

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 4 月 11 日現在

機関番号：84404  
 研究種目：研究活動スタート支援  
 研究期間：2010 ~ 2011 年  
 課題番号：22890254  
 研究課題名（和文）胎盤・臍帯血中の物質を利用した新生児低酸素性虚血性脳症の治療

研究課題名（英文）Treating neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy with substances that exist in the placenta and cord blood

研究代表者 辻 雅弘 (TSUJI MASAHIRO)  
 独立行政法人 国立循環器病研究センター 再生医療部 室長  
 研究者番号：80579467

研究成果の概要（和文）： 分娩前後に重症仮死となった児は、新生児低酸素性虚血性脳症（HIE）をきたし、脳障害を残す。胎盤から分泌され、胎児脳中に高濃度に存在するホルモン、アロプレグナノロン（ALLO）とプロゲステロン（PROG）の効果を新生児 HIE ラットモデルを用いて検討した。予想とは逆に、ALLO、PROG 投与により脳障害が悪化した。これはγアミノ酪酸（GABA）を介する作用であることを証明した。以上は成人脳梗塞とは正反対の結果である。

研究成果の概要（英文）： Progesterone and its metabolite, allopregnanolone, are neurosteroids that are present at high concentrations in fetal brains. Allopregnanolone is a potent positive modulator of γ-aminobutyric acid A (GABA<sub>A</sub>) receptor function. We examined the effect of exogenous administration of these steroids on hypoxic-ischemic encephalopathy in immature rats. Both progesterone and allopregnanolone significantly exacerbated brain injury in P7 (postnatal day 7) and P14 rats, but not in P21 rats. Co-administration of the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist, bicuculline, partially mitigated the exacerbating effect of allopregnanolone. This is in line with the notion that GABA is excitatory for immature neurons, while it is inhibitory for mature neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011 年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

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： 新生児医学

1. 研究開始当初の背景

新生児低酸素性虚血性脳症（HIE）は産科、新生児医療に於いて最大の問題と言っても過言ではない。分娩前後の問題で重症仮死となった児は HIE をきたし、脳性麻痺や発達障害を呈する。NHIE における脳障害進展機序（脳

障害カスケード）は、ラット、マウスを用いた研究により徐々に明らかになってきている。それに基づいて各種薬剤が試みられているが、臨床応用に至った薬剤は皆無である。その最大の原因は、動物モデルにおいてさえ、薬剤の脳保護効果が、脳障害発生前投与のみにし

か認められないことである。脳障害発生後投与でも有効性を示す薬剤は少数あるが、障害発生後1-3時間までの投与に限られ、時間的猶予の無さから臨床応用は困難である。

## 2. 研究の目的

上記問題点を克服するために、脳障害カスケードの一段階を阻止するのではなく、合成薬でもなく、人が本来有している生理活性物質の中から、脳保護効果を有するであろうと思われる物質に注目した。

(1) **Allopregnanolone (ALLO)** : 胎盤から分泌され、胎児脳中に高濃度に存在するが、出生後に急速に減少する。また黄体ホルモン **Progesterone (PROG)** から脳内で代謝、生成されている。成人女性は男性より脳梗塞の発生率が低いことから、女性ホルモンが脳保護的に作用していると考えられている。以上から ALLO と PROG の脳保護効果が期待される。

新生児 HIE において ALLO、及び PROG の効果を検討した報告は無い。成人脳梗塞モデル動物においては ALLO が有効であったとの論文が一編、PROG は数編ある。

(2) **Ghrelin** : 当センターで成長ホルモン分泌促進ペプチドとして発見、構造決定された。主に胃から分泌され成長ホルモンを介さずに強力な中枢性摂食促進作用を発揮することで注目され、多彩な作用を有する。神経細胞に対しては抗酸化ストレス作用や細胞増殖作用を示す。

