

機関番号：32610

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591217

研究課題名（和文） 発達期脳障害の機序と可塑性に関する研究

研究課題名（英文） Pathogenesis of premature brain damage and plasticity

研究代表者

岡 明 (OKA AKIRA)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：00251273

研究成果の概要（和文）：脳性まひの原因として最も重要な脳室周囲白質軟化症（PVL）について、炎症機転によるラットモデルを作成した。臨床的な知見から絨毛羊膜炎モデルと新生児敗血症モデルの2つのモデルを作成した。ヒトと同様に脳室周囲の白質に選択的に病変が認められ、白質の基質の菲薄化を伴うのう胞形成等の極めてヒトの病変に類似した組織像とその後の修復組織反応を認めた。ヒトのPVLの病態として感染炎症機転の重要性を示すとともに、現在緊急の課題である治療に向けた研究に有用であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We developed an inflammatory rat model of periventricular leukomalacia (PVL), the most important pathology as a cause of cerebral palsy. Rat models using chorioamnionitis and neonatal sepsis, which were epidemiologically linked to cerebral palsy, have lead to brain injury specifically in periventricular white matter, including cystic formation with rarefaction of white matter, and subsequent histologic reaction of tissue repair. These pathologic changes were similar to human PVL, indicating the significant role of infection and inflammation in the pathogenesis of human PVL, and these models were suitable to the investigation for the development of therapeutic intervention.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：周産期脳障害、脳室周囲白質軟化症、脳性麻痺、可塑性、感染

## 1. 研究開始当初の背景

脳室周囲白質軟化症（PVL）は今日の脳性麻痺の原因として最も重要であるが、特異的な有効な治療法はなく、その開発は緊急の課題となっている。

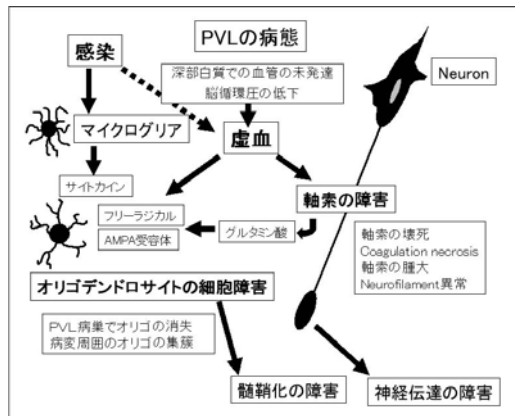
脳性麻痺は生涯に渡り重篤な後遺症をきたし、社会的・医療的に重要な問題である。周産期医療の進歩によって発生率の低下が

期待されたが、本邦を含む先進国での統計では、残念ながら発生率は横ばいあるいは漸増傾向を示している。その内訳として早産低出生体重児として生まれた児の比率が多いことが指摘されており、脳性麻痺の児の約2/3が相当する。この早産低出生体重児における脳性麻痺の主要な病態がPVLであることが知られている。自験例でも、

胎生 34 週以下で出生した児のうち 9.3% が後に脳性麻痺と診断され、その 76% で PVL が原因であった(未発表データ)。また PVL により、例えば視覚認知などの高次脳機能障害等の脳性麻痺以外の神経後遺症を呈することが知られており、約 25~50% の早産低出生体重児では認知や行動面での問題が見られる点からも、PVL による神経後遺症は今日の小児神経学・障害者医学の中での極めて重大な課題となっている。現時点では PVL に対する有効な治療法はなく、本研究は今後の治療法開発に向けての基礎的な研究を行う必要がある。

