

機関番号：37111
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590552
 研究課題名（和文） 脳性小児麻痺の機能再生に関する緩徐進行性脳損傷モデルラットを用いた研究
 研究課題名（英文） Study for regeneration of function in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy using animal model of slowly progressive brain damage in rats
 研究代表者
 三島 健一（MISHIMA KENICHI）
 福岡大学・薬学部・准教授
 研究者番号：00320309

研究成果の概要（和文）：新生児低酸素性・虚血性脳症（HIE）は、周産期脳障害の主要な原因であり、重篤な神経学的後遺症をもたらすが有効な治療法がない。そこで、我々は学習療法を行うリハビリテーションが HIE に対して有効であるか検討し、HIE の機能再生における性差の影響を調べた。その結果、学習療法群の雌性ラットは空間学習障害も脳損傷も未療法群に比べて改善した。一方、雄性ラットでは改善されなかった。このことは、性差の影響を考慮して学習療法を行うリハビリテーションは、HIE の治療法として有効である可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：We recently reported that rehabilitative training tasks during adolescence improve spatial learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic (HI) injury in rats without histological improvement. In the present study we focused on sex differences. Wistar rat pups were exposed to a unilateral hypoxic-ischemic insult at 7 days of age. Six weeks after hypoxia-ischemia, rehabilitative training tasks were started. The tasks consisted of the plus maze, the eight-arm radial maze, and the choice reaction time task. Sixteen weeks after the HI insult, the water maze task was performed to evaluate spatial learning ability. Afterwards, we morphologically examined brain injury. Our rehabilitative training significantly improved swimming time and length in females but not in males. Likewise, the training ameliorated infarct areas in the injured cerebral hemisphere in females but not in males. These results suggest that it may be important to develop and evaluate cognitive rehabilitation programs for children with brain injury on the basis of gender.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：行動薬理学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：新生児、低酸素性虚血性脳症、緩徐進行性脳損傷、機能再生、性差

1. 研究開始当初の背景

胎児期における発育・分化の異常が、成人期まで影響を及ぼすものの中に、脳性麻痺を代表とする周産期脳障害がある。胎児期のさまざまな刺激によって正常な発育・分化から逸脱し、異常な発達を生じたり、あるいは、胎

児特有の可塑性によって一見正常に見えることがある。そのため、確立した治療法もなく、その機序も明らかにされていない。

申請者は、この問題を解決するため、脳性麻痺の原因である低酸素性虚血性脳症（HI）

モデルの慢性期を調べた結果、ゆっくりと進行する脳損傷を伴った進行性学習・記憶障害であることを発見した (Behavioral Brain Res 118, 17-25, 2001)。我々は、この脳損傷を、緩徐進行性脳損傷 (slowly progressive brain damage: SPBD) と名付け、この発見はこの分野での研究に広く引用されている (Neurosci Lett 376, 194-199, 2005)。このモデルは、従来の成熟ラットの脳虚血モデルでは認められなかったゆっくりとした進行性の脳損傷であり、性差である先天的要因に加え、体温、飼育条件、感染、ストレスなどの後天的な環境要因によって、SPBDは大きく変動することを明らかにした (科学研究費基盤研究 (C)、課題番号 14572171、17590479)。また、新生児の周産期脳障害の慢性期の機能再生の解析を行う上で非常に有用なモデルであることを示した。

一方、幹細胞を用いた再生医療は不治の病を克服できる可能性を持った新規治療法である。我々は、1) NGFやBDNFなどの栄養因子が変化すること、2) GDNF遺伝子含有の細胞治療によってSPBDが改善したこと、3) リハビリテーションによってSPBDは改善されず、学習・記憶障害のみを改善したこと、4) BrdUを用いた新生細胞が線条体や大脳皮質の神経細胞やアストロサイトに見られたことを明らかにしている (*Am J Obstet Gynecol*, 193, 849-856, 2005, *Brain Res*, 1038, 41-49, 2005)。これらの結果は、このSPBDが再生医療への応用が可能なモデルであることを意味している。

以上の背景により、このSPBDの発症機序に関わる因子を明らかにし、それに基づいた因子を含めた幹細胞を用いることで低酸素性虚血性脳症に対する新たな治療方法を確立できると思われる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、この SPBD モデルに対して学習療法を行うことで、新生児の周産期脳障害の慢性期の機能再生に対する新しい治療法を提唱できるか検討する。また、SPBDの発症機序を調べることで機能再生に関わる生体内因子を調べることである。

3. 研究の方法

<HI モデルの作製> : 生後 7 日齢の Wistar ラットの左総頸動脈を永久決紮し、低酸素 (8%O₂, 92%N₂) 条件を 37°C で 2 時間暴露させて作製した。

<水迷路課題> : 実験装置は、水温 23±2°C の水を入れた円形の水槽 (直径 150 cm, 高さ 45 cm, 水深 32 cm, Neuroscience, Inc. 製)

でそのプールはさまざまな目立つ手がかりのある実験室においた。プールの中には逃避用のプラットホーム (直径 12 cm, 壁面からの距離 30 cm) を固定し、その表面は水面下 2 cm のところにあるようにした。また、実験装置のプールの上方には CCD カメラ (WV-BP334, Panasonic CCTV camera) を設置し、インターフェース (Evanston, IL60202, ACTIMETRICS, Inc. 製) を介して解析ソフト (Water Maze ACTIMETRICS software, ACTIMETRICS, Inc. 製) にて画像処理をし、コンピューター (hp Compaq d530 SFF, HP 製) にて計測描写した。実験はプールを 4 分割したときプラットホームを含まない他の 3 区画において一定の場所にスタート地点を決め、3 つのうちいずれかのスタート地点にラットを壁向きにプールの中に入れ、ゴールに達するまで観察した。最大観察時間を 120 秒とし、ラットが 120 秒以内にゴールを見つけることができない場合は、プラットホームの位置を認知させるためにその上に 30 秒放置した。訓練は 1 日 3 試行を 5 日連続で行った。観察項目は、プラットホームに逃避するまでの遊泳時間 (swimming time; sec)、泳いだ遊泳距離 (swimming length; cm) および遊泳速度 (swimming speed; cm/sec) を測定した。データは 15 試行の平均として表した。

<スケジュール> : 図 1 に示すように学習療法 (pre-training) 群、未療法 (no-training) 群に分け、それぞれ雄性群と雌性群の計 4 群に分類した。学習療法群は、HI 処置 6 週目から十字迷路課題、7 週目から 8 方向放射状迷路課題、11 週目から選択反応時間課題、16 週目から水迷路課題を行った。一方、未療法群は、上述の 3 つ学習課題を行わず、HI 処置 16 週目に初めて水迷路課題を行った。それぞれの行動実験終了後に灌流固定し、前頭葉から 6、8、10 mm の部位で切断し、左右の脳半球面積を測定した。

