

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591601

研究課題名(和文) 新生児低酸素性虚血性脳症における脳血管内皮細胞保護療法の有効性の検討

研究課題名(英文) Development of cerebrovascular protection therapy for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy

研究代表者

谷口 英俊 (TANIGUCHI, HIDETOSHI)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・招へい教員

研究者番号：00622747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：周産期の低酸素状態は新生児低酸素性虚血性脳症(HIE)と呼ばれる病態を生じ、脳に不可逆な後遺症を残す。本研究ではプロスタグランジン(PG)のもつ神経毒性/保護作用についてラットHIEモデルおよびヒトiPS細胞をもちいた解析を行い、EP4アゴニストであるAE1-329を虚血開始直前に投与すると、脳血流量の増加を介して脳梗塞巣の面積が軽減することが分かった。また一方で、ヒトiPS細胞から分化誘導した神経前駆細胞に対しEP2-4アゴニストであるミソプロストールを投与すると、低酸素・無栄養状態にある神経細胞の酸化ストレスが低下することも判明し、HIEの治療法として有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hypoxic ischemic encephalopathy (HIE) in neonates is a leading cause of neurological impairment. We investigated the function of the prostaglandin in rodent models of neonatal HIE and human induced pluripotent stem cells (iPSCs). Pharmacologic activation of the EP4 receptor with a selective agonist (AE1-329) was significantly cerebroprotective through the improvement of cerebral perfusion. On the other hand, activation of EP2-4 receptors with the agonist misoprostol significantly reduced the oxidative stress in human iPSC-derived neural precursors subjected to oxygen glucose deprivation. These data indicate that the G-protein coupled EP receptors may be amenable to pharmacologic targeting in the acute setting of neonatal HIE.

研究分野：胎児・新生児医学

キーワード：プロスタグランジン 低酸素性虚血性脳症 iPS細胞

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; HIE) は、胎児・新生児が循環不全に暴露され、その脳組織が低酸素・低血糖に陥ることにより生じる病態である。重症のHIEは、出生1,000人に対し1-6人の割合で生じ、周産期医療の進歩にも関わらず依然として新生児死亡や神経学的後遺障害の原因の主たる原因となっている。これまで種々の治療法が研究されてきたがその効果は一定ではなく、現時点では脳低温療法が唯一の神経保護作用を有する治療法として認められているもののその効果は限定的で、半数は重篤かつ不可逆な後遺症を残すことから、新たな治療戦略の開発が急務である。

プロスタグランジン(PG)はアラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ(COX)によって変換されて生じるPGH₂から各々のPG合成酵素を介して産生される物質であり、発熱や疼痛、血管拡張の他に血管新生の促進や神経再生の促進物質としての候補とされるなど様々な生体作用が報告されている。主なPGとしては、PGE₂, PGD₂, PGF₂, PGI₂, トロンボキサン(TX)A₂があげられ、それぞれに固有の受容体(DP1-2, EP1-4, FP, IP, TP)が存在し、多様な作用を介している。

近年、脳梗塞モデルにおける作用が注目されており、誘導型シクロオキシゲナーゼであるCOX-2阻害により梗塞巣の縮小が報告されている一方で、EP2受容体の神経保護効果も報告されていることから、EP受容体がそれぞれ固有の神経保護作用/毒性作用を有していると考えられている(図1)。

The Effects of Prostaglandins in adult stroke models

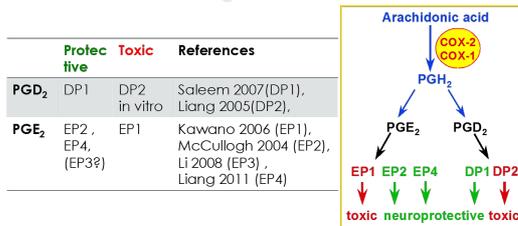


図1. 脳虚血モデルにおけるプロスタグランジンの作用

2. 研究の目的

申請者はこれまで新生児における脳梗塞、すなわちHIEモデルにおけるEP受容体の作用について研究を続けており、とくにEP4がHIEにおける神経保護作用を有することを明らかにしてきた。その結果、EP1-4が神経細胞および内皮細胞に発現しており、選択的EP1阻害薬であるSC-51089、およびEP2-4アゴニストであるミソプロストールの投与がHIEによる24時間後の脳損傷を有意に軽減することが分かってきた。そこで本研究では、EP2-4刺激による神経保護作用の可能性について、「HIEモデル動物を用いた血管内皮細胞への作用の解析」および「ヒト

