

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860907

研究課題名(和文) 抗Aレセプター抗体を用いた周産期脳障害の治療法開発

研究課題名(英文) Developing a novel therapy with anti-A receptor antibody for perinatal brain injuries

研究代表者

齊藤 明子 (Saito, Akiko)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：50615276

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)：周産期低酸素性虚血性脳症に対する新規治療法の開発は急務である。本研究では、炎症性サイトカインであるAのレセプター抗体が、周産期脳障害の改善に対しても有効であるかを検討した。周産期脳障害モデルマウスに抗Aレセプター抗体を投与すると、有意にアポトーシスを抑制し、梗塞体積を減少させた。また、抗体は、脳内に移行し、サイトカインAの血中濃度は抗体投与により有意に上昇することがわかった。

研究成果の概要(英文)：It is urgent to develop novel therapies for infants with perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE). In the present project, we evaluated whether anti-A receptor antibody can exert treatment effect against perinatal HIE or not with perinatal HIE mice. We found that intraperitoneal injection of anti-A receptor antibody suppressed apoptosis, leading to smaller infarct volume. Anti-A receptor antibody injected intraperitoneally could migrate into injured brain, and increased serum cytokine A level significantly.

研究分野：新生児学

キーワード：周産期低酸素性虚血性脳症

## 1. 研究開始当初の背景

脳性麻痺は出生 1000 人に対し 2-3 人の割合で生じ、新生児医療が大きく進歩し救命率が向上した昨今においても、なお解決されていない重大な問題である。脳性麻痺の主要な原因の一つとして、新生児仮死に続発する低酸素性虚血性脳症 (hypoxic-ischemic encephalopathy; HIE) が挙げられ、その発症率については改善がない。なかでも、死亡または後遺症を残す重症 HIE の発症率は、1800 人/年と推定される。現在、HIE に対する有効性が示されている治療法は脳低温療法のみであるが、治療適応や設備等の問題があり万能の策とはいえず、HIE に対する新規治療法の開発は急務である。

炎症性サイトカインである A は中枢神経損傷において、その発生から回復に至るメカニズムにおいて非常に重要な役割を担っていることが知られている。サイトカイン A は、組織の直接損傷および炎症の発生、それによる二次的な損傷の発生に関与する。さらに近年では、神経幹細胞や前駆細胞への分化誘導への関与を通じて、グリア瘢痕の形成を促進する働きを持つことが判明してきた。脊髄損傷モデルマウスにおける検討では、マウス抗 A レセプター抗体の投与により、脊髄損傷後の炎症やグリア瘢痕の形成を抑制し、機能回復を促進することが報告されている (Mukai *et al.*: *Exp Neurol*, 2010)。

ヒト抗 A レセプター抗体は、キャスルマン病や関節リウマチの治療薬として既に臨床応用されている (Nishimoto *N et al.*: *Blood*. 2000, Nishimoto *N et al.*: *An, Rheum Dis*. 2007)。また、小児科領域においても、全身型の若年性関節リウマチの臨床治験において高い有効性を示している (Yokota *S, et al.* *Lancet*. 2008)。

## 2. 研究の目的

抗 A レセプター抗体の投与が周産期脳障害の改善に対しても有効である可能性が考えられる。また、臨床応用を視野に入れると、本抗体の有効性を証明することは、周産期脳障害の治療法開発において非常に意義深いことと考えられる。本研究課題では、周産期 HIE においての抗

A レセプター抗体を用いた治療の基礎研究を行い、早期に臨床応用可能な新規治療法の開発を目指す。

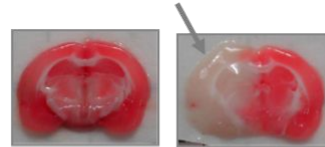
## 3. 研究の方法

### モデルの作製

生後 7 日齢の C57-BL 6J マウス (生後 1 日目に 1 母獣あたり仔 6 - 8 匹に調整) の右総頸動脈を二重結紮・切離し、休息の後、8% 酸素 20 分の負荷を加えた。

### 梗塞面積の評価

抗体投与群では抗 A レセプター抗体 100 $\mu$ g / 体重(g)を、対照群では同量の rat IgG を、低酸素虚血負荷の直前に腹腔内投与した。負荷から 48 時間後に各群同部位の脳切片 6 枚の TTC (2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride, TTC) 染色を行い、平均虚血面積を比較した。



TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) による脳切片染色の例 ...梗塞部位は染色されない

また、サブ解析として、受傷の程度(軽症、対照群の平均梗塞面積 5%; 中等症、5<梗塞面積 10%; 重症、梗塞面積>10%)による抗体投与の有効性の違いを評価した。

### 急性期受傷マーカーによる評価

上記と同じようにモデルを作製、抗体を投与した。受傷 24 時間後に灌流固定後、5 $\mu$ m のパラフィン切片を作製し、抗 Active caspase-3 抗体により免疫組織染色した。Caspase 陽性細胞を、Stereo Investigator version 10 (MicroBrightField Europe EK, Magdeburg, Germany)を用いカウントした。

