

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07794

研究課題名(和文) 小脳障害に着目した早産児の神経学的障害の病態解明と幹細胞療法の治療機序解明

研究課題名(英文) Pathophysiology of neurological disorders in preterm infants with a focus on cerebellar disorders and elucidation of the therapeutic mechanism of stem cell therapy.

研究代表者

佐藤 義朗 (Sato, Yoshiaki)

名古屋大学・医学部附属病院・病院准教授

研究者番号：30435862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、早産児における高濃度酸素暴露の病態を模倣した慢性肺疾患(CLD)モデルにおいて、運動障害や認知記憶障害、社会性の障害を示唆する行動学的異常と急性期における顆粒細胞の細胞遊走の遅延や慢性期における髄鞘化の低下やプルキンエ細胞の樹状突起の発達異常という組織学的な小脳病変を明らかにした。小脳の発達が最も盛んな時期に早産として出生した早産児において、出生後に胎内と異なる環境(相対的高濃度酸素暴露)に置かれることにより小脳機能に異常が生じることが、早産児における神経学的発達予後に影響を及ぼしている可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早産児における神経学的障害に関しては、未だ解決の糸口のない大きな課題であり、今まで主な研究対象となってきた大脳病変ではなく、小脳病変が神経学的発達予後に影響を及ぼす可能性を示すことができ、新たな治療戦略の礎となる。

研究成果の概要(英文)：In this project, in a chronic lung disease (CLD) model that mimics the pathophysiology of hyperoxia exposure in preterm infants, we found behavioral abnormalities suggestive of motor deficits, cognitive memory impairment, and social deficits, as well as histological cerebellar lesions, including delayed cell migration of granule cells in the acute phase and reduced myelination and abnormal dendritic development of Purkinje cells in the chronic phase, were revealed. We showed that abnormal cerebellar function in preterm infants born prematurely when cerebellar development was at its peak might be caused by postnatal exposure to an environment different from that in utero (exposure to relatively high concentrations of oxygen), which might affect the neurological developmental outcome in preterm infants.

研究分野：新生児学

キーワード：超低出生体重児 慢性肺疾患 高酸素 小脳障害

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

新生児医療の進歩により早産児の死亡率は大きく改善したが、神経学的障害を残す児の数は減っていない。これまで神経学的障害の原因として大脳病変が言われており広く研究されてきたが、小脳病変は着目されてこなかった。正常のヒトの小脳の発達は妊娠第3期(妊娠28~40週)をピークとして、その間に外顆粒層での細胞増殖、内顆粒層への細胞遊走、脳回形成、プルキンエ細胞の成熟などが起こる。よって早産児においては、この時期の小脳発達が障害されることによって脳機能に異常が生じる可能性が高いと考えられる。従来、小脳の役割は運動の調整機能とされてきたが、近年では学習や知覚、高次脳機能との関係が示され、精神疾患との関与も明らかになってきている。早産児の小脳障害に関する研究は極めて限定的であるため、小脳病変の病理病態の解明が、早産児に生じる神経学的障害を改善する新規治療法の開発に繋がると考えた。

### 2. 研究の目的

これまで注目されていなかった小脳障害に焦点を当てる。早産児の神経学的障害には、炎症や虚血、薬剤など様々なものがあるため、神経学的障害の原因が異なる2種類のモデルラットを用いて行動学的評価や組織学的評価を行い、早産児における神経学的発達予後に影響を及ぼす要因として、小脳障害の関連を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1)モデル作製

早産児に伴う小脳障害の病態として、神経学的障害の原因が異なる2種類のモデルラットを作製した。一つ目は、妊娠17日目の母獣SDラットの両側子宮動脈および卵巣動脈に長さ2.5mm、直径0.24mmのマイクロコイルを装着し、胎児低灌流による子宮内発育遅延モデル(FGR)を作製した(Ohshima M. *Sci Rep* 2016)。1日齢の体重が6.5g未満であった新生児仔ラットをFGRと定義し、体重6.5g以上であった新生児仔ラットは研究対象から除外した。二つ目は、自然分娩で出生した正常新生児仔SDラットに1日齢から15日齢にかけて83%の高濃度酸素暴露を行い、新生児慢性肺疾患モデル(CLD)を作製した(Suzuki T. *Cytotherapy* 2020)。CLDモデルは従来肺病変にターゲットをおいたモデルであるが、今回は高濃度酸素暴露による脳への影響を評価するモデルとして使用した。