iPS細胞をもちいた神経細胞への作用の解析」という両方の側面からの解析を行った。

3. 研究の方法

HIEモデル動物を用いた血管内皮細胞への作用の解析

新生児ラットHIEモデルに対してEP4アゴニストであるAE1-329を投与し、その効果を確認した。さらにその薬理学的効果が血管内皮細胞に作用しており、結果的に脳血流の増加をもたらしていることをEvans Blue(EB)染色をもちいた脳血流測定によって確認した。

新生児ラットHIEモデルはすでに申請者が詳細に報告している方法(Taniguchi et al., 2008, J. of Visualized Medicine)を用いて作成した。すなわち、日令7の新生仔ラットの総頸動脈を麻酔下にて結紮し、その後37に保ったコンテナ内で100分間8%酸素に暴露させ、24時間後と7日後に安楽死させ脳を摘出した。脳は1% 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride (TTC) 染色(24時間後)またはニッスル染色(7日後)によって梗塞巣を測定した。

Evans Blueは2%となるようPBSに希釈し、AE1-329(50 µg/kg)投与群あるいはコントロール群に対して低酸素開始5分前あるいは5分後に200 mg/kgを皮下注射した。摘出した脳はホルムアミド処理ののち、スペクトロフォトメーターをもちいてEB濃度の評価を行った。

ヒトiPS細胞をもちいた神経細胞への作用の解析

本研究に用いる疾患特異的ヒトiPS細胞は、臍帯血へのセンダイウイルスの感染により樹立した。センダイウイルスベクターは産総研の中西真人らによって作成されたC1.15株をもちいた。このベクターは持続感染型変異株であり、センダイウイルス遺伝子上のP、M遺伝子に変異を入れて細胞障害性を低下させる改変を加えてある(図2)。またiPS細胞樹立後にこのウイルスを除去させる必要があるが、SeVのL遺伝子(ウイルスポリメラーゼ遺伝子でありウイルス発現に必須)に対するsiRNAを加えることでL遺伝子発現を抑制させている。さらにL遺伝子の末端にmiR302a target sequenceを4つならべたものを付加してあり、感染させた細胞がiPS細胞の状態になると未分化細胞特異的microRNAであるmiR302aによってL遺伝子の発現が抑制されることになる。

このセンダイウイルスと臍帯血をもちいて、以下のようにiPS細胞を樹立した。

- ✓ あらかじめ同意書を得て採取した臍帯血の単核球分画に、山中4因子を搭載した持続発現型センダイウイルスベクターを感染させることで遺伝子を導入
- ✓ 感染7~10日後にiPS細胞様コロニーをピックアップ

- ✓ センダイウイルスに対する shRNA を投与することによりベクターを除去
- ✓ QRT-PCR により多能性を確認

Sendaivirus C1.15株 (産総研 中西ラボ作成)
SeV-KQSM302L_vector



図2. iPS細胞樹立のために使用する持続発現型センダイウイルスベクター (産総研中西ラボ作成)。
細胞傷害性と持続性に関係する変異・欠失を導入し持続感染型としてある。

- ・4つの初期化転写因子を同一ベクターに包含
- ・iPS細胞樹立後のウイルス除去;
L遺伝子の末端に miR302a 標的配列を付加
L遺伝子に対する siRNA を投与

