

機関番号： 32620

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591306

研究課題名 (和文) 胎児胎盤系に着目した早産児脳障害の病態解明

研究課題名 (英文) Analyses on Perinatal Brain Injury on the basis of Evaluation of Fetus-Placenta System.

研究代表者

奥村 彰久 (OKUMURA AKIHISA)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：60303624

研究成果の概要 (和文)：

臍帯血中の Tau 蛋白・S-100B・8OHdG・8-isoprostane・MMP-9 は、脳室周囲白質軟化症児と対照児との間に有意差を認めなかった。臍帯血リンパ球の全 mRNA の発現パターンを脳室周囲白質軟化症児と対照児との間で比較したところ、15 遺伝子の発現が脳室周囲白質軟化症児で有意に増加し、そのうち 5 つはリボゾーム蛋白を、他の 1 つは翻訳伸長因子をコードしていた。脳室周囲白質軟化症児においてはリンパ球の活性化が起きている可能性が示唆された。胎児発育不全ラットと対照ラットとについて大脳的全 RNA の発現パターンを比較したところ、胎児発育不全ラットで発現が低下している遺伝子が 73 個、亢進している遺伝子が 55 個同定された。胎児発育不全モデルラットにおける母獣ドコサヘキサエン酸投与の効果では、ドコサヘキサエン酸強化群で通常飼料群に比べて仔の大脳のドコサヘキサエン酸が有意に高値であった。母獣ドコサヘキサエン酸投与により仔の脳のドコサヘキサエン酸増加をもたらすことが示された。

研究成果の概要 (英文)：

There were no significant differences in the cord blood levels of Tau protein, S-100B, 8OHdG, or MMP-9 between the preterm infants with and without periventricular leukomalacia. We examined the difference in mRNA expression in umbilical cord blood according to the presence or absence of periventricular leukomalacia. Five of the 15 up-regulated genes are coding ribosomal proteins, and another encodes a translation elongation factor. This may indicate an activation of lymphocytes during the fetal period. We examined the difference in mRNA expression in the cerebrum between fetal growth retardation model rats and control ones. Seventy-three genes were up-regulated in fetal growth retardation model rats, and 55 were down-regulated. We evaluated the effect of maternal docosahexaenoic acid-enriched diet on the brain of fetal growth retardation model rats. The percentage of docosahexaenoic acid was higher in the docosahexaenoic acid-enriched group than in the control group.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
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・胎児・新生児医学

キーワード：新生児脳障害

1. 研究開始当初の背景

周産期医療の進歩に伴い早産児の生存率

は大きく改善した。しかし、生存した児の神経学的後障害は稀でないことが明らかにな

った。早産児の神経学的後障害の原因として脳室周囲白質軟化症を始めとする種々の脳障害が知られており、現在まで多くの研究がなされてきたが、その原因や病態は十分に明らかになっていない。早産児の神経学的予後の改善は新生児医療の最重要課題であり、その発症原因や病態の解明は急務である。

我々は、新生児脳波を用いて新生児脳障害の病態を研究してきた。その結果、後に神経学的後障害を認める児では、胎児心拍曲線の基線変動増加が高率であり、出生後早期から強い脳波異常を認めることが明らかになった。また、後に脳室周囲白質軟化症を発症する児では人工換気が必要な割合が高く、出生後早期に一過性の腎障害を認めることを明らかにした。さらに近年、絨毛膜羊膜炎による子宮内での炎症性サイトカインなどに対する曝露や酸化ストレスが、神経学的後障害と関連することが報告されている。また、胎盤の病理変化と神経学的後障害との関連も報告されている。

また、超低出生体重児の生存率が著しく改善するにつれ、生存した超低出生体重児において神経学的後障害がより高率であることが問題になってきた。そのなかで、胎児発育不全を認めた児の神経学的予後がより不良であり、このような児における脳障害の病態解明が特に重要になってきた。胎児発育不全の主たる要因である妊娠高血圧症では、胎児胎盤系への血流不足が関与し、胎児は低栄養状態であることが知られている。このような状態が胎児の中枢神経系に与える影響を解析することは、胎児発育不全児の予後を改善する介入法を明らかにするために必要である。また、胎児発育不全に介入するには、出生前から介入する方法を開発する必要があると推測される。

