慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	新生児低酸素性虚血性脳症に対する低体温療法の至適化のための包括的代謝解析の研究
Sub Title	Comprehensive study of hypothermia in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy
Author	武内, 俊樹(Takenouchi, Toshiki) 末松, 誠(Suematsu, Makoto) 梶村, 眞弓(Kajimura, Mayumi) 中西, 豪(Nakanishi, Tsuyoshi) 杉浦, 悠毅(Sugiura, Yuki) 長畑, 善子(Nagahata, Yoshiko) 杉岡, 忠男(Sugioka, Tadao) 松浦, 友美(Matsuura, Tomomi) 菱木, 貴子(Hishiki, Takako) 森川, 隆之(Morikawa, Takayuki) 久保, 亜希子(Kubo, Akiko) 高橋, 孝雄(Takahashi, Takao)
Publisher	
Publication year	2016
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2015.)
JaLC DOI	
Abstract	新生児低酸素性虚血性脳症に対して現在唯一有効とされ, 臨床現場で行われている低体温療法の作用機序を明らかにするため, 動物実験モデルを作成し, 脳内のアセチルコリンが海馬と扁桃体において減少すること, カルニチンが同部位で増加することを世界で初めて明らかにした。本研究結果により, 新生児低体温療法の至適化, 新たな併用療法の開発が進むこと期待される。 We have investigated molecular mechanisms of therapeutic hypothermia in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy using a rat model. We have shown that hypothermia exerts its neuroprotective effects by changing cellular acetylation status through a coordinated suppression of acetyl-CoA.
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2014～2015 課題番号：26860854 研究分野：小児神経学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_26860854seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ５ 月 ２６ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2015
課題番号：２６８６０８５４

研究課題名（和文）新生児低酸素性虚血性脳症に対する低体温療法の至適化のための包括的代謝解析の研究

研究課題名（英文）Comprehensive study of hypothermia in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy

研究代表者
武内　俊樹（Takenouchi, Toshiki）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：６０３８３７４１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,500,000円

研究成果の概要（和文）：新生児低酸素性虚血性脳症に対して現在唯一有効とされ、臨床現場で行われている低体温療法の作用機序を明らかにするため、動物実験モデルを作成し、脳内のアセチルコリンが海馬と扁桃体において減少すること、カルニチンが同部位で増加することを世界で初めて明らかにした。本研究結果により、新生児低体温療法の至適化、新たな併用療法の開発が進むこと期待される。

研究成果の概要（英文）：We have investigated molecular mechanisms of therapeutic hypothermia in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy using a rat model. We have shown that hypothermia exerts its neuroprotective effects by changing cellular acetylation status through a coordinated suppression of acetyl-CoA.

研究分野：小児神経学

キーワード：低酸素　虚血　新生児

１．研究開始当初の背景

新生児低酸素性虚血性脳症(hypoxic-ischemic encephalopathy: HIE)は、発症頻度1/1,000出生程度と必ずしも高くないものの、神経学的予後が極めて不良であり、種々の合併症をきたすことから、患者・家族・社会の負担が大きい。このため、周産期医療における最重要疾患のひとつとされている。本疾患に対して、唯一有効とされる低体温療法をもってしても10人に1人の神経学的予後が改善される程度であり、その治療効果はまだ不十分である。その理由は、低酸素虚血が新生児の脳に与える影響や、そもそも「なぜHIEに低体温療法が効くのか？」についての分子機序の実態が未解明であることであり、治療適応基準の統一や治療温度、持続時間、復温方法などの低体温療法の最適化に向けての大きな障壁となっている。成人とは異なり、脂質を多く含む母乳を唯一の栄養源とする新生児の脳では、母乳中のグルコースおよび脂質に由来するケトン体が主なエネルギー源である。血流により脳に運ばれたケトン体、グルコース、アミノ酸といった基質が、アセチルCoAを介して、クエン酸回路を介するエネルギー産生、神経伝達物質や脂肪酸合成経路を経て様々な生体分子へと変換されることが、新生児期の脳組織の急激な成長と、脳機能が維持に必要である。

