

令和 5 年 5 月 26 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：20K18165

研究課題名（和文）ナノ粒子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 nanoparticles

研究代表者

信田 侑里（Nobuta, Yuri）

滋賀医科大学・医学部・医員

研究者番号：60823896

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：ポリグリセロールで表面コーティングしたナノ粒子が活性酸素種を消去する効果があることは本研究開始前に実証済みであったが、さらに合成方法の改良を行った。具体的にはポリグリセロールのコーティング層を二重にしてナノ粒子にさらに強力な活性酸素種除去能を持たせることに成功した。次に、マウスの新生児低酸素性虚血性脳症モデルに対して、ポリグリセロールで表面コーティングしたナノ粒子を血管内投与することで、脳障害および運動機能障害が軽減されるかについて検討を開始した。現在、上記の動物実験を継続中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内もしくは分娩時の低酸素環境によって引き起こされる新生児低酸素性虚血性脳症は、脳性麻痺などの中枢神経障害の原因となり、周産期医療における最も重篤な疾患のひとつであるが、現在、治療効果が確認されているのは脳低温療法のみで、それも新生児HIEの発症率を11%低下させるに留まる。本研究において新規に開発したナノ粒子は新生児低酸素性虚血性脳症の病態の鍵となる活性酸素種を強力に除去することができる。本ナノ粒子を用いた治療法を確立できれば、過去60年低下しない脳性麻痺の発症率を下げる事が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The effectiveness of nanoparticles coated with polyglycerol in scavenging reactive oxygen species had already been demonstrated prior to the start of this study. In this study, the nanoparticles were coated with a double layer of polyglycerol to give them even stronger ROS scavenging ability. We have begun to examine whether intravascular administration of the nanoparticles in a neonatal mouse model of hypoxic-ischemic encephalopathy alleviates brain damage and motor dysfunction. The above animal experiments are currently ongoing.

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 ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

新生児低酸素性虚血性脳症 (Hypoxic Ischemic Encephalopathy; 以下、HIE) は分娩時における新生児仮死や急性呼吸循環不全などに起因し、脳性麻痺、てんかん、精神運動発達障害など不可逆的な中枢神経障害を引き起こす重篤な疾患である。頻度は正常産児の 1000 出生あたり 1.8~6.7 の割合で、重症・死亡例は出生 1000 に対して 0.5~1.0 の割合で発生する。(Lee AC, et al. *Pediatric Res Suppl* 1; 50-72, 2013)