このように、早産児の脳障害には母体と胎児を結び付けている胎児胎盤系の変化が密接に関連していることが推測される。我々は早産児の脳障害の病態を明らかにし、それに対する介入法を解明するためには、胎児胎盤系の多角的な解析をすることが不可欠であると判断し、今回の研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、以下の2つのトピックを明らかにすることを目的とした。

(1) 脳室周囲白質軟化症における胎児・胎盤系の解析

脳室周囲白質軟化症の病態を解明するために、臍帯血マーカーの解析、臍帯血・胎盤のRNA発現解析を行う。脳室周囲白質軟化症と密接に関連する臍帯血マーカーは、現在まで明らかになっていない。今回の研究では、臍帯血中の酸化ストレスマーカー（8OHdG な

ど）・脳障害マーカー（Tau 蛋白など）・血管内皮障害マーカー（MMP-9 など）といった新しいマーカーを測定し、神経学的後障害との関係を検討してその意義を明らかにする。また、臍帯血におけるRNAの発現をマイクロアレイを用いて網羅的に解析し神経学的後障害との関係を検討することで、予測外の変化を検索し現在知られていない新しいマーカーの探索を行う。

(2) 胎児発育不全における中枢神経障害の解析と母体不飽和脂肪酸補充の効果

ヒトにおける重症妊娠高血圧症に類似した病態をもつ合成トロンボキサン A2 投与による胎児発育不全ラットを作成し、解析を行う。胎児発育不全ラットおよび対照ラットにおいて、生後早期に大脳を取り出して大脳におけるRNAの発現をマイクロアレイを用いて網羅的に解析する。また、脳組織の発生に重要な不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸を母獣に投与し、出生した胎児発育不全ラットの脳における脂肪酸組成を解析して母体不飽和脂肪酸解析の効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) 脳室周囲白質軟化症における臍帯血マーカーの探索

対象は、在胎週数 32 週以下の早産児の臍帯血とする。多発奇形や水頭症などの中枢神経系の形成異常を認めた症例は除外する。また、脳波や頭部エコー・MRI などの結果から、明らかな出生後の脳侵襲による脳障害を受けたと判断された症例も除外する。

児が出生した後、直ちに臍帯血を採取して血清を分離し、凍結保存する。以下の項目について測定を行い、脳室周囲白質軟化症を発症した児としなかった児との間で比較する。

脳障害マーカー：Tau 蛋白・S-100B

酸化ストレスマーカー：

8OHdG・8-isoprostane

血管内皮障害マーカー：MMP-9

(2) 脳室周囲白質軟化症児の臍帯血の RNA 発現解析

対象は在胎週数 32 週以下の早産児の臍帯血とする。多発奇形や水頭症などの中枢神経系の形成異常を認めた症例は除外する。

児が出生した後、直ちに臍帯血を採取する。採取した臍帯血の RNA を QIAGEN 社製 TissueProtect Tubes を用いて安定化させたのち、ランダムな符号を付与して解析担当者に送付する。Agilent 社製オリゴ DNA マイクロアレイを用い、同社のプロトコールに従って解析する。

出生した児については経時的な脳波検査を行い、脳障害の有無およびその受傷時期を決定する。出生までの脳侵襲によると推定さ

れた脳室周囲白質軟化症の児と、退院までの経時的な脳波・頭部エコー・頭部 MRI の全てに異常を認めなかった対照児との間で、臍帯血 RNA の発現を比較する。

(3) 胎児発育不全モデルラットの脳 RNA 発現解析

妊娠 SD 系ラットの母獣の腹腔内に妊娠 13 日目に浸透圧ポンプを埋め込み、合成トロンボキサン A2 が 20ng/時で持続投与されるように設定して胎仔に胎児発育不全を誘導する。経膈分娩として、新生仔期は母獣に哺育させる。出生翌日に仔ラットから大脳を取り出し、QIAGEN 社の RNA later を用いて安定化させる。Agilent 社製オリゴ DNA マイクロアレイを用い、同社のプロトコールに従って解析する。生理食塩水を入れた浸透圧ポンプを埋め込んだ対照ラットと胎児発育不全ラットとの間で大脳における RNA の発現を比較する。

