

博士論文

論文題目 Lectin-like oxidized low-density lipoprotein
receptor-1 (LOX-1) is a novel therapeutic target in
neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy
(LOX-1 は新生児低酸素性虚血性脳症の新たな治療ターゲ
ットである)

氏名 赤松 智久

目次

I. 要旨	4
II. 序文	6
1. 新生児低酸素性虚血性脳症	6
2. 新生児低酸素性虚血性脳症に対する低体温療法	11
3. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1)とは	13
III. 目的	15
IV. 方法	16
1. 新生児 HIE モデルと低体温療法のメカニズム解明	16
1-1. 動物、新生児 HIE モデル、低体温療法	16
1-2. 脳組織の準備	18
1-3. 梗塞面積の評価	19
1-4. アポトーシスの評価	19
1-5. マイクロアレイと定量 PCR による遺伝子発現解析	21
1-6. In situ hybridization	22
2. 新たな治療方法の効果判定	23
2-1. 新たな治療薬と投与方法	23
2-2. 梗塞面積の評価とアポトーシスの評価	24
2-3. ウェスタンブロットと ELISA	25
2-4. 脳浮腫の評価	26
3. 統計解析	27
V. 結果	28
1. 新生児 HIE モデルと低体温療法の評価	28
2. マイクロアレイ解析と定量 PCR による低体温療法関連遺伝子の特定	33
3. In situ hybridization による遺伝子発現細胞の同定	38
4. 2MeSADP 治療と抗 LOX-1 中和抗体治療の梗塞面積による評価	39

5. 抗 LOX-1 中和抗体治療のアポトーシス評価.....	42
6. 抗 LOX-1 中和抗体治療の生化学的評価.....	45
7. 抗 LOX-1 中和抗体治療の脳浮腫と tight junction proteins への影響の評価... 48	
VI. 考察	50
1. 新生児 HIE モデルと実験的低体温療法について.....	50
2. 遺伝子発現変化と候補遺伝子について.....	51
3. 新生児 HIE に対する新しい治療としての LOX-1 (遺伝子名 <i>Olr1</i>) の阻害	53
4. P2y13 の新生児 HIE に対する治療法としての可能性	57
VII. 結論	59
VIII. 謝辞	60
IX. 文献	61

I. 要旨

新生児医療は著しく発展してきたが、新生児低酸素性虚血性脳症 (hypoxic-ischemic encephalopathy: HIE) の発症率は 20 世紀後半より変化がない。低体温療法は新生児 HIE に有効な治療であるが、より簡便かつ普遍的な治療法の開発が必要である。本研究の目的は、低体温療法の神経保護作用機序の解明と、それを利用した代替治療の開発である。最初に、新生児 HIE モデルラットの低体温療法から LOX-1 分子の高い神経傷害性をみだし、さらに、抗 LOX-1 中和抗体が低体温療法と同程度にアポトーシスと脳浮腫を抑制することを明らかにした。

LOX-1 は新生児 HIE における新しい治療ターゲットである。

(略語表)

ATP : adenosine triphosphate

cCASP3 : cleaved caspase 3

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

DW : deionized-water

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

HI : hypoxia-ischemia

HIE : hypoxic-ischemic encephalopathy

LDL : low density lipoprotein

LOX-1 : lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1

MDA : malondialdehyde

MMP : matrix metalloproteinase

Olr1 : oxidized low density lipoprotein receptor 1

P2ry13 ,P2y13: P2Y purinoceptor 13

PBS : phosphate buffer saline

PCR : polymerase chain reaction

ROS/RNS : reactive oxygen species / reactive nitrogen species

SD rat : Sprague-Dawley rat

TBS : tris-buffered saline

TJP : tight junction protein

TUNEL : TdT-mediated dUTP nick end labeling

2MeSADP : 2-(Methylthio)adenosine 5' -diphosphate trisodium salt hydrate

CTL 群 : コントロール群

HIE 群 : 低酸素性虚血性脳症群

HT 群 : 低体温療法群

II. 序文

1. 新生児低酸素性虚血性脳症

新生児低酸素性虚血性脳症 (hypoxic-ischemic encephalopathy: HIE) は、新生児仮死に伴う脳の低酸素・虚血によって引き起こされる脳傷害である。近年の新生児医療の発展は目覚ましいが、新生児 HIE は出生 1000 に対して 1-6 人の割合で起こる¹。新生児 HIE は、その致死率は 10-60% と依然高く、生存者の 25% が脳性麻痺、発達遅滞、聴覚障害、てんかんなどの神経学的後遺症を残す^{2,3}。新生児 HIE は母体要因（子癇、低血圧、感染、ショックなど）、胎盤要因（臍帯巻絡、前置胎盤、常位胎盤早期剥離など）、児の要因（奇形、ショック、感染、呼吸循環不全など）がもたらす新生児の脳血流減少が病態の第一段階であり、臨床的には新生児仮死に引き続き起こる。満期産児における新生児 HIE では、大脳皮質や基底核といった脳灰白質が傷害を受けやすい。

HIE の生化学的研究から、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の神経毒性やサイトカインなどの炎症性物質の重要性が知られている。HIE は、低酸素・虚血負荷後の時間経過によりいくつかの段階に分けられる。様々な臨床症状がみられる **primary phase** は数分～数時間の極急性期で、その後、再灌流後に臨床的に症状を認めず、一旦回復したかのようにみえる **latent phase** (～数時間)、再び痙攣、脳浮腫などの臨床症状が現れる **secondary phase** (数時間～数週間)

と進行する（図1）⁴。

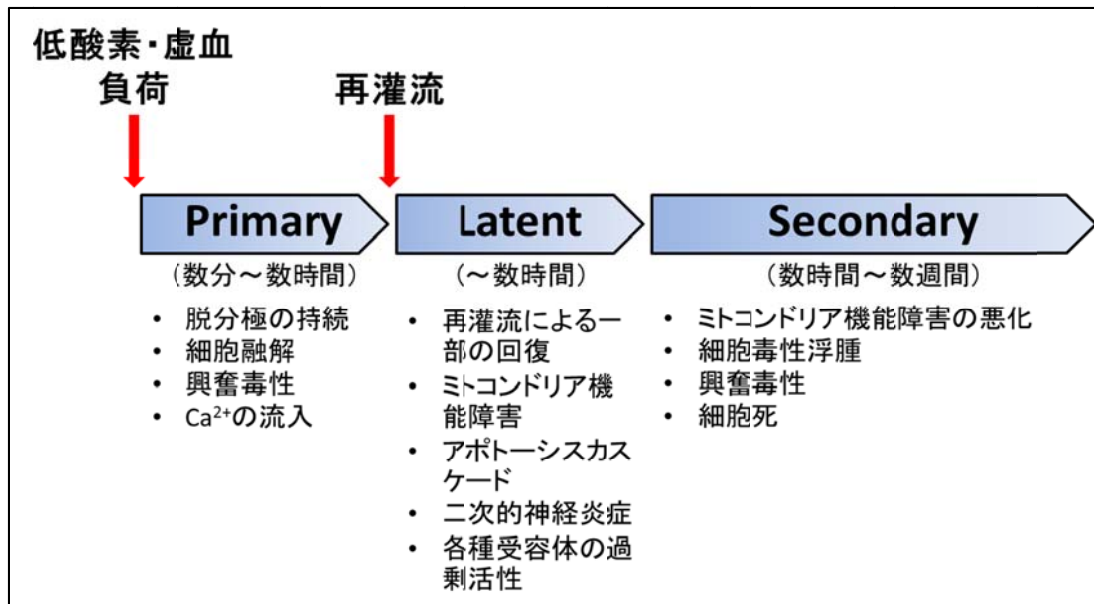


図1：新生児低酸素性虚血性脳症における脳傷害の進行

新生児低酸素性虚血性脳症は低酸素・虚血負荷後、primary phase、latent phase、secondary phase と進行する。

(Semin Fetal Neonatal Med. 15(5):287-92 (2010)⁴より引用一部改変)

primary phase では、組織の酸素およびグルコース欠乏から、adenosine triphosphate (ATP)欠乏および代謝性アシドーシスに至り、ATP 依存性 Na⁺ポンプの機能不全から Na⁺と水が細胞内に流入し、細胞融解（ネクローシス）を引き起こす。また、エネルギー不足から神経細胞膜の脱分極の持続、グルタミン酸輸送体の機能不全及び反転が起こることで、グルタミン酸の過剰放出と再取り込みの低下が起こり、細胞外にグルタミン酸の蓄積が起こる。この細胞外グルタミン酸の増加がカルシウム通過性のグルタミン酸受容体

(N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体など) を活性化し、細胞内への Ca^{2+} の過剰な流入を引き起こす。同時に、神経細胞の膜電位の消失が電位依存性のカルシウムチャネルを開くことでも Ca^{2+} の流入が引き起こされる (図 2) ⁵。

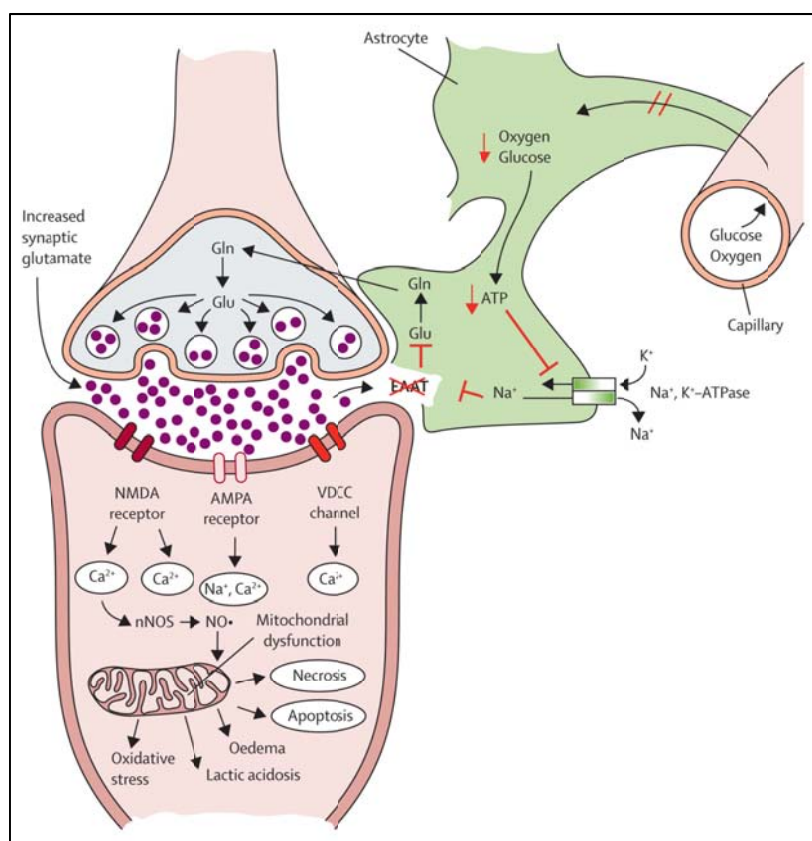


図 2 : グルタミン酸の細胞間隙での蓄積と Ca^{2+} の流入

Glu の過剰放出と再取り込低下により細胞間隙に Glu が蓄積される。グルタミン酸受容体の活性化および VDCC の開口により Ca^{2+} が細胞内に流入する。流入した Ca^{2+} は RNS を発生させ、ミトコンドリアを傷害し、細胞死のカスケードが進行する。

ATP= adenosine triphosphate. EAAT=excitatory aminoacid transporter.

Gln=glutamine. Glu=glutamate. NMDA=N-methyl-D-aspartate.

AMPA=α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid.

VDCC=voltage-dependent calcium channels. nNOS=neuronal nitric oxide synthase. NO=nitric oxide. RNS=reactive nitrogen species.

(Lancet Neurol. 10(4):372-82 (2011)⁵.より引用)

Latent phase から secondary phase においては、細胞死へのカスケードが進行し、さらに不可逆的な悪循環へと進行する。細胞内への過剰な Ca^{2+} の流入は reactive nitrogen species (RNS) を産生し、ミトコンドリアの機能を障害することで reactive oxygen species (ROS) を産生する。これによりミトコンドリアから cytochrome *c*、apoptosis-inducing factor (AIF) が放出されてアポトーシスを誘導する（内因性経路）。一方で、低酸素・虚血で生じる神経炎症には、主にサイトカイン、ケモカイン、ROS、matrix metalloproteinases (MMPs)、細胞接着分子が関わっている。炎症性サイトカインは神経細胞の Fas 受容体を活性化することで外因性経路による細胞死を誘導する。MMPs は炎症性サイトカインの活性化を引き起こし、さらに、細胞外マトリックスを分解して血液脳関門を破壊し、単球やマクロファージの侵入、脳浮腫を起こすことで神経を傷害する^{6,7}。アポトーシスの過程で断片化された DNA は poly-ADP-ribose polymerase 1 (PARP1) を活性化することで nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)⁺ を消費し、ミトコンドリアのエネルギー不足を加速する。これらカスケードにおけるミトコンドリアの機能不全が、さらにエネルギー不足を招き、再び膜電位の消失を招き、細胞傷害の悪循環に陥る（図 3）^{5,8}。

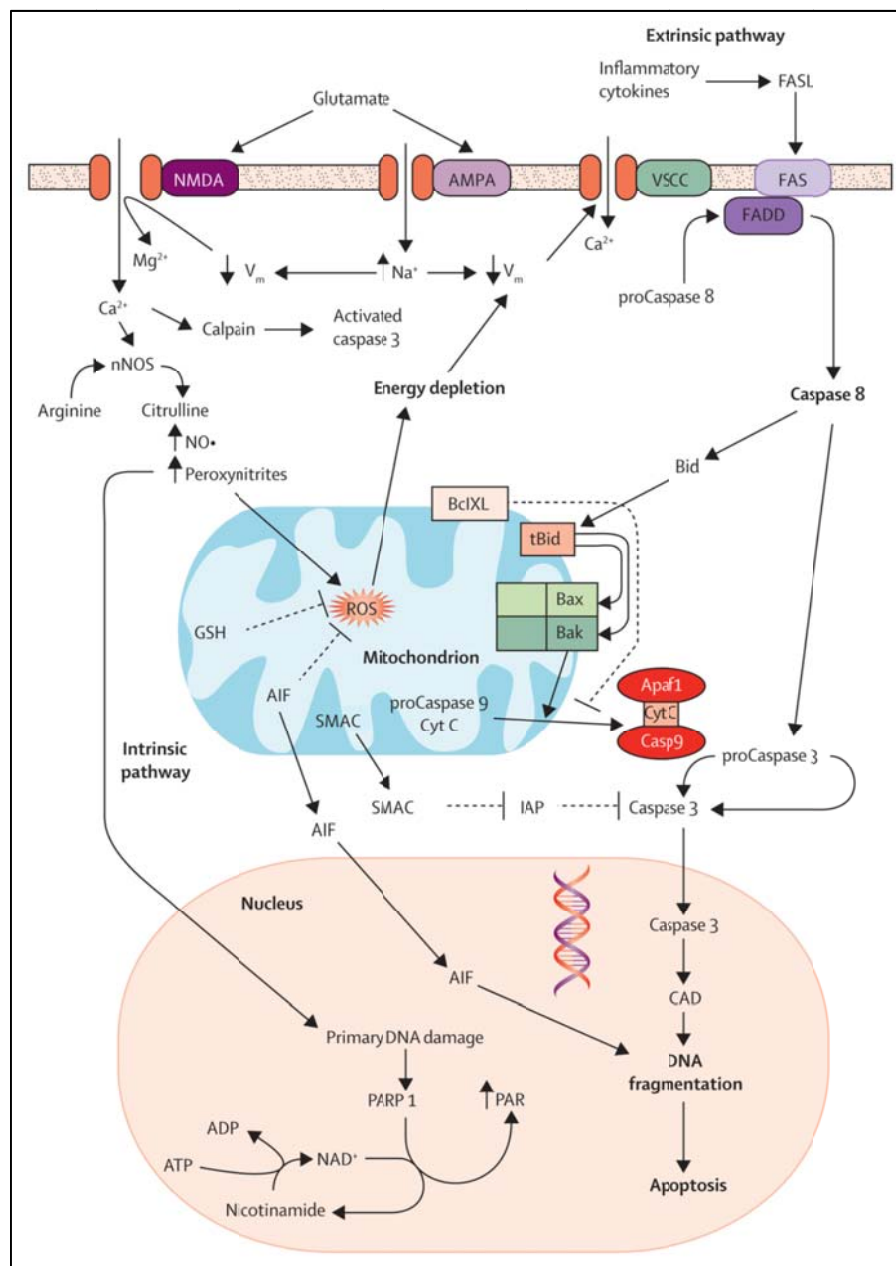


図 3：細胞死へのシグナル経路

Ca^{2+} の流入によって傷害されたミトコンドリアは *Cyt c* や AIF を放出してアポトーシスを誘導しサイトカインは Fas 受容体を介して外因性経路にてアポトーシスを誘導する。また、断片化された DNA は PARP1 を活性化することで NAD^+ を消費し、ミトコンドリアのエネルギー不足を加速する。ミトコンドリアの機能不全がさらなるエネルギー不足を引き起こし、細胞傷害の悪循環に陥る。

V_m =membrane potential. NMDA=N-methyl-D-aspartate.

