

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011 ～ 2012  
 課題番号：23659523  
 研究課題名（和文） 病態解析を通じたH5N1高病原性鳥インフルエンザ治療法の確立  
 研究課題名（英文） Study on the treatment of highly pathogenic avian influenza H5N1 infections by means of the analysis of pathogenesis of the illness  
 研究代表者  
 森島 恒雄（MORISHIMA TSUNEO）  
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
 研究者番号：90157892

研究成果の概要（和文）：高病原性鳥インフルエンザ H5N1 の病態は、AH1N1pdm における重症肺炎及び多臓器不全を伴う脳症に近似していた。宿主の遺伝子発現を検討し、肺炎と脳症では発現する遺伝子に差が認められること、また、肺炎マウスモデルにおいて酸化ストレスによる障害と炎症の抑制が重要であり、チオレドキシン (TRX) がその両方に効果があることが判明した。これらは H5N1 ヒト重症例の治療における重要な知見と思われた。

研究成果の概要（英文）：

The pathogenesis of highly pathogenic avian influenza H5N1 in humans has been closely similar to those of severe pneumonia and influenza-associated encephalopathy with cytokine storm. Using microarray assay we have analyzed gene expression in the acute phase of 2009pdm infection. Interestingly, gene expression profiles were different between pneumonia patients and patients with CNS manifestations. Particularly, gene expression related to ROD has been highly activated.

Using mouse model, we have shown that thioredoxin-1 (TRX) could suppress the oxidative stress and inflammatory changes resulting better outcome in pneumonia with influenza virus infections.

Taking together, anti-oxidant stress agents such as TRX could play an important role in the severe pneumonia/ARD with H5N1 infections.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：小児感染症、中枢神経感染症

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：インフルエンザ、脳症、多臓器不全、肺炎、H5N1、新型インフルエンザ、サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

2009pdm における日本の感染人口あたりの致命率は世界の中で最も低いものであった。これは、「病態に基づいた」インフルエンザ治療および診療体制が著効した結果と思われる。一方、H5N1 など病原性の高いインフルエンザ、とくに ARDS など重症肺炎に対する病態解析・治療法は全く確立していない。世界的には H5N1 以外にも新たな新型インフルエンザの脅威が高まっている（米国 H3N2v 豚インフルエンザのヒト感染など）。詳細な病態解析の結果をもとに「病態に基づいた H5N1 高病原性鳥インフルエンザ治療法とくに ARDS など重症肺炎の治療法の確立」の研究は現在喫緊の課題である。

## 2. 研究の目的

「世界各地で散発的に発生し、未だ治療法がない H5N1 高病原性鳥インフルエンザ（H5N1）等の重症インフルエンザの治療法を、日本に侵入する前に確立しておく」ことが本研究の目的である。

そのために、

- (1)病態に共通点の多い 2009 インフルエンザ（以下、2009pdm）の宿主側反応（サイトカイン・ケモカイン・COX2 等）を詳細に解析し H5N1 の臨床像・病態と共通するメカニズムを見つける。
- (2)重症インフルエンザに対する特異的治療として、新しい可能性をもつレドックス制御機構が、2009 pdm 肺炎に果たす役割を検証し、H5N1 に応用可能かどうかを検討する。
- (3)以上から、重症インフルエンザ特異的治療の柱である①抗ウイルス薬、②抗サイトカイン・抗アポトーシス療法に加え、③レドックス制御の組み合わせなど H5N1 に有効な治療を明らかにする。
- (4)これらを可能であれば国立感染症病理部

との共同研究で、H5N1 感染マウスモデルで評価する。

## 3. 研究の方法

H5N1 感染に対するレドックス制御治療の効果（マウスモデル）：

現在、成人 ARDS での臨床応用されつつあるチオレドキシンの治療効果を、インフルエンザ感染マウスモデルで検討した。具体的には平成 23 年度：

インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおける、レドックス制御の関与の検討  
評価項目として生存曲線炎症性サイトカイン・ケモカイン（TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, KC, IL-12, IFN- $\gamma$  等）酸化還元マーカーなど。肺組織の免疫染色。

平成 24 年度：

インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおけるチオレドキシンの治療効果

最終的に、レドックス制御を含めた総合的治療効果の検証を行った。

2009pdm 合併症との関連が示された宿主遺伝子の作用機序について DNA マイクロアレイ法による解析を実施した。具体的には関連遺伝子（COX2, CNTNAP3,  $\alpha$ -シヌクレイン、SOD2 など）の重症インフルエンザ特に 2009 pdm における肺炎・中枢神経合併症における急性期遺伝子発現を検討した。

## 4. 研究成果

(1)マウスにおけるインフルエンザ肺炎においてウイルス増殖による直接の肺障害に加え、サイトカイン・ケモカインによる炎症（好中球が主体）と酸化ストレスによる組織障害が肺病変の進行に関与していることを示すことができた。

(2)これらの肺障害はチオレドキシシン (TRX)

により抑制され、マウスの致命率は改善した。また、この効果は抗炎症および抗酸化ストレスの両者にたいして認められた。

(3)2009pdmにおける小児の肺炎においてDNAマイクロアレイ解析により SOD-2(ミトコンドリア膜の antioxidant)関連遺伝子発現の増強が認められ、(1)の結果と一致していた。