新生児 HIE において Ghrelin の効果を検討した論文は無い。成人脳梗塞モデル動物においては Ghrelin が脳保護的に働くとの報告が4つある

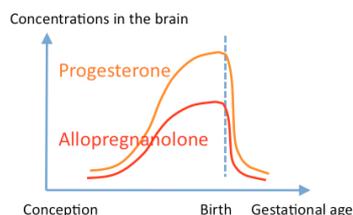
## 3. 研究の方法

新生児低酸素性虚血性脳症の分野で頻用されている唯一のモデル、Rice-Vannucci の手法によるラットモデルを用いた。Allopregnanolone、Progesterone、Ghrelin 投与（腹腔内投与）により組織学的に脳障害の改善がみられるかどうかを検討し、その後その作用機序を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 仮説とは逆に、新生仔ラットでは、ALLO、PROG 投与により脳障害が増悪した。より成長したラットでは脳障害を悪化させることはなかった。PROG は脳内で ALLO へと代謝され、ALLO は γ-アミノ酪酸 (GABA) の作動薬として働く。新生仔では、GABA は成獣と異なり、神経興奮性に働きとの報告がある。GABA 受容体阻害剤 (Bicuculline) を併用する実験を行ったところ、ALLO 投与による神経障害の増悪は、打ち消された。

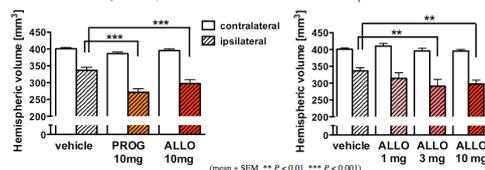
新生児低酸素性虚血性脳症に対する新しい治療法を探るといふ本来の目的は達成できなかったが、ALLO、PROG ともに成人脳梗塞のげっ歯類モデルでは脳保護効果があると近年報告されたことから、新生児と成人との脳障害の違いを理解する上で、興味深い結果が得られたと考えている。また、PROG は臨床で、他疾患に対して既に使用されており、産科、新生児領域での使用に注意を喚起する研究結果である。



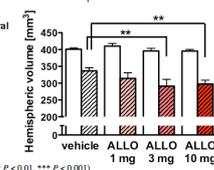
### 1. PROG and ALLO exacerbated brain injury in P (postnatal day) 7 rats.



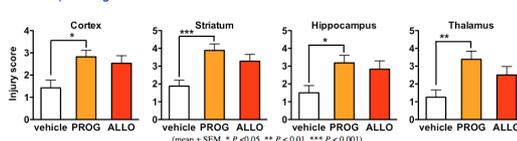
#### 1-1. PROG and ALLO exacerbated injury as assessed by hemispheric volume.



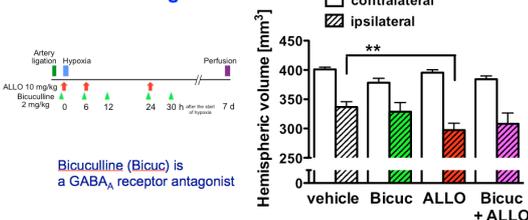
#### 1-2. Exacerbating effect of ALLO was dose-dependant.



#### 1-3. PROG exacerbated all four brain regions examined based on the neuropathological scores.



### 2. GABA<sub>A</sub> receptor antagonism abolished the exacerbating effect.



(2) Ghrelin に神経保護作用があるかどうかを探ったが、明確な効果は認められなかった。

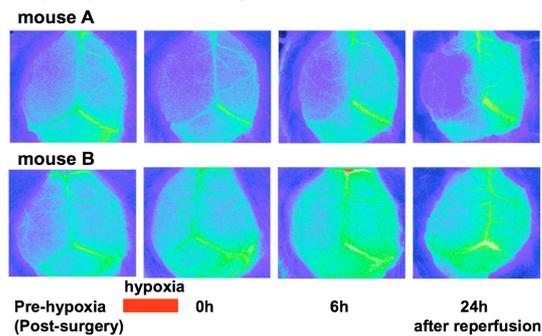
(3) 新生児 HIE 動物モデルは、脳障害の個体差が大きいために以前からの問題点である。本研究を進めて行く中で、脳障害の均質化、及び障害負荷早期に以後の脳障害予測ができないかどうかを探った。Laser speckle flowmetry 法を用いて経時的に脳表血流を測定し、以後の組織的脳障害との相関を検討した。HIE ラット

