

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08278

研究課題名(和文) 自然免疫炎症メディエーターをターゲットとしたインフルエンザ脳症の新規治療の探索

研究課題名(英文) Search for new treatments for influenza associated encephalopathy targeting innate immune mediators

研究代表者

津下 充 (TSUGE, MITSURU)

岡山大学・医歯薬学域・講師

研究者番号：80625004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍壊死因子(TNF-)によるヒト脳血管内皮細胞の透過性亢進をHigh mobility group box-1(HMGB-1)モノクローナル抗体が抑制しうるか検討した。TNF- 刺激後に脳血管内皮透過性は亢進し、細胞の紡錘状変形、細胞間隙の増加、F-アクチン形成の増加、タイトジャンクション分子であるVEカドヘリン蛋白量の減少を認めた。抗HMGB-1抗体の存在下で有意に血管透過性亢進は抑制され、細胞間隙の増加とVEカドヘリン蛋白の減少は抑制された。また、TNF- 刺激によって増加した上清中の炎症性サイトカインであるIL-6やIP-10濃度は、抗HMGB-1抗体の存在下で有意に抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザ脳症における脳浮腫・脳血管透過性亢進のメカニズムと自然免疫分子であるHMGB-1分子の関与について検討した。HMGB-1分子を中和するモノクローナル抗体によって、サイトカインによる脳血管内皮細胞の血管透過性亢進や細胞形態の変化、細胞間にあるタイトジャンクション分子と呼ばれる蛋白の減少を抑制することを明らかにした。インフルエンザ脳症の新規治療として抗HMGB-1モノクローナル抗体の有効性を説明しうる研究成果を得た。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether high mobility group box-1 (HMGB-1) monoclonal antibody could suppress the increase in vascular permeability of human primary cerebral vascular endothelial cells by tumor necrosis factor (TNF-). After TNF- stimulation, vascular permeability was significantly enhanced, and cell spindle-like deformation, increased intercellular space, increased F-actin formation, and decreased amount of VE-cadherin protein, which is a tight junction molecule, were observed. In the presence of anti-HMGB-1 antibody, vascular hyperpermeability was significantly suppressed, and the increase in intercellular space and the decrease in VE-cadherin protein were significantly suppressed. The concentrations of IL-6 and IP-10, which are inflammatory cytokines in the supernatant, increased by TNF- stimulation were significantly suppressed in the presence of anti-HMGB-1 antibody.

研究分野：小児感染症

キーワード：脳血管内皮細胞 インフルエンザ脳症 脳浮腫 自然免疫 サイトカイン タイトジャンクション 腫瘍壊死因子-

## 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザ脳症は小児に多く発症し、インフルエンザ感染を契機にけいれん重積や意識障害・異常言動等を伴って発症する。インフルエンザ脳症ガイドラインの普及と抗インフルエンザ薬やステロイドパルス療法の有効性によって、約30%であった死亡率は10%前後まで改善した。しかし、現在もなお死亡例や重度後遺症に至るケースがあり、さらに、2009年に起きた新型インフルエンザパンデミックで小児インフルエンザ脳症患者数も増加を認めた。インフルエンザ脳症の病態解明と神経学的予後の改善を目指す新規治療薬の開発は喫緊の課題である。

インフルエンザ脳症の病態は、気道または肺胞上皮へのインフルエンザ感染によって宿主の過剰な免疫反応が起きることで、高サイトカイン血症が引き起こされ、脳血液関門の障害や神経細胞障害が起きると考えられている。

現在までの研究によって、インフルエンザ脳症の患者血清ではTNF- $\alpha$ やIL-6、IL-1 $\beta$ といった炎症性サイトカインの値が高値であることが報告されている (Ichiyama T, et al. *Pediatr Infect Dis J.* 2007;26:542-4)。また、高TNF $\alpha$ モデル血症マウスでは脳血管透過性が亢進することが示されている (Tsuge M et al. *Microbiol Immunol.* 2010;54:417-424.)。インフルエンザ脳症の病態には、特に血液中のTNF- $\alpha$ の増加が大きく関与している。

近年の臨床研究でインフルエンザ脳症患者の血清でHigh Mobility Group Box-1 (HMGB-1) 蛋白が高値であることが報告された (Momonaka H, et al. *Brain Dev.* 2014;36:484-488.)。HMGB-1は主に核内に存在し、炎症刺激や細胞死に伴って、細胞外にまで放出される。自然免疫受容体によって認識され、炎症性サイトカインを誘導し、近年、敗血症や自己免疫疾患などのバイオマーカーとして知られ、治療応用の標的としても注目されている。

