

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16922

研究課題名(和文) ファージディスプレイ法を用いた新生児低酸素性虚血性脳症に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel treatment for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy using phage display method

研究代表者

樋口 明日香 (Higuchi, Asuka)

滋賀医科大学・医学部・客員助教

研究者番号：90613480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：新生児低酸素性虚血性脳症の新規治療法の開発を目指し、ファージディスプレイ法を用いて、炎症活性を有するM1ミクログリアに選択的に結合するペプチド(MG1)に、アポトーシスを誘導するペプチド(KLA)を結合させ、治療用ペプチド(MG1-KLA)を作成し、治療効果の検討を行った。In vitroにおいて、MG1-KLAがM1ミクログリア選択的にアポトーシスを誘導することを確認できた。HIEモデルマウス作成時に、温度を自動調節可能な低酸素チャンパーを使用することで、0.5 というわずかな環境温度の変化で、HIEの重症度を任意に作成できることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HIEの新規治療法開発を目指し、炎症活性を有するM1ミクログリアを治療標的とした研究を行った。In vitroでの治療用ペプチドによる治療効果を確認できたので、今後はHIEマウスにペプチドを投与し、治療効果の検討を行っていく。HIEマウスは重症度にばらつきが大きいとされるが、我々のモデルでは、0.5 というわずかな環境温度変化とHIEの重症度の間に相関を認め、今後の本領域における研究の発展の基礎を築くことができた。

研究成果の概要(英文)： To develop a novel therapeutic approach for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy (HIE), we have created a therapeutic peptide (MG1-KLA) by binding a peptide that selectively binds to M1 microglia with inflammatory activity (MG1) to a peptide that induces apoptosis (KLA) using a phage display method and examined its therapeutic effect. In vitro, we were able to confirm that MG1-KLA selectively induces M1 microglia to apoptosis. By using a hypoxic chamber with auto-regulated temperature during the creation of HIE model mice, we found that even a small change of 0.5 produced a significant difference in pathology and behavior in a neonatal mouse model of HI brain injury. Furthermore, there was a correlation between ambient temperature and microglial accumulation.

研究分野：産婦人科

キーワード：新生児低酸素性虚血性脳症 脳性麻痺

1. 研究開始当初の背景

周産期医療の向上にもかかわらず、過去 60 年間脳性麻痺の発症頻度は変化していない。脳性麻痺の原因の半数を占めるのが、新生児低酸素性虚血性脳症 (Hypoxic Ischemic encephalopathy; HIE) であり、子宮内もしくは分娩時の低酸素環境などによって引き起こされる。新生児 HIE には奏効率の高い治療法が確立されておらず、真に有用な新たな治療法の確立が期待されている。

HIE の発症機序には、強い炎症が関与しており、その中心的役割を果たすのがマイクログリアと呼ばれる免疫担当細胞である。通常マイクログリアは胎生期から脳組織内に存在し、神経細胞のモニタリングを行い、シナプスの刈込み (pruning) や精練 (refinement) など神経の発達に寄与し、マクロファージと同様の免疫担当細胞として異物やアポトーシスした細胞を除去する作用を有する。しかし、HIE のように血液脳関門が破壊されるような急性の強いストレスが起きると、マイクログリアはその形態を変化させながら活性化する。一般的に、炎症性サイトカインを放出する M1 タイプと抗炎症サイトカインを放出する M2 タイプとに分類される。M1 と M2 のどちらが HIE の炎症に強く寄与しているのかは明らかにはなっていない。

2. 研究の目的

本研究の問いとは、炎症性サイトカインを産生し神経障害を誘発する M1 マイクログリアを、直接的にアポトーシスへ誘導を行うことで、新生児 HIE に対してより効果的な治療法の確立ができないか、ということである。

近年注目されているファージディスプレイ法を用い、M1 マイクログリアに選択的に結合するペプチドを同定し、アポトーシスを誘導する KLA ペプチドを結合させることで、治療用ペプチドを創出する。このペプチドを用いて、活性化した M1 マイクログリアを細胞死へと誘導させ、新生児 HIE における神経障害を防ぎ、新規治療法の開発を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

