

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462553

研究課題名(和文)モデル動物を用いた新生児低酸素性虚血性脳症分子病態解明

研究課題名(英文) Comprehensive gene expression analysis of neonatal ischemic-hypoxic encephalopathy animal model at acute phase

研究代表者

小島 俊男 (Kojima, Toshio)

豊橋技術科学大学・健康支援センター・教授

研究者番号：00311340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新生児低酸素性虚血性脳症のモデル動物の障害対側大脳の急性期網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果は、障害後1時間では、炎症反応が誘導され、24時間後、その多くが沈静化すると同時に誘導された炎症反応が進行すること、障害後1時間後、24時間後に神経障害が一部進行していることなどを示唆するものと考えられた。同疾患モデルにおいて、障害対側大脳も重要な解析対象であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed comprehensive gene expression analysis of the contra-lesional cerebrum of neonatal ischemic-hypoxic encephalopathy animal model at acute phase. The results suggest that 1 hour after lesioning, inflammatory responses are induced, and that induced inflammatory reactions continue at 24 hour after lesioning. Furthermore, neuropathy progression is suggested at both 1 hour and 24 hour after lesioning. From these results, we concluded that the contra-lesional hemisphere of neonatal ischemic-hypoxic encephalopathy animal model is important subject of investigation.

研究分野：ゲノム医科学

キーワード：低酸素性虚血性脳症 網羅的遺伝子発現解析

1. 研究開始当初の背景

周産期脳障害の一つである新生児低酸素性虚血性脳症 (Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: HIE) は、妊娠中あるいは成熟児の出生時、何らかの原因で長時間の血流停止が起こり、その結果、脳が低酸素および脳虚血状態にさらされることにより様々な脳神経障害が引き起こされる疾患である。HIE 患児の 15 ~ 20% は、新生児期に死亡し、生存した患児の 30% は、脳性麻痺、精神発達遅延、てんかんなどの神経学的後遺症を残すと報告されている。

HIE の病態進行機序は未だ不明であり、有効な治療法も確立されていない。そのため、患児の状態や症状に応じて酸素吸入や薬剤投与などを行うなどの対処療法的な治療しかおこなえておらず、治療薬の開発を含めて治療法の確立が求められている。

HIE 病態解明および治療法確立のためにラットの片側頸動脈を結索後に切断し、低酸素暴露した HIE モデル動物が開発され、低酸素・脳虚血負荷後の急性期変化の形態学的、組織学的研究を中心に多様な研究がおこなわれている。これまでのモデル動物を用いた研究から、HIE の病態の成立には、脳虚血と低酸素暴露の両方が必要であり、その病態解明には、特に低酸素・虚血負荷後 24 時間ぐらいまでの急性期の変化をとらえることが重要であることが示唆されてきた。

HIE モデル動物を用いた最近の研究によって低酸素・虚血負荷後の脳でフリーラジカルが発生すること、負荷後のフリーラジカル発生を抑えるために、抗酸化剤を事前投与すると脂質過酸化や酸化窒素代謝物の生成が抑制され、神経細胞死が抑えられることなどが見出された。これらにより、低酸素・虚血負荷による脳障害の重要な因子の一つとして、低酸素・虚血負荷後のフリーラジカル発生が明らかになってきた。研究代表者らは、DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析によって、抗酸化剤を事前投与した HIE モデル動物の低酸素・虚血負荷後 7 日時点の遺伝子発現の変化を評価した。抗酸化剤事前投与の脳保護効果は、組織学的には明らかであったが、遺伝子発現に対する効果は、低酸素・虚血負荷による影響と比較すると軽微であった。しかしながら、低酸素・虚血負荷によって誘導される炎症関連遺伝子の発現を確かに抑制することが確認された。(Kojima et al., J. Mol. Neurosci., 2010)

HIE モデル動物の組織学的解析では、頸動脈結索切断側の脳に障害が起き、結索切断反対側の脳には、低酸素・虚血負荷後 7 週後でも障害がみられなかった。これに対し、結索切断反対側脳において低酸素・虚血負荷後少なくとも 7 週間以上の長期に渡って還元力が低下することが示された。そのため、HIE モデル動物の低酸素・虚血負荷後 7 週後の頸動脈結索切断反対側の遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現

