

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K10086

研究課題名(和文) グリアに着目した急性脳炎・脳症の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenesis of acute encephalitis/encephalopathy with a focus on glia

研究代表者

倉橋 宏和 (Kurahashi, Hirokazu)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：30621817

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)：グリアは脳内微小環境の恒常性維持に関与している。グリアに着目することで急性脳炎・脳症の病態をニューロン障害とは異なる面から理解し、新規治療の開発につながる可能性がある。本研究では、低環境温がミクログリアの活性化を抑制し、神経細胞の損傷を軽減する効果が示された。低環境温での培養BV-2ミクログリア細胞は、炎症性サイトカインおよび誘導型一酸化窒素合成酵素の発現が低下し貪食作用も抑制された。

また、可逆性脳梁膨大部病変をもつ軽症脳炎・脳症(MERS)2家系において、発端者および有症状者に、グリア細胞のひとつであるオリゴデンドロサイトの遺伝子発現を制御するMYRF遺伝子のミスセンス変異を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究は、低体温療法がミクログリアの炎症反応を抑制することで神経保護に寄与している可能性を示唆している。低体温療法は、ミクログリアの活性化抑制の観点からも、急性脳炎・脳症の治療において有望なアプローチとなっている可能性がある。

MYRF (Myelin Regulatory Factor) は成熟したオリゴデンドロサイトで発現するDNA制御因子であり、MBP、PLPなどのミエリン関連遺伝子の発現に関与している。MERSにおけるMYRF遺伝子変異の同定はグリアが関与する急性脳症という新たな概念を裏付けている。これらの研究成果は、グリアに着目した急性脳炎・脳症の治療法開発に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：Glia are involved in the homeostasis of the brain microenvironment. By focusing on glia, it is expected that the pathophysiology of acute encephalitis and encephalopathy can be understood from a different perspective than neuronal damage, which may lead to the development of novel therapies. In the present study, the effect of therapeutic hypothermia on microglial activation was shown to reduce neuronal damage. Cultured BV-2 microglial cells under hypothermia showed significantly reduced expression of inflammatory cytokines and iNOS, and hypothermia also suppressed BV-2 cell phagocytosis. In addition, a missense variant in the MYRF gene, which regulates gene expression in oligodendrocytes, one of the glial cells, were identified in two families with mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenial lesion (MERS).

研究分野：小児科学、神経科学、臨床神経学

キーワード：ミクログリア オリゴデンドロサイト ミエリン サイトカイン MYRF

1. 研究開始当初の背景

(1) 小児の急性脳炎・脳症とその治療法

小児の急性脳炎・脳症では、死亡および後障害を約3分の1の症例に認める。特に高サイトカイン血症が関与すると考えられる急性壊死性脳症や出血性ショック脳症症候群ではより予後が不良である。近年、低体温療法や脳平温療法などの体温管理が蘇生後脳症や新生児脳症の予後を改善することが明らかになり、小児の急性脳炎・脳症においてもその適用が始まっている。しかし、小児においては無作為比較試験のようなエビデンスレベルが高い研究は倫理的に困難であり、その有効性が証明されていない。また、臨床の現場では、体温管理のみでは十分な効果が得られない症例も多く、体温管理と併用する新規治療法の開発も必要である。新規治療法を開発するためには、その導入として実験室レベルでの有効性の証明が必要であるが、小児の急性脳症については十分に進んでいるとは言えないのが現状である。

(2) 急性脳炎・脳症とグリア

従来の急性脳炎・脳症の研究は、ニューロンに対する障害に焦点を当てたものがほとんどであった。しかし、近年グリアが従来考えられた以上に脳において重要な働きを持っていることが明らかになりつつある。グリアは神経栄養因子の合成と分泌・過剰に放出されたカリウムなどのイオンの再取り込み・神経伝達物質の回収などにより、ニューロンおよびその周囲組織の恒常性を維持している。さらに近年の研究からグリアには多種多様な神経伝達物質の受容体が発現し、グリア細胞自身もイオンを放出するなど、シグナル伝達等に対する動的な役割も果たしていることが次々に示されている。中枢神経系の組織マクロファージであるミクログリアは、サイトカインの放出、デブリの除去、組織の恒常性の維持に関与している。また、小児の急性脳症による死亡例の脳の組織学的解析の結果から、アストロサイトの障害が有意であることも明らかになってきた。これらのことから、グリアの機能異常が急性脳炎・脳症の病態の中で果たす役割を解明することが、急性脳炎・脳症の病態解明や治療法の開発に有用である可能性がある。

