

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月30日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591425

研究課題名（和文）超早産児の神経学的後遺症としての高次脳機能障害についての病態研究

研究課題名（英文）Pathological study of higher brain dysfunction as a neurological outcome in extremely preterm infants

研究代表者

出口 貴美子（DEGUCHI KIMIKO）

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第二部・研究生

研究者番号：50227542

研究成果の概要（和文）：超早産児の神経学的後遺症として、大脳白質病変に起因する脳性麻痺とともに、最近では、多動や学習障害等の高次脳機能障害が注目されている。しかし、その高次脳機能障害の原因については、依然不明な点が多い。我々は、これまでに超未熟児剖検脳の神経病理学的解析を行った結果、虚血性脳障害を有する超早産児の脳では、白質障害以外に、脳室周囲の神経前駆細胞が傷害されていることを見いだした。超早産児にあたる在胎28週未満の時期は、脳の神経前駆細胞の皮質への移動が終了する直前であり、この時期の傷害がその後の神経細胞の皮質への移動の過程に影響を及ぼし、最終的に大脳皮質の発達を障害し、これが高次脳機能障害の原因の一つになるのではないかと仮説を立てた。そこで、本申請では、この仮説を検証するために、長期生存例を含む超早産児剖検脳の神経病理学的検索と、マウスを用いた周産期脳虚血モデルの構築とその解析を行い、超早産児の神経学的後遺症である高次脳機能障害の病態を明らかにする

研究成果の概要（英文）：Recently, higher brain dysfunction including hyperactivity and learning disability have been highlighted as neurological outcome of the extremely preterm infants. We hypothesized that the brain ischemia in the extremely preterm infants may result in injuries to the neurons migrating to cortex, subsequently damaging the developing cerebral cortex and causing higher brain dysfunction. In this study, we sought to establish a mouse model for prenatal ischemic brain injuries and delineated the cellular pathological basis for the higher brain dysfunction in extremely preterm infants.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
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：未熟児医学、神経幹細胞、高次脳機能障害

1. 研究開始当初の背景

我が国の周産期医療の発展とともに、在胎 28 週未満の超早産児の生存率は著しく向上した。しかしその一方で、虚血性脳障害による後遺症の頻度は減少しておらず、小児医療の大きな課題の一つとなっている。早産児の虚血性脳障害による神経学的後遺症の特徴としては、脳性麻痺などの運動発達障害が主であるが、その中の超早産児では、学習発達障害等の高次脳機能障害の頻度が高い事が近年注目されている¹。これまでの我々²⁻⁴を含む国内外の研究では、超早産児の虚血性脳障害の主な病変は、広範性的大脑白質障害であると考えられており、オリゴデンドロサイトの前駆細胞傷害が将来の運動発達障害の原因としてわかってきた。一方、高次脳機能障害に関しては、むしろ皮質の障害と関連があると推測され、実際に MRI による画像解析で、脳室壁の不整、白質の容量減少などに加え、生後的大脑皮質の発達の障害が指摘されており⁵、この所見と高次脳機能障害との関連性が示唆されている。しかし、なぜ皮質の発達の障害が起こるのかといった病態に関しては、ほとんどわかっていない。また、これが白質病変と関連するのかという点についても不明である。

2. 研究の目的

我々は、脳室壁の不整の所見に注目し、最初に、ヒト在胎 28 週の正常の脳室周囲を観察したところ、神経前駆細胞が予想以上に豊富に存在し、神経細胞の皮質への移動が行われていることの実事を見いだした。そこでこの時期での神経前駆細胞に注目し、超未熟児剖検脳神経病理学的解析を行ったところ、虚血性脳障害を有する超早産児の脳では、ほぼ全例で脳室周囲の神経前駆細胞が広く傷害されていることがわかった。また、長期生存例では、脳室上衣層の広範な消失や脳室下帯の癍痕化も認められた。この時期の広範な脳室周囲の組織傷害は、その後、正常に行われるはずの神経前駆細胞への分化、移動、成熟障害をもたらし、その結果、白質のみならず大脳皮質の発達障害、ひいてはその後遺症として知的及び行動障害を引き起こす要因になり、高次脳機能障害に繋がるのではないかと考えた。従って我々は、脳室上衣層を含むこの脳室周囲の神経前駆細胞の傷害が、これまで明らかでなかった大脳皮質の発達の障害をもたらす重要な病態の一つではないかと考え、障害後の脳再生の過程も含め、これらのメカニズムを明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、超早産児の神経後遺症として注目されている高次脳機能障害について、周

産期に起きた脳室周囲の神経前駆細胞傷害が、その後的大脑の皮質の発達過程での障害の関連しているのではないかという病態仮説について検証することを目的に、次のごとく研究目標を立てる。

