

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25年3月31日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591198

研究課題名（和文）新生児低酸素性虚血性脳症に対する治療戦略の開発に向けた基礎的研究

研究課題名（英文）Basic Research on the establishment of the strategy for the treatment of neonatal hypoxic ischemic encephalopathy

研究代表者

亀井 良政 (KAMEI YOSHIMASA)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00251265

研究成果の概要（和文）：早産児の脳傷害に特徴的な脳室周囲白質軟化症 (Periventricular leukomalacia；PVL) の予防と治療は周産期領域の大きな課題である。本研究では、ラット PVL モデルを作成し、硫酸マグネシウムに予防効果があること、早産児でも理論的には脳低温療法が有効である可能性があり、その背景には PVL 発症に深く関与する白質のオリゴデンドロサイト (OL) 前駆細胞の増殖を一時的に抑制してダメージを回避し、後に成熟した OL として機能するメカニズムが存在することを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：To prevent periventricular leukomalacia (PVL), which is the major cause of the cerebral palsy in the preterm babies, we analyzed the effects of magnesium sulfate and hypothermia on the brain damage using in vivo/in vitro animal model. Magnesium sulfate significantly prevented the brain damage in vivo, and the hypothermia attenuated the apoptosis of the oligodendrocyte-precursor cells (OPC) through temporally preventing the proliferation of OPC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
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：胎児医学

1. 研究開始当初の背景

近年日本をはじめとする先進国では早産率が漸増しており、周産期領域における大きな克服課題である。早産児に認められる脳傷害として従来言われてきた脳室周囲白質軟化症 (Periventricular leukomalacia；PVL) は脳性麻痺との密接な関連から、その発症予防に関する研究が精力的に進められ、いわゆ

る嚢胞性 PVL は減少傾向にあると報告されている。しかしながら、早産児においては、今まで注目されてこなかったびまん性の大脳白質傷害が極めて高頻度に認められることが明らかとなり、この所見と認知行動異常との関連が近年注目されるようになった。これら PVL の早産児では、白質のオリゴデンドロサイト前駆細胞 (Oligodendrocyte pre-

cursor cells ; OPC)が傷害を受け、OPC 自身の脆弱性や白質血流の乏しさを背景として、さらに感染や虚血性負荷が加わることにより多くのOPCが細胞死を起しPVLが発生するとされている。

これら早産児の脳傷害に関しては、何らかの原因で胎児／新生児脳への血流と酸素供給の制限により発症する低酸素虚血性脳症 (Hypoxic ischemic encephalopathy : HIE) が深く関与していることが明らかとなっている。この数年の間に、これら脳傷害の予防に関して出産前のマグネシウム(Mg)投与が有効であるという大規模臨床試験の報告が出された。しかしながら、動物実験での裏付けはなく、現在に至るもMgの細胞内での作用機序は全く明らかにはなっていなかった。

また、正常産児のHIEに対しては、脳低温療法の有用性が証明され、全国的に普及が進められているが、早産児に対しては、低温による副作用が問題となり、またその有用性を示す基礎的なデータも少なく、適応拡大はされていない。さらに、脳低温療法は生後6時間以内に開始することが条件となり、周産期センター以外で出生した症例では搬送に要する時間が問題となっている。

これまでの我々の研究で、OPCの初代培養系を用いて、OPC細胞の増殖能が低温培養により上昇することを発見し、DNA microarrayの手法を用いて、両条件下で有意に発現が増加・減少している遺伝子を同定することに成功している。これにより、これまで全く不明とされてきたOPCの膜蛋白質を介する新たな細胞増殖のシグナル伝達系が存在することを突き止めた。

2. 研究の目的

(1) ラット PVL モデルにおける Mg の脳保護作用の検討

(2) ラット PVL モデルにおける脳低温療法の脳保護作用の検討

(3) OPC 初代培養系を用いた、低酸素無糖負荷に対する低温療法の細胞保護効果の検討

3. 研究の方法

(1) 虚血による PVL モデルとして、6 日齢の新生仔ラットを用いて、エーテル麻酔下にて片側頸動脈の結紮を行い、術後 1~2 時間の休息の後に、37℃、6%酸素下で 60 分の低酸素負荷を低酸素用チャンバーにて行った。Mg の脳保護効果を観察するために、低酸素負

