

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461640

研究課題名(和文) 低酸素性虚血性脳症に対する新規トロンボモジュリンによる脳保護作用の解明

研究課題名(英文) Elucidation of novel brain neuroprotective effect of thrombomodulin on hypoxic ischemic encephalopathy

研究代表者

高橋 幸博 (TAKAHASHI, YUKIHIRO)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60142379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：重症新生児仮死は低酸素性虚血性脳症(HIE)を惹起し、重度の脳障害や生命予後に影響する疾患である。一方、重度新生児仮死では播種性血管内凝固(DIC)を発症する。重症新生児仮死に合併した新生児DICに対して遺伝子組換えトロンボモジュリン(rTM)を用い治療を行ってきたが、DICの改善効果に加え、顕著にHIEの改善効果を観察した。本研究はrTMの脳神経保護効果をラットを用いた中大脳動脈閉塞(MACO)モデルで検証した。その結果、rTMはDICの効果のみならず脳神経保護を有すると考えられた。また病態に、炎症の関与が示唆された。しかし本研究は実験数の限りからさらなる検証が必要と考える。

研究成果の概要(英文)：Severe neonatal asphyxia induces hypoxic ischemic encephalopathy (HIE) and is a disease affecting severe brain damage and life prognosis. On the other hand, severe neonatal asphyxia develops disseminated intra-vascular coagulation (DIC). In this study, we examined the therapeutic effect of recombinant thrombomodulin (rTM) for neonatal DIC, which was associated with severe neonatal asphyxia, and noticeably improved effect of HIE was observed in addition to the improvement effect of neonatal DIC. Therefore, the brain nerve protection effect of rTM was examined in the middle cerebral artery occlusion (MACO) model using rats. As a result, it was thought that rTM has not only the effect of DIC but also brain nerve protection. It was also suggested that inflammation was involved in the pathological condition. However, we believe that this study requires further verification from the limit of the number of experiments.

研究分野：新生児の止血管理

キーワード：重症新生児仮死 低酸素性虚血性脳症 播種性血管内凝固 トロンボモジュリン 脳神経保護作用

1. 研究開始当初の背景

重症新生児仮死は低酸素性虚血性脳症 (hypoxic ischemic encephalopathy; HIE) を惹起し、重度の脳障害や生命予後に影響する疾患である。そのため、新生児医療において最も重要な課題でもある。新生児仮死に対しは、既に新生児心配蘇生法 (neonatal cardiopulmonary resuscitation; NCPR) が普及し、新生児仮死の発症予防にその効果を上げている。また HIE には脳低温療法も普及し、一定の成果が上がってきているが、その効果は十分でなく、エリストポエチンの脳保護や臍帯血輸血などの新たな治療が試みられている。一方、重度新生児仮死は播種性血管内凝固 (disseminated intravascular coagulation; DIC) を発症する。我々の施設では重度新生児仮死に合併した DIC に対し、本邦で開発された DIC 治療薬である遺伝子組換えトロンボモジュリン製剤 (rTM) を新生児 DIC の治療使用してきた。そして rTM 投与後の治療効果を検証する中で、DIC の改善効果に加え、顕著な HIE に伴う脳傷害の改善効果を観察した。そこで、rTM の HIE での脳傷害に対する治療効果を動物実験モデルで検証する目的で研究を行ってきた。

2. 研究の目的

rTM の脳保護効果を、動物実験モデルを用いて、神経筋機能および脳病理で明らかにするとともに、病態把握のため、脳免疫組織染色を用い、また血液中の炎症性サイトカイン等から明らかにする。

3. 研究の方法

実験開始当初はモデルラットの作成は、Rice JE 3rd & Vannucci RC らの方法¹⁾に準じ、妊娠母親ラットを購入後、施設内で出産させ、生後後 7 日目 (Postnatal day 7) に右総頸動脈を結紮し、7%低酸素負荷後に rTM を投与し脳組織を HE 染色、TUNNEL 染色で傷害を検証した。しかし、虚血傷害率が約半数で

あり、幼若ラットを用いることから、神経筋機能からモデルラットとしての評価が困難であり、rTM 製剤の有効性を検証するには多くの実験動物が必要で動物倫理面からも、また、高額な rTM 試薬を旭化成ファーマから無償提供を受けていることもあり、より確実な実験モデルで検証する方法に変更した。