#### (2)行動学的評価

新生児神経反射の評価として8日齢から16日齢にかけて背地走性試験、行動学的評価として7週齢において、水平梯子歩行試験、シャトルアボイダンス試験、ソーシャル・インタラクション試験を実施し、コントロール群と比較した。背地走性試験では、新生児神経反射の評価のため、仔ラットを30度の傾斜斜面上に頭を下にして置き、180度回転するまでの時間を測定した。水平梯子歩行試験では、ラットの協調運動機能の評価のため、ランダムに配置した水平の梯子の上をラットに走らせ、後ろ脚が梯子を掴み損ねた頻度を評価した。シャトルアボイダンス試験では、ラットの認知・記憶能の評価のため、条件付け恐怖体験(音・光刺激に伴う電気ショック)から回避することが出来る割合を評価した。ソーシャル・インタラクション試験では、ラットの社会性の評価のため、2個体のラットを同時に観察箱の中に入れ、におい嗅ぎや毛づくろい、後追い、マウンティング、上に乗る/下を這うなどの社会的行動時間を測定した。

#### (3)組織学的評価

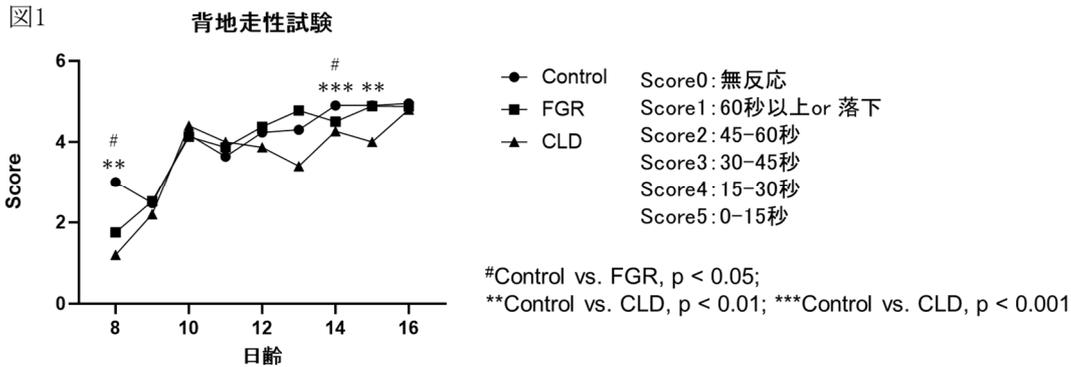
ラットの小脳の発達はヒトと異なり、生後1週間前後にピークを迎える。新生児仔ラットには、成獣ラットには見られない外顆粒層があり、4日齢から10日齢頃に最も発達している。細胞分裂は外顆粒層で活発に行われ、外顆粒層で増殖した細胞は7日齢頃から徐々に外顆粒層から内顆粒層へと細胞遊走が起こり、最終的に成獣ラットにおける顆粒細胞層が形成される。

今回急性期の組織学的評価としては、7日齢に採取した小脳組織で小脳半球全容積に対する細胞増殖が盛んな外顆粒層の割合と6日齢にBrdU(5-bromo-2'-deoxyuridine)をラットの腹腔内に投与後10日齢で採取し、抗BrdU抗体を用いた免疫組織化学的染色を試行した小脳組織において、細胞遊走の評価のため外顆粒層内縁に残存している抗BrdU抗体陽性細胞数および内顆粒層における抗BrdU抗体陽性細胞数を評価した。慢性期の組織学的評価として、小脳体積やミエリン塩基性蛋白の発現領域の割合、プルキンエ細胞数やプルキンエ細胞の樹状突起の長さや直径を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 新生児神経反射の評価 (背地走性試験)

