

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591615

研究課題名(和文) 超早産児の虚血性脳障害に関する新規モデルマウスの確立と病態研究

研究課題名(英文) Establishment and analysis of a new mouse model of ischemic brain injuries in extremely preterm infants

研究代表者

出口 貴美子 (Deguchi, Kimiko)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：50227542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：超早産児の後遺症として、認知機能障害が近年注目されている。本研究では独自に超早産児の脳虚血傷害モデルマウスを構築したのち、神経細胞の移動を可視化するために、妊娠マウスの胎仔に子宮内胎児電気穿孔法を用いて、神経前駆細胞を緑色蛍光蛋白質(GFP)でラベルした。この方法により、脳病理を経時的に検討する上で、神経細胞の移動の観察が容易となった。また、生後の生存マウスを用いて行動解析を行い、認知機能障害と関連する行動異常の有無を検討した。脳病理像において、生存マウスの皮質の層構造の異常が確認された。さらに、生存マウスの記憶や認知などに関する行動異常が一部明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Many extremely preterm infants (EPIs) subsequently develop cognitive impairment of unknown etiology. We observed fewer neural progenitors and larger numbers of ectopic neurons in the white matter (WM) of human EPI brains and hypothesized that EPIs develop cognitive dysfunction because of altered neuronal generation and migration. To test our hypothesis we produced ischemic brain damage in mouse embryos by occluding maternal uterine arteries. The mice showed decreased proliferation of neuronal progenitors, delayed neuronal migration, and altered neocortical structures. Similar to human EPIs the surviving mice exhibited abnormal cognitive function. These findings supported our hypothesis that altered neuronal generation and migration underlies the serious risk of subsequent cognitive impairment of EPIs.

研究分野：小児神経学

キーワード：超早産児 後遺症 認知機能障害 脳虚血 モデルマウス 神経細胞

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の周産期医療の発展とともに、在胎 28 週未満の超早産児の生存率は著しく向上した。しかしその一方で、虚血性脳障害による後遺症の頻度は減少しておらず、現在もなお小児医療の大きな課題の一つとなっている。早産児の虚血性脳障害による神経学的後遺症の特徴としては、脳性麻痺などの運動発達障害が主であるが、その中の超早産児では、学習発達障害等の高次脳機能障害の頻度が高い事が近年注目されている。これまでの我々を含む国内外の研究では、超早産児の虚血性脳障害の主な病変は、広範性の大脳白質障害であると考えられており、オリゴデンドロサイトの前駆細胞傷害が将来の運動発達障害の原因としてわかってきた。一方、高次脳機能障害に関しては、むしろ皮質の障害と関連があると推測され、実際に MRI による画像解析で、脳室壁の不整、白質の容量減少などに加え、生後の大脳皮質の発達の障害が指摘されており、この所見と高次脳機能障害との関連性が示唆されるようになった。しかし、なぜ皮質の発達の障害が起こるのかといった病態に関しては、ほとんどわかっていない。また、これが白質病変と関連するのかという点についても不明であった。

## 2. 研究の目的

超早産児の虚血性脳障害による後遺症の病態を明らかにするために、これまでに、脳室壁の不整の所見に注目し、ヒト在胎 28 週の正常の脳室周囲を観察したところ、神経前駆細胞が予想以上に豊富に存在し、神経細胞の皮質への移動が行われていることを見いだした。そこでこの時期での神経前駆細胞に注目し、超未熟児剖検脳の神経病理学的解析を行ったところ、虚血性脳障害を有する超早産児の脳では、ほぼ全例で脳室周囲の神経前駆細胞が広く傷害されていることがわかった。さらに長期生存例では、脳室上衣層の広範な消失や脳室下帯の癆痕化を認めると同時に、部分的な大脳皮質層構造の異常、大脳白質内の異所性神経細胞などの神経前駆細胞への分化、移動、成熟障害を示唆する所見を得た。以上の所見より、これらの大脳皮質の傷害が超早産児の後遺症として知的及び行動障害を引き起こす要因になり、高次脳機能障害に繋がるのではないかと考えた。この仮説を実証し、治療法開発を進めるためには動物モデルが必要であるが、これまで適当な超早産児の虚血性脳障害モデルは存在しない。そのため、本研究では、マウスを用いて、新規動物モデルを確立することとそのモデルを用いて病態の解明を進めることを目的とした。

