

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22757

研究課題名(和文) ASK1シグナルを介した脳室周囲白質軟化症の病態機序の解明と治療的可能性の検討

研究課題名(英文) ASK1 promotes uterine inflammation leading to pathological periventricular leukomalacia

研究代表者

吉川 美登利 (Yoshikawa, Midori)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：90881441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠マウスへのLPS投与により、胎仔および新生仔にオリゴデンドロサイトの障害に代表される白質障害が起こるPVLモデルはすでに確立されている。群 ASK1^{-/-} (メス) × ASK1^{+/-} (オス) 仔は半数がASK1^{+/-}、半数がASK1^{-/-}、群 ASK1^{+/+} (メス) × ASK1^{+/-} (オス) 仔は半数がASK1^{+/+}、半数がASK1^{+/-}、群 ASK1^{+/-} (メス) × ASK1^{+/-} (オス) 仔は半数がASK1^{+/-}、1/4 がASK1^{+/+}、ASK1^{-/-} 上記の3群それぞれに対し、PVLモデルを施行しているがまだ再現に至っていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳性麻痺は胎児期の発達する脳が侵襲を受け、重篤な神経学的後遺症をきたす運動機能障害である。脳性麻痺児の約半数以上を早産児が占め、早産児の脳性麻痺の主要な原因は脳室周囲白質軟化症(Periventricular leukomalacia; PVL)である。PVLは子宮内感染による過剰な炎症の脳への波及や低酸素虚血による病的ストレスが原因とされる。いまだにPVLに対する根本的な治療法はない。本研究でApoptosis signal-regulating kinase1 (ASK1) が子宮内感染に伴う過剰な炎症を惹起し、PVL発症に関与することが明らかとできれば、今後新たな治療法となりうる。

研究成果の概要(英文)：A PVL model has already been established in which LPS administration to pregnant mice induces white matter damage, typified by oligodendrocyte damage, in fetuses and neonates. ASK1^{-/-} (female) × ASK1^{+/-} (male) half the number of fetus:ASK1^{+/-}, half the number of fetus:ASK1^{-/-}, ASK1^{+/+} (female) × ASK1^{+/-} (male) half the number of fetus:ASK1^{+/+}, half the number of fetus:ASK1^{+/-}, ASK1^{+/-} (female) × ASK1^{+/-} (male) half the number of fetus:ASK1^{+/-}, quarter of fetus:ASK1^{+/+}, ASK1^{-/-}. A PVL model was performed for each of the 3 groups by the mating method of 3 types of KO mice, but it has not yet been reproduced.

研究分野：周産期

キーワード：ASK1 PVL LPS

1. 研究開始当初の背景

脳性麻痺児の半数以上を早産児が占め、早産児の脳性麻痺の主因は脳室周囲白質軟化症 (Periventricular leukomalacia : PVL) である。PVL は子宮内感染による過剰な炎症の脳への波及や低酸素虚血による病的ストレスに、早産児脳に特有の白質の脆弱性が相まって生じる。いまだに早産児 PVL に対する根本的な治療法はなく、PVL の病態解明と治療法開発は、周産期医療従事者にとって喫緊の課題である。

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路は、酵母から哺乳類に至るまで真核生物において進化的に保存された、ストレスシグナル伝達において中心的な機構の一つである。Apoptosis signal-regulating kinase1 (ASK1) は、ストレス応答性 MAPK である c-Jun N-terminal kinase (JNK) および p38 の最上流に位置する MAPKKK であり、多様なストレスにより誘導されるアポトーシスや、炎症性サイトカインの産生を中心とする免疫応答において JNK および p38 経路の制御を介して重要な役割を果たす分子である。本申請者は ASK1 が早産の発症に関わる重要な分子であることを示した (Sci Rep. 2020 Feb 5;10(1):1887)。本報告では、1) ASK1 が子宮内感染に伴う過剰な炎症を惹起し、早産を促すこと、2) ASK1 活性阻害が過剰な炎症反応を抑制し、早産に対する治療的效果を有すること、を 2 種類の遺伝子改変マウスおよびヒト胎盤検体を用いた解析により明らかとした。

2. 研究の目的

本研究では、PVL 発症における ASK1 の関与について明らかとすることを第一の目的とする。さらには ASK1 欠損マウスおよび ASK1 阻害剤を用いた検討を行い、ASK1 活性阻害による PVL 発症の抑制と早産児に対する治療の可能性を検討する。ASK1 が早産児 PVL 発症に関与する機序の仮説として、以下に述べるように、妊娠中および出生後の 2 段階からなるメカニズムを想定し、検討を進める。