AMPA= α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid.

VSCC=voltage sensitive calcium channel. Fas=death receptor in tumor necrosis factor family. FASL=fas ligand. FADD=fas adaptor death domain

protein. nNOS=neuronal nitric oxide synthase. NO= nitric oxide.
BclXL=B-cell lymphoma-extra large. Bax and Bak=Bcl-2-associated X
protein and Bcl-2 homologous antagonist/killer. tBid=truncated BH3-only
proapoptotic protein. Bid=BH3 interacting domain. Apaf1=apoptotic protein
activating factor 1. Casp9=caspase 9. SMAC= second mitochondria-derived
activator of caspases. IAP=inhibitor of apoptosis. CAD=caspase activating
DNase. Cyt *c*=cytochrome *c*. ROS=reactive oxygen species. GSH=glutathione.
AIF=apoptosis-inducing factor. ADP=adenosine diphosphate. ATP=
adenosine triphosphate. PARP1=poly-ADP-ribose polymerase 1.
PAR=poly-ADP ribose formed by ribosylation of DNA and proteins.
NAD=nicotinamide adenine dinucleotide.
(Lancet Neurol. 10(4):372-82 (2011)⁵.より引用、一部改変)

このため HIE の治療は、不可逆的な細胞傷害の悪循環に陥る前に行われなければならない。Primary phase は受傷起点となるので治療介入は難しく、secondary phase ではすでに不可逆的な病態に陥っているため遅すぎる。HIE と診断されてから latent phase の間に治療を開始することが必要となる。Latent phase は HIE の重症度によって異なるが、ヒトにおいては受傷後約 6 時間と考えられている。

2. 新生児低酸素性虚血性脳症に対する低体温療法

低体温療法は新生児 HIE に対して臨床的に有効性が証明されている。新生児に対する低体温療法の歴史は古く、17 世紀に英国で仮死児を冷水に浸して蘇生していたという記述がある⁹。1950 年代に低体温療法による脳保護の臨床データが集められたが、早産児に対する低体温療法の危険性が拡大解釈され、新生

児での低体温療法の道は一時閉ざされることとなった⁹⁻¹²。その後、成人領域での応用と新生児領域での実験データの蓄積により、1990年代後半より臨床試験が行われるにいたった。2010年までに6つの大規模な多施設ランダム化比較試験、Cool Cap Trial、National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) Trial、Total Body Hypothermia for Neonatal Encephalopathy (TOBY) Study、neo. nEURO Trial、中国での Trial、Infant Cooling Evaluation (ICE) Trial が行われ、新生児 HIE に対する低体温療法の有効性が証明された¹³⁻¹⁸。2010年、低体温療法は International Liaison Committee on Resuscitation (ILCOR)にて中等度から重度の新生児 HIE に対する標準治療とされた¹⁹。

低体温療法は患児の脳温度を低下させることでエネルギー消費を減らし、グルタミン酸の放出を抑制し、グルタミン酸再取り込み障害を改善し、フリーラジカルの発生を抑制することで細胞傷害の悪循環を断ち、脳神経保護に働くとされている^{4,8}。さらに、脳傷害後の低体温療法は、脳浮腫による脳圧亢進を抑制する働きもある²⁰。しかし、このような低体温療法の脳保護作用に関わる分子機序は非常に複雑であり、明確にはわかっていない。

また、低体温療法には多くの問題点がある。低体温療法を行うには冷却装置、人工呼吸器、脳波モニターなど特別な機器を必要とし、手技、管理が非常に煩

雑であるため、低体温療法は特定の高度医療機関でしか行うことができない。

一方で、新生児仮死および新生児 HIE はあらゆる出産施設にて予期せず起こりうるものであり、低体温療法を行うためには高度医療機関への新生児搬送が必要となる。低体温療法は出生後 6 時間以内に開始されないと効果がないといわれているが、新生児 HIE は出生前または出生時から進行しており、煩雑な手技に加え、新生児搬送などで時間をとられているとその治療効果は失われてしまう。さらに、低体温療法からの復温時には、血液脳関門の透過性亢進から、脳圧のリバウンド上昇が認められる²⁰。特に発達段階の脳においては、血液脳関門が様々なストレスに弱く、脳浮腫に対する対策は非常に重要である²¹。より多くの患児を救うためには、このような低体温療法の欠点を補うことのできる、あらゆる施設で早期より施行可能で、より簡便な治療の開発が必要なのである。

3. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1)とは

LOX-1はSawamuraらによって1997年に酸化low-density lipoprotein (LDL)の受容体として同定された²²。構造は、N末端が細胞質内、C末端が細胞外に出る細胞膜一回貫通型のⅡ型膜蛋白である。N末端側より細胞質ドメイン、膜透過性ドメイン、ネックドメイン、レクチン様ドメインの4つのドメインからなり、レクチン様ドメインが酸化LDL認識部位である。ヒトLOX-1は、レクチン様ドメインの根元にシステイン残基が1つ余分にあり、これが分子間のS-S

結合に寄与することにより、ホモ 2 量体として機能している。LOX-1 の発現を誘導する刺激は多数あり、in vitro で、angiotensin II、C-reactive protein(CRP)、endothelin-1、interleukin-1 β 、oxidant species、shear stress、tumor necrosis factor- α など、in vivo で、粥状硬化症、糖尿病、高脂血症、高血圧、虚血再灌流などが確認されている。LOX-1 のリガンドとしては、酸化 LDL、heat shock protein 70、アポトーシス細胞、フォスファチジルセリン、CRP などが同定されている。LOX-1 は主に粥状硬化症の形成および増悪因子として研究がされており、血管内皮細胞、単球・マクロファージ、血管平滑筋細胞、心筋細胞などに発現していることが確認されている。粥状硬化症において、LOX-1 の活性化は血管内皮細胞のアポトーシス・機能不全、血管内皮細胞への単球の接着、血管平滑筋細胞の増殖・アポトーシス、マクロファージの泡沫細胞形成、血小板の凝集を引き起こす²³⁻²⁸。

Ⅲ. 目的

近年、低体温療法の補助治療、代替治療として N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体のアンタゴニストであるキセノン、抗酸化効果を有するアロプリノール、フリーラジカルスカベンジャーであるエダラボン、一酸化窒素合成酵素阻害剤、抗酸化・抗炎症・神経栄養作用のあるエリスロポエチンなどの開発、導入が試みられているが、いずれも十分な治療効果を示すには至っていない²⁹。これらの治療は新生児 HIE の病態に着眼し、その一部を改善する目的で考案されたものである。そこで、現在 HIE に対する有効性が証明されている低体温療法の作用機序を解明し、同じ作用機序を持つ治療法を開発することが、より普遍的な代替治療の確実な開発につながると考えた。

本研究の目的は、低体温療法の新生児 HIE に対する分子作用機序を解明することと、その作用機序を利用した新生児 HIE に対する新たな治療法を開発することである。

IV. 方法

1. 新生仔 HIE モデルと低体温療法のメカニズム解明

1-1. 動物、新生仔 HIE モデル、低体温療法

全ての実験は国立精神・神経医療研究センターの動物実験倫理委員会の承認を得て行った（承認番号：2012009）。生後 7 日齢の Sprague-Dawley (SD) ラットを使用し（CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan）、コントロール群（CTL 群）、低酸素性虚血性脳症群（HIE 群）、低体温療法群（HT 群）に分けた。新生仔 HIE モデルのための低酸素・虚血負荷（hypoxic-ischemic insult: HI 負荷）は、Rice-Vannucci のモデルに従い、生後 7 日齢に行った³⁰。まず、ジエチルエーテル吸入によってラットに麻酔をかけ、頸部正中に切開を入れ、左総頸動脈を同定した。次に、左総頸動脈を二重結紮し、結紮間にて動脈を切断した。その後、2 時間の母仔飼育を行った。その後、アクリルボックスの中にラットを配置し、酸素濃度モニター下にて窒素を 10L/分の流量でアクリルボックス内に流し込み、8%の低酸素状態として 2 時間保持した。HI 負荷の間、全てのラットの体温を 36°C に保持した。体温は、一実験の中で無作為に選ばれた一匹のラットで、直腸温にてモニターし、外気温と、ヒートマットを利用した体温コントローラーによって管理した（ACT-101B, Unique Medical, Tokyo, Japan）。体温コントローラーは直腸温からフィードバックしてヒートマットにて体温を管理するものであるが、実際の体温の経時的変化は記録していない。体温管理中はラット同

士の重なりを防ぎ、全てのラットがヒートマットに接触するようにアクリル板にて一匹ずつを仕切った。CTL 群のラットは生後 7 日齢に体温を 36℃に、3 時間保ち、その他の手術や治療は行わなかった。HIE 群のラットは生後 7 日齢に HI 負荷を施したのち、体温を 36℃で 3 時間保持し、母親のもとに返した。HT 群のラットは生後 7 日齢に HI 負荷を施し、速やかに外気温と ice pack によって体温を 28℃に冷却し、体温を 28℃で 3 時間保持したのちに母親のもとに返した。体温モニターに使用されたラットには過剰なストレス負荷による実験結果への影響を考え、全ての実験から除外した³¹。ラットは屠殺するまで 12 時間毎の明暗サイクルの部屋で管理した（図 4）。

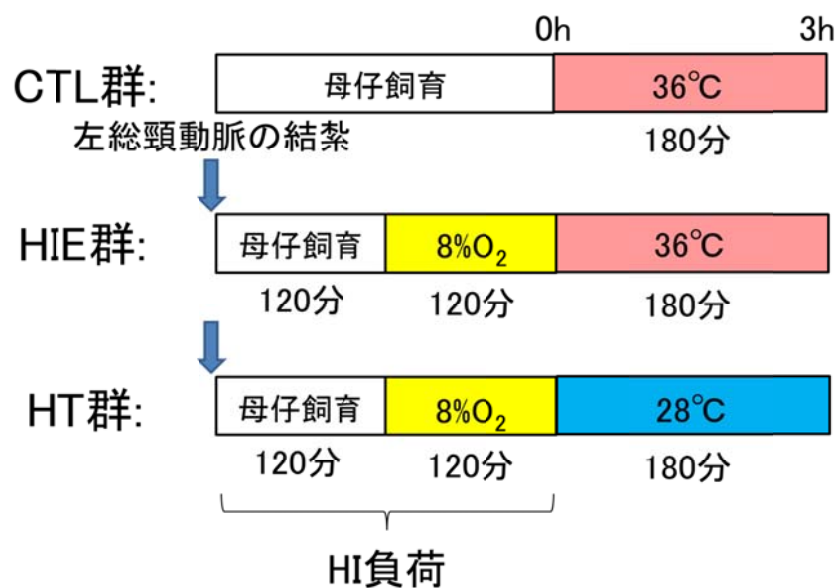


図 4：各群の処置

コントロール（CTL）群では低酸素・虚血（HI）負荷を行わず、36℃で 3 時間の体温管理のみ行った。低酸素性虚血性脳症（HIE）群では HI 負荷後 36℃で 3 時間の体温管理を行った。低体温療法（HT）群では HI 負荷後 28℃で 3 時間の体温管理を行った。

1－2．脳組織の準備

ラットは HI 負荷後 3, 6, 24, 48, 72 時間に、ジエチルエーテルの吸入にて麻酔をかけ、経心室的にリン酸緩衝食塩水（phosphate buffer saline : PBS, pH 7.4）または 4%パラフォルムアルデヒドで十分に灌流した。その後、速やかに脳を摘出した。

病理組織学的解析のために、4%パラフォルムアルデヒドで灌流後、4℃で 24 時間 4%パラフォルムアルデヒドにて後固定した。その後、エタノールで脱水し、パラフィン包埋した。脳のパラフィンプロックは冠状方向で厚さ $4\mu\text{m}$ の切片にしたのち、Nissl 染色、TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)解析、および in situ hybridization に使用した。

発現解析のために、マイクロアレイ解析と定量 polymerase chain reaction (PCR) 用の脳を PBS にて灌流後、脳下垂体茎の 1 mm 前方で冠状方向に切断した。切断面の後部の左大脳皮質の病巣部を切除し、液体窒素にて凍結後、 -80°C にて保存した。全ての手技は、RNase free 処置した状態で行われた。

ウェスタンブロットと enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 用の脳は、PBS にて灌流後、大脳を左右半球に分けて液体窒素にて凍結後、 -80°C にて保存した。

1－3．梗塞面積の評価

梗塞面積の評価は、海馬・視床レベルの切片を Nissl 染色することで行った。Nissl 染色は神経細胞の Nissl 小体を染色することにより、神経細胞を特異的に染色する手法である。切片を脱パラフィン後、0.1%クレシルバイオレットにて 5 分間処理し、染色した。神経細胞の染色された切片の写真は、顕微鏡 (BX51; Olympus, Tokyo, Japan) にて 20 倍率の拡大にて撮影した。写真上で、梗塞側 (左) 半球の正常な組織面積の合計と健側 (右) 半球全体の面積を測定し、その比 (梗塞側の正常組織面積/健側の面積) を計算して梗塞面積の評価に使用した。面積の測定は Image J ソフトにて行った。

1－4．アポトーシスの評価

アポトーシスの評価は、海馬・視床レベルの切片において TUNEL 解析にて行った。TUNEL 解析は、Apop Tag Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore, Billerica, MA) を使用した。パラフィン切片の脱パラフィン処理を行ったのち、プロテナーゼ K (20 μ g/ml) にて 15 分間酵素処理を行った。PBS で洗浄後、terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) 緩衝液で処理し、37°C で 1 時間 TdT 反応液にて deoxyuridine triphosphate (dUTP) を付加した後に、遮光、室温にて蛍光標識抗 digoxigenin 抗体と 30 分間反応させた。PBS で洗浄後、対比染色として 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色を行った。また、

神経細胞でのアポトーシスを確認するため、抗 NeuN マウス抗体 (Millipore, Billerica, MA)にて二重染色した。二重染色においては、蛍光標識抗 digoxigenin 抗体反応後、PBS にて洗浄し、2% bovine serum albumin (BSA) in PBS にてブロッキングした。1000 倍希釈の抗 NeuN マウス抗体と 4℃で一晩反応させ、二次抗体として蛍光標識抗マウス IgG 抗体と室温で 60 分間反応させた後に DAPI 染色を行った。抗 NeuN 抗体は神経細胞の核を特異的に染色するため、DAPI は細胞核を非特異的に染色するために用いた。染色した切片の写真は、蛍光顕微鏡 (BX51 ; Olympus, Tokyo, Japan) にて 200 倍率の拡大にて撮影した。

1x1mm² に観察される TUNEL 陽性細胞と DAPI 陽性細胞を数え、その比 (TUNEL 陽性細胞数/DAPI 陽性細胞数) を計算した。これを梗塞側大脳新皮質 4 か所で行い、その平均値を計算し、アポトーシスの評価を行った (図 5)。

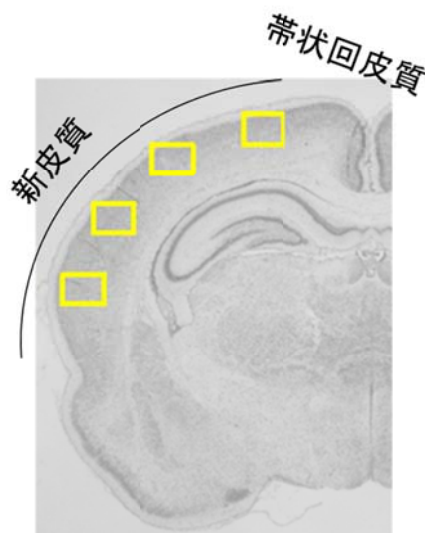


図 5 : TUNEL 解析の評価部位

大脳新皮質を 4 等分し、各領域 1 か所 (黄色四角部分) においてアポトーシスの評価を行った。

1-5. マイクロアレイと定量 PCR による遺伝子発現解析

RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands)を使用し、 -80°C に保存されていた梗塞側大脳皮質のサンプルから total RNA を抽出した。DNase I (QIAGEN)にて DNA を分解処理した。NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA)にて、抽出した total RNA の RNA 濃度を測定した。

マイクロアレイ解析は HI 負荷後 3 時間のラットを用いて行った。2 匹のラットから別々に抽出した total RNA を等量ずつ混合し、1 つのサンプルとし、各群 2 サンプルずつ準備した。Ambion WT Expression Kit および GeneChip WT Terminal Labeling Kit and Controls Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA) を使用し、random primer を用いて reverse transcription を行って total RNA より cDNA を合成、精製し、ビオチン標識したのちに GeneChip Rat Gene 1.0 ST Array (Affymetrix)に加え、 45°C 、17 時間でハイブリダイズさせ、Expression Console Version1.1 (Affymetrix)にて解析を行った。各群で 2 サンプルの平均値を計算し、群間の発現量の比較を行った。HI 負荷による遺伝子発現の変化は 3 倍以上の上昇、または $1/2$ 以下の低下を有意な変化とした。