また、脳病理での傷害部位を HE 染色法、TUNEL 染色法では傷害部位の特定が不明瞭であることから、1%TCC 染色法を用いることとした。以下に方法を示す。

(1) 中大脳動脈閉塞 (MACO) 術

Koizumi J らの方法²⁾に準じて成熟ラットを用いて実施した。実験環境で 7 日間、檢疫・馴化した Crl:CD 雄ラットをイソフルレンで吸入麻酔し、保温維持装置で体温を維持しながら自発呼吸のもとで右頸部切開し、迷走神経を避けて右外形動脈、内頸動脈を剥離後、右が頸動脈から 4-0 ナイロン糸を挿入し、内頸動脈まで糸を挿入し、外形動脈起始部を結紮し中大脳動脈閉塞 (MCAO) モデルラットを作成した。

(2) 神経筋機能評価

Petullo D らの方法³⁾で神経筋機能評価を行った。MCAO の効果は MCAO 後 30 分で運動機能障害を有するものを用いた。その後、6 時間での評価実験は MCAO 後 6 時間目で評価し、その後病理検査を行った。また、24 時間での評価実験では MCAO 後 6 時間後と 24 時間後で評価した。(表 1)

Criteria	Score	Description
Forelimb flexion	0.0	no flexion
〃	0.5	mild
〃	1.0	moderate to severe
Torso twisting	0.0	no signs
〃	0.5	mild
〃	1.0	moderate to severe
Lateral push	0.0	equal resistance
〃	0.5	weaken resistance
〃	1.0	no resistance
Hindlimb placement	0.0	immediately replaces
〃	0.5	delay in replacing
〃	1.0	no replacement
Rotation	0.0	no signs
〃	0.5	mild
〃	1.0	moderate to severe

(3) rTM の投与用量と投与方法

rTM は研究用薬剤として旭化成ファーマから提供を受けた。投与用量が 3mg/kg、5mL/kg になるよう生理食塩水で調整し、投与速度は 2mL/kg/分とした。対照として同量の生理食塩水を投与した。なお、ラットの実験時体重は約 300g (270.4g ~ 303.9g) であった。

(4) 脳病理標本の作製と TTC 染色

中大脳動脈 (MCA) 起始部を基点に吻側 4 および 2mm および MAC 起始部尾側 2, 4 及び 6mm の 6 切片をラット用の脳ブラインスライサーで用いて切片を作成した。切片は 1% TTC-生理食塩水液で、室温で 30 分間染色した。染色後、標本写真撮影した。

(5) 傷害面積の測定

得られた脳組織標本の写真から NIH Image J を用いて、左右の大脳半球面積、傷害面積を求め、同側脳半球 (ipsilateral)、非傷害側脳半球 (contralateral) の脳面積と比較した。Image J での面積計測算出にはスライドサイズ (52mm×76mm) を基に面積を算出した。

(6) 免疫染色

脳組織パラフィン包埋組織切片を脱パラフィン後、5 分間オートクレーブ処理し、水洗、火酸化処理、流水、ウシアルブミンで 10 分間ブロックし、一次抗体 (抗ラット IL-18 抗体; PGI 16806-1-AP は 300 倍希釈、抗ラット TNF α 抗体; PGI 60291-1-IG は 200 倍希釈) 4、overnight で反応させ、TBS で洗浄後、500 倍希釈ビオチン標識抗ウサギ抗体と 30 分間反応、再度 TBS で洗浄し、500 倍ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンで 30 分間反応させ、TBS 洗浄し DAB 発色反応、水洗、ヘマトキシリン核染色、色だし、脱水、透徹、封入した。

対照は一次抗体を加えず同染色を行った。染色撮影解析は浜松ホトニクス C13140-L03

NanoZoomer-SQ パーチャルスライドで撮影し解析した。

(7) 血中 HMGB-1 およびサイトカイン測定
ラット血清、血漿サンプルの HMGB-1 および炎症性サイトカイン (TNF α 、IL-1 β 、IL6) を測定した。

