

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591278
 研究課題名（和文） 活性化プロテイン C を用いたアポトーシス制御による新生児脳障害の
 治療に関する研究
 研究課題名（英文） Interventions for prevention of neonatal neuronal injury by
 inhibition of apoptosis with activated protein C
 研究代表者
 横山 直樹（YOKOYAMA NAOKI）
 神戸大学・医学部附属病院・准教授
 研究者番号：20314487

研究成果の概要：

アポトーシス経路において神経細胞の分化抑制や障害防護作用を持つ plasminogen activator receptor-1 (PAR-1) の活性化には、活性化 Protein C を代表とするさまざまな凝固線溶系蛋白が関連している。これらの蛋白は神経細胞自らが制御し、凝固線溶系の活性バランス調節を介して間接的に PAR-1 制御に作用している。これらを制御することが新生児脳障害治療の戦略になると考えられる。臨床的には、活性化 Protein C や錫メゾポルフィリン、脳低温療法が、新生児脳障害に対する新しい治療法として期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：胎児・新生児医学

キーワード：新生児脳障害、アポトーシス、活性化プロテイン C、plasminogen activator receptor-1 (PAR-1)

1. 研究開始当初の背景

新生児期幼弱脳への低酸素性虚血性脳障害は、細胞レベルでの二次性エネルギー障害からアポトーシスを誘導し、神経細胞死やグリア髄鞘化障害を惹起することで脳性麻痺などの後障害の原因となる。そこで、新生児脳障害に対する新たな治療戦略として、アポトーシス経路における神経細胞の分化抑制や障害防護が考えられる。

発達期中枢神経において神経細胞が機能的に分化成熟するには、神経細胞の遊走とそ

の後の情報連絡ネットワークの構築が重要である。この神経分化現象にはグリア系細胞が大きく関与しており、その制御機構の解明が明らかにされつつある。その制御機構の一つとして注目されているものに、セリン・プロテアーゼとそのインヒビターの相互調節がある。その中心的存在が thrombin の主要な受容体である protease-activated receptor-1 (PAR-1) である。

我々は、これまでにこの受容体の活性化が培養神経系細胞の分化を抑制し、この脱分化

作用により神経系細胞の障害への閾値が高まることを明らかにしてきた。また、この障害防護作用が生体（ラット低酸素虚血障害モデル）においても認められることも明らかにした。セリン・プロテアーゼとそのインヒビター群としては各種 plasminogen activator とその inhibitor、anti-thrombin、thrombomodulin、活性化プロテインCなどの血液凝固線溶系酵素蛋白群があり、これらの発現が中枢神経系において報告されている。そして、これらの作用点としての PAR-1 の重要性が言われてきている。その中でも、脳細胞障害だけでなく、脳血管障害防護効果も期待できる活性化プロテインCは、静脈内投与が可能であり、脳障害に対する治療として応用できる可能性がある。

2. 研究の目的

PAR-1 活性化リガンドの一つであり、治療戦略的にも有利な血管内への注射投与が可能であるプロテインCを中心に凝固線溶系蛋白の中枢神経系での発現状況を検討する。プロテインCの活性化体の作用として、既に脳虚血障害における血管内皮細胞保護作用、ならびに血栓形成性障害防護作用などが報告されている。これらの防護作用を新生児の低酸素性虚血性脳障害へ安全に応用実現化することが最終目的である。

3. 研究の方法

(1) 対象サンプルの調整

中枢神経系細胞のモデルとして、既知のヒト培養細胞株を用いた。すなわち、ヒト神経芽細胞腫 GOTO、IMR32、SKNSH、SY5Y、ヒトグリア芽細胞腫 A172、ヒトグリア細胞腫 EP1 である。それぞれ 10% 牛胎児血清を含む RPMI1640 培地にて pre-confluent 状態へ培養し、RNA 回収スピナラムにて total RNA 分画を回収した。ヒト胎盤組織、ヒト臍帯組織からも同様に total RNA 分画を回収し、血管内皮細胞の陽性コントロールとした。各 total RNA 3mg を用いて RT-PCR を行い、cDNA を含む産物 30μL を作製した。