新生児低酸素性虚血性脳症に対する低体温療法の分子標的群を同定・解明するためには、まず、ニューロン、グリア、微小循環から構成される解剖学的なユニットを勘案しつつ、新生児特有の脳代謝・エネルギーマネージメントを生化学的に包括的に解析することが必要となる。その上で、新生児に低体温療法を行った場合に、中枢神経への栄養支持基盤となる肝臓と血液も含めた、『脳-血液-肝臓』の三つのコンポーネント間で、生体内分子・メディエーターが「いつ、どこで、どれだけ」変化するのかを明らかにすることが、低体温療法の治療効果改善と新たな治療法開発には求められている。

このような条件を満たすため、研究代表者らは、複数の質量分析技術を融合させることにより、高い定量性と空間分解能を同時に実現し、組織上で代謝物の分布と濃度をマッピングする画期的な定量的質量分析イメージング法の構築に成功した。本解析を新生児低酸素性虚血性脳症の病態解明に応用するという着想を得た。

２．研究の目的

新生仔低酸素性虚血性脳症に対して、低体温療法を行った場合の脳内代謝物の定量的かつ空間的変化を *in vivo* で網羅的に解析し、低体温療法の分子作用点を洗い出すことで、新生児期の脳実質のエネルギー代謝と低体温療法の連関を解明し、新たな治療法開発の端緒とすることを目的として本研究を行った。具体的には、脳内の低分子代謝物や細胞内メディエーターの時空間的な偏在情報（「いつ、どこで、どれくらい」）を評価することにより、低体温療法の分子的機序を徹底的に解明し、分子基盤に基づいた治療法の開発・最適化を目指す。本研究では、CE/MS メタボローム測定系による代謝物の包括的定量解析および定量的質量分析イメージングを駆使し、①正常幼若マウスに特異的な脳代謝、②低酸素虚血障害及び③その後の低体温療法が幼若マウスの脳に与える急性期の代謝変化のプロファイリングを行い、低体温療法の標的分子(群)を明らかにする。

３．研究の方法

新生児低酸素性虚血性脳症の動物実験モデルとして世界で最も広く使われているRice-Vannucci modelに準じて、生後7日のSprague-Dawley系雄性ラットの左総頸動脈を結紮した後、8%酸素に2.5時間曝露、新生仔低酸素性虚血性脳症モデルを作製した。

その後、深部体温を38°C（常温群）と30°C（低体温群）の2群に分けてコントロールしつつ21%酸素下で3時間再酸素化した。

低体温による代謝変動を系統的に解析するため、摘出した大脳から水溶性代謝物を抽出しメタボローム解析を行った。さらに、代謝制御のポイントと考えられる複数の代謝物に着目し、定量的質量分析イメージングを用いて、その脳内分布と領域特異的な動態を解析した。

４．研究成果

構築した動物実験系の常温群と低体温群の脳全体のエネルギー状態を評価するために、ATPの定量的質量イメージングを行い、低酸素虚血後に低体温療法を行うことで、脳全体のエネルギーが維持されることを確認した（図１）。

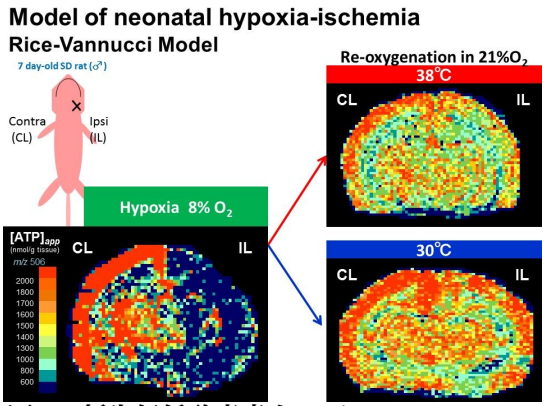

図１　新生仔低酸素虚血モデル

続いて、107種類の脳代謝物を包括的かつ定量的にプロファイリングした。低酸素化直後の大脳では、ピルビン酸、乳酸等が上昇した。再酸素化における代謝プロファイルにおいて、低体温群では常温群に比して、(1) アセチル基供与体であるピルビン酸、アセチルCoA、アセチルコリンおよびグルタミン酸が減少、(2) 脱アセチル代謝物であるカルニチ

