

日本医療研究開発機構 成育疾患克服等総合研究事業 事後評価報告書

I. 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 新生児低酸素性虚血性脳症の早期重症度診断法の開発
(英 語) Developmental study of early diagnosis of severity of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy

研究開発実施期間: 令和 4 年 4 月 1 日～令和 7 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 伊藤 雅之
(英 語) Ito Masayuki

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所病態生化学研究部・特任研究室長
(英 語) Department of Molecular and Biochemistry and Cellular Biology, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry. Section Chief.

II. 研究開発の概要

(和文) 2 ページ以上

1. 研究開発の概要

本研究は、新生児脳疾患の主因である新生児低酸素性虚血性脳症 (nHIE) の重症度診断法の開発である。これまでの研究から、生後 6 時間以内の血液中 sLOX-1 濃度が、Sarnat 分類の重症度と高い相関があることを明らかにした。出生時より本研究登録者の臨床症状を追跡調査し、3 歳の神経発達との相関について統計学的解析を行い、重症度診断 (障害の予後予測) の臨床応用を目指す。

新生児低酸素性虚血性脳症 (HIE) は、新生児仮死に引続いて生じる脳障害でてんかんや脳性麻痺、知的障害などの神経発達障害を高頻度にもたらす。唯一の治療法である低体温療法は、Sarnat 分類中等度以上の新生児に対して生後 6 時間以内の開始を求めている。臨床現場において、生後間もない時期に HIE の診断と重症度を決定しなければならない。また、高度な医療である新生児の低体温療法は、その設備と人員が必要である。また、短時間で正確な重症度診断には経験の豊富な新生児科医が必要である。そこで、簡単にベッドサイドで短時間に重症度診断を可能にする体外診断薬の開発が望まれる。

我々のこれまでの研究では、生後 6 時間以内の血液 sLOX-1 値と HIE 重症度に有意の相関があることを明らかにした。本研究では、長期的な神経発達の結果との関連性を明らかにするために、生後 6 時間以内の血液 sLOX-1 値と生後 3 歳までの追跡調査 (前方視的研究) を行った。加えて、HIE 重症度診断のための体外診断薬と治療法を開発を行った。

①生後 6 時間以内の sLOX-1 値と 1 歳 6 ヶ月、3 歳の神経発達との相関：登録者 191 名を得て開始した。初めに、臍帯 (動脈) 血と新生児血の間に sLOX-1 値との相関を調べたが、有意差はなかった。

次に、血液 sLOX-1 値と Sarnat 分類の重症度との相関を調べた。その結果、中等度と重度群と軽度群の間には有意差はないが、他の群間には有意差があった ($P < 0.001$)。これらのことから、臍帯血や新生児血に関わらず sLOX-1 測定値が重症度診断に有用であることを示している。また、血液 sLOX-1 測定は Sarnat 分類による重症度診断を補完することができると考えられた。1 歳 6 ヶ月の追跡は 117 名であり、3 歳まで追跡できた登録者は 91 名であった。神経発達評価は発達指数と精神/神経症状の有無により、Grade 0 (G0: 正常)、1 (G1: 軽度)、2 (G2: 中等度)、3 (G3: 重度) の 4 群に分けて統計解析を行った。各群の分布は、1 歳 6 ヶ月では、G0 が 74 名、G1 が 20 名、G2 が 3 名、G3 が 20 名であった。3 歳では、分布は G0 が 33 名、G1 が 19 名、G2 が 7 名、G3 が 32 名であった。統計解析の結果、1 歳 6 ヶ月および 3 歳のいずれの群間で有意差があった。ロジスティック回帰分析では、各群間では、障害が重くなるに従って、sLOX-1 値が有意差をもって高くなっていた ($P < 0.0001$)。群間比較 (G0+G1 対 G2+G3) では、G2+G3 が有意差をもって高い ($P < 0.0001$) ことがわかった。

また、重症度診断としてカットオフ値の設定のための ROC 曲線は、G0+G1 と G2+G3 間で ROC 曲線を作成した。その結果、sLOX-1 値を N と設定すると、1 歳 6 ヶ月では AUC は 0.94 で感度 95%、特異度 80%であり、3 歳では AUC は 0.96 で感度 89%、特異度 90%と高い確率で設定できることがわかった。

これらの結果から、生後 6 時間以内の採血による sLOX-1 測定は、出生後 1 歳 6 ヶ月だけでなく、3 歳時点の神経発達の予後予測に有効であることがわかった。このことから、血液 sLOX-1 値は HIE 重症度診断の生物学的指標となり、この臨床応用は生後早期の低体温療法の介入の選択および治療介入や早期療育の導入にも期待できる。

②診断薬開発：血液 sLOX-1 のベッドサイドでの簡易な測定を目指して、体外診断薬の開発を行なった。従来の ELISA 法による sLOX-1 測定は、検査設備と時間を要することから、イムノクロマト法を開発した。高感度蛍光による改良を行い、LOX-1 標準液による検量線の検証を終えた。実検体での実験を行い、血液中