2. 研究の目的

(1) グリアに着目した低環境温の治療効果の検討

我々は以前から、新生児の低酸素性虚血性脳症や高サイトカイン血症が脳に障害をもたらす機序について、グリアに着目した研究成果を報告してきた。これらの研究で用いた実験方法を急性脳炎・脳症の病態解明や新規治療法の開発に応用し、グリアを介した低体温療法の効果を明らかにすることを目的とした。具体的には、活性型ミクログリアが示すサイトカイン放出や誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)放出、貪食能などの機能を低環境温が抑制するかどうかを検証した。

(2) 急性脳炎・脳症の遺伝学的背景の解明

急性脳炎・脳症の原因は多岐にわたるが、グリアと関連する遺伝学的背景をもつ急性脳炎・脳症も存在する可能性がある。そのため我々は家族性の急性脳炎・脳症症例に対して遺伝学的解析を行い、その遺伝学的背景を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ミクログリアに対するリポ多糖(LPS)、低酸素・低糖濃度刺激の影響の検討

LPS投与と低酸素・低糖濃度環境刺激を単独または組み合わせて負荷することに対する培養ミクログリアの反応を観察した。上記の刺激ごとに、炎症性サイトカインTNF α 、IL-6、IL-1 β およびiNOSを測定した。その結果、LPS刺激では炎症性サイトカインとiNOSの上昇を認めたが、

低酸素・低糖濃度刺激のみでは iNOS のみ上昇し炎症性サイトカインの上昇を認めなかった。LPS 及び低酸素・低糖濃度環境を組み合わせた場合は、iNOS がより高値となり、炎症性サイトカインは上昇するものの LPS 単独刺激ほどは上昇しなかった。

(2) ミクログリアの活性化およびニューロン損傷に対する低環境温の抑制作用の解析

LPS 単独刺激が炎症性サイトカインと iNOS の両者を効率よく上昇させることから、LPS で刺激されたグリアを通常温 (37.0) および低環境温 (33.5) に置き、低環境温がグリアの活性化を抑制し、神経細胞の損傷を軽減するかを観察した。まず、マウス由来の BV-2 ミクログリア細胞を培養し、細胞の密度を調整した。その後、細胞を LPS で刺激し、細胞を 37 の通常温度下で培養した。次にこれらの細胞を、通常温度のまま培養した群と、33.5 の低環境温を適用した群に分けた。その後、BV-2 細胞のサイトカイン産生と貪食作用を測定し、通常温と低環境温で比較した。サイトカイン産生は、IL-1、IL-6、TNF- α 、IL-10、および IFN- γ を ELISA 法を用いて測定した。また、貪食作用は、ラテックスビーズを BV-2 細胞培養環境に添加し、貪食されたビーズの数を数えることで測定した。

(3) 可逆性脳梁膨大部病変をもつ軽症脳炎・脳症 (MERS) 家系の遺伝学的解析

我々は3世代にわたって、発熱時のけいれん、異常言動などの症状を呈した家系を経験した。発端者は同症状を反復し、またそのたびに頭部 MRI にて脳梁および深部白質の拡散低下所見を認めたことから、家族性・反復性の MERS と診断した。遺伝形式は常染色体顕性 (優性) 遺伝に矛盾しなかった。この家系に対し全エクソーム解析を行い、原因遺伝子の絞り込みを行った。

4. 研究成果

(1) 低環境温はミクログリアの活性化および神経細胞損傷を抑制する

本研究では、低体温療法が微小膠細胞の活性化を抑制し、神経細胞の損傷を軽減する効果が示された。低体温療法下での BV-2 細胞は、炎症性サイトカインの発現と iNOS の発現が有意に低下した。また、低体温療法は BV-2 細胞の貪食作用も抑制した。ラテックスビーズの貪食率が低下し、貪食能力が低下したことが示された。これらの結果は、低体温療法が微小膠細胞の炎症反応を抑制し、神経細胞の保護に寄与する可能性を示唆している。低体温療法は、神経疾患の治療において有望なアプローチとなる可能性がある。ただし、本研究は in vitro での実験であり、in vivo での実験や臨床試験が必要である。

