

87. 脳脊髄液の循環に着目した脳発達異常早期診断への挑戦

小野田 淳人

山口東京理科大学 薬学部 薬学科 衛生化学分野

Key words : 胎児発育不全, 子宮内血流不全, 動物モデル, プロテオミクス, バイオマーカー

緒言

21世紀の医学において、中枢神経系に関わる疾患の予防および治療法の確立は最大の課題の一つだと周知されている。とくに、自閉スペクトラム症や注意欠如・多動症、学習障害などの神経発達症をもつ児の増加が国際的に問題視されている。ゆえに、次世代を担う子どもたちの健康増進に向け、世界各国における、神経発達症の予後改善や早期予防法の確立が強く求められている。

神経発達症のリスク因子として、胎児発育不全 (FGR) が注目されている。FGR は、胎児の発育が子宮内で停滞または停止する現象を指し、低出生体重の主原因となる。周産期におけるその罹患率は 5~10% を占め、世界全体で年間 3,000 万人の胎児が該当すると推定されている [1]。FGR の潜在的なリスク因子として、環境汚染物質や高齢妊娠などが挙げられているが、その直接的な原因は未だ明確になっていない。共通した病態として、妊娠高血圧症候群などに関連する胎児への血流不全や、その血流不全に伴う低酸素血症と栄養障害などの慢性的な要因が複合的に作用している [2]。このような慢性的な病態が脳発達に悪影響を及ぼし、神経発達症の発症リスクを増加させると考えられている。FGR に伴う脳発達異常に関する問題点は、出生後の脳画像検査で明確な異常が確認されない軽症例であっても、成育後の幼児期・学童期に神経発達症が誘発されることにある。FGR に起因する脳発達異常の予防・治療法の確立が求められているにも関わらず、その確立が実現できないのは、現在の診断技術では、各 FGR 児に生じる微細な脳の異常を捉え、脳発達異常を早期に予測・診断できないことに起因する。その診断や予測が可能になれば、神経可塑性が高く、治療への反応をより期待し得る新生児期の早い段階で治療介入が可能となる。また、患児の家族が、その患児にとって最適な育児環境をより早く整えることにも繋がる。こうした背景から、新生児医学の基礎研究やトランスレーショナルリサーチにおいて、FGR に伴う神経発達症の早期診断の実現に向けた、神経学的予後を早期に予測できる指標が求められる。

そこで本研究では、その FGR 由来の脳発達異常をより早期に検出するためのバイオマーカーの探索を目的に行った。特に、軽症時の脳発達異常を捉えられるよう、マイルドで慢性的な子宮内血流不全を再現した最新のモデル動物を用いた [3]。そのモデル動物の脳脊髄液中タンパク質の網羅的解析により、バイオマーカー候補分子を見出した。

方法

1. 子宮内血流不全誘導手術

本研究では、妊娠ラットの卵巣動脈および子宮動脈に血管狭窄器具を装着することで、子宮内血流不全モデルを作製した。その際、血管狭窄器具としてアメリロイドコンストリクター (AC) を用いた。AC は、金属製のリングの内側にドーナツ状のカゼインコアをもち、それが周囲の水分を吸収して徐々に膨張し、時間をかけて中心の穴が狭くなることで緩やかに血管を狭窄させる。本研究では、内径 0.40 mm の AC (MC-0.40-SS) を使用した。

妊娠 17 日目の SD ラットをイソフルラン麻酔下で、手術台 (39°C) に仰向けで固定した。腹部消毒後に剃毛し、正中切開により約 1.5 cm 開腹した。用手的に子宮を体外に露出させ、胎仔数を計数した後、双眼実体顕微鏡

下で、子宮壁面から卵巣動脈および子宮動脈を剥離し、血管狭窄器具を装着した。露出した子宮をガーゼで覆い、39°Cに加温した生理食塩水で湿度と体温を維持しつつ操作を行った。また、子宮を白熱電球で照らすことで、胎子を外部から暖め、低体温化を抑制した。血管狭窄器具の装着後、子宮を体内に戻し、二重縫合により閉腹した。閉腹後、39°Cの手術台に10分間静置した後に、持続麻酔から解放した。偽手術群では、血管狭窄器具の装着以外すべて子宮内血流不全誘導手術と同じ操作を行った。外科的処置を施す本実験における動物の飼育では、無処置群を含め、すべての群で滅菌した巣箱（ラットハウス）を飼育ケージ内に入れることでストレスの緩和を計った。血流不全処置を施した母ラットから生まれた仔ラットのうち、出生体重が基準値を下回る個体をFGR群と判断して用いた。体重の群間変動に関しては、Tukey-Kramerの多群検定法により判定した。

2. 脳脊髄液中タンパク質プロファイルの取得と分析

Sham群およびFGR群における出生4、5日目の仔ラットから脳脊髄液を採取した。そこにタンパク質分解酵素阻害剤を加え、10,000×gで5分間遠心し、上清を採取することで、混入した細胞や夾雑物を排除した。精製した脳脊髄液中のタンパク質濃度をBCA protein assay法により定量し、その値に基づいて、タンパク質溶液の上清を0.5 μg/μLに調製した。その後、タンパク質に対し、液体クロマトグラフ/質量分析(LC/MS)用にTandem Mass TagTMシステムでラベル付けし、脳脊髄液中の全タンパク質の存在量をLC/MSで定量した。Orbitrap Fusion 質量分析システムを、UltiMate 3000 RSLCnano LC システム、ナノキャピラリーカラム(150 mm×75 μm)、ナノエレクトロスプレーイオン源と組み合わせて使用した。逆相クロマトグラフィーでは、2%アセトニトリル/0.1%ギ酸溶液および95%アセトニトリル/0.1%ギ酸溶液を用いた線形グラディエントフローレート(0分、5%B; 100分、40%B、300 nL/min)に設定した。タンデムMS分析前には、400~1,600の質量対電荷比(m/z)で前駆体イオンスキャンを行った。タンデムMSは、四重極隔離で0.8 Th、HCD断片化で30%正規化衝突エネルギーとイオントラップにおける迅速スキャンMS分析によって実行した。タンパク質濃度の定量後、脳脊髄液中タンパク質プロファイルを、プロテオームソフトウェア Scaffold 4.4.8、Proteome Discoverer 1.4 および MASCOT 検索エンジン 2.6.0 を用いて解析し、タンパク質およびペプチドを同定した。同定には、UniProtのタンパク質データベース(リリース 2023_05)を参照し、前駆体質量許容範囲を10 ppm、フラグメントイオン質量許容範囲を0.8 Daに設定した。定量された各タンパク質の存在量と出生体重との相関性について、スピアマン相関係数を算出し、その値を用いてp-valueとFalse discovery rate(Q-value)を算出した。

結 果

1. FGRモデル動物の成否判定

本研究では、アメロイドコンストラクターと呼ばれる吸水により膨張する血管狭窄器具を用いて、緩徐かつ持続的に胎児への血流を抑制することで軽症例のFGRを再現したモデル動物を用いた[3]。このモデル動物は、臨床上のFGR児における脳機能の所見[4, 5]と類似した表現型を示し、大脳皮質神経細胞数の減少などの組織学的変化に加え、協調運動、学習記憶の障害などの行動学的変化が認められる。一方で、このモデルでは、マイルドな病態を再現しているがゆえに、母ラットの胎内で、全ての仔ラットがFGRを呈するとは限らない。そこでFGR仔の成否は出生体重で判定した。临床上用いられるFGR診断基準値は、World Health Organizationが定義する在胎不当過小児(出生体重が該当する在胎週数の標準出生体重と比較して小さい新生児)の診断基準を参考に[6]、胎児体重基準値の10パーセンタイル未満(下位10%未満)とされることが多い。ただし、在胎不当過小児のうち周産期予後が問題となる児の大半は、5パーセンタイル未満(下位5%未満)に分類される。この5パーセンタイルは正規分布集団において、平均-1.64標準偏差に相当する。そこで本研究では、無処置群の平均体重-1.5SD値をFGRモデル基準値として採用した。なお、日本では胎児体重基準値の-1.5SDをFGR診断の目安とすることが推奨されている[7]。

本研究で用いた無処置群の出生体重は、 7.01 ± 0.55 g であり、FGR モデル基準値は 6.18 g と算出された (図 1A)。本研究では、この値を下回る個体を FGR 群として用いた。子宮内血流不全の手術により、出生仔数の 73%がこの基準値を下回り、FGR と判定された (図 1B)。また、対照として用意した偽手術群 (Sham : 開腹と子宮の露出のみで、血管狭窄器具を装着していない群) の出生体重は、 6.87 ± 0.74 g であり、基準値を下回る個体数は 15%にであった (図 1A、B)。Sham 群と子宮内血流不全処置群での体重推移を比較した結果、出生 14 日まで両者に有意差が認められ、その後は Catch up し、有意差は認められなくなった (図 1C、D)。本研究で行った子宮内血流不全処置に伴う低体重は、出生 2 週頃まで維持されると言える。

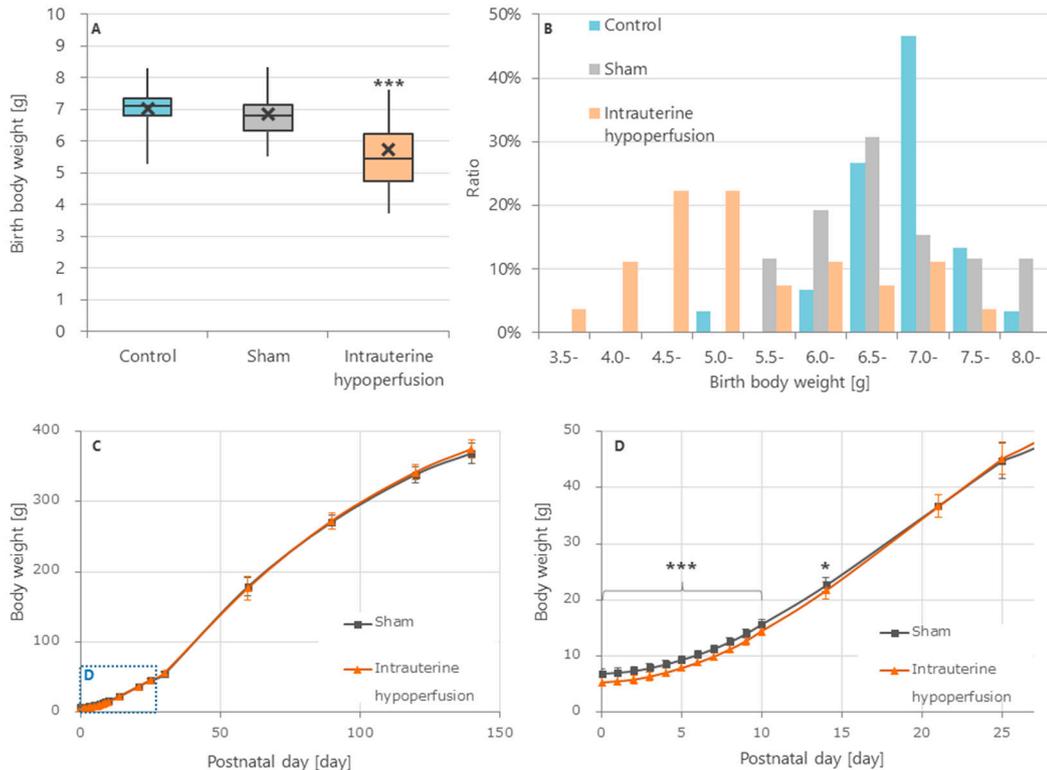


図 1. モデル動物の体重表現型の評価

- 無処置群 (Control)、偽手術群 (Sham)、子宮内血流不全群 (Intrauterine hypoperfusion) の出生体重。子宮内血流不全群では、他の 2 つの群と比較して、有意な出生体重の減少が認められた (***) $p < 0.001$ 、Tukey-Kramer)。
- 各群における出生体重のヒストグラム。無処置群の出生体重の平均値と標準偏差より、FGR モデル基準値を算出した結果、6.18 g と算出された。子宮内血流不全群の出生仔の 73%がこの基準値を下回り、FGR モデルと判定された。
- D) 偽手術群と子宮内血流不全群の体重推移。D は C の一部であり、出生 0 日から 25 日までを拡大した図。出生 14 日まで、子宮内血流不全群で有意な体重低下が認められ、その後は Catch up が確認された (* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ 、Tukey-Kramer,.)。

2. バイオマーカー候補分子の探索

バイオマーカーを探索するため、脳脊髄液中タンパク質の網羅的解析を行った。脳脊髄液は、脳内を循環する組織液であり、その中には脳細胞から分泌された様々な生体分子が存在している。その生体分子の種類や量は、脳の状態に依存するため、脳脊髄液中には脳内の状態を鋭敏に反映するバイオマーカー候補分子が存在すると考えられている [8]。

本研究では、出生 4、5 日目の仔から脳脊髄液を採取し、全タンパク質の存在量を測定することで、タンパク質プロファイルを取得した。定量された 601 種のタンパク質の存在量と仔ラット体重とのスピアマン相関係数なら

びにその相関係数に基づいた p -value と Q -value を算出した。 p -value <0.05 、 Q -value <0.1 を条件に、低体重に伴って発現変動の大きいタンパク質をバイオマーカーの候補分子として選出した。出生 4 日目で 140 種、5 日目で 123 種、計 212 種（重複 51 種）が、出生体重の低下に依存して変動することが確認された（図 2A）。重複 51 種のうち、出生 4 日目と 5 日目ともに同じ変化を維持したものを抽出した結果、15 種類の分子が見出された。その 15 種類の内、Human protein atlas database にて、脳組織で強い発現が確認されている 6 つの分子、OX-2 membrane glycoprotein (CD200)、Alpha-2-macroglobulin (A2m)、Polyubiquitin-B (Ubb)、Neuroserpin (Serpini1)、Ubiquitin thioesterase OTUB1 (Otub1)、ならびに、Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 (Uba1) が、バイオマーカー候補として選出された（図 2B~M）。

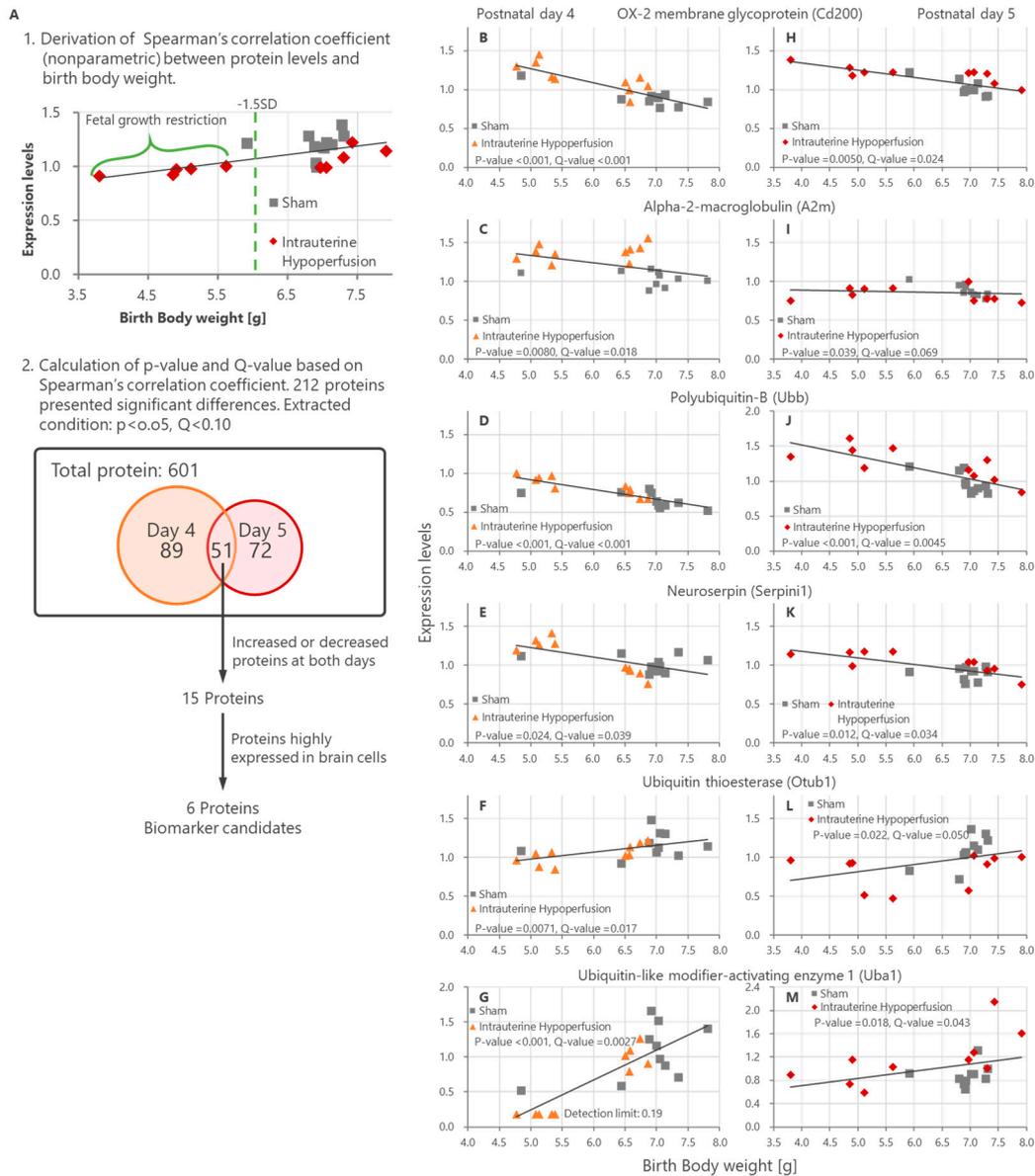


図 2. 脳脊髄液中タンパク質の網羅的解析と抽出されたバイオマーカー候補分子

A) 脳脊髄液中タンパク質プロファイルの解析と抽出条件。出生 4 日目で 140 種、5 日目で 123 種、計 212 種（重複 51 種）が、出生体重低下に比例して変動することが確認された（Spearman's rank correlation coefficient ; $p < 0.05$ 、 $Q < 0.1$ ）。

B~M) 抽出された 6 種類のタンパク質の体重相関性を示したグラフ。出生 4 日目のデータ（B~G）、出生 5 日目のデータ（H~M）。

考 察

本研究は、子宮内血流不全処置により作製した FGR モデルの新生仔ラットから脳脊髄液を採取し、そのタンパク質の網羅的解析を行った初めての研究である。その脳脊髄液中の全タンパク質の出生体重との相関性を評価し、FGR に伴う脳発達異常の早期予測診断指標となりうる、バイオマーカー候補分子を見出した。FGR 児のおよそ半数に、神経発達の遅れが 2 歳時点で確認され、幼児期には神経発達症を発症する [9, 10]。FGR に起因する脳発達異常を早期に捉え、神経学的予後を予測することは、神経可塑性の高い新生児期の早い段階で治療方針の決定を可能にする。そして、治療方針の早期決定は、脳発達が未熟な段階からの適切な投薬や運動療法に取り組むことの実現に貢献し、その治療効果の向上や治療選択の幅を広げることに繋がる。ゆえに、本研究により見出されたバイオマーカー候補分子の脳機能との相関や治療反応性などを臨床的に評価することで、FGR 児の脳発達異常を改善する新たな技術の開発へと発展すると期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、名古屋大学医学部附属病院総合周産期母子医療センターの佐藤義朗准教授、京都女子大学家政学部食物栄養学科の辻雅弘教授、Aix-Marseille University (仏国) の J-Olivier Coq 上席研究員、Oxford University (英国) の Zoltan Molnar 教授である。本研究に関し、貴重な御助言や御助力を頂いたことに厚く御礼申し上げる。

文 献

- 1) Lehner C, Harry A, Pelecanos A, Wilson L, Pink K, Sekar R. The feasibility of a clinical audit tool to investigate stillbirth in Australia - a single centre experience. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2019 Feb;59(1):59-65. doi: 10.1111/ajo.12799. Epub 2018 Mar 23. PMID: 29569709.
- 2) Levine TA, Grunau RE, McAuliffe FM, Pinnamaneni R, Foran A, Alderdice FA. Early childhood neurodevelopment after intrauterine growth restriction: a systematic review. *Pediatrics.* 2015 Jan;135(1):126-41. doi: 10.1542/peds.2014-1143. PMID: 25548332.
- 3) Kitase Y, Sato Y, Arai S, Onoda A, Ueda K, Go S, Mimatsu H, Jabary M, Suzuki T, Ito M, Saito A, Hirakawa A, Mukai T, Nagamura-Inoue T, Takahashi Y, Tsuji M, Hayakawa M. Establishment of a Novel Fetal Growth Restriction Model and Development of a Stem-Cell Therapy Using Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Front Cell Neurosci.* 2020 Jul 28;14:212. doi: 10.3389/fncel.2020.00212. PMID: 32848614; PMCID: PMC7401876.
- 4) Samuelsen GB, Pakkenberg B, Bogdanović N, Gundersen HJ, Larsen JF, Graem N, Laursen H. Severe cell reduction in the future brain cortex in human growth-restricted fetuses and infants. *Am J Obstet Gynecol.* 2007 Jul;197(1):56.e1-7. doi: 10.1016/j.ajog.2007.02.011. PMID: 17618757.
- 5) Leitner Y, Fattal-Valevski A, Geva R, Bassan H, Posner E, Kutai M, Many A, Jaffa AJ, Harel S. Six-year follow-up of children with intrauterine growth retardation: long-term, prospective study. *J Child Neurol.* 2000 Dec;15(12):781-6. doi: 10.1177/088307380001501202. PMID: 11198491.
- 6) American College of Obstetricians and Gynecologists, ACOG Practice bulletin no. 134: fetal growth restriction. *Obstet. Gynecol.*, 121(5), 1122-33, 2013. DOI:10.1097/01.AOG.0000429658.85846.f9

- 7) Kawaguchi R, Matsumoto K, Ishikawa T, Ishitani K, Okagaki R, Ogawa M, Oki T, Ozawa N, Kawasaki K, Kuwabara Y, Koga K, Sato Y, Takai Y, Tanaka K, Tanebe K, Terauchi M, Todo Y, Nose-Ogura S, Noda T, Baba T, Fujii E, Fujii T, Miyazaki H, Yoshino O, Yoshimura K, Maeda T, Kudo Y, Kobayashi H. Guideline for Gynecological Practice in Japan: Japan Society of Obstetrics and Gynecology and Japan Association of Obstetricians and Gynecologists 2020 edition. *J Obstet Gynaecol Res.* 2021 Jan;47(1):5-25. doi: 10.1111/jog.14487. Epub 2020 Nov 4. PMID: 33145837.
- 8) Olsson B, Zetterberg H, Hampel H, Blennow K. Biomarker-based dissection of neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol.* 2011 Dec;95(4):520-34. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.04.006. Epub 2011 Apr 16. PMID: 21524681.
- 9) Lees C, Marlow N, Arabin B, Bilardo CM, Brezinka C, Derks JB, Duvetkot J, Frusca T, Diemert A, Ferrazzi E, Ganzevoort W, Hecher K, Martinelli P, Ostermayer E, Papageorgiou AT, Schlembach D, Schneider KT, Thilaganathan B, Todros T, van Wassenaer-Leemhuis A, Valcamonica A, Visser GH, Wolf H; TRUFFLE Group. Perinatal morbidity and mortality in early-onset fetal growth restriction: cohort outcomes of the trial of randomized umbilical and fetal flow in Europe (TRUFFLE). *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013 Oct;42(4):400-8. doi: 10.1002/uog.13190. PMID: 24078432.
- 10) Baschat AA, Viscardi RM, Hussey-Gardner B, Hashmi N, Harman C. Infant neurodevelopment following fetal growth restriction: relationship with antepartum surveillance parameters. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009 Jan;33(1):44-50. doi: 10.1002/uog.6286. PMID: 19072744.