な神経回路の形成を担う傍らで、脳に内在する唯一の免疫担当細胞でもある。これまでの基礎研究では、ミクログリアの炎

症下での役割について一定の見解を得るに至っていないが、ミクログリアが PVL の発症・進展に中心的な役割を果たしている可能性が十分に推察でき、PVL におけるミクログリアの動態・役割、成長に伴う脳機能の発達への影響を解析することは、今後の治療戦略を考える上で極めて重要であると思われる。本研究で動物モデルを用いて PVL の病態におけるミクログリアの役割を明らかにすることができれば、その作用に交渉して脳神経保護に結びつく新たな治療法を開発できる可能性がある。既に我々はミクログリアが PVL 発症に保護的に作用する可能性があること、さらに、この作用を促進するいくつかの薬物を同定することができた。従って、PVL の病態下におけるミクログリアの役割を解明することは、PVL 発症後の脳発達を診療する周産期医療の臨床現場に沿った観点からも非常に医学的・社会的意義が大きく、新しい知見となると考える。

さらに、我々の施設はコモンマーモセット(CM)の施設内繁殖系を有しており、ヒト新生児 HIE を投影する可能性のある非ヒト霊長類新生仔 HIE モデル、および、病態診断評価系を開発する。新生仔 HIE モデル開発を低酸素環境暴露誘導により試行する。同暴露により表出する病態の程度を識別できる、運動パターン出力試験系の探索と検証を行なう。

3. 研究の方法

(1) MG を除去できる薬剤クロドロネート含有リポソーム(Clo-lipo)を用いて調べた。生後 4 日目 SD ラット右側脳室にリポソームを注射した。48 時間後の生後 6 日目に低酸素虚血処置(左総頸動脈を結紮離断、酸素濃度 6.0% 30 分間暴露)を施行した。また、低酸素時期に合わせて、低体温(31 ± 1.0)を導入した。処置 5 日後、ミエリン塩基性蛋白(MBP)の発現を指標として白質傷害の程度を組織学的に評価した。

(2) 乳幼児神経システム発達の臨床医学的マイルストーンとして知られる抗重力運動パターンの出現年齢指標に相同とみなしている、本施設の先行研究(引用文献、)に基づく霊長類モデルを参照し、その評価系を適用した。本試験系は、コモン・マーモセット新生仔が出生直後より親のしがみつきにより哺乳・保熱・外敵からの保護により生命が保存される生得的神経機能を前提とするもので、図 1 に示す円柱下部で自身の身体を把持する体位を開始とする場合、円柱上位に登り切る行動パターンが再現的にみられる。本行動は、ヒト周産期に一過的に生じ発達過程で消える原始反射の一部を投影していることを仮定し、先行研究では、円柱の表面の摩擦や四肢爪の引っかかり構造を調節し検討した。その結果、ペットシーツを表面に施すことで、把持機能の程度により、再現的自発的出現行動“登り”の障害を“不動”や“落下”、“遅れ”として識別することが示唆された。そこで、ビデオ記録データを対象に、頭部および四肢が円柱上半分に全部移動するまでの秒数を定量した。試験時間を 2 分とし、不動や到達できない場合は最大時間の 120 秒(2 分) 自己身体の把持ができず落下する場合は 180 秒(3 分)とカウント則を定義した。

埼玉医科大学動物実験倫理委員会により審議され承認を受けた内容を遵守した。遺伝的背景のばらつきを最小限に抑えるため、同一自家繁殖ペアより一回に 1~2 頭の新生仔を 4 期に分けて計 6 頭得た。出生後 24

時間以内に何も処置を行なわない状態で、個体毎に行動試験(図 1)を行なった。その後、室温 30 ± 2 、相対湿度平均 40%に保持したチャンバー(160 縦×230 横×180 高 mm)に新

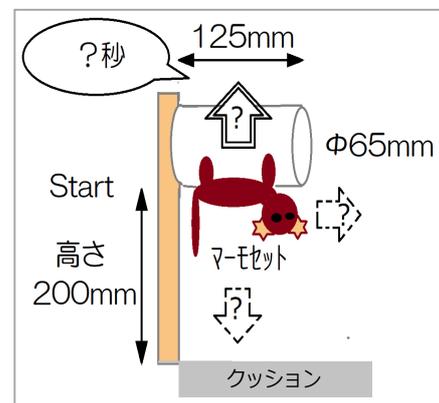


図 1. “原始反射”様行動試験法

生仔一頭を移し、混合ガス（酸素 5%、窒素 95%）を約 1ml/秒以内の流量で循環制御し、庫内を 30 分間以上、酸素分圧 6 %程度に制御した（低酸素環境暴露）。左手掌に血中酸素飽和度・脈拍計測プローブ（コヴィディエン・ Nellcor）を巻き計測した。暴露終了後、行動試験を再度行なった。

