

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07832

研究課題名(和文) 新生児低酸素性虚血性脳症に対するグリア由来脳内微小環境改善による新規低体温療法

研究課題名(英文) New hypothermia therapy by the glial microenvironment for the neonatal hypoxic ischemic encephalopathy

研究代表者

垣田 博樹 (Hiroki, Kakita)

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：新生児の後遺症なき生存を阻む大きな壁は脳障害である。近年、低体温療法が新生児低酸素性虚血脳症における治療法として確立している。しかし、その効果は限定的である。低体温療法は興奮性アミノ酸、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傷害を抑制すると考えられている。今回の研究で申請者は、アストロサイトが分泌するエリスロポエチン(EPO)が、低体温療法における脳保護に重要であることを明らかにした。さらに低体温療法はミクログリアにおいてNF- κ Bの活性化を抑制することで、神経保護効果を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児の後遺症なき生存を阻む大きな壁は脳障害である。近年、低体温療法が新生児低酸素性虚血脳症における治療法として確立している。しかし、その効果は限定的である。今回の検討で低体温療法の脳保護メカニズムの一部をグリアの機能制御という観点で明らかにできた。本研究はグリアに注目した基礎研究で、低体温療法の脳保護メカニズムのさらなる解明、新規補充治療法の開発につながると期待できる。さらにグリアの機能を制御することで低体温療法が施行困難な早産児の脳室周囲白質軟化症も含めた包括的な新生児脳障害の治療成績を向上させることにもつながると考えられる

研究成果の概要(英文)：Hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) has a high morbidity rate and involves severe neurologic deficits, including cerebral palsy. Therapeutic hypothermia (TH) has been shown to decrease the mortality rate and provide neuroprotection in infants with HIE. We demonstrated that hypothermia after oxygen/glucose deprivation stabilized HIF-EPO signaling in astrocytes, and upregulated EPO expression could suppress neuronal apoptosis. In addition, we demonstrated that, under hypothermic conditions, expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) was suppressed. In addition, phagocytosis of latex beads was significantly suppressed in BV-2 cells under hypothermic conditions. Investigating the neuroprotective effect of EPO from astrocytes and microglia function under hypothermic conditions may contribute to the development of novel neuroprotection-based therapies for HIE

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 アストロサイト ミクログリア 低体温療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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。

2. 研究の目的

HIE に対する有効性が唯一証明されている治療は低体温療法であるが、その効果は限定的であり、**低体温療法**を強力に補完する新規治療法の確立は喫緊の課題である。これまでわれわれは、HIE の発症ならびに**低体温療法**の効果に酸化ストレスが関与していることを明らかにした。また様々な疾患モデルにおいてグリアが疾患の増悪や神経保護において、多面的かつ主体的に関与していることを明らかにしてきた。これらの研究成果をもとに**低体温療法**の脳保護メカニズムを、グリア機能に着目して解明する。さらにグリア機能を制御するという全く新しい脳内の微小環境改善戦略で、低体温療法を補完しその治療成績を向上させる新規治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

1. 低酸素・低栄養状態、LPS 刺激、低温状態が培養細胞に与える影響 (担当: 垣田)

・ 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ーを測定し、細胞傷害に影響を与えるケミカルメディエーターについて検討する。すでに申請者らは細胞傷害性を示す iNOS および細胞保護効果を示す EPO が低酸素・低栄養状態で発現誘導されることと、炎症を惹起する LPS 刺激により iNOS の発現が亢進することを明らかにし、報告してきた。この発現が亢進する iNOS および EPO については、活性化シグナルおよび活性化機能に与える影響について検討する。さらにその他各種サイトカイン、興奮性アミノ酸、酸化ストレスのマーカーである 8-OHdG についても遺伝子、タンパクレベルで測定する。それぞれの遺伝子発現は定量的 RT-PCR 法を用いて測定する。またサイトカイン、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。

・ 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 °C 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。

4. 研究成果

1. 低温状態はアストロサイトの発現を誘導することで、ニューロンを保護する。無酸素・無糖状態にしたアストロサイトは神経保護効果を持つ EPO の発現を誘導する。さらにこのアストロサイトを低温状態にすると EPO の発現はさらに誘導されることが明らかになった。この誘導された EPO がニューロンを保護することを明らかにした。

2. 低温状態はミクログリアの活性化を抑制することでニューロンを保護する。培養ミクログリアにおいて低温状態は NF- κ B の活性化を抑制することで、炎症性サイトカイン、iNOS の発現を抑制し、ニューロンを保護することを明らかにした。

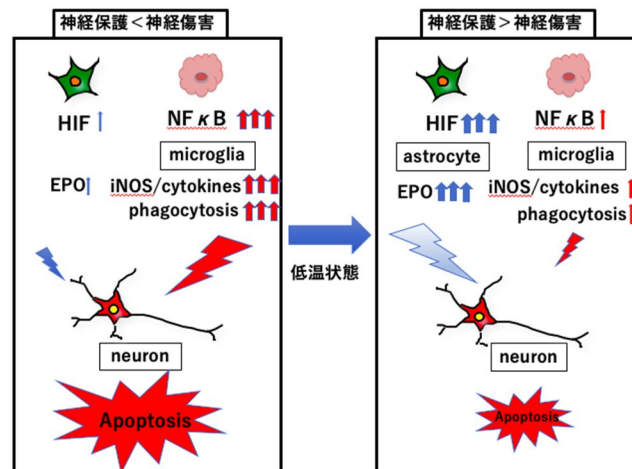


図1：低温状態はミクログリア、アストロサイトを介してニューロンを保護する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 垣田博樹	4. 巻 55
2. 論文標題 新生児低酸素性虚血性脳症の治療 低体温療法を中心に(総説)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 東海産科婦人科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 9-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Toriuchi K, Kakita H, Tamura T, Takeshita S, Yamada Y, Aoyama M	4. 巻 17
2. 論文標題 Prolonged astrocyte-derived erythropoietin expression attenuates neuronal damage under hypothermic condition.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neuroinflammation.	6. 最初と最後の頁 141
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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kimura T, Toriuchi K, Kakita H, Tamura T, Takeshita S, Yamada Y, Aoyama M	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 Cell Mol Neurobiol.	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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 垣田博樹
2. 発表標題 低温状態においてアストロサイトが分泌するエリスロポエチンを介した神経保護効果
3. 学会等名 第64回日本新生児成育医学会 学術集会
4. 発表年 2019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	山田 恭聖 (Yamada Yasumasa) (60405165)	愛知医科大学・医学部・教授 (33920)	
研究 分担者	青山 峰芳 (Aoyama Mineyoshi) (70363918)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・教授 (23903)	

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
---------	---------