

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591515

研究課題名(和文) 感染・炎症による脳室周囲白質軟化症の病態と治療に関する研究

研究課題名(英文) Inflammatory mechanisms of periventricular leukomalacia

研究代表者

岡 明(Oka, Akira)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：00251273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：脳性麻痺の重要な原因である脳室周囲白質軟化症(PVL)について、感染機転の解明を目的として、大腸菌由来リポ多糖による新生児期敗血症のラットモデルを作成した。脳においてPVL類似の脳室周囲大脳白質に局限した病変を認め、炎症性細胞の出現とオリゴデンドロサイトの著明な減少および髄鞘化障害を認めた。これは、ヒトPVL同様の未分化なオリゴデンドロサイトの障害と結果として生じる髄鞘形成異常に合致する所見であった。さらにグラム陽性球菌敗血症モデルとして黄色ブドウ球菌についても同様の検討を行い、海馬優位の変化を認めた。感染の原因菌とそのメディエーターの種類により脳障害パターンは変化することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the role of infection and inflammation in the pathogenesis of periventricular leukomalacia (PVL), an important cause of cerebral palsy, models of neonatal sepsis were developed in rat pups. The intraperitoneal administration of lipopolysaccharides from *E. Coli* to neonatal rats caused PVL-like lesions in periventricular white matter, where the infiltration of inflammatory cells as well as the reduction of oligodendrocytes was observed, leading to the impaired myelination. These findings were regarded to be consistent with the damages of immature oligodendrocytes observed in human PVL. In another experimental model of neonatal sepsis of Gram-positive bacteria, the intraperitoneal injection of a toxin derived from *Staphylococcus aureus* caused neuronal loss in hippocampus, lacking lesion of cerebral white matter. Therefore, neonatal sepsis caused distinct lesions in neonatal brains, depending on the species of bacteria and related toxins.

研究分野：医歯薬学

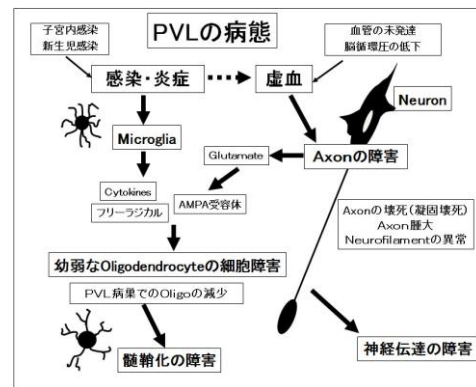
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：脳室周囲白質軟化症 脳性麻痺 敗血症 周産期医学 脳障害

1. 研究開始当初の背景

脳性麻痺は生涯に渡り重篤な後遺症をきたし、社会的・医療的に重要な問題である。周産期医療の進歩によって発生率の低下が期待されたが、残念ながら発生率は漸増傾向を示し出生千人に対し約2人の脳性麻痺が発生している(當山. 脳と発達 2008、鈴木. 脳と発達 2009)。特に、脳性麻痺の児の中で早産低出生体重児として生まれた児の比率が最近では約1/2~2/3に達し、早産低出生体重児自体が増加している傾向とも併せて、非常に憂慮すべき状態となっている。早産低出生体重児における脳性麻痺の主要な病態については、脳室周囲白質軟化症(PVL)白質の障害であることが知られており、自験例でも、胎生34週以下で出生した児のうち9.3%が後に脳性麻痺と診断し、その76%でPVLが原因であった(未発表データ)。従って、我が国では年間2千人の児が脳性麻痺と診断されており、このうちPVLによる障害児の数は年間五百~千人程度と推計される。またPVLでは脳性麻痺以外にも、視覚認知などの高次脳機能障害等の神経後遺症が生じ、約25~50%の早産低出生体重児において認める認知や行動面での問題と大脳白質障害との関連が示されるなど、PVLを含む未熟脳での大脳白質障害による神経後遺症が周産期脳障害の中で最も重要な課題となっている(Volpe. Lancet Neurol 2009)。さらに最近のコホート研究では、PVLの中では満期産として出生した児も多いことが示されており、胎内で発症し満期に出生したPVLの重要性も今後認識していく必要がある(Robinson. Dev Med Child Neurol 2009)。PVLについては、機序は不明であるが母体へのステロイド投与が予防効果があることを示されている他は、有効な治療法はなく、その開発が急務となっている(Baud. New Eng J Med 1999)。

