

## 論文の内容の要旨

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

### 【序文】

新生児医療の発展にも関わらず、新生児低酸素性虚血性脳症 (hypoxic-ischemic encephalopathy: HIE) は予期せず起こる。新生児 HIE は致死率 10~60%、神経学的後遺症の発生率 25%と高く、予後不良の疾患である。その病態には、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による細胞傷害と脳浮腫が深く関わっている。これらによる不可逆的な細胞傷害の悪循環に陥る前の、latent phase における治療介入が重要である。

低体温療法は新生児 HIE に対して神経保護作用が証明されている。しかし、低体温療法には、手技・管理の煩雑さ、特殊機器の必要性、復温時の脳浮腫増強などの問題点があり、低体温療法の問題点を補うことのできる、より普遍的かつ簡便な治療の開発が必要である。

### 【目的】

新生児 HIE における低体温療法の神経保護作用のメカニズムを解明することと、それを利用したより普遍的な治療方法を開発することが本研究の目的である。

### 【方法】

生後 7 日齢のラットをコントロール (CTL) 群、HIE 群、低体温療法 (HT) 群、各種治療群に分けた。新生児 HIE モデルは左総頸動脈の切断と 2 時間の 8% 酸素にて作成した。低体温療法は体温 28°C で 3 時間とした。CTL 群では 36°C、3 時間の体温管理のみ、HIE 群では hypoxic-ischemic (HI) 負荷後に 36°C、3 時間の体温管理とした。HT 群では HI 負荷後に低体温療法を施した。各種治療群は HI 負荷直後から治療を開始し、同時に 36°C、3 時間の体温管理を行った。

各種解析のために、HI 負荷後 3, 6, 24, 48, 72 時間にラットの脳を取り出した。

梗塞面積は、脳切片を Nissl 染色し、顕微鏡にて切片の写真を撮影し、(梗塞側の正常面積/健側の面積) 比を計算し、評価した。

アポトーシスは、脳切片にて TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 解析を行い、観察視野における (TUNEL 陽性細胞数/総細胞数) 比を計算し、評価した。

梗塞側大脳皮質から抽出した total RNA を使用し、CTL 群、HIE 群、HT 群における HI 負荷後 3 時間の遺伝子発現の変化をマイクロアレイにて解析した。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 時間の定量 polymerase chain reaction (PCR) を行い、遺伝子発現の変化を検証した。さらに、遺伝子発現解析から治療ターゲットとなった *Olr1* と *P2ry13* の発現部位を同定するために、脳切片にて in situ hybridization を行った。

新たな治療薬として、抗 LOX-1 中和抗体および P2y13 のアゴニストである 2-(Methylthio)adenosine 5'-diphosphate trisodium salt hydrate (2MeSADP) を用いた。抗 LOX-1 抗体は、phosphate buffer saline (PBS) 0.1ml/回を対照とし、6 $\mu$ g/kg あるいは 60 $\mu$ g/kg の用量で 1 日 2 回腹腔内投与した。2MeSADP は、蒸留水 (DW) 0.1ml/回を対照とし、0.25mg/kg、2.5mg/kg、25mg/kg の用量で 1 日 1 回腹腔内投与した。

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、梗塞側半球からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロットにて、Gapdh をレファレンスタンパクとして cleaved (active) caspase 3、occludin、ZO-1 の量的評価をおこない、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) にて malondialdehyde (MDA) の測定を行った。

脳浮腫の評価として、脳水分率の評価を行った。ラットの脳を左右大脳半球に切断し、重量を測定した (乾燥前重量)。オーブンで乾燥させた後、再びそれぞれの重量を測定した (乾燥後重量)。(乾燥前重量-乾燥後重量) / (乾燥前重量) を脳水分率とし、梗塞側半球/健側半球の比を計算し、脳浮腫の評価とした。

## 【結果】

本研究における HIE モデルと低体温療法の妥当性を調べるため、CTL 群、HIE 群、HT 群において HI 負荷後 3~72 時間の梗塞評価およびアポトーシス評価を行った。HIE 群では、CTL 群に比べて HI 負荷後 3 時間以降、正常面積比が有意に減少し、HI 負荷後 24 時間以降、アポトーシス細胞が有意に増加していた。一方、HT 群では、HIE 群に比べて HI 負荷後 24 時間以降、正常面積比が有意に増加し、アポトーシス細胞が有意に減少していた。