ンやコリン等が増加していることが示された（図２）。

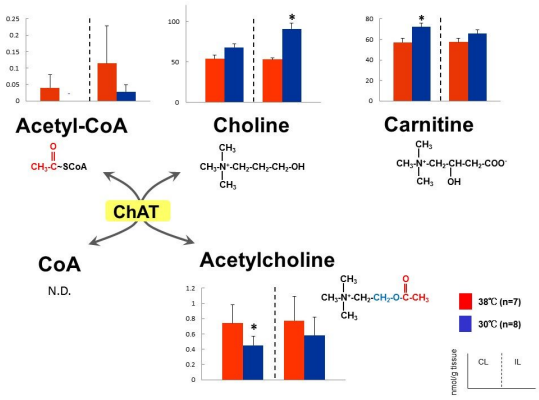

図２　低体温によるアセチル化合物の変化

さらに、脳内の各部位における各代謝物の変動を明らかにするために定量的質量分析イメージングを行った結果、低体温群では、アセチルコリンが海馬と扁桃体において減少すること、カルニチンが同部位で増加することが明らかとなった（図３）。

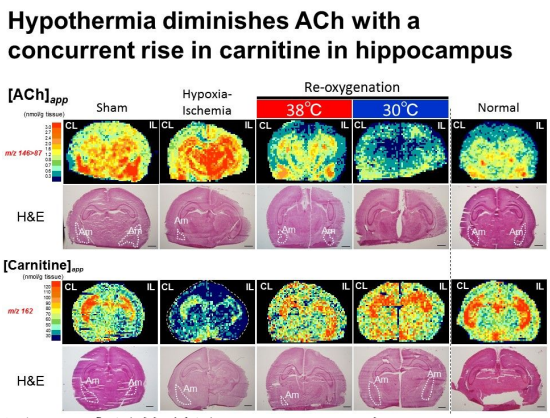

図３　定量的質量イメージング

また、低体温処理によるグルタミン酸の減少は、大脳の全領域で認められた（図４）。

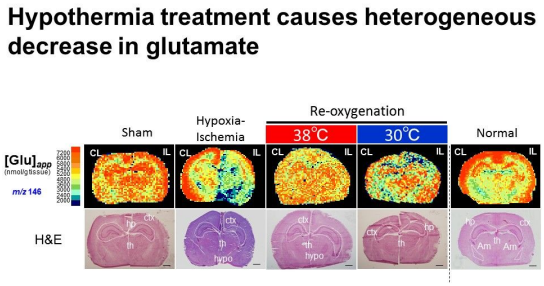

図４　低体温によるグルタミン酸の減少

本研究の主な成果として、新生仔低酸素性虚血性脳症に対する低体温療法は、低酸素・虚血によるアセチルコリンやグルタミン酸の増加を抑制する。同時にカルニチンを増加させることが明らかとなった。これにより、低体温療法の至適化には、脳内の神経伝達物資とエネルギー代謝動態に関わるアセチル基代謝の制御が重要であることが初めて示された。本研究結果は、アセチルコリンを含めたアセチル基の動態に着目した新生児 HIE に対する新規治療法の開発に道を開くものである。研究代表者らは、本研究結果を国際学術誌に報告し、国内外の研究者から多くの反響を得た。

新生児 HIE に対する低体温療法の臨床現場での問題点から着想を得て、疾患モデル動物と革新的代謝物解析技術を組み合わせた基礎実験系を用いて、低体温による脳代謝の制御ポイントを *in vivo* で定量的かつ空間的に明らかにすることで発展させ、治療法開発の端緒を見出すことができた。現在、新生児 HIE が与えている患者、家族、社会全体の負担の大きさを考慮すると、新生児 HIE の代謝異常および低体温療法による代謝制御ポイントの一つが明らかになったことの臨床的意義は計り知れないほど大きい。

今後の研究の展望として、本研究の結果を踏まえて、アセチルコリン以外の低体温療法の分子標的を明らかにし、またそれが脳の「いつ・どこで・どれくらい」起きているかという空間的・時間的定量変化として捉えることで、新生児 HIE の病態がさらに明らかになることが期待される。

これまで臨床現場で待望されてきた低体温療法の有効な併用療法及び至適化に関してはまだ科学的根拠が不十分であり、より治療効果の高い治療法開発を目指して、今後も研究の継続が必要である。本研究で用いた定量的質量分析イメージング法が、成人の脳梗塞といった新生児 HIE 以外の *in vivo* の実験系にも応用され、これまで難しかった複雑な生体内の病態解明の強力な手段として発展することが期待される。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計１件）

Takenouchi T, Sugiura Y, Morikawa T, Nakanishi T, Nagahata Y, Sugioka T, Honda K, Kubo A, Hishiki T, Matsuura T, Hoshino T, Takahashi T, Suematsu M, Kajimura M. Therapeutic hypothermia achieves neuroprotection via a decrease in acetylcholine with a concurrent increase in carnitine in the neonatal hypoxia-ischemia. J Cereb Blood Flow Metab.（査読あり）35(5) 2015:794-805. doi: 10.1038/jcbfm.2014.253.

〔学会発表〕（計２件）

(1)Takenouchi T, Sugiura Y, Morikawa T, Nakanishi T, Nagahata y, Sugioka T, Honda K, Kubo A, Hishiki T, Matsuura T, Hoshino T, Takahashi T, Suematsu M, Kajimura M. Hypothermic intervention causes reciprocal changes in acetylated metabolites in neonatal hypoxia-ischemia.

10th World Congress for Microcirculation,
平成 27 年 9 月 26 日
京都国際会館（京都府京都市）

(2)Takenouchi T, Sugiura Y, Morikawa T, Nakanishi T, Nagahata y, Sugioka T, Honda K, Kubo A, Hishiki T, Matsuura T, Hoshino T, Takahashi T, Suematsu M, Kajimura M. Therapeutic hypothermia in neonatal hypoxia-ischemia: neuroprotection through alteration in acetylated metabolites.
Society for Neuroscience 2013
2013 年 11 月 10 日
シカゴ（アメリカ合衆国）

〔図書〕（計０件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計０件）
なし

○取得状況（計０件）
なし

〔その他〕
なし

６．研究組織
(1)研究代表者
武内　俊樹（TAKENOUCHI Toshiki）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：60383741

(2)研究協力者
末松　誠（SUEMATSU Makoto）
慶應義塾大学・医学部・教授

梶村　眞弓（KAJIMURA Mayumi）
慶應義塾大学・医学部・准教授

中西　豪（NAKANISHI Tsuyoshi）
慶應義塾大学・医学部・特任講師

杉浦　悠毅（SUGIURA Yuki）
慶應義塾大学・医学部・特任講師

長畑　善子（NAGAHATA Yoshiko）
慶應義塾大学・医学部・研究員

杉岡　忠男（SUGIOKA Tadao）
慶應義塾大学・医学部・共同研究員

松浦　友美（MATSUURA Tomomi）
慶應義塾大学・医学部・研究員

菱木　貴子（HISHIKI Takako）
慶應義塾大学・医学部・特任講師

森川　隆之（MORIKAWA Takayuki）
慶應義塾大学・医学部・特任助教

久保　亜希子（KUBO Akiko）
慶應義塾大学・医学部・特任講師

高橋　孝雄（TAKAHASHI Takao）
慶應義塾大学・医学部・教授