PVLの病態については、これまで脳循環



不全による虚血が主因とされ、動物実験モデルも作成されてきた(岡. 脳と神経 2000, Oka. Brain Dev 2002)。未熟脳では脳室周囲の大脳白質の動脈系が未発達であるために、低血圧の際に局所の虚血となりPVLの特徴的な病変分布をきたすものと考えられる。晩期循環不全などによる全身の低血圧から脳虚血によるPVLとなる場合がある一方で、明らかな低血圧などのエピソードのない児の中にPVLが発症することが以前から指摘されてきた(Batton. Am J Perinatol 2003)。

コホート研究でも母体および児の感染症との関連(Shah. J Pediatr 2008, Glass. Pediatrics 2008)が繰り返し報告されるとともに、炎症に関連する遺伝子多型との関連(Gibson. Pediatrics 2008)なども示され、PVLの病態として虚血だけでなく感染・炎症の重要性が認識されるようになってきており、世界的にPVL研究の焦点も感染・炎症機軸へと移行してきている(岡小児科学レビュー2010 2010)。感染は早産の誘因として高頻度に合併し、また早産児は免疫不全状態にあり敗血症などの細菌感染をきたしやすく、完全な予防は困難と考えられ、その病態を解明し治療法を開発することが非常に重要である。

2. 研究の目的

PVLは今日の脳性麻痺の最も重要な原因であるが、感染・炎症を含む複雑な病態であ

ることが疫学的研究などで示されている。感染・炎症によるPVLの機序は明らかでなく、特異的な有効な治療法もないためその開発が緊急の課題となっている。本研究では、感染によるラットPVLモデルを使用し、児の体内の炎症が脳白質障害をきたす病態を解明し治療的可能性について検討をする。

PVLにおいて感染・炎症機転からこうした組織障害に至る病態は明らかにされておらず、病態の解明には動物モデルでの解析が重要と考えられた。

大腸菌由来のリポ多糖による子宮内感染ラットPVLモデル：こうした背景から、我々は感染・炎症機転による実験的PVLモデルの作成を試み、大腸菌由来のリポ多糖を用いて感染機序による脳白質障害モデルを作成した。リポ多糖を胎生期の羊膜腔内あるいは注入することにより、ヒトPVLと同様に、脳室周囲の脳白質に局限したPVL様病変を作成することができた (Oka. 35th Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiology Society 2008, 岡 日本周産期・新生児学会誌 2009)。

子宮内感染ラットPVLモデルの病理的特徴

	日令 0	日令 7	日令14
マクロファージ	2+	1+	—
活性化ミクログリア	2+	2+	1+
軸索走行の乱れ	1+	1+	—
軸索変性	1+	1+	—
グリオーシス	—	1+	2+
Karyorrhexis	—	1+	—

ヒトで見られる軸索の凝固壊死像は認められなかったが、ミクログリア/マクロファージの出現と、軸索の変性像と嚢胞様病変の形成

やグリオーシスなど、時間的な経過も含めヒトのPVLに類似した病理像を示した (Oka. The 3rd Germany -Japan Neuropediatric Symposium 2008)。

こうしたPVLの動物モデルは、より大型の動物種では作成されてきていたが、ラットなどの小動物での作成は困難であった。今回ラットにおいてもヒトに類似したモデルを作成することができたことにより、今後は感染・炎症による白質障害の病態の解析だけでなく、薬剤による予防法、再生に向けた治療的実験などに応用することが可能となった。

早産低修正体重児は、免疫不全状態にあるとともに、呼吸・循環・消化器などの臓器機能の未熟性のために、人工呼吸器や中心静脈栄養などの集中治療が必要であり、重篤な敗血症をきたすことが高頻度に認められる。こうした新生児期の敗血症と脳性麻痺の関連が指摘されており、新生児敗血症モデルと脳障害の機転について検討を行った。

3. 研究の方法

新生児敗血症モデルの作成：SDラット仔を使用し、生後3日に腹腔内に大腸菌由来のリポ多糖 (LPS)、黄色ブドウ球菌体成分または同由来毒素を投与し、対照群として同量の生食を投与した。生後10日に麻酔下で4%パラホルムアルデヒドを用い灌流固定し、大脳をOCTコンパウンドで包埋凍結後、脳梁膝部・脳室前角を含んだ冠状断で切片を作成した。

