

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791121

研究課題名(和文)顕微質量分析による新生児低酸素性脳症の代謝システムの制御解明と低体温療法の最適化

研究課題名(英文)Research on mechanism of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy using microscopic mass-spectroscopy

研究代表者

武内 俊樹 (Takenouchi, Toshiki)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60383741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：新生児低酸素性虚血性脳症は、神経学的後遺症を残すことの多い疾患である。これまでに低体温療法だけが唯一、予後を改善することが知られていた。本研究では、低体温療法の作用機序を解明するために、疾患動物モデルを作成し、脳内の代謝変化を詳細に解析した。低体温療法による脳内の複雑な代謝変化が空間的・経時的に確認され、今後、治療法改善を検討する上で有用な知見と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The present study was undertaken to reveal mechanisms of hypothermic intervention in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. Using animal models, we have demonstrated detailed intracerebral metabolic changes, which would contribute to improvement in the hypothermic treatment strategy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：新生児 低酸素虚血 脳障害 低体温療法

1. 研究開始当初の背景

(1) 新生児低酸素性虚血性脳症 (Hypoxic-Ischemic Encephalopathy; HIE) に対する低体温療法の有効性が認められてきていた。

新生児 HIE は、頻度が高く、神経学的予後が不良で種々の合併症をきたすことから、周産期医療における最重要疾患のひとつであった。これまでに基礎研究で神経保護が示唆された膨大な数の物質の中で、低体温療法だけが唯一、臨床現場で新生児 HIE の予後を改善することが証明され、欧米を中心に標準治療として急速かつ広く普及しつつあった。しかしながら、低体温療法が新生児の脳に与える詳細な作用機序が不明であることから、開始時期、期間、温度設定、有効な薬物併用療法などについては、依然として試行錯誤の状態が続いていた。

(2) 低体温療法が新生児 HIE 急性期の生化学反応に与える影響の解明が最重要課題であった。

新生児 HIE の本態は、胎盤血流の遮断に起因する複雑かつ同時進行的な生化学反応カスケードであり、その結果、活性酸素を含む内因性親電子物質が爆発的に生成され、最終的に神経細胞が障害される。低体温療法は、この HIE 急性期の生化学反応を多段階で阻害していると考えられているが、従来の実験系では、この同時進行的かつ複雑な化学反応カスケードを俯瞰的に解析することは困難であり、具体的にどの段階をどの程度阻害しているのかは未だに解明されていなかった。

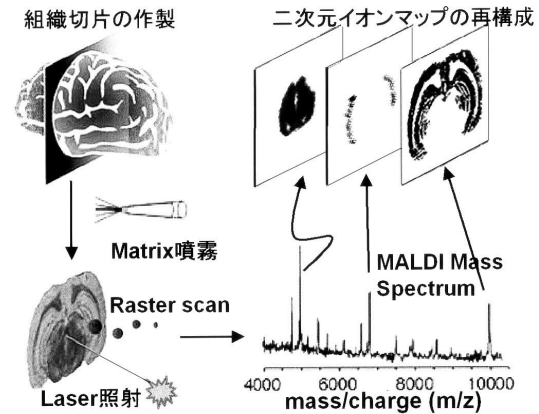
2. 研究の目的

本研究の目的は、HIE に対する低体温療法の脳保護効果には、脳内の親電子物質の消去効率の改善が関与している、という仮説を立証することであった。革新的な計測技術であるキャピラリー電気泳動質量分析計メタボローム測定系と顕微質量分析法を組み合わせ、低体温療法が幼若な脳の生化学反応系に及ぼす影響を高い空間分解能をもって定量解析する。本仮説が立証されれば、新生児 HIE に対する低体温療法の至適条件を設定するための重要な根拠のひとつとなると期待されたからである。

3. 研究の方法

本研究では、近年開発された、生体内代謝物質の新たな網羅的測定法を用いた。具体的には、生体内代謝化合物の測定方法として、細胞内の数千種類のイオン性代謝物質を一斉に分析できるキャピラリー電気泳動質量分析計 (Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry; CE/MS) メタボローム測定が注目されていた。さらにこの原理を顕微鏡と組み合わせることにより、生体内代謝物を高い空間的分解能で描出できる顕微質量分析法と呼ばれる画期的な計測技術が開発されて

いた(下図、Stoeckli et al. Nat Med 2001)。慶應義塾大学医学部医化学教室の末松誠教授のグループは、上記の分析法を確立し、脳梗塞の動物実験モデルにおいて、解糖系代謝物、NADH、高エネルギーリン酸化合物、アミノ酸、乳酸、プリン代謝物質などを高い空間分解能で同時測定できることを示しており (Hattori et al. Antioxid Redox Signal, 2010)、本研究でもこれを活用し解析を行った。



