

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19453

研究課題名（和文）早産児・低出生体重児の脳発達の予後改善を目指す研究の基盤創出

研究課題名（英文）Establishment of a research foundation to improve the prognosis of brain development in preterm and low birth weight infants

研究代表者

畠山 淳（Hatakeyama, Jun）

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：90404350

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、早産児、低出生体重児の脳発達の予後改善を目指し、霊長類の脳発生研究の基盤創出と分子レベルの理解に取り組んだ。

早産が起こる時期に相当する時期の正常脳発生過程を理解するために、カニクイザル妊娠中期・後期の脳の組織学的解析とMRI画像立体解析より霊長類脳発生のアトラスを作製した。次に、ヒトを含む霊長類の妊娠中期・後期の脳発生特徴であるグリア細胞の増大に着目し、グリア細胞増産に関与する候補因子を複数見つけた。そのうちの1つは、グリア細胞の増大に寄与できることを示した。また、早産児において減少してしまう脳発生に必要な因子を探索するため、産科・小児科との研究体制を整えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

霊長類の脳発生研究は、まだ学問として発展途上である。霊長類胚の試料は希少かつ高額で研究対象とするにはハードルが高く研究推進の壁となっている。本研究で得られたカニクイザル胚の脳発生過程の基礎データは近いうちに公のデータベース化することを目指しており、霊長類研究の推進に大きく寄与できる。また、グリア細胞の増大に関わる分子メカニズムを一部を明らかにしつつあり、ニューロンに比べて理解が遅れているグリア細胞の視点から霊長類の脳発生の理解が進むことも学問的に重要である。さらに、臨床との研究体制も整えており、脳発生の基礎研究が新生児医学に応用される架け橋となる研究と位置付けられる。

研究成果の概要（英文）：In this project, we have worked to establish a basis for research on primate brain development and to understand it at the molecular level, aiming to improve the prognosis for brain development in preterm and low birth weight infants. For understand the brain development process during the period corresponding to the time when preterm birth occurs, the histological analysis and three-dimensional MRI images analysis of developing brain were performed in the middle and late gestation period of macaque monkey. Next, we focused on glial cell expansion, a feature of brain development in mid-and late pregnancy in primates including human. As a results, we found several factors potentially involved in glial cell expansion in primate and have shown that at least one of them contributes glial cells expansion. Moreover, a collaborative research system with obstetrics and pediatrics was established to search for factors necessary for human brain development, which is reduced in preterm infants.

研究分野：神経発生

キーワード：脳発生 グリア細胞 白質 早産児 低出生体重児

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの脳発生・発達を理解することは、神経科学、ヒト生物学、新生児医療や精神医学にとって重要である。しかし、マウスの研究では、ヒトの脳発生を理解するには限界がある。特に、妊娠中期以降は、グリア細胞の増大や白質の発達、複雑な脳回脳溝形成など霊長類固有の発生現象が多い。ヒト脳は、神経軸索とグリア細胞から成る白質容量が増加しており、特にグリア細胞の増加が著しく、脳の約9割を占める(Defelipe J. et al. 2003, Oberheim NA. et al. 2009)。脳機能の中心はニューロンでグリア細胞は裏方であるという固定概念や、マウスではグリア細胞は少なく白質も薄いことから、グリア細胞や白質が注目されることは少なかった。しかし、近年、グリア細胞が神経活動を積極的に制御していることがわかり、統合失調症や発達障害など多くの精神疾患で白質容量やグリア細胞に異常があるため、グリア細胞の増大や白質の発達は、ヒトの高次機能を支える重要な基盤の1つと推察される。