次に、マイクロアレイ解析にて低体温療法の神経保護作用に関連している可能性があると考えられた 12 遺伝子について、HI 負荷後 3, 6, 24, 48 時間のラットを用いて定量 PCR を行った。まず、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA)を使用し、大

脳皮質から抽出した total RNA から random primer にて cDNA を合成した。

その後、TaqMan プローブを用いて目的の 12 遺伝子の定量 PCR を行った。レファランス遺伝子として、*Gapdh* を用い、全ての遺伝子の発現量は *Gapdh* にて補正した。

1 – 6 . In situ hybridization

遺伝子発現解析によって治療ターゲットの候補となった *Olr1* と *P2ry13* の発現部位を同定するために、in situ hybridization を行った。PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Basel, Switzerland) を使用して、*Olr1* のプライマー (forward(F): TGACCCTGCCATGCCATGCT、reverse(R): TGGGGATGGTG GAGGCCCTG)、*P2ry13* のプライマー (F: CCTGGGGCTGCTGTGGCATC、R: TTCGCCTCCAGCCGCTTGTG) を用い、PCR にてそれぞれのテンプレート DNA を増幅し、digoxigenin (DIG) に標識したプローブを作成した。海馬・視床レベルの冠状断のパラフィン切片を脱パラフィン後、4%パラフォルムアルデヒドにて 20 分間再固定を行った。Tris-buffered saline (TBS, pH 7.5) にて洗浄後、200mM HCl にて 10 分間タンパク変性を行った。TBS で洗浄後、非特異的バックグラウンドを減らすため、0.5%無水酢酸を含む 100mM Tris (pH 8.0) にて 10 分間処理した。TBS にて洗浄後、プロテナーゼ K 溶液 (2mM CaCl₂、20μg/ml プロテナーゼ K in TBS) にて 37°C、20 分間処理し、洗浄、反応停止

後にエタノールにて脱水した。その後、切片とプローブを 55℃、16 時間ハイブリダイズさせた。洗浄後、10% BSA in TBS にてブロッキングを行い、アルカリフォスファターゼ標識の抗 DIG 抗体と 60 分間反応させ、4-nitro blue tetrazolium chloride (NBT) / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) にて発色させた。全ての手技は、nuclease free 状態にて行った。切片の写真は、顕微鏡にて 20 倍率の拡大にて撮影した。

2. 新たな治療方法の効果判定

2-1. 新たな治療薬と投与方法

新生児 HIE に対する新たな治療薬として、抗 LOX-1 中和抗体 (R&D Systems, Minneapolis, MN) と P2Y purinoceptor 13 (P2y13) のアゴニストである 2-(Methylthio)adenosine 5'-diphosphate trisodium salt hydrate (2MeSADP) (Sigma-Aldrich Corporate, St. Louis, MO) を用いた。各種治療群では、生後 7 日齢に HI 負荷を施し、HI 負荷直後から治療を開始し、同時に体温を 36℃で 3 時間保持してから母親のもとに返した。

抗 LOX-1 中和抗体は、PBS に溶き、6µg/kg あるいは 60µg/kg の用量で腹腔内投与した。対照として PBS 治療群を作り、PBS を 0.1ml/回にて腹腔内投与した。それぞれ、ラットが屠殺されるまで最大 72 時間、1 日 2 回投与された。

2MeSADP は、蒸留水(deionized-water : DW)に溶き、0.25mg/kg、2.5mg/kg、25mg/kg の用量で腹腔内投与した。対照として DW 治療群を作り、DW を 0.1ml/回にて腹腔内投与した。それぞれ、ラットが屠殺されるまで最大 72 時間、1 日 1 回投与された。

脳組織の準備は 1-2 と同様に行った。

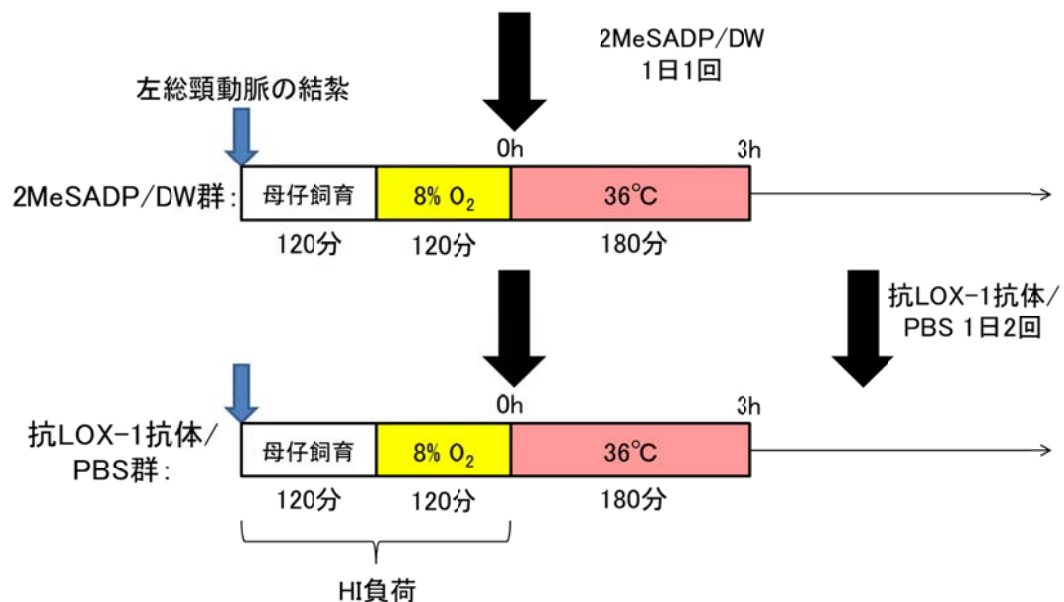


図 6：治療群の処置

各治療群では低酸素・虚血 (HI) 負荷直後から治療を開始し、同時に 36℃で 3 時間の体温管理を行った。2-(Methylthio)adenosine 5'-diphosphate trisodium salt hydrate (2MeSADP) / 蒸留水 (DW) は 1 日 1 回、抗 LOX-1 中和抗体 / リン酸緩衝食塩水 (PBS) は 1 日 2 回投与し、治療は屠殺まで続けた。

2-2. 梗塞面積の評価とアポトーシスの評価

治療効果の病理組織学的評価は、1-3、1-4 と同様に Nissl 染色および TUNEL 解析にて行った。

2-3. ウェスタンブロットと ELISA

低体温療法および新たな治療法の分子動態を調べるため、梗塞側半球でのアポトーシス、酸化ストレス、tight junction proteins (TJPs)の量的評価をウェスタンブロットと ELISA によって行った。梗塞側の半球全体を組織溶解液(50mM Tris-HCl, pH7.4, 0.15M NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% deoxycholic acid)の中で、超音波ホモゲナイザーを使用して溶解し、タンパク質を抽出した。BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA)を用いて、抽出液のタンパク質濃度を測定した。

ウェスタンブロットでは、sodium dodecyl sulfate (SDS)ポリアクリルアミドゲル (12%) に各レーン 20 μ g ずつのタンパク質をのせ、125V で電気泳動後にポリビニリデンジフルオライド膜に 2mA/cm²、1 時間にて転写した。5%スキムミルク in PBS-Tween にて 37°C、20 分間のブロッキング後、ポリビニリデンジフルオライド膜を 4°Cで一晩、一次抗体と反応させた。二次抗体 (5000 倍希釈の抗ウサギ IgG 抗体) と室温で 60 分間反応後、膜上の目的タンパク質は ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)にて検出した。一次抗体として、抗 active-caspase 3 ウサギ抗体 (1000 倍希釈) (Sigma-Aldrich Corporate, St. Louis, MO)、抗 occludin ウサギ抗体 (250 倍希釈) (Zymed Laboratories Inc., Carlsbad, CA)、抗 ZO-1 ウサギ抗体 (500 倍希釈) (Zymed Laboratories Inc.)、抗 Gapdh ウサギ抗体 (1000 倍希釈) (Abcam,

Cambridge, UK) を用いた。特異的バンドを検出後、Image Quant TL (GE Healthcare)にて相対的発現量を評価した。Gapdh をレファランスタンパクとして補正を行った。

Malondialdehyde (MDA) の量的評価を行うために、Rat MDA ELISA Kit (CUSABIO, Hubei, China)を使用し、ELISA を行った。MDA に対する抗体が塗布されたウェルにサンプルを加え、反応させ、さらにビオチン標識抗 MDA 抗体と反応させた後に、発色させ、吸光度計にて測定を行った。MDA レベルはサンプルのタンパク質濃度にて補正した。全ての検体は二重に検出を行い、その平均値を用いた。

2-4. 脳浮腫の評価

脳浮腫の評価として、脳水分率の評価を行った。HI 負荷後 24、48、72 時間にラットをジエチルエーテル吸入にて麻酔し、速やかに脳を取り出した。直後に左右大脳半球を切断し、それぞれ重量を測定した (乾燥前重量)。その後、オープンにて 85℃で 72 時間、脳を乾燥させ、左右半球それぞれの重量を測定した (乾燥後重量)。各半球で脳水分率を $\{(乾燥前重量 - 乾燥後重量) / (乾燥前重量)\}$ として計算し、健側半球を対照として、梗塞側半球/健側半球の比を算出した。この比を脳浮腫の評価に使用した。

3. 統計解析

全てのデータは平均値±標準偏差で表した。Statcel 2 (OMS Publication, Saitama, Japan) を用いて、多群間の比較には analysis of variance (ANOVA) 解析を、2 群間の比較には t 検定または Mann-Whitney's U 検定を行った。 $p<0.05$ を有意差とした。

V. 結果

本研究には 396 匹の SD ラットを用いた。生後 7 日齢において、各群間で性別および体重に有意な差はなかった（表 1）。

実験		実験群			
		CTL	HIE	HT	anti-LOX-1 60 μ g/kg
Infarct & TUNEL	n	27	30	27	23
	male	14	17	14	10
	weight (g)	18.1 \pm 1.81	17.8 \pm 1.75	17.8 \pm 1.86	19.0 \pm 2.61
Microarray & qPCR	n	26	33	25	
	male	18	23	20	
	weight (g)	15.5 \pm 2.05	14.8 \pm 1.28	15.1 \pm 1.03	
ELISA & Western blotting	n	12	25	23	23
	male	5	11	12	13
	weight (g)	21.4 \pm 1.01	20.3 \pm 2.13	20.9 \pm 2.11	19.9 \pm 1.65
Brain edema	n		21	27	26
	male		8	13	13
	weight (g)		19.2 \pm 1.75	18.9 \pm 1.82	19.1 \pm 2.13
total		65	109	102	72

表 1：各群のラットの分布

各群間で性別および体重に有意差はなかった。TUNEL=TdT-mediated dUTP nick end labeling. qPCR=quantitative polymerase chain reaction. ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay.

1. 新生仔 HIE モデルと低体温療法の評価

本研究で用いた新生仔 HIE モデルおよび 28°C、3 時間の低体温療法の治療効果を確認するため、CTL 群、HIE 群および HT 群において、Nissl 染色による梗塞面積の評価と TUNEL 解析によるアポトーシスの評価を行った。HI 負荷後 3、6、24、48、72 時間に取り出された脳のパラフィン切片にて評価を行った。

梗塞評価では、CTL 群には梗塞は全く認められなかったが、HIE 群では梗塞側半球の広範囲に梗塞が認められ、HT 群では一部に梗塞が認められた(図 7 A)。量的評価には、(梗塞側の正常面積／健側の面積) 比を用いて評価した。HIE 群では、3 時間 0.79 ± 0.08 ($p < 0.001$)、6 時間 0.71 ± 0.08 ($p < 0.001$)、24 時間 0.31 ± 0.12 ($p < 0.001$)、48 時間 0.31 ± 0.15 ($p < 0.001$)、72 時間 0.31 ± 0.15 ($p < 0.001$) であり、CTL 群に比べて有意に正常面積比が減少していた。一方で、HT 群では、24 時間 0.70 ± 0.25 ($p < 0.05$)、48 時間 0.70 ± 0.26 ($p < 0.05$)、72 時間 0.71 ± 0.11 ($p < 0.001$) であり、HIE 群に比べて有意に正常面積比が増加していた(図 7 B)。HI 負荷後 3、6 時間では HIE 群と HT 群で正常面積比に有意差を認めなかった。本研究の低体温療法は HIE モデルでの梗塞巣を 24、48、72 時間において有意に減少させ、24 時間以降の病巣に変化は認められなかった。それゆえ、以降の評価は HI 負荷後 24 時間以降のサンプルについて行うこととした。

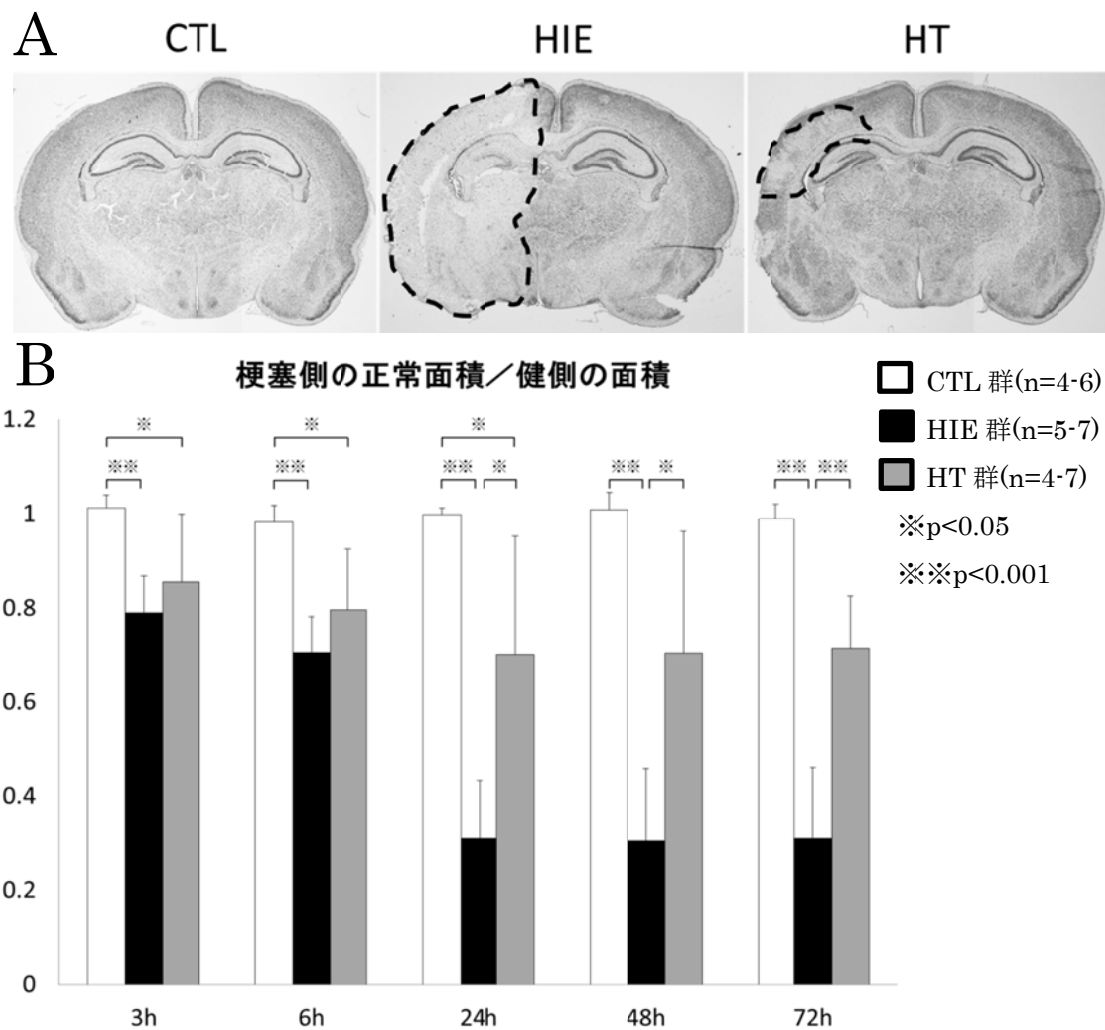


図 7：新生仔 HIE モデルと低体温療法の梗塞評価

A は HI 負荷後 48 時間での Nissl 染色の写真である。点線内が梗塞部位である。CTL 群（左）では梗塞を認めず、HIE 群（中央）では大きな梗塞を認めた。HT 群（右）では HIE 群に比べて梗塞が縮小していた。B は（梗塞側の正常面積／健側の面積）比によって、HI 負荷後 3-72 時間での梗塞の評価を行ったものである。24-72 時間において HIE 群と HT 群間の正常面積比に有意差を認めた。

アポトーシス評価では、HIE 群にて TUNEL 陽性のアポトーシス細胞が多数認められたのに対して、HT 群では少なかった。CTL 群では TUNEL 陽性細胞は認められなかった（図 8 A）。また、HIE 群にて抗 NeuN 抗体による二重染色を行ったところ、新生仔 HIE モデルの脳皮質ではアポトーシス細胞のほとん