#### 図 PVL の病態

PVL の病因として脳血管の未熟性等による大脳深部白質の循環不全、グルタミン



酸による細胞障害等が主な原因と考えられてきたが、疫学的なデータから感染などの炎症性の因子の関与が示唆されてきている。

しかし、感染炎症機転による動物モデルは大型動物が中心で、脳障害の機転およびその修復や治療に関する研究は十分ではなかった。

## 2. 研究の目的

PVL は感染・炎症を含む複雑な病態であることが疫学的研究などで示されている。しかし、感染・炎症による PVL の機序は明らかでなく、それに対する特異的な有効な治療法もないためその開発が緊急の課題となっている。本研究では、感染によるラット PVL モデルを作成し、仔の体内の炎症が大脳白質障害をきたす病態を解明するとともに、組織の修復や可塑性に関与する因子の解明を目的とした。

これまでの疫学的なヒトでのデータにて、PVL の発症と感染については、出生前と出生後の 2 つの病態との関連を示唆するデータが示されている。まず、子宮内感染との関連については、絨毛羊膜炎や臍帯炎との関連が認められている。また、早産児では出生後の敗血症と PVL の発症との関連が認められている。

本研究では、発達期の脳における障害

の機序として、PVL に注目し、この 2 つの病態それぞれについて脳障害の動物モデルを作成し、組織修復等の可塑性について検討することを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

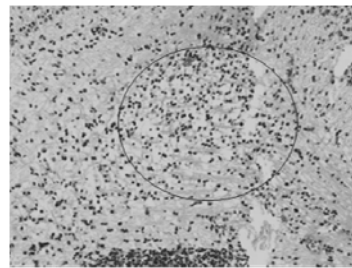
(1) 絨毛羊膜炎モデル：ラットにおいて、感染・炎症による再現性のある PVL のモデルを作成する目的で、ヒトの上行性の子宮内感染を模した実験系を作成した。上行性の感染を模す目的で、子宮口などに投与する方法もあるが、羊膜内に LPS の注入を行った。妊娠 20 日目の SD ラットを麻酔下で開腹をし、子宮内の各羊膜腔に LPS 0.1  $\mu$ g から 1  $\mu$ g を無菌的に注入し、閉腹した。妊娠 22 日に自然分娩をさせ、生後 0 日、7 日、14 日目に、還流固定後に脳を取り出し、ホルマリン固定後、パラフィン包埋し、切片を作成した。

(2) 新生児敗血症モデル：幼弱ラットの腹腔内に LPS を注入した。1 週間後等に還流固定後に脳を取り出し、液体窒素にて凍結した後、切片を切り出し、後固定を行った。

(3) 組織化学：HE 染色、炎症細胞の浸潤については Iba-1、RCA1 の抗体を用いた免疫組織化学で評価を行い、組織修復については GFAP に対する抗体を用いて評価した。また大脳白質の成熟発達については、ミエリン塩基性蛋白 (MBP) に対する抗体を用いて評価した。

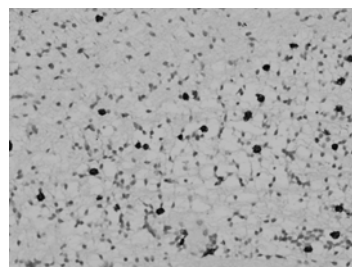
## 4. 研究成果

(1) 絨毛羊膜炎モデル：生後 0 日および 7 日において、脳室周囲白質に炎症性細胞であるマクロファージや活性型ミクログリアの浸潤を認め、一部に軸索の配列や走行の乱れを認めた。また、生後 7 日目から大脳白質に選択的なグリオーシスの所見を認めた。



潤を伴う病変 (日令 0)

左図：HE 染色、子宮内羊膜腔 LPS 投与にて脳室周囲白質に見られた炎症細胞の浸



左図：Iba-1 免疫組織化学病変部に見られた Iba-1 陽性マクロファージ様の炎

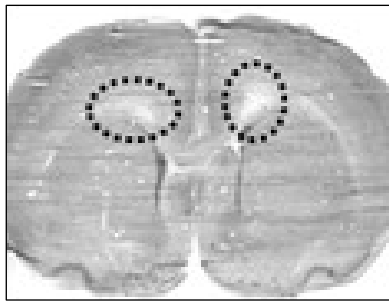
症細胞

表 絨毛羊膜炎モデルの組織所見

日令	0	7	14
マクロファージ浸潤	++	+	
活性化ミクログリア浸潤	++	++	+
軸索の配列の乱れ	+	+	-
軸索の好酸性変化 (HE)	+	+	-
グリオシス	-	+	++
Karyorrhesis	-	+	-