4. 研究成果

(1) MACO 後 6 時間後の比較

MCAO 後の 6 時間後のラット脳の皮質部位領域と線条体部位領域の神経傷害領域の脳面積の比較では rTM 群で対照群に比較して皮質部位領域での傷害領域面積の有意な減少がみられた。しかし、傷害脳の全体あるいは皮質領域の対側脳に対する容積増加率を比較したところ、rTM 群では傷害脳の低下はみられたが有意差はなかった。(平成 27 年報告)

(2) MACO 後 24 時間後の比較

MACO 後 24 時間後では対照群で死亡例がみられ、神経筋機能は rTM 群で対照群と比較し Fisher's exact test で有意な改善がみられた。MCAO 後 24 時間での TTC 染色像では対照群では死亡例及び梗塞巣の拡大に加え、脳浮腫がより強く、MCAO 起始部吻側 2 mm での傷害度と脳容積率皮質領域の傷害部の面積は有意な差異は見られなかったが、rTM 群で有意に浮腫の軽減がみられた(図 1)。

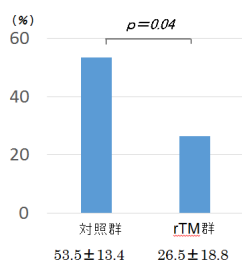


図 1. MACO 後 24 時間の傷害脳の皮質領域の対側脳に対する容積増加率

(3) MACO 後 24 時間後 30 分後と 6 時間後の追加試験結果

rTM を MACO 後 30 分後と 6 時間後に追加投与を行い、24 時間に神経筋機能と 1%TTC

染色での脳病理を行ったが、30分後の単回投与での得られた効果がなかった。

(4) 脳病理組織の免疫染色

MACO 後 6 時間の脳パラフィン切片を用いて免疫染色を行った。

TUNEL 染色、GRAF 染色

TUNEL (TdT mediated dUDP nich end labering) 染色はアポトーシスにより DNA が断片化されたものを検出染色法で傷害側が染色された。一方 GRAF (glial fibrillary acidic protein) は HIE の傷害マーカーでとされ、傷害側に広範囲に染色された。

TNF- α 染色、IL-1 β 染色

TNF- α (tumor necrosis factor- α) は、主にマクロファージから産生されるサイトカインで、IL-1 β も単球やマクロファージで産生され、免疫や炎症を制御する重要な因子で内皮細胞などの活性化や好中球増加などに作用するが、TNF- α 、IL-1 β ともに傷害部位で陽性所見が得られた。

(5) 血中 HMGB-1 および血中サイトカイン測定

血中 HMGB-1 は rTM 投与前で高値を示し、MCAO 後 24 時間後で測定基準値まで低下していた。また、血中サイトカインも MCAO 後の 24 時間後ですでに基準値まで低下していた。rTM の投与効果を MCAO 後 24 時間後の血中測定量からは検証できなかった。

考察

トロンボモジュリンは血管内皮細胞上に発現する抗血栓因子で、血液凝固や血小板活性化に関与するトロンビンと結合することで、トロンビンの凝固能や血小板活性化能を失活させ、抗凝固因子のプロテイン C を活性化することで抗血栓作用を示す。遺伝子組換えトロンボモジュリン製剤 (rTM) が開発され、DIC の治療薬として既に臨床使用され、その有効性が示されている。われわれは、重症新生児仮死に伴う DIC に対し rTM 製剤を使用し、DIC の改善に加え HIE での臨床症状と