どが NeuN 陽性であり、神経細胞の多くにアポトーシスが起こっているものと考えられた (図 8 B)。アポトーシスの量的評価は、(TUNEL 陽性細胞数/総 (DAPI 陽性)細胞数)比を用いて行った。CTL 群では全経過でほとんど TUNEL 陽性細胞を認めなかったのに対し、HIE 群では、24 時間 0.43 ± 0.08 ($p < 0.001$)、48 時間 0.54 ± 0.05 ($p < 0.001$)、72 時間 0.49 ± 0.08 ($p < 0.001$)と TUNEL 陽性細胞数が有意に増加していた。一方で、HT 群では、24 時間 0.10 ± 0.10 ($p < 0.05$)、48 時間 0.23 ± 0.18 ($p < 0.05$)、72 時間 0.12 ± 0.07 ($p < 0.001$)と HIE 群に比べて TUNEL 陽性細胞数が有意に減少していた (図 8 C)。本研究の低体温療法は新生児 HIE モデルにおけるアポトーシスを有意に減少させた。

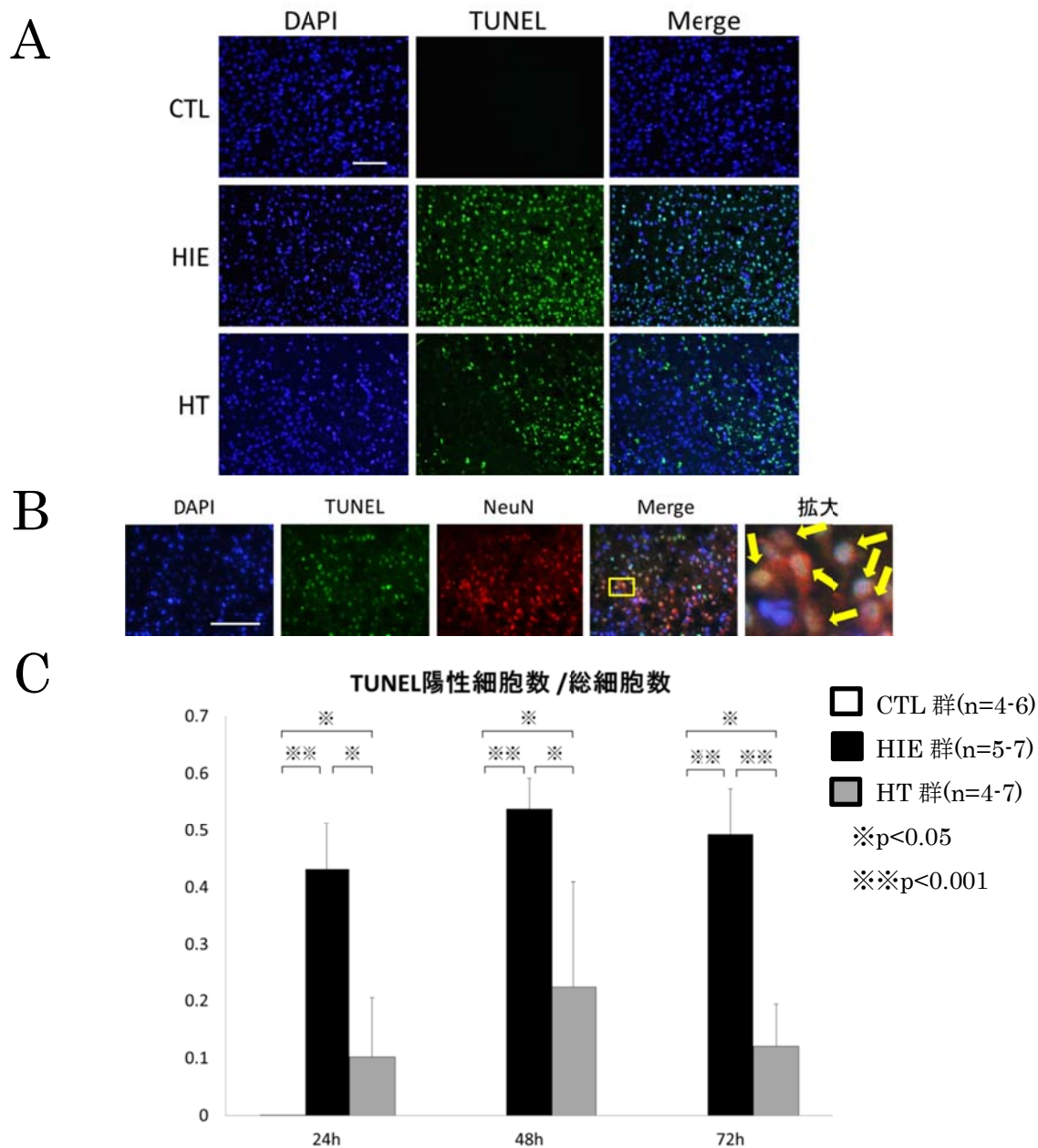


図8：新生仔 HIE モデルと低体温療法のアポトーシス評価

A は HI 負荷後 48 時間の CTL 群、HIE 群、HT 群における DAPI (青)、TUNEL (緑) の蛍光顕微鏡写真である。HIE 群で多数の TUNEL 陽性細胞が観察された。B は HI 負荷後 48 時間の HIE 群における、DAPI (青)、TUNEL (緑)、NeuN (赤) の蛍光顕微鏡写真である。右端の写真はマージ写真の黄色四角部分の拡大図であり、黄色矢印は神経細胞でのアポトーシスを示している。C は各時間での (TUNEL 陽性細胞数 / 総細胞数) 比を表したものである。HIE 群に比べて HT 群では TUNEL 陽性細胞が有意に減少していた。白線：100μm
 DAPI=4',6-diamidino-2-phenylindole. TUNEL=TdT-mediated dUTP nick end labeling.

2. マイクロアレイ解析と定量 PCR による低体温療法関連遺伝子の特定

HIE の latent phase で生じる遺伝子発現変化がその後の治療効果を左右するとの仮説に基づいて、CTL 群、HIE 群、HT 群において HI 負荷後 3 時間の大脳皮質より抽出した total RNA を用いてマイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析を行った。HI 負荷によって 7 遺伝子が発現量を 1/2 未満に減じ(表 2)、そのうち 3 遺伝子で HT 群では HIE 群に比べて発現量が高いことがわかった。このような遺伝子は、HIE では発現が抑制され、低体温療法において発現が促進されたことから、神経保護的な作用に関する分子である可能性が高いと考えた。このうち tRNA の遺伝子を除いた 1 分子を神経保護候補分子とした(表 3)。

また、HI 負荷によって 28 遺伝子が発現量を 3 倍以上に増加し(表 2)、そのうち 12 遺伝子で HIE 群に比べて HT 群では発現量が低くなっていることがわかった。このような遺伝子は、HIE では発現が増強され、低体温療法で抑制されたことから、神経傷害性の作用に関する分子である可能性が高いと考えた。このうち、機能不明の mRNA を除いた 11 分子を神経傷害候補分子とした(表 3)。

変化	Gene symbol/name または Accession number		機能	HIE/CTL 比
down-regulation (<0.5)	mir-9-2		miRNA	0.32
	NC_001665		tRNA	0.38
	P2ry13	Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 13	receptor	0.39
	NC_001665		tRNA	0.41
	mir-154		miRNA	0.44
	Hist2h2ab	Histone H2A type 2-B	nucleosome assembly	0.47
	mir-382		miRNA	0.48
up-regulation (>3.0)	Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	chemokine	20.58
	Il1a	Interleukin 1 alpha	cytokine	14.61
	Cyr61	Cysteine-rich angiogenic inducer 61	extracellular matrix binding	14.29
	Ttr	Transthyretin	hormone activity	10.16
	Npas4	Neuronal PAS domain protein 4	DNA binding	10.04
	Ccl4	Chemokine (C-C motif) ligand 4	chemokine	8.35
	Ccl3	Chemokine (C-C motif) ligand 3 (Ccl3)	chemokine	8.22
	ENSRNOG00000036290*	Small nucleolar RNA SNORA57	snoRNA	7.66
	Zfp36	Zinc finger protein 36	mRNA binding	6.88
	Hspb1	Heat shock protein 1	chaperone	6.68
	Fos	FBJ osteosarcoma oncogene	transcription factor	5.92
	ENSRNOG00000035145*		snoRNA	5.91
	Atf3	Activating transcription factor 3	transcription factor activity	5.84
	Hspa1b	Heat shock 70kD protein 1B	chaperone	5.83
	Ier3	Immediate early response 3	protein binding	5.01
	Cxcl10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	chemokine	4.98
	Btg2	BTG family, member 2	transcription factor activity	4.64
	Olr1	Oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	receptor	4.64
	Dusp1	Dual specificity phosphatase 1	protein tyrosine phosphatase activity	3.9
	Nr4a1	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	nuclear receptor	3.78
	Angptl4	Angiopietin-like 4	angiogenesis	3.75
	ENSRNOG00000036062*	Small nucleolar RNA SNORD34	snoRNA	3.45
	ENSRNOG00000035153*		snoRNA	3.44
	Pdk4	Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	protein kinase activity	3.16
	Junb	Jun B proto-oncogene	transcription factor activity	3.15
	NM_001013062.1	Thrombospondin 1 (Thbs1), mRNA	(unknown)	3.14
	Plat	Plasminogen activator, tissue	serine-type endopeptidase activity	3.09
	ENSRNOG00000035684*		snoRNA	3.01

表 2 : HIE 群における mRNA 発現の変化

※ENSEMBL 番号、※※*Rattus norvegicus* の reference sequence、HIE/CTL 比は CTL 群に比べた HIE 群での mRNA の相対量を示している。HI 負荷によって 7 遺伝子が発現を抑制され、28 遺伝子が発現を促進された。

変化	Gene symbol	HIE/CTL 比	HT/HIE 比
down-regulation	P2ry13	0.39	1.41
up-regulation	Ccl2	20.58	0.53
	Il1a	14.61	0.27
	Ccl4	8.35	0.39
	Ccl3	8.22	0.65
	Zfp36	6.88	0.73
	ENSRNOG00000036290	7.66	0.67
	Ier3	5.01	0.85
	Cxcl10	4.98	0.48
	Olr1	4.64	0.49
	Nr4a1	3.78	0.93
	ENSRNOG00000036062	3.45	0.68

表 3 : HI 負荷と低体温療法での mRNA 発現の変化

HIE/CTL 比は CTL 群に比した HIE 群での mRNA の相対量、HT/HIE 比は HIE 群に比した HT 群での mRNA の相対量を示している。HI 負荷によって発現を抑制された遺伝子のうち 1 遺伝子が低体温療法によって発現を促進され、HI 負荷によって発現を促進された遺伝子のうち 11 遺伝子が低体温療法によって発現を抑制された。

遺伝子発現変化の検証のため、12 の候補遺伝子の梗塞側大脳皮質での発現量を定量 PCR にて経時的に評価した (図 9)。その結果、latent phase (HI 負荷後 3~6 時間) にて HIE 群と HT 群間に発現量の有意差が認められたのは *P2ry13* と *Olr1* のみであった。*P2ry13* の発現は、HI 負荷後 3、6 時間に HIE 群で CTL 群に比べて有意に減少しており、HT 群では発現の減少が抑制されていた。*Olr1* は lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) と呼ばれる。

Olr1 の発現は HI 負荷後 3 時間に HIE 群で有意に上昇しており、HT 群では発現の上昇が抑制されていた。以上から、P2y₁₃ の活性化と LOX-1 活性の阻害が新生仔 HIE モデルに対する低体温療法の効果に関わっている可能性が考えられた。

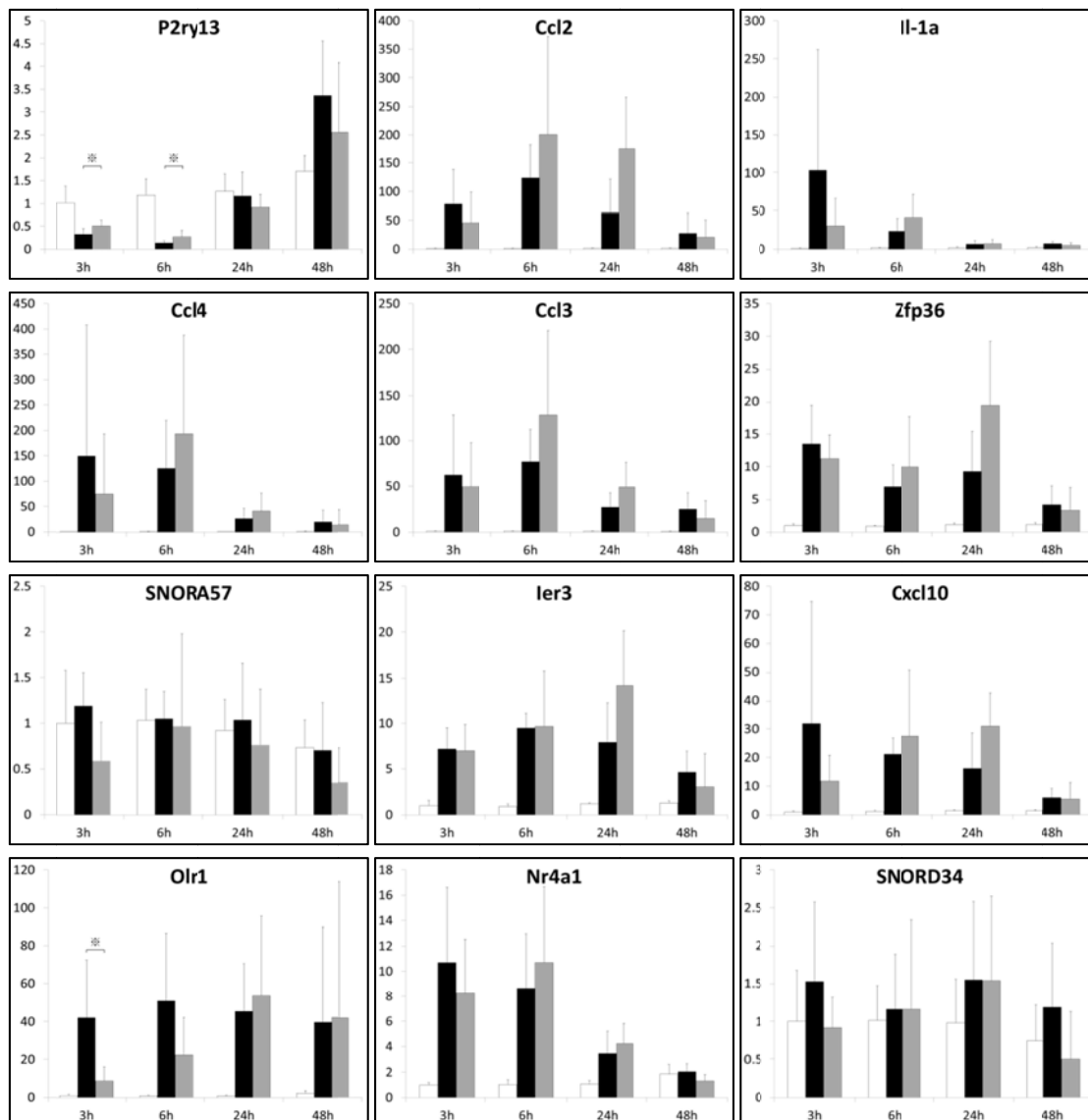


図9；12の候補遺伝子の定量PCR

CTL 群、HIE 群、HT 群の梗塞側大脳皮質における 12 遺伝子、*P2ry13*、*Ccl2*、*Il-1a*、*Ccl4*、*Ccl3*、*Zfp36*、*SNORA57*、*Ier3*、*Cxcl10*、*Olr1*、*Nr4a1*、*SNORD34* の発現量を定量 PCR にて経時的に測定した。発現量は、HI 負荷後 3 時間の CTL 群での発現量に対する相対値として表示してある。*P2ry13* と *Olr1* においてのみ、HIE 群と HT 群間に有意差が認められた。※ $p < 0.05$ 、□；CTL 群 (各時間 $n=6$)、■；HIE 群 ($n=6-10$)、■；HT 群 ($n=5-7$)。

3. In situ hybridization による遺伝子発現細胞の同定

P2ry13 および *Olr1* が神経細胞に発現していることを確認するため、in situ hybridization を行った (図 10A)。どちらの mRNA も大脳皮質、扁桃、海馬、視床、視床下部などに広く発現を認めており、大脳皮質では染色された細胞が層状をなしていた。これらの分布から主に両遺伝子は神経細胞に発現していると考えられた。また、拡大写真からは、*Olr1* が神経細胞と血管内皮細胞に発現していることがわかった (図 10B)。

