

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 30 日現在

機関番号：21601
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009 ～ 2011
 課題番号：21591330
 研究課題名（和文）
 インフルエンザ脳症の組織培養モデルを用いた薬剤による病態の増悪及び改善の検討
 研究課題名（英文） Elucidation of mechanisms of aggravation in Influenza virus encephalopathy using with tissue culture system.
 研究代表者：細矢光亮
 (Hosoya Mistuaki)
 公立大学法人福島県立医科大学・医学部・教授
 研究者番号：80192318

研究成果の概要（和文）：

TNF- α 、および非ステロイド性消炎鎮痛薬のヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)へのアポトーシス誘導、毒性、タイトジャンクションの変化について検討した。ウエスタンブロットによる Claudin-5、Occludin 発現の変化、経上皮内皮電気抵抗値(TER)測定による細胞透過性の変化により TNF- α のタイトジャンクションへの影響を評価した。

研究成果の概要（英文）：

We examined induction of apoptosis, cytotoxicity, and change of tight junction due to TNF - α and non-steroidal anti-inflammatory drugs in model of Influenza virus encephalopathy using with human umbilical vein vascular endothelial cell (HUVEC).
 We evaluated influence of TNF - α to tight junction of HUVEC by western blot for Claudin-5 and Occludin, and by measurement of trans-endothelial epithelium endodermis electric resistance (TER) for alteration of cell permeability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児感染症学、インフルエンザ脳症、アポトーシス、血管内皮細胞、サイトカイン、細胞透過性、タイトジャンクション

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、インフルエンザ脳症の病

態解明を目的として、急性脳症患者保護者の同意を得て、脳症発症時と回復期に血液及び

髄液検体を採取し、各種サイトカイン（炎症マーカー）接着分子（血管内皮活性化マーカー）、チトクローム C（アポトーシスマーカー）濃度を測定してきた。その結果、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し、血管障害をきたしてインフルエンザ脳症を発症することを明らかにした（Morita et al. Brain & Development, 2005）。さらに、血清中チトクローム C が死亡例と高度後遺症例の急性期で高値であり、髄液チトクローム C が大脳に萎縮をきたした後遺症例の回復期において高値であったことから、最重症例の病態形成には血管内皮細胞のアポトーシスが、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（Hosoya et al. Pediatric Infections Disease Journal, 2005）。

現在、インフルエンザ脳症に対しステロイドパルス療法や大量ガンマグロブリン療法が試みられているが、これらの治療によっても死亡および高度後遺症例が 20-30%にみられる。さらに有効な治療法の開発が望まれるが、インフルエンザ脳症のモデルがないため、薬剤の有効性を評価するのが困難な状況にある。

2. 研究の目的

インフルエンザ脳症の病態モデルを *in vitro* において再現し、薬剤による病態の改善あるいは増悪を定量的に解析して、有効な予防・治療薬開発の基礎にする。

3. 研究の方法

本研究への協力の同意が得られた、当施設で出生した児より臍帯を提供して頂き、唐崎らの論文（J UOEH, 18(4): 281-285, 1996）を参考に HUVEC を単離培養した。

TNF- α を用い HUVEC にアポトーシス誘導し、さらに消炎鎮痛剤添加し、アポトーシスおよび細胞毒性を APOPercentage 法、MTT 法でそれぞれ評価した。

一方、TNF- α の HUVEC のタイトジャンクションを構成する蛋白（ZO-1、Claudin-4、Claudin-5、Claudin-12、Occludin）発現への影響について mRNA レベル、蛋白レベルで検討した。さらに、細胞リアルタイムモニタリングシステム (cellZscope[®]) により、経上皮内皮電気抵抗値 (TER) を経時的に測定し、TNF- α 細胞タイトジャンクションへの影響（細胞透過性）を検討した。

4. 研究成果

①TNF- α の HUVEC におけるアポトーシス誘導。

TNF- α (10pg/ml~100ng/ml) を培養液に添加し、24 時間後に APOPercentage 法によるアポトーシスの評価では、TNF- α は濃度依存的にアポトーシスを誘導し、以後の実験の TNF- α 至適濃度を 10ng/ml に決定した。

②各種消炎鎮痛剤の TNF- α 存在下での HUVEC への影響。

消炎鎮痛剤としてメフェナム酸、ジクロフェナクナトリウム、イブプロフェン、インドメタシン、アセトアミノフェンを用い、TNF- α (10ng/ml) 存在下での HUVEC への細胞毒性を MTT 法で評価した。薬剤濃度 250 μ M、125 μ M での検討ではイブプロフェン、アセトアミノフェンはともに細胞毒性は認められなかったが、メフェナム酸は TNF- α の存在により細胞毒性が増強された。ジクロフェナクナトリウム、インドメタシンは 125 μ M では毒性を示さなかったが、250 μ M では細胞毒性を示した。

