

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791221

研究課題名(和文)ステロイドによる新生児脳障害およびその治療法の開発

研究課題名(英文) Neonatal brain injury induced by steroid and developing for a therapy against the injury.

研究代表者

一ノ橋 祐子 (Ichinohashi, Yuko)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：60465523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：生後早期のラットに対する少量Dexamethasone (DEX)の影響をin vivo、in vitro両面で調べた。行動実験では、DEX群で能動回避学習試験での学習障害に加えてオープンフィールドテストで多動傾向を認めた。免疫組織学的検討では、DEX群の海馬において、cleaved caspase 3陽性細胞が有意に増加するのに対し、phospho H3陽性細胞が有意に減少しており、アポトーシス誘導、細胞新生の抑制が認められた。In vitroでは、DEX群において低濃度でも有意に細胞数が減少した。細胞死(LDH)については有意差を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effects of DEX on neural development, we first administered low doses (0.2mg/kg bodyweight or less) of the glucocorticoid to neonatal rats on a daily basis during the first postnatal week and examined subsequent behavioral alterations at the juvenile stage. DEX-treated rats exhibited not only a significant reduction in both somatic and brain weights but also learning disabilities as revealed in the shuttle avoidance test. The hippocampi of DEX-treated rats displayed a high apoptotic and a low mitotic cell density compared to control rats on day 7 after birth. In a subsequent experiment, neural stem/progenitor cells were cultured in the presence of DEX for 6days. The glucocorticoid inhibited cell growth without an increase in cell death. These results suggest that administration of DEX to premature infants induces neurological dysfunction via inhibition of the proliferation of neural stem/progenitor cells.

研究分野：新生児学

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：ステロイド 未熟脳 新生児

1. 研究開始当初の背景

近年新生児医療の進歩に伴い、低出生体重児・早期産児の出生数も増加しており、現在では国内・国外とも全出生数の約10%となっている。早期産児の増加に伴い、さまざまな面でステロイド治療を必要とする機会も多くなり、新生児医療に携わる上でなくてはならない治療薬のひとつである。

ステロイドの使用により、新生児医療において短期予後は明らかに改善傾向ではあるものの、一方で Dexamethasone (DEX) については高容量投与では神経学的後遺症をもたらすとの報告が散見され、近年では少量投与で使用する人が多い。

しかしながら、これまで早期産児に対するステロイドの影響・脳障害のメカニズムなどについての報告は数少ない。

2. 研究の目的

本研究では、生後早期のラットに対する少量 DEX の影響を、in vivo において、組織学的、行動学的に、また、in vitro において、神経幹細胞に対する細胞増殖能や細胞死について調べる。

この研究により、ステロイドの功罪を再認識するとともに、救命率のみならず神経学的予後を改善する上でのステロイドの適切な使用方法を導き出す。

3. 研究の方法

(1) 動物モデルでの検討

免疫組織学的評価

生後1日目から新生仔ラット(SDラット)にDEX(0.2mg/kg/day 3日間、その後0.1mg/kg/day 4日間)を腹腔内投与した。生後7日目に灌流固定し、パラフィン切片を作製し、抗cleaved caspase 3抗体、抗Phospho-Histone H3抗体を用い免疫組織学的に検討した。

体重、脳重量

上記同条件でDEXを投与し、生後1週～5週にかけて体重、脳重量評価を行った。

行動学的評価

生後4～6週にかけて、能動回避学習試験にて学習障害を、またオープンフィールドテストにて基本行動を評価した。

(2) 細胞培養系での検討

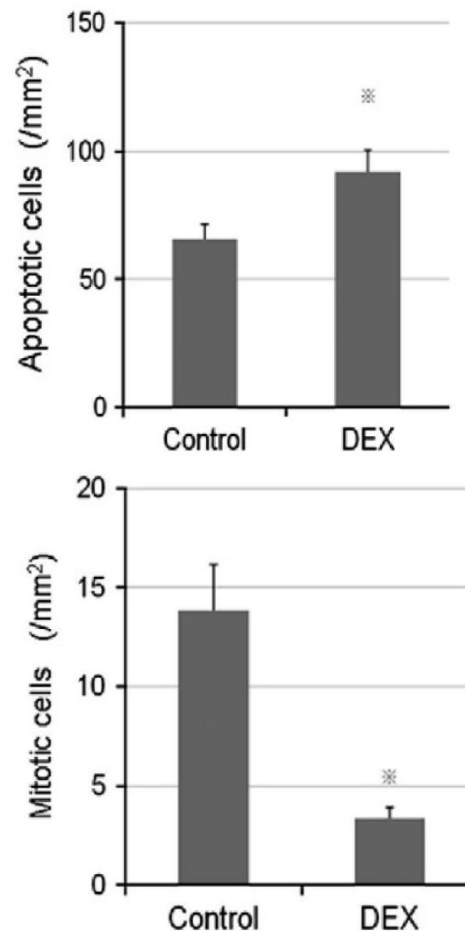
胎齢14日の胎仔ラット脳から神経幹細胞を採取し、7日間増殖させ、続いて6日間は0.1nM、0.1μM、1μM、5μMと濃度の異なるDEXを添加して培養した。比較としてのCorticosterone(CORT)を同力価となるように添加した群、および生理食塩水を添加した対照群とで、細胞増殖能および細胞死を評価した。