そのほか、一部にアポトーシス様の細胞所見である Karyorrhesis の所見が認められた。典型的な嚢胞性変化は認められなかったが病変は基質の菲簿化と軸索の配列の乱れを伴った局所所見であり、ヒトにおいても嚢胞は形成しない細胞浸潤を主体とした PVL の組織所見に類似していた。ただし、ヒト PVL の早期の特徴的病変である軸索の凝固壊死の所見は認められなかった。これは、の所見に類似したものと考えられた。慢性期の髄鞘化については、MBP 発現の有意な変化は確認できなかった。

(2) 新生児敗血症モデル



左図：幼弱ラット LPS 腹腔内投与にて見られた白質病変 (日令

10)

PVL 腹腔内に LPS を投与し 1 週間後に脳内病変を評価した。両側側脳室周囲白質に限局した病変を認めた。絨毛羊膜炎モデルと同様に、炎症細胞浸潤を認め、軸索の変性による基質の菲簿化が顕著に認めらより嚢胞形成に近い病変を認められた。病変近傍での MBP 発現は減少しており、ヒト PVL に認められる髄鞘化障害が存在していた。なお、この髄鞘化障害は慢性期にも観察され、ヒト PVL と同様の所見であった。現在、細胞障害については、その細胞種と分化などについて解析を行っている。

(4) まとめ

大腸菌由来 LPS を用いて、PVL モデルをラットにおいて作成することができた。ヒト PVL では、脳室周囲白質に限局した対称性の嚢胞形成を伴う病変の出現が特徴的であり、ラットモデルでは、典型的な嚢胞形成ではないが、分布などを含め非常に類似した病変を作成することができた。

炎症細胞浸潤は白質に特異的であり、皮質には組織的な変化を同定できなかった。こ

した白質に特異的な病変形成は、早産児などの未熟脳における障害の最大の特徴であるが、その機序には複数の因子が関与しているものと考えられる。血管因子による未熟脳白質での局所的な循環不全の関与が示されているが、LPS 受容体の関与などの化学的因子の特異性についてはいまだ明らかではない。この点は、今後治療法を考える上で重要であり、今後発達期の脳における感染とそれに関係する因子の検討が必要であると考えられた。

修復や可塑性の変化としては、アストロサイトの活性化による修復所見が中心で、再生につながる強い所見は現時点では確認できずなかった。これは、観察した時期が急性期から亜急性期であったことも関係している可能性があり、今後さらに、時期・方法を変えて、軸索伸長因子 (GAP-43 等) と特異的接着因子 (CHL1) や、成人の白質変性の病変部にて発現が認められている Nogo-A/LINGO-1 および vitronectin・integrin について検討する必要があると考えられる。

また、客観化した指標での観察は行えなかったが、LPS 負荷群では運動機能が低下している様子が観察されており、今後運動機能を解析して、脳性麻痺のモデルとしての有効性も検証する必要があると考えられた。

これまで感染によるヒト PVL のモデルは、白質が大きい大型動物を用いたものであり、今回初めてラットにおいて作成できたことは、今後治療的な介入による病態の把握と治療法の検討に非常に有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 27 件)

① Saito T, Hanai S, Takashima S, Nakagawa E, Okazaki S, Inoue T, Miyata R, Hoshino K, Akashi T, Sasaki M, Goto Y, Hayashi M, Itoh M. Neocortical layer formation of human developing brains and lissencephalies: consideration of layer-specific marker expression. Cereb Cortex (査読有) 2011;21:588-596