- ① ヒト超早産児剖検脳、脳室周囲の検討
- ② ヒト超早産児剖検脳、皮質および皮質下白質の検討
- ③ マウスモデルでの再現（ヒト周産期のモデル）-急性期の変化

マウスモデルでの再現（ヒト長期生存例のモデル）-慢性期の変化

超早産児の出生の時期（在胎 28 週未満）は、脳の発達から見ると、神経新生や、脳室下帯で生まれ、分化した神経前駆細胞が、皮質への移動する最後の時期である。この時期の傷害は、その後の皮質形成と成熟の過程に微妙に影響を及ぼす可能性がある。これまでの我々が行った急性期のヒト超早産児剖検脳では、脳室周囲の神経前駆細胞の傷害および脳室上衣層の破壊や消失を認めており、これは、発達過程での脳の神経新生

(neurogenesis) を障害する可能性がある。本研究では、この過程の障害に関し、さらに詳細に検討する。さらにこの①の障害により、神経細胞の分化、成熟、移動に影響するものと考えられる。本研究では、長期生存したヒト超早産児剖検脳の症例において、それらの皮質下白質および皮質の神経細胞の移動の詳細を検討し、この異常が超早産児の多動や学習障害などの高次脳機能障害を引き起こす可能性を探る。さらに、マウスを用いて、これらの仮説の検証を行う。

4. 研究成果

ヒト超早産児剖検脳は、昨今の剖検率が低さから、大変貴重である。特に、超早産児剖検脳の長期生存例は、稀である。我々は、在胎 28 週未満で出生し、出生直後に亡くなった例から長期生存（6 歳まで）の例まで計 42 例の剖検脳および同年齢の正常対照例 40 例の譲渡を、研究協力者であるテキサス小児病院、病理学前教授 Dawna Armstrong 博士や大阪府立大阪母子総合医療センター検査部、中山雅弘博士から受け、これらを用いた。

ヒト超早産児の虚血性脳障害剖検脳では、急性期から脳室周囲の破壊と消失に伴う神経前駆細胞の傷害が認められた。ヒトの脳室下帯に成人神経幹細胞が存在し、成人期の脳障害に重要な役割を果たしている事が示唆されている。そこで、脳室下帯の癍痕化があるヒト超早産児の長期生存例に関し、そこに存在するはずの成人神経幹細胞に対する傷害の有無とその程度について、神経幹細胞特異的マーカー Nestin を用いた免疫組織染色にて検討した。その結果、脳室下帯において、

nestin 陽性の神経幹細胞がほぼ完全に消滅していることを確認した。また、皮質下白質および皮質においては、異所生神経細胞の存在を認め、また大脳層構造の乱れが存在することから、神経細胞の移動および成熟の異常を示唆する所見が得られた。これらの検討は、MRI などではわからない細胞レベルでの障害の病態機序であるため、これらが明らかになることにより、超早産児の生存例の予後を推測するための重要な材料となると思われる。

ヒトでの所見を動物で再現できるか検証するために、マウスを用いて胎児期の脳虚血モデルを作製した。ICR マウス妊娠母体 (E18.5) を麻酔下に開腹し、GFP を追跡マーカーとした子宮内エレクトロポレーションを実施後に、引き続き子宮動脈を結紮し、一定時間後に再灌流し、胎児の一次的な循環障害による脳虚血を誘導した後に閉腹した。一定時間に胎児を採取、あるいは自然出産後に、組織学的検索を行った。

出生直後のマウス脳解析では、脳室周囲の神経前駆細胞移動の障害や大脳皮質の神経細胞の細胞死を観察した。さらに出生後、2週目の胎児期脳虚血モデルマウスの解析では、大脳皮質において、層構造の異常と異所性神経細胞の存在を見いだした。

さらに、astrocyte および放射状グリアのマーカーGFAP、神経細胞マーカーNeuN および Map2、層特異的マーカーTbr1 などを用いて、様々な lineage ごとの解析を進めた結果、放射状グリアの異常、白質内の異所性神経細胞、および皮質の層構造の異常を認めた。これらより、胎生期の特定の時期に虚血負荷がかかると、神経細胞の移動に障害をきたし、後に皮質の形成に障害を及ぼす事が示唆された。これはヒトの病理像と一致する所見であると考えられた。

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 9 件)