組織化学的検討：Hematoxylin & Eosin (HE) で組織を評価するとともに、脳内各種細胞マーカーを用いた免疫組織化学を行った

マクロファージ・ミクログリア：R i c i n u s c o m m u n i s a g g l u t i n i n 1 (RCA1)

アストロサイト：G l i a l F i b r i l l a r y A c i d i c P r o t e i n

(GFAP)

オリゴデンドロサイト: Oligodendrocyte Transcription Factor 2 (Olig2)

また髄鞘化の評価にはMyelin Basic Protein (MBP) の免疫組織化学を用い、陽性面積をimageJ64に評価した。軸索障害はAmyloid Precursor Protein (APP) にて評価した。

4. 研究成果

1) 大腸菌由来のLPSによるラット新生仔脳の大脳白質障害: LPSの腹腔内投与により脳室周囲の大脳白質に変化が認められた。

計測上では脳重量に変化を認めず、大脳皮質の厚さも対照群と投与群にて差は認めなかった。しかし、大脳白質の厚さは軽度低下傾向を認め、脳梁の厚さは有意に低下していた。

各視野あたりのCA1陽性のミクログリア数は、LPS投与群で増加傾向を示し、特に形態的に活性型ミクログリアの増加が認められた。

Olig2陽性オリゴデンドロサイトは、脳室周囲白質および脳梁にて数の減少が認められた。さらにMBP陽性の髄鞘化された面積は、LPS投与群で低下しており、オリゴデンドロサイトの減少と、その結果としての髄鞘化遅延を認めた。

対照的にGFAP陽性アストロサイト数は変化を認めず、APP陽性となる軸索障害も認められなかった。

以上の結果からLPS投与による組織変化は、ラット大脳の皮質ではなく白質に選択的に認められた。

以上よりLPS群において白質全体の低形成を示唆する所見として、脳梁の厚さの低下を認めた。

ヒトPVLの特徴の一つである明らかな囊胞性病変や壊死性病変は認めなかった一

方で、前頭部脳室周囲白質で基質の局所的な菲薄化と軸索の配列の乱れを軽度認め、炎症性細胞の浸潤を時に伴っていた。

LPS投与によって活性型ミクログリアが大脳白質に増加しており、何らかの炎症性変化の存在を示していた。

さらにLPS群においてOlig2陽性オリゴデンドロサイトの減少が広い範囲で認められ、髄鞘化についてもMBP陽性範囲が生食群と比較して有意に低下していた。

ヒトの早産低出生体重児に相当する発達段階であるラット新生仔へのLPS投与では、前頭部大脳白質優位に組織変化を認めた。

ヒトPVLにおいても、成熟過程にあるオリゴデンドロサイトの障害が重視されてきており、結果として髄鞘化障害による機能障害が強調されてきている。

本実験の結果より、感染がヒトPVLでの髄鞘化障害の原因となることが示された。

現在、オリゴデンドロサイトの減少の機序、特に分化段階と細胞障害については検討中である。

本実験でも、LPS投与による低血圧などの全身的な循環動態の変化による虚血性の白質障害を見ている可能性は否定できないが、今後、LPSの直接的な影響や全身炎症を介しての白質障害の機序についてさらなる研究が必要と考えられる。

2) 黄色ブドウ球菌成分および黄色ブドウ球菌由来毒素による脳障害: 黄色ブドウ球菌による感染モデルでは、LPSで認めた様な大脳白質のPVL様の病変は明らかではなかった。しかし興味深いことに、海馬に限局した変化を認め、錐体神経細胞がCA1およびCA3の領域での減少が認められた。またCaspase3陽性細胞の増加も認められており、アポトーシスの機転による障害であると考えられ、現在、さらに詳細な解析を継続している。

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 16 件)

