

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15693

研究課題名（和文）新生児低酸素性虚血性脳症におけるLOX-1の分子動態の解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）The elucidating the biomolecular role of LOX-1 and the development of novel treatment in neonatal HIE

研究代表者

赤松 智久（Akamatsu, Tomohisa）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・センター病院・小児科 医師

研究者番号：10737985

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：新生児低酸素性虚血性脳症（HIE）という新生児の重度な脳症の動物モデルを使い、以下のことを明らかにした。HIEの病態にLOX-1という物質が関与していることは以前に報告した。本研究では、HIEにおいて神経炎症を惹起するミクログリアという脳細胞の増殖、活性化にLOX-1の活性化が関与していることを明らかにした。さらに、ヒトHIEの脳標本を用いて、実際にヒトのHIEのミクログリアにLOX-1が発現していることを明らかにした。このことは、抗LOX-1治療が臨床において有用である可能性を示唆する。また、その研究過程において、ミクログリアの活性化を顕微鏡写真で形態学的に評価する方法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児低酸素性虚血性脳症（HIE）は、中等度以上の場合、治療を行っても30%が死亡、30%に神経学的後遺症を残す、予後不良の疾患である。研究者は、LOX-1がHIEの病態に関与しており、抗LOX-1治療が動物モデルで有効であることはすでに報告していた。さらに今回、脳内での具体的なLOX-1の役割を解明し、ヒトのHIE脳においてもLOX-1が発現していること解明したことで、抗LOX-1治療の臨床応用の可能性が広がった。将来ある、新生児の脳を守ることは少子化の社会にとって非常に重要なことと考える。また、ミクログリアの活性化の新たな評価方法を提唱したことは、今後の神経研究に貢献すると考える。

研究成果の概要（英文）：We previously reported that LOX-1 was related to neonatal HIE, using the rat HIE model. In this study, we revealed that LOX-1 was expressed in microglia and that the activation of LOX-1 was related to the proliferation and activation of microglia in HIE. Furthermore, we disclosed that LOX-1 was expressed in microglia of human HIE brain. These indicate that anti-LOX-1 treatment can be a novel treatment of neonatal HIE. In this study, we developed a novel method that assays the microglial activity morphologically.

研究分野：新生児学

キーワード：低酸素性虚血性脳症 新生児 LOX-1 ミクログリア 新規治療法

## 1. 研究開始当初の背景

新生児低酸素性虚血性脳症 (neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy 以下 nHIE) は新生児仮死に引き続いて生じる脳傷害であり、その病態には神経炎症が深く関わっている。低体温療法を行っても中等度から重度の nHIE では死亡率が 30% であり、生存の 30% に神経学的後遺症 (脳性麻痺など) が生じている (N Engl J Med 2005)。低体温療法だけでは治療効果が不十分であり、nHIE の病態のさらなる解明と新たな治療法が求められている。

nHIE における神経炎症では、過度に活性化されたミクログリアが神経細胞傷害や血液脳関門の破綻を促進し、脳傷害を引き起こす。ミクログリアは中枢神経系の免疫担当細胞であり、活性化することで増殖し、機能および形態変化 (平常時: ramified 型、活性化時: amoeboid 型) をきたす。活性化ミクログリアには、M1 と M2 の 2 種がある。前者は炎症性サイトカインや ROS などを産生し、細胞傷害性に働き、後者は組織修復や神経再生を促進し、細胞保護性に働く。

Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) は変性 LDL の受容体で、主に血管内皮細胞やマクロファージに発現している。血管炎において様々な炎症性サイトカインや酸化ストレスなどによって発現と活性が高まり、細胞傷害性に働くことが知られている。

