

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09718

研究課題名(和文) 新生児低酸素性虚血性脳症に対する脳低温療法におけるグリアに注目した新規脳保護療法

研究課題名(英文) Hypothermia attenuate brain damage by coordinating the function of glia

研究代表者

垣田 博樹 (Kakita, Hiroki)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：40528949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：新生児低酸素性虚血性脳症(HIE)に対して現在まで報告されている有効な治療法としては、低体温療法のみである。本研究ではHIEに対する低体温療法によるグリア機能制御による脳内の微小環境改善を視野に入れた検討を行った。培養アストロサイト、ミクログリアにおいて低酸素負荷を行い、これらの細胞を低温状態(32-34℃)にすることにより、iNOS、炎症性サイトカインの発現が抑制されることを明らかにした。さらに神経保護作用を有するErythropoietinは低温状態により、高発現が持続することを明らかにした。本研究により、現在もなお予後不良疾患であるHIEの病因および治療法の開発に貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Hypothermia has been reported to be only effective therapy for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy (HIE). We performed the examination of microenvironment improvement of glial function control with hypothermia. We found hypothermia (32-34℃) decreased the expression of iNOS and inflammatory cytokine in cultured glia under hypoxic condition. Furthermore, erythropoietin having neuroprotective effect made clear that overexpression lasted by a low temperature state. We found that these protein expression adjustment by hypothermia decreased brain damage. This study might contribute to the development of an etiology of HIE which is still a poor prognosis and the cure.

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 一酸化窒素 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。

新生児仮死に伴う虚血再灌流や感染などの炎症が起こると、脳内環境に関わるアストロサイトや脳内炎症に関わるミクログリアの活性化が生じる。主としてアストロサイトからグルタミン酸などの興奮性アミノ酸が放出される。この興奮性アミノ酸が NMDA 受容体を介してアストロサイトやミクログリアから一酸化窒素 (NO)、フリーラジカル、炎症性サイトカインなどのケミカルメディエータを誘導する。これらのケミカルメディエータは直接的、あるいはミクログリアの貪食能を亢進させることで間接的にニューロンを傷害する。低体温療法は血液脳関門の保持、興奮性アミノ酸、フリーラジカル、炎症性サイトカイン産生抑制、さらに抗炎症性サイトカインの誘導などにより脳損傷を抑制すると考えられている。

しかしながらその脳保護メカニズムについては十分に解明されていない。さらなる治療成績の向上のためには、とりわけグリアの機能制御に着目した脳保護メカニズムの解明は必要不可欠であると考ええる。

2. 研究の目的

本研究の目的は HIE による脳損傷に対する低体温療法の脳保護メカニズムを解明することである。さらに低体温療法の治療向上を可能とするグリアの活性化調節に基づく新規治療法の確立を目指す。

HIE において低体温療法が有効であることは証明されているが、その効果は限定的である。また低体温療法による脳保護の詳細なメカニズムはいまだ不明である。低体温療法は一見メカニズムの解明が曖昧になりがちな治療である。本研究ではグリアの機能制御に着目し、分子生物学的な手法を用い解析することを目的とする。細胞レベルでの HIE とグリアの関係を明らかにすることで、HIE に対してさらに病態に踏み込んだ特異的治療法の確立が期待できる。細胞および分子レベルでの治療効果のメカニズム、新規治療法の開発は低体温療法の治療成績向上のために極めて重要であると考ええる。

3. 研究の方法

1. 低酸素・低栄養状態、LPS 刺激による影響

培養グリア (アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア)、ニューロンに低酸素負荷と LPS 刺激を加え、細胞傷害および各種ケミカルメディエータを測定し、細胞傷害に影響を与えるケミカルメディエータについて検討する。サイトカイン、8-OHdG の測定は ELISA 法を用いる。興奮性アミノ酸はウエスタンブロット法、細胞傷害については MTT assay、LDH 測定、TUNEL 染色で評価する。ミクログリアの活性化については形態変化、マイクロビーズを用いた貪食能の解析を行う。オリゴデンドロサイトに関しては、ミエリン形成タンパクの発現を中心に解析を行う。

2. 低温状態による影響

刺激を加えた培養細胞を臨床現場の治療

の際に行われている 34 の低温状態に 72 時間おき、細胞傷害および各種ケミカルメディエーターの変化を検討する。また最適な低体温療法の方法をグリアの機能制御から検討するため、温度と持続時間の条件を替えて検討する。アストロサイト、ミクログリアが放出するケミカルメディエーターがニューロン、オリゴデンドロサイトに与える影響を、低酸素・無糖状態、LPS 刺激で得られたコンディションメEDIUMを用いて細胞傷害性について検討する。また、細胞間の直接的な影響を調べるため、アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイト、ニューロンの共培養を行い、ニューロン、オリゴデンドロサイトの細胞傷害を調べる。さらに低温状態によってニューロン、オリゴデンドロサイトの細胞傷害が抑制されるかを検討する。細胞傷害ならびに低温状態による細胞保護に関与すると考えられる EPO, iNOS, その他ケミカルメディエーターに関しては、miRNA を用い遺伝子発現を抑制し細胞傷害について検討する。