荷の約 30 分前に、Mg を新生仔の腹腔内に投与した。この PVL モデルにおいて患側に発生する梗塞巣が Mg の予防投与により縮小するか、組織学的、細胞生物学的手法を用いて検討した。

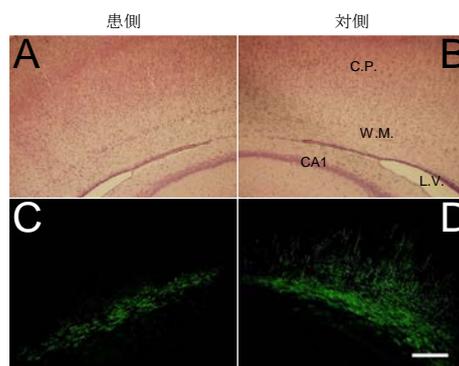
(2) 前述のラット PVL モデルを用いて、低酸素負荷中に同時に 32℃の低温療法を行い、大脳脳室周囲における MBP 蛋白質の発現量の変化並びに MBP isoform の発現パターンの変化を、対照群(36℃)と比較検討した。

(3) 胎齢 18~20 のラット胎児より OPC 初代培養系を確立し、1%未満の低酸素ならびに無糖培地で 6 時間 37℃または 31.5℃で培養し、apoptosis の変化を観察した。さらに、先の研究にて関与が強く示唆された細胞内細胞内シグナル伝達系蛋白質であるリン酸化 ERK1/2 の発現の変化を観察した。

4. 研究成果

(1) PVL動物モデルを用いたMgSO₄のPVL発症予防効果の検討

まず、本モデルでは、患側において大脳皮質の構造に影響を及ぼすことなく、白質部における成熟オリゴデンドロサイト(OL)数の著明な減少を確認できた。MgSO₄投与群では、コントロール群に比べ、患側脳梁のミエリン蛋白質(MBP)発現量は回復し(図1)、炎症や虚血性変化の指標となる反応ミクログリアの数も有意に減少した。さらに、MBPに先駆けて発現するOlig2, MAGといったオリゴ前駆蛋白質の発現量もMBPと同様に回復しており、オリゴデンドロサイトの分化初期の段階においてMgSO₄が低酸素虚血負荷に対し保護的に作用することが示唆された。(論文投稿中)

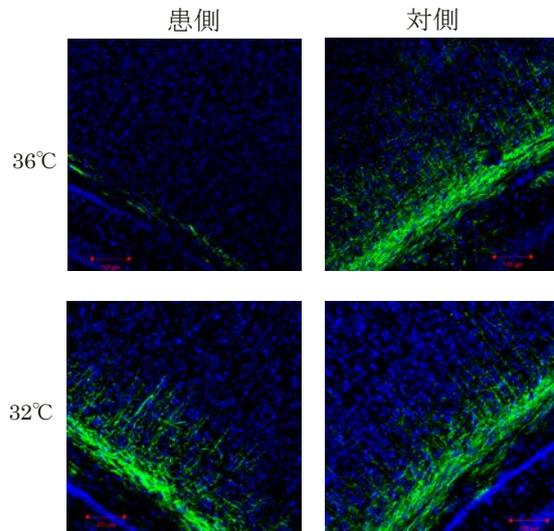


(図1)

さらに、これら病変部ではTUNEL陽性細胞がMgSO₄投与により減少することを明らかとし、MgSO₄の脳保護効果がOLのアポトーシス抑制により発現していることが示唆された。(論文投稿中)

(2) ラット PVL モデルにおける脳低温療法の脳保護作用の検討

ラット PVL モデルにおいて、低酸素負荷中の低温療法により、MBP 発現が有意に保たれ、PVL のダメージを防止できることが示された(図2)。また、低温により髄鞘化能が維持され、MBP exon2 を含む splicing variant が重要な役割を担うことが示唆された。



(図2)

(3) OPC 初代培養系を用いた、低酸素無糖負荷に対する低温療法の細胞保護効果の検討

オリゴデンドロサイト初代培養系において、低温は、低酸素無糖負荷による apoptosis を抑制し、低温による PVL ダメージ軽減には、pre-OLs に対する直接作用が関与することが示された。また、この過程において ERK1/2 のリン酸化は、生存シグナルとして機能していると考えられた。