4 . 研究成果

(1) リポソーム脳室注射 48 時間後、Clo-lipo 群はコントロールリポソーム(Con-lipo)群と比較し、Iba1 陽性細胞の数が有意に減少していた。低酸素虚血処置 5 日後、Clo-lipo + 低体温群では、Con-lipo + 低体温群と比較して、MBP 染色が有意に脱落した。Clo-lipo 群 (MG 除去群) で低温療法の保護効果が低下したことより、(1)低温療法は MG に作用すること、(2)MG が低温下で白質保護的に機能する可能性が推測された。

(2) 行動試験の結果、6 頭の内、4 頭までが 1 分以内に ” 登り ” 行動で最高位に到達したのに対し、2 頭は ” 不動 ” の傾向が認められた。一方、低酸素制御後は、把持力を失ったかのようにみえる ” 不動 ” や ” 落下 ” を示した 3 頭、および、初期行動試験の結果に関連の無い状況で、30 秒以内に最高位に到達する ” 登り ” 機能の向上を示した 3 頭、の二群に分かれた。

そこで、前者を ” 障害モデル ” 群、後者を ” 非障害 ” 群とみなし、チャンバー内酸素分圧が約 6 %となり生理状態が安定とみなせる状態に至ったときの生理計測情報に病態識別を予測させる指標を探索した。すると、血中酸素飽和度が ” 非障害 ” 群では平均 40%以上が保持されているのに対し、 ” 障害モデル ” 群で 30%以下となり有意に低いことがわかった(図 2A)。これに対して、脈拍回数は両群とも負荷前に 250 回 / 分を示し、低酸素制御中は 200 回 / 分以下に抑制する調節がみられる一方、両群に有意な差異は認められなかった (図 2B)。

以上の結果より、コモン・マーモセット新生仔の HIE モデル作成条件として、30 分以上の低酸素環境制御中に、定常的に血中酸素飽和度値が約 30%を下回るように誘導することとして示唆を得た。また、新生期はいずれの個体でも極めて低い酸素分圧 6 %環境でも

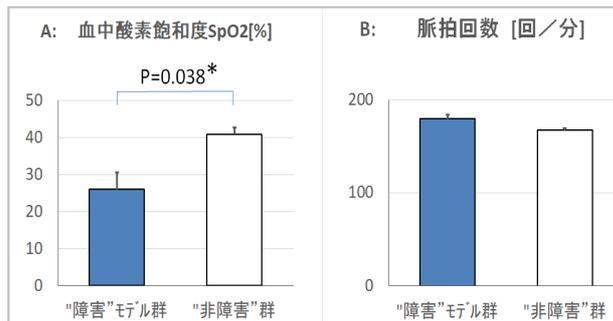


図 2. 低酸素暴露中定常状態平均の生理指

脈動を創成することで循環系ホメオスタシスの調節が働く様子が示唆された。本霊長類モデルは、HIE で障害される可能性の高い錐体外路の支配する抗重力運動機能の障害として定量識別ができる可能性を示唆した。今後、例数を重ね検証を進めると共に、脳内分子基盤を本モデルで探索することができる可能性を示唆した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

1. Suzumori N, Kamei Y, (51 人中 17 番目) et al.. Classification of factors involved in nonreportable results of noninvasive prenatal testing (NIPT) and prediction of success rate of second NIPT. Prenat Diagn. 39:100-106, 2019. doi: 10.1002/pd.5408. PMID: 30586157
2. Yasuda S, Iuchi T, Goto A, Katanoda K, Iida S, Oikawa Y, Namba A, Isshiki M, Inoue I, Kamei Y, Shimada A, Noda M. Weight control before and during pregnancy for patients with gestational diabetes mellitus. J Diabetes Investig. 2018 Dec 12. doi: 10.1111/jdi.12989. [Epub ahead of print] PMID: 30548799

