

令和 6 年 4 月 24 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07830

研究課題名（和文）低体温療法を中心としたグリアの機能制御による新生児脳障害の包括的な新規治療戦略

研究課題名（英文）Comprehensive Novel Treatment Strategy for Neonatal Brain Injury via Glial Function Modulation with a Focus on Hypothermia Therapy

研究代表者

垣田 博樹（Kakita, Hiroki）

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40528949

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：培養アストロサイトのEPOの発現にAMP-activated protein kinase(AMPK)が関与しており、このEPOの分泌促進によりニューロンの傷害が抑制されることを明らかにした。またLPSで活性化した培養ミクログリアでは低温状態でTRPV4-AMPK-NFkBを介して活性化が抑制され、ニューロンの傷害が抑制されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により新生児低酸素性虚血性脳症の低体温療法を補完する、新規治療法の開発に繋がることが期待される。さらに低体温療法が施行困難で治療法のない早産児の脳室周囲白質軟化症も含めた包括的な新生児脳障害の治療戦略の確立が可能なる。

研究成果の概要（英文）：Impact of Glial-Mediated Hypothermia on Neurons and Oligodendrocytes

We revealed that AMP-activated protein kinase (AMPK) is involved in the expression of erythropoietin (EPO) in cultured astrocytes. Furthermore, we demonstrated that this promotion of EPO secretion inhibits neuronal damage. Additionally, in cultured microglia activated by LPS, we elucidated that activation via TRPV4-AMPK-NFkB is suppressed under hypothermic conditions, leading to the inhibition of neuronal injury.

Analysis in HIE Model Rats. It was revealed that some of the inhibition of neuronal damage observed in the above glial cultured cells is also present in HIE model rats.

研究分野：新生児学

キーワード：新生児低酸素性虚血性脳症 グリア 低体温療法 エリスロポエチン

1. 研究開始当初の背景

新生児仮死は成熟児 1000 に対して 2-4 の頻度で起きる。新生児仮死にともなう、脳内の低酸素虚血と再灌流による傷害が**新生児低酸素性虚血性脳症 (HIE)**を引き起こす。さらに感染を合併することで、弱い負荷であっても予想以上に重度の脳損傷をきたすことが知られており、感染に伴う炎症が重症化因子であることが報告されている。HIE 患者の 25%以上に神経学的後遺症がみられ、脳性麻痺の原因の約 10%を占めている現状がある。HIE の治療法として現在までに有効性が認められているのは、**低体温療法**のみである。しかし**低体温療法**を施行しても 30-60%の症例では依然として予後不良であり、HIE に対する確実な治療法は未だに確立されていない。

2. 研究の目的

HIE に対する有効性が唯一証明されている治療は低体温療法であるが、その効果は限定的であり、**低体温療法**を強力に補完する新規治療法の確立は喫緊の課題である。これまでわれわれは、低体温療法の神経保護効果はグリアにおいて、内因性エリスロポエチンの持続分泌が重要であることを明らかにした。本研究ではこれらの研究成果さらに発展させ、グリアの機能制御による神経炎症抑制を目指した、低体温療法を強力に補完する新規治療法の開発を目指す。さらに副作用などのため低体温療法を導入できない症例を想定した、低体温療法に代わる新規治療法の開発をモデル動物を用いて行い、今後の臨床応用へ発展することを目的とする

3. 研究の方法

1. 低温状態がアストロサイト/ミクログリアに与える影響

これまでに申請者らは、低温状態がアストロサイトの EPO 分泌を促進し、ニューロンの障害を抑制することを明らかにした (*J Neuroinflammation* 2020)。また申請者らは低温状態がミクログリアの活性化を包括的に抑制し、神経障害を抑制すること明らかにした (*Cell Mol Neurobiol.* 2023)。(未発表、図3)。これらの結果を踏まえてグリアの培養細胞を用いて低温状態でのアストロサイトの EPO 発現やミクログリアの活性化抑制において、さらなる詳しいメカニズムを解明する。特に AMPK は Hypoxible induce factor (HIF)や NF -B、さらに sitruin など低酸素、炎症、代謝に関わるタンパク質との相互作用が知られており、それらの相互作用について解析する。

2. グリアを介した低体温療法のニューロン、オリゴデンドロサイトに与える影響

上記検討で明らかになった、グリアによるニューロンの保護に関与するタンパク、特に EPO、HIF、NF -B、AMPK、iNOS がニューロン、オリゴデンドロサイトに与える影響について検討する。グリアとニューロン、オリゴデンドロサイトの共培養、グリアから得られたコンディショニングメディウムを用いて、ニューロン、オリゴデンドロサイトの細胞傷害について検討する。

3. モデルラットでの解析

・HIE モデルラットでの解析

すでに申請者らは P7 のラットを用いて総頸動脈結紮、低酸素負荷を加えることでニューロン、オリゴデンドロサイトを広範囲に障害する HIE モデルラットを作成している。この HIE モデルラットを用い、傷害後低温状態におくことで死亡率、神経学的症状の改善がみられる

