

平成22年 6月 11日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790771

研究課題名（和文） 新生児低酸素虚血性神経障害の機序解明と治療法の解明

研究課題名（英文） Investigation of mechanism of developing neonatal hypoxic ischemic encephalopathy establishment of novel therapy.

研究代表者 藤岡 弘季 (FUJIOKA HIROKI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・登録医

研究者番号：70382083

研究成果の概要（和文）：ブタ新生児低酸素虚血性脳症モデルではニューロンでの iNOS 発現と、その補酵素である血中ビオプテリン濃度の上昇を認めた。NMDA 受容体阻害剤投与では、血中ビオプテリン濃度は上昇せず、炎症性サイトカインの合成抑制が示唆された。ラットけいれん重積モデル（カイニン酸投与）ではニューロンでの iNOS 発現は認めず、ブタとネズミの合成調節は異なっていることが示唆された。瀬川病ではビオプテリン合成系の律速酵素であるグアノシン3リン酸シクロヒドロラーゼ I 活性が低下するが、瀬川病患者の血中フェニルアラニン値は正常範囲ではあるが、有意に上昇していた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in neurons of severe neonatal hypoxic ischemic encephalopathy model piglets after 12 hours. Level of blood biopterin, known as a co-factor of iNOS, was also increased. The increase was inhibited by MK-801, one of NMDA receptor antagonist. However, expression of iNOS was not affected. Guanosine triphosphate cyclohydrolase I (GTPCH) is the rate-limiting enzyme of biopterin synthesis pathway. Previous reports described that proinflammatory cytokines up-regulated the activity of GTPCH. It was suggested that excitatory neurotransmission affected the synthesis of proinflammatory cytokines. On the other hand, rat model of status epilepticus by using kainic acid, an analogue of glutamate, indicated no increase of iNOS in neuron. Those results suggested that the pathways of signal transductions were different between swine and rodents.

Human Segawa Disease was caused by the defect of GTPCH. Generally, biopterin shortage causes hyperphenylalaninemia. However blood phenylalanine concentration of Segawa disease patients was within normal range, for the mutations of GTPCH in Segawa disease were heterozygous. We compared blood phenylalanine levels between patients of Segawa disease and controls. The result was that the blood phenylalanine level in Segawa disease was within normal range however the values were significantly higher than those of controls.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物系・医歯薬学分野

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児新生児医学

キーワード：(1) 低酸素虚血 NOS (iNOS) (2) ビオプテリン (3) inducible (4) GTPCH I (5) NMDA 受容体拮抗剤

1. 研究開始当初の背景

新生児の低酸素性虚血性脳症(HIE)は痙性対麻痺や他の神経学的後遺症を起こす予後不良な疾患であるが、病態の解明と有効な治療法の開発が望まれている。我々は新生仔ブタを用いた HIE モデルで、急性期中枢神経系に誘導性一酸化窒素合成酵素 (iNOS) が発現し、血漿中ビオプテリン濃度が急激に上昇することを発見し、一酸化窒素 (NO) は HIE に関与していることを明らかにした。低体温療法は、HIE に対する新しい治療法として最近注目されているが、我々はこの新生仔ブタ HIE モデルを用いてテトラヒドロビオプテリン (BH4) と低体温療法が脳と他の臓器に及ぼす影響を検討している。さらに micro positron emission tomography (micro PET) 装置を用いて HIE 発症の経過を糖代謝の変動を通して経時的に観察し、機能低下を定量的に測定する研究を行っている。

2. 研究の目的

第1に新生仔ブタ HIE モデルの脳と肝における NO と BH4 の代謝を生化学的、組織化学的のみならず分子生物学的にも検討し、組織障害を起こす一連の反応に BH4 の調節障害に基づく各種 NOS 発現の機構の異常が関与していることを明らかにする。また、ラットけいれん重責モデルを用いてラット脳における iNOS 発現について検討する。第2現在低体温療法よりも簡便な治療法として多くの施設で用いられているマグネシウム製剤による NMDA 型グルタミ

ン酸受容体(以下 NMDA)レセプターを介した神経保護作用について、NO、BH4 の側面から生化学的、組織化学的、分子生物学的に解明する。第3に瀬川病をテーマとしてテトラヒドロビオプテリンの合成系について検討を行う。

3. 研究の方法

(1)

- ・生後 1-3 日の新生仔ブタを気管切開後、6%酸素/94%窒素にて換気し、両側頸動脈をクランプして阻血した(低酸素虚血負荷)。45 分の負荷後、蘇生した (Severe 群;n=3)。
- ・MK 群(n=3)、低体温群 (Hypo 群;n=3)では Severe 群と同様の低酸素虚血負荷を行ったが、MK 群では負荷直前から MK-801(10 mg/kg/dose)の経静脈投与を行った。Hypo 群は低酸素虚血負荷直後より直腸温が 3°C低下するように冷却した。
- ・DAHP 群 (n=2) に対してはビオプテリン合成阻害剤である 2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidine (DAHP) を低酸素虚血負荷前より 100 mg/kg/hr の投与量で経静脈投与を行い、負荷後 1 2 時間まで持続投与を行った。
- ・コントロール群は生後 1-3 日の新生仔ブタを麻酔後気管切開したものとした。
- ・各実験群について、低酸素虚血負荷前、負荷直後(0 時間)、4、8、12 時間後に動脈採血し、血中ビオプテリン濃度を測定した。測定は HPLC にて行った。
- ・低酸素虚血負荷後 1 2 時間で 4%パラホ

ホルムアルデヒドにて灌流固定を行い、20 μ mのスライスを作成し、抗 inducible NOS(iNOS)抗体を用いて免疫染色を行い、diaminobenzidineにて発色させた。