の夾雑物による干渉等による測定精度への影響を調べた。全血での測定感度を検証したのち、PMDA の体外診断薬の相談を進める。

- ③治療法開発：HIE の新しい治療法として、LOX-1 を標的にした治療法を開発する。これまでに、HIE モデル動物でミクログリアが LOX-1 発現し、サイトカインを誘導することを見つけ、LOX-1 中和抗体が治療効果を有することを報告した。そこで、初代ミクログリア細胞に低酸素低栄養負荷（OGD（oxygen-glucose deprivation）負荷）を行うことにより HIE モデル細胞を作成した。この HIE モデル細胞では、LOX-1 が誘導され、サイトカインの上昇をもたらすことを報告している。

治療候補として、ヒト型 LOX-1 タンパクをエピトープとした抗体、および競合する低分子化合物を作成した。抗体は 13 種類のモノクローナル抗体を作成した。低分子化合物は 7 種類合成した。これらを HIE モデル細胞へ投与し、LOX-1 発現とその中和活性を測定することでスクリーニングを行なった。HIE モデル細胞の LOX-1 発現とサイトカインの抑制効果を評価した。その結果、LOX-1 とサイトカインのいずれの抑制効果を認めた 2 種類の抗体を選定することができた。一方、低分子化合物には有意に発現抑制を認めたものはなかった。

今後、治療候補として、この 2 種類のモノクローナル抗体を個体としての HIE モデル動物による臨床およびサイトカイン抑制効果を検証する。

2. 顕著な成果

（1）sLOX-1 測定による重症度診断

概要：生後 6 時間以内の血液中 sLOX-1 値と 3 歳時の神経発達の重症度を高い相関があることを明らかにした。

また、3 歳時の神経発達障害についての ROC 曲線解析では、sLOX-1 値とに有意なカットオフ値の設定ができることが分かった。本研究結果を踏まえて、HIE の体外診断薬としてのカットオフ値設定について PMDA の全般相談を行った。

（2）新生児低酸素性虚血性脳症の診断薬開発

概要：新生児低酸素性虚血性脳症の診断薬としてのイムノクロマト検査キットの開発は、抗体を変更して開発した。蛍光標識による検出法の優位性を確認し、標準液での検量線には問題がなかったが、血液検体での測定結果に正確性を欠いたため、フィルターなどの検討を行い、改良を行なった。性能試験や関連試験などを行い、体外診断薬承認を目指す。

（3）新生児低酸素性虚血性脳症の治療法開発

概要：HIE の治療候補薬（中和抗体、低分子化合物）のスクリーニングを行なった。ラット初代培養ミクログリアによる HIE モデル細胞を樹立し、LOX-1 発現変化と培養上清のサイトカイン、ケモカインを測定した。その結果、LOX-1 発現を有意に低下させ、中和活性を有する抗体を複数個同定した。一方、LOX-1 受容体に競合することは予測される低分子化合物による治療効果は検証できなかった。HIE の新しい治療薬として、LOX-1 を介した薬剤開発の基盤を明らかにした。

The 3-year prospective cohort study is intended to verification of soluble form of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (sLOX-1) as a novel biomarker for severity evaluation of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) and confirmation of cutoff values for HIE severity and prognosis.

HIE is one of major perinatal brain diseases, sometimes leading to severe neurological sequelae or death. Therapeutic hypothermia is only effective therapy for moderate and severe grade of HIE. However, physicians often threw away a therapeutic chance, because of experimented-specific skill to decide the HIE severity. Moreover, it is very few of hospitals which can treat hypothermia with adequate properties. Therefore, it is necessary for the integrated diagnostic system of HIE, patients' transportation and special treatments, including therapeutic hypothermia.

On the other hand, sLOX-1 is tried to use an early diagnosis of acute myocardial infarction. We previously reported that the sLOX-1 expression level elevated in acute phase of HIE model rats and was normalized by hypothermia. In addition, the anti-LOX-1 neutralized antibody significantly reduced brain damage of the HIE model rats. In addition, we previously reported the relationship of plasma sLOX-1 value and severity grades of HIE patients. We measured plasma sLOX-1 value of 72 patients within 6 hours after birth. As a result, we confirmed that the sLOX-1 value elevated with HIE severity in parallel and was correlated with neurological sequelae at discharge. Moreover, we obtained the meaningful cutoff values of sLOX-1 for HIE severity and sequelae.

In the study, we performed 3-year cohort study of plasma sLOX-1 and HIE severity. We measured plasma sLOX-1 value within 6 hours after birth and collected clinical data of 191 registered participants with an informed consent. We divided five groups of normal-umbilical cord blood (UCB), normal-patient's blood (CTL), mild, moderate and severe, according to the Sarnat's modified severity category. There was no significant sLOX-1 value between UCB and CTL.

As of 3-year age of participants, we evaluated 4 grades of developmental and neurological severity; G0 (normal), G1 (mild), G2 (moderate) and G3 (severe). We collected clinical data of 33 participations of G0, 19 G1, 7 G2 and 32 G3. After statical analysis, we identified that the sLOX-1 values increased with grades. We also recognized that the sLOX-1 values of G2 and G3 were significantly higher than those of G0 and G1. Moreover, we could propose the cutoff values of sLOX-1 for HIE severity and prognosis.

To measure the sLOX-1 value on bedside, we are developing the whole blood examination system with immunochromatography. From the results, we can establish and provide a novel examination, which can be easily tested at anywhere. Furthermore, we developed novel HIE treatments, using antibodies and chemicals.