(4) 胎児発育不全モデルラットにおける母獣ドコサヘキサエン酸投与の効果

胎児発育不全ラットを作成する方法は 3) と同様である。胎児発育不全モデルラットの母獣に対し脂肪酸組成の異なる 2 種類の飼料を与えた。通常群はドコサヘキサエン酸を含まない通常の soy diet をドコサヘキサエン酸強化群は 1kg 当たり 5.8g のドコサヘキサエン酸を含む特殊飼料を与えた。特殊飼料は胎齢 7 日から分娩まで与えた。出生後は両群とも通常の soy diet で飼育した。日齢 1 および 7 に仔ラットから脳全体を取り出し、Bligh and Dyer の方法によって全脂肪を抽出した。Sep-Pak silica column (Waters 社) を用いてリン脂質分画を抽出し、ガスクロマトグラフィーにて各脂肪酸を定量した。通常飼料群とドコサヘキサエン酸強化群との間で、脳の脂肪酸分画を比較した。

4. 研究成果

(1) 脳室周囲白質軟化症における臍帯血マーカーの探索

脳波検査の結果などから、出生時までに受傷と判断した脳室周囲白質軟化症児 5 例と、対照早産児 15 例とについて解析した。統計学的解析には Mann-Whitney の U test を用い、p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありとした。

その結果、Tau 蛋白・S-100B・8OHdG・8-isoprostane・MMP-9 のいずれもが、2 群間で有意差を認めなかった。この結果から、今回検討した臍帯血マーカーでは脳室周囲白質軟化症の把握は困難であると考えた。

(2) 脳室周囲白質軟化症児の臍帯血の RNA 発現解析

脳波検査の結果などから出生時までに受傷と判断した脳室周囲白質軟化症児 3 例と、

在胎週数や出生前因子が概ね合致する対照児 5 例とについて解析した。臍帯血のリンパ球から全 RNA を抽出して増幅し、4×44K のマイクロアレイを用いて全 mRNA の発現パターンを脳室周囲白質軟化症児と対照児との間で比較した。p 値が 0.05 未満のものを RNA 発現の有意差ありと判定した。

その結果、15 遺伝子の発現が脳室周囲白質軟化症児で有意に増加していた。このうち 5 つの遺伝子はリボソーム蛋白をコードしており、1 つは翻訳伸長因子をコードしていた。また、4 遺伝子は免疫反応や炎症との関係が示唆されているが、その機能は十分明らかになっていないものであった。

一方、7 遺伝子の発現が脳室周囲白質軟化症児で有意に減少していた。このうち 3 遺伝子は免疫反応や炎症との関係が示唆されるが、うち 2 つの遺伝子の機能は十分に明らかでなかった。これらの結果から、脳室周囲白質軟化症児の臍帯血では対照児に比較して蛋白合成が盛んに行われていることが推測される。したがって、脳室周囲白質軟化症児においては何らかの理由でリンパ球の活性化が起きている可能性が示唆された。一方、免疫反応や炎症に関する遺伝子の発現は大きく変化していなかった。

(3) 胎児発育不全モデルラットの脳 RNA 発現解析

胎児発育不全ラット 3 例・対照ラット 3 例について、大脳の組織から全 RNA を抽出して増幅した後、4×44K のマイクロアレイを用いて全 mRNA の発現パターンを解析した。2 群間の RNA の発現の違いを GeneSpring ver. 8 (Agilent 社) を用いて解析した。今回は p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありとした。