8日齢及び14日齢において、FGR群及びCLD群ではコントロール群と比較して有意にスコアの低下を認め(8日齢コントロール群:  $3.00 \pm 1.34$  (平均 $\pm$ 標準偏差) FGR群:  $1.75 \pm 1.00$ 、CLD群:  $1.20 \pm 0.45$ 、14日齢コントロール群:  $4.90 \pm 0.30$ 、FGR群:  $4.50 \pm 0.66$ 、CLD群:  $4.27 \pm 0.46$ )、15日齢において、CLD群ではコントロール群と比較して有意にスコアの低下を認めた(コントロール群:  $4.90 \pm 0.32$ 、FGR群:  $4.89 \pm 0.33$ 、CLD群:  $4.00 \pm 0.94$ ) (図1)。



##### (2) 行動学的評価

###### 1) 水平梯子歩行試験

コントロール群:  $9.44 \pm 8.02$ 、FGR群:  $14.44 \pm 7.84$ 、CLD群:  $17.33 \pm 9.61$  であり、CLD群ではコントロール群と比較して有意に失敗率 (%) の上昇を認めた (図2)。

###### 2) シャトルアボイダンス試験

コントロール群:  $74.76 \pm 22.50$ 、FGR群:  $68.33 \pm 31.48$ 、CLD群:  $47.22 \pm 30.45$  であり、CLD群ではコントロール群と比較して有意に回避率 (%) の低下を認めた (図3)。

###### 3) ソーシャル・インタラクション試験

コントロール群:  $130.91 \pm 36.81$ 、FGR群:  $98.00 \pm 31.07$ 、CLD群:  $76.25 \pm 22.14$  であり、CLD群ではコントロール群と比較して有意に社会的相互作用時間 (秒) の短縮を認めた (図4)。

図2 水平梯子歩行試験

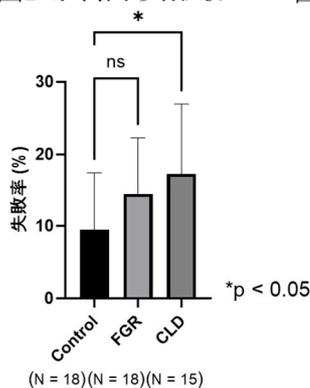


図3 シャトルアボイダンス試験

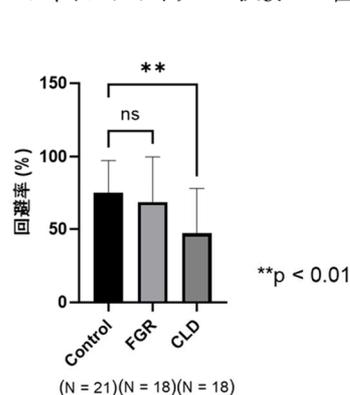
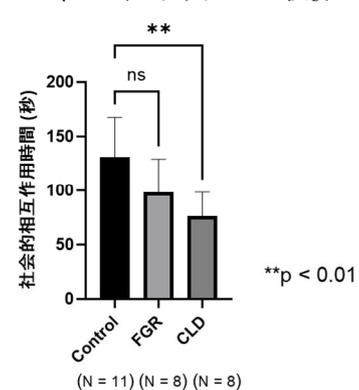


図4 ソーシャル・インタラクション試験



CLD群においてはコントロール群と比較して、運動障害や認知記憶障害、社会性の障害を示唆する所見を認め、小脳障害と関連し得る行動学的異常を示した。FGR群ではコントロール群と比較して、傾向はあるものの有意な行動学的異常を示さなかった。