さらに、このグリア細胞の産生や白質の発達は、まさに早産が起こる妊娠6ヶ月から生後にかけての発生現象である。日本の出産における早産児の割合は約6%、低出生体重児は約10%も占める。早産児・低出生体重児では、グリア細胞数の減少や白質容量の低下、神経の髄鞘化が遅れる傾向にあり、将来的に発達障害の発症リスクが高い(Lampik M. et al. 2012)。現在は、栄養学的観点からのケアが中心だが、分子機構を根拠にしたケアが加われば予後の大きな改善が期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、早産児、低出生体重児の脳発達の予後改善を目指し、**霊長類の脳発達の研究基盤創出とその分子制御機構の解明を目的とする。**霊長類であるカニクイザル胚を用いて、妊娠中期・後期の脳発達の現象理解とその発達を制御する因子の同定に挑む。そして、グリア細胞の大量産生に寄与する因子を探索する。また、カニクイザル早産児モデルの作製を試み、早産児の脳発達障害リスクを軽減する可能性のある因子を同定し、妊娠中期・後期の脳発達研究の基盤創出と、将来、臨床応用できる成果を目指す。

## 3. 研究の方法

以下の実験より、グリア細胞の増産に関わる因子とそのシグナル経路を明らかにする。さらに、早産児モデルで変動する因子を同定する。早産児は、早々に胎盤経由の母性因子の供給が途絶えるため、その影響を受け脳脊髄液の成分は変動する。早産で影響がある因子と、脳発達現象に重要な因子を照らし合わせ、臨床応用の可能性を模索する。

### 1) 霊長類の妊娠中期・後期の脳発達現象の組織学的解析

妊娠中期から生後のカニクイザルを用いて、組織学的解析と、MRI解析(DWI画像、DTI画像)によって脳発達の立体Mapを作製し、霊長類の脳発達研究に有用な基礎情報を収集する。

### 2) グリア細胞大量産生に寄与する因子の探索

マウス胚のグリア細胞には少なく、ヒト胚やカニクイザル胚のグリア細胞、特にグリア細胞の増大が見られる脳回部位に優位に発現するグリア細胞増殖促進因子を探索する。空間的トランスクリプトーム解析と一細胞トランスクリプトーム解析より、カニクイザル胚の脳回領域の白質部位に発現する増殖関連因子を選定する。

### 3) グリア細胞の初代培養およびモルモット胚での機能解析

実験2で選定した因子に関して、グリア細胞の初代培養およびモルモット胚に添加または強制発現を行い、グリア細胞や白質発達への影響を解析する。

### 4) カニクイザル早産児モデルの立ち上げと影響を受ける脳脊髄液因子の探索

カニクイザルを帝王切開にて早期に胎児を取り出し育成し、早産児モデルにする。数日育成後、早産児と相当正常胎児の脳脊髄液を質量分析で比較し、早産で変動する脳脊髄液の成分を同定する実験系を立ち上げる準備を行う。

## 4. 研究成果

1) 早産が起こる時期に相当する時期の正常脳発生過程を理解するために、霊長類の脳研究の基礎となるカニクイザル妊娠中期・後期の脳の組織学的解析を行い、種々の細胞マーカーで免疫組織学的解析とMRI撮影（DWI画像、DTI画像）により、白質や神経髄鞘化の発達過程、脳の形態的発生の全体像立体Mapの作製を行った（図1）また、種間比較のため、マウス、コモンマーモセット、モルモット胚の脳についても作製した。

Cynomolgus monkey-E128

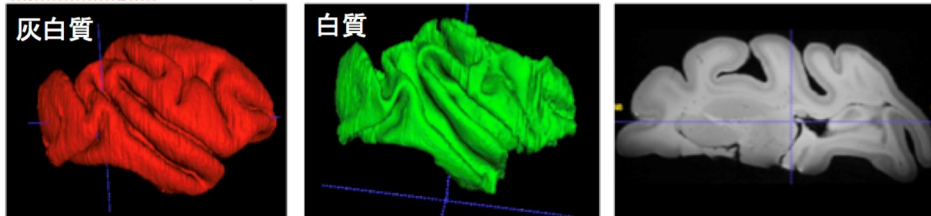


図1 カニクイザル妊娠後期の脳のMRI画像解析。立体的な形態変化や、脳回脳溝形成の過程を理解する貴重なデータとなる。

2) 妊娠中期・後期にはグリア細胞が増大し白質が発達する。グリア細胞増産に関与する因子の探索を目的に、カニクイザル胚の脳を用いて、slide RNA-seq解析及び一細胞RNA-seq解析を行った。その結果、複数の候補因子を見つけた（図2）。