1. Takahashi K, Oka A, Mizuguchi M, Saitoh M, Takita J, Sato A, Mimaki M, Kato M, Ogawa S, Igarashi T. Interstitial deletion of 13q14.13-q32.3 presenting with Arima syndrome and bilateral retinoblastoma. *Brain Dev* 33:353-6, 2011
2. Koyano S, Inoue N, Oka A, Moriuchi H, Asano K, Ito Y, Yamada H, Yoshikawa T, Suzutani T; Japanese Congenital Cytomegalovirus Study Group. Screening for congenital cytomegalovirus infection using newborn urine samples collected on filter paper: feasibility and outcomes from a multicentre study. *BMJ Open* 1:e000118, 2011
3. Hoshino A, Saitoh M, Oka A, Okumura A, Kubota M, Saito Y, Takanashi JI, Hirose S, Yamagata T, Yamanouchi H, Mizuguchi M. Epidemiology of acute encephalopathy in Japan, with emphasis on the association of viruses and syndromes. *Brain Dev* 34:337-343, 2012
4. Fukumura S, Saito Y, Saito T, Komaki H, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Oka A, Takamisawa I. Progressive conduction defects and cardiac death in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Dev Med Child Neurol*. 54:663-666, 2012
5. Itoh M, Tahimic CG, Ide S, Otsuki A, Sasaoka T, Noguchi S, Oshimura M, Goto Y, Kurimasa A. Methyl CpG-binding protein isoform MeCP2_e2 is dispensable for Rett syndrome phenotypes but essential for embryo viability and placenta development. *J Biol Chem*. 287:13859-67, 2012
6. Arai A, Saito T, Hanai S, Sukigara S, Nabatame S, Otsuki T, Nakagawa E, Takahashi A, Kaneko Y, Kaido T, Saito Y, Sugai K, Sasaki M, Goto Y, Itoh M. Abnormal maturation and differentiation of neocortical neurons in epileptogenic cortical malformation: unique distribution of layer-specific marker cells of focal cortical dysplasia and hemimegalencephaly. *Brain Res*. 1470:89-97, 2012
7. Sakakibara T, Sukigara S, Saito T, Otsuki T, Takahashi A, Kaneko Y, Kaido T, Saito Y, Sato N, Kimura Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Goto Y, Itoh M. Delayed maturation and differentiation of neurons in focal cortical dysplasia with the transmantle sign: analysis of layer-specific marker expression. *J Neuropathol Exp Neurol*. 71:741-9, 2012

8. Kaido T, Otsuki T, Kakita A, Sugai K, Saito Y, Sakakibara T, Takahashi A, Kaneko Y, Saito Y, Takahashi H, Honda R, Nakagawa E, Sasaki M, Itoh M. Novel pathological abnormalities of deep brain structures including dysplastic neurons in anterior striatum associated with focal cortical dysplasia in epilepsy. *J Neurosurg Pediatr*. 10:217-25, 2012
9. Sakakibara T, Sukigara S, Otsuki T, Takahashi A, Kaneko Y, Kaido T, Saito Y, Sato N, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Goto Y, Itoh M. Imbalance of interneuron distribution between neocortex and basal ganglia: consideration of epileptogenesis of focal cortical dysplasia. *J Neurol Sci*. 323:128-33, 2012
10. Hayashi T, Inuzuka R, Shindo T, Hirata Y, Shimizu N, Oka A. Hyaluronic acid concentration in Fontan circulation: Correlation with hepatic function and portal vein hemodynamics. *Pediatr Cardiol* 35:608-15, 2014
11. Kataoka M, Aimi Y, Yanagisawa R, Ono M, Oka A, Fukuda K, Yoshino H, Satoh T, Gamou S. Alu-mediated nonallelic homologous and nonhomologous recombination in the BMP2 gene in heritable pulmonary arterial hypertension. *Genet Med*. 15:941-7, 2013
12. Fumoto S, Hosoi K, Ohnishi H, Hoshina H, Yan K, Saji H, Oka A. Chimerism of buccal membrane cells in a monozygotic dizygotic twin. *Pediatrics*. 133:e1097-1100, 2014
13. Itoh M, Iwasaki Y, Ohno K, Inoue T, Hayashi M, Ito S, Matsuzaka T, Ide S, Arima M. Nationwide survey of Arima syndrome: revised diagnostic criteria from epidemiological analysis. *Brain Dev*. 36:388-93, 2014
14. Akamatsu T, Dai H, Mizuguchi M, Goto Y, Oka A, Itoh M. LOX-1 Is a Novel Therapeutic Target in Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Am J Pathol*. 184:1843-52, 2014

[学会発表] (計 5 件)

[図書] (計 0 件)

[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

岡 明 (東京大学医学部附属病院・教授)

研究者番号：

00251273

(2) 研究分担者

伊藤 雅之 (独立行政法人国立精神・神
経医療研究センター・室長)

研究者番号：

50243407

(3) 連携研究者

()

研究者番号：