### 血中サイトカイン A 濃度の変化

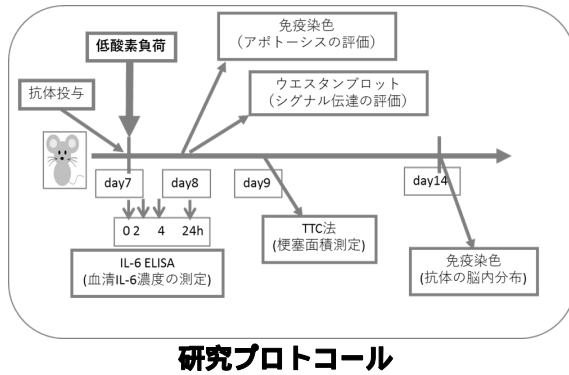
抗体投与後 0, 2, 4, 24 時間の時点で両群のマウス心臓より採血し、血清を分離した。Mouse A ELISA kit (Endogen co. Ltd.)にて血清中 A サイトカイン濃度を測定した。

### 抗体の脳内移行の確認

抗体投与群、対照群1 (rat IgG 投与)、対照群2 (溶媒投与) の3群より抗体投与後(負荷後) 3時間で脳を摘出した。パラフィン切片を作製し、抗 rat IgG 抗体による免疫染色を行った。

### シグナル伝達への影響

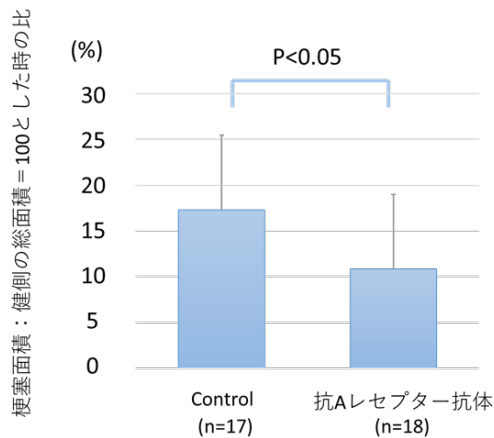
上記と同じようにモデルを作製、抗体を投与した。受傷24時間後にタンパクを抽出し、ウエスタンブロット法で Stat-3、Akt、MapK のリン酸化に関して調べた。