HIE モデルマウスの作成

まず、HIE のマウスモデルの作成を行った。Rice-Vannucci 法に基づき、C57BL/6J の生後 10 日目の新生仔マウスをイソフルレンによる全身麻酔下に、左総頸動脈を迷走神経より単離し、バイポーラー電気メスにて焼灼し、血流を遮断。1 時間母獣に戻し、脱水補正した後に、10%酸素濃度の低酸素チャンバーに 50 分間おくことで、HIE モデルを作成した (図 1)。

この HIE モデルマウスを用いて、低酸素曝露時の環境温度と HIE の重症度、マイクログリアの集積性との相関性に関する検討を行った。

治療用ペプチドの in vitro での効果

治療用ペプチドに関しては、ファージディスプレイ法を用い、M1 マイクログリアに選択的に結合するペプチド配列 (MG1) が同定されていた。この配列にアポトーシスを誘導する KLA ペプチドを結合させることで、治療用ペプチド (MG1-KLA) を作成した (図 2)。KLA はミトコンドリア膜を破壊することで、アポトーシスを誘導するとされており、抗腫瘍研究などに用いられている。

治療用ペプチドの効果確認のため、in vitro での実験を行った。新生仔マウス脳からのマイクログリアの初代培養を行い、LPS 負荷により M1 マイクログリアへ分化誘導し、治療用ペプチドとコントロールペプチド投与による生細胞数の変化を、WST-8 アッセイにより比較した。また、アポトーシスの効果を確認するため、Annexin-V アッセイを行った。

4. 研究成果

HIE モデルマウスの作成

C57BL/6J の新生仔マウスの左総頸動脈の血流を遮断した上で、50 分間の低酸素 (10%酸素) 曝露を行い、HIE モデルマウスを作成した。本モデル作成時に、温度を自動調節可能な低酸素チャンバーを使用し、低酸素チャンバーの温度設定を 36.0、36.5、37.0 とすると、患側では健側に比べ、線条体で 63%、37%、34%、海馬で 34%、12%、7% と、有意に組織の萎縮を認めた (図 3)。さらに、環境温度が高温となるほど、運動機能障害、高次脳機能障害は重度となり、患側へのマイクログリアの集積も増加した (図 4)。この検討により、0.5 というわずかな環境温度変化と HIE の重症度の間に相関を認め、その背景にはマイクログリアの活性化が関与していることが明らかとなった。0.5 というわずかな環境温度の変化で、HIE の重症度を任意に

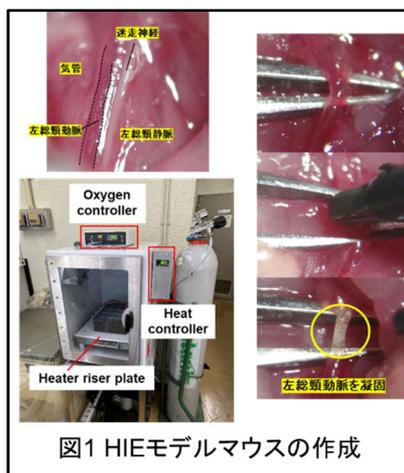


図1 HIEモデルマウスの作成

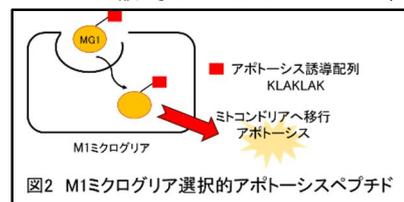


図2 M1マイクログリア選択的アポトーシスペプチド

作成できることを見出した。本知見は重症度にばらつきが大きい本モデルに対して、温度を自動的に一定にすることができる低酸素チャンバーが有効であることを示した。この研究成果には新規性があり、Frontiers in Pediatrics に誌上発表し、今後の本領域における研究の発展の基礎を築くことができた。

本研究成果は、Zen R, Terashima T, Tsuji S, et al. Ambient temperature is correlated with the severity of neonatal hypoxic-ischemic brain injury via microglial accumulation in mice. *Frontiers in Pediatrics*; 10: 883556, DOI: 10.3389/fped.2022.883556, 2022. に発表した。