解析によって評価した。その結果、頸動脈結索切断反対側の脳でも細胞死関連の遺伝子発現が増強され、遺伝子発現関連遺伝子など神経細胞で高発現の傾向にある遺伝子の発現が低下していることが示され、慢性期の頸動脈結索切断反対側での変化も重要であることが示唆された。(Kojima et al., J. Mol. Neurosci., 2013)

2. 研究の目的

HIE モデル動物の組織学的解析では、頸動脈結索切断側の脳に障害が起き、結索切断反対側の脳には、障害がみられなかったことから、頸動脈結索切断側の脳が解析対象とされてきた。これに対し、酸化還元能の解析結果から結索切断反対側の重要性が示唆されたことから、研究代表者らが結索切断反対側大脳の網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、障害後 7 週の慢性期においては、頸動脈結索反対側においても細胞死関連の遺伝子発現増強、遺伝子発現関連遺伝子の発現低下など重要な変化が起こっていることを見出した。しかしながら、HIE モデル動物の解析で重要とされる急性期頸動脈結索切断反対側遺伝子発現の解析は、未着手であった。本研究では、DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析によって HIE モデル動物の急性期の頸動脈結索切断対側の遺伝子発現に及ぼす低酸素・虚血負荷の影響の解明を目指した。

3. 研究の方法

HIE モデル動物の急性期における頸動脈結索切断反対側の大脳における全遺伝子発現の経時的变化を低酸素・虚血負荷を受けていない大脳における全遺伝子発現と比較解析し、発現変動する遺伝子群およびそれら遺伝子が関与するシグナル系の解明を行うことを目的として、HIE モデルラット大脳の網羅的遺伝子発現解析実験を行った。生後 7 日齢のラットの片側頸動脈を結索切断し低酸素暴露した HIE モデルラットと低酸素・虚血負荷を加えなかったラット大脳の負荷後 1 時間、3 時間、24 時間後の全遺伝子発現を頸動脈結索切断同側、反対側に分けて DNA マイクロアレイを用いて解析した。また、必要に応じて頸動脈結索切断のみのラットの遺伝子発現も比較対象として用いた。データの解析は、1 時間後と 24 時間後で頸動脈結索切断対側で 2 倍の発現変化のあった遺伝子を抽出して行った。

4. 研究成果

低酸素虚血負荷後 1 時間で発現増強する遺伝子 (表 1)
頸動脈結索切断対側大脳では、低酸素・虚血負荷後 1 時間には、Fos, Jun などの最初期遺伝子 (immediate early gene) や炎症に関与するサイトカイン、ケモカイン遺伝子などが多数発現増強していた。それらの多くは、低

酸素・虚血負荷後3時間では、発現増強を継続していたが、24時間後には、一部のケモカイン関連遺伝子等を除いて発現レベルが減少していた。それらの遺伝子は、頸動脈結索切断側でも発現増強が見られ、24時間後には、最初期遺伝子の発現は、低減していたが、炎症関連サイトカイン、ケモカイン遺伝子は、発現増強状態が続いていた。

頸動脈結索切断対側大脳で低酸素・虚血負荷後1時間に発現増強し24時間後発現レベルが減少する遺伝子の内、成長因子関連の一群の遺伝子(Epgn, Egr4, Nr4a3等)は、頸動脈結索切断側大脳では、発現低下していた。虚血のみで低酸素負荷を加えなかった場合には、上記遺伝子の発現増強は見られなかった。

低酸素虚血負荷後1時間で発現低下する遺伝子(表1)

発現増強遺伝子と比較すると少数ではあるが、神経伝達物質輸送タンパク遺伝子、膜貫通タンパク遺伝子に発現低下するものも認められた。それらの多くは、24時間後には、コントロールと同程度まで遺伝子発現が回復していた。しかしながら、神経伝達物質輸送タンパク遺伝子の発現は、24時間後も低下しており、頸動脈結索切断側でも、低酸素虚血負荷24時間後において、発現低下が継続していた。