病態仮説 ASK1 活性化による子宮の過剰な炎症が胎児脳に波及、PVL 発症の契機となる。

病態仮説 早産児 PVL の契機となる、脳での炎症や低酸素虚血などのストレス、それに伴う白質障害において ASK1 が関与する。すなわち、ミクログリアにおける ASK1 を介した炎症の促進や、オリゴデンドロサイトにおける ASK1 が細胞死に関与して、PVL 形成を促す。これら病態仮説に基づき ASK1 を標的とした治療戦略として、以下を想定している。

治療的仮説 妊娠中の母体への ASK1 阻害剤投与により、子宮内感染を契機とした炎症が抑制され、胎児脳への障害と出生後の脳内の局所環境が改善する。

治療的仮説 早産児への ASK1 阻害剤の投与が、脳の病的炎症状態を改善し、白質障害を抑制することで、PVL の発症と進展を抑制し、治療的效果を発揮する。本研究の成果は、分子レベルからの病態解明が途上にある早産児 PVL に対する治療的可能性をも提示できる画期的な成果となり得る。また、ストレスシグナル伝達系の関与、という観点でも胎児新生児脳障害の分野ではまったく新しい成果となりえる。

3. 研究の方法

方法 1) 妊娠マウスへ腹腔内 Lipopolysaccharide (LPS) 投与による PVL モデルを用いた解析

A. ASK1 ノックアウト (KO、ASK1^{-/-}) マウスを用いた検討

妊娠マウスへの LPS 投与により、胎児および新生仔にオリゴデンドロサイトの障害に代表される白質障害が起こる PVL モデルはすでに確立されている。そこで、以下に示す 3 種類の KO マウスの交配の仕方による 3 群で PVL モデルを施行、母体 ASK1 もしくは胎児 ASK1 の PVL 類似病変形成への関与について検討する。

群 ASK1^{-/-} (メス) × ASK1^{+/-} (オス) 仔は半数が ASK1^{+/-}、半数が ASK1^{-/-}

群 ASK1^{+/+} (メス) × ASK1^{+/-} (オス) 仔は半数が ASK1^{+/+}、半数が ASK1^{+/-}

群 ASK1^{+/-} (メス) × ASK1^{+/-} (オス) 仔は半数が ASK1^{+/-}、1/4 が ASK1^{+/+}、ASK1^{-/-}

B. ASK1 阻害剤を用いた検討

近年、ASK1 活性阻害剤が開発され、非アルコール性脂肪肝炎や慢性腎疾患でその効果が確認され、欧米で臨床試験が進行中のものもある。申請者は、東京大学薬学部一條秀憲研究室で開発された、ASK1 のキナーゼドメインに結合して ASK1 の自己リン酸化による活性化を阻害する ASK1 活性化阻害剤 (K811) を用いた検討により、K811 がヒト胎盤での LPS による炎症反応進展を抑制することを報告した。上述した PVL モデルマウスを施行し、K811 に治療的效果を検証する。妊娠中に K811 を経母体的に投与し、仔脳での PVL 類似病変の改善効果を検証する。さらに、出生後の仔への投与でも PVL 病変の改善効果を示すかどうかについても検証を行う。

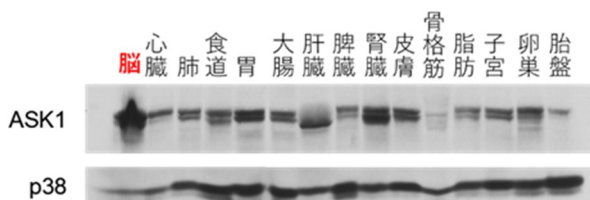
方法 2) マウスオリゴデンドロサイト前駆細胞初代培養を用いた解析

早産児では、特に白質のオリゴデンドロサイト前駆細胞 (Oligodendrocyte precursor cells : OPC) が傷害を受け、OPC 自身の脆弱性や白質血流の乏しさを背景として、さらに感染による炎