(2) 検討対象酵素蛋白の primers 作成

今回検討対象とした酵素蛋白は、protease-activated receptor-1 (PAR-1)、plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)、prothrombin、plasminogen、tissue plasminogen activator (tPA)、urinary plasminogen activator (uPA)、plasminogen activator receptor (PAR)、tissue factor (TF)、tissue factor pathway inhibitor (TFPI)、anti-thrombin III、heparin co-factor II (HC-II)、thrombomodulin、vitronectin、protein C である。それぞれ既報告の塩基配列情報より、主に coding region 内で forward 及び reverse primer を設定作

製した。

(3) PCR

RT-PCR 産物である cDNA 2μL を用い、30μL の系で PCR を行った。各 PCR 産物 10μL をアガロースゲル電気泳動にて可視化し、半定量解析を行った。

予測される各 PCR 産物のサイズ

protease-activated receptor-1 (PAR-1) : 856 bp、plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) : 1,376 bp、prothrombin : 894 bp、plasminogen : 1,037 bp、tissue plasminogen activator (tPA) : 741 bp、urinary plasminogen activator (uPA) : 751 bp、plasminogen activator receptor (PAR) : 870 bp、tissue factor (TF) : 817 bp、tissue factor pathway inhibitor (TFPI) : 921 bp、anti-thrombin III : 884 bp、heparin co-factor II (HC-II) : 824 bp、thrombomodulin : 1,104 bp、vitronectin : 897 bp、protein C : 1,028 bp

これら primer set が有効であり、各 PCR 産物が予測されたサイズ (bp) であることをヒト胎盤組織由来 RNA を用いた PCR にて確認した。

4. 研究成果

(1) PAR-1、PAI-1 の発現 (図 1)

① PAR-1 (protease-activated receptor-1) 4 種類の様々な分化過程にある神経芽細胞腫すべてにおいて PAR-1 の産物 (856 bp) をはっきりと確認した。グリア系の細胞腫 2 種においても神経芽細胞腫以上に多量の発現を確認した。

② PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) 神経芽細胞腫 GOTO、SKNSH において極少量の PAR-1 産物 (1,376 bp) を確認した。一方、グリア系細胞腫 EP1、A172 ではより多量の発現を確認した。

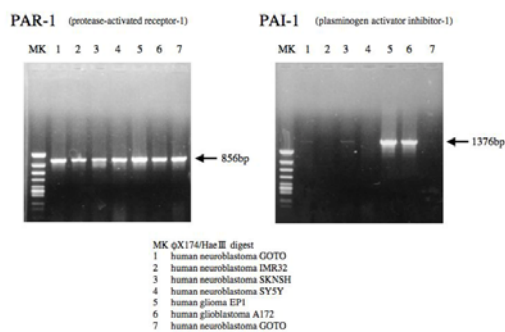


図 1

(2) その他の各種凝固線溶系酵素蛋白の発現 (図 2-5、表)

神経芽細胞腫 GOTO、グリア細胞腫 A172 において、様々な凝固線溶系酵素蛋白の発現

をヒト胎盤組織、臍帯組織を対照に検討した。
①神経芽細胞腫において発現の認められるもの

protease nexin-1 を GOTO 株において強く発現を認めた。

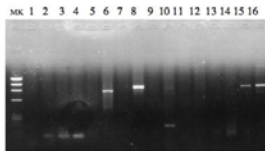
②グリア系細胞腫において発現の認められるもの

protein C、urinary plasminogen activator、tissue factor、tissue factor pathway inhibitor、anti-thrombin III の発現を認めた。

③胎盤組織、臍帯組織においてのみ発現の認められるもの

vitronectin、thrombomodulin の発現を認めた。

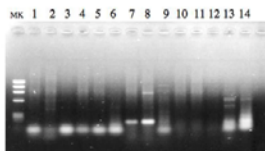
④肝臓組織のみで発現の認められるもの
prothrombin、tissue plasminogen activator、heparin co-factor II、plasminogen



MK α X174Hae III digest
1 Prothrombin (GOTO)
2 Prothrombin (A172)
3 Tissue plasminogen activator (GOTO)
4 Tissue plasminogen activator (A172)
5 Tissue factor (GOTO)
6 Tissue factor (A172)
7 Tissue factor receptor inhibitor (GOTO)
8 Tissue factor receptor inhibitor (A172)
9 anti-thrombin III (GOTO)
10 anti-thrombin III (A172)
11 Heparin co-factor II (GOTO)
12 Heparin co-factor II (A172)
13 Thrombomodulin (placenta)
14 Thrombomodulin (cord)
15 Vitronectin (placenta)
16 Vitronectin (cord)