3. Hasegawa J, Kamei Y, et al(20人中20人目); Study group for first trimester Combined Test (FCTG). Distribution of PAPP-A and total hCG between 11 and 13 weeks of gestation in Japanese pregnant women. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2018 Nov 28;1-6. doi: 10.1080/14767058.2018.1536737. [Epub ahead of print] PMID: 30318933
4. Otsuki K, Kawabata I, Matsuda Y, Nakai A, Shinozuka N, Makino Y, Kamei Y, Iwashita M, Okai T. Randomized trial of the efficacy of intravaginal ulinastatin administration for the prevention of preterm birth in women with a singleton pregnancy and both cervical shortening and inflammation of lower genital tract. *J Obstet Gynaecol Res.* 45:86-95, 2019. doi: 10.1111/jog.13796. PMID: 30277627
5. Yamada T, Sekizawa A, Fujii Y, Hirose T, Samura O, Suzumori N, Miura K, Sawai H, Hirahara F, Murotsuki J, Kamei Y, Sago H; Japan NIPT consortium*. Maternal age-specific risk for trisomy 21 based on the clinical performance of NIPT and empirically derived NIPT age-specific positive and negative predictive values in Japan. *J Hum Genet.* 63:1035-1040, 2018. doi: 10.1038/s10038-018-0453-8. PMID: 29849041
6. Toshimitsu M, Kamei Y, Ichinose M, Seyama T, Imada S, Iriyama T, Fujii T. Atomoxetine, a selective norepinephrine reuptake inhibitor, improves short-term histological outcomes after hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal male rat. *Int J Dev Neurosci.* 70:34-45, 2018. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2018.03.011. PMID: 29608930
7. Seyama T, Kamei Y, Iriyama T, Imada S, Ichinose M, Toshimitsu M, Fujii T, Asou H. Pretreatment with magnesium sulfate attenuates white matter damage by preventing cell death of developing oligodendrocytes. *J Obstet Gynaecol Res.* 44:601-607,2018. doi: 10.1111/jog.13568 PMID: 29363221
8. Suzumori N, Kamei Y(53人中18番目), et al. Fetal cell-free DNA fraction in maternal plasma for the prediction of hypertensive disorders of pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 224:165-169, 2018. doi: 10.1016/j.ejogrb.2018.03.048 PMID: 29605711
9. Samura O, Kamei Y(56人中15番目), et al. Current status of non-invasive prenatal testing in Japan. *J Obstet Gynaecol Res.* 43:1245-1255, 2018. doi: 10.1111/jog.13373 PMID: 28586143
10. Tochigi H, Kajihara T, Mizuno Y, Mizuno Y, Tamaru S, Kamei Y, Okazaki Y, Brosens Jan J, Ishihara O. Loss of miR-542-3p enhances IGFBP-1 expression in decidualizing human endometrial stromal cells. *Sci Rep.* 2017 Jan 4;7:40001. doi: 10.1038/srep40001. PMID: 28051155
11. Nishiyama M, Kamei Y(20人中19番目), et al. Factors affecting parental decisions to terminate pregnancy in the presence of chromosome abnormalities: a Japanese multicenter study, *Prenatal Diagnosis*, 36:1121-1126, 2016. doi: 10.1002/pd.4947 PMID: 27760457
12. Yotsumoto J, Kamei Y(46人中11番目), et al. Japan NIPT Consortium. A survey on awareness of genetic counseling for non-invasive prenatal testing: the first year experience in Japan. *J Hum Genet.* 61:995-1001, 2016. doi: 10.1038/jhg.2016.96 PMID: 27604555
13. Suzumori N, Kamei Y(18人中11番目), et al. Japan NIPT Consortium. Fetal cell-free DNA fraction in maternal plasma is affected by fetal trisomy. *J Hum Genet.* 61:647-652, 2016. doi: 10.1038/jhg.2016.25. PMID: 26984559
14. Otsuki K, Nakai A, Matsuda Y, Shinozuka N, Kawabata I, Makino Y, Kamei Y, Iwashita M, Okai T. Randomized trial of ultrasound-indicated cerclage in singleton women without lower

genital tract inflammation. J Obstet Gynaecol Res. 42:148-57, 2016. doi: 10.1111/jog.12880.
PMID: 26633738

15. Tao T, Sakurai H, Kakei H, Morita K, Honda M, Kamei Y, Yamanouchi H, Kunikata T, Koshiba M. Preterm infant vocal behavior and SpO2, pulse rate modulation in neonatal intensive care unit. Regional “Stress and Behavior” ISBS Conference” 2019, in press.

〔学会発表〕(計5件)他22件

(招待講演) M Koshiba, G Karino, A Senoo, T Kunikata, Y Kamei, Hideo Y, Early life influences on social-emotional development in common marmosets. International Primatological Society Congresses 2018 Nairobi, Kenya

T Tao, H Sakurai, H Kakei, K Morita, M Honda, Y Kamei, H Yamanouchi, T Kunikata, M Koshiba. Preterm infant vocal behavior and SpO2 modulation under optical frequency condition in neonatal intensive care unit. 15th International Regional (Asia) ISBS Neuroscience and Biological Psychiatry “Stress and Behavior” Conference

M Yoda, Hua Zhudii, T Tao, Y Kamei, H Yamanouchi, M Koshiba, A male common marmoset grief at the partner's death.

15th International Regional (Asia) ISBS Neuroscience and Biological Psychiatry “Stress and Behavior” Conference

陶婷, 櫻井隼人, 笥紘子, 森田佳代, 本多正和, 山内秀雄, 亀井良政, 國方徹也, 小柴満美子, 胎児期新生児の音声分析で予測する昼・夜の環境温度感受性と酸素飽和度・脈拍数への影響 こども環境学会 2019 九州大会

依田真由子, 小澤晋平, 山内秀雄, 國方徹也, 亀井良政, 久保田健夫, 小柴満美子 サル・モデルの行動定量分析が示す遊具の有無の社会性への影響、こども環境学会 2019 九州大会
〔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 なし

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：小柴 満美子

ローマ字氏名：(KOSHIBA, mamiko)