我々は nHIE モデルラットにおいて、LOX-1 の発現増加が脳傷害に関連し、LOX-1 活性の抑制が神経細胞死と脳浮腫を軽減することを発見した (Am J Pathol 2014)。さらに、nHIE モデルラットの脳の活性化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 (未発表)。これまでに、発達期における脳内ミクログリアでの LOX-1 発現は報告がなく、nHIE におけるミクログリアでの LOX-1 の働きは不明である。しかしながら、LOX-1 はマクロファージでの発現が確認されており、ミクログリアとマクロファージはその起源が同じであり、機能が共通する部分が多い。また、M1 ミクログリアの産物である ROS、MCP-1、MMP といった炎症促進性物質は、血管内皮細胞において LOX-1 活性によっても産生される。D. Zhang らが *in vitro* 成人の神経慢性炎症モデルにおいて、ミクログリアの LOX-1 発現を抑制することにより、IL-1、TNF- $\alpha$ 、iNOS の産生が減少し、IL-10 の産生が増加することを報告している (Neurochem Int 2012)。これらのことから、ミクログリアにおいて LOX-1 がその活性化、M1 への移行、または M1 ミクログリアにおける細胞傷害性機能に関与していることが予想される。

## 2. 研究の目的

nHIE の病態においてミクログリア発現の LOX-1 に注目した報告はなく、また、これまでの nHIE の治療研究は、神経細胞のアポトーシスを直接防ぐ薬剤の開発が主流であった。我々は、LOX-1 阻害が低体温療法の作用機序の一つであることを発見し、LOX-1 阻害を nHIE の新たな治療法として提案している。これは、臨床的に有効性の示されている唯一の治療法である低体温療法の作用機序を利用していることから、臨床的に有効性が十分に期待される。本研究は、nHIE におけるミクログリア発現 LOX-1 にスポットをあて、神経細胞のアポトーシスを引き起こす原因となる神経炎症のメカニズムを解明し、さらにそれを抑制する新たな治療法を開発を試みるものである。

本研究では、まず始めに nHIE モデルラットを用いて、ミクログリアの活性および M1/M2 極性に LOX-1 が関与していることを明らかにする。次に、初代培養ミクログリア nHIE モデルを用いて、ミクログリアにおける LOX-1 活性化のシグナル経路を同定し、経路上の分子に対する阻害剤を用いてミクログリア活性の抑制効果を検討する。最後に、*in vitro* で効果のあった阻害剤を nHIE モデルラットに投与し、抗炎症治療の効果を *in vivo* で確認する。

## 3. 研究の方法

### 1. nHIE モデルラットにおけるミクログリア活性と LOX-1 発現の関連を証明

これまでと同様に、生後 7 日齢の SD ラットを用い、麻酔下に左総頸動脈を結紮・切断し、8% 低酸素に 120 分間暴露することで nHIE モデルラットとした。ラットをコントロール (無処置) 群、nHIE 群に分けた。ミクログリア活性は HI 負荷後 72 時間以内では、海馬で顕著であるため (CNS Neurol Disord Drug Targets 2013)、海馬において評価を行った。HI 負荷 24、48、72 時間後に脳を取り出し、海馬・視床レベルの脳凍結切片の作成および海馬からの RNA 抽出を行った。切片の梗塞側海馬全体において、抗 LOX-1 抗体、抗 Iba1 抗体 (ミクログリアマーカー)、抗 iNOS 抗体 (M1 マーカー)、抗 Arg1 抗体 (M2 マーカー) および抗 Ki67 抗体 (増殖マーカー) を用いて以下の免疫組織学的検討を行った。ミクログリアの活性化は ramified から amoeboid への形態変化で評価した。抽出した RNA を用い、定量 PCR によって M1/M2 マーカーの定量を行った。

免疫染色により、ミクログリア活性 (amoeboid ミクログリア数/総ミクログリア数)、ミクログリア増殖 (Ki67 陽性ミクログリア数/総細胞数) および M1/M2 極性 (iNOS 陽性ミクログリア数/Arg1 陽性ミクログリア数) を評価し、nHIE におけるミクログリア活性・増殖と M1/M2 極性を検証した。

免疫染色により、LOX-1 発現量 (LOX-1 発現ミクログリア数/総細胞数) がミクログリア活性・増殖および M1/M2 極性と相関することを検証した。

定量 PCR により上記 - を定量的に確認し、さらにミクログリア活性による炎症性サイトカイン、ケモカイン (IL-1、IL-6、TNF-、MCP-1) の増加を定量評価した。

## 2. 培養ミクログリアにおける LOX-1 分子動態の解明と抗炎症療法の検討

(まだ研究の中途段階である。)