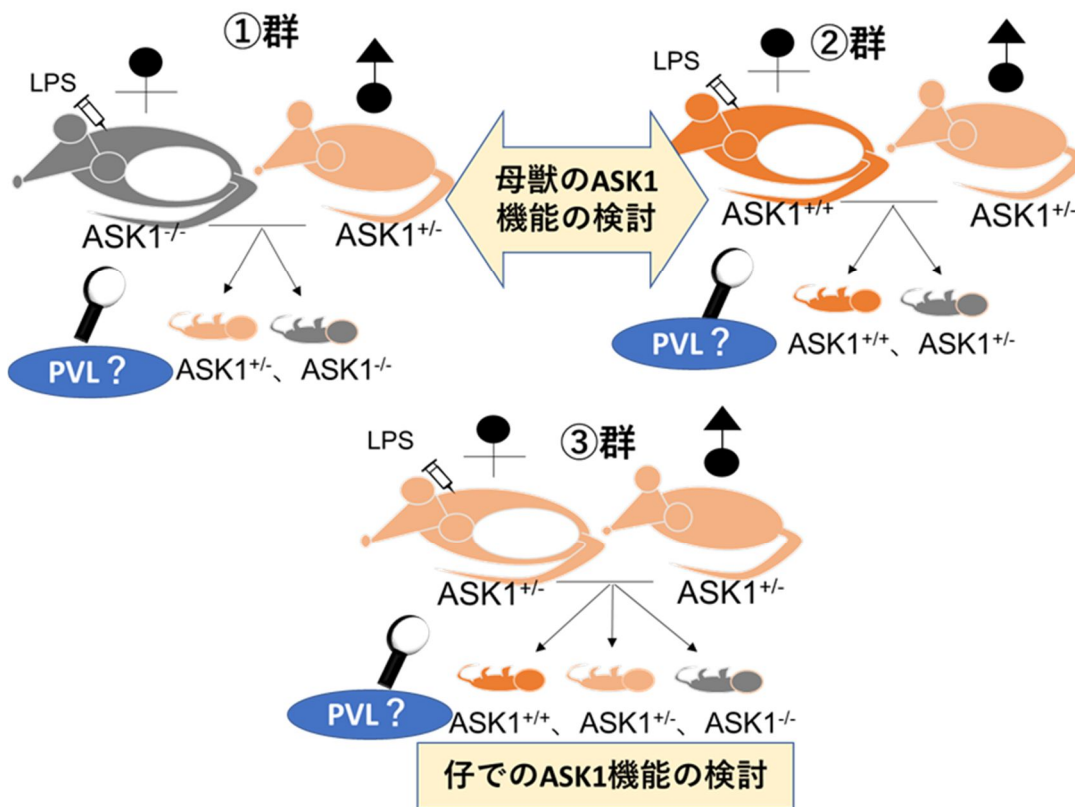
症や虚血性負荷が加わることにより多くの OPC が細胞死を起こし PVL が発生することが知られている。OPC のストレス応答に ASK1 が密接に関与し、PVL 病態形成に関わる可能性、および ASK1 阻害による白質障害に対する治療的可能性を、ASK1KO マウス由来 OPC 初代培養細胞、さらには ASK1 阻害剤を用いた実験により検討する。

4. 研究成果

まず ASK1 がどの臓器に発現するのか immunoblotting にて確認した。



特に脳において ASK1 は強く発現していることが確認できた。このことは脳において ASK1 がストレス応答に関与している可能性を示唆する。



群 ASK1^{-/-} (メス) × ASK1^{+/-} (オス) 仔は半数が ASK1^{+/-}、半数が ASK1^{-/-}
 群 ASK1^{+/+} (メス) × ASK1^{+/-} (オス) 仔は半数が ASK1^{+/+}、半数が ASK1^{+/-}
 群 ASK1^{+/-} (メス) × ASK1^{+/-} (オス) 仔は半数が ASK1^{+/-}、1/4 が ASK1^{+/+}、ASK1^{-/-}
 上記のように野生型マウス、ASK1KO マウス、ヘテロ欠損マウスを交配させ、生まれた仔の genotype をそれぞれ確認した。

群と 群の比較検討では、仔 ASK1^{+/-}の脳障害の程度を評価することで、母体の ASK1 の機能が仔の PVL 発症に関与しているかを検討できる。ASK1KO マウスは、ヘテロ欠損 (+/-) でストレ

ス下でも表現型を示さないことが知られ、仔 ASK1+/-の脳では ASK1 が十分に機能していると仮定している。

群の検討では、3 種類の仔 genotypeASK1+/+, ASK1+/-, ASK-/-の脳障害の程度を評価することで、仔の脳の ASK1 の機能が PVL 発症に関与しているかを検討できる。

現在、LPS 投与による PVL モデルマウスの再現を行っている段階である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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