GOTO: human neuroblastoma
A172: human glioblastoma
placenta: human placenta
cord: human umbilical cord

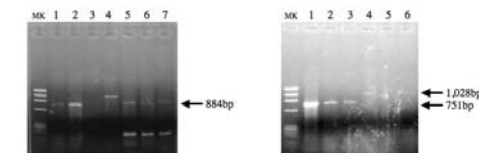
図 2



MK α X174Hae III digest
1 Prothrombin (GOTO)
2 Prothrombin (A172)
3 Prothrombin (cord)
4 Tissue plasminogen activator (GOTO)
5 Tissue plasminogen activator (A172)
6 Tissue plasminogen activator (cord)
7 anti-thrombin III (GOTO)
8 anti-thrombin III (A172)
9 anti-thrombin III (cord)
10 Heparin co-factor II (GOTO)
11 Heparin co-factor II (A172)
12 Heparin co-factor II (cord)
13 Thrombomodulin (placenta)
14 Thrombomodulin (cord)

GOTO: human neuroblastoma
A172: human glioblastoma
cord: human umbilical cord
placenta: human placenta

図 3

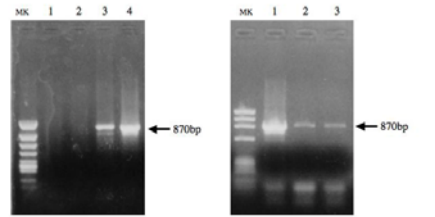


MK α X174Hae III digest
1 urinary plasminogen activator (GOTO)
2 urinary plasminogen activator (A172)
3 protein C (GOTO)
4 protein C (A172)
5 anti-thrombin III (GOTO)
6 anti-thrombin III (A172)
7 anti-thrombin III (EP1)

MK α X174Hae III digest
1 urinary plasminogen activator (EP1)
2 urinary plasminogen activator (placenta)
3 urinary plasminogen activator (cord)
4 protein C (EP1)
5 protein C (placenta)
6 protein C (cord)

GOTO: human neuroblastoma
A172: human glioblastoma
EP1: human glioma
cord: human umbilical cord
placenta: human placenta

図 4



MK α X174Hae III digest
1 plasminogen (GOTO)
2 plasminogen (A172)
3 plasminogen activator receptor (GOTO)
4 plasminogen activator receptor (A172)

MK α X174Hae III digest
1 plasminogen activator receptor (EP1)
2 plasminogen activator receptor (placenta)
3 plasminogen activator receptor (cord)

GOTO: human neuroblastoma
A172: human glioblastoma
EP1: human glioma
cord: human umbilical cord
placenta: human placenta

図 5

凝固線溶系酵素蛋白質群の神経系での発現

	PAR-1	PAI-1	uPA	PAR	PC	AT-III	TF	TFPI
Neuroblastoma								
GOTO	++	+	+	++	-	+	-	-
Glia cell								
A172	++	+++	++	+++	+	+	++	++
EP1	++	++	+++	+++	+	+	nd	nd

nd: not determined

PAR-1: protease-activated receptor-1
PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1
uPA: urinary plasminogen activator
PAR: plasminogen activator receptor

PC: protein C
AT-III: anti-thrombin III
TF: tissue factor
TFPI: tissue factor pathway inhibitor

表

我々は発達期の中樞神経における PAR-1 の活性化制御が、神経細胞のみならず、グリア系細胞の分化にも寄与していること、また低酸素虚血等によるネクローシス障害にもアポトーシス細胞死にも PAR-1 が強く関与していることを明らかにしてきた。本研究では PAR-1 に作用可能な、いわゆる一連の凝固線溶系蛋白質群の中樞神経での発現を検討した。

ヒト胎盤及び臍帯組織を陽性コントロールとした半定量 PCR 検索にて、PAR-1 は多種類のヒト神経芽細胞腫、グリア系腫瘍の細胞株で強い発現を確認できた。これら PAR-1 が発現している細胞種の中で、protease nexin-1 は GOTO 細胞などの神経芽細胞腫で発現が強いが、直接 PAR-1 の良好なりガンドとはなり得ない urinary plasminogen activator (uPA)、plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)、plasminogen activator receptor (PAR)、thrombomodulin、vitronectin などは、むしろグリア系細胞でより強い発現を認めた。PAR-1 最強のリガンドである thrombin 活性を阻害する anti-thrombin III の発現がグリア系細胞のみならず、神経芽細胞腫 GOTO でも認められることは興味深い。Protein C に関しては GOTO 細胞での発現はほとんど認められず、グリア系腫瘍である A172 や EP1 にて強い発現を認めた。