4. 研究成果

(1) 動物モデルでの検討

免疫組織学的評価

DEX群の海馬において、cleaved caspase 3陽性細胞が有意に増加するのに対し(DEX, 97.4 ± 17.5 cells/mm²; control, 56.6 ± 16.8 cells/mm²; $p = 0.003$)、phospho H3陽性細胞が有意に減少しており(DEX, 3.37 ± 0.55 cells/mm²; control, 13.88 ± 2.28 cells/mm²; $p = 0.028$)、アポトーシス誘導、細胞新生の抑制が認められた(図1)。

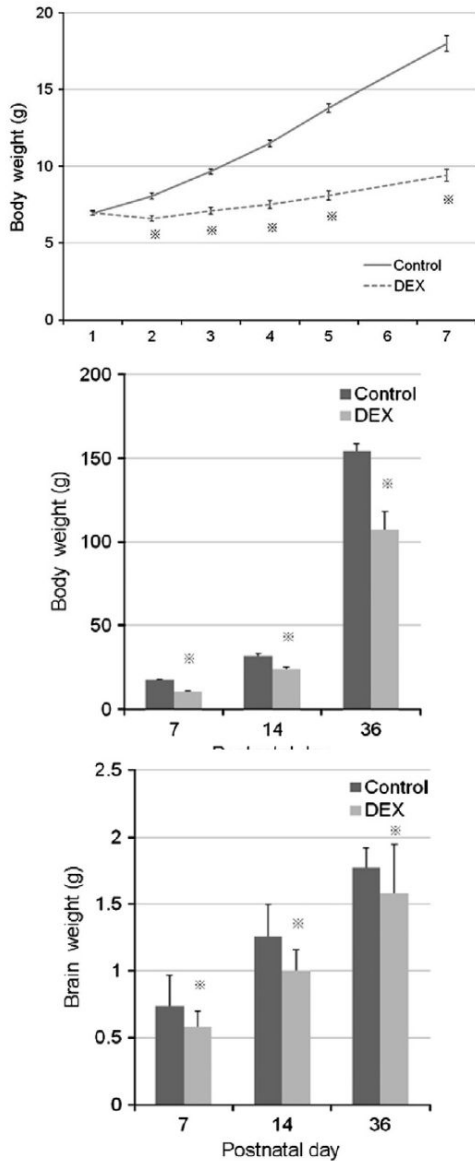


(Ichinohashi Y, et al. Early Hum Dev. 2013)

図1 アポトーシス、細胞新生

体重、脳重量

生後1週～5週にかけて行った体重、脳重量評価では、有意な増加不良（生後36日で体重30.4%減、脳重量10.7%減）を認めた（図2）。



(Ichinohashi Y, et al. Early Hum Dev. 2013)