さらに、DRG 神経細胞との共培養実験により、低温条件下では MBP exon2(+)-mRNA の発現が抑制され、低酸素虚血負荷による分化能への障害を回避し、常温に戻すことで髄鞘形成を再開すると考えられた。

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 17 件)

1. Iriyama T, Kamei Y, Kozuma S, et al. (4 名): Management of the patient with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) during pregnancy. *J Obstet Gynecol Res* 査読あり, 39: 390-4, 2013, doi: 10.1111/j.1447-0756.2012.01954.x.

2. 左時江, 今田信哉, 大石元, 甲賀かをり, 平池修, 亀井良政, 大須賀穰, 上妻志郎, 武谷雄二: 子宮筋腫に対するUAE後に治療に難渋した二例 東京産婦人科学会雑誌、査読あり、61: 115-118, 2012
3. 亀井良政: 早産のリスク因子 産婦人科の実際 査読なし 61: 541-546, 2012
4. 亀井良政: 臨床婦人科産科増刊号 オフィスギネコロジー 女性のプライマリケア nuchal translucencyの計測と対応 査読なし 医学書院 148-151, 2012
5. Yamasaki M, Nonaka M, Suzumori N, et al. (15 名、7 番目): Prenatal molecular diagnosis of a severe type of L1 syndrome (X-linked hydrocephalus). *J Neurosurg Pediatr.* 査読あり, 8: 411-6, 2011, doi: 10.3171/2011.7.PEDS10531.
6. Isono W, Nagamatsu T, Uemura Y, et al. (9 名、7 番目): Prediction model for the incidence of emergent cesarean section during induction of labor specialized in nulliparous low-risk women. *J Obstet Gynaecol Res.* 査読あり, 37: 1784-91, 2011, doi: 10.1111/j.1447-0756.2011.01607.x
7. 塚崎雄大, 齋藤泉, 嘉本寛江, 他(11 名、9 番目): 子宮筋腫核出後の癒着胎盤に対し、子宮筋ごと胎盤を切除し子宮を温存した一例 日産婦関東連会誌、査読あり、48:109-115, 2011
8. 市瀬茉里, 兵藤博信, 後藤美希, 山下隆博, 亀井良政, 大須賀穰, 上妻志郎, 武谷雄二: amniotic sheetの一例 東京産婦人科学会雑誌、査読あり、60: 456-459, 2011
9. 亀井良政: 妊娠初期・中期における胎児・胎盤スクリーニング 東京産婦人科医会誌 査読なし 43: 67-72, 2011
10. Imada S, Yamamoto M, Tanaka K, et al. (9 名、6 番目): Hypothermia-induced increase of oligodendrocyte precursor cells: Possible involvement of plasmalemmal voltage-dependent anion channel. *J Neurosci Res* 査読あり, 88: 3457-3466, 2010, doi: 10.1002/jnr.22520.
11. Tapanes-Castillo A, Weaver EJ, et al. (10 名、4 番目): A modifier locus on chromosome 5 contributes to L1 cell adhesion molecule X-linked hydrocephalus in mice. *Neurogenetics* 査読あり, 11: 53-71, 2010, doi: 10.1007/s10048-009-0203-3.
12. Mizuno Y, Tsuchida S, Kakiuchi S, et