(2) 家族性・反復性 MERS の原因遺伝子として MYRF 遺伝子を同定

家族性・反復性 MERS 家系に対する全エクソーム解析では、発端者および有症状者に、MYRF 遺伝子のミスセンス変異 c.1208A>G (p.Gln403Arg) を同定した。この結果をもとに、MERS 症例 36 例に対し、サンガーシークエンス法を用いた MYRF 遺伝子解析を行い、そのうち 1 家系 3 同胞において、発端者家系と同様の変異を同定した。

MYRF (Myelin Regulatory Factor) は成熟したオリゴデンドロサイトで発現する DNA 制御因子であり、MBP、PLP などのミエリン関連遺伝子の発現に関与している。MERS における MYRF 遺伝子変異の同定はグリアが関与する急性脳症という新たな概念を裏付けるものとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kimura Tomoka, Toriuchi Kohki, Kakita Hiroki, Tamura Tetsuya, Takeshita Satoru, Yamada Yasumasa, Aoyama Mineyoshi	4. 巻 41
2. 論文標題 Hypothermia Attenuates Neuronal Damage via Inhibition of Microglial Activation, Including Suppression of Microglial Cytokine Production and Phagocytosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 459 ~ 468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10571-020-00860-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okumura Akihisa, Takagi Mizuki, Numoto Shingo, Iwayama Hideyuki, Azuma Yoshiteru, Kurahashi Hirokazu	4. 巻 122
2. 論文標題 Effects of l-carnitine supplementation in patients with childhood-onset epilepsy prescribed valproate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Epilepsy & Behavior	6. 最初と最後の頁 108220 ~ 108220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yebeh.2021.108220	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ogawa Chikako, Kidokoro Hiroyuki, Ishihara Naoko, Tsuji Takeshi, Kurahashi Hirokazu, Hattori Ayako, Suzuki Motomasa, Ogaya Shunsuke, Ito Yuji, Fukasawa Tatsuya, Kubota Tetsuo, Okumura Akihisa, Saitoh Shinji, Natsume Jun	4. 巻 109
2. 論文標題 Splenic Lesions in Benign Convulsions With Gastroenteritis Associated With Rotavirus Infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Neurology	6. 最初と最後の頁 79 ~ 84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pediatrneurol.2019.05.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura Nami, Muto Taichiro, Masuda Yu, Numoto Shingo, Kodama Shunsuke, Miyamoto Ryosuke, Miyata Kenji, Hayakawa Tomohito, Mori Hiromitsu, Kuroyanagi Yoshiyuki, Akaihata Mitsuko, Iwayama Hideyuki, Kurahashi Hirokazu, Shimomura Yasuhito, Nagai Takuhito, Horii Toshinori, Agata Hiroatsu, Okumura Akihisa	4. 巻 39
2. 論文標題 Procalcitonin as a Biomarker of Unresponsiveness to Intravenous Immunoglobulin for Kawasaki Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Infectious Disease Journal	6. 最初と最後の頁 857 ~ 861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/INF.0000000000002716	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Toshiyuki, Imaizumi Taichi, Yamamoto-Shimajima Keiko, Kurahashi Hirokazuら,	4. 巻 41
2. 論文標題 Genomic backgrounds of Japanese patients with undiagnosed neurodevelopmental disorders	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 776 ~ 782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2019.05.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okumura Akihisa, Shimajima Keiko, Kurahashi Hirokazuら.	4. 巻 71
2. 論文標題 PRRT2 mutations in Japanese patients with benign infantile epilepsy and paroxysmal kinesigenic dyskinesia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Seizure	6. 最初と最後の頁 1 ~ 5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.seizure.2019.05.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okumura Akihisa, Kurahashi Hirokazu, Iwayama Hideyuki, Numoto Shingo	4. 巻 41
2. 論文標題 Serum carnitine levels of children with epilepsy: Related factors including valproate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 516 ~ 521