ヒト iPS 細胞から神経細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞から神経細胞への分化誘導法については、胚様体 (Embryoid Body) からの分化プロトコルを用いた (図3)。iPS 細胞からを浮遊培養によって胚様体を作成し、dual SMAD 阻害剤と呼ばれる Dorsomorphin (2uM) および SB431542 (10uM) を投与した。分化開始 8 日目にマトリゲル上に接着培養を行い、DMEM/F12, Neurobasal medium, 2 mM L-alanyl-L-glutamine, 1% MEM non-essential amino acids solution, 0.1 mM 2-mercaptoethanol, N2 supplement (1x), B27 supplement (1x), and 20 ng/mL basic fibroblast growth factor を加えて培養を行った。培養開始 13、18 日目にロゼット構造を分離し、神経前駆細胞 (neural precursor cell; NPC) の培養を行った。この NPC からさらに神経分化誘導を行い、10 日後に虚血類似環境下 (低酸素、無栄養) においた。

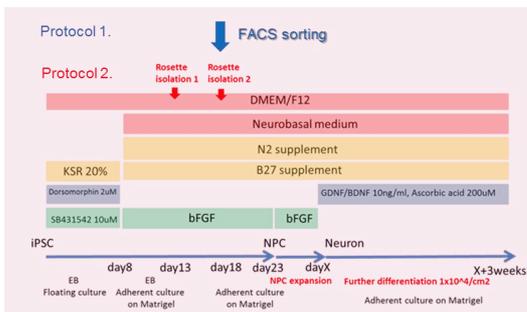


図3. 健康児 iPS 細胞から神経細胞系への分化誘導のプロトコル

この細胞において酸化ストレス (ROS) を測定し、EP2-4 非選択的アゴニストであるミソプロストール (0.1, 1, 5, 10 uM) の効果を評価した。

4. 研究成果

- EP4 受容体への刺激による HIE モデルでの脳保護作用
多様な生理作用を呈する EP1-4 受容体刺

激のうち、とくに EP4 に注目して HIE における脳保護作用の有無について評価を行った。すなわち虚血後 24 時間の脳組織の TTC 染色結果をもとに梗塞部位をレベル 1 - 4 に分け (図 4A)、さらに全組織内に占める面積を測定した。その結果、EP4 選択的アゴニストである AE1-329 を虚血処置の前後、前のみ、後のみに投与した群は、コントロール群に比していずれも有意に虚血部位の面積が減少していることが分かった (図 4 - C)。興味深いことに、虚血の前、あるいは後の 1 回投与群は、虚血の前後の二回投与した群と比較して明らかに虚血の改善が強く出ており、AE1-329 の複数回投与が細胞にとって毒性を呈する可能性があると考えられた。

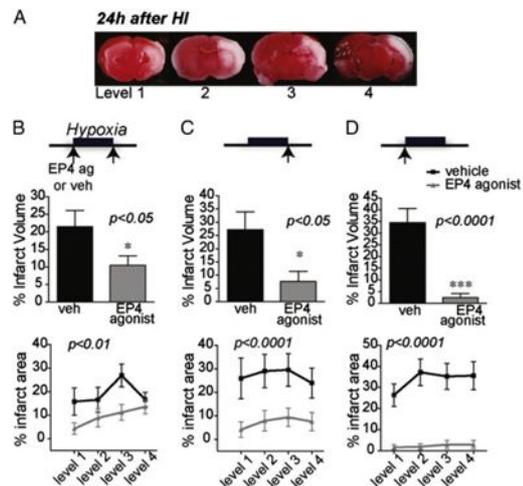


図4. EP4 選択的アゴニストである AE1-329 投与が HIE モデルの脳組織に与える神経保護作用の評価
A. 脳虚血処理 24 時間後の脳組織について TTC 染色を行い、白色となった梗塞部位の広さによってレベル 1-4 に分類を行った。
B. AE1-329 を虚血の前後に投与した群、
C. 虚血の後だけに投与した群、
D. 虚血の前だけに投与した群における梗塞部位の面積の割合を測定した

さらに長期の影響を評価するために、虚血後 7 日目の脳組織を用いて Cresyl Violet 染色を行ったところ、やはり梗塞部位の有意な減少が認められた (図 5)。