##### (3) 組織学的評価

行動学的評価において、小脳障害と関連し得る行動学的異常を示したCLDモデルのみを用いて、小脳の組織学的評価を行った。

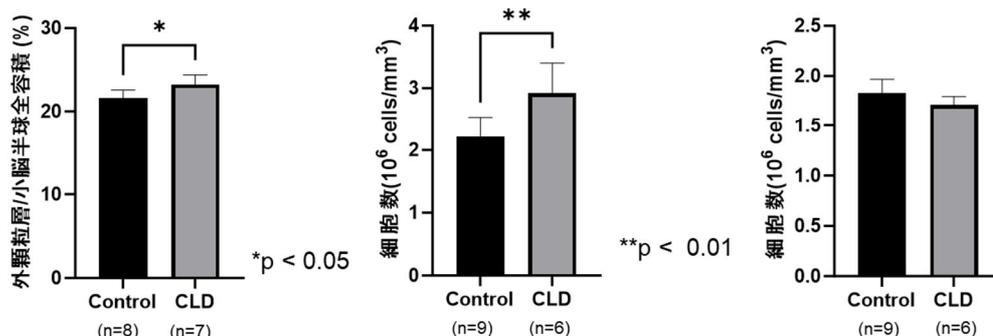
### 1)急性期の組織学的評価

CLD 群ではコントロール群と比較して有意に小脳半球全容積に占める外顆粒層の割合 (%) が高かった(コントロール群:  $21.6 \pm 0.96$ 、CLD 群:  $23.2 \pm 1.15$ )(図 5)。また、CLD 群ではコントロール群と比較して有意に外顆粒層内縁に残存している抗 BrdU 抗体陽性細胞数 ( $10^6 \text{ cells/mm}^3$ ) が多く(コントロール群:  $2.2 \pm 0.31$ 、CLD 群:  $2.9 \pm 0.48$ )、内顆粒層における抗 BrdU 抗体陽性細胞数 ( $10^6 \text{ cells/mm}^3$ ) が少ない傾向を認めた(コントロール群:  $1.8 \pm 0.14$ 、CLD 群:  $1.7 \pm 0.08$ )(図 6)。

図5 外顆粒層割合

図6 外顆粒層内縁

内顆粒層



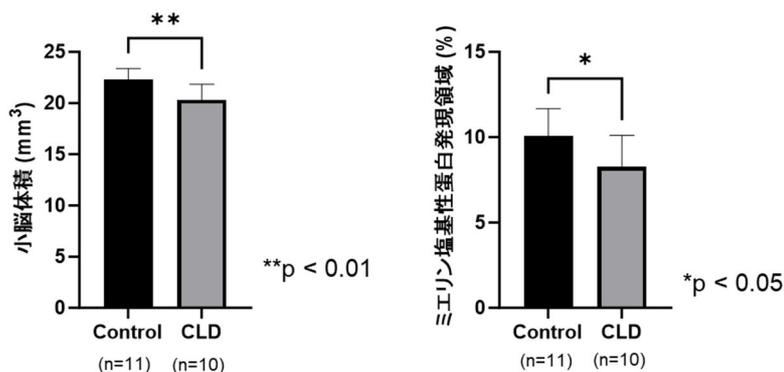
以上のことから、CLD 群では外顆粒層から内顆粒層への細胞遊走が遅延している可能性が示唆された。

### 2)慢性期の組織学的評価

CLD 群ではコントロール群と比較して有意に小脳体積 ( $\text{mm}^3$ ) が小さかった(コントロール群:  $22.3 \pm 2.0$ 、CLD 群:  $20.3 \pm 1.5$ )(図 7)。CLD 群ではコントロール群と比較して有意にミエリン塩基性蛋白の発現領域の割合 (%) が少なかった(コントロール群:  $10.1 \pm 1.6$ 、CLD 群:  $8.3 \pm 1.8$ )(図 8)。