1. Kubo K, Honda T, Tomita K, Sekine K, Ishii K, Uto A, Kobayashi K, Tabata H, Nakajima K. Ectopic Reelin induces neuronal aggregation with a normal birthdate-dependent "inside-out" alignment in the developing neocortex. *J. Neurosci.* 2010;30:10953-66 doi: 10.1523/JNEUROSCI.0486-10.2010 査読あり
2. Kubo K, Tomita K, Uto A, Kuroda K, Seshadri S, Cohen JS, Kaibuchi K, Kamiya A, Nakajima K. Migration defects by DISC1 knockdown in C57BL/6, 129X1/SvJ, and ICR strains via in utero gene transfer and virus-mediated RNAi. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;400:631-7. DOI:10.1016/j.bbrc.2010.08.117 査読あり
3. Yu L-H, Morimura T, Numata Y, Yamamoto R, Inoue N, Antalffy B, Goto Y, Deguchi K, Osaka H, Inoue K. Effect of curcumin in a mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Mol Genet Metab* 2012;106:108-114. DOI: 10.1016/j.ymgme.2012.02.016 査読あり
4. 井上 健, 岩城明子, 黒澤健司, 高梨潤一, 出口貴美子, 山本俊至, 小坂 仁 先天性大脳白質形成不全症: Pelizaeus-Merzbacher病とその類縁疾患 *脳と発達* 2011;43(6):435-442 <http://www.shindan.co.jp/books/index.php?menu=01&cd=1111100&kn=2#toku> 査読あり
5. Tanaka DH, Toriumi K, Kubo K, Nabeshima T, Nakajima K. GABAergic precursor transplantation into the prefrontal cortex prevents phencyclidine-induced cognitive deficits. *J Neurosci.* 2011;31:14116-25. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2786-11.2011 査読あり
6. Sekine K, Honda T, Kawauchi T, Kubo K, Nakajima K. The outermost region of the developing cortical plate is crucial for both the switch of the radial migration mode and the Dab1-dependent "inside-out" lamination in the neocortex. *J Neurosci.* 2011;31:9426-39. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0650-11.2011 査読あり
7. Tomita K, Kubo K, Ishii K, Nakajima K. Disrupted-in-Schizophrenia-1 (Disc1) is necessary for migration of the pyramidal neurons during mouse hippocampal development. *Hum Mol Genet.* 2011;20:2834-45. doi: 10.1093/hmg/ddr194 査読あり

8. Yip YP, Zhou G, Kubo K, Nakajima K, Yip JW. Reelin inhibits migration of sympathetic preganglionic neurons in the spinal cord of the chick. *J Comp Neurol*. 2011;519(10):1970-8. DOI: 10.1002/cne.22616 査読あり
9. Ishizuka K, Kamiya A, Oh EC, Kanki H, Seshadri S, Robinson JF, Murdoch H, Dunlop AJ, Kubo K, Furukori K, Huang B, Zeledon M, Hayashi-Takagi A, Okano H, Nakajima K, Houslay MD, Katsanis N, Sawa A. DISC1-dependent switch from progenitor proliferation to migration in the developing cortex. *Nature*. 2011 473(7345):92-6 doi:10.1038/nature09859 査読あり

[学会発表] (計 1 3 件)

1. K Deguchi, K Kubo, DL Armstrong, K Nakajima, K Inoue. Abnormal neuronal migration with ischemic brain injuries may cause cognitive dysfunction in extremely preterm infants. 18th Biennial Meeting of the International Society for Development Neuroscience. 8 June 2010, Estoril, Portugal
2. 出口貴美子、久保健一郎、仲嶋一範、井上健 周産期脳障害による高次脳機能障害のマウスモデルの開発 第52回日本小児神経学会総会 2010年5月20-22日福岡国際会議場、福岡
3. 久保健一郎、本田岳夫、関根克敏、石井一裕、富田憲司、田畑秀典、仲嶋一範 大脳皮質発生におけるリーリン分子の機能の再解析第33回日本神経科学大会・第53回日本神経化学学会大会・第20回日本神経回路学会大会合同大会 (Neuro2010) 2010年9月2-4日 神戸コンベンションセンター、神戸
4. 出口貴美子、久保健一郎、仲嶋一範、井上健 新たな超早産児の虚血性脳障害のモデルマウスの解析:神経前駆細胞の移動障害 第55回日本未熟児新生児学会 2010年10月10日 神戸コンベンションセンター、神戸
5. 出口貴美子、久保健一郎、仲嶋一範、井上健 新たな超早産児の虚血性脳傷害モデルマウスを用いた解析 (続報) 第

53回日本小児神経学会 2011年5月28日 横浜、パシフィコ横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

出口 貴美子 (DEGUCHI KIMIKO)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第二部・研究生

研究者番号 : 5 0 2 2 7 5 4 2

(2) 研究分担者

井上 健 (INOUE, KEN)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第二部・室長
研究者番号 : 3 0 3 9 2 4 1 8

久保 健一郎 (KUBO, KENICHIROU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号 : 2 0 3 4 8 7 9 1