図2 体重、脳重量の変化

行動学的評価

DEX群において、能動回避学習試験での学習障害 ($p < 0.05$; 図3)に加えて open field test で多動傾向を認めた(図4)。

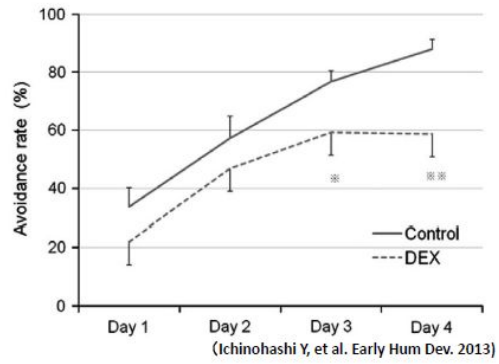


図3 能動回避学習試験

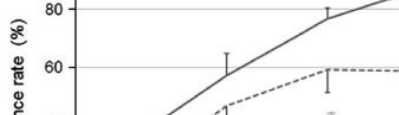
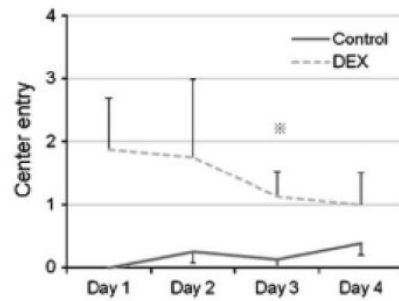
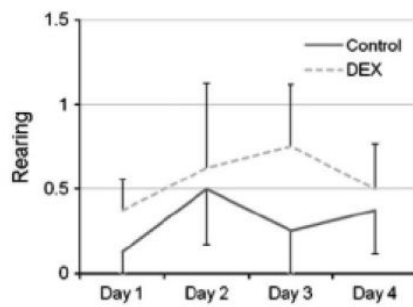
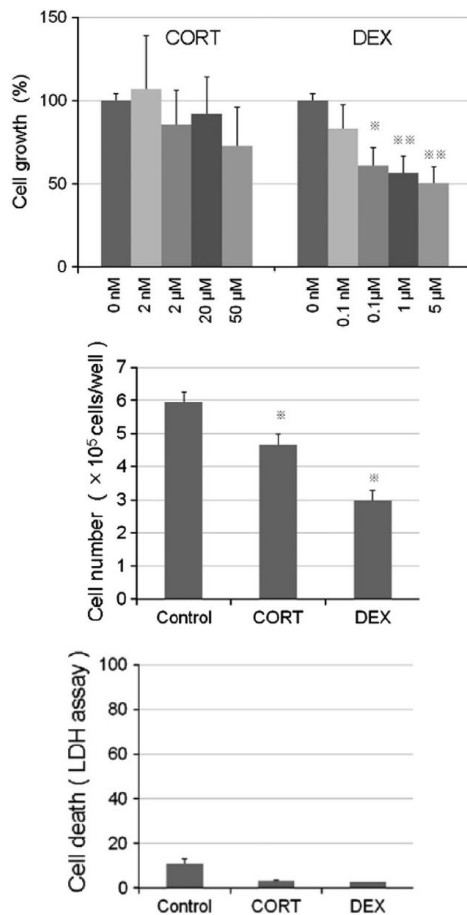


図3 能動回避学習試験

(2) 細胞培養系での検討

CORT 群では高濃度では増殖能抑制傾向はあるものの有意差までは至らなかった。一方、DEX 群では低濃度でも有意に細胞数が減少した(対照群: CORT: DEX; $5.94 \pm 0.32 \times 10^5$ cells/well : $4.66 \pm 0.33 \times 10^5$ cells/well : $2.98 \pm 0.30 \times 10^5$ cells/well)。細胞死(LDH)については3群間で有意差を認めなかった(図5)。



(Ichinohashi Y, et al. Early Hum Dev. 2013)

図5 神経幹細胞の細胞増殖、細胞死

未熟脳では、少量 DEX 短期間投与でも、神経幹細胞増殖能は抑制され、分化過程における細胞へのアポトーシスを誘導することにより、神経学的障害を引き起こす可能性が示唆された。これらの結果を踏まえ、臨床での使用については他剤への変更、もしくは避けられない場合には必要最小限の投与量に限ることが望ましい。

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1件)

1. Ichinohashi Y, Sato Y, Saito A, Ito M, Watanabe K, Hayakawa M, Nakanishi K, Wakatsuki A, Oohira A. Dexamethasone administration to the neonatal rat results in neurological dysfunction at the juvenile stage even at low doses. Early Hum Dev. 2013;89(5):283-8:10.1016/j.earlhumdev.2012.10.007. 査読あり

[学会発表](計4件)

1. 一ノ橋祐子、佐藤義朗、杉山裕一朗、伊藤美春、近藤大貴、服部哲夫、齋藤明子、藤巻英彦、早川昌弘
未熟な脳細胞に対する少量デキサメサゾンの影響
第 57 回日本未熟児新生児学会
2012.11.25-27、熊本市 ホテル日航熊本
2. 一ノ橋祐子、佐藤義朗、齋藤明子、渡邊貴美、早川昌弘、中西圭子、若槻明彦、大平敦彦
Effects of low doses of dexamethasone, a synthetic glucocorticoid, on neural development of the neonatal rat
第 35 回日本神経科学大会
2012.9.18-21、名古屋市 名古屋国際会議場
3. 一ノ橋祐子、佐藤義朗、伊藤美春、服部哲夫、邊見勇人、齋藤明子、藤巻英彦、早川昌弘
未熟な脳細胞に対するデキサメサゾンの影響
第 47 回日本周産期・新生児医学会、
2011.7.10-12、札幌市 札幌コンベンションセンター
4. 一ノ橋祐子、佐藤義朗、服部哲夫、伊藤美春、邊見勇人、山本ひかる、中山淳、早川昌弘
ステロイドによる神経幹細胞の増殖と分化への影響
第 55 回 未熟児新生児学会
2010.11.5-7、神戸市 神戸国際会議場

6 . 研究組織

(1)研究代表者

一ノ橋祐子 (Ichinohashi Yuko)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：60465523

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし