

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：21601  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2020～2022  
課題番号：20K08185  
研究課題名(和文) 血液脳関門組織培養モデルによるウイルス関連急性脳症病態解明と治療法開発の基礎研究

研究課題名(英文) Basic study for elucidation of pathophysiology of virus-related acute encephalopathy and development of therapy using blood-brain barrier tissue culture model

研究代表者  
細矢 光亮 (Hosoya, Mitsuaki)  
福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：80192318  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス関連急性脳症(VAE)はウイルス感染後に発症する重篤な合併症の一つです。実験室で病態モデルを作成し、VAEの増悪因子と考えられている非ステロイド系抗炎症薬(NSAIDs)についてVAEの本態である血管透過性への影響を調べました。その結果、NSAIDsであるジクロフェナクナトリウムとメフェナム酸は血管透過性を増加させることが分かりました。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルス関連急性脳症(VAE)はウイルス感染後に発症する重篤な合併症の一つです。治療法はガイドラインにて示されていますが、その死亡率、後遺症残存率は依然として高いのが現状です。また、これまで予防法、治療法を検討する研究の方法がありませんでした。本研究では「3次元VAEモデル」を作成し、VAEの詳細な病態解明により有効な治療戦略を検討しました。今回の研究により、一部の非ステロイド系抗炎症薬がVAEに関わっていることが示唆されました。今後、今回作成したモデルにより得られた知見により、VAEの予防法や治療法が確立されることが期待されます。

研究成果の概要(英文)：Virus-associated acute encephalopathy (VAE) is one of the most serious complications that can develop after viral infection. In a laboratory model of the pathogenesis of VAE, we investigated the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), which are considered to be aggravating factors in VAE, on vascular permeability, the essential mechanism of VAE. The results showed that the NSAIDs diclofenac sodium and mefenamic acid increased vascular permeability.

研究分野：小児科学

キーワード：脳炎 脳症 ウイルス感染症 ウイルス関連急性脳症

## 1. 研究開始当初の背景

ウイルス関連急性脳症 (VAE) は、インフルエンザウイルスやヒトヘルペスウイルス、RS ウイルス、ロタウイルスなどの一般的なウイルス感染後に発症する重篤な合併症の一つであり、急激な意識障害や痙攣を伴う。現在 VAE はインフルエンザ脳症の中心病態が解明され、高サイトカイン血症により脳内深部の血管透過性が亢進し、血管周囲へ血液成分が漏出することで、血管周囲の脳組織が浮腫に陥り、二次的に神経細胞やグリア細胞がアポトーシスに陥ると考えられている。本病態はインフルエンザ脳症のみならず HHV-6、エンテロウイルス、ロタウイルスなどのその他の VAE の病態としても考えられている。

これまで我々は、インフルエンザウイルス感染にともない惹起された高サイトカイン血症が血管内皮細胞を活性化することで、血管透過性が亢進し、血液脳関門 (Blood-Brain barrier, BBB) が破綻することによりインフルエンザ脳症を発症することを明らかにした<sup>1)</sup>。また、インフルエンザ脳症の最重症例の病態形成においては血管内皮細胞のアポトーシスが関与し、回復期の脳萎縮には神経細胞のアポトーシスが関与すると推定した<sup>1, 2)</sup>。さらに、ヒトインフルエンザウイルス感染と TNF- $\alpha$  が相乗的にこのアポトーシスを増強させることを細胞培養系で証明した<sup>4)</sup>。

血管内皮細胞は細胞間接着装置により細胞同士が互いに接着して物質の透過性を制御しているが、その中でも claudin、occludin などによって構成されるタイト結合が脳血管内皮細胞のバリア機能の維持に強く関わっている。また、そのタイト結合は TNF- $\alpha$  をはじめとした炎症性サイトカインの影響を受けるとされている<sup>5)</sup>。そこで我々は、VAE モデルの作成を目指し、単離した臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) を用いた血管内皮細胞障害モデルを作成した。炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  を添加し、TNF- $\alpha$  が濃度依存的に血管透過性を亢進させることを、経内皮細胞電気抵抗 (Transendothelial Electrical Resistance, TER) 測定により電気生理学的に示し、また FITC 標識デキストランを用いた溶質透過試験でも機能的に示した。さらに内皮細胞間のタイト結合の局在が変化することを蛍光免疫染色により明らかにした<sup>6)</sup>。しかし、臓器によりタイト結合構成タンパクの発現量が異なり、臍帯静脈内皮細胞と脳血管内皮細胞ではタイト結合構成蛋白である claudin5 の発現量に差がある<sup>7)</sup>。また、血液脳関門 (BBB) は脳血管内皮細胞と周皮細胞、アストロサイトにより形成される。そのため我々は BBB を構成する脳血管内皮細胞と周皮細胞を 3 次元的に共培養し TNF- $\alpha$  を添加した 3 次元 VAE モデルを作成、確立した。TNF- $\alpha$  濃度依存的に、血管透過性の回復遅延が観察され、溶質透過性試験でも同様の現象が観察された。さらに、蛍光免疫染色では TNF- $\alpha$  による透過性亢進時に一致した claudin-5 の一過性の非局在化が観察され、タイト結合の構造的変化が血管透過性亢進に関与していることが示唆された<sup>8)</sup>。

インフルエンザ脳症症例の全国疫学的調査から、予後の悪化因子としてジクロフェナクやメフェナム酸などの解熱鎮痛剤が挙げられている。また、推定される病態から免疫抑制療法、抗サイトカイン療法、抗アポトーシス療法などが治療ガイドラインにて示されている。しかし、特に詳細な検討が行われているインフルエンザ脳症では、さまざまな治療法が試みられているものの、その死亡率は 10-20%、後遺症残存率は 20-30% と依然高い。

## 2. 研究の目的

VAE に代表されるインフルエンザ脳症の重症度は症例により多様であり、解熱鎮痛薬である非ステロイド性抗炎症剤 (NSAIDs) を使用したことによる病態の悪化や、新たな治療法の導入による改善効果を臨床的に証明するのは困難である。また、治療法や予防法の検討が可能な小動物を用いたインフルエンザ脳症病態モデルがないため、これまで血管障害に対するこれら薬剤の影響を検討した研究もなされていない。一方、本研究で用いる細胞リアルタイムモニタリングシステムはこれまで不可能であった血管内皮細胞における細胞透過性を電気生理学的に解析可能である。

本研究は、VAE の主病態である「ウイルス感染に伴い産生された炎症性サイトカインによる血管内皮細胞障害と血管透過性の亢進」に着目し、BBB を *in vitro* で再現した 3 次元 VAE モデルを用いて、血管透過性の動的、質的变化を解明する。これらにより、各種サイトカイン、薬剤の血管透過性への影響、さらにタイト結合への作用を明らかにし、VAE の病態解明により有効な治療戦略を検討し、最終的に治療法の確立を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) NSAIDs の血管透過性への影響

TNF- $\alpha$  濃度を 0.5~5ng/mL に調整した VAE モデルに、各種 NSAIDs を添加した際の傍細胞透過性への影響を検討した。マクロ分子の透過性を測定する方法として、溶質透過性試験を、イオン分子の透過性については TER 測定により解析した。NSAIDs として、ジクロフェナクナトリウム (DCF)、メフェナム酸 (MEF) を用いた。また、解熱鎮痛薬

としてインフルエンザによる発熱時に安全に使用できるとされているアセトアミノフェン(ACE)についても検討した。

(2) NSAIDsの細胞障害性への影響

ヒト脳血管内皮細胞を単層培養したプレートにTNF- $\alpha$ を0~100ng/mL添加したのち、NSAIDsを添加した際の細胞障害性をLDH遊離試験にて検討した。NSAIDsとして、DCF、MEFを用いた。ACEについても同様に検討し比較した。

(3) NSAIDsのタイトジャンクション関連蛋白発現への影響

ヒト脳血管内皮細胞を単層培養したプレートにTNF- $\alpha$ を0~10ng/mL添加したのち、NSAIDsとしてDCFを添加した際のタイト結合構成蛋白の1つであるclaudin5のmRNA発現についてリアルタイムPCRにて測定した。

4. 研究成果

(1) NSAIDsの血管透過性への影響

VAEモデルにTNF- $\alpha$ 存在下でDCF、MEFを添加すると、溶質透過性の亢進を認めた。ACE添加ではTNF- $\alpha$ 0、0.1ng/mL濃度で溶質透過性の改善が見られた(図1)。

TERにおいてはTNF- $\alpha$ 非存在下においてもDCF、MEFによるTERの低下を認めた(図2)。ACE添加では有意な変化は見られなかった。つまり、VAEモデルにおいて、DCF、MEFによるイオン分子、およびマクロ分子に対するバリア機能の障害が示された。

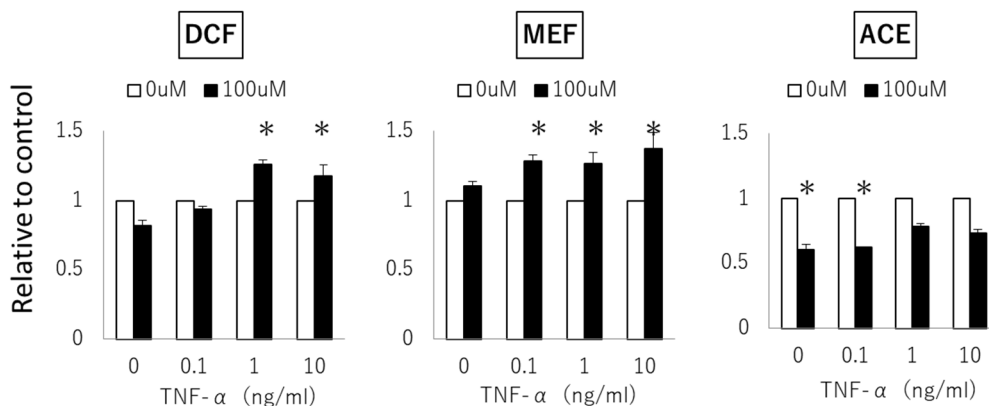


図1. 各種薬剤による溶質透過性の変化

各TNF- $\alpha$ 濃度における各薬剤の有無での溶質透過性を比較し、 $p < 0.05$ を有意とした(\*).

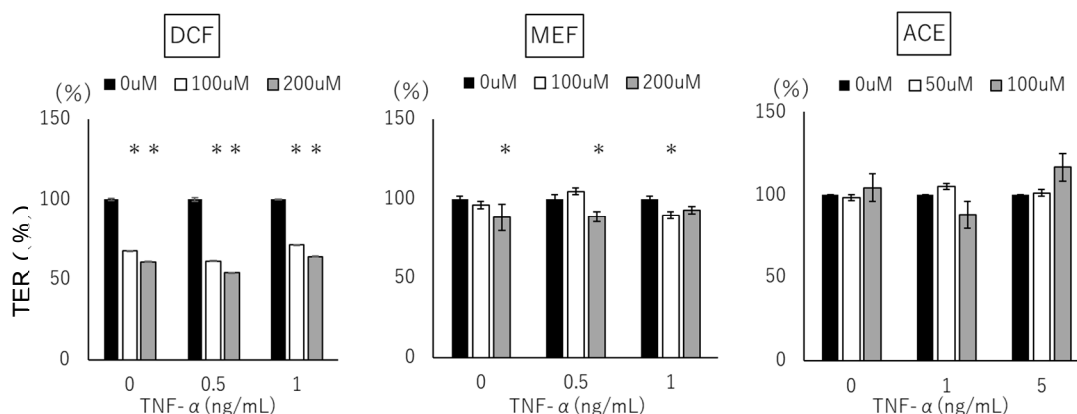


図2. 各種薬剤によるTER変化

各TNF- $\alpha$ 濃度における各薬剤の濃度条件でのTERを比較し、 $p < 0.05$ を有意とした(\*).

(2) NSAIDsの細胞障害性への影響

ヒト脳血管内皮細胞を用いた LDH 遊離試験において、DCF、MEF 添加にて、TNF- $\alpha$  濃度依存性に細胞障害の増強が認められた。一方 ACE では TNF- $\alpha$  存在下でも薬剤による細胞障害の増強は認められなかった(図3)。また、TNF- $\alpha$  非存在下では DCF、MEF による細胞障害性は認められなかった。このことから DCF、MEF の脳血管内皮細胞への直接的な障害作用は TNF- $\alpha$  存在下で増強されることが示された。