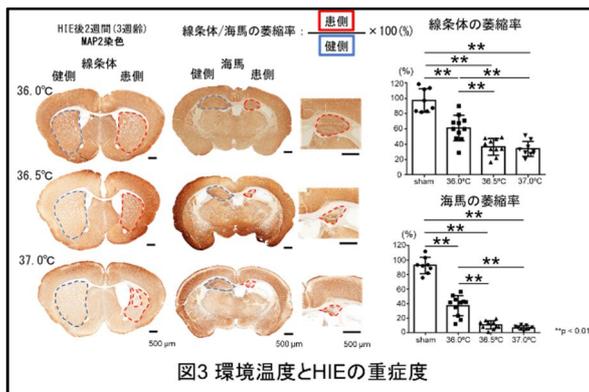


図3 環境温度とHIEの重症度

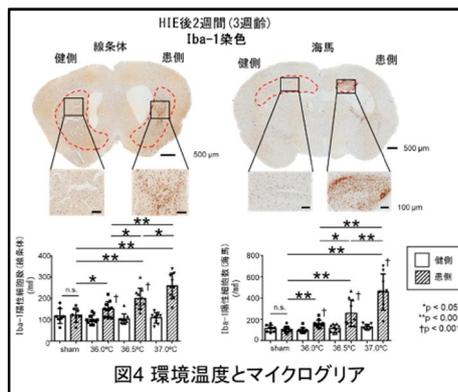


図4 環境温度とマイクログリア

治療用ペプチドの in vitro での効果

ファージディスプレイ法を用いて M1 ミクログリアに選択的に結合するペプチド (MG1) を開発し、さらにアポトーシスを誘導する治療用ペプチド (KLA) を結合させ、治療用ペプチド (MG1-KLA) を作成した。

MG1-KLA の有効性についてはまず in vitro にて検証した。新生仔マウス脳からのマイクログリアの初代培養を行い、M1 ミクログリアのアポトーシス効果を検討した。WST-8 アッセイでは、M1 ミクログリア選択的に生細胞数が濃度依存性に減少することを確認した(図 5)。Annexin-V アッセイでは、M1 ミクログリアの 24%がアポトーシスへと誘導されており、治療用ペプチドが M1 ミクログリア選択的にアポトーシスに誘導することが確認できた(図 6)。

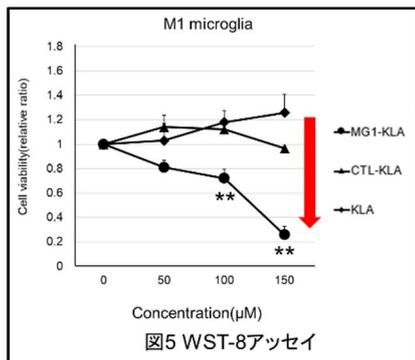


図5 WST-8アッセイ

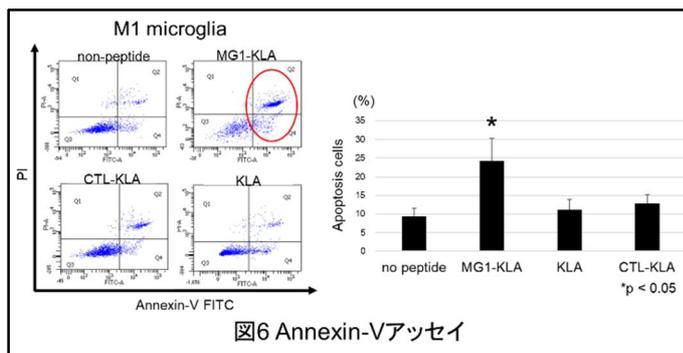


図6 Annexin-Vアッセイ

今後は、MG1-KLA ペプチドを HIE モデルマウスへ投与し、in vivo において、神経細胞障害をもたらす M1 ミクログリアを選択的に阻害したいと考えている。M1 ミクログリアの炎症性サイトカインによる神経細胞障害を抑制し、神経保護作用をもつ M2 ミクログリアを温存できるのではないかと考えており、HIE による脳障害を改善する新規治療法となることが期待できる。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Zen Rika, Terashima Tomoya, Tsuji Shunichiro, Katagi Miwako, Ohashi Natsuko, Nobuta Yuri, Higuchi Asuka, Kanai Hirohiko, Murakami Takashi, Kojima Hideto	4. 巻 10
2. 論文標題 Ambient Temperature Is Correlated With the Severity of Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury via Microglial Accumulation in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pediatrics	6. 最初と最後の頁 883556
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fped.2022.883556	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------