その結果、胎児発育不全ラットで 10 倍以上発現が低下している遺伝子が 73 個、10 倍以上発現が亢進している遺伝子が 55 個同定された。Ontology analysis ではこれらの特徴付ける pathway は同定できなかった。発現が低下している遺伝子には aquaporin 4 遺伝子や corticotropin releasing hormone 遺伝子が、発現が亢進しているものには fatty acid binding protein 9 遺伝子や apolipoprotein A-IV 遺伝子などが含まれていた。

(4) 胎児発育不全モデルラットにおける母獣ドコサヘキサエン酸投与の効果

図 1 に日齢 1・7 の仔の体重を示す。いずれにおいても通常飼料群・ドコサヘキサエン酸強化群は対照に比べて有意に体重が少なかった。また、通常飼料群とドコサヘキサエン酸強化群との間には仔の体重に差はなく、ドコサヘキサエン酸を強化しても胎内での発育を促進する効果はなかった。

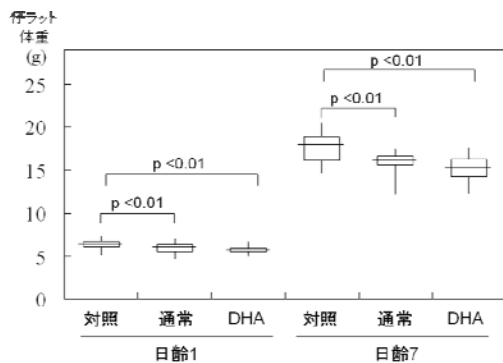


図1. 仔ラットの体重
通常：通常飼料群、DHA：強化群

図2に日齢1・7における脳の脂肪酸組成を示す。いずれにおいてもドコサヘキサエン酸A強化群で通常飼料群に比べてドコサヘキサエン酸が有意に高値で、アラキドン酸が低値であった。したがって、母獣ドコサヘキサエン酸投与により仔の脳のドコサヘキサエン酸増加をもたらすことが示された。

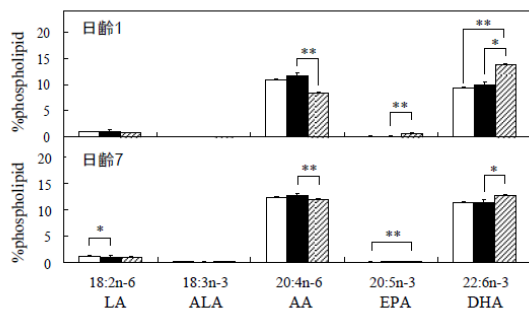


図2. 仔ラットの脳の脂肪酸組成

LA：リノレン酸、ALA：αリノレン酸、AA：アラキドン酸、EPA：エイコサペンタエン酸、DHA：ドコサヘキサエン酸

*：p < 0.05、**：p < 0.01

□ 対照 ■ 通常 ▨ DHA

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計45件)

- ① Okumura A, Suzuki M, Kubota T, et al (5名省略、1番目)、West syndrome in extremely preterm infants: its relation to postnatal events、Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed、査読有、93巻、2008、F326-327.
- ② Okumura A, Hayakawa M, Tsuji T, et al (2名省略、1番目)、Diffusion tensor imaging in infants with basal ganglia-thalamic lesions、Eur J Paediatr Neurol、査読有、12巻、2008、412-416.
- ③ Sato Y, Hayakawa M, Okumura A, et al (10名省略、4番目)、Delayed neurological signs following isolated parasagittal

injury in asphyxia at term、Eur J Paediatr Neurol、査読有、12巻、2008、359-365.