(4)以上の結果から TRX を含む redox の制御薬は抗インフルエンザ薬との併用で H5N1 を含む重症インフルエンザの治療薬として応用可能と考えられ、今後の臨床応用が期待できる。

図1:現在推測されるH5N1重症化の機序

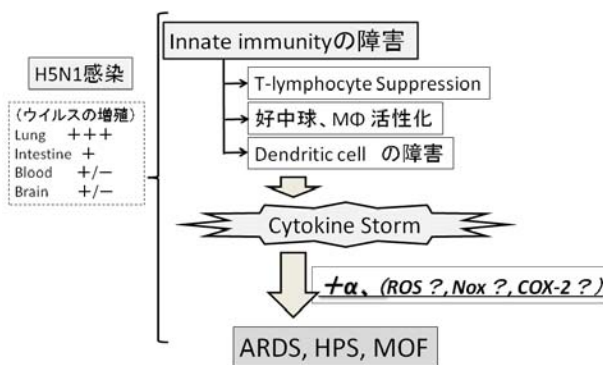


図2 重症新型インフルエンザ合併症で示された宿主関連遺伝子

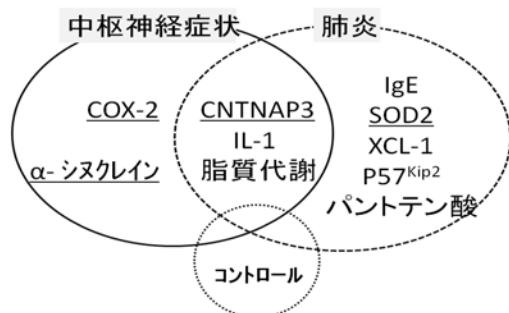
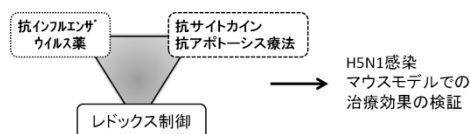


図3 重症インフルエンザの治療戦略



この治療戦略は、H5N1鳥インフルエンザなどにも応用が可能

## 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7件)

① Okada S, Hasegawa S, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Ikemoto K, Sasaki K, Toda S, Shirabe K, Takahara M, Harada S, Morishima T, Ichiyama T. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. Cytokine. 2013 Aug;63(2):194-200. doi: 10.1016/j.cyto.2013.04.035. Epub 2013 May 23.

② Yamashita N, Tsukahara H, Tsuge M, Nagaoka Y, Yashiro M, Saito Y, Fujii Y, Takashi O, Morishima T. Pathogenic mechanisms of influenza A(H1N1)pdm09 infection elucidated by gene expression profiling. Pediatr Int. 2013 May 23. doi: 10.1111/ped.12139. [Epub ahead of print]

③ Tsukahara H, Fujii Y, Matsubara K, Yamada M, Nagaoka Y, Saito Y, Yashiro M, Tsuge M, Goto S, Kitamura T, Hata A, Ichiyama T, Morishima T. Prognostic value of brain injury biomarkers in acute encephalitis/encephalopathy. Pediatr Int. 2013 Mar 11. doi: 10.1111/ped.12094. [Epub ahead of print]

④ Nakatsukasa Y, Tsukahara H, Tabuchi K, Tabuchi M, Magami T, Yamada M, Fujii

Y, Yashiro M, Tsuge M, Morishima T. Thioredoxin-1 and oxidative stress status in pregnant women at early third trimester of pregnancy: relation to maternal and neonatal characteristics. J Clin Biochem Nutr. 2013 Jan;52(1):27-31. doi: 10.3164/jcfn.12-71. Epub 2012 Oct 24.

⑤ Yashiro M, Tsukahara H, Matsukawa A, Yamada M, Fujii Y, Nagaoka Y, Tsuge M, Yamashita N, Ito T, Yamada M, Masutani H, Yodoi J, Morishima T. Redox-active protein thioredoxin-1 administration ameliorates influenza A virus (H1N1)-induced acute lung injury in mice. Crit Care Med. 2013 Jan;41(1):171-81. doi: 10.1097/CCM.0b013e3182676352.

⑥ Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Muguruma T, Saito O, Fujimoto JI, Toida C, Kuga S, Imamura T, Shimizu T, Kondo N, Morishima T. Unexpected cardiopulmonary arrest associated with influenza: our experience during the 2009 pandemic in Japan. Influenza Other Respi Viruses. 2012 Nov 5. doi: 10.1111/irv.12032. [Epub ahead of print]

⑦ Kawashima H, Morichi S, Okumura A, Nakagawa S, Morishima T. National survey of pandemic influenza A (H1N1) 2009-associated encephalopathy in Japanese children. J Med Virol. 2012 Aug;84(8):1151-6. doi: 10.1002/jmv.23317.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森島 恒雄 (MORISHIMA TSUNEO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
教授  
研究者番号：90157892

### (2) 研究分担者

塚原 宏一 (TSUKAHARA HIROKAZU)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
准教授  
研究者番号：90207340

山下 信子 (YAMASHITA NOBUKO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
助教  
研究者番号：40379798

### (3) 連携研究者

(なし)