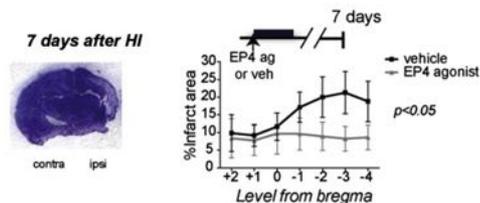


図5. HIE モデルへの AE1-329 投与による脳保護作用の長期的評価

虚血の直前に AE1-329 投与を行うことで梗塞面積が減少するのは、PG の効果が血管内皮細胞に現れ、灌流血液量の増加が心拍出量の低下を補っている可能性がある。そこで Evans Blue 染色を行い、虚血と同側・反対

側における EB の濃度を測定することによって脳血流量の変化を評価した。EB を AE1-329 と同時に虚血直前に投与しその 60 分後に測定を行うと、脳血流量は有意に上昇した。AE1-329 を虚血直前あるいは直後に投与し、EB を虚血直後に投与した場合、脳血流量の増加は認めるものの大きくなかった。AE1-329 投与と EB 投与が同時の場合が最も効果が大きいことから、EP4 受容体活性化は脳血流増加を介して脳保護作用を呈している可能性が示唆された。

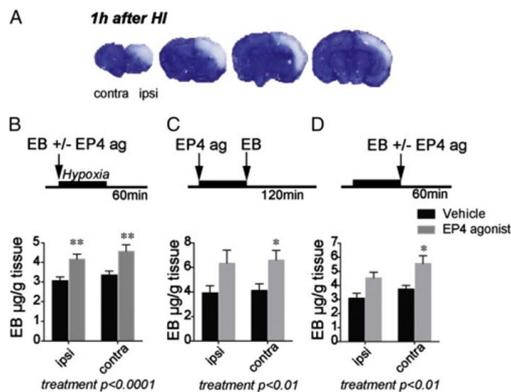


図 6. Evans Blue 染色による脳血流量の評価

ヒト iPS 細胞をもちいた神経細胞への作用の解析

健常新生児の臍帯血から単核球分画を採取し、 6.0×10^5 個あたり SeV-KOSM-302L ウイルスを MOI=2-3 で 2h 感染した。感染 7 日目前後にコロニーが出現し、~12 日でピックアップ可能となったため 20 個のコロニーをピックアップした。これらの iPS 細胞クローンに対してセンダイウイルスを除去するために siRNA 処理を行った。siRNA 処理および miR302a target sequence を加えない状態では半年経っても SeV は消失していないのに対し、2 回の siRNA 処理によってほぼすべての SeV が消失した (図 7, 8)。

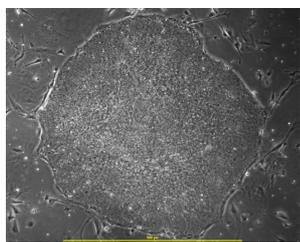


図 7. 臍帯血より樹立したヒト iPS 細胞

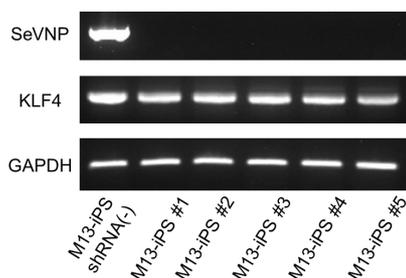


図 8. siRNA 処理後の SeV 除去の確認

次に樹立したヒト iPS 細胞から神経系への分化誘導を行った。得られた NPC はいずれも高純度に神経前駆細胞のマーカー陽性であることが確認できた。さらにこれらの神経分化を進め、90 日目には成熟した神経マーカーの発現を確認することができた (図 9)。