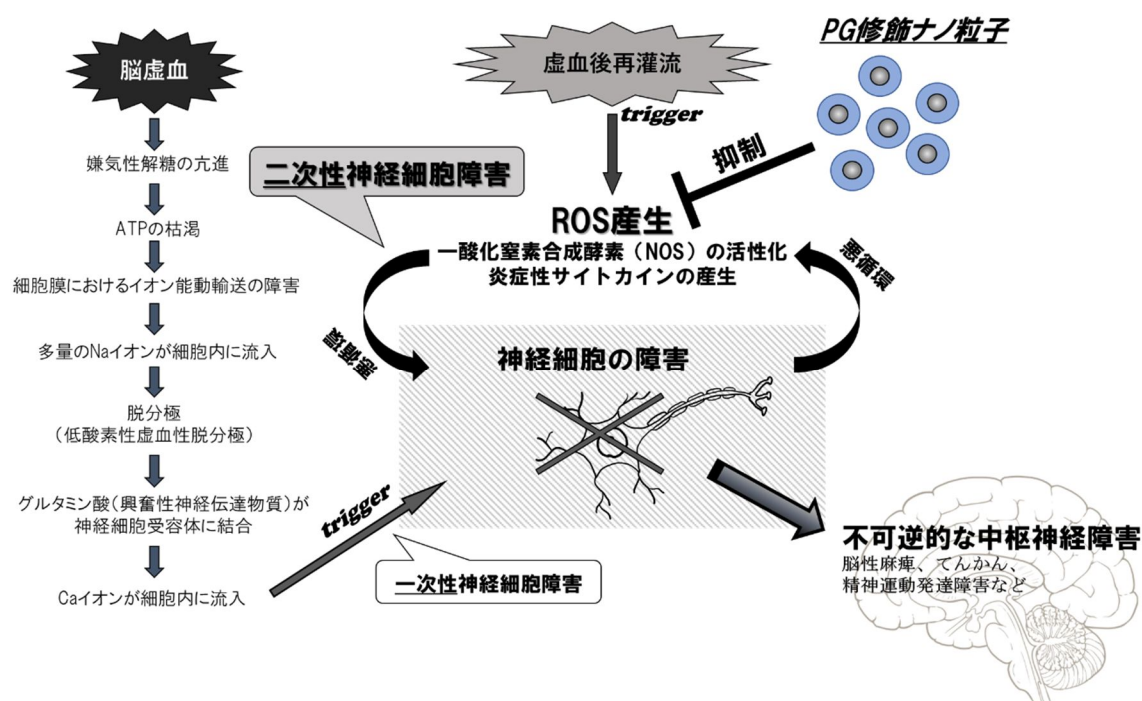
HIE の病態は以下の一次性神経細胞障害および二次性神経細胞障害によって構成される。分娩時に脳が低酸素状態にさらされると、神経細胞の低酸素性虚血性脱分極に続いて神経細胞内への Ca イオンの流入が起こり、神経細胞の細胞膜の障害を引き起こす(一次性神経細胞障害)。一次性神経細胞障害と虚血後の再灌流によって ROS や炎症性サイトカインが産生され、神経細胞障害がさらに進行する(二次性神経細胞障害)。

出生前後 5 - 10 分の低酸素・虚血による一次性神経細胞障害に関しては、受傷起点となるので治療介入は難しく、胎児の低酸素状態の評価と適切な分娩時期の判断、分娩管理といった臨床上の管理・介入によって脳が低酸素に曝される時間を短縮し、神経損傷を低減するしかない。二次性神経細胞障害は、一次性神経細胞障害および虚血後再灌流を引き金として、出生後数時間から数日にかけて徐々に進行するが、この二次性神経細胞障害こそが脳神経の恒久的な障害を引き起こし、神経学的予後を不良なものとしている。二次的神経細胞障害を抑える治療として、現在効果が確認されているのは脳低温療法のみであるが、低体温療法の脳保護作用に関わる分子機序は明確にはわかっておらず、新生児 HIE の発症率を 11%低下させるに留まる(Edwards AD, et al. *BMJ* 340; c363, 2010)。

脳組織の虚血・再灌流後に大量に産生される活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : 以下、ROS) が二次性神経細胞障害の主たる原因であることが分かっており、新生児 HIE の急性期において、この ROS の発生を抑制、あるいは発生した ROS を速やかに消去することができれば、二次性神経細胞障害を防ぎ、神経学的予後を改善することができると考えられる。

2. 研究の目的

申請者は、ポリグリセロール (PG) で表面をコーティング (表面修飾) したナノ粒子が強力なフリーラジカル除去剤として機能することを発見した。そこで、フリーラジカルの発生が病態に深く関与している、HIE の治療薬として PG 修飾ナノ粒子が応用できるのではないかと考えた。本研究の目的は、PG 修飾ナノ粒子をマウス新生児 HIE モデルに急性期に投与することで、不可逆的な中枢神経障害への進行を阻止し、神経学的予後の改善が得られるか、について検証することである。