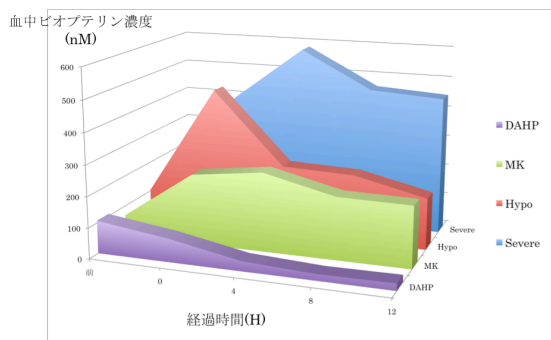
・二重染色は前述の抗 iNOS 抗体と神経細胞のマーカーである Neurofilament(NF)抗体を用い、FITC, Cy-3 の蛍光色素にて標識し、検出した。

(2) 8週令の雄 Wister 系ラットを用いて実験を行った。各ラットに 10mg/kg のカイニン酸を腹腔内投与し、けいれん誘発を行った。

(3) 遺伝子解析により GTPCH 遺伝子の heterozygous 変異を認め、瀬川病と確定診断された患者の血中フェニルアラニン濃度をジストニア群、対照群と分散分析を行い比較した。

4. 研究成果

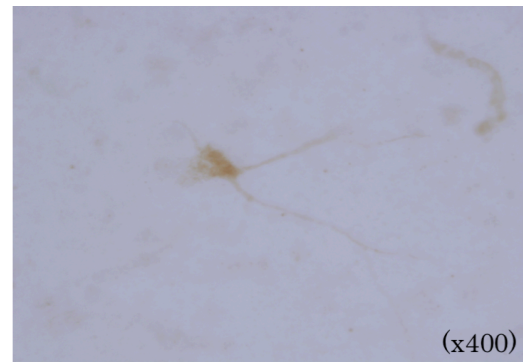
(1) 結果 ①



結果 ②-1



結果 ②-2



(2) 6匹のラットにカイニン酸を投与したところ、全例で身震い、前肢の間代、顔面クローヌス、四肢の間代を認め、けいれん重責を呈した。けいれん開始後24時間の時点で経心的に4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定後、中枢神経系の切片を作成し、抗 iNOS 抗体にて標識した。その結果、ニューロンにおける iNOS 発現は認めなかった。

(3) 遺伝子解析により確定診断された瀬川病患者7名と対照群7例について血中フェニルアラニン濃度について検討を行った。その結果を以下に示す。

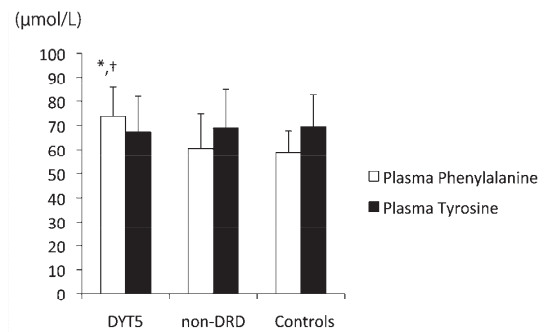


FIG. 1. Plasma phenylalanine and tyrosine levels. The plasma phenylalanine levels (open boxes) and tyrosine levels (closed boxes) are shown for patients with DYT5, patients with non-DRD, and controls. Error bars indicate standard deviations. * $P < 0.05$ (DYT5 vs. non-DRD). † $P < 0.05$ (DYT5 vs. controls).

この図に示されるように、DYT5(瀬川病)、non-DRD (Disease control)、対照群の比較を行ったところ、瀬川病群において血中フ

フェニルアラニン値の有意な上昇を認めた。

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 1 件)

① H Fujioka et al. Plasma Phenylalanine Level in Dopa-Responsive Dystonia, Movement Disorders 査読あり

24(15) 2009 2289-2290

[学会発表] (計 6 件)

① Haruo Shintaku, Masaya Segawa, Hiroki Fujioka, Japan PND study group NATION-WIDE EPIDEMIOLOGIC STUDY OF PEDIATRIC NEUROLOGIC DISEASE IN JAPAN (THE 1ST REPORT) International Symposium on Epilepsy in Neurometabolic Diseases (ISENMD) & The 13th Annual Meeting of the Infantile Seizure Society (ISS) March 26-28, 2010, Taipei

② 藤岡 弘季 他 NMDA 受容体阻害剤が新生児の低酸素虚血に与える生化学的影響—新生仔ブタモデルを用いた検討—第 5 4 回日本未熟児新生児学会学術集会 2009.12.1 パシフィコ横浜 (横浜)

③ H Fujioka, H Shintaku, S Kudo, T Sakaguchi, T Yamano Usefulness of the plasma neopterin concentration in screening for dopa-responsive dystonia. 11th international congress of inborn errors of metabolism 29 Aug – 02 Sep, 2009, San Diego, California, USA

④ 藤岡 弘季、新宅 治夫、平林 真一、

山野 恒一 一過性高フェニルアラニン血症を認めた瀬川病の一例 第 112 回日本小児科学会学術集会 2009.4.17-19, 奈良

⑤ Hiroki Fujioka, Haruo Shintaku, Masaya Segawa, Satoshi Kudo, Tsunekazu Yamano Lower plasma neopterin concentration in dopa-responsive dystonia patients. Pteridines and Folates, June 7-12, 2009 - Jeju - Korea

⑥ 藤岡 弘季 他 Plasma and CSF pteridines in Dopa responsive dystonia 日本小児神経学会 2008.5.30 東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤岡 弘季 (FUJIOKA HIROKI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・登録医
研究者番号：70382083