- al. (10名,6番目): Case report: Prenatal intervention for severe anterior urethral valve. *Pediar International* 査読あり, 52: e92-95, 2010, doi: 10.1111/j.1442-200X.2010.03047.x.
13. 亀井良政: 臨床婦人科産科特大号 これを読めばすべてわかる最新の産婦人科超音波診断 VOCAL法を用いた胎盤体積・腫瘍体積の計測 岡井崇編 査読なし 医学書院 789-791, 2010
 14. 亀井良政: 周産期医学別冊 周産期診療指針 2010 超音波検査 NT(nuchal translucency) 周産期医学編集部編 査読なし 東京医学社 23-26, 2010
 15. 亀井良政: 多胎妊娠 産科と婦人科 査読なし 77:167-169, 2010
 16. 亀井良政: VOCAL法を用いた胎盤体積・腫瘍体積の計測 臨床婦人科産科 査読なし 64:789-791, 2010
 17. 辻佳穂里, 浦田陽子, 小倉さやか, 金高友妃子, 山口俊一, 小松篤, 吉田志朗, 兵藤博信, 亀井良政, 藤井知行, 上妻志郎, 武谷雄二: 左副腎摘出術を行い血圧コントロール良好となったCushing症候群合併妊娠の一例 日本産科婦人科学会東京地方部会誌 59:358-361, 2010
- [学会発表] (計 25 件)
1. Higuchi S, et al.: The assessment of fetal head descent with intrapartum translabial ultrasonography for the safe forced delivery. 22nd World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, 2012.09.09., Copenhagen, Denmark
 2. Ichinose M, et al.: Effect of hypothermia on periventricular leukomalacia via attenuating the cell death of oligodendrocyte precursor cells. 39th Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society, 2012.07.10., Utrecht, The Netherland
 3. Seyama T, et al.: Pretreatment of magnesium sulphate attenuates the white matter damage by preventing the cell death of developing oligodendrocytes. 39th Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society, 2012.07.09., Utrecht, The Netherland
 4. Goto H, et al.: Investigation of changes of the amniotic fluid volume in polyhydramnios. 21st World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, 2011.09.19., Los Angeles, U.S.A.
 5. 瀬山貴博, 他: ラットモデルを用いた硫酸マグネシウムの白質傷害に対する予防効果の検討 第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会, 大阪, 2011
 6. Kamei Y, et al.: Prenatal diagnosis of the dural sinus malformation. 20th World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, 2010.10.12., Plaque, Czech Republic
 7. Nagamatsu T, et al.: Confined placental mosaicism of trisomy 2 in the prominent growth-retarded fetus with normal karyotype; a case report. 8th Korea-Japan Ultrasound Symposium in Obstetrics and Gynecology, 2010.10.03., Nagasaki, Japan
 8. 小松篤史, 他: 早産予知を目的とした子宮頸部の硬度評価に関する検討 第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会, 東京, 2010
 9. 大槻克文, 他: 子宮頸管長短縮症例の臨床所見及び治療の予後への関与に関する多施設共同研究 第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会, 東京, 2010
 10. 小倉さやか, 他: 褥期に広範なくも膜下出血を起こし死亡した Marfan 症候群合併妊娠の一例 第 119 回日産婦関東連合地方部会学術集会, 東京, 2010
 11. 重城真智, 他: 一例 第 119 回日産婦関東連合地方部会学術集会, 東京, 2010
 12. 後藤美希, 他: 腹腔内異物のように描出された油性造影剤の長期遺残の一例 第 120 回日産婦関東連合地方部会学術集会, つくば, 2010
 13. 大橋奈尾子, 他: 鎌状赤血球症合併妊娠の一例 第 120 回日産婦関東連合地方部会学術集会, つくば, 2010
 14. 嘉本寛江, 他: 生体肝移植後, 妊娠中期より腎機能傷害と高血圧を来し妊娠 29 週で早産となった一例 第 120 回日産婦関東連合地方部会学術集会, つくば, 2010
 15. 神尊貴裕, 他: 妊娠後期に統合失調症が増悪し, 電気けいれん療法で改善を認め満期産に至った一例 第 120 回日産婦関東連合地方部会学術集会, つくば, 2010
 16. 松本玲央奈, 他: ハプトグロビン欠損症合併妊娠の分娩管理に対する考察 第 120 回日産婦関東連合地方部会学術集会, つくば, 2010
 17. 松山玲子, 他: 子宮体癌・子宮内膜異型増殖症に対する妊孕性温存療法後の妊娠分娩症例の周産期予後に関する検討 第