脳梗塞や脳外傷・てんかんモデルマウスでは、神経細胞の障害によりHMGB-1が放出され、ミクログリアが活性化した結果、TNF- $\alpha$ が産生され脳血管透過性が亢進するメカニズムが明らかになりつつある。さらに、インフルエンザ脳症様モデルマウスにHMGB-1を中和するモノクローナル抗体を投与すると、血清中の炎症性サイトカインが減少し脳血管透過性の亢進が抑制され、さらに脳血管透過性亢進に寄与するMatrix metalloproteinase-9 (MMP-9)の遺伝子発現増加が抑制されることを明らかにされている (Nosaka N et al, *J Med Virol.* 2018 90:1192-1198.)。

インフルエンザ脳症の新たな治療戦略の一つとして、HMGB-1をターゲットとした治療が注目されており、HMGB-1がインフルエンザ脳症の脳血管透過性亢進にどのように関与するかを明らかにすることが必要であると考えられた。

## 2. 研究の目的

インフルエンザ脳症における高TNF- $\alpha$ 血症と脳血管透過性亢進のメカニズムと、HMGB-1の関与を明らかにすることを目的とした。ヒト初代脳血管内皮細胞を用いたトランスウェルシステムを構築し、TNF- $\alpha$ による刺激によるHMGB-1の分泌と血管透過性の変化、およびタイトジャンクション分子の発現変化を明らかにする。また、抗HMGB-1モノクローナル抗体を用いた中和による血管透過性亢進の抑制効果について明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

初代ヒト脳微小血管内皮細胞 (HBMEC) (Cell Systems 社) をコラーゲン1コーティングされた培養容器で培養し、完全培地で維持した。HBMECは、4~9継代で実験に使用した。HBMECへのTNF- $\alpha$ 刺激は、10 ng/mlのヒト組換えTNF $\alpha$  (PeproTech 社) で24時間行なった。抗HMGB-1モノクローナル抗体は50  $\mu$ g/mlの濃度でTNF- $\alpha$ 刺激1時間前に添加した。

細胞生存率: MTT Cell Proliferation Assay Kit (Trevigen 社) を使用して測定した。

血管内皮細胞透過性: HBMECをラットコラーゲンIコーティングされたトランスウェルインサート (孔径0.4 mmのポリエチレンテレフタレートフィルター) の内面に、インサートあたり50,000細胞数で播種し、コンフルエントに達するまで培養した。上部および下部チャンバーの培地を、抗HMGB1モノクローナル抗体 (岡山大学薬理学教室より供与) またはコントロール抗体を含む0.5%BSAを含む無血清培地と交換し1時間処理後、50  $\mu$ g/mlのHMGB-1モノクローナル抗体またはコントロール抗体を含む10ng/mlのTNF- $\alpha$ が添加された培地に交換し24時間刺激した。フルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識デキストラン (MW, 40,000; Molecular Probes 社) を新しいアッセイバッファーに最終濃度1 mg/mlで添加し、上部チャンバーの培地と交換した。37°Cで2時間培養後に下部チャンバーの培地を収集し、蛍光測定した。

免疫蛍光染色: HBMECをコラーゲンIコーティングされた培養スライド (AGC TECHNO GLASS 社) 上で培養しTNF- $\alpha$ 刺激後、細胞を無血清培地で洗浄し、4.0%パラホルムアルデヒドで15分間固定した。0.3%Triton X-100で10分間透過処理後、細胞を洗浄し、一次抗体 (ウサギ抗HMGB1抗体、ウサギ抗VEカドヘリン抗体) で一晩インキュベートした。洗浄後、Alexa Fluor 488標識ヤギ抗ウサギまたは抗マウス二次抗体で室温1時間反応させた。核は、DAPIで染色した。サンプルは、BZ画像解析ソフトウェアアプリケーションを使用して、蛍光顕微鏡 (BZ-9000 ジェネ

レーション II; キーエンス株式会社) で評価した。

定量的逆転写 PCR: RNeasy Mini Kit (Qiagen 社) を用いて、トータル RNA を抽出した。cDNA 合成は、Primescript cDNA Synthesis kit (タカラバイオ社) を使用した。PowerUp SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems 社) を使用して増幅しました。リアルタイム PCR システム 7500 (Applied Biosystems) を使用して、cDNA を 50° C で 2 分間および 95° C で 2 分間変性させた後、95° C で 15 秒間および 60° C で 1 分間を 40 サイクル増幅した。GAPDH を内因性コントロールとして使用し、相対定量 (2<sup>-ΔΔCt</sup>) 分析法を使用して遺伝子発現量を測定した。

酵素免疫測定 (ELISA): TNF-α で刺激後の上清を回収し、HMGB1、IL-6、GM-CSF、IP-10、RANTES、MCP-1、および IL-8 を市販の ELISA キットを使用して測定した。