ラットの初代培養ミクログリアおよび海馬神経細胞を用いて行った。予備実験(初代培養ミクログリアの活性化能の確認)として、ミクログリアに LPS (100ng/ml) + INF- (20ng/ml) を加え M1 へ、IL-4 (20ng/ml) を加え M2 へ誘導し、ミクログリアの形態変化、LOX-1 発現および iNOS、Arg1 の発現を免疫染色で確認した。酸素グルコース欠乏負荷 (oxygen-glucose deprivation : OGD) は glucose-free 培地で 5%CO<sub>2</sub>、95%N<sub>2</sub>、60 分で行い、nHIE を再現した。まず、生体内に近い OGD ミクログリアを模索した。

ミクログリアに OGD を施行した。(ミクログリア単独での反応の検討)

ミクログリアの活性・増殖および LOX-1 の発現に関して in vivo 同様に各種抗体を用いて免疫組織学的評価を行った。

無処置、OGD および OGD+抗 LOX-1 中和抗体投与の 3 群のミクログリアから mRNA を抽出し、マイクロアレイにて網羅的に遺伝子発現解析を行った。

同様の 3 群の培地からタンパク質を抽出しサイトカインアレイによってミクログリアからの放出サイトカインを網羅的に解析した。

マイクロアレイおよびサイトカインアレイの結果から、LOX-1 活性からサイトカイン放出までの経路上にあるタンパク質を予測した。各種阻害剤および siRNA transfection を用い、ウェスタンブロット法によって経路の活性変化を解析することでミクログリアでの LOX-1 分子動態を同定する。同時に、各種阻害剤によるミクログリアの活性抑制効果を比較した。

## 3. nHIE モデルラットにおける新たな抗炎症療法の試行

(行えていない。)

## 4. 研究成果

我々は、nHIE モデルラットを作成し、LOX-1 が確かにミクログリアに発現していることを再確認した。さらに、抗 LOX-1 中和抗体治療を行うことで、ミクログリアの形態学的活性が抑制されることを証明した。また、抗 LOX-1 治療を行うことにより、Ki-67 を発現しているミクログリアの減少、ミクログリア自体の減少を確認した。また、傷害された海馬から抽出した mRNA をもちいて定量 PCR を用いることで、抗 LOX-1 治療が nHIE において M1 ミクログリア由来のサイトカイン・ケモカインを優位に抑制することを証明した。すなわち、nHIE において、抗 LOX-1 治療はミクログリアの活性・増殖を抑制することを証明した。

さらに、ヒトの nHIE 脳切片において、LOX-1 が活性化ミクログリアに発現していることを確認した。

以上のことから、LOX-1 は nHIE において、ミクログリアの活性・増殖に関連しており、その阻害が nHIE における神経炎症抑制作用を有すると考える。また、ヒトの nHIE でも LOX-1 が動物モデルと同様の発現をしていることから、将来的に nHIE に対する新規治療法としての抗 LOX-1 治療の臨床導入も可能と考える。

また、我々は本研究において、ミクログリアの周囲長、面積などを用いた、新たな形態学的評価方法を提示した。

Akamatsu T, Sugiyama T, Oshima T, Aoki Y, Mizukami A, Goishi K, Shichino H, Kato N, Takahashi N, Goto YI, Oka A, Itoh M.

Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1eRelated Microglial Activation in Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy.Morphologic Consideration.

Am J Pathol .2021;191(7):1303-1313.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Akamatsu Tomohisa, Sugiyama Takehiro, Oshima Takuya, Aoki Yoshinori, Mizukami Ayumi, Goishi Keiji, Shichino Hiroyuki, Kato Norihiro, Takahashi Naoto, Goto Yu-ichi, Oka Akira, Itoh Masayuki	4. 巻 191
2. 論文標題 Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1?Related Microglial Activation in Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 1303 ~ 1313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2021.04.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 赤松智久, 五石圭司, 七野浩之, 高橋尚人, 岡明, 伊藤雅之
2. 発表標題 新生児低酸素性虚血性脳症においてLOX-1がミクログリアの活性化に関与している
3. 学会等名 第57回日本周産期・新生児医学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------