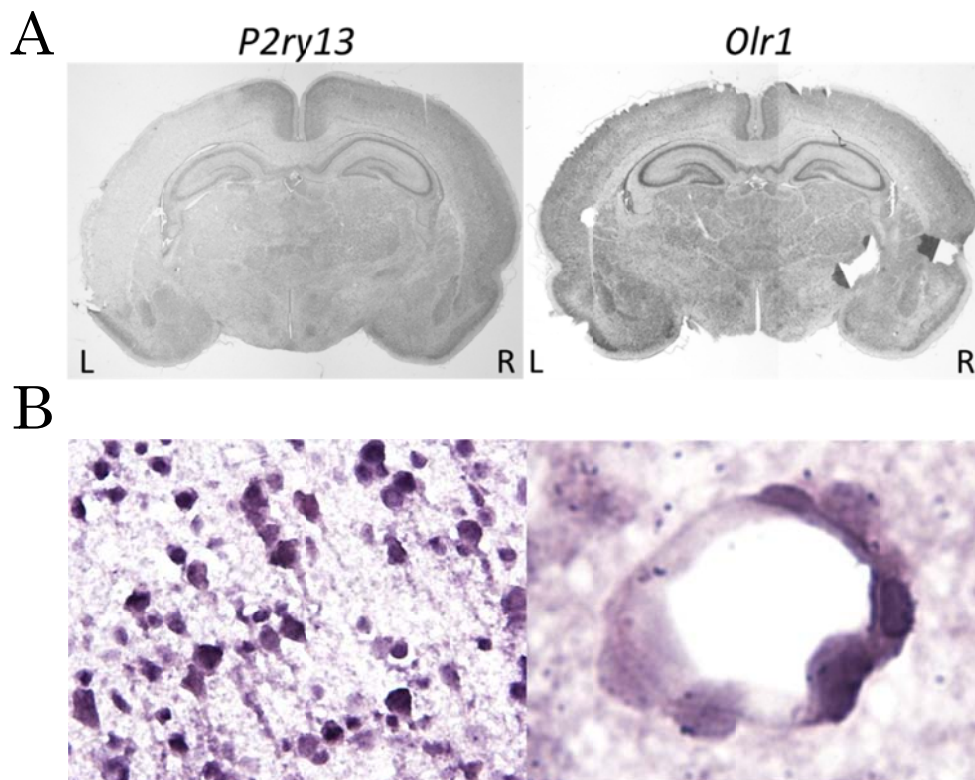


図 10 ; *P2ry13* と *Olr1* の in situ hybridization

HI 負荷後 48 時間のパラフィン切片における *P2ry13* と *Olr1* の in situ hybridization である。どちらも大脳皮質において細胞が層状に染まっている (A)。B は *Olr1* の拡大写真である。*Olr1* が神経細胞 (左、1000 倍) および血管内皮細胞 (右、400 倍) に発現していることがわかる。

4. 2MeSADP 治療と抗 LOX-1 中和抗体治療の梗塞面積による評価

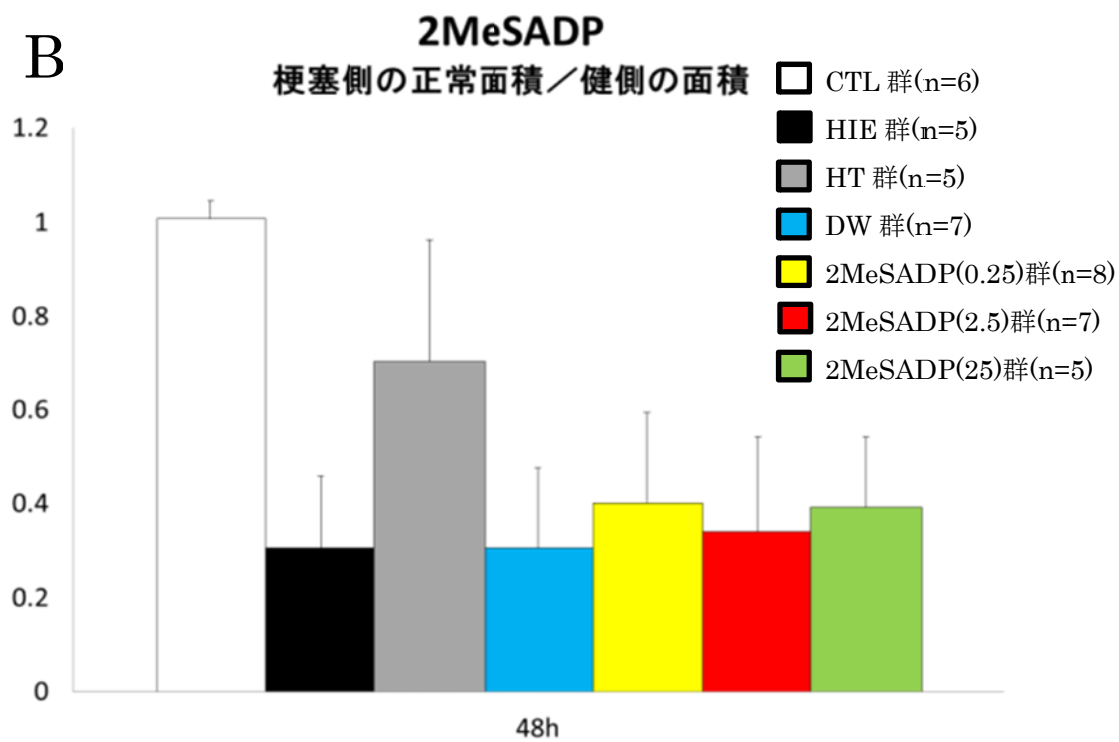
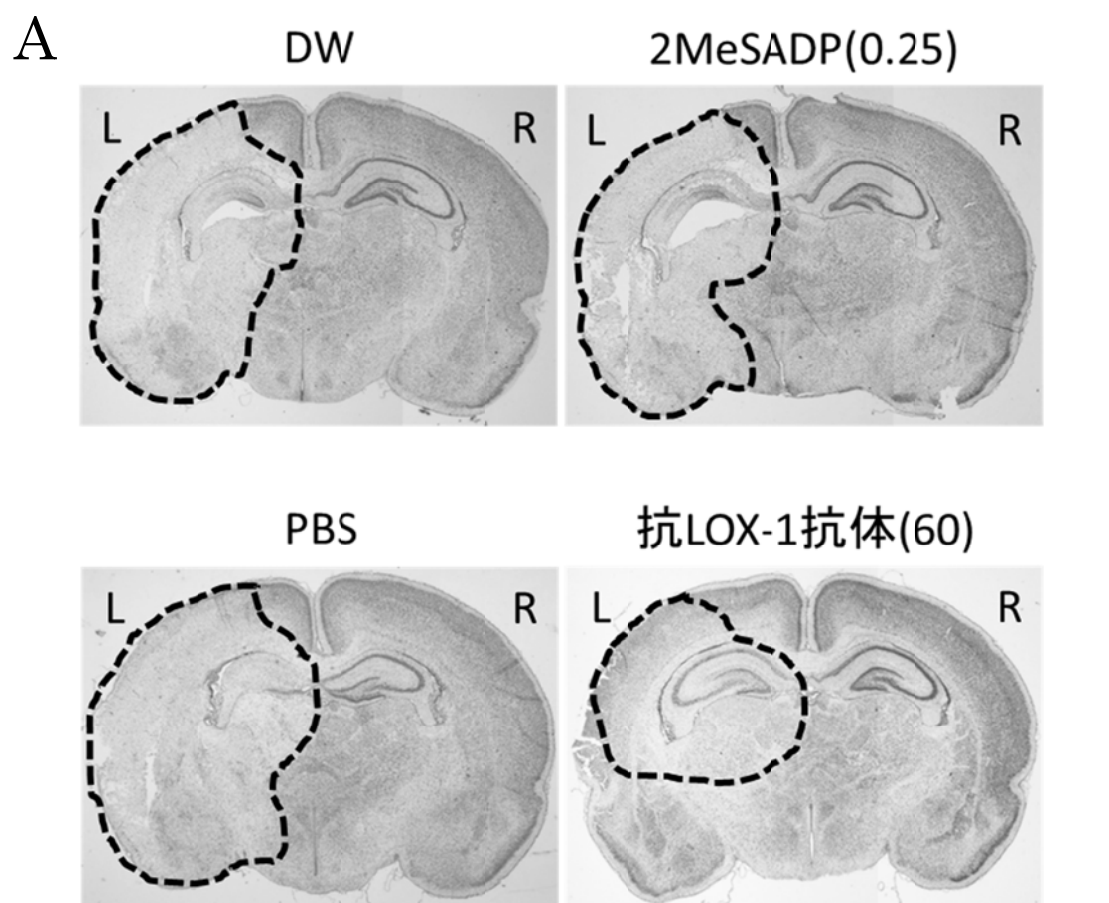
P2y13 のアゴニストである 2MeSADP と抗 LOX-1 中和抗体の、新生児 HIE における新たな治療法の可能性を提案した。Takizawa らによる報告によると、同モデルの病態および治療効果の判定には HI 負荷後 48 時間が最も有効であったことから³²、まず始めに両治療法が新生仔 HIE モデルにおける HI 負荷後 48 時間の梗塞巣に与える影響について検討した (図 11、12)。

2MeSADP の投与は、0.25mg/kg、2.5mg/kg、25mg/kg/回、1 日 1 回および対照の蒸留水 (DW) 0.1ml/回、1 日 1 回の 4 群に分けて、治療効果を評価した。

HI 負荷直後に腹腔内投与を開始し、48 時間後の脳のパラフィン切片に Nissl 染色を行い、梗塞の評価を行った。その結果、2MeSADP 治療群では半球全体に及ぶ梗塞巣を認めた (図 11A)。HI 負荷後 48 時間の HIE 群、2MeSADP 治療の 3 群、DW 治療群の間で (梗塞側の正常面積/健側の面積) の比に差は認められず、2MeSADP による治療効果はないものと考えられた (図 11B)。

抗 LOX-1 中和抗体の投与は、6 μ g/kg、60 μ g/kg/回、1 日 2 回および対照の PBS 0.1ml/回、1 日 2 回の 3 群に分けて治療効果を評価した。60 μ g/kg 抗 LOX-1 中和抗体治療群で梗塞巣の縮小が認められた (図 11A)。48 時間後の評価では HIE 群 (0.31 ± 0.15)、6 μ g/kg 治療群 (0.18 ± 0.08)、PBS 治療群 (0.19 ± 0.10) の間で (梗塞側の正常面積/健側の面積) の比に差は認められなかったが、60 μ g/kg 治療群 (0.52 ± 0.14) では HIE 群、PBS 群に比べて正常面積比が有意に増加し

ていた (図 11C)。



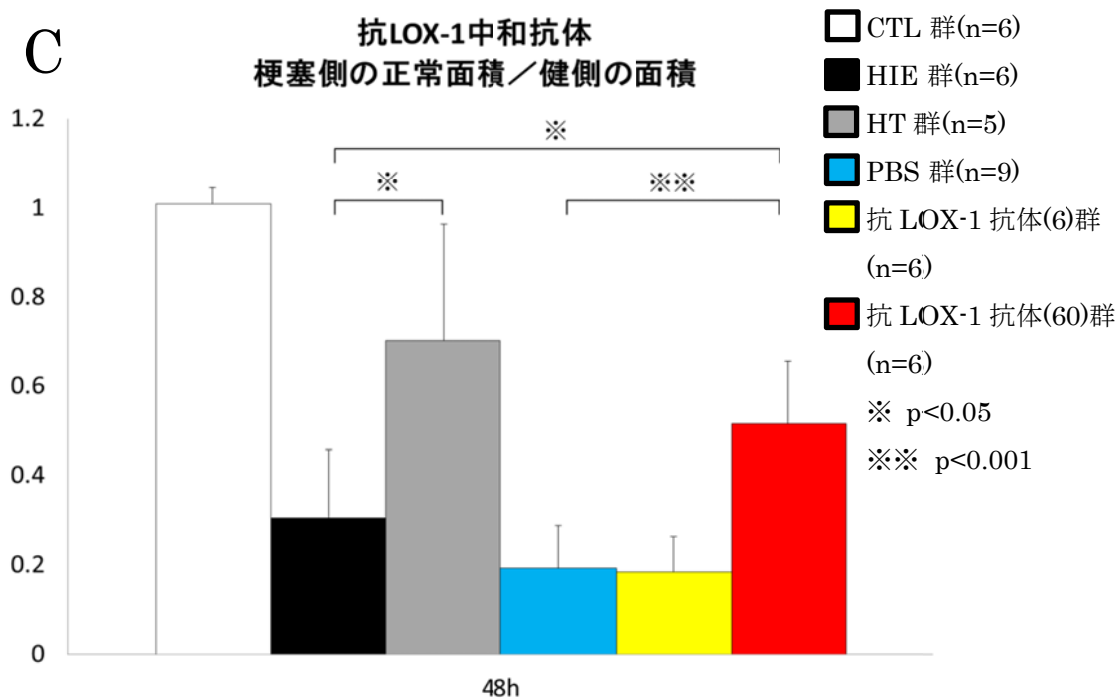


図 11：治療後の梗塞評価

A は HI 負荷後 48 時間の各治療群の脳の冠状断切片を Nissl 染色したものである。点線内が梗塞部分である。抗 LOX-1 中和抗体では梗塞巣の縮小が認められる。B は 2MeSADP 治療を、各群の 48 時間後の（梗塞側の正常面積／健側の面積）比にて評価したものである。治療効果は認められなかった。C は抗 LOX-1 中和抗体治療を、各群の 48 時間後の（梗塞側の正常面積／健側の面積）比にて評価したものである。60 μ g/kg の群で正常面積比が有意に増加していた。

この治療効果の継続性を調べるため、HI 負荷後 24、72 時間でも 60 μ g/kg 治療群について同様の評価を行った。24、72 時間においても 60 μ g/kg 治療群（24 時間 0.51 \pm 0.16、72 時間 0.63 \pm 0.17）では HIE 群（24 時間 0.31 \pm 0.12、72 時間 0.31 \pm 0.15）、PBS 群（24 時間 0.28 \pm 0.11、72 時間 0.20 \pm 0.07）に比べて正常面積比が有意に増加していた（図 12）。

以上から、60 μ g/kg の抗 LOX-1 中和抗体治療は、新生仔 HIE モデルにおける梗塞巣を HI 負荷後 24 時間以降継続して有意に減少させることが分かった。

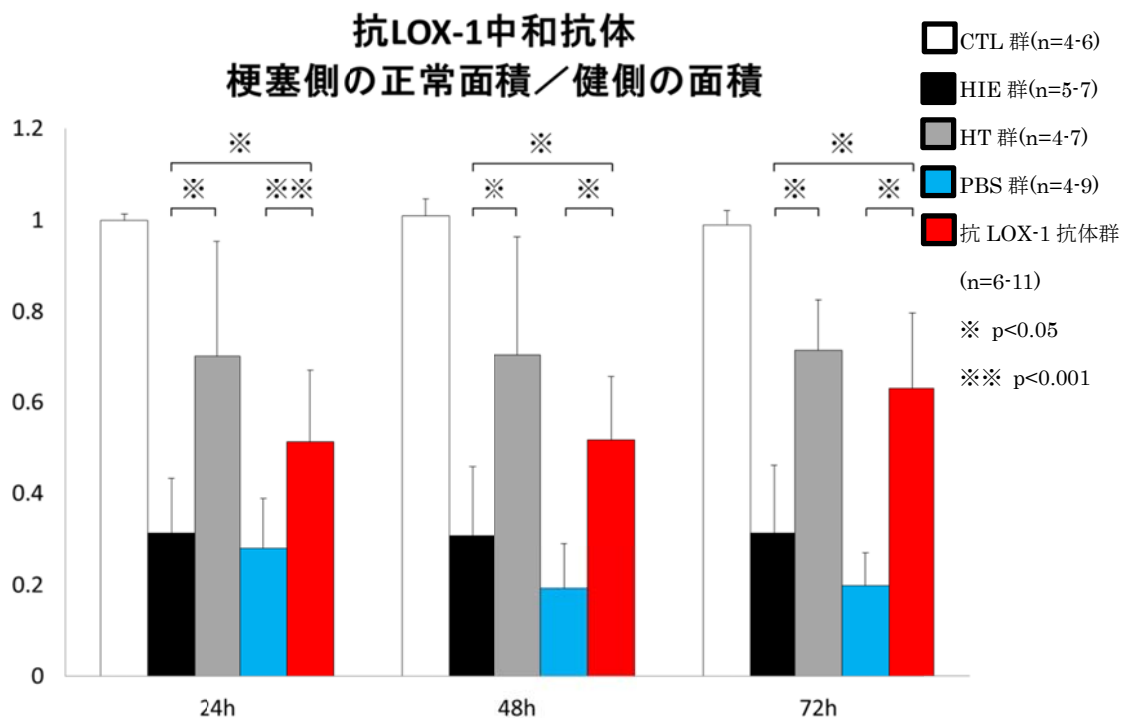


図 12：抗 LOX-1 中和抗体治療の梗塞評価

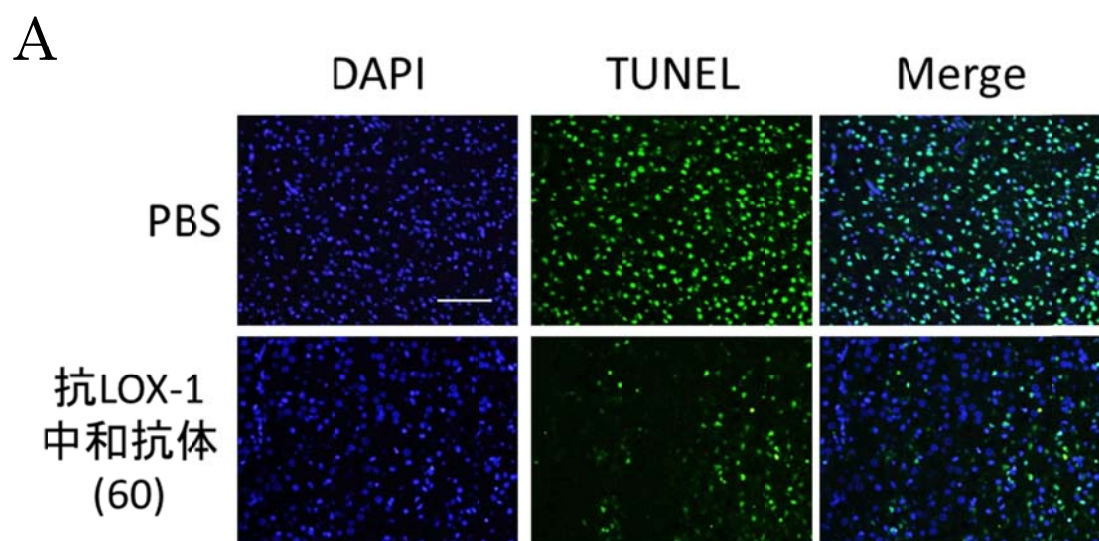
60 μ g/kg の抗 LOX-1 中和抗体治療の効果を 24、48、72 時間後の（梗塞側の正常面積／健側の面積）比にて評価したものである。全ての時間において、抗 LOX-1 中和抗体は正常面積比を有意に増加させている。