3. モデルラットの解析

LPS 投与、低酸素虚血モデルラットおよび低酸素虚血のみの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。また *in vitro* ですでに明らかになっている EPO と iNOS の発現変化が *in vivo* の解析により脳内でも起きるかを確認し、低体温療法による発現変化の局在部位を免疫染色により検討する。さらに上記 *in vitro* で明らかになったケミカルメディエーターに関しても *in vivo* で脳内での発現変化を確認する。

4. 研究成果

培養アストロサイト、ミクログリアにおい

て低酸素負荷を行い、iNOS/erythropoietin、各種サイトカインが誘導されることを遺伝子・タンパクレベルでの発現で確認した。さらにこれらの細胞を低温状態 (32-34) にすることにより、iNOS、炎症性サイトカインの発現が抑制されることを明らかにした。また神経保護作用を有する erythropoietin は低温状態により、高発現が持続することを明らかにした。さらにこれらの発現調節には NF B、HIF1 が関与していることを明らかにした。また低温状態による iNOS、erythropoietin、炎症性サイトカインの発現調節がミクログリアの活性化を抑制し、細胞障害を軽減させることを明らかにした。

モデルラットの解析を現在行っているが、細胞培養の実験結果と同様の結果が得られた。研究期間内に論文完成は間に合わなかったが、現在これらの結果をもとに論文作成を行っている。HIE の病態ならびに低体温療法における脳保護メカニズムは未だ不明である。またグリアに着目した基礎研究はほとんどない。本研究により、現在もなお予後不良疾患である HIE の病因および治療法の開発に貢献できるものとする。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

Ueda H, Numoto S, Kakita H, Takeshita S, Muto D, Goto T, Mizuno H, Okumura A, Yamada Y. Neonatal Central Diabetes Insipidus Caused by Severe Perinatal Asphyxia *Pediat Therapeut* 2016, 6: 278

Muto D, Kakita H, Takeshita S, Ueda H, Goto T and Yamada Y

Fatal Tension Pneumopericardium in an Extremely Low Birth Weight Infant to Identify the Perforation Site of the

Pericardium

Pediat Therapeut 2016, 6: 277

Tamura T, Aoyama M, Ukai S, Kakita H, Sobue K, Asai K. Neuroprotective erythropoietin attenuates microglial activation, including morphological changes, phagocytosis and cytokine production.

Brain Res 1162:65-74.2017

Goto Y, Aoyama M, Sekiya T, Kakita H, Waguri-Nagaya Y, Miyazawa K, Asai K, Goto S. CXCR4⁺ CD45⁻ Cells are Niche Forming for Osteoclastogenesis via the SDF-1, CXCL7, and CX3CL1 Signaling Pathways in Bone Marrow.

Stem Cells 34:2733-2743. 2016

Takeshita S, Ueda H, Goto T, Muto D, Kakita H, Oshima K, Tanaka T, Ono T, Kazaoka Y, Yamada Y. Case report of Pierre Robin sequence with severe upper airway obstruction who was rescued by fiberoptic nasotracheal intubation.

BMC Anesthesiol. 17:43. 2017

Inagaki Y, Kubota E, Mori Y, Aoyama M, Kataoka H, Johnston RN, Joh T. Anti-tumor efficacy of oncolytic reovirus against gastrointestinal stromal tumor cells.

Oncotarget 8:115632-115646 2018

Tatematsu N, Waguri-Nagaya Y, Kawaguchi Y, Oguri Y, Ikuta K, Kobayashi M, Nozaki M, Asai K, Aoyama M, Otsuka T. Mithramycin has inhibitory effects on gliostatin and

matrix metalloproteinase expression induced by gliostatin in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes.

Mod rheumatol 28:495-505 2018

Ohmae S, Noma N, Shinohara M, Takeiri M, Fuji H, Takemoto K, Iwaisako K Fujita T, Takeda N, Kawatani M, Aoyama M, Hagiwara M, Ishihara Y, Asagiri M. Actin-binding protein coronin 1A controls osteoclastic bone resorption by regulating lysosomal secretion of cathepsin K.

Sci Rep 7:41710 2017

〔学会発表〕(計2件)

垣田博樹、竹下覚、上田博子、山田恭聖. エリスロポエチンのミクログリア活性抑制による神経保護作用.

第53回日本周産期新生児学会 2017年

垣田博樹、長屋嘉顕、竹下覚、上田博子、後藤盾信、武藤大輔、山田恭聖. 炎症性サイトカイン TNF によるアストロサイトから分泌される神経保護因子エリスロポエチンの産生抑制メカニズムの解明.

第61回日本新生児生育学会

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

垣田 博樹 (KAKITA Hiroki)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：40528949

(2)研究分担者

青山 峰芳 (AOYAMA Mineyoshi)

名古屋市立大学・薬学部・教授

研究者番号：70363918

浅井 清文 (ASAI Kiyofumi)

名古屋市立大学・医学部・教授

研究者番号：70212462

(3)連携研究者

なし

研究者番号：

(4)研究協力者

なし