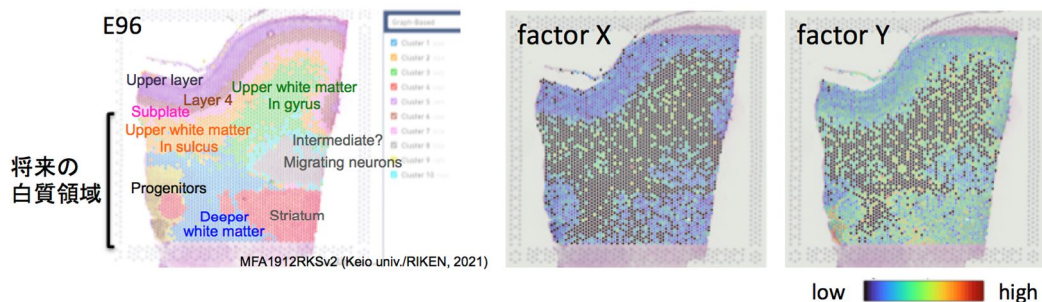


図2 カニクイザル胚E96の脳を用いたslide RNA-seq解析の例。将来の白質領域でグリア細胞の増大が観察される。白質領域で優位に発現する増殖に関連する可能性のある因子が複数見つかった。

3) 次に、機能解析に使用できる霊長類由来のグリア細胞培養系を樹立した。そのうちの1つは機能解析までに行い、マウスやモルモットを用いてグリア細胞の増大に寄与できることを示した。他にも候補因子は複数あり、引き続き、機能解析を行う。

4) 早産児においては早々に母体から離れるため、母体または胎盤由来因子に曝される期間が、正期出産児と比較して短い。脳発生に必要な母体または胎盤由来因子を同定できれば、予後改善に貢献できる。そのために、熊本大学の産科及び小児科と共同研究体制を整備し、ヒト早産児及び正期出生児の羊水、脳脊髄液を収集するための研究体制を整え、すでにヒト試料の収集を開始している。研究開始当初は、カニクイザルを用いて早産児モデルを作製する計画だったが、コロナ流行に伴い、サル代価格の約6倍程度の高騰があり現実的ではなくなった。また、ヒト試料を用いることが可能となり、この方法がより臨床応用に近いと考え、変更するに至った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Jun Hatakeyama, Haruka Sato, Kenji Shimamura
2. 発表標題 Extrinsic factors contributing cerebral cortical expansion in primates.
3. 学会等名 第55回日本発生生物学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jun Hatakeyama, Haruka Sato, Kenji Shimamura
2. 発表標題 Extrinsic factors nurturing neural stem cells
3. 学会等名 Neuro2022（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jun Hatakeyama
2. 発表標題 Strategies for the expansion of cerebral cortex in primates
3. 学会等名 第17回生命医学研究所ネットワーク国際シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jun Hatakeyama
2. 発表標題 Strategies for the expansion of cerebral cortex in primates
3. 学会等名 International Symposium on Neural Development and Diseases（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jun Hatakeyama, Haruka Sato, Sanka Yoshimochi, Rika Matsushita, Kenji Shimamura
2. 発表標題 The cradle of cerebrospinal fluids nurturing embryonic neural stem cells
3. 学会等名 International society for stem cell research ( ISSCR ) ( 国際学会 )
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 畠山 淳
2. 発表標題 霊長類の脳の巨大化の戦略
3. 学会等名 日本動物学会・日本植物学会・日本生態学会 三学会合同熊本例会 ( 招待講演 )
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jun Hatakeyama, Haruka Sato, Kenji Shimamura
2. 発表標題 Extrinsic factors promoting cortical expansion in primates
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会 ( 招待講演 )
4. 発表年 2021年

〔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	土屋 英明  (Tsuchiya Hideaki)  (10378440)	滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・技術専門職員    (14202)	

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
---------	---------