## 3. 研究の方法

超早産児の虚血性脳障害の病態解明と治療法の開発のために必要なマウスモデルを下記の方法により作成し、病態の解明を行った。

1. 妊娠後期(E17等)のマウスの胎児脳室内に GFP 発現ベクターを子宮内エレクトロポレーションで脳室壁の神経幹細胞に遺伝子導入した後、子宮動脈結紮により胎児脳虚血を負荷した後、胎児は子宮内に戻した。経時的に脳組織を採取し、脳虚血による細胞死などから、モデルとしての妥当性を検証した。
2. 虚血負荷後、様々な時点で組織学的解析を行い、組織傷害に関する病態を明らかにした。ヒトの超早産児剖検脳で確認された神経幹細胞の障害、神経細胞の移動の障害、大脳皮質の層構造の異常、異所性神経細胞の有無など所見がみとられるか検証した。
3. 行動解析実験により、運動、記憶などの高次脳機能をはじめとする認知や行動の障害について評価を行った。

## 4. 研究成果

### 1) モデルマウス作成とその条件検討

超早産児の虚血性脳障害のモデルマウス作成の条件検討を行いながら、脳の組織学的な解析や行動学的解析を行った。

超早産児の虚血性脳障害のモデルマウス作成の条件検討については、子宮動脈結紮の際に母マウスが高率に死亡し、ほとんど仔マウスが得られなくなってしまうという、当初予期していなかった問題点が発生した。しかし、結紮時間や方法、手術方法を改良することで、母マウスの死亡率が減少し、仔マウスを安定的に得て解析を行うことが可能になった。

### 2) 放射状グリア細胞に注目した組織学的な解析

脳の組織学的な解析の際には、神経幹細胞であると同時に移動神経細胞の足場となる放射状グリア細胞に注目して解析を行った。神経幹細胞特異的抗体である Nestin、Musashi1、GFAP を用いて免疫染色を行って解析するほか、子宮内エレクトロポレーションによって GFP 蛍光を放射状グリア細胞に導入して、虚血性脳障害による影響の解析を行った。放射状グリア細胞を可視化するための至適条件を見出したうえで解析を行ったが、その解析の結果、放射状グリア細胞の形態は当初の予想以上に多様性に富んでおり、その多様性を踏まえつつ解析を行う必要があることが明らかになった。

### 3) 脳の微細な組織構築変化に注目した解析

さらに、脳の組織学的な解析として、神経細胞移動と、その遅れの結果としてもたらされる、脳の組織構築の微細な変化に注目した解析を行った。正常対照において移動が終了

する状態においても虚血が誘導されたマウスではまだ移動中の神経細胞を数多く認めることを確認したのち、それらの移動神経細胞の最終的な配置位置についての解析を行った。これらの神経細胞は最終的には脳表面近くに移動する細胞が多数を占めたものの、最終的な神経細胞が配置される位置には変化を認め、微細な組織構築変化が生じることが確認された。

#### 4) 超早産児の虚血性脳障害のモデルマウスの行動解析

行動解析として、まずオープンフィールドテストを行ったところ、コントロール群と比較して有意な差を認めなかった。この結果から、運動機能への明らかな障害が生じていないことが確認された。さらに、ソーシャルインタラクションテストによる社会性の評価においても、虚血群とコントロール群に有意な差を認めなかった。しかし、これらに加えて、超早産児の後遺症として、認知機能障害が注目されているため、認知機能の評価に焦点を当てて解析を行った。新規物体認識試験と、Y字迷路試験において正常対照マウスと比較した際に有意な低下をみとめ、認識記憶の障害および、作業記憶の障害が示唆された。ところ、記憶の保持に影響が生じている可能性が明らかになった。以上の所見については、現在、論文を準備してその投稿を行っている。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Numata Y, Gotoh L, Iwaki A, Kurosawa K, Takanashi JI, Deguchi K, Yamamoto T, Osaka H, Inoue K. Epidemiological, clinical, and genetic landscapes of hypomyelinating leukodystrophies. *J Neurol.*;261(4):752-8. (2014). 査読有

2. 井上健, 岩城明子, 黒澤健司, 高梨潤一, 出口貴美子, 山本俊至, 小坂 仁. 先天性大脳白質形成不全症: ゲノム解析から診断、治療への取り組み 脳と発達 45(2);122-126 (2013). 査読有

3. Yu L-H, Morimura T, Numata Y, Yamamoto R, Inoue N, Antalfy B, Goto Y, Deguchi K, Osaka H, Inoue K. Effect of curcumin in a mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Mol Genet Metab*, 106:108-114. (2012). 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Ken-ichiro Kubo, Kimiko Deguchi, Taku

Nagai, Michihiko Aramaki, Kiyofumi Yamada, Ken Inoue, Kazunori Nakajima “Analyses of the effects of embryonic ischemia on brain development (胎児期の虚血が脳の構造と機能に及ぼす影響)” シンポジウム: “周産期ストレスと脳機能”(オーガナイザー: 鯉淵典之、西真弓)、第 92 回日本生理学会大会 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会、2015 年 3 月 21-23 日、神戸国際会議場・展示場(兵庫県神戸市)

2. Ken-ichiro Kubo, Kazuhiro Ishii, Toshihiro Endo, Seico Benner, Taku Nagai, Wei Shan, Kimiko Deguchi, Ken Inoue, Kiyofumi Yamada, Chiharu Tohyama, Masaki Takeyama, and Kazunori Nakajima “Abnormal brain cytoarchitecture as one of the micro-endophenotypes of neuropsychiatric disorders (精神疾患のマイクロエンドフェノタイプとしての微細な脳組織構築の異常)” シンポジウム “マイクロエンドフェノタイプから考える精神疾患研究”(オーガナイザー: 喜田聡、加藤忠史) 第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学学会大会、2014 年 9 月 29 日-10 月 1 日、奈良県文化会館・奈良県新公会堂(奈良県奈良市)

3. Kimiko Deguchi, Ken-ichiro Kubo, Kazunori Nakajima, and Ken Inoue, “Abnormal neuronal migration with ischemic brain injury in extremely preterm infants underlies subsequent cognitive impairment”, Joint Meeting of the 20th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (ISDN) and the 5th Annual NeuroDevNet Brain Development Conference, 2014 年 7 月 19-24 日, Hilton Montreal Bonaventure, Montreal (Canada)

4. 出口貴美子、久保健一郎、永井拓、Shan Wei、山田清文、仲嶋一範、井上健、 “超早産児の高次脳機能障害に結びつくメカニズムの解明; 虚血性脳傷害モデルマウスを用いた解析【第 4 報】”、第 56 回日本小児神経学会学術集会、2014 年 5 月 29-31 日、アクトシティ浜松(静岡県浜松市)

5. Ken-ichiro Kubo, Kimiko Deguchi, Taku Nagai, Wei Shan, Ayako Kitazawa, Michihiko Aramaki, Kazuhiro Ishii, Kiyofumi Yamada, Ken Inoue, Kazunori Nakajima, “Abnormal cortical architectures and neuropsychiatric disorders”、第 87 回日本薬理学会年会、

2014年3月19-21日、東北大学百周年記念会館川内萩ホール・仙台国際センター（宮城県仙台市）

6. Kimiko Deguchi, Ken-ichiro Kubo, Dawna Armstrong, Kazunori Nakajima, and Ken Inoue, “Abnormal neuronal migration with ischaemic brain injuries may cause cognitive dysfunction in extremely preterm infants”、23rd Meeting of the European Neurological Society (ENS), 2013年6月8-11日, Convention Centre Gran Via, Barcelona(Spain)
7. 出口貴美子、久保健一郎、仲嶋一範、井上健 “超早産児の虚血性脳傷害モデルマウスを用いた解析；第3報” 第54回日本小児神経学会総会、2012年5月17-19日、ロイトン札幌（北海道札幌市）

〔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〕

無し

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

出口 貴美子 (Kimiko Deguchi)  
慶應義塾大学・医学部・講師(非常勤)  
研究者番号：50227542

##### (2)研究分担者

無し

##### (3)連携研究者

井上 健 (Ken Inoe)  
国立精神・神経医療研究センター・神経研究所疾病研究第二部・室長  
研究者番号：30392418

##### (4)研究協力者

久保 健一郎 (Ken-ichiro Kubo)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：20348791