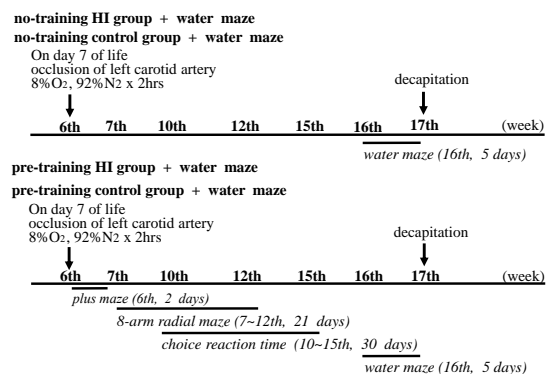


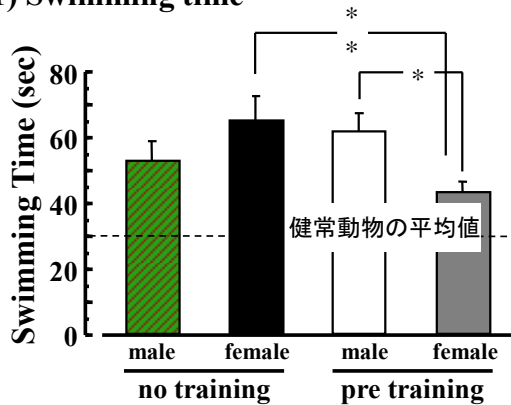
図1 HI処置後のスケジュール

4. 研究成果

(1) 正常動物に対する学習療法の影響
水迷路課題を行う前に 3 つの学習課題を試

行した学習療法群は、正常動物の水迷路課題の空間学習に対して変化はなかった。また、性差の影響もなかった。

1) Swimming time



2) Swimming length

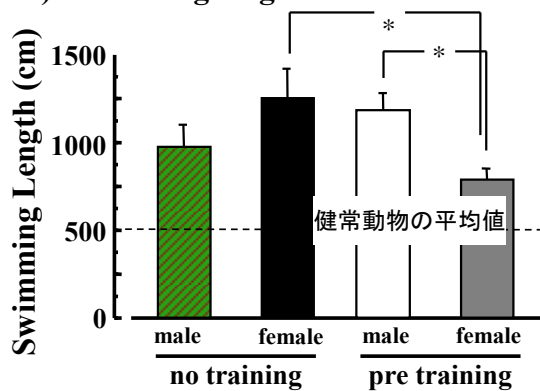


図2 HI 処置後の空間学習に対する学習療法の影響

(2) HI 処置動物に対する学習療法の影響

HI 処置はいずれの群も遊泳時間と遊泳距離が延長したが、遊泳速度には影響しなかった。すなわち、いずれの群も水迷路課題での空間学習が障害された。未療法群では、雌性群の遊泳時間と遊泳距離が雄性群に比べて延長傾向を示した。一方、学習療法群では、雌性群の遊泳時間と遊泳距離が雄性群に比べ、有意に低く、さらに未療法群の雌性群に比べても有意に低かった (図2)。

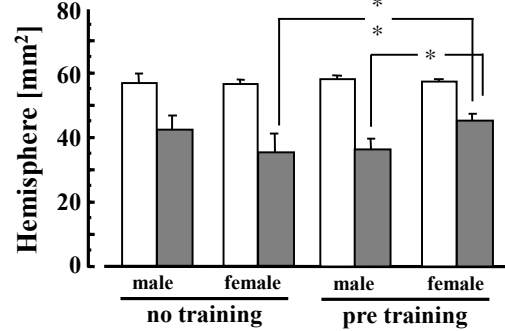
HI 処置によって、いずれの群も脳虚血同側の残存脳面積は低下した。すなわち、いずれの群も脳損傷を示した。学習療法群の雌性ラットの残存した脳面積は、雄性群に比べ、有意に大きく、さらに未療法群の雌性群に比べても有意に大きかった (図3)。すなわち、学習療法群の脳損傷は軽減した。

雄性ラットにおいては空間学習障害も脳損傷も差はなかった。

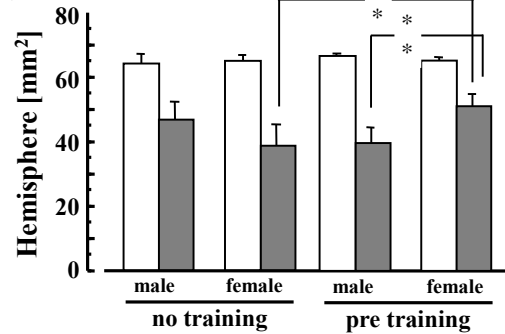
以上の結果から、HI 処置後に、複数の学習課題などの学習療法を行うリハビリテーシ

ョンが雌性ラットでの進行的な学習・記憶障害を改善できることを明らかにした。このことは、新生児低酸素性・虚血性脳症の機能再生の生体因子として、エストロゲンが重要であることを示唆した。

1) 6 mm



2) 8 mm



3) 10 mm

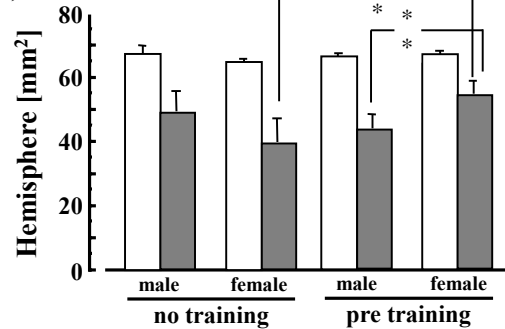


図3 HI 処置による脳損傷に対する学習療法の影響

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42件)

- ① Tsuji M, Aoo N, Harada K, Sakamoto Y, Akitake Y, Irie K, Mishima K, Ikeda T, Fujiwara M. Sex differences in the benefits of rehabilitative training during adolescence following neonatal hypoxia-ischemia in rats. Exp

- Neurol. 226(2):285-292 (2010), 査読有.
- ② Ishikane S, Yamahara K, Sada M, Harada K, Kodama M, Ishibashi-Ueda H, Hayakawa K, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Kangawa K, Ikeda T. Allogeneic administration of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells attenuates acute myocarditis in rats. *J Mol Cell Cardiol.* 49(5):753-761 (2010), 査読有.
- ③ Pu F, Kaneko T, Enoki M, Irie K, Okamoto T, Sei Y, Egashira N, Oishi R, Mishima K, Kamimura H, Iwasaki K, Fujiwara M. Ameliorating effects of Kangen-karyu on neuronal damage in rats subjected to repeated cerebral ischemia. *J Nat Med.* 64(2):167-174(2010), 査読有.
- ④ Fujioka M, Hayakawa K, Mishima K, Kunizawa A, Irie K, Higuchi S, Nakano T, Muroi C, Fukushima H, Sugimoto M, Banno F, Kokame K, Miyata T, Fujiwara M, Okuchi K, Nishio K. ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage: a possible neuroprotective role of ADAMTS13 by ameliorating post-ischemic hypoperfusion. *Blood* 115(8):1650-1653 (2010), 査読有.
- ⑤ Hayakawa K, Nakano T, Irie K, Higuchi S, Fujioka M, Orito K, Iwasaki K, Jin G, Lo EH, Mishima K, Fujiwara M. Inhibition of reactive astrocytes with fluorocitrate retards neurovascular remodeling and recovery after focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 30(4):871-82 (2010), 査読有.
- ⑥ Hayakawa K, Irie K, Sano K, Watanabe T, Higuchi S, Enoki M, Nakano T, Harada K, Ishikane S, Ikeda T, Fujioka M, Orito K, Iwasaki K, Mishima K, Fujiwara M. Therapeutic time window of cannabidiol treatment on delayed ischemic damage via high-mobility group box1-inhibiting mechanism. *Biol Pharm Bull.* 32(9):1538-44 (2009), 査読有.
- ⑦ Pu F, Motohashi K, Kaneko T, Tanaka Y, Manome N, Irie K, Takata J, Egashira N, Oishi R, Okamoto T, Sei Y, Yokozawa T, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M. Neuroprotective effects of Kangen-karyu on spatial memory impairment in an 8-arm radial maze and neuronal death in the hippocampal CA1 region induced

by repeated cerebral ischemia in rats. *J Pharmacol Sci.* 109(3):424-340 (2009), 査読有.

- ⑧ Ishikane S, Ohnishi S, Yamahara K, Sada M, Harada K, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Kitamura S, Nagaya N, Ikeda T. Allogeneic injection of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells induces therapeutic angiogenesis in a rat model of hind limb ischemia. *Stem Cells.* 26(10):2625-2633(2008), 査読有.
- ⑨ Hayakawa K, Mishima K, Irie K, Hazekawa M, Mishima S, Fujioka M, Orito K, Egashira N, Katsurabayashi S, Takasaki K, Iwasaki K, Fujiwara M. Cannabidiol prevents a post-ischemic injury progressively induced by cerebral ischemia via a high-mobility group box1-inhibiting mechanism. *Neuropharmacology* 55(8):1280-6(2008), 査読有.
- ⑩ Hayakawa K, Mishima K, Nozako M, Irie K, Hazekawa M, Mishima S, Fujioka M, Orito K, Egashira N, Iwasaki K, Fujiwara M. Delayed treatment with minocycline improves neurological impairment via activated microglia expressing high-mobility group box1 inhibiting mechanism *Stroke* 39(3):951-958 (2008), 査読有.

その他 32 報

[学会発表] (計 10 件)

- ① 坂元佑哉、三島健一、秋武義治、入江圭一、宮崎蓉子、榎千恵、窪田香織、桂林秀太郎、高崎浩太郎、岩崎克典、藤原道弘、新生児低酸素性虚血性脳症モデルラットにおける虚血同側への異常な回転行動に対するドーパミン神経系の関与、第 63 回日本薬理学会西南部会、2010 年 11 月 26 日、鹿児島
- ② 宮崎蓉子、坂元佑哉、石兼 真、原田和彦、入江圭一、池田智明、松山 清、三島健司、桂林秀太郎、高崎浩太郎、三島健一、岩崎克典、藤原道弘、新生児低酸素性虚血性脳症 (HIE) モデルラットの緩徐進行性脳損傷に対するアストロサイトに発現したカンナビノイド受容体の関与、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 28 日、岡山
- ③ 坂元佑哉、石兼 真、原田和彦、三島健一、入江圭一、樋口 聖、白川教規、宮崎蓉子、池田智明、桂林秀太郎、高崎浩