白血球接着アッセイ: ヒト単球性白血病細胞株 (THP-1) 細胞は 10% ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培地で 5% CO<sub>2</sub>、37° C で培養維持した。THP-1 細胞を 2 μM カルセイン-AM で染色し、TNF-α で刺激後の HBMEC 細胞にカルセイン-AM で染色した THP-1 細胞を播種し、37° C で 90 分間インキュベートした。非接着性 THP-1 細胞を新鮮な培地で洗い流し溶解緩衝液 (1% Triton X-100) を加え、蛍光測定した。

統計分析: GraphPad Prism ソフトウェアバージョン 8.0 (GraphPad Software 社) を使用した。グループ間の統計的比較は、一元配置分散分析 (ANOVA) とそれに続くテューキーの多重比較検定によって検定した。

#### 4. 研究成果

(1) HBMEC における HMGB-1 受容体 TLR-2、TLR-4、および RAGE の発現

HMGB-1 受容体である TLR-2、TLR-4 および RAGE がヒト脳微小血管内皮細胞で発現することを蛍光免疫染色によって確認した。血管内皮細胞マーカーである PECAM-1 もまたヒト脳血管内皮細胞の大部分で発現していた。

(2) TNF-α 刺激による HBMEC からの HMGB-1 の分泌

10 ng/ml の濃度の HBMEC で TNF-α を刺激後、上清中の HMGB-1 の濃度が有意に増加した。さらに、TNF-α (10 ng / ml) による刺激は、経時的に上清中の HMGB1 濃度を有意に増加させた。

(3) TNF-α 刺激による HMGB1 の細胞質移行の有無

TNF-α 刺激がない場合、HMGB-1 は HBMEC 細胞の核に局在していた。TNF-α (10 ng/ml) 刺激 3、6、12、24 時間後のいずれも HMGB1 の細胞質移行は観察されなかった。

(4) 細胞生存率

HMGB-1 モノクローナル抗体 (50 μg / ml) または TNF-α (10 ng / ml) で 24 時間処理しても、HBMEC 細胞の細胞生存率に影響を与えなかった。

(5) HMGB-1 モノクローナル抗体による脳血管内皮透過性の亢進抑制 (図 1)

TNF-α (10 ng / ml) の刺激 24 時間後に、FITC デキストランの漏出量は有意に増加した。HMGB-1 モノクローナル抗体の存在下 (50 μg/ml) で、TNF-α 刺激による血管透過性の増加が有意に抑制された。HMGB-1 モノクローナル抗体単独では HBVEC の透過性は変化しなかった。

ポイデンチャンパー法を用いた脳血管内皮透過性測定

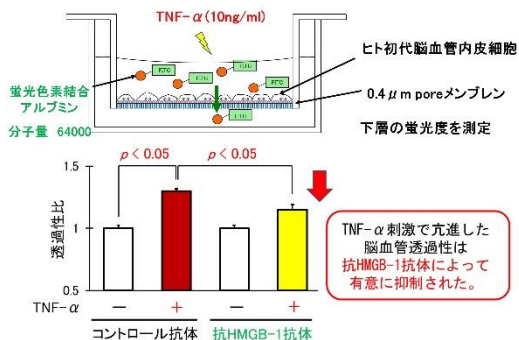


図 1

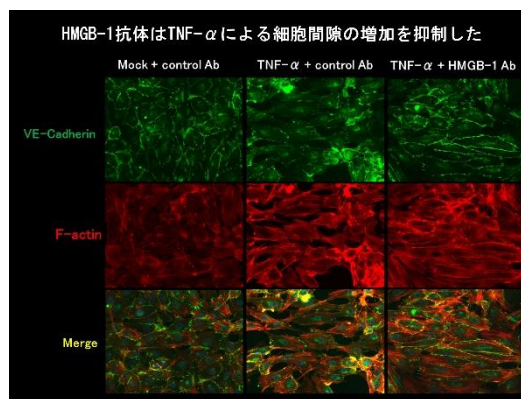


図 2

(6) HMGB-1 モノクローナル抗体による HBMEC の紡錘形変化・細胞間隙の増加の抑制 (図 2)  
無刺激で HBMEC は細胞間隙をほとんど認めないが、TNF-α 刺激 (10 ng/ml、24 時間) で紡錘形変化を示し、細胞間隙が拡大した。HMGB-1 モノクローナル抗体単独では、正常細胞の形状は変化しなかった。HMGB-1 モノクローナル抗体 (50 μg / ml) の存在下では、紡錘形変化の抑制と、細胞間隙の減少を認めた。

(7) HMGB-1 モノクローナル抗体によるストレスファイバー増加の抑制 (図 2)

無刺激では、HBMEC は細胞質の周りに F-アクチンの染色を認め、HMGB-1 モノクローナル抗体単独では F-アクチンの分布は変化なかった。TNF-α 刺激によって、特に細胞中央領域で F-アクチンの増加を認めた。TNF-α 刺激後の F-アクチンの分布変化は、HMGB-1 モノクローナル抗体によって阻害されなかった。