これらの結果より、PAR-1 のリガンドになり得る蛋白は神経細胞自らが autocrine 制御

しているが、グリア系細胞は plasminogen activator 系を中心に凝固線溶系の酵素活性バランスの調節を介して間接的に PAR-1 制御に作用することで、神経細胞の分化や障害防護に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

protease-activated receptor-1 (PAR-1) のリガンドになり得る蛋白は神経細胞自らが autocrine 制御しているが、グリア系細胞は凝固線溶系の活性バランス調節を介して間接的に PAR-1 制御に作用することで、神経細胞の分化や障害防護に影響を及ぼしている可能性が示唆され、これらを制御することが新生児脳障害治療の戦略になると考えられた。

(3) 錫メゾポルフィリン (Tin mesoporphyrin :SnMP) の核黄疸予防に対する効果

細胞防護の観点から臨床への応用を想定し、熱ショック蛋白であるヘムオキシゲナーゼ 1 (heme oxygenase-1:HO-1) の関与について研究した。新生児脳障害の一つである核黄疸の発症予防には、高ビリルビン血症の予防すなわちビリルビン上昇の抑制が不可欠である。ビリルビン産生を抑制する一つの方法として、ビリルビン代謝の速段階酵素である HO-1 を抑制させることが考えられる。基礎研究において、HO-1 の抑制物質の一つである SnMP が HO-1 活性を抑制し、ビリルビン産生を減少させることにより血中ビリルビン濃度を低下させることが報告されている。そこで、成獣・新生仔マウスや溶血性・閉鎖性出血モデルマウスを用いて、SnMP の経口投与による HO-1 の発現への影響・効果について検討した。

その結果、標的臓器である肝臓・脾臓に対し、SnMP は非常に強力な HO-1 活性抑制効果を示し、その効果は投与後も持続した。それは投与量依存性であるが、興味深いことに、投与量を 3.75 μ mol/kg まで減量しても有意な HO-1 活性抑制効果を示すことが明らかになった (図 6)。一方で、SnMP は HO-1 遺伝子を誘導するため、SnMP 投与後には蛋白を誘導しビリルビン産生を増加させるリバウンド現象が生じる可能性がある。しかし、この遺伝子誘導は一過性であり、SnMP の HO-1 活性抑制効果に影響を与えないことを確認した。

以上より、アポトーシスに関わる HO-1 を抑制する SnMP が予防薬として臨床応用できる可能性が示唆された。

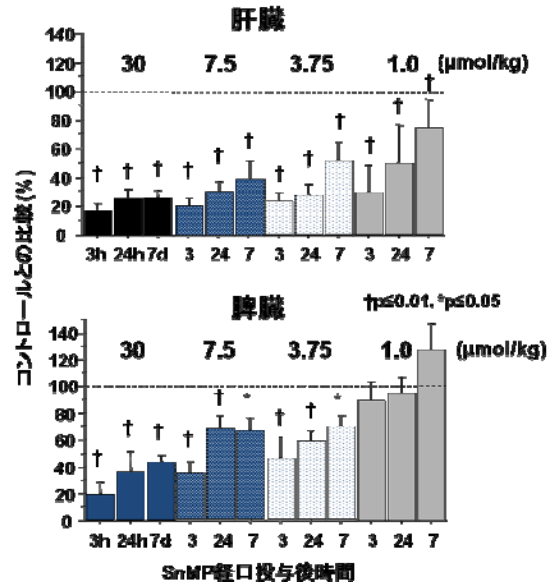


図 6

(4) 新生児重症低酸素性虚血性脳症に対する脳低温療法の効果

低酸素性虚血性脳症による不可逆性脳障害に対し、アポトーシスによる細胞障害保護戦略の一つに脳低温療法が挙げられる。我々の施設では、これまで脳低温療法を 5 例に施行し、5 例中 4 例が神経学的予後は良好である (表 1、表 2)。脳低温療法施行以前の同様の症例 6 例は、全例後障害または死亡しており、有意な予後改善が認められている。脳低温療法は有望な治療法と考えられる。