2. 研究の方法

PG 修飾ナノ粒子の合成法の改良

超常磁性酸化鉄ナノ粒子の周囲をポリグリセロールでコーティングしたナノ粒子が高いフリーラジカル除去能を持つことは、本研究開始前に確認していた。In vivo 実験に先立ち、より高いフリーラジカル除去作用を持たせるべく、ナノ粒子の合成法の改良を行った。従来は、超常磁性鉄ナノ粒子 (SPION) をグリシドールに分散させて加熱することで、SPION の表面をポリグリセロール (PG) でコーティングした SPION-PG を得ていた。表面の PG 層が厚いほど、生体内での分散性が高く、血中投与した際の病変への集積性に優れること、フリーラジカル除去作用が増強することなどが期待されることから、PG 層をより厚くすることに着眼し、下記の如く合成法を改良した。

- SPION をグリシドールに分散させ、140 20 時間加温し、SPION-PG を得た。
- SPION-PG を精製後、無水コハク酸を反応させてカルボキシル基を導入し、SPION-PG-COOH とした。
- SPION-PG-COOH を精製後、グリシドールに分散させ、140 20 時間加温し、SPION-PG-COO-PG を得た。

HIE マウスモデルの作製

マウスでは生後 9、10 日目が、ヒトの正期産に相当する。そこで、C57BL/6 の生後 10 日目 (P10) の新生児マウスに Rice-Vannucci 法を施行し HIE モデルを作成する。新生児マウスをイソフルレンの全身麻酔下に、左頸動脈を迷走神経より単離し、バイポーラ電気メス 8W にて凝固し、血流を遮断する。1 時間母獣に返し哺乳することで脱水を補正した後、36 に加温した低酸素チャンパー (10 % 酸素濃度) で 50 分間、低酸素状態とする。その後母獣に返し、経過観察とする。また、左総頸動脈の単離は行わず、電気凝固しない Sham 群を設定する。

MRI を用いた HIE マウスモデルの脳評価のための撮像条件の検討

仔マウスの小さな脳に対して、脳萎縮についての検討に足る精細な画像を得るために、で作成した HIE マウスモデルを用いて撮像条件の検討を行った。

低酸素処置から 48 時間後、7 日後、14 日後にマウスを 3 種混合麻酔薬で不動化し 4.7T MRI を用いて頭部の撮像を行った。

PG 修飾ナノ粒子を HIE マウスモデルに投与し短期的予後について検討

投与方法は、生理食塩水中に分散させた PG 修飾ナノ粒子を腹腔内に投与する。投与のタイミングは低酸素チャンパーから取り出した直後とする。

の手順で作成した HIE 群および Sham 群にそれぞれ PG 修飾ナノ粒子投与群、生理食塩水投与群を設定し 4 群における検討を行う。先行研究を鑑み一群を $n = 10-15$ とする。また HIE の障害に性差が指摘されており、男児は重症になりやすい。そこで、性差による影響を除くために男児と女児を分けて本研究を実施することで性差による評価のバイアスを除くこととする。

低酸素処置から 48 時間後および 14 日後に 3 種混合麻酔薬腹腔内投与にてマウスを不動化し、4.7T MRI で頭部を撮像した。

現在、で確立した撮像条件にて HIE モデルマウスの撮像を継続して行っている。

4. 研究成果

ナノ粒子のフリーラジカル除去能を増強

前述の手法で得られた合成ナノ粒子 SPION-PG-COOH-PG は、PG 末端に導入されたカルボキシル基を起点としてグリシドールが開環重合し、新たな PG 層を形成していることが FTIR スペクトラムで確認された。(図1) SPION-PG-COOH-PG の流体力学的径は約 45nm でばらつきは小さく、(SPION-PG の流体力学的径は約 20nm)、水に対して良好な分散性を示した。SPION の径が約 8nm であることから、PG 層の厚みは約 6nm から約 18nm に増加し、約 3 倍になったことが分かる。(図2) SPION-PG-COOH-PG のフリーラジカル除去作用について、APF を用いた検討を行ったところ、SPION-PG と比較して、約 2 倍のフリーラジカル除去作用があることが分かった。(図3) これは PG 層が厚くなったことによりナノ粒子の表面積が大きくなり、PG 末端の水酸基の数が増加したためと考えられる。