③10%FCS 含培地での TNF- α の HUVEC にお

るタイトジャンクション蛋白 m-RNA 発現への影響。

TNF- α (1, 10pg/ml)を培養液に添加し、HUVEC のタイトジャンクション蛋白の経時的変化 (time 0, 0.5, 4, 6, 8, 24 時間) をリアルタイム RT-PCR を用い m-RNA レベルで検討した。Claudin-12 以外のタイトジャンクション蛋白は TNF- α 添加後 4 時間に発現のピークが認められた。いかなる条件でも time 0 に比較し発現の低下は認められなかった。

④2%FCS 含培地での TNF- α の HUVEC における Claudin-5、Occludin 発現への影響。

TNF- α (0.1, 1, 10pg/ml)を培養液に添加し、HUVEC の Claudin-5、Occludin の経時的変化 (6, 12, 24 時間) をウェスタンブロットで検討した。両蛋白共に添加後 6 時間では発現に変化は認められなかったが、添加後 12 時間では、Claudin-5 は濃度依存的に発現の低下が認められた。添加後 24 時間では、両蛋白共に濃度依存的に発現の低下が認められた。

⑤ 細胞リアルタイムモニタリングシステムによる細胞タイトジャンクションの評価。

血管内皮細胞を専用プレート (トランスウェル[®]) で培養し、cellZscope[®]を用い、経上皮内皮電気抵抗値 (TER) を経時的に測定し、細胞タイトジャンクションへの影響 (細胞透過性) を検討した。HUVEC 培養開始後 60 時間より、TER 値が上昇し、90 時間後に TER 値はプラトーに達しタイトジャンクションの形成を機能的に確認した。HUVEC 培養開始後 120 分に TNF- α (100pg/ml, 1ng/ml, 10ng/ml) を培養液に添加し、TER を継時的に測定した。TNF- α いずれの濃度でも、添加後 10 時間後より TER 値が低下し細胞透過性の亢進が確認された。100pg/ml では添加後約 24 時間で細

胞透過性は添加前のレベルに回復したが、1ng/ml、10ng/ml では添加後 30 時間でも細胞透過性の回復は認められなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Takeyama A, Hashimoto K, Sato M, Sato T, Kanno S, Takano K, Ito M, Katayose M, Nishimura H, Kawasaki Y, Hosoya M. Rhinovirus load and disease severity in children with lower respiratory tract infections. *J Med Virol*. 査読有、84 巻、2012、1135-42 頁.
- ② Watanabe M, Suyama K, Hashimoto K, Sato M, Ohara S, Abe Y, Kawasaki Y, Yamaguchi S, Saijo M, Hosoya M. Mumps Virus-Associated Acute Encephalopathy: Case Report and Review of the Literature. *J Child Neurol*. 査読有、2012 [Epub ahead of print]
- ③ Abe Y, Hashimoto K, Iinuma K, Ohtsuka Y, Ichiyama T, Kusuhara K, Nomura K, Mizuguchi M, Aiba H, Suzuki Y, Mizusawa H, Hosoya M. Survey of subacute sclerosing panencephalitis in Japan. *J Child Neurol*. 2012, [Epub ahead of print]
- ④ 細矢光亮. 亜急性硬化性全脳炎に対する治療の動向. *最新医学*, 依頼総説、66 巻 : 86-90 頁, 2011 年.
- ⑤ 細矢光亮. 亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) に対する新たな治療法の開発を目指して. *Neuroinfection*, 依頼総説、16 巻 : 1-8 頁, 2011 年.

〔学会発表〕（計3件）

- ① 阿部優作、橋本浩一、川崎幸彦、細矢光亮. ヌードマウス脳内に持続感染した麻疹ウイルスの検討. 第43回日本小児感染症学会総会学術講演会. 岡山市, 2011年10月30日.
- ② 渡部真裕、阿部優作、橋本浩一、川崎幸彦、細矢光亮. 膜融合蛋白（F蛋白）を標的とした新規ペプチドによる重急性硬化性全脳炎の新たな治療戦略. 第43回日本小児感染症学会総会学術講演会. 岡山市, 2011年10月30日.
- ③ 阿部優作、橋本浩一、細矢光亮. ヌードマウス脳内に持続した麻疹ウイルスの検討. 第16日本神経感染症学会総会. 東京, 2011年11月4日.

〔図書〕（計1件）

細矢光亮. 単純ヘルペス脳炎診療ガイドライン. In: 五十嵐隆/塩見正司・編 小児科診療ピクシス「急性脳炎・急性脳症」, 東京, 中山書店, 94-97頁, 2011年

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

該当なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細 矢 光 亮 (HOSOYA MISTUAKI)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：80192318

(2) 研究分担者

川 崎 幸 彦 (KAWASAKI YUKIHIKO)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00305369

橋 本 浩 一 (HASHIMOTO KOICHI)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50322342