モデルではHI後6時間、マウスでは24時間後の虚血中心部での脳血流が、非常に高い相関を有して以後の脳障害を予測することが明らかになった。

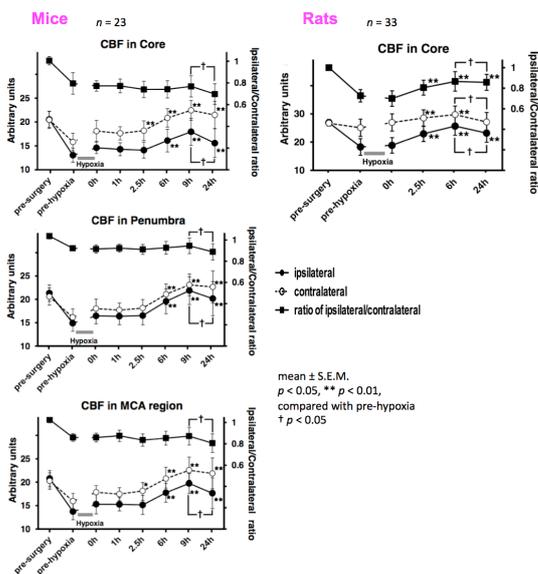
この研究により新生児HIE研究での動物個体差が減少し、研究結果の信頼性が高まると期待される。これまで新生児HIEの脳血流の経時的变化の検討は、技術的制約からげっ歯類では殆ど無く、大動物のデータが主であった。本研究によりげっ歯類での脳血流変化が明らかとなった。

### 1. Representative laser-speckle images in two mice.

Temporal profiles of CBF vary in each animal.

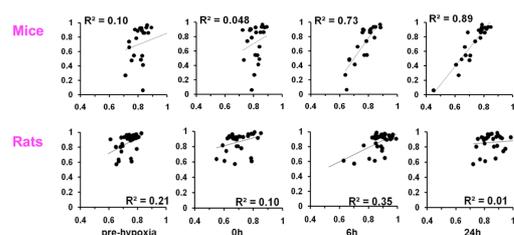


### 2. The temporal profiles of the mean CBF



### 3. The correlation between CBF and brain injury (7 days after the HI)

The correlation was strongest when the CBF was measured in Core at 24 h after HI in mice and 6 h in rats.



### 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 2 件)

(1) Masahiro Tsuji, Akihiko Taguchi, Makiko Ohshima, Yukiko Kasahara, Tomoaki Ikeda. Progesterone and allopregnanolone exacerbate hypoxic-ischemic brain injury in immature rats. *Experimental Neurology* 233: 214-220 (2012) 査読有

DOI:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.10.004>

(2) Makiko Ohshima, Masahiro Tsuji, Akihiko Taguchi, Yukiko Kasahara, Tomoaki Ikeda. Cerebral blood flow during reperfusion predicts later brain damage in a mouse and a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Experimental Neurology*; 233: 481-489 (2012) 査読有

DOI:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.11.025>

[学会発表] (計 4 件)

(1) Masahiro Tsuji. Cerebral blood flow measured by laser speckle flowmetry in neonatal mice with hypoxic-ischemic brain injury.

Neuroscience Meeting 2011; Annual Meeting of Society for Neuroscience. 2011.11.13.

Washington DC, USA

(2) 辻 雅弘 低酸素性虚血性脳障害に対する Progesterone の効果：幼若ラットモデルでの検討

第 114 回日本小児科学会学術集会 2011.8.14 東京

(3) 辻 雅弘 低酸素性虚血性脳障害に対するニューロステロイド Allopregnanolone の効果：幼若ラットモデルでの検討

第 47 回日本周産期・新生児医学会学術集会 2011.7.11 札幌

(1) Masahiro Tsuji. Progesterone and allopregnanolone exacerbate hypoxic-ischemic brain injury in immature rats.

*Brain* 2011; 25<sup>th</sup> International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism, and Function. 2011.5.27. Barcelona, Spain

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻 雅弘 (TSUJI MASAHIRO)  
独立行政法人国立循環器病研究センター・  
再生医療部・室長  
研究者番号：80579467

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：