表1 頸動脈切断対側で低酸素虚血負荷後1時間で発現変動する遺伝子の機能分類と発現変化

発現	遺伝子機能分類	切断対側		
		24時間	1時間	24時間
増強	最初期遺伝子	低下	増強	低下
	サイトカイン、ケモカイン	低下	増強	増強
	成長因子	低下	低下	低下
低下	神経伝達物質輸送	低下	低下	低下
	膜貫通タンパク	回復	低下	低下

低酸素虚血負荷後24時間で発現増強する遺伝子(表2)

頸動脈結索切断対側大脳では、低酸素・虚血負荷後24時間には、白血球遊走、増殖、細胞死関連遺伝子等、多くの炎症、免疫関連遺伝子が発現増強していたが、それらの多くは、1時間後には発現に変化はなく、3時間、24時間と経時的に発現が増強していた。頸動脈結索切断側での発現増強がより顕著であった。

低酸素虚血負荷後24時間で発現減少する遺伝子(表2)

頸動脈結索切断対側大脳で24時間後に発現減少する遺伝子は、発現増強遺伝子と比較して数は少ないが、神経系に発現する膜タンパク遺伝子、イオンチャネル遺伝子、前述の神経伝達物質輸送タンパク遺伝子が含まれていた。これらの多くは、負荷後1時間、3時間、24時間と経時的に発現が減少していた。また、頸動脈結索切断側でも発現低下が見ら

れ、コントロールでは1時間より24時間で発現増強していた。

表2 頸動脈切断対側で低酸素虚血負荷後24時間で発現変動する遺伝子の機能分類と発現変化

発現	遺伝子機能分類	切断対側		
		1時間	1時間	24時間
増強	炎症、免疫関連	変化なし	増強	増強
低下	膜貫通タンパク	変化なし	低下	低下

まとめ

以上の結果から、HIEモデル動物では、障害後1時間では、両側性にサイトカイン、ケモカイン等の遺伝子発現増強により、炎症反応が誘導され、結索切断側では、炎症反応誘導は24時間後も継続するが、結索切断対側では、その多くが沈静化する。障害後24時間には、頸動脈結索切断対側では、誘導された炎症反応が進行し、結索切断側では、炎症反応の誘導と進行が並行して起こる。また、結索切断対側においても障害後1時間後、24時間後に神経障害が一部進行している。これらの炎症反応、神経障害は、頸動脈結索による脳虚血のみでは進行しない。以上を示唆するものと考えられた。既報のように、組織学的解析で障害が認められないことを理由として頸動脈結索切断対側をコントロールとして扱うと(Hedtjärnet al., J Cereb Blood Flow Metab. 2004)炎症反応など両側性に生じる反応や頸動脈結索切断対側で固有に生じる反応を過小評価してしまう可能性があり、同疾患モデルにおいて、頸動脈結索切断対側大脳も重要な解析対象であると考えられた。

<引用文献>

Kojima T, Adati N, Ueda Y, Kitamoto A, Sato A, Huang MC, Noor J, Sameshima H, Ikenoue T. Gene network analysis to determine the effects of antioxidant treatment in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. J. Mol. Neurosci., 2010; 42(2):154-61.

Kojima T, Ueda Y, Sato A, Sameshima H, Ikenoue T. Comprehensive gene expression analysis of cerebral cortices from mature rats after neonatal hypoxic-ischemic brain injury. J. Mol. Neurosci., 2013;49(2):320-7.

Hedtjärn M, Mallard C, Eklind S, Gustafson-Brywe K, Hagberg H. Global gene expression in the immature brain after hypoxia-ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 2004;24(12):1317-32.

Hedtj rn M, Mallard C, Hagberg H.
Inflammatory gene profiling in the
developing mouse brain after
hypoxia-ischemia. J Cereb Blood Flow
Metab. 2004;24(12):1333-51.

5 . 主な発表論文等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小島 俊男 (KOJIMA, Toshio)
豊橋技術科学大学・健康支援センター・教授
研究者番号 : 00311340