② Hanai S, Saito T, Nakagawa E, Arai A, Otsuki T, Sasaki M, Goto Y, Itoh M. Abnormal maturation of non-dysmorphic neurons in focal cortical dysplasia: immunohistochemical considerations. Seizure (査読有) 2011;19:274-9

③ Takashima S, Itoh M, Oka A. A history of our understanding of cerebral vascular development and pathogenesis of perinatal brain damage over the past 30 years. Semin Pediatr Neurol (査読有) 2009;16:226-236

④ Abe Y, Oka A, Mizuguchi M, Igarashi T, Ishikawa S, Aburatani H, Yokoyama S,

Asahara H, Nagao K, Yamada M, Miyashita T. EYA4, deleted in a case with middle interhemispheric variant of holoprosencephaly, interacts with SIX3 both physically and functionally. Hum Mutat (査読有) 2009;30:E946-955

⑤Kato M, Takita J, Takahashi K, Mimaki M, Chen Y, Koh K, Ida K, Oka A, Mizuguchi M, Ogawa S, Igarashi T. Hepatoblastoma in a patient with Sotos syndrome. J Pediatr (査読有) 2009;155:937-939

⑥Sato A, Mizuguchi M, Mimaki M, Takahashi K, Jimi H, Oka A, Igarashi T. Cortical gray matter lesions in acute encephalopathy with febrile convulsive status epilepticus. Brain Dev (査読有) 2009;31;622-4.

⑦Tumurkhuu M, Saitoh M, Sato A, Takahashi K, Mimaki M, Takita J, Takeshita K, Hama T, Oka A, Mizuguchi M. Comprehensive genetic analysis of overlapping syndromes of RAS/RAF/MEK/ERK pathway. Pediatr Int (査読有) 2010;52;557-62.

⑧岡明、鈴木啓二、管波佑介、近藤敦、高橋秀弘、正木宏、鈴木理永、田村正徳 実験的絨毛羊膜炎による脳室周囲白質軟化症のラットモデル 日本周産期・新生児医学会雑誌 (査読無) 2009;45;1208-1210

[学会発表] (計11件)

①岡明 未熟児の脳障害と炎症機転 第51回日本小児神経学会総会 平成21年5月30日 米子

②岡明、鈴木啓二、管波佑介、近藤敦、高橋秀弘、正木宏、鈴木理永、田村正徳 実験的絨毛羊膜炎による脳室周囲白質軟化症のラットモデル 第45回日本周産期・新生児医学会学術集会 平成21年7月14日 名古屋

③Oka A. Inflammatory mechanisms of white matter injury in immature brains: A rat model of chorioamnionitis induces lesions similar to periventricular leukomalacia.

The 3<sup>rd</sup> Germany-Japan Neuropediatric Symposium 平成20年9月5日, Munich, German

④Oka A, Takahashi H, Masaki H, Suzuki K, Tamura M. Periventricular white matter lesion by intrauterine exposure to lipopolysaccharides in rats: a model of periventricular leukomalacia due to chorioamnionitis. 35th Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiology Society 平成20年6月24日, Maastricht, the Netherlands

[図書] (計22件)

①岡明 脳室周囲白質軟化症 五十嵐隆監修 総合小児科診療のための小児科レビュ

ー2010 東京:総合医学社、2010:277-283

②岡明 脳性麻痺 小児の治療指針 小児科診療 73 巻増刊号 東京:診断と治療社:2010;726-728

③岡明 脳室内出血、脳室周囲白質軟化症 山口徹、北原光夫、福井次矢編集 今日の治療指針 東京:医学書院、2010:1147-1148

④岡明 脳室周囲白質軟化 周産期診療指針2010 周産期医学増刊号 東京:東京医学社 2010:742-744

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡明 (OKA AKIRA)

研究者番号: 00251273

### (2) 研究分担者

伊藤 雅之 (ITO MASAYUKI)

国立精神・神経医療研究センター神経研究所・室長

研究者番号: 50243407