かを検討する。さらに脳の凍結切片を作成し免疫染色を行い、脳障害の部位、程度、病変部でのグリア細胞の集積、形態変化などを検討する。さらにこれらのラットの脳を回収し、Milteny Biotech社製のgentle MACSによりマイルドに単細胞化したのち、BD Biosciences社製のFACS Verseを用いて、全脳細胞の中からグリアおよびニューロンの表面抗原の発現の変化を解析する。さらに、BD Biosciences社製のFACS Ariaを用いて、特定の細胞集団を回収し、活性化マーカーである炎症性サイトカインや神経保護因子の発現を定量的RT-PCRによって解析し、細胞レベルでの変化を遺伝子発現の変化によって比較検討する。

・脳室周囲白質軟化症（PVL）モデルラットでの解析

早産児を想定した幼弱なP3ラットを、マイルドな低酸素負荷を加えることで、より大脳白質に特異的な傷害がみられるPVLモデルラットを作成する。未熟児では一般的に低体温にすることにより全身状態の悪化が見られるため、低体温療法は適応外となる。そこでin vitro、HIEモデルで明らかになった神経保護因子の投与、神経障害因子の阻害剤を投与することにより白質障害が抑制されるかどうかを検討する。これまでの研究からEPOが強力な神経保護効果を示すことは明らかである。しかし、われわれは外因性EPOでは十分な神経保護効果を示さないことを明らかにした。(J Neuroinflammation 2020)。そのため、内因性EPOの発現を調整するHIF、AMPKさらにミクログリアでの炎症シグナルの中心をなすNF- κ Bを中心に解析する予定である。これらの効果が確認できれば、低体温療法が施行できない未熟児の脳障害においても低体温療法を模した新規治療法の提案が可能となり、包括的な新生児脳障害の新規治療が確立できると考えられる。

4. 研究成果

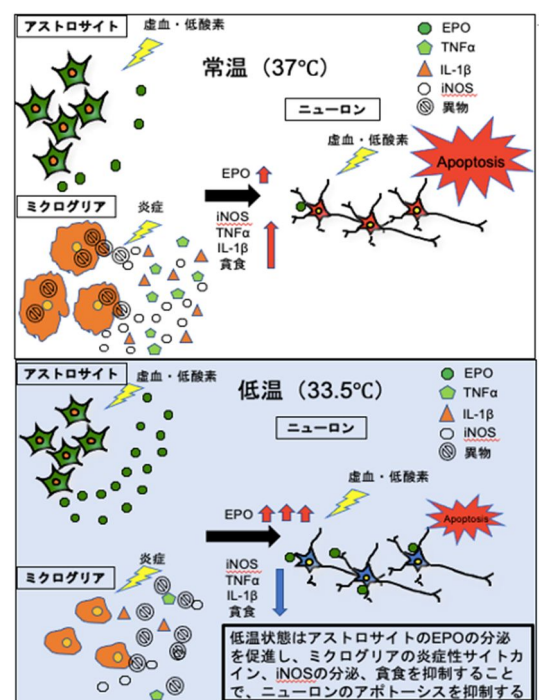
・グリアを介した低温状態のニューロン、オリゴデンドロサイトに与える影響

培養アストロサイトを低酸素、無糖状態にすることで、更新するEPOの発現にAMP-activated protein kinase(AMPK)が関与していることを明らかにした。さらにこのEPO分泌促進によりニューロンの傷害が抑制されることを明らかにした。さらにLPSで活性化した培養ミクログリアでは、低温状態でTRPV4-AMPK-NF κ Bを介して活性化が抑制されニューロンの傷害が抑制されることを明らかにした。(Neurochem Res 2024)

・HIEモデルラットでの解析

上記のグリア培養細胞でのニューロン、オリゴデンドロサイトの障害抑制の一部はHIEモデルラットにおいてもみられることが明らかになった。

現在脳室周囲白質軟化症モデルラットにおいても検証中であり包括的な新生児脳障害の新規治療が確立を目指して検証中である。



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 Kimura Toriuchi K, Kakita H, et al	4. 巻 41
2. 論文標題 Hypothermia Attenuates Neuronal Damage via Inhibition of Microglial Activation, Including Suppression of Microglial Cytokine Production and Phagocytosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Mol Neurobiol	6. 最初と最後の頁 459-468
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10571-020-00860-z	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 垣田博樹
2. 発表標題 低温状態はミクログリアの炎症性サイトカイン、iNOS発現および食欲能抑制することで神経保護効果を発揮する
3. 学会等名 日本新生児成育医学会
4. 発表年 2022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
研究分担者	竹下 覚 (Takeshita Satoru) (20715875)	愛知医科大学・医学部・講師 (33920)	
研究分担者	山田 恭聖 (Yamada Yasumasa) (60405165)	愛知医科大学・医学部・教授 (33920)	
研究分担者	青山 峰芳 (Aoyama Mineyoshi) (70363918)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・教授 (23903)	

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
---------	---------