5. 抗 LOX-1 中和抗体治療のアポトーシス評価

抗 LOX-1 中和抗体治療の梗塞巣抑制機序について、低体温療法との異同を調べるため、TUNEL 解析にてアポトーシス評価を行った（図 13）。48 時間後の切片の写真から、PBS 群で認められた TUNEL 陽性細胞の増加が、抗 LOX-1 中和抗体によって減少していることが分かった（図 13A）。量的評価として、まず HI 負荷後 48 時間に、6 μ g/kg、60 μ g/kg および PBS の 3 群について（TUNEL 陽性細胞数／総細胞数）比にて評価を行った。梗塞評価と同様に、HIE 群（0.54 \pm 0.05）、6 μ g/kg 治療群（0.52 \pm 0.07）、PBS 治療群（0.60 \pm 0.11）では TUNEL

陽性比に差を認めなかったが、60 μ g/kg 治療群 (0.15 ± 0.08) では前 3 群に比べて有意な TUNEL 陽性細胞数が有意に減少していた (図 13B)。次に 60 μ g/kg の治療について、24、72 時間においても評価を行った。その結果、HIE 群 (24 時間 0.43 ± 0.08 、72 時間 0.49 ± 0.08)、PBS 群 (24 時間 0.33 ± 0.07 、72 時間 0.54 ± 0.03) に比べて 60 μ g/kg 治療群 (24 時間 0.09 ± 0.06 、72 時間 0.12 ± 0.10) では、24 時間後でも 72 時間後でも TUNEL 陽性細胞数が有意に減少していた (図 13C)。

以上から、60 μ g/kg の抗 LOX-1 抗体治療は、低体温療法と同様に、新生仔 HIE モデルにおけるアポトーシスを有意に減少させることが分かった。6 μ g/kg では梗塞評価と同様、PBS 群と差がなく、効果は期待できないと考えられたため、以降、60 μ g/kg を抗 LOX-1 抗体治療群における投与量とした。



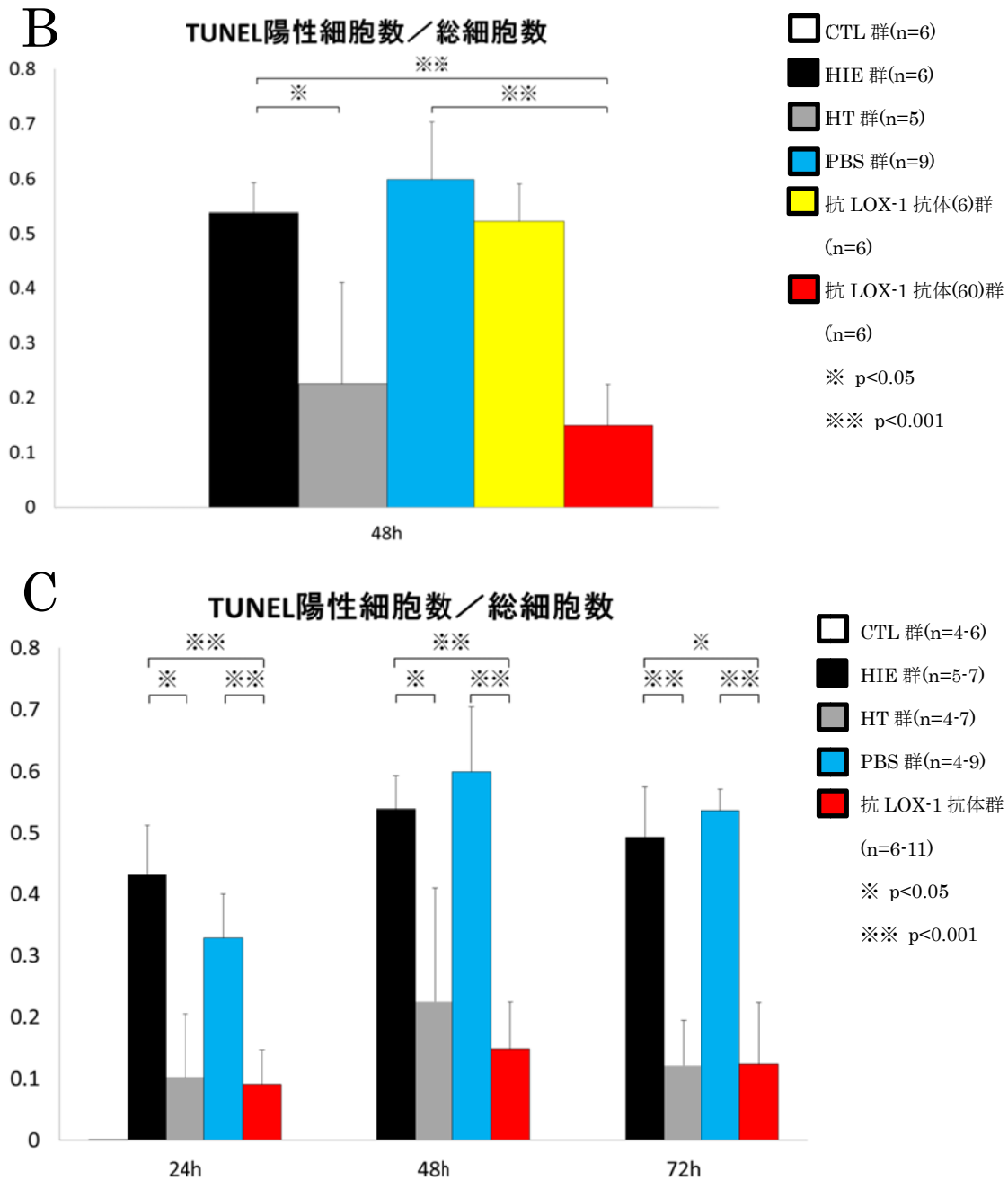


図 13：抗 LOX-1 中和抗体のアポトーシス評価

A は HI 負荷後 48 時間のパラフィン切片の DAPI（青）、TUNEL（緑）、merge の写真である。抗 LOX-1 抗体治療群で TUNEL 陽性細胞数が減少していた。白線は 100 μ m。B は、各群における HI 負荷後 48 時間の（TUNEL 陽性細胞数／総細胞数）比の検討である。C は HI 負荷後 24-72 時間の（TUNEL 陽性細胞数／総細胞数）比の検討である。いずれの検討においても、60 μ g/kg の治療で TUNEL 陽性細胞数が有意に減少していた。

DAPI=4',6-diamidino-2-phenylindole. TUNEL=TdT-mediated dUTP nick end labeling.

6. 抗 LOX-1 中和抗体治療の生化学的評価

新生仔 HIE モデルにみられるアポトーシス細胞では、これまでの報告から酸化ストレスによる DNA 損傷、カスパーゼ活性からのシグナル伝達による核損傷が知られている⁵。そこで、HI 負荷後 24～72 時間の梗塞側大脳半球において、酸化ストレスマーカーとして脂質過酸化物である malondialdehyde (MDA)、アポトーシスマーカーとしてアポトーシス誘導タンパク質である cleaved caspase 3 (cCASP3) を調べた。

MDA は、HIE 群 (24 時間 98.0 ± 7.1 、48 時間 170.0 ± 59.7 、72 時間 220.1 ± 92.3 pmol/pro.mg) では HI 負荷後 24～72 時間の全てで CTL 群に比べて有意に高値であった。一方で、抗 LOX-1 中和抗体治療群での MDA は、24 時間 61.7 ± 13.5 、48 時間 91.6 ± 60.0 、72 時間 84.3 ± 49.0 pmol/pro.mg であり、全てにおいて HIE 群に比べて有意に少なかった。CTL 群、HT 群、抗 LOX-1 抗体治療群間では有意差を認めなかった (図 14A)。

cCASP3 は、HI 負荷後 24 時間では 4 群間に有意差がなかった。また、48、72 時間において HIE 群 (48 時間 1.99 ± 0.94 、72 時間 1.69 ± 0.28) では、CTL 群に比べて cCASP3 が有意に高かったが、抗 LOX-1 中和抗体治療群 (48 時間 0.88 ± 0.33 、72 時間 1.29 ± 0.24) ではどちらの時間でも有意に低かった。CTL 群、HT 群、抗 LOX-1 中和抗体群間では有意差を認めなかった (図 14B)。

以上から、抗 LOX-1 中和抗体治療は新生仔 HIE モデルにおいて、細胞傷害

につながる酸化ストレスおよびアポトーシス経路を低体温療法と同等に抑制することが生化学的に証明された。

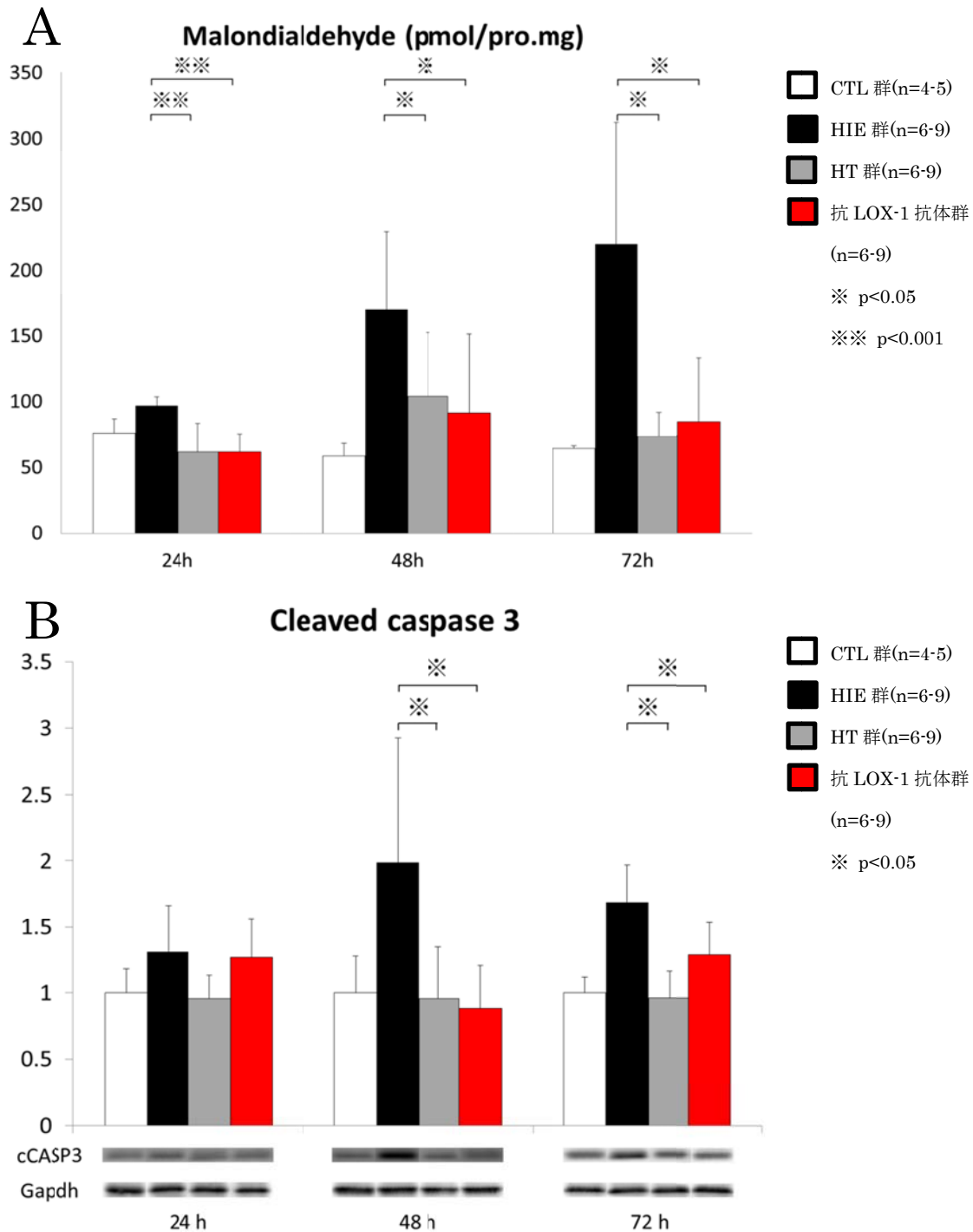


図 14：抗 LOX-1 中和抗体治療の生化学的評価

A は ELISA 法による MDA の測定結果である。MDA はタンパク量で補正された。抗 LOX-1 中和抗体は MDA を有意に減少させた。B はウェスタンブロットによる cCASP3 の測定結果である。Gapdh で補正された。各時間の CTL 群の cCASP3 に対する相対値にて表示した。抗 LOX-1 中和抗体は 48、72 時間において cCASP3 を有意に減少させた。ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay. MDA=malondialdehyde. cCASP3=cleaved caspase 3.