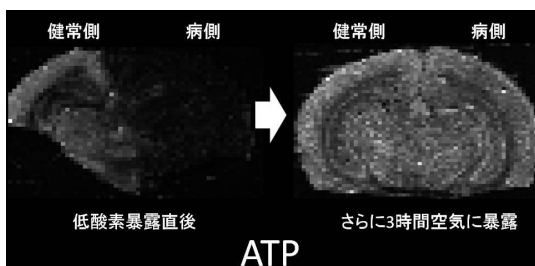
本研究では、新生児低酸素性虚血性脳症の疾患モデル動物を構築した。概要は、Rice-Vannucciモデルに順じた。生後7日のオスのSDラットの左総頸動脈を、全身麻酔下で外科的に結紮し、2-4時間の回復期をおいた後に、38度の恒温槽の上で8%酸素に暴露した。その後、空気に暴露する際に、30度の恒温槽に移し、低体温による治療を行った。文献上は、90分程度の8%酸素への暴露で十分な脳障害が形成されるとするものが多かったが、動物の系統の違いからか、本研究では、150分程度の低酸素暴露が必要であった。本研究のテーマである低体温の効果を調べるため、床を熱伝導性効率の高い金属で置き換えた特殊なプラスチック製のチャンバーを作成し使用した。また、長時間の実験で安定した温度の環境を得ることが困難であったが、既存の恒温槽を改良して利用したことで、長時間にわたって安定した温度の環境を得ることができた。これにより、低酸素暴露後の低体温療法により、神経学的症状が劇的に改善する疾患モデル動物実験系を安定して構築することができた。

4. 研究成果

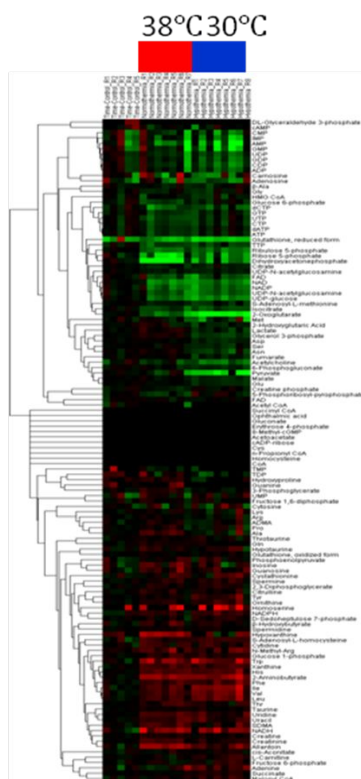
研究代表者は、末松教授らのグループとともに、新たに構築した新生児ラットモデルを用いて、予備実験の成果として以下の知見を得た。

(1) 幼若ラットを低酸素暴露後に空気に再暴露した場合 (HIE 児の出生時に相当) に、脳内の高エネルギーリン酸化合物や cyclic ADP ribose などの劇的な経時変化を定量的かつ高い空間分解能をもって確認した(下図)。

(2) また、低酸素暴露後、空気に再暴露する際に、低体温にすることで低酸素虚血側大脳半球で、還元型グルタチオンが枯渇する現象を CE/MS メタボローム測定系で観察した。



また、本実験系で得られた脳障害ラットから抽出した脳代謝物を抽出し、メタボローム解析を行った。約 200 種類の代謝物を CE/MS を用いて網羅的かつ定量的に測定し、クラスター解析プログラムを行って系統的に分類した(下図)。



その結果、低体温虚血障害の直後から低体温療法を行うことにより、一様に脳内代謝が抑えられるのではなく、予想に反して一部の脳内代謝物が低体温療法により増加することが明らかとなった。また、独創的な脳内イメージング技術である定量的質量イメージング法を駆使して、脳内のいくつかの代謝物の変化の解析を試みた。

これにより、従来の染色法では捉えることのできなかった健康側大脳半球での代謝物の変化が示され、低体温療法が、脳内の代謝物を局在を持って変化させることが明らか

となった。今後、標的分子候補のノックアウトマウスの作出とその表現型の解析を視野に入れ、研究を進めていく予定である。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

(1) 発表者(代表)者: 武内俊樹

発表表題: Metabolic responses to therapeutic hypothermia after hypoxia-ischemia in newborn rats

学会名: Society for Neuroscience 2013

日時: 平成 25 年 11 月 10 日、午前 10:00 - 11:00

場所: アメリカ合衆国カリフォルニア州サンディエゴ市

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武内 俊樹 (Takenouchi Toshiki)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 60383741

(2) 研究協力者

末松 誠 (Suematsu Makoto)

慶應義塾大学・医学部・教授

実験手法・解析結果の解釈に関する助言と指導

梶村 眞弓 (Kajimura Mayumi)

慶應義塾大学・医学部・准教授

実験手法・解析結果の解釈に関する助言と指導

中西 豪 (Tsuyoshi Nakanishi)

慶應義塾大学・医学部・特別研究講師

定量的質量イメージング分析・解析結果の解釈に関する助言

杉浦 悠毅 (Yuki Sugiura)
慶應義塾大学・医学部・特別研究講師
定量的質量イメージング分析・解析結果
の解釈に関する助言

長畑 善子 (Yoshiko Nagahata)
慶應義塾大学・医学部・研究補助員
メタボローム解析・解析結果の解釈に関
する助言

杉岡 忠男 (Tadao Sugioka)
慶應義塾大学・医学部・共同研究員
疾患モデル動物の作成・解析

松浦 友美 (Tomomi Matsuura)
慶應義塾大学・医学部・研究補助員
メタボローム解析・解析結果の解釈に関
する助言

菱木 貴子 (Takako Hishiki)
慶應義塾大学・医学部・特別研究講師
メタボローム解析・解析結果の解釈に関
する助言

森川 隆之 (Takayuki Morikawa)
慶應義塾大学・医学部・特別研究助教
疾患モデル動物の作成・解析

久保 亜希子 (Akiko Kubo)
慶應義塾大学・医学部・特別研究講師
メタボローム解析・解析結果の解釈に関
する助言

高橋 孝雄 (Takao Takahashi)
慶應義塾大学・医学部・教授
実験手法・解析結果の解釈に関する助言
と指導