低体温療法の神経保護作用に関連する遺伝子を特定するため、マイクロアレイ解析および定量 PCR を行った。HI 負荷によって発現が減少し、低体温療法

によって発現が増加する遺伝子を神経保護的な作用に関する遺伝子と考え、1 遺伝子を候補として同定した。また、HI 負荷によって発現が増加し、低体温療法によって発現が減少する遺伝子を神経傷害作用に関する遺伝子と考え、11 遺伝子を候補として同定した。定量 PCR では、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 12 の候補遺伝子のうち *P2ry13* と *Olr1* のみであった。*P2ry13* の発現は、HI 負荷後 HIE 群で CTL 群に比べて有意に減少し、HT 群では発現の減少が抑制されていた。*Olr1* の発現は、HI 負荷後 HIE 群で有意に上昇し、HT 群では発現の上昇が抑制されていた。In situ hybridization では、*P2ry13* は神経細胞に、*Olr1* は神経細胞と血管内皮細胞に発現していることが確認された。

2MeSADP と抗 LOX-1 中和抗体を新たな治療薬とした。各種治療群において HI 負荷後 48 時間の梗塞面積の評価を行った。2MeSADP 治療群では、いずれの用量でも治療効果が認められず、2MeSADP は有効でないと判断した。抗 LOX-1 抗体治療では、60 $\mu$ g/kg 治療群において、HIE 群、6g/kg 治療群、PBS 治療群に比べて正常面積比が有意に増加していた。同様に HI 負荷後 48, 72 時間においても正常面積比が有意に増加していた。抗 LOX-1 抗体治療について、HI 負荷後 48 時間のアポトーシス評価を行った。60 $\mu$ g/kg 治療群において、HIE 群、6g/kg 治療群、PBS 治療群に比べてアポトーシス細胞が有意に減少していた。同様に HI 負荷後 48, 72 時間においてもアポトーシス細胞が有意に減少していた。以降、60 $\mu$ g/kg を抗 LOX-1 抗体治療群における投与量とした。

抗 LOX-1 抗体治療の生化学的評価として、梗塞側大脳半球において酸化ストレスマーカーである MDA およびアポトーシス誘導タンパク質である cCASP3 の測定を行った。HIE 群では HI 負荷後 24~72 時間で CTL 群に比べて MDA が有意に高かったが、抗 LOX-1 抗体群では 24~72 時間において有意に減少していた。HT 群、抗 LOX-1 抗体治療群間に有意差はなかった。また、HIE 群では HI 負荷後 48, 72 時間において CTL 群に比べて cCASP3 が有意に増加していたが、抗 LOX-1 抗体治療群では有意に減少していた。HT 群、抗 LOX-1 抗体治療群間に有意差はなかった。

脳浮腫の評価と脳浮腫の機序としての TJPs の量的評価を行った。HI 負荷後 48, 72 時間において抗 LOX-1 抗体治療群と HT 群の両群とも HIE 群に比べて水分率が有意に低下しており、量群間に有意差はなかった。また、HI 負荷後 48 時間において occludin、ZO-1 とともに HIE 群では有意に減少しており、抗 LOX-1 抗体治療群では有意に増加していた。

#### 【考察】

病理組織学的評価および生化学的評価から、本研究における新生仔 HIE モデルにおいて、神経細胞が傷害され、TJPs の分解から脳浮腫が生じることを証明し、同時に、これらの傷害を本研究での低体温療法が抑制することを証明した。

このことは本研究での新生児 HIE モデルおよび低体温療法が妥当なものであったことを意味した。

LOX-1 は酸化 LDL の受容体であり、主に粥状硬化症の形成および増悪因子として研究されている。本研究では、LOX-1 の発現または活性の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。LOX-1 の活性化が神経細胞や血管内皮細胞のアポトーシスを誘導するという報告や MMPs の発現および活性化を促進するという報告がある。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、低体温療法と同等に抑制した。抗 LOX-1 中和抗体は、神経細胞での LOX-1 の発現および活性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 MMPs による TJPs の分解を抑制することで脳浮腫抑制と神経傷害抑制の役割を果たしたとも考えられる。

#### 【結論】

本研究において、LOX-1 の発現および活性の抑制を、新生児 HIE における低体温療法の神経保護メカニズムの一つと同定した。抗 LOX-1 中和抗体は新生児 HIE モデルにおける脳傷害を低体温療法と同等に軽減することを証明した。LOX-1 の発現・活性抑制は新生児 HIE の新たな治療ターゲットである。