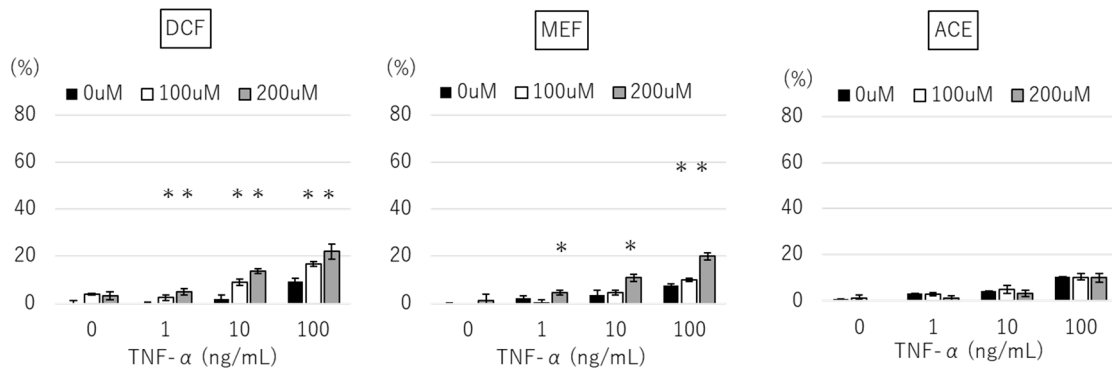


図3. 各種薬剤による LDH 遊離試験

各 TNF- $\alpha$  濃度における各薬剤の濃度条件での LDH 遊離(細胞障害性)を比較し、 $p < 0.05$  を有意とした(\*).

(3) NSAIDsのタイト結合関連蛋白発現への影響

TNF- $\alpha$  存在下で DCF により claudin5 の mRNA 発現が低下した(図4)。このことから TNF- $\alpha$  存在下では DCF によりタイト結合を構成する蛋白発現が低下し、傍細胞透過性に影響することが示唆された。

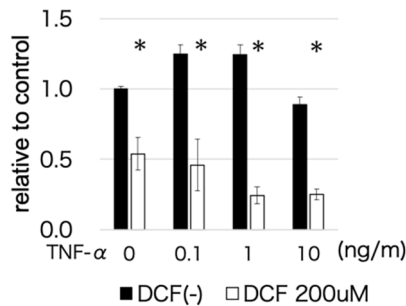


図4. DCF による claudin5 発現変化

各 TNF- $\alpha$  濃度における DCF の有無での claudin5 の mRNA 発現量を比較し、 $p < 0.05$  を有意とした(\*).

以上のことから VAE モデルにおいて、TNF- $\alpha$ 、NSAIDs によりバリア機能障害が認められたが、その要因として、細胞障害と tight junction 障害のどちらも関与していることが示唆された。

引用文献

1. Morita H, Hosoya M, Kato A, et al. Laboratory characteristics of acute encephalopathy with multiple organ dysfunctions. Brain Dev. 27:477-82, 2005.
2. Hosoya M, Nunoi H, Aoyama M, et al. Cytochrome c and tumor necrosis factor- $\alpha$  values in serum and cerebrospinal fluid of patients with influenza-

- associated encephalopathy. *Pediatr Infect Dis J.* 24:467-70, 2005.
3. Hosoya M, Kawasaki Y, Katayose M, et al. Prognostic predictive values of serum cytochrome c, cytokines, and other laboratory measurements in acute encephalopathy with multiple organ failure *Arch Dis Child.* 91:469-72,2006.
  4. Sumikoshi M, Hashimoto K, Kawasaki Y, et al. Human influenza virus infection and apoptosis induction in human vascular endothelial cells. *J Med Virol.* 80:1072-8, 2008.
  5. Capaldo CT, and Nusrat A. Cytokine regulation of tight junctions. *Biochim Biophys Acta.* 1788:864-71, 2009.
  6. Miyazaki K, Hashimoto K, Sato M, et al. Establishment of a method for evaluating endothelial cell injury by TNF- in vitro for clarifying the pathophysiology of virus-associated acute encephalopathy. *Pediatr Res.* 81:942-947, 2017.
  7. Fontijn RD, Rohlena J, Marle J, et al. Limited contribution of claudin-5-dependent tight junction strands to endothelial barrier function. *Eur J Cell Biol.* 85:1131-44, 2006.
  8. Maeda H, Hashimoto K, Go H, et al. Towards the development of a human in vitro model of the blood-brain barrier for virus-associated acute encephalopathy: assessment of the time- and concentration-dependent effects of TNF- on paracellular tightness. *Exp Brain Res.* 239:451-461, 2021.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	橋本 浩一  (Hashimoto Koichi)  (50322342)	福島県立医科大学・医学部・准教授    (21601)	
研究分担者	佐藤 晶論  (Sato Masatoki)  (60423795)	福島県立医科大学・医学部・准教授    (21601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関