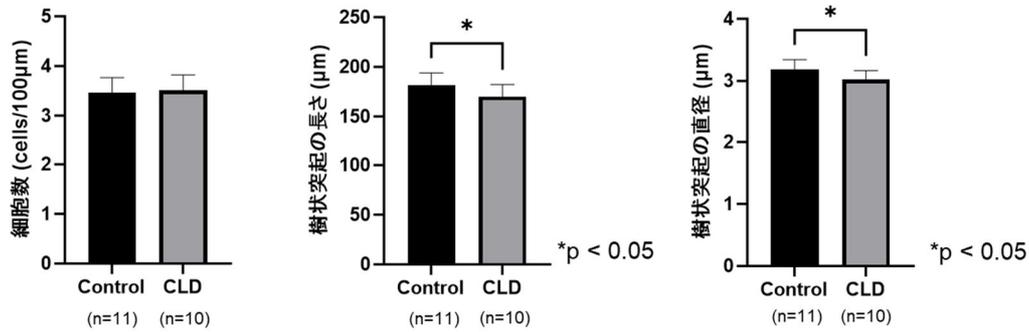
図7 小脳体積

図8 ミエリン塩基性蛋白



また、プルキンエ細胞数 (cells/100 $\mu\text{m}$ ) に関しては両群間に有意な差は認めなかった(コントロール群:  $3.5 \pm 0.3$ 、CLD 群:  $3.5 \pm 0.3$ ) が、CLD 群ではコントロール群と比較して有意にプルキンエ細胞の樹状突起の長さ ( $\mu\text{m}$ ) (コントロール群:  $181.4 \pm 12.6$ 、CLD 群:  $169.9 \pm 12.4$ ) や直径 ( $\mu\text{m}$ ) (コントロール群:  $3.2 \pm 0.2$ 、CLD 群:  $3.0 \pm 0.1$ ) が短かった(図 9)。

図9 プルキンエ細胞



以上のことから、CLD 群では髄鞘化の低下やプルキンエ細胞の樹状突起の発達異常が示唆された。

胎児の発育は子宮内の低酸素状態で行われるため、早産児では出生後、通常の発育環境よりも組織酸素濃度が室内気下でも急速に上昇する。また、早産児の多くは蘇生時から酸素吸入を必要とし、慢性的に高濃度酸素に曝されることが多く、特に CLD を合併した児ではより高濃度酸素により長期間暴露されると考える。