MR 画像の顕著な改善が得られたことから、rTM は抗凝固能の改善に加え脳保護作用を有すると考え本研究を行った。本研究は新生児重症仮死を想定し、多くの研究者が仮死モデルラットとしている Rice JE 3rd & Vannucci RC らが考案した幼若ラットの低酸素性虚血性動物モデルで開始した。しかし、脳傷害を有するモデルラットの成功率は少数ラットでの実験ではあるが十分でなく、rTM の有効性の証明には多くの実験動物が必要で、モデル成功の確認も容易でなく、動物愛護の観点および高額な rTM を用いての実験は困難と考え、少ない実験動物でも可能な Koizumi J らの方法に準じ、成熟ラットの MACO 永久結紮モデルで検証した。また、Petullo D らの神経筋機能評価法で MACO 後 30 分での評価でモデル作成が確認することが可能であった。rTM のラットでの投与量は、DIC 治療薬開発時の用量として用いられていた 3mg/kg の単回投与で、対照は溶解液に用いられていた生理食塩水とした。評価は Nedelcu J ら (Pediatr Res.1999 46:297-304) のラットの脳虚血後の MR 画像での脳浮腫解析結果を参考に、MACO 6 時間後で評価した。神経筋機能評価には有意な差が見られなかったが、TTC 染色での脳傷害面積は対照群と比較し有意に縮小していた。同成績は Ryang YU らが同時期に報告したトロンボモジュリン改変遺伝子組換え製剤 Solulin を用いた虚ラットでの虚血再還流実験 (BMC neuroscience 2011,12:113) と同様で、rTM の脳保護作用を支持する成績であった。さらに MACO 単回投与 24 時間後での TTC 染色および神経筋機能評価を行ったところ、傷害部位の縮小効果はみられたが、有意な差ではなかったが、脳浮腫の低下と神経筋機能の有意な改善効果を認めた。rTM 再投与効果を検証するため、Nedelcu J らの報告を参考に結紮後 30 分後と 6 時間の同量再投与を行ったが、単回投与で見られた効果はなかった。そ

の要因として rTM を短時間に 2 回投与を行なったことによる容量負荷も考慮された。

rTM の脳保護作用機序として抗 HMGB-1 作用 (Zhang J, et al. Stroke. 2011;42:1420-1428), PC 活性化による APC の作用 (Yesilirmak DC, et al. Brain Res. 2008 19;1210:56-62) などによる抗炎症効果が推察された。

われわれは重症新生児仮死児の DIC 診断時の止血検査と神経予後との関連を同時に解析しており、予後と止血検査の活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) の延長を明らかにした (未発表)。また、敗血症に伴う DIC でも APTT の延長は予後と関係から、APTT と炎症との関連が推察されている。本研究でも脳病理免疫染色でアポトーシスの病理マーカーの TUNEL 染色、HIE の病理マーカーの GRAP 染色で対側脳と比較し明らかに陽性を示し、同時に炎症マーカーの TNF α 、IL-1 β も陽性を示した。したがって、脳虚血部位では脳傷害に炎症の関与が示唆された。一方、血中の HMGB-1 は MACO 後は高値を示したが MACO 後 24 時間では低下していた。また、血中での炎症性サイトカイン (TNF α , IL-1 β , IL-6) の濃度と rTM の投与との間に有意な差異はなかった。

結語

トロンボモジュリンは抗 DIC 効果に加え、脳保護作用を有すると考えられる。また、低酸素性虚血性脳症の病態に炎症の関与が示唆された。しかし、本研究は実験度物の対象数が少なく、更なる追加試験が必要と考える。

< 引用文献 >

- Rice JE 3rd, et al. Ann Neurol 1981;9:131-141
Koizumi J, et al. Jpn J Stroke 1986;8:1-7
Petullo D, et al. Life Science 1999; 64:1099-1108

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 8 件)

川口千晴, 西久保 敏也, 白幡 聡, 高橋 幸博 新生児仮死および感染症に起因した新生児 DIC 症例の凝固線溶系検査所見と予後の関連 (原著論文) 日本産婦人科・新生児血液学会誌 (0916-8796) 26 巻 2 号 Page53-59 (2017.03) 査読有 ISSN 0916-8796

[学会発表] (計 10 件)

高橋 幸博, 他 新生児仮死、低酸素血症と播種性血管内凝固 (DIC) リコンビナント・トロンボモジュリン療法。第 26 回日本産婦人科・新生児血液学会、2016 年、長崎市

高橋幸博, 他 重症新生児仮死児

への遺伝子組み換えトロンボモジュリンによる脳保護効果 第 61 回日本新生児成育医学会。2016 年、大阪市

[図書] (計 3 件)

Takahashi Y Clinical manifestations of ITP in children Springer Nature Shingapore P205-216 DOI 10.1007/978-981-10-4142-6_22 2017

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

記載なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 幸博 (TAKAHASHI, Yukihiro)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号: 60142379

(2) 研究分担者

西久保 敏也 (NISHIKUBO, Toshiya)

奈良県立医科大学・医学部・病院教授

研究者番号: 20208169

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

加治木 正洋 (KAJIKI, Masahiro)

左近上 博司 (SAKONJO, Hiroshi)

伊藤 昭人 (ITOU, Akito)