7. 抗 LOX-1 中和抗体治療の脳浮腫と tight junction proteins への影響の評価

HIE の病態として、アポトーシスを介した神経細胞死に加え、脳浮腫が生じることが知られている^{6,7}。このため、抗 LOX-1 中和抗体の効果をさらに評価するため、HIE 群、HT 群、抗 LOX-1 中和抗体治療群において脳水分率を測定し、脳浮腫の評価を行った。各群とも健側半球の水分率を対照として（梗塞側大脳半球の水分率／健側大脳半球の水分率）比を用いて評価した。HI 負荷後 24 時間においては 3 群間に有意差を認めなかった。しかし、48、72 時間では、抗 LOX-1 中和抗体治療群と HT 群の両群とも HIE 群に比べて水分率比が有意に低下しており、両群間の有意差は認められなかった（図 15A）。

また、CTL 群、HIE 群、HT 群、抗 LOX-1 中和抗体群において、脳浮腫の一因として、血液脳関門に多く分布する主な tight junction proteins (TJPs)である occludin および ZO-1 の量の評価した。HIE 群では、CTL 群に比べて occludin の量が有意に減少しており、抗 LOX-1 中和抗体治療群では HIE 群に比べて有意に増加していた。また、同様に HIE 群では ZO-1 の量が CTL 群に比べて有意に減少しており、抗 LOX-1 中和抗体治療群では HIE 群に比べて有意に増加していた（図 15B）。

以上から、抗 LOX-1 中和抗体は新生仔 HIE モデルにおいて、TJPs の分解を抑制し、脳浮腫を軽減することが分かった。

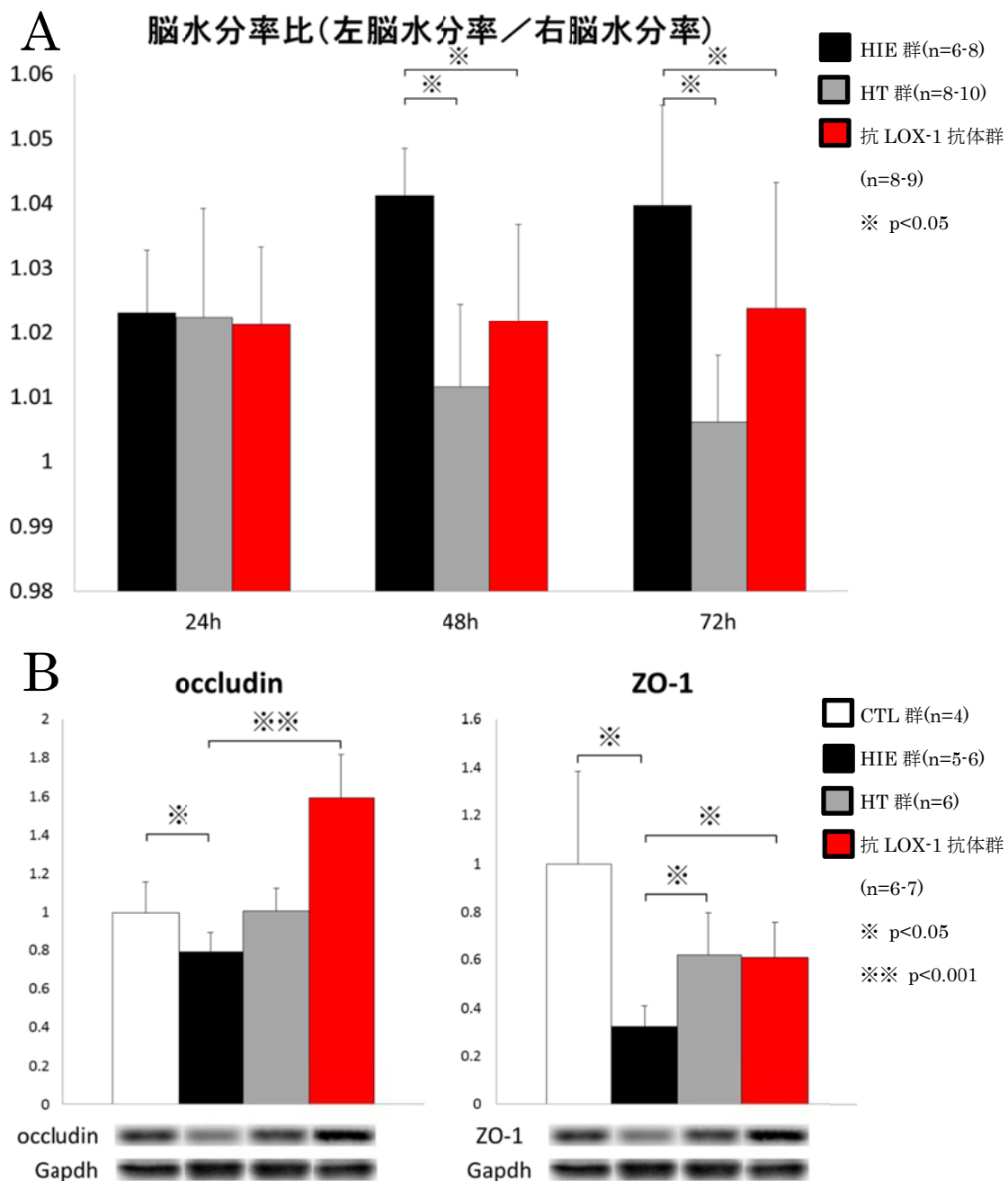


図 15：脳浮腫と血液脳関門の評価

A は脳水分率比による脳浮腫の評価である。健側の水分率を対照として、HIE 群、HT 群、抗 LOX-1 中和抗体治療群について検討を行った。HT 群と抗 LOX-1 中和抗体群で有意に低下していた。B は HI 負荷後 48 時間の occludin と ZO-1 の量をウェスタンブロットにて評価したものである。CTL 群の量に対する相対量にて示してある。HIE 群に比べて、抗 LOX-1 抗体治療群では occludin と ZO-1 が有意に増加していた。

VI. 考察

新生児 HIE は医療の進歩にも関わらず、発展途上国だけでなく先進国においても一定の割合で発生している疾患であり、その完全な予防は不可能と思われる。本研究では、現在、新生児 HIE の予後を改善する治療法とされている低体温療法の複雑なメカニズムを解明することで、新たな治療法の開発を試みた。

1. 新生児 HIE モデルと実験的低体温療法について

本研究では、Rice-Vannucci のラット新生仔 HIE モデルを採用した³⁰。本研究においても同ラットモデルにおいて、傷害側の脳半球における MDA と cCASP3 測定および TUNEL 解析、Nissl 染色による梗塞面積評価によって、HI 負荷後の酸化ストレス、アポトーシス誘導タンパクの活性化により神経細胞が傷害され、脳傷害が生じることを十分に証明した。また、同モデルにおいて TJPs の分解から脳浮腫が生じることも証明し、同モデルの有用性を確認した。低体温療法の実験的な施行方法には、温度、開始時間、持続時間に関連して様々な報告があるが³³⁻³⁵、本研究では HI 負荷直後の開始、28℃、3 時間という低体温療法を選択した。HIE の治療においては、受傷から数時間以内の latent phase における介入が secondary phase における神経損傷を軽減するといわれており⁴、HI 負荷直後の低体温療法の開始により latent phase でのメカニズムを解明することが妥当であると考えた。体温管理に関しては、予備実験において 32℃、28℃

の体温管理を試みたうえで、32℃に比べて 28℃において梗塞面積がより縮小されることを確認し（データなし）、28℃とした。持続時間に関しては、Thoresen らは 3 時間の低体温療法が実験的に有用であると報告しており³⁶、latent phase でのメカニズム解明および短期的な治療評価に十分であると考えた。本研究では、このような低体温療法が実際に HI 負荷による細胞傷害および脳浮腫を有意に減少させており、妥当なものであったことを意味する。

2. 遺伝子発現変化と候補遺伝子について

HIE の病態では、primary phase に続く latent phase においてその後の神経損傷のカスケードが始まっているため、latent phase での低体温療法による遺伝子発現の変化こそが重要であると考えた。HI 負荷後 3 時間、つまり体温管理直後の latent phase での遺伝子発現の変化を網羅的に解析することでそのメカニズムの解明を試みた。これまでも HIE の病態および低体温療法の作用メカニズムの解明を目的に遺伝子発現の変化を調べた研究は多数あるが、そこから直接に新たな治療法の開発につながっているものはない³⁷⁻⁴⁴。本研究では、HI 負荷によって発現が増強され、低体温療法によって発現の増強が抑制された遺伝子を細胞傷害性の候補遺伝子とし、また、HI 負荷によって発現が減弱され、低体温療法によって発現の減弱が抑制された遺伝子を細胞保護性の候補遺伝子として、12 の遺伝子を同定した。その中に含まれていたサイトカイン、ケモカ

インの多くは既に神経炎症との関係が報告されており、今回の実験モデルにおいても神経炎症と関連していた可能性がある。これらのサイトカイン、ケモカインに関しては、定量 PCR で脳組織中の発現量に有意差こそ認められなかったが、HI 負荷で増加し、低体温療法で減少する傾向にあるものが多かった。

Muramatsu らは *Zfp36* が虚血脳傷害において炎症性サイトカインの発現を抑制することで神経保護的に働いていることを報告しており⁴⁵、このことは本研究で *Zfp36* を細胞傷害性の候補遺伝子としたことと矛盾する。これは、Muramatsu らの実験が成獣ラットで行われたことや塩類による前処置が虚血に対する耐性となるメカニズムを解明しようとした実験であるという違いに起因する可能性がある。また、*Nr4a1* (あるいは *Nurr77*) と *Ier3* はアポトーシスとの関連が報告されているが⁴⁶⁻⁴⁸、新生児 HIE における役割は不明である。

これら、定量 PCR にて latent phase での発現量に有意差が認められなかった分子も HIE の病態に関わっている可能性はある。本研究のマイクロアレイによる網羅的解析では、2 匹のラットの脳皮質病巣部位から得た total RNA を混合して 1 サンプルとして使用し、各群 2 サンプルを解析したものである。定量 PCR においては十分なサンプル数をもって解析を行ったが、網羅的解析においてはサンプル数の不足は否めない。より多くのサンプル数をもって網羅的解析を行えば、低体温療法のメカニズムに関連する遺伝子がさらに発見される可能性

もある。

3. 新生児 HIE に対する新しい治療としての LOX-1 (遺伝子名 *Olr1*) の阻害

HIE の latent phase における遺伝子発現の網羅的解析および定量 PCR において、*Olr1* は HI 負荷によって発現が促進され、低体温療法によって発現が抑制されたことから神経傷害性の作用を有する遺伝子であると考えられる。すなわち、LOX-1 の発現抑制または活性抑制が低体温療法の神経保護メカニズムの一つであると考えられた。さらに、in situ hybridization から *Olr1* の mRNA が神経細胞および血管内皮細胞に発現していることが確認された。LOX-1 については主に粥状硬化症に関連して、血管内皮細胞および血管平滑筋での働きについての報告が多いが²³⁻²⁸、Schwarz らは成獣ラットの虚血梗塞モデルの線条体において LOX-1 の遺伝子発現が増加していたと報告しており³⁷、本研究の結果と合致する。また、Li らはラットの高血圧症モデルにおいて LOX-1 が神経細胞に発現しており、神経細胞のアポトーシスを誘導したと報告している⁴⁹。これらの報告は、LOX-1 が新生児 HIE において細胞傷害性の役割を果たしていることを十分に示唆するものである。そこで、本研究では、低体温療法と同様に LOX-1 の発現または活性を抑制することが新生児 HIE の新たな治療法になると考え、抗 LOX-1 中和抗体を新生児 HIE モデルの新たな治療方法として用いた。Xu らは粥状硬化症のマウスモデルにおいて抗 LOX-1 中和抗体が LOX-1 の発現

を抑制することを報告しており⁵⁰、また、Schreurs らは成獣妊娠ラットの高脂血症モデルにおいて抗 LOX-1 中和抗体が LOX-1 の活性を抑制することを報告している⁵¹。これらの報告からも抗 LOX-1 中和抗体が、LOX-1 の発現と活性化を抑制することが証明されているが、新生仔 HIE モデルの治療として用いられるのは本研究が初めてである。

本研究では、まず、抗 LOX-1 中和抗体治療が、新生仔 HIE モデルにおいて梗塞巣と神経細胞のアポトーシスを抑制することを証明した。新生仔 HIE モデルのアポトーシスにはカスパーゼ活性からの核損傷や酸化ストレスによる DNA 損傷が深く関わっている⁵。Cleaved caspase 3 (cCASP3) は強力なアポトーシス誘導タンパクであり、LOX-1 の活性化が cCASP3 を増加させることが報告されている⁵²。また、malondialdehyde (MDA) は脂質の過酸化産物であり、DNA を直接に破壊し、アポトーシスを誘導する、酸化ストレスマーカーである。本研究では HIE モデルの傷害半球において、このどちらも抗 LOX-1 中和抗体によって抑制されることを証明した。これは病理組織学的結果にも矛盾しないものであった。このような細胞傷害の抑制は、神経細胞と血管内皮細胞の両方で生じている可能性がある。

LOX-1 の活性化は matrix metalloproteinases (MMPs) の発現と活性化を促進するといわれている²³⁻²⁸。MMPs は HIE における神経炎症に深く関わっており、

炎症性サイトカインを活性化する一方で、細胞外マトリックスを破壊することにより血液脳関門を破壊し、さらなる炎症細胞の流入や脳浮腫を促進している^{6,53}。Occludin と ZO-1 は代表的な tight junction proteins (TJPs)である。Chen らは、ラットの新生仔 HIE モデルにおいては、MMPs の発現と活性が促進されることにより occludin と ZO-1 が分解され、血液脳関門の透過性亢進と脳浮腫が促進されるが、MMP 阻害剤がこれを改善したと報告している⁵⁴。本研究においても、抗 LOX-1 中和抗体が新生仔 HIE モデルにおける occludin および ZO-1 の分解を抑制し、脳浮腫を軽減することを証明した。Occludin は抗 LOX-1 抗体治療群で CTL 群より増加していた。このことから LOX-1 の抑制が occludin 発現に深く関わっており、治療により神経血管単位の再形成が始まっている可能性が示唆された。本研究では MMPs の測定は行っていないが、LOX-1 の誘導する MMPs が抑制されたことで、TJPs の分解が抑制され、脳浮腫が軽減された可能性がある。また、TJPs の分解抑制により、脳内循環が改善され、細胞傷害が軽減された可能性もある。

本研究において抗 LOX-1 中和抗体は、新生児 HIE の神経傷害の中核となる細胞傷害と脳浮腫を、低体温療法と同程度に軽減した。今回、抗 LOX-1 中和抗体がどのような細胞に作用しているかということは証明できていないが、HIE によって破壊された血液脳関門を通過して、神経細胞での LOX-1 の発現および

活性化を抑制することで神経細胞死を抑制した可能性がある。一方で、抗 LOX-1 中和抗体が HIE における TJPs の分解を抑制し、脳浮腫を軽減したことから、抗 LOX-1 中和抗体は脳血管内皮細胞に作用し、血管内皮細胞のアポトーシスの抑制と TJPs の分解を抑制することで、脳浮腫抑制と脳内循環の改善を引き起こし、神経傷害抑制の役割を果たしたとも考えられる（図 16）。

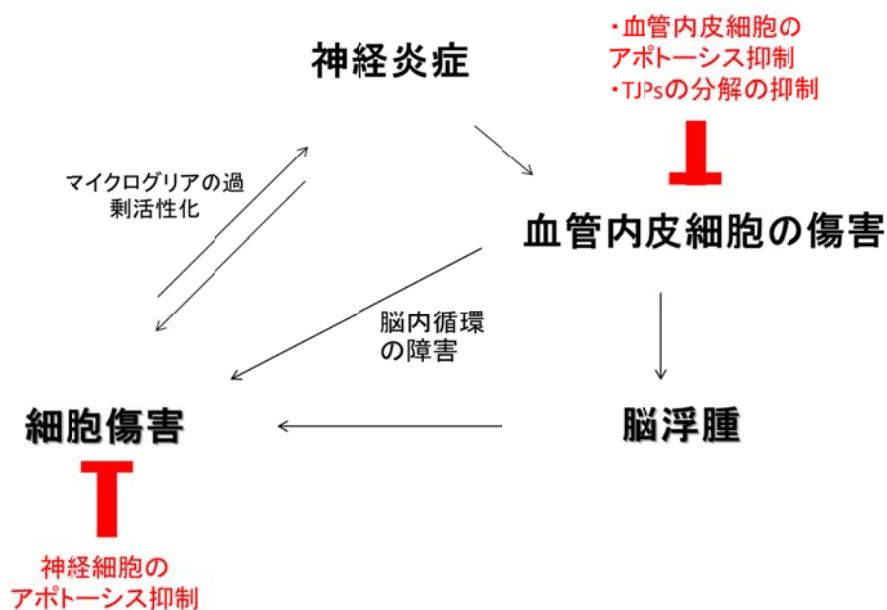


図 16：抗 LOX-1 中和抗体の効果

赤字が本研究から想定される抗 LOX-1 中和抗体の新生児 HIE における効果を示している。抗 LOX-1 中和抗体は神経細胞のアポトーシス抑制、血管内皮細胞のアポトーシス抑制、TJPs の分解の抑制を通して神経保護作用を発揮すると考えられる。TJPs=tight junction proteins

本研究では、LOX-1 のタンパクレベルでの発現確認を病理組織学的に試みたが失敗に終わった（データなし）。また、HI 負荷に暴露された神経細胞および脳内血管内皮細胞の LOX-1 を介した反応を *in vitro* で確認することも行ってい

ない。抗 LOX-1 中和抗体の作用機序を明確にするためにも、LOX-1 のタンパクレベルでの発現細胞や *in vitro* での HI 負荷後の神経細胞および脳内血管内皮細胞に対する中和抗体の作用を確認する必要がある。さらに、治療群においては初回投与以降の投与時には体温コントロールを行っておらず、PBS 治療群との比較を行っていない生化学的評価および脳浮腫評価においては、治療薬投与による体温低下が神経保護作用を発揮した可能性を完全には否定できない。投薬時の体温管理も今後の課題と考える。臨床応用を視野に入れると、低体温療法と抗 LOX-1 中和抗体併用療法が新生児 HIE に与える影響の評価も今後の課題と考える。

4. P2y13 の新生児 HIE に対する治療法としての可能性

本研究における遺伝子発現の網羅的解析および定量 PCR によると、*P2ry13* は latent phase において HI 負荷によって発現を抑制され、低体温療法によって発現が促進された。このことから、*P2ry13* は神経保護的な作用を有する遺伝子であると考えられた。また、*in situ hybridization* により神経細胞での発現も確認され、*P2ry13* の発現促進が低体温療法の神経保護メカニズムの一つと考えられた。P2y13 (*P2ry13*) はプリン作動性受容体の一つで、神経細胞、グリア細胞に発現していることが知られている。Espada らはマウスの小脳顆粒細胞において、P2y13 の選択的アゴニストである 2MeSADP が Nrf2/HO-1 経路を活性