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2019.02.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shima Taiki, Okumura Akihisa, Kurahashi Hirokazu, Numoto Shingo, Abe Shinpei, Ikeno Mitsuru, Shimizu Toshiaki	4. 巻 41
2. 論文標題 A nationwide survey of norovirus-associated encephalitis/encephalopathy in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 263 ~ 270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2018.11.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okumura Akihisa, Maruyama Koichi, Shibata Mami, Kurahashi Hirokazu, Ishii Atsushi, Numoto Shingo, Hirose Shinichi, Kawai Tomoko, Iso Manami, Kataoka Shinsuke, Okuno Yusuke, Muramatsu Hideki, Kojima Seiji	4. 巻 40
2. 論文標題 A patient with a GNAO1 mutation with decreased spontaneous movements, hypotonia, and dystonic features	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 926 ~ 930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2018.06.005	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurahashi Naoko, Miyake Noriko, Mizuno Seiji, Koshimizu Eriko, Kurahashi Hirokazu, Yamada Keitaro, Natsume Jun, Aoki Yusuke, Nakamura Miho, Taniyai Hiroko, Maki Yuki, Abe-Hatano Chihiro, Matsumoto Naomichi, Maruyama Koichi	4. 巻 39
2. 論文標題 Characteristics of epilepsy in patients with Kabuki syndrome with KMT2D mutations	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 672 ~ 677
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2017.03.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurahashi Hirokazu, Azuma Yoshiteru, Masuda Akio, Okuno Tatsuya, Nakahara Eri, Imamura Takuji, Saitoh Makiko, Mizuguchi Masashi, Shimizu Toshiaki, Ohno Kinji, Okumura Akihisa	4. 巻 83
2. 論文標題 MYRF is associated with encephalopathy with reversible myelin vacuolization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Neurology	6. 最初と最後の頁 98 ~ 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ana.25125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizuguchi Takeshi, Kurahashi Hirokazu, et al.	4. 巻 27
2. 論文標題 Loss-of-function and gain-of-function mutations in PPP3CA cause two distinct disorders	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 1421 ~ 1433
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddy052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 倉橋宏和、沼本真吾、東慶輝、岩山秀之、奥村彰久、石井敦士、廣瀬伸一、松本直通、水口 剛、土田奈緒美、瀧澤まりな、内山由理、山本俊至、高橋悟
2. 発表標題 当院のてんかん外来における遺伝学的解析の有用性
3. 学会等名 第63回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirokazu Kurahashi, Shingo Numoto, Akihisa Okumura, Tsuyoshi Mizuguchi, Naomi Tsuchida, Naomichi Matsumoto
2. 発表標題 A case of developmental epileptic encephalopathy with PPP3CA mutation
3. 学会等名 The 21st Annual Meeting of the Infantile Seizure Society (ISS) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 倉橋 宏和、沼本 信吾、岩山 秀之、奥村 彰久
2. 発表標題 Weekly ACTH療法における甲状腺および副腎皮質機能の推移
3. 学会等名 第62回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 倉橋 宏和、沼本 真吾、奥村 彰久、加藤 耕治、荻 朋男、遠山 美穂、星野 愛、水口 雅
2. 発表標題 可逆性脳梁膨大部病変を伴う軽症脳症におけるMYRF関連遺伝子の解析
3. 学会等名 第61回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 倉橋 宏和、沼本 真吾、奥村 彰久、石井 敦士、廣瀬 伸一
2. 発表標題 Dravet症候群における発熱時および平熱時の免疫学的反応の解析
3. 学会等名 第53回 日本てんかん学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 倉橋 宏和、東 慶輝、増田 章男、奥野 達矢、中原 絵里、今村 卓司、斎藤 真木子、水口 雅、大野 欣司、奥村彰久
2. 発表標題 脳梁膨大部病変を有する軽症脳症におけるMYRF遺伝子パリアント
3. 学会等名 第60回日本小児神経学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 倉橋 宏和
2. 発表標題 SCN1A遺伝子変異症例における免疫学的反応の解析
3. 学会等名 第52回日本てんかん学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	垣田 博樹 (Kakita Hiroki) (40528949)	愛知医科大学・医学部・講師 (33920)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	奥村 彰久 (Okumura Akihisa) (60303624)	愛知医科大学・医学部・教授 (33920)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関