- 47 回日本周産期・新生児医学会学術集会, 札幌, 2011
18. 市瀬茉莉, 他: 胎児発育不全症における胎児心拍数基線細変動の変化について 第47回日本周産期・新生児医学会学術集会, 札幌, 2011
 19. 高橋千波, 他: 正期産, 前期破水に対するミニメトロを用いた頸管拡張術は子宮内感染の誘因となるか? 第47回日本周産期・新生児医学会学術集会, 札幌, 2011
 20. 後藤美希, 他: 羊水過多症例の原因別羊水量推移の検討 第63回日本産科婦人科学会学術講演会, 大阪, 2011
 21. 嘉本寛江, 他: 新生児期に手術を要する重症先天性心疾患3疾患の発育・発達に関する検討 第63回日本産科婦人科学会学術講演会, 大阪, 2011
 22. 西田晴香, 他: 切迫早産の入院時所見と妊娠延長期間の関連について 第63回日本産科婦人科学会学術講演会, 大阪, 2011
 23. 保谷茉莉, 他: 前置・低置胎盤における癒着胎盤の術前画像診断:MRI は正診率向上に寄与するか 第63回日本産科婦人科学会学術講演会, 大阪, 2011
 24. 松本玲於奈, 他: Marfan 症候群合併妊娠の妊娠分娩管理について 第63回日本産科婦人科学会学術講演会, 大阪, 2011
 25. 山本康廣, 他: 東大病院における妊婦自己血輸血の有用性に関する検討 第25回日本自己血輸血学会学術集会, 東京, 2012

[図書] (計17件)

1. 亀井良政: 症例から学ぶ周産期診療ワークブック 日本周産期・新生児医学会教育・研修委員会編 メディカルビュー社 pp460, 2012 (編集協力)
2. 亀井良政: 疾患と治療薬 改訂第6版 妊娠高血圧症候群 大内尉義他編 南江堂 928-929, 2010
3. 亀井良政: 六訂版 家庭医学大全科 胎児水腫 高久史磨他編 法研 717-718, 2010
4. 亀井良政: 六訂版 家庭医学大全科 Rh型母子間血液型不適合妊娠 高久史磨他編 法研 718, 2010
5. 亀井良政: 六訂版 家庭医学大全科 産褥精神傷害 高久史磨他編 法研 736-737, 2010
6. 亀井良政: 六訂版 家庭医学大全科 妊娠高血圧症候群の後遺症 高久史磨他編 法研 737, 2010
7. 亀井良政: 系統看護学講座 専門分野Ⅱ母性看護学[2]母性看護学各論改訂12版 産

褥期の身体的変化 堤治他編 医学書院 290-293, 2012

8. 亀井良政: 系統看護学講座 専門分野Ⅱ母性看護学[2]母性看護学各論改訂12版 産褥経過の診断 堤治他編 医学書院 302-304, 2012
9. 亀井良政: 系統看護学講座 専門分野Ⅱ母性看護学[2]母性看護学各論改訂12版 ハイリスク妊娠 堤治他編 医学書院 336-346, 2012
10. 亀井良政: 系統看護学講座 専門分野Ⅱ母性看護学[2]母性看護学各論改訂12版 妊娠期の感染症 堤治他編 医学書院 346-358, 2012
11. 亀井良政: 系統看護学講座 専門分野Ⅱ母性看護学[2]母性看護学各論改訂12版 妊娠疾患 堤治他編 医学書院 358-362, 2012
12. 亀井良政: 系統看護学講座 専門分野Ⅱ母性看護学[2]母性看護学各論改訂12版 多胎妊娠 堤治他編 医学書院 362-363, 2012
13. 亀井良政: 系統看護学講座 専門分野Ⅱ母性看護学[2]母性看護学各論改訂12版 妊娠持続期間の異常 堤治他編 医学書院 364-367, 2012
14. 亀井良政: 系統看護学講座 専門分野Ⅱ母性看護学[2]母性看護学各論改訂12版 異所性妊娠(子宮外妊娠) 堤治他編 医学書院 367-369, 2012
15. 亀井良政: 系統看護学講座 専門分野Ⅱ母性看護学[2]母性看護学各論 産褥の異常 子宮復古不全他 堤治他編 医学書院 455-458, 2012 亀井良政: 基礎から学ぶ産婦人科超音波診断 NTの意義とNTを認めた場合の対応 馬場一憲編 東京医学社 58-65, 2010
16. 亀井良政: 講義録産科婦人科学 胎児発育と胎児付属物 石原理他編 メジカルビュー社 42-47, 2010
17. 亀井良政: 講義録産科婦人科学 先天異常 石原理他編 メジカルビュー社 470-475, 2010

[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

亀井 良政 (KAMEI YOSHIMASA)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 : 00251265

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし