

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19663

研究課題名(和文) 新生児低酸素性虚血性脳症の新たなバイオマーカーおよび分子療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel biomarker and treatment of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy

研究代表者

赤松 智久 (Akamatsu, Tomohisa)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第二部・流動研究員

研究者番号：10737985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：新生児低酸素性虚血性脳症(以下nHIE)の新たな治療法および新たなバイオマーカー開発のため本研究を行った。

LOX-1の分子機序の解明について、nHIEモデルラットの脳ミクログリアおよび培養ミクログリアにおいて、LOX-1が発現していることを発見した。次に、LOX-1阻害の治療効果の検証について、nHIEモデルラットにおいて、傷害後6時間以内で中和抗体治療が有効であることを見出した。最後に、バイオマーカーとしてのLOX-1の可能性について、LOX-1の血中分子であるsLOX-1がヒトnHIEの重症度判別マーカー、短期予後予測マーカーとして有用であることを証明した。

研究成果の概要(英文)：We had revealed that lectin-like low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) was related to the pathology of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (nHIE), previously. We performed this study to develop novel treatment and biomarker for nHIE. First, we revealed that LOX-1 was expressed in microglia of nHIE model rats and nHIE model primary cultured microglia. Second, we demonstrated anti-LOX-1 neutralization was efficient in 6 hours after the brain injury in nHIE model rats. Third, we demonstrated that the soluble form of LOX-1 level in plasma was useful as the severity staging marker and prognostic marker in human nHIE.

研究分野：新生児神経

キーワード：新生児低酸素性虚血性脳症 LOX-1 ミクログリア バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

新生児低酸素性虚血性脳症(nHIE)は新生児仮死に引続き起こる脳傷害であり、低酸素・虚血による神経細胞死と血液脳関門の破綻による脳浮腫が主要な病態である。nHIEの発症率は0.1-0.6%で、そのうち死亡率は10-60%と高く、生存の約25%に重度の神経学的後遺症を残す。

nHIEの治療は、薬物療法(キセノン、アロプリノール、エリスロポエチン、エダラボン)の有効性が動物実験では報告されているが、様々な問題があり臨床応用には至っていない。一方、中等度から重度のnHIEに対する低体温療法の有効性が報告されている。しかし、新生児における低体温療法には高度な機器や手技、頻回な検査などを必要とし、その施行は一部の高機能医療機関に限られている。さらに、nHIEの重症度判定は臨床所見に基づくSarnatの重症度分類によって判定されているのみで、科学的基盤に基づいたバイオマーカーがない。多くの未来ある新生児の命、脳を守るためには、nHIEの簡便な治療方法、正確なバイオマーカーによる評価法の開発が急務である。

Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1)は、1997年に変性LDLの受容体として同定された(Sawamura et al. Nature 1997)。近年、血管内皮細胞のアポトーシスとその機能不全などを引き起こし、粥状硬化症の形成に関わる増悪因子として注目されている。興味深いのは、この分子の細胞外部分がsoluble form of LOX-1 (sLOX-1)として血中に遊離し、脳梗塞の予測因子、急性冠動脈疾患の急性期マーカーとして臨床応用されつつあることである。

我々は、低体温療法の神経保護作用機序の分子生物学的解明から、LOX-1遺伝子発現の面白い挙動をみつけた。すなわち、LOX-1遺伝子発現はnHIE下で増加し、低体温療法を行なうことで治療効果に比例して発現が抑制されることをみつけた。さらに、nHIE下でLOX-1遺伝子が神経細胞および脳内血管内皮細胞に発現していることを明らかにした。LOX-1が神経細胞および脳内の血管内皮細胞で作用し、病巣を形成したと考えた。そこで、nHIEモデルラットに抗LOX-1中和抗体を投与し、病巣の縮小と脳浮腫の改善、神経細胞のアポトーシスを抑制することを明らかにした。(図1)(Akamatsu et al. Am J Pathol 2014)。

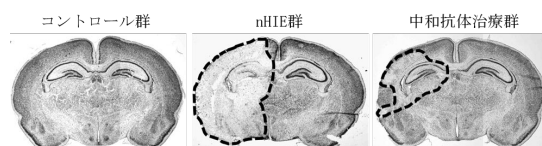


図1：LOX-1中和抗体が梗塞面積を縮小

しかし、これらの分子機序が未解明のままである。これを解決することでLOX-1の治療機序が明らかになるだけでなく、nHIEの診断や重症度判定におけるsLOX-1値のバイオマーカーとしての臨床応用へ発展できる。本研究では、臨床応用にむけた分子機序の解明とバイオマーカーの有効性、および治療法開発を行なう。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究はnHIEにおけるLOX-1の分子機序および治療標的としての可能性を解明し、臨床応用に展開するためにLOX-1阻害の治療効果の検証を行い、バイオマーカーとしてのLOX-1の有用性を検討する。具体的には以下のことを明らかにする。

I. nHIEにおけるLOX-1の分子機序を解明し、治療標的としての可能性を検証する。

a. nHIEモデルラットにおいてタンパクレベルでLOX-1を発現している細胞を同定するとともに抗LOX-1中和抗体が作用した細胞を同定する。

b. nHIEモデルラットにおけるLOX-1活性化からの神経細胞死に至るカスケードを明らかにする。

c. 抗LOX-1中和抗体がnHIEにおいて脳浮腫を軽減するメカニズムを明らかにする。

II. LOX-1阻害の治療効果の検証及び治療法開発を行う。

a. nHIEモデルラットにおいて抗LOX-1中和抗体の投与量、投与時期、投与回数を変化させ、最適な投与方法を検討する。

b. 抗LOX-1中和抗体と低体温療法の併用療法が効果的なものであるか検討する。

III. LOX-1がnHIEにおいてバイオマーカーとなりうるかを検証する。

a. nHIEモデルラットの血中におけるsLOX-1をELISA法にて測定し、脳の病理所見との相関を明らかにする。

b. 多数のnHIE診療実績のある埼玉県立小児医療センターなど協力機関と共同研究のもと、(倫理委員会の承諾および患者家族の同意下)nHIE患者検体のsLOX-1測定を解析する。

3. 研究の方法

すべての研究は、国立精神・神経医療研究センターの倫理委員会の承認を得て行った。

I. nHIEにおけるLOX-1の分子機序を解明し、治療標的としての可能性を検証する。

①nHIEモデルラットと中和抗体治療

nHIEモデルラットをこれまでと同様に作成した(Rice et al. Ann Neurol 1981, Akamatsu et al. Am J Pathol 2014)。すなわち、生後7日齢のSDラットの左総頸動脈を麻酔下に露出、二重結紮を行い、結紮間を切断した。その後、母ラットのもとで120分間休憩した後、120分間8%酸素に暴露することで、片側のHIEを作成した。中和抗体治療群では、低酸

素・虚血負荷直後から 12 時間毎に 60 μ g/kg/dose の抗 LOX-1 中和抗体を腹腔内投与した。コントロール群は無処置とした。

②脳切片の免疫染色

低酸素・虚血負荷後 24 時間、48 時間および 72 時間に脳を取り出し、パラフィンおよび凍結ブロックを作成し、海馬・視床レベルの切片を作成した。2%ウシ血清アルブミンでブロッキングした後、一次抗体としてウサギ抗 Iba1 抗体、ヤギ抗 LOX-1 抗体、マウス抗 GFAP 抗体、マウス抗 NeuN 抗体を用い、4°Cで一晩インキュベートした。二次抗体に蛍光標識抗ウサギ IgG 抗体、抗ヤギ IgG 抗体、抗マウス IgG 抗体を用い、室温で 1 時間インキュベートした後、DAPI にて核染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察を行った。

③抗 LOX-1 中和抗体の作用細胞の同定

抗 LOX-1 中和抗体を蛍光標識キットにて標識し、上記同様に nHIE モデルラットに腹腔内投与し、低酸素・虚血負荷後 1 時間、3 時間、6 時間、24 時間になるべく遮光した環境で凍結切片を作成した。作成した切片は、そのまま蛍光顕微鏡にて観察、または上記同様に Iba1、GFAP、NeuN の染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察した。

④初代培養ミクログリアの精製

生後 0-3 日齢の SD ラットの脳大脳皮質より調整した。無菌的に髄膜を除去した大脳皮質を細かく刻み、0.25%Trypsin で処理した。1,500rpm, 4°Cで 5 分間遠心後、上清を捨て、10%FBS および 100 μ g/ml ペニシリン・ストレプトマイシン混合溶液を含む 4.5%glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培地で細胞を再懸濁後、75cm² フラスコに播種し、mixed glial culture として 1-2 週間の予備培養を行った。ミクログリアとアストロサイトの接着性の差を利用した振盪法によりミクログリアを精製し、以降の実験に用いた。なお、得られたミクログリアは 95%以上 Iba-1 陽性であった。

⑤Oxygen-glucose deprivation (OGD)

精製したミクログリアを 24 時間培養後、細胞の低酸素虚血負荷として OGD を行った。すなわち、Glucose および血清を含まない DMEM に培地を交換し、BIONIX 低酸素培養キットを用いて、37°C、0%酸素として 6 時間培養した。コントロール群として、血清を含まない 4.5%glucose DMEM 培地、通常酸素濃度下においたミクログリアを用いた。コントロール群では血清を含まない 4.5%glucose DMEM 培地で通常酸素濃度下の培養を行った。その後、両群の細胞から染色用切片を作成し、上記同様の免疫染色を行って、解析に使用した。

II. LOX-1 阻害の治療効果の検証及び治療法開発を行う。

上記同様に nHIE モデルラットを作成した。Sham-ope 群では、生後 7 日齢の SD ラットの左総頸動脈を麻酔下に露出して、結紮など行わずにすぐに閉鎖した。低酸素・虚血負荷直

後、3 時間、6 時間、9 時間後から抗 LOX-1 中和抗体を 60 μ g/kg/dose で 12 時間毎に合計 4 回、腹腔内投与し、48 時間後に凍結切片を作成した。海馬・視床レベルにおいて Nissl 染色による梗塞評価およびアポトーシス検出キットを用いたアポトーシス評価を行った。

III. LOX-1 が nHIE においてバイオマーカーとなりうるかを検証する。

①nHIE モデルラットにおける血漿中 sLOX-1 の測定

上記同様に nHIE モデルラットを作成した。低酸素・虚血負荷後 3 時間、6 時間、24 時間に採血を行い、血漿を分離後、enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA)法にて sLOX-1 を測定した。すなわち、固相化された抗 LOX-1 抗体にサンプルを反応させ、抗体と LOX-1 を結合させた後、別のビオチン標識抗 LOX-1 抗体を反応させた。ストレプトアビジン-HRP、発色基質と反応させた後にプレートリーダーによって吸光度を測定した。

②ヒト nHIE の血漿中 sLOX-1 の測定

研究協力機関である埼玉県立小医療センター、東京都立小児総合医療センター、青梅市立総合病院の倫理委員会の承認を得、また、ご両親に文書にて研究内容を説明後、承諾を得て、行った。

上記 3 施設の新生児集中治療室に入院となった在胎 36 週以上、出生体重 1800g 以上の児を対象とした。奇形のある児、染色体および遺伝子の異常、先天性代謝異常症、先天性感染症、先天性心疾患の判明した児は除外した。nHIE の診断基準は National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) の診断基準を用いた。すなわち、1)臍帯血または生後 60 分以内の児血で強いアシドーシス (pH<7 あるいは BE $\geq$ 16)、2) 周産期の急性イベント (胎盤剥離など) +強い新生児仮死 (アプガースコア 10 分値 $\leq$ 5 または蘇生時間 10 分以上)、1)、2)のいずれかを認めた新生児を nHIE と診断した。対照は、nHIE の診断にあてはまらなかった児とした。nHIE の重症度は、修正 Sarnat 分類を用いた。すなわち、意識、自発運動、姿勢、筋緊張、原始反射 (吸吮反射、モロー反射)、自律神経系 (瞳孔反射、心拍) の 6 カテゴリーの神経学的所見をもとに、軽度、中等度、重度に判別した。6 カテゴリーのうち異常が 2 カテゴリー以下であったものを軽度とした。3 カテゴリー以上の異常があったものを中等度から重度とした。異常のあったカテゴリーでの重症度で決めた。

採血は入院時 (生後 6 時間以内)、日齢 1、日齢 2-4、日齢 5-9 に行い、血漿分離後、-80°C で冷凍保存した。冷凍された血漿を当センターに集め、解凍後、上記同様のサンドイッチ ELISA 法にて sLOX-1 の測定を行った。

臨床情報には、周産期情報 (妊娠情報、新生児情報) と入院中から退院時の情報までを利用した。入院中の全身状態の評価には、在院

日数、酸素使用日数、挿管日数、full-feeding (経腸栄養 100ml/kg/day) に達した日齢を用いた。また、短期予後に関しては、筋緊張の低下、難聴、摂食障害、抗けいれん薬を要するけいれんを重度の障害とした。

4. 研究成果

I. nHIE モデルラットを用いた LOX-1 の分子機序の解明について

nHIE モデルラットの皮質、海馬、視床において Iba 陽性細胞に LOX-1 が発現していた。すなわち LOX-1 がミクログリアに発現していることを発見した (図 2)。

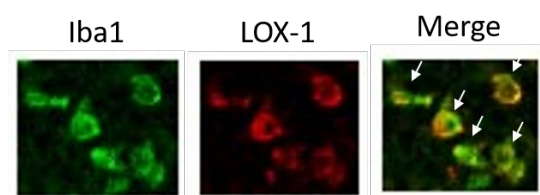


図 2：ミクログリアが LOX-1 を発現

同時に、GFAP 陽性細胞であるアストロサイト、NeuN 陽性細胞である神経細胞では LOX-1 が発現していないことが分かった。LOX-1 がミクログリアに発現していることから、in vivo で抗 LOX-1 中和抗体治療を用いて、LOX-1 がミクログリアの活性、増殖、M1/M2 極性、炎症性物質産生に及ぼす影響を検討中である。一方で、in vitro ではラット初代培養ミクログリアを用いて、OGD で HIE を模し、OGD によりミクログリアでの LOX-1 発現が増加することを確認した。siRNA によって LOX-1 をノックダウンすることで、培養細胞および培地から抽出した RNA およびタンパク質を利用して、in vivo 同様に、LOX-1 がミクログリアの活性、増殖、M1/M2 極性、炎症性物質産生に及ぼす影響を検討中である。

中和抗体の作用する細胞の同定については、2 種の抗体標識キットを利用し、観察した。しかしながら、いずれの方法においても中和抗体に標識した蛍光は観察されなかった。原因としては、ア) 蛍光標識によって抗 LOX-1 抗体の分子量が大きくなり、血液脳関門を通過できなくなった、イ) 蛍光標識が生体内で分解されてしまった、ウ) 蛍光標識によって中和抗体の作用が失われた、などが考えられる。今後、他の標識方法を用いて、生体内での抗 LOX-1 中和抗体の動態、作用細胞を調べられないか検討中である。

II. nHIE モデルラットに対する LOX-1 阻害の治療効果の検証

低酸素・虚血負荷直後、3 時間後、6 時間後に抗 LOX-1 中和抗体の投与を開始した群では、治療を行わなかった群に比べて、梗塞面積が小さく、また、アポトーシス細胞数が少なかった。低酸素・虚血負荷 9 時間後に投与開始した群では、無治療群と同程度の梗塞面積、

アポトーシス細胞数であった。抗 LOX-1 中和抗体治療の therapeutic time-window は 6 時間以内と考える。今後は、LOX-1 ノックアウトマウスを作成し、LOX-1 抑制の nHIE に対する治療効果を検証した後に、マウスにおいて中和抗体治療の可能性を検討する予定である。

III. ヒト nHIE におけるバイオマーカーとしての LOX-1 の可能性

nHIE モデルラットにおいては、無処置コントロール群 (CTL)、sham-ope 群 (Sham) に比べて、低酸素・虚血負荷後 3 時間、6 時間において血漿中 sLOX-1 レベルが有意に高かった (図 3)。

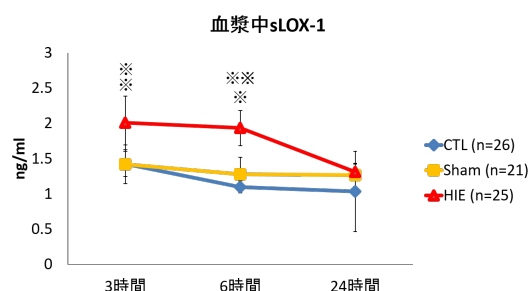


図 3：nHIE モデルラットの血漿中 sLOX-1

研究協力機関から合計 74 例 (コントロール 45 例、軽度 nHIE 6 例、中等度 nHIE 16 例、重度 nHIE 5 例)、124 検体のヒト血漿サンプルを得て、sLOX-1 の測定を行った。生後 6 時間以内の血漿 sLOX-1 はコントロール群で 411pg/ml (中央値)、軽度 nHIE 群で 339pg/ml、中等度 nHIE 群で 924pg/ml、重度 nHIE 群で 1325pg/ml と Sarnat 重症度に応じて上昇していた。コントロール群と中等度 nHIE 群、重度 nHIE 群の間には有意な差が認められた。また、軽度 nHIE 群と重度 nHIE 群の間にも有意な差が認められた。低体温療法の適用となる中等度から重度の nHIE の sLOX-1 レベルは、軽度 nHIE の sLOX-1 レベルよりも有意に高く、sLOX-1 は低体温療法適用の判別マーカーとして有用と思われた。血漿中 sLOX-1 の新生児期の特徴としては、sLOX-1 はコントロール群においても nHIE 各重症度群においても、出生直後が高値であり、経時的に低下し、日齢 2 以降では各群に差がないことが分かった。LOX-1 の発現は、出生 (分娩) ストレスによってある程度、誘発されると考えられた。さらに、生後 6 時間以内の sLOX-1 レベルは入院中の児の状態 (在院日数、酸素使用日数、挿管日数、full feeding になった日齢) と関連していた。nHIE と診断され、低体温療法を行った児の中で、退院時に intact 群と死亡または重度の障害群に分けて生後 6 時間以内の sLOX-1 レベルを比較してみると、死亡ま

たは重度の障害群で有意に高いことが分かった。これらのことから sLOX-1 は、nHIE の予後マーカーとしても有用と思われた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

発表者名: 赤松 智久

発表表題: 新生児低酸素性虚血性脳症の新規バイオマーカーとしての sLOX-1

学会名: 第 54 回日本周産期・新生児医学会学術集会

発表年: 2018 年 7 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 新生児低酸素性虚血性脳症の重症度判定方法と予後予測方法

発明者: 伊藤 雅之、赤松 智久

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 2018-070037

出願年月日: 2018 年 3 月 30 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

赤松 智久 (Akamatsu, Tomohisa)

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・流動研究員

研究者番号: 10734986

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

伊藤 雅之 (Itoh, Masayuki)

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

青木 良則 (Aoki, Yoshinori)

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・研究生

岡 明 (Oka, Akira)

東京大学医学部附属病院・小児科・教授

高橋 尚人 (Takahashi, Naoto)

東京大学医学部附属病院・小児科・教授

清水 正樹 (Shimizu, Masaki)

埼玉県立小医療センター・新生児科・科長兼部長

近藤 昌敏 (Kondo, Masatoshi)

東京都立小児総合医療センター・新生児科・部長

横山 美貴 (Yokoyama, Yoshiki)

青梅市立総合病院・小児科・部長