(8) HMGB-1 モノクローナル抗体による VE-カドヘリン発現低下の抑制 (図 2・3)

無刺激では VE-カドヘリンは主に細胞膜に存在し、TNF- $\alpha$  刺激によって HBMEC の細胞膜上の VE-カドヘリンの蛍光強度の低下を認め VE-カドヘリンの蛋白量の有意な減少を認めた。TNF- $\alpha$  刺激後、VE-カドヘリン遺伝子発現は低下しなかった。HMGB-1 モノクローナル抗体単独では、VE-カドヘリン蛋白の局在と発現は変化しなかった。HMGB-1 モノクローナル抗体存在下では、TNF- $\alpha$  刺激による VE-カドヘリン蛋白の分布変化と減少が有意に抑制された。

HMGB-1抗体はTNF- $\alpha$ によるVEカドヘリンの減少を抑制した

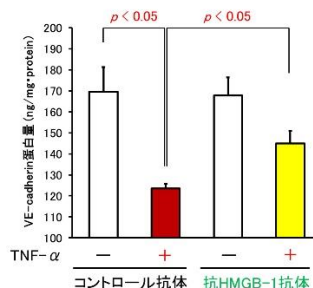


図 3

HMGB-1抗体はTNF- $\alpha$ 刺激に伴うIL-6増加を抑制した

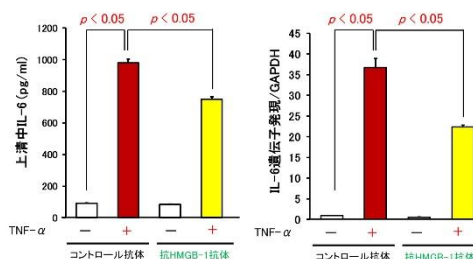


図 4

(9) HMGB-1 モノクローナル抗体によるサイトカイン産生の増加抑制 (図 4)

上清中の IL-6、GM-CSF、IP-10、RANTES、MCP-1、IL-8 の濃度は TNF- $\alpha$  刺激後に有意に増加した。HMGB-1 モノクローナル抗体の存在下で上清中の IL-6 および IP-10 濃度の増加は、コントロール抗体存在下と比較して有意に抑制された。さらに、HBMEC における IL-6 および IP-10 の遺伝子発現量は TNF- $\alpha$  刺激後に有意に増加し、これらの遺伝子の発現増加は HMGB-1 モノクローナル抗体の存在下で対照抗体と比較して有意に抑制された。

以上の研究成果より、ヒト脳血管内皮細胞への TNF- $\alpha$  刺激に対する HMGB-1 モノクローナル抗体の①血管内皮透過性の抑制効果②サイトカイン産生抑制効果を明らかにした。インフルエンザ脳症の病態の一つである高サイトカイン血症による脳血管透過性亢進・脳浮腫形成において、HMGB-1 の関与を裏付ける成果であり、HMGB-1 をターゲットとした抗体医薬による治療がインフルエンザ脳症の新規治療の候補になる可能性が示唆された。今後もさらに抗 HMGB-1 モノクローナル抗体の有効性について基礎実験を進めていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Namba Takahiro, Tsuge Mitsuru, Yashiro Masato, Saito Yukie, Liu Keyue, Nishibori Masahiro, Morishima Tsuneo, Tsukahara Hirokazu	4. 巻 70
2. 論文標題 Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody suppressed hyper-permeability and cytokine production in human pulmonary endothelial cells infected with influenza A virus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inflammation Research	6. 最初と最後の頁 1101 ~ 1111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00011-021-01496-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 津下 充, 茂原 研司, 斎藤 有希恵, 八代 将登, 塚原 宏一
2. 発表標題 インフルエンザA(H1N1)pdm09による急性呼吸窮迫症候群に対して体外式膜型人工肺とペラミビル・パロキサビルマルボキシル併用療法で改善した一例
3. 学会等名 第52回日本小児感染症学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 難波貴弘, 津下充, 八代将登, 塚原宏一, 森島恒雄
2. 発表標題 肺血管内皮細胞を用いた重症インフルエンザ肺炎モデルの構築と high mobility group box 1抗体による肺血管透過性亢進の抑制効果
3. 学会等名 第61回日本臨床ウイルス学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津下 充, 難波貴弘, 西堀正洋, 斎藤有希恵, 八代将登, 塚原宏一, 森島恒雄
2. 発表標題 ヒト脳血管内皮細胞を用いた高サイトカイン血症モデルにおけるhigh mobility group box-1抗体の血管透過性抑制効果
3. 学会等名 第51回日本小児感染症学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Tsuge M, Yashiro M, Ohno N, Tsukahara H, Fujita J	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 229
3. 書名 Influenza: Advances in Diagnosis and Management	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------