表 1 脳低温療法施行 5 例

症例	生後週齢	出生体重	出血	産科的疾患	STB	APB	PH	Len	血状	Survival 分類
1	41w 2d	2074g	脳外	胎中下血腫、羊水汚染	過高性胎児呼吸	2/3	2.20	96	治療後予後低下	Stage II
2	40w 0d	2220g	脳外	胎毒性肺炎	FHR低下	1/2	6.51	94	治療後予後低下	Stage II
3	39w 1d	2280g	脳外	産前羊水	FHR低下、胎児呼吸	1/2	7.15	160	治療後予後低下	Stage II
4	38w 1d	2480g	脳内	胎毒性肺炎	分娩15分後、胎児呼吸	7/8	6.9	120	治療後予後低下	Stage II
5	38w 0d	2470g	脳外	PH	FHR低下	2/2	7.56	104	治療後予後低下	Stage II

表2 脳低温療法施行5例(続き)

症例 選取	産生 体重	脳低温療法に 伴う合併症	特徴学的所見	予後	
1	41w 3d	3974g	特になし	MRI: 両側基底核-T1で高信号 両側側頭葉異常高信号 AER: 異常なし EEG: burstless 交代性酸中毒(+)Direct aspartate(-)	脳性麻痺 難聴性てんかん
2	40w 0d	2830g	心臓動脈下	MRI: 異常なし, PVL(-) AER: EEG: 異常なし	発達正常
3	39w 1d	2950g	気管による 気道閉塞	MRI: AER: EEG: 異常なし	発達正常
4	39w 1d	2460g	気管内出血 肺動脈閉塞	MRI: 両側基底核がT1-FLAIRで高信号 AER: 異常なし EEG: 異常なし	発達正常
5	39w 0d	2420g	血心臓動脈下 肺動脈閉塞	MRI: 両側基底核・側核がT1-FLAIRで高信号 AER: 異常なし EEG: 過覚性慢性心低下	発達正常

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4件)

1. Enomoto M, Morioka I, Morisawa T, Yokoyama N, Matsuo M. A Novel Diagnostic Tool for Detecting Neonatal Infections Using Multiplex Polymerase Chain Reaction. Neonatology. 2009 Mar 12;96(2):102-108

2. Shibata A, Morioka I, Ashi C, Nagasaki S, Tode C, Morikawa S, Miwa A, Enomoto M, Saiki K, Yokoyama N, Takeuchi A, Matsuo M. Identification of N-acetyl Proline-Glycine-Proline (acPGP) in human serum of adults and newborns by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clin Chim Acta. 2009 Apr;402(1-2):124-8.

3. Egawa T, Morioka I, Morisawa T, Yokoyama N, Nakao H, Ohashi M, Matsuo M. Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis presence in umbilical cord is associated with pathogenesis of funisitis. Kobe J Med Sci. 2007;53(5):241-9

4. Takatera A, Takeuchi A, Saiki K, Morioka I, Yokoyama N, Matsuo M. Blood lysophosphatidylcholine (LPC) levels and characteristic molecular species in neonates: prolonged low blood LPC levels in very low birth weight infants. Pediatr Res. 2007 Oct;62(4):477-82

[学会発表] (計3件)

1. 万代ツルエ、森岡一朗、北山真次、横山直樹、松尾雅文、極低出生体重児における3歳時の精神発達評価 新版K式発達検査による下位項目の重要性 日本小児精神神経学会、2008.10、米子

2. 佐藤有美、森川悟、三輪明弘、榎本真宏、柴田暁男、森岡一朗、横山直樹、松尾雅文、新生児黄疸管理において総ビリルビン/アルブミン比はUBの代用となるか?

日本周産期・新生児医学会、2008.07、横浜

3. 横山直樹、佐藤有美、森岡一朗、松尾雅文、未熟児新生児の黄疸管理 中村の基準値を超えても交換輸血を施行せずに管理した新生児黄疸症例の検討

日本未熟児新生児学会、2007.11、香川

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 直樹 (YOKOYAMA NAOKI)

神戸大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 20314487

(2) 研究分担者

北山 真次 (KITAYAMA SHINJI)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 10346257

森岡 一朗 (MORIOKA ICHIRO)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 80437467

(3) 連携研究者

なし