化することで抗酸化作用を発揮し、酸化ストレスによる神経細胞死を抑制したと報告している⁵⁵。また、Zheng らは photothrombosis によるマウスの梗塞モデルにおいて、2MeSADP 投与が細胞毒性浮腫と梗塞を軽減したことを報告している⁵⁶。本研究においても同様の効果を期待して治療を試みたが、梗塞巣の改善は認められなかった。Tan らはマウスの膵β細胞で P2y13 がアポトーシスを誘導したと報告しており⁵⁷、また、P2y13 が神経細胞の分化・成長を抑制したという報告もある^{58,59}。さらに、Zheng らは 2MeSADP の高濃度投与によって呼吸抑制や痙攣といった副作用が認められたと報告している。本研究においても、新生仔 HIE モデルにおいて P2y13 は神経保護的に働かないものと考えられた。

（Photothrombosis とは、光感受性色素（ローズベンガル）の存在下に特定波長の光（562 nm レーザー光）を照射すると、血管内皮の機能異常を引き起こし、血管内に血栓を生じる現象である。）

VII. 結論

分子生物学的探索により、新生児 HIE における低体温療法の作用メカニズムの一つとして LOX-1 発現・活性の抑制が関与していることを同定した。新生児 HIE に対する新たな治療法として、抗 LOX-1 中和抗体をラットの新生仔 HIE モデルに投与することで、HIE において生じる神経細胞傷害および脳浮腫が軽減されることを証明した。抗 LOX-1 抗体は、直接に神経細胞に作用し、あるいは血管内皮細胞に作用して脳浮腫抑制および脳内循環の改善を通して、神経細胞傷害を抑制することが考えられた。本研究において抗 LOX-1 中和抗体の新生仔 HIE モデルに対する治療効果は低体温療法と同等のものであり、その汎用性と脳浮腫抑制効果から抗 LOX-1 中和抗体は低体温療法に勝る治療ともなりうる可能性が考えられた。臨床応用までには、抗 LOX-1 中和抗体の詳しい作用機序の解明、長期予後の検討、治療薬の開発などが必要とされるが、LOX-1 の発現・活性の抑制が新生児 HIE の新たな治療ターゲットとなることは確かである。

VIII. 謝辞

ご指導いただきました国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第二部の伊藤雅之室長、後藤雄一部長、代紅梅研究補助員、東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻国際生物医科学講座発達医科学分野の水口雅教授、同生殖・発達・加齢医学専攻小児医学講座の岡明教授、国立成育医療研究センターの五十嵐隆総長、順天堂大学医学部神経生物学・形態学講座の古田晶子非常勤助教に深謝申し上げます。また、本実験のパラフィン切片作成にご協力いただいた国立精神・神経医療研究センターの熊谷昭六氏に深謝申し上げます。

IX. 文献

1. Shankaran S. Neonatal encephalopathy: treatment with hypothermia. *J Neurotrauma*. 26(3):437-43. doi: 10.1089/neu.2008.0678 (2009).
2. Gunn AJ. Cerebral hypothermia for prevention of brain injury following perinatal asphyxia. *Curr Opin Pediatr*. 12(2):111-5 (2000).
3. Vannucci RC, Perlman JM. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics*. 100(6):1004-14 (1997).
4. Drury PP, Bennet L, Gunn AJ. Mechanisms of hypothermic neuroprotection. *Semin Fetal Neonatal Med*. 15(5):287-92. doi: 10.1016/j.siny.2010.05.005 (2010).
5. Johnston MV, Fatemi A, Wilson MA, Northington F. Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care. *Lancet Neurol*. 10(4):372-82. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70016-3 (2011).
6. Leonardo CC, Pennypacker KR. Neuroinflammation and MMPs: potential therapeutic targets in neonatal hypoxic-ischemic injury. *J Neuroinflammation*. 6:13. doi: 10.1186/1742-2094-6-13 (2009).
7. Alam M, Mohammad A, Rahman S, Todd K, Shuaib A. Hyperthermia up-regulates matrix metalloproteinases and accelerates basement membrane degradation in experimental stroke. *Neurosci Lett*.

- 495(2):135-9. doi: 10.1016/j.neulet.2011.03.056 (2011).
8. Volpe JJ. Neurology of the Newborn 5th ed. Chapter 6:247-324. Philadelphia: Sanders (2008).
 9. Wyatt JS, Thoresen M. Hypothermia treatment and the newborn. Pediatrics. 100(6):1028-30 (1997).
 10. Westin B, Nyberg R, Miller JA Jr, Wedenberg E Hypothermia and transfusion with oxygenated blood in the treatment of asphyxia neonatorum. Acta Paediatr Suppl. 139:1-80 (1962).
 11. Silverman WA, Fertig JW, Berger AP. The influence of the thermal environment upon the survival of newly born premature infants. Pediatrics. 22(5):876-86 (1958).
 12. Silverman WA, Parke PC. The newborn. Keep him warm. Am J Nurs. 65(10):81-4 (1965).
 13. Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, Ballard R, Edwards AD, Ferriero DM, Polin RA, Robertson CM, Thoresen M, Whitelaw A, Gunn AJ. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. Lancet. 365(9460):663-70 (2005).

14. Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, Tyson JE, McDonald SA, Donovan EF, Fanaroff AA, Poole WK, Wright LL, Higgins RD, Finer NN, Carlo WA, Duara S, Oh W, Cotten CM, Stevenson DK, Stoll BJ, Lemons JA, Guillet R, Jobe AH; National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N Engl J Med.* 353(15):1574-84 (2005).
15. Azzopardi DV, Strohm B, Edwards AD, Dyet L, Halliday HL, Juszczak E, Kapellou O, Levene M, Marlow N, Porter E, Thoresen M, Whitelaw A, Brocklehurst P; TOBY Study Group. Moderate hypothermia to treat perinatal asphyxial encephalopathy. *N Engl J Med.* 361(14):1349-58. doi: 10.1056/NEJMoa0900854 (2009).
16. Simbruner G, Mittal RA, Rohlmann F, Muche R; neo.nEURO.network Trial Participants. Systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: outcomes of neo.nEURO.network RCT. *Pediatrics.* 126(4):e771-8. doi: 10.1542/peds.2009-2441 (2010).
17. Zhou WH, Cheng GQ, Shao XM, Liu XZ, Shan RB, Zhuang DY, Zhou CL, Du LZ, Cao Y, Yang Q, Wang LS; China Study Group. Selective head

- cooling with mild systemic hypothermia after neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a multicenter randomized controlled trial in China. *J Pediatr*. 157(3):367-72, 372.e1-3. doi: 10.1016/j.jpeds.2010.03.030 (2010).
18. Jacobs SE, Morley CJ, Inder TE, Stewart MJ, Smith KR, McNamara PJ, Wright IM, Kirpalani HM, Darlow BA, Doyle LW; Infant Cooling Evaluation Collaboration. Whole-body hypothermia for term and near-term newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy: a randomized controlled trial. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 165(8):692-700. doi: 10.1001/archpediatrics.2011.43 (2011).
19. Perlman JM, Wyllie J, Kattwinkel J, Atkins DL, Chameides L, Goldsmith JP, Guinsburg R, Hazinski MF, Morley C, Richmond S, Simon WM, Singhal N, Szyld E, Tamura M, Velaphi S; Neonatal Resuscitation Chapter Collaborators. Part 11: Neonatal resuscitation: 2010 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science With Treatment Recommendations. *Circulation*. 122(16 Suppl 2):S516-38. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.971127 (2010).
20. Wu TC, Grotta JC. Hypothermia for acute ischaemic stroke. *Lancet*

- Neurol. 12(3):275-84. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70013-9 (2013).
21. Baburamani AA, Ek CJ, Walker DW, Castillo-Melendez M. Vulnerability of the developing brain to hypoxic-ischemic damage: contribution of the cerebral vasculature to injury and repair? *Front Physiol.* 3:424. doi: 10.3389/fphys.2012.00424 (2012).
22. Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, Tanaka T, Miwa S, Katsura Y, Kita T, Masaki T. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature.* 386(6620):73-7 (1997).
23. Mehta JL, Chen J, Hermonat PL, Romeo F, Novelli G. Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. *Cardiovasc Res.* 69(1):36-45 (2006).
24. Chen XP, Zhang TT, Du GH. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, a new promising target for the therapy of atherosclerosis? *Cardiovasc Drug Rev.* 25(2):146-61 (2007).
25. Dunn S, Vohra RS, Murphy JE, Homer-Vanniasinkam S, Walker JH, Ponnambalam S. The lectin-like oxidized low-density-lipoprotein receptor: a pro-inflammatory factor in vascular disease. *Biochem J.*

409(2):349-55 (2008).

26. Navarra T, Del Turco S, Berti S, Basta G. The lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 and its soluble form: cardiovascular implications. *J Atheroscler Thromb.* 17(4):317-31 (2010).
27. Yan M, Mehta JL, Zhang W, Hu C. LOX-1, oxidative stress and inflammation: a novel mechanism for diabetic cardiovascular complications. *Cardiovasc Drugs Ther.* 25(5):451-9. doi: 10.1007/s10557-011-6342-4 (2011).
28. Xu S, Ogura S, Chen J, Little PJ, Moss J, Liu P. LOX-1 in atherosclerosis: biological functions and pharmacological modifiers. *Cell Mol Life Sci.* 70(16):2859-72. doi: 10.1007/s00018-012-1194-z (2013).
29. Fan X, Kavelaars A, Heijnen CJ, Groenendaal F, van Bel F. Pharmacological neuroprotection after perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Curr Neuropharmacol.* 8(4):324-34. doi: 10.2174/157015910793358150 (2010).
30. Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol.* 9(2):131-41 (1981).

31. Thoresen M, Bågenholm R, Løberg EM, Apricena F. The stress of being restrained reduces brain damage after a hypoxic-ischaemic insult in the 7-day-old rat. *Neuroreport*. 7(2):481-4 (1996).
32. Takizawa Y, Miyazawa T, Nonoyama S, Goto Y, Itoh M. Edaravone inhibits DNA peroxidation and neuronal cell death in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy model rat. *Pediatr Res*. 65(6):636-41. doi: 10.1203/PDR.0b013e3181a16a9f (2009).
33. Ohta H, Terao Y, Shintani Y, Kiyota Y. Therapeutic time window of post-ischemic mild hypothermia and the gene expression associated with the neuroprotection in rat focal cerebral ischemia. *Neurosci Res*. 57(3):424-33 (2007).
34. Markarian GZ, Lee JH, Stein DJ, Hong SC. Mild hypothermia: therapeutic window after experimental cerebral ischemia. *Neurosurgery*. 38(3):542-50; discussion 551 (1996).
35. Kollmar R, Blank T, Han JL, Georgiadis D, Schwab S. Different degrees of hypothermia after experimental stroke: short- and long-term outcome. *Stroke*. 38(5):1585-9 (2007).
36. Thoresen M, Bågenholm R, Løberg EM, Apricena F, Kjellmer I.

- Posthypoxic cooling of neonatal rats provides protection against brain injury. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 74(1):F3-9 (1996).
37. Schwarz DA, Barry G, Mackay KB, Manu F, Naeve GS, Vana AM, Verge G, Conlon PJ, Foster AC, Maki RA. Identification of differentially expressed genes induced by transient ischemic stroke. *Brain Res Mol Brain Res.* 101(1-2):12-22 (2002).
38. Bernaudin M, Tang Y, Reilly M, Petit E, Sharp FR. Brain genomic response following hypoxia and re-oxygenation in the neonatal rat. Identification of genes that might contribute to hypoxia-induced ischemic tolerance. *J Biol Chem.* 277(42):39728-38 (2002).
39. Hedtjörn M, Mallard C, Eklind S, Gustafson-Brywe K, Hagberg H. Global gene expression in the immature brain after hypoxia-ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 24(12):1317-32 (2004).
40. Kawahara N, Wang Y, Mukasa A, Furuya K, Shimizu T, Hamakubo T, Aburatani H, Kodama T, Kirino T. Genome-wide gene expression analysis for induced ischemic tolerance and delayed neuronal death following transient global ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 24(2):212-23 (2004).

41. Pabello NG, Tracy SJ, Snyder-Keller A, Keller RW Jr. Regional expression of constitutive and inducible transcription factors following transient focal ischemia in the neonatal rat: influence of hypothermia. *Brain Res.* 1038(1):11-21 (2005).
42. Kobayashi MS, Asai S, Ishikawa K, Nishida Y, Nagata T, Takahashi Y. Global profiling of influence of intra-ischemic brain temperature on gene expression in rat brain. *Brain Res Rev.* 58(1):171-91. doi: 10.1016/j.brainresrev.2008.03.001 (2008).
43. Kojima T, Ueda Y, Adati N, Kitamoto A, Sato A, Huang MC, Noor J, Sameshima H, Ikenoue T. Gene network analysis to determine the effects of antioxidant treatment in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Mol Neurosci.* 42(2):154-61. doi: 10.1007/s12031-010-9337-x (2010).
44. Feng JF, Zhang KM, Jiang JY, Gao GY, Fu X, Liang YM. Effect of therapeutic mild hypothermia on the genomics of the hippocampus after moderate traumatic brain injury in rats. *Neurosurgery.* 67(3):730-42. doi: 10.1227/01.NEU.0000378023.81727.6E (2010).
45. Muramatsu H, Welsh FA, Karikó K. Cerebral preconditioning using

- cortical application of hypertonic salt solutions: upregulation of mRNAs encoding inhibitors of inflammation. *Brain Res.* 1097(1):31-8 (2006).
46. Lin B, Kolluri SK, Lin F, Liu W, Han YH, Cao X, Dawson MI, Reed JC, Zhang XK. Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell.* 116(4):527-40 (2004).
 47. Lindenboim L, Borner C, Stein R. Nuclear proteins acting on mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1813(4):584-96. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.11.016 (2011).
 48. Arlt A, Schäfer H. Role of the immediate early response 3 (IER3) gene in cellular stress response, inflammation and tumorigenesis. *Eur J Cell Biol.* 90(6-7):545-52. doi: 10.1016/j.ejcb.2010.10.002 (2011).
 49. Li Y, Duan Z, Gao D, Huang S, Yuan H, Niu X. The new role of LOX-1 in hypertension induced neuronal apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 425(4):735-40. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.07.143 (2012).
 50. Xu X, Gao X, Potter BJ, Cao JM, Zhang C. Anti-LOX-1 rescues endothelial function in coronary arterioles in atherosclerotic ApoE knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27(4):871-7 (2007).
 51. Schreurs MP, Hubel CA, Bernstein IM, Jeyabalan A, Cipolla MJ.

- Increased oxidized low-density lipoprotein causes blood-brain barrier disruption in early-onset preeclampsia through LOX-1. *FASEB J.* 27(3):1254-63. doi: 10.1096/fj.12-222216 (2013).
52. Chen J, Mehta JL, Haider N, Zhang X, Narula J, Li D. Role of caspases in Ox-LDL-induced apoptotic cascade in human coronary artery endothelial cells. *Circ Res.* 94(3):370-6 (2004).
53. Candelario-Jalil E, Yang Y, Rosenberg GA. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience.* 158(3):983-94. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.06.025 (2009).
54. Chen W, Hartman R, Ayer R, Marcantonio S, Kamper J, Tang J, Zhang JH. Matrix metalloproteinases inhibition provides neuroprotection against hypoxia-ischemia in the developing brain. *J Neurochem.* 111(3):726-36. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06362.x (2009).
55. Espada S, Ortega F, Molina-Jijón E, Rojo AI, Pérez-Sen R, Pedraza-Chaverri J, Miras-Portugal MT, Cuadrado A. The purinergic P2Y(13) receptor activates the Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress-induced neuronal death. *Free Radic Biol Med.*

- 49(3):416-26. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.031 (2010).
56. Zheng W, Watts LT, Holstein DM, Prajapati SI, Keller C, Grass EH, Walter CA, Lechleiter JD. Purinergic receptor stimulation reduces cytotoxic edema and brain infarcts in mouse induced by photothrombosis by energizing glial mitochondria. *PLoS One*. 5(12):e14401. doi: 10.1371/journal.pone.0014401 (2010).
57. Tan C, Salehi A, Svensson S, Olde B, Erlinge D. ADP receptor P2Y₁₃ induce apoptosis in pancreatic beta-cells. *Cell Mol Life Sci*. 67(3):445-53. doi: 10.1007/s00018-009-0191-3 (2010).
58. del Puerto A, Díaz-Hernández JI, Tapia M, Gomez-Villafuertes R, Benitez MJ, Zhang J, Miras-Portugal MT, Wandosell F, Díaz-Hernández M, Garrido JJ. Adenylate cyclase 5 coordinates the action of ADP, P2Y₁, P2Y₁₃ and ATP-gated P2X₇ receptors on axonal elongation. *J Cell Sci*. 125(Pt 1):176-88. doi: 10.1242/jcs.091736 (2012).
59. Yano S, Tsukimoto M, Harada H, Kojima S. Involvement of P2Y₁₃ receptor in suppression of neuronal differentiation. *Neurosci Lett*. 518(1):5-9. doi: 10.1016/j.neulet.2012.04.021 (2012).