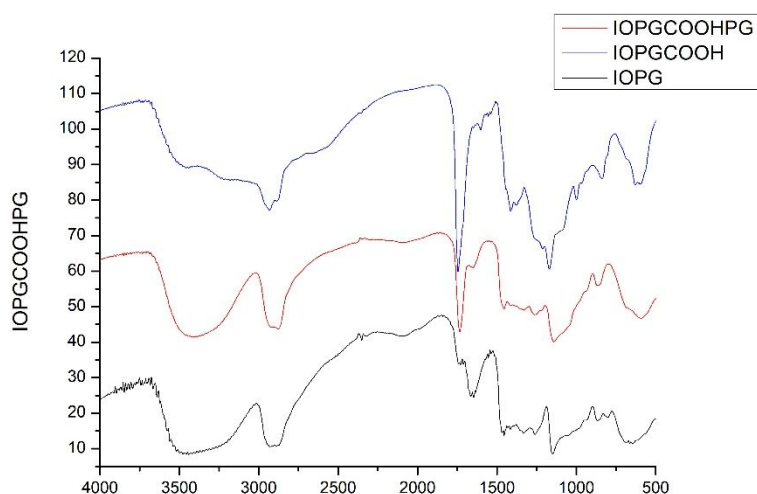
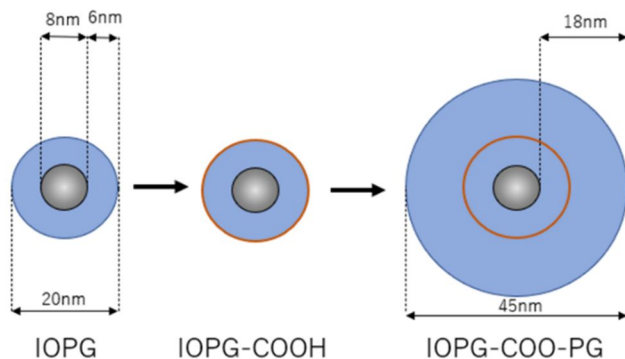
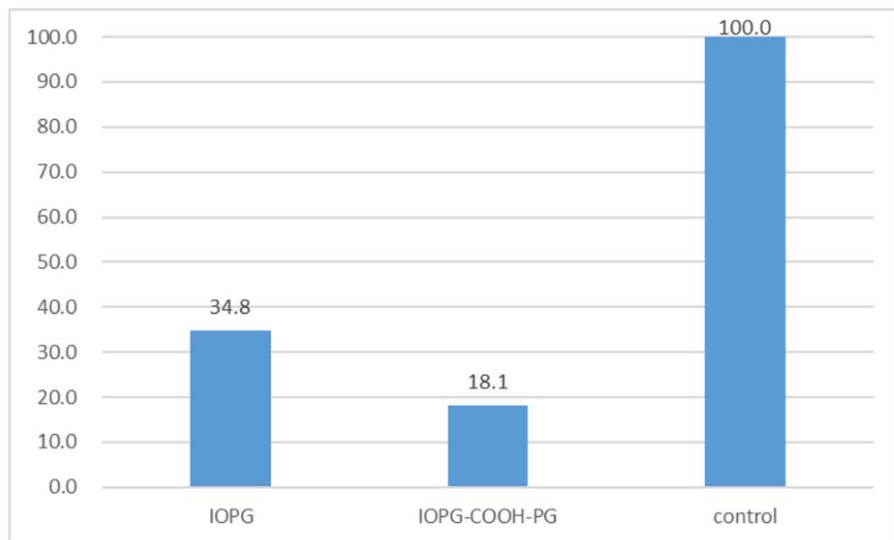


図 1



Name	Size (nm) from Nanotract					AVG	SD
	1#	2#	3#	4#	5#		
IOPG	20.89	17.81	21.14	21.77	20.84	20.49	1.543194738
IOPG-COOH-PG	41.4	46.8	48.1	45.0	48.0	45.9	2.788906596

図 2



APFを用いたフリーラジカル測定にて IO-PG-COO-PGは

- コントロールの**18.1%**
- 同濃度 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) のIO-PGを加えた場合の**52%**に減少していた

IO-PG-COO-PGは IO-PGより強いフリーラジカル除去能をもっていると考えられる

図 3

4.7T MRI による精細な新生仔マウス脳構造の画像化

4.7T MRI 3D モードで条件設定を行い、小さな新生仔マウスの脳を精細に画像化することに成功した。HIE の重症度評価においては冠状断における健側と比較した患側の脳半球、線条体、海馬の萎縮率を求めるが、評価が十分行える精細な画像を得ることができた。(図4)

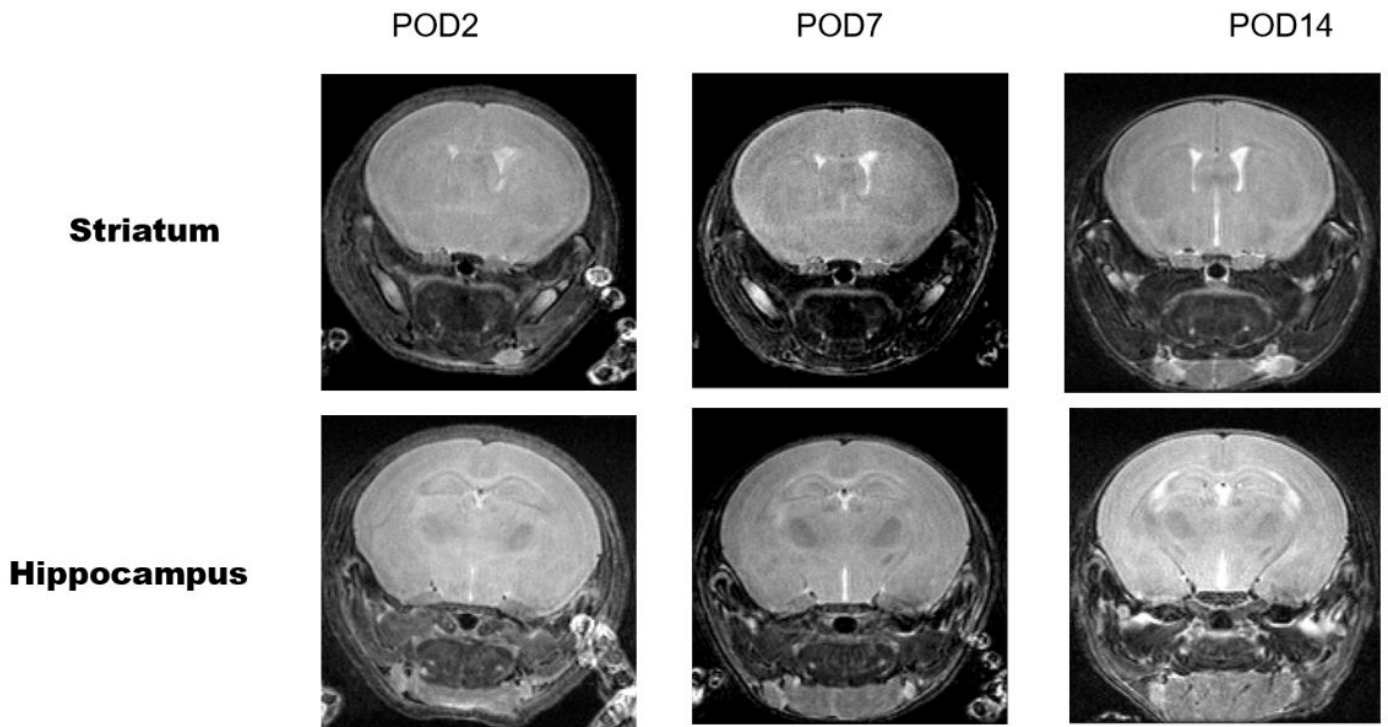


図4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------