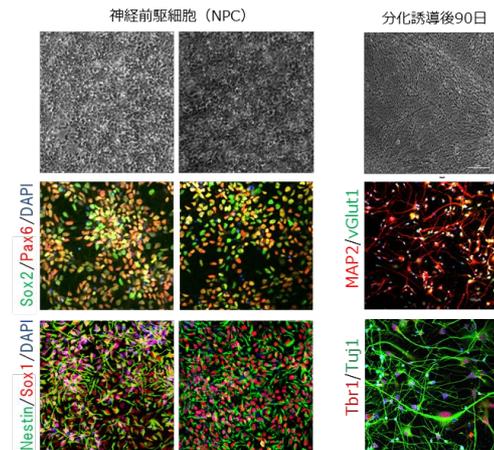


図 9. ヒト iPS 細胞から神経系への分化誘導 (左; 神経前駆細胞 (NPC) 右; NPC からさらに分化を進め 90 日後の神経細胞)

これら iPS 細胞から分化誘導を行った神経細胞は、胎児-新生児期の未熟な神経細胞を再現できていると考えられる。そこでこの細胞をもちいてミソプロストールによる神経保護作用の可能性を検証した。すなわち iPS 細胞由来 NPC から分化誘導 10 日後に分散培養を行い、96 ウェルプレート上へ 1×10^4 /ウェルの割合で再播種した。さらに 2 日後より低酸素・無栄養状態 (1%酸素、glucose-free balanced buffer solution) におき、その 6 時間後に CellRox DeepRed reagent (Thermo Fisher) をもちいて酸化ストレスの評価を行った。

「NPC から分化 10 日後の神経細胞」および「6 時間の低酸素・無栄養環境」という条件では細胞死にいたる数が全体に少なく、ミソプロストール投与による違いはほとんどみられなかった。しかしながら細胞に発生する酸化ストレス (ROS) を調べると、ミソプロストール (10uM) 投与群において有意に ROS の低下が見られた。

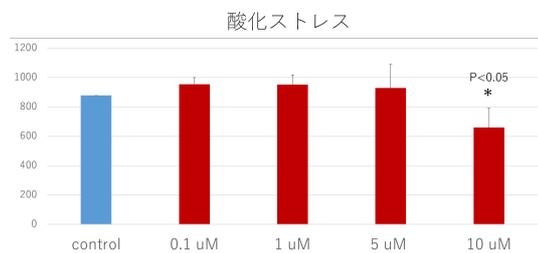


図 6. 低酸素・無栄養状態においたヒト iPS 細胞由来神経細胞におけるミソプロストールによる神経保護作用の検討。細胞辺りの酸化ストレスは、ミソプロストール投与により減少する。

これらの結果は、ミソプロストールが酸化ストレスの軽減を介して神経保護作用を呈する可能性を示唆している。今後さらに分化誘導の進んだ細胞において、異なる条件をもちいて神経細胞死の状態を解析し、ミソプロストールの効果について検討を加える予定である。

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 1 件)

1. Protection by vascular prostaglandin E2 signaling in hypoxic-ischemic encephalopathy.
Taniguchi H, Anacker C, Wang Q, Andreasson K.
Exp Neurol. 2014 ;255:30-7. (査読あり)
doi: 10.1016/j.expneurol.2014.02.012.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 8th Hershey Conference on Developmental Brain Injury : 2012.6.5-8 London, UK
Cerebrovascular protection targeting EP receptors achieves infarct reduction in the model of neonatal hypoxic ischemic encephalopathy.
H.Taniguchi, C.Anacker, G.Suarez M.Wang, K.Andreasson
2. 第 31 回周産期学シンポジウム : 13.01.25-26 大阪
プロスタグランジン受容体作動薬による脳血管内皮細胞保護療法-低酸素虚受傷後の脳へのライフライン確保を目指す薬物治療アプローチ-
谷口 英俊

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷口 英俊 (TANIGUCHI HIDETOSHI)
大阪大学大学院医学系研究科・招へい教員
研究者番号 : 00622747

(2)研究分担者

谷池 雅子 (TANIIKE MASAKO)
大阪大学連合小児発達学研究所・教授
研究者番号 : 30263289

和田 和子 (WADA KAZUKO)
大阪大学大学院・医学系研究科・講師
研究者番号 : 30294094

(3)連携研究者

研究者番号 :