- 太郎、岩崎克典、藤原道弘、低酸素性虚血により生じる緩徐進行性脳損傷の性差の発現には活性化アストロサイトが関与している、第 83 回日本薬理学会年会、2010 年 3 月 18 日、大阪
- ④ 石兼 真、池田智明、原田和彦、三島健一、岩崎克典、藤原道弘、下肢虚血モデルラットを用いた卵膜由来間葉系幹細胞の他家細胞移植による血管新生効果の検討、第 26 回日本薬学会九州支部大会、2009 年 12 月 12 日、福岡
- ⑤ Y. Sakamoto, S. Ishikane, K. Harada, K. Mishima, K. Irie, T. Nakashima, S. Higuchi, A. Shirakawa, Y. Miyazaki, T. Ikeda, S. Katsurabayashi, T. Takasaki, K. Iwasaki, M. Fujiwara, Ovariectomy gets worse the brain damage and learning impairment by hypoxic-ischemia in neonatal rats. Neuroscience, 2009.10.15, Chicago, USA
- ⑥ Ishikane S, Nagaya N, Yamahara K, Sada M, Harada K, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Ikeda T. Therapeutic Angiogenesis by Transplantation of Allogeneic Fetal Membrane-Derived Mesenchymal Stem Cells. American College of Cardiology 58th Annual Scientific Session, 2009. 3. 28, Orlando, Florida, USA
- ⑦ 原田和彦、大西俊介、山原研一、佐田正晴、石兼真、大谷健太郎、中村篤宏、三島健一、岩崎克典、藤原道弘、寒川賢治、北村惣一郎、永谷憲歳、池田智明、下肢虚血モデルに対するヒト卵膜由来間葉系幹細胞移植による血管新生効果、第 8 回日本再生医療学会総会、2009 年 3 月 5 日、東京
- ⑧ Harada K, Ohnishi S, Yamahara K, Sada M, Ishikane S, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Kangawa K, Kitamura S, Nagaya N, Ikeda T. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells derived from three different layers of human fetal membrane in hindlimb ischemia model. American Heart Association Scientific Session, 2008. 11. 10, New Orleans, USA
- ⑨ Katsuragi S, Ikeda T, Date I, Shingo T, Yasuhara T, Mishima K, Aoo N, Harada K, Egashira N, Iwasaki K, Fujiwara M, Ikenoue T. Implantation of encapsulated glial cell line-derived neurotrophic factor-secreting cells prevents long-lasting learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. 6th Hershey Conference, 2008. 6. 7, Harrisburg, USA
- ⑩ Harada K, Mishima K, Ikeda T, Ishikane S, Nagaya N, Iwasaki K, Fujiwara M. Abnormal turning behavior but not ultrasonic vocalization correlates with hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. 6th Hershey Conference, 2008. 6. 7, Harrisburg, USA
- 〔図書〕(計 1 件)
- ① Egashira N, Mishima K, Iwasaki K, Oishi R, Fujiwara M. Neuroprotective effect of theanine on cerebral ischemia. Edited by Mckinley H. and Jamieson M., In Handbook of Green Tea and Health Research, Nova Science Publishers, Inc., N.Y., pp209-217(2009), ISBN:978-1-60741-045-4
- 〔産業財産権〕
- 出願状況(計 2 件)
- 名称: 生体試料中 2-アラキドノイルグリセロールの定量法
 発明者: 入江圭一、藤原道弘、三島健一、樋口聖、三島健司、早川和秀、佐野和憲、佐藤朝光、秋武義治、荒木舞子、大治万喜子
 権利者: 福岡大学
 種類: 特許
 番号: 特願 2010-234486
 出願年月日: 2010 年 10 月 19 日
 国内外の別: 国内
- 名称: 母乳由来の脂質およびその誘導体を有効成分とする抗菌ペプチドの発現誘導剤あるいは産生促進剤
 発明者: 佐藤朝光、藤原道弘、入江圭一、三島健一、見明史雄、鹿志毛信広、早野智大、添田泰司
 権利者: 福岡大学
 種類: 特許
 番号: 特願 2009-121853
 出願年月日: 2009 年 5 月 20 日
 国内外の別: 国内
- 取得状況(計◇件)
- 名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
- 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三島 健一 (MISHIMA KENICHI)
福岡大学・薬学部・准教授
研究者番号：00320309

(2) 研究分担者

藤原 道弘 (FUJIWARA MICHHIRO)
福岡大学・薬学部・教授
研究者番号：10091331

岩崎 克典 (IWASAKI KATSUNORI)
福岡大学・薬学部・教授
研究者番号：10183196