- ④ Kidokoro H, Okumura A, Kato T, et al (5名省略、2番目)、Electroencephalogram and flash visual evoked potentials for detecting periventricular leukomalacia、Neuropediatrics、査読有、39巻、2008、226-232.
- ⑤ Okumura A, Kidokoro H, Shoji H, et al (5名省略、1番目)、Kernicterus in preterm infants、Pediatrics、査読有、123巻、2009、e1052-1058.
- ⑥ Okumura A, Lee T, Yamamoto T, et al (6名省略、1番目)、Brainstem disconnection associated with nodular heterotopia and proatlantal arteries、Am J Med Genet Part A、査読有、149巻A、2009、2479-2483.
- ⑦ Kidokoro H, Okumura A, Hayakawa F, et al (7名省略、2番目)、Chronologic Changes in Neonatal EEG Findings in Periventricular Leukomalacia、Pediatrics、査読有、124巻、2009、e477-484.
- ⑧ Ikeno M, Okumura A, Hayakawa M, et al (4名省略、2番目)、Fatty acid composition of the brain of intrauterine growth retardation rats and the effect of maternal docosahexaenoic acid enriched diet、Early Hum Dev、査読有、85巻、2009、733-735.
- ⑨ Okumura A, Hayakawa M, Oshiro M, et al (3名省略、1番目)、Nutritional state, maturational delay on electroencephalogram, and developmental outcome in extremely low birth weight infants、Brain Dev、査読有、32巻、2010、613-618.
- ⑩ Okumura A, Yamamoto T, Kidokoro H, et al (6名省略、1番目)、Altered gene expression in umbilical cord mononuclear cells in preterm infants with periventricular leukomalacia、Early Hum Dev、査読有、86巻、2010、665-667.
- ⑪ Kato T, Okumura A, Hayakawa M, et al (11名省略、2番目)、Prolonged EEG depression in term and near-term infants with hypoxic ischemic encephalopathy and later development of West syndrome、Epilepsia、査読有、51巻、2010、2392-2396.
- ⑫ Kidokoro H, Hayakawa M, Okumura A, et al (4名省略、7番目)、Absent cyclicality on aEEG within the first 24 h is associated with brain damage in preterm infants、Neuropediatrics、査読有、41巻、2010、241-245.

[学会発表] (計40件)

- ① 奥村彰久、基底核視床病変における拡散テンソル画像、第50回日本小児神経学会総会、2008年5月30日、東京。
- ② 奥村彰久、著明な高ビリルビン血症を欠く早産児の核黄疸様症候群 — 診断基準案の提案 —、第44回日本周産期新生児医学会総会、2008年7月15日、横浜。
- ③ 奥村彰久、Brainstem Disconnection の1例、第51回日本小児神経学会総会、2009年5月28日、米子。
- ④ 奥村彰久、超低出生体重児の新生児期における栄養状態と6歳時の発達予後、第45回日本周産期新生児医学会総会、2009年7月14日、名古屋。
- ⑤ 奥村彰久、新生児発作および新生児発作様イベントの症状型分類の提案、第54回日本未熟児新生児学会、2009年11月30日、横浜。
- ⑥ 奥村彰久、早産児核黄疸の1例、第113回日本小児神経学会総会、2010年4月23日、盛岡。
- ⑦ Akihisa Okumura、Altered Gene Expression in Umbilical Cord Mononuclear Cells in Preterm Infants with Periventricular Leukomalacia、第46回日本周産期・新生児医学会学術集会、2010年7月12日、神戸。

[図書] (計3件)

- ① 早川文雄、奥村彰久、加藤徹、丸山幸一、著、診断と治療社、誰でも読める新生児脳波、2008年、233ページ。
- ② 奥村彰久、加藤徹、丸山幸一、久保田哲夫、城所博之、辻健史、著、診断と治療社、新生児発作と脳波モニタリング、2009年、205ページ。
- ③ 奥村彰久、國方徹也、早川昌弘、服部哲夫、久保田哲夫、加藤徹、城所博之、著、診断と治療社、aEEG ビギナーズマニュアル、2010年、87ページ。

[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) 研究代表者

奥村 彰久 (OKUMURA AKIHISA)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号: 60303624

(2) 研究分担者

早川 昌弘 (HAYAKAWA MASAHIRO)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 40343206

山本 俊至 (YAMAMOTO TOSHIYUKI)

東京女子医科大学・付置研究所・准教授

研究者番号: 20252851