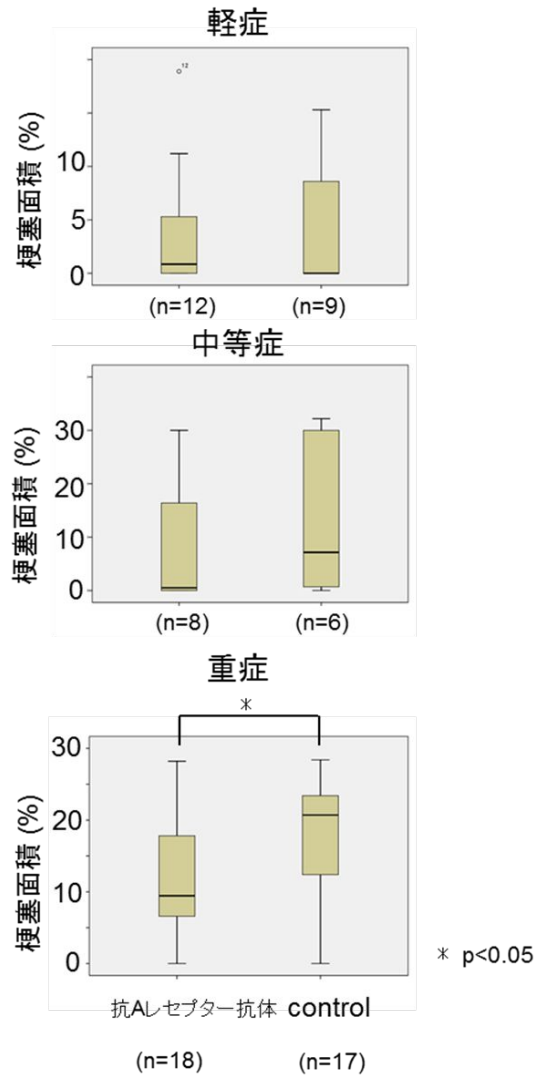
## 4. 研究成果

### 梗塞面積の評価

コントロール群の17.3%に対し、抗体投与群では10.8%であり、抗体投与により有意に梗塞面積を縮小することがわかった。

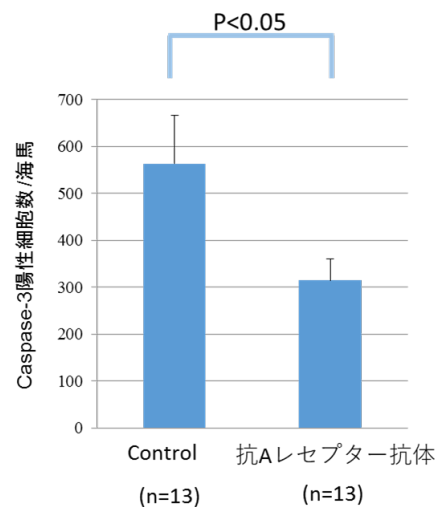


### 梗塞面積 (受傷程度による効果の違い)



軽症、中等症では、治療効果は有意ではなかったが、重症では有意に梗塞面積を減少させた。

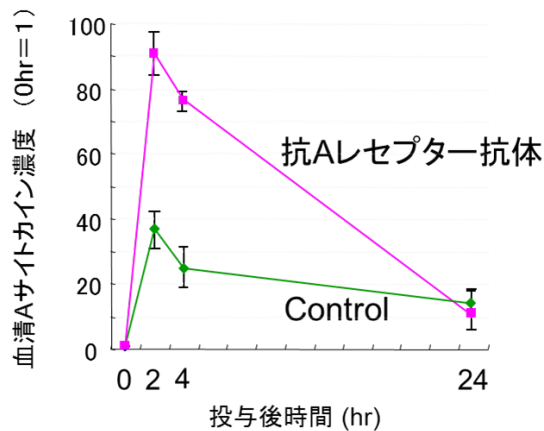
### 急性期受傷マーカーによる評価



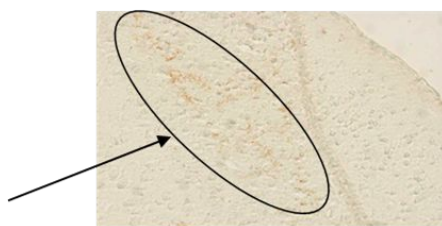
陽性細胞は海馬にのみ認められた。海馬においての細胞数は、コントロール群で  $563 \pm 103$  個/海馬に対し、抗 A レセプター抗体投与群では、 $315 \pm 45$  個/海馬であり、抗 A レセプター抗体を投与することにより陽性細胞を 44% 減少させた ( $p < 0.05$ )

### 血中サイトカイン A 濃度の変化

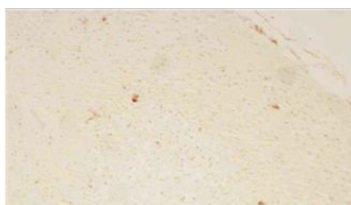
A サイトカイン濃度のピークは負荷後 (投与後) 数時間のところにあり、24 時間後には基礎値に近くなった。抗体投与群では A レセプターがブロックされているため、positive feedback が生じて血清中の A サイトカイン濃度が非常に高値となると考えられた。



### 抗体の脳内移行の確認



抗体投与群



対照群1



対照群2

抗体投与群では抗体の脳局在が確認されたが、対照群 1 (rat IgG 投与) 対照群 2 (溶媒投与) では確認できなかった。

### シグナル伝達への影響

PBS を投与した群と抗 A レセプター抗体群で Stat-3、Akt、MapK、またそれぞれのリン酸化されたタンパク (p-Stat-3、p-Akt、p-MapK) のバンドを比較したが、両群間で差を認めなかった。

### 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 2 件)

Sato Y, Oshiro M, Takemoto K, Hosono H, Saito A, Kondo T, Aizu K, Matsusawa M, Futamura Y, Asami T, Terasaki H, Hayakawa M. Multicenter observational study comparing sedation/analgesia protocols for laser photocoagulation treatment of retinopathy of prematurity. J Perinatol. 2015;35(11):965-9. (査読あり)

齊藤明子、早川昌弘 母子感染からみた新生児細菌感染症、周産期医学増刊：周産期感染症 2014 / 東京医学社、44、2014、294-296 (査読なし)

[学会発表](計 4 件)

齊藤明子 当院における NICU アウトブレイクとその対応 小児科学会東海地方会 (招待講演) 2014 年 10 月 05 日 藤田保健衛生大学 (豊明市)

齊藤明子、佐藤義朗、鈴木俊彦、杉山裕一郎、伊藤美春、孫田みゆき、近藤大貴、藤巻英彦、中村裕子、佐藤義朗、早川昌弘 HIE モデルマウスにおける抗 IL-6 レセプター抗体の効果、第 50 回周産期新生児学会、2014 年 07 月 15 日 ~ 2014 年 07 月 15 日、シェラトン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル (千葉県浦安市)

齊藤明子 Opitz Kaveggia 症候群を疑う一例 第 23 回 Dysmorphology の夕べ 2014

年 4 月 10 日 名古屋市立大学（名古屋市）

齊藤明子 当院NICUにおけるMRSA  
アウトブレイクと、その対応、第 58 回日本  
未熟児新生児学会、2013 年 11 月 30 日～2013  
年 12 月 02 日、石川県立音楽堂（金沢市）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：新生児低酸素性虚血性脳症の予防又は  
治療剤及びその利用

発明者：佐藤義朗、齊藤明子

権利者：名古屋大学

種類：特許

番号：2014 - 022411

出願年月日：2014 年 02 月 07 日

国内外の別：国内

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

齊藤明子 ( Saito Akiko )

名古屋大学・医学系研究科・病院助教

研究者番号：50615276

(2)研究分担者

なし