今回の我々の研究では、出生後に胎内と異なる環境（高濃度酸素暴露）が小脳障害に何らかの影響を与えている可能性を示し、早産児に伴う神経学的障害の一因として、高濃度酸素暴露による小脳機能の障害の可能性を示した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Tsuji Masahiro, Mukai Takeo, Sato Yoshiaki, Azuma Yasue, Yamamoto Saki, Cayetanot Florence, Bodineau Laurence, Onoda Atsuto, Nagamura-Inoue Tokiko, Coq Jacques-Olivier	4. 巻 13
2. 論文標題 Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cell therapy to prevent the development of neurodevelopmental disorders related to low birth weight	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3841
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-30817-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Jabary Mahboba, Onoda Atsuto, Kitase Yuma, Ueda Kazuto, Mimatsu Haruka, Go Shoji, Miura Ryosuke, Tsuji Masahiro, Takahashi Yoshiyuki, Hayakawa Masahiro, Sato Yoshiaki	4. 巻 13
2. 論文標題 Fetal growth restriction followed by early catch-up growth impairs pancreatic islet morphology in male rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2732
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-28584-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fuma Kazuya, Kotani Tomomi, Ushida Takafumi, Imai Kenji, Iitani Yukako, Nakamura Noriyuki, Miki Rika, Katsuki Satoru, Kinoshita Fumie, Sato Yoshiaki, Hayakawa Masahiro, Kajiyama Hiroaki	4. 巻 49
2. 論文標題 Antenatal corticosteroids to delivery interval associates cord blood S100B levels	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 1129 ~ 1136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jog.15582	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukasawa Yoshie, Yamamoto Hidenori, Ito Miharu, Saito Akiko, Go Kiyotaka, Morimoto Yoshihito, Yasuda Kazushi, Sato Yoshiaki, Hayakawa Masahiro, Kato Taichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Case report: High-dose epoprostenol therapy in pediatric patients with pulmonary hypertension and developmental lung disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Pediatrics	6. 最初と最後の頁 1116434
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fped.2023.1116434	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Taniguchi Akinobu, Hayakawa Masahiro, Kataoka Erina, Fujishiro Naozumi, Sato Yoshiaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Relationship between Neonatal MRI Findings and Emotional/Behavioral Evaluation in Early Childhood for Extremely Low-Birth-Weight Infants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 772 ~ 772
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11030772	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ozeki Shoko, Kawada Jun-ichi, Yamashita Daiki, Yasufuku Chika, Akano Takuya, Kato Masahiro, Suzuki Konomi, Tano Chihiro, Matsumoto Kazuki, Mizutani Shu-hei, Mori Ayumi, Nishio Nobuhiro, Kidokoro Hiroyuki, Yasui Yoshihiro, Takahashi Yoshiyuki, Sato Yoshiaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Impact of the Coronavirus Disease 2019 Pandemic on the Clinical Features of Pediatric Respiratory Syncytial Virus Infection in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Open Forum Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 ofac562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ofid/ofac562	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuyama Nao, Shimizu Shinobu, Ueda Kazuto, Suzuki Toshihiko, Suzuki Sakiko, Miura Ryosuke, Katayama Akemi, Ando Masahiko, Mizuno Masaaki, Hirakawa Akihiro, Hayakawa Masahiro, Sato Yoshiaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Safety and tolerability of a multilineage-differentiating stress-enduring cell-based product in neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy with therapeutic hypothermia (SHIELD trial): a clinical trial protocol open-label, non-randomised, dose-escalation trial	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMJ Open	6. 最初と最後の頁 e057073 ~ e057073
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjopen-2021-057073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Katsuki Satoru, Ushida Takafumi, Kidokoro Hiroyuki, Nakamura Noriyuki, Iitani Yukako, Fuma Kazuya, Imai Kenji, Nakano-Kobayashi Tomoko, Sato Yoshiaki, Hayakawa Masahiro, Natsume Jun, Kajiyama Hiroaki, Kotani Tomomi	4. 巻 163
2. 論文標題 Hypertensive disorders of pregnancy and alterations in brain metabolites in preterm infants: A multi-voxel proton MR spectroscopy study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Early Human Development	6. 最初と最後の頁 105479 ~ 105479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.earlhumdev.2021.105479	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maeda Takashi, Kidokoro Hiroyuki, Tachibana Takashi, Shiraki Anna, Yamamoto Hiroyuki, Nakata Tomohiko, Fukasawa Tatsuya, Kubota Tetsuo, Sato Yoshiaki, Kato Toru, Natsume Jun, Okumura Akihisa, Hayakawa Masahiro	4. 巻 43
2. 論文標題 Trajectory of the incidence of brushes on preterm electroencephalogram and its association with neurodevelopment in extremely low birth weight infants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 979 ~ 987
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2021.07.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ushida Takafumi, Kidokoro Hiroyuki, Nakamura Noriyuki, Katsuki Satoru, Imai Kenji, Nakano-Kobayashi Tomoko, Moriyama Yoshinori, Sato Yoshiaki, Hayakawa Masahiro, Natsume Jun, Kajiyama Hiroaki, Kotani Tomomi	4. 巻 25
2. 論文標題 Impact of maternal hypertensive disorders of pregnancy on brain volumes at term-equivalent age in preterm infants: A voxel-based morphometry study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pregnancy Hypertension	6. 最初と最後の頁 143 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.preghy.2021.06.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Yoshiaki, Tsuji Masahiro	4. 巻 63
2. 論文標題 Diverse actions of cord blood cell therapy for hypoxic ischemic encephalopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 497 ~ 503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.14604	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa Yuko, Tanaka Emi, Sato Yoshiaki, Tsuji Masahiro	4. 巻 337
2. 論文標題 Brain damage caused by neonatal hypoxia-ischemia and the effects of hypothermia in severe combined immunodeficient (SCID) mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 113577 ~ 113577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2020.113577	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takemoto K, Oshiro M, Sato Y, Yamamoto H, Ito M, Hayashi S, Kato E, Kato Y, Hayakawa M	4. 巻 83
2. 論文標題 Outcomes in symptomatic preterm infants with postnatal cytomegalovirus infection. Nagoya journal of medical science	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nagoya J Med Sci	6. 最初と最後の頁 311～319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18999/nagjms.83.2.311	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	飛田 秀樹 (Hida HidekiHideki) (00305525)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授  (23903)	
研究分担者	湯川 博 (Yukawa Hiroshi) (30634646)	名古屋大学・未来社会創造機構・特任教授  (13901)	
研究分担者	小野田 淳人 (Onoda Atsuto) (70835389)	山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・助教  (25503)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

#### 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------