

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20611013

研究課題名(和文) 解熱剤ジクロフェナクの致死性解析を起点とした低副作用化合物のケミカルバイオロジー

研究課題名(英文) The chemical biology of low side effects compound in anti-fever drugs, which is derived from the analysis about fatal function by diclofenac.

研究代表者

矢野 仁康 (YANO MIHIRO)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・准教授

研究者番号：40304555

研究成果の概要(和文)：インフルエンザ脳症を誘発する解熱剤(ジクロフェナク)の作用機序を明らかにするため、脳浮腫の原因として重要な血管内皮細胞間タイトジャンクション(TJ)障害に与える影響を検証した。その結果、インフルエンザウイルスに感染した血管内皮細胞内では、ウイルスによるZO1等の裏打ち蛋白質の局在変化とその分解促進によるTJの崩壊が誘導されている事、一方、ジクロフェナクは、これとは別に、裏打ち蛋白質の合成そのものを阻害することで、インフルエンザ感染による血管内皮細胞間タイトジャンクション障害を促進している事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanisms of influenza encephalitis induced by diclofenac, we examined the effect of influenza virus and diclofenac on the disruption of tight junction (TJ) in human vascular endothelial cells *in vitro*. In this study, we found that influenza virus induced the degradation of TJ proteins, such as ZO1, leading to its disruption. On the other hands, diclofenac by itself inhibited the synthesis of TJ proteins, consequently accelerating the disruption of TJ induced by influenza infection in vascular endothelial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：時限

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：インフルエンザウイルス、ジクロフェナクナトリウム、ウイルス放出障害、インフルエンザ脳症、解熱剤

1. 研究開始当初の背景
インフルエンザ感染は特に小児でしばしば重篤化するが、脳症と肝不全を特徴とするラ

イ症候群が、解熱剤投与によって発症する事が知られており、小児では解熱効果の強いアスピリン、ジクロフェナク、メフェナム酸は

近年その投与が禁忌とされている。現状では、これら解熱剤によるライ症候群の発症機序が不明な事から、解熱効果の低いアセトアミノフェンに頼らざる事から、安全性の高い解熱剤の開発が望まれている。本研究は、インフルエンザ感染における、これら解熱剤の細胞毒性の詳細な分子論的解析から、安全で効果の高い解熱剤の基本骨格の解明に至るケミカルバイオロジー研究である。

2. 研究の目的

インフルエンザ脳症は、主に小児の感染で問題となる重篤な合併症の一つである。インフルエンザ脳症に特徴的な急性壊死性脳症は、脳血管透過性の亢進(血液脳関門を構成する脳微小血管内皮細胞(HBMEC)の膜透過性亢進による)に基づく脳浮腫と、これによって引き起こされる2次的な神経細胞障害がその原因と考えられている。脳症を引き起こす一つの要因として、解熱剤の非ステロイド系の抗炎症剤(NSAIDs)で起こるライ症候群での急性壊死性脳症があるため、現在ではその投与は禁忌となっている。一方、当教室でのこれまでの研究から、インフルエンザの高熱持続が、熱不安定性遺伝子多型を有する患者において、ミトコンドリアでの脂肪酸代謝障害を介する全身のエネルギー危機を引き起こし脳症発症に繋がる事が明らかとなった事から、これらの患者では解熱剤の処方不可欠となる。そこで本研究では、これまでの研究成果に基づき、インフルエンザ感染に伴う発熱でのNSAIDsの併用を念頭に、脳症発症に重要な脳浮腫を引き起こす原因となる、これらファクターの血管内皮細胞の透過性亢進機構について分子レベルで解析を行う事を目的とする。

3. 研究の方法

インフルエンザ感染及び脳症を誘発するNSAIDs(ジクロフェナック)の、血管内皮細胞間タイトジャンクション障害機序について、human umbilical vein endothelial cells(HUVEC)を用いたin vitro解析システムで解析を行った。HUVECを用い、インフルエンザウイルスH1N1(PR8)株を感染後(タイター 10^8 pfu/ml)、 $200 \cdot M$ ジクロフェナック存在および非存在下で24時間培養を行い、Z01, Z02等のタイトジャンクション構成蛋白質に与える影響を検討した。一方、プロテアソームによるTJ蛋白質の分解誘導効果を検証するため、ウイルス感染後、 $2 \cdot M$ ラクタシスチン存在下で24時間培養を行った。尚、今回、発熱を考慮した細胞への熱ストレス効果をみるため、感染後、細胞を生理的な発熱温度(3

9度)で0~6時間処理を行い解析を行った。

4. 研究成果

インフルエンザウイルスに感染した血管内皮細胞内では、ウイルスによるZ01, Z02等の裏打ち蛋白質のプロテアソーム分解促進に基づくタイトジャンクションの崩壊が誘導されている事、又、ジクロフェナックは、これとは別に、裏打ち蛋白質の合成そのものを阻害することで、インフルエンザ感染による血管内皮細胞間タイトジャンクション障害を促進している可能性が考えられた。一方、 $39 \sim 40^{\circ}C$ の熱ストレスは、血管内皮細胞間のタイトジャンクション崩壊に影響を与えなかった。

<結果>

(1) インフルエンザウイルス感染のタイトジャンクション(TJ)構成蛋白質に与える影響

① TJ(蛋白質)に与える影響

ウエスタンブロッティングによる解析で、PR8(moi1.0)感染でHUVECにおける著明なZ01及びZ02の蛋白質の発現量低下が認められた。一方、HUVECでは、occludin, claudinIの発現量はいずれも検出感度以下のため、その蛋白質発現に与える影響の解析は困難と考えられた。

②TJ(RNA)に与える影響

RT-PCRによる解析では、PR8(moi1.0)感染は、HUVECにおけるZ01及びZ02のmRNAの発現には全く影響を与える事がなかった。Z01, Z02蛋白質の発現量低下は、ウイルス感染によってこれら蛋白質の分解が促進されている可能性が事が考えられた。

③インフルエンザウイルスによるTJ裏打ち蛋白質の分解促進

HUVECを、 $2 \cdot M$ ラクタシスチン存在下でウイルス感染(12h)を行い、Z01, Z02の発現量に与える影響をウエスタンブロッティングで解析した。ラクタシスチン存在下では、ウイルス感染によるZ01, Z02の発現低下が完全に抑制された事により、インフルエンザウイルスは、血管内皮細胞内のTJ裏打ち蛋白質であるZ01, Z02分解を誘導している事が明らかとなった。

(2)ジクロフェナックのタイトジャンクション(TJ)構成蛋白質に与える影響

① TJ (蛋白質) に与える影響

ウエスタンブロッティングによる解析で、ジクロフェナック (200・M) でHUVECにおける著明なZ01及びZ02の蛋白質の発現量低下が認められた。

② TJ (RNA) に与える影響

RT-PCRによる解析では、ジクロフェナック (200・M) 処理でHUVECにおける著名なZ01及びZ02のmRNAの発現量低下が認められたことから、ジクロフェナックによるZ01, Z02の発現量低下は、これら蛋白質の合成阻害によるものと考えられた。

(3) 熱ストレス (発熱) のタイトジャンクション構成蛋白質に与える影響

これまでの解析で、HUVECに41度以上 (41, 43度) の熱ストレスを加えるとその処理時間に依存して著明なZ01の発現低下が認められたが、39度の熱処理ではZ01, Z02の発現低下は全く認められなかった。これらの結果より、インフルエンザ感染に伴う生理的な発熱は、血管内皮細胞間のタイトジャンクション崩壊に殆ど影響を与えないと考えられた。

(4) インフルエンザウイルス感染とジクロフェナックのタイトジャンクション崩壊に与える相乗効果

インフルエンザウイルス感染もしくはジクロフェナックは、各々その機序は異なっても、単独で血管内皮細胞内のZ01, Z02の崩壊を促進していた。それ故、これらファクターの相乗効果による血管内皮細胞間タイトジャンクション崩壊が、ジクロフェナックによるインフルエンザ脳症誘発に関与している可能性が考えられた。

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 10 件)

- ① H-Y Pan, H Yamada, J Chida, S Wang, M Yano, M Yao, H Kido. Up-regulation of ectopic trypsins in the myocardium by influenza A virus infection triggers acute myocarditis. *Cardiovascular Research*. 89 (3): 595-603, 2011. 査読有
- ② H-Y Pan, M Yano, H Kido. Effect of inhibitor

of Toll-like receptors, protease-activated receptor-2 signaling and trypsin on influenza

A virus replication and upregulation of cellular factors in cardiomyocytes.

The

Journal of Medical Investigation 58, 1.2: 19-28, 2011. 査読有

- ③ S Wang, TQ Le, N Kurihara, J Chida, Y Cisse, M Yano, H Kido. Influenza Virus-Cytokine-Protease Cycle in the Pathogenesis of Vascular Hyperpermeability in Severe Influenza. *Journal of Infectious Disease* 202, 7, 991-1001. 2010. 査読有
- ④ Y Okumura, E Takahashi, M Yano, M Ohuchi, T Daidoji, T Nakaya, W Gaten, HD Klenk, H Kido. Novel Type II Transmembrane Serine Proteases, MSPL and Tmprss 13, Proteolytically Activate Membrane Fusion Activity of the Hemagglutinin of Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses and Induce Their Multicycle Replication. *Journal of Virology* 84, 10, 5089- 5096. 2010. 査読有
- ⑤ S Wang, T Quang Le, J Chida, Y Cisse, M Yano, H Kido. Mechanisms of matrix metalloproteinase-9 upregulation and tissue destruction in various organs in influenza A virus infection. *J Med Investigation*. 57, 1, 2, 26-34. 2010. 査読有
- ⑥ Takahashi E, Kataoka K, Fujii K, Chida J, Mizuno D, Fukui M, Hiro-O Ito, Fujihashi K, Kido H. Attenuation of inducible respiratory immune responses by oseltamivir treatment in mice infected with influenza A virus.
- ⑦ Cissé Y, Wang S, Inoue I, Kido H. Rat model of influenza-associated encephalopathy (IAE): studies of electroencephalogram (EEG) in vivo. *Neuroscience*. 165(4):1127-37. 2010. 査読有
- Microbes Infect*. 12(10):778-83. 2010. 査読有
- ⑧ Sawabuchi T, Suzuki S, Iwase K, Ito C, Mizuno D, Togari H, Watanabe I, Talukder SR, Chida J, Kido H. Boost of mucosal secretory immunoglobulin A response by clarithromycin in paediatric influenza. *Respirology*. 14(8):1173-9. 2009. 査読有

- ⑨ H Kido, Y Okumura, E Takahashi, H-Y Pan, S Wang, T Quang Le, M Yano. Host envelope glycoprotein processing proteases are indispensable for entry into human cells by seasonal and highly pathogenic avian influenza viruses. *J Mol and Gene Med* 3, 1, 167-175. 2009.. 査読有
- ⑩ Nishino M, Mizuno D, Kimoto T, Shinahara W, Fukuta A, Takei T, Sumida K, Kitamura S, Shiota H, Kido H. Influenza vaccine with Surfacten, a modified pulmonary surfactant, induces systemic and mucosal immune responses without side effects in minipigs. *Vaccine*. 18;27(41):5620-7. 2009. 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 矢野仁康、木戸博 熱ストレスによる腸管上皮細胞間タイトジャンクションの崩壊機構 第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会、合同学会 神戸 2010年12月7日
- ② H Kido, J Chida, S Wang, H-Y Pan, M Yao. Influenza-Cytokine-Protease Cycle in the pathogenesis of vascular hyperpermeability in severe influenza and its possible treatments. 第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会、合同学会 神戸 2010年12月7日
- ③ 矢野仁康、木戸博 イブプロフェンは、Hsp70の発現量を低下させる事で、肺腺癌細胞に対するシスプラチンの抗腫瘍活性を増強する 第82回日本生化学会大会、神戸 2009年10月24日
- ④ 木戸博、王司擘、千田淳司、水野大、武井恒知 インフルエンザ感染重症化の分子基盤と粘膜局所での感染予防の最前線 第82回日本生化学会大会、神戸 2009年10月23日
- ⑤ M Yano, H Endo, H Kido. Ibuprofen Increases Cisplatin-induced Apoptosis in Lung Adenocarcinoma by Suppressing Hsp70. 第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会、合同学会 神戸 2008年12月12日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 仁康 (YANO MIHIRO)
 徳島大学・疾患酵素学研究センター・准教授
 研究者番号：40304555
 (H21 研究分担者→H22 研究代表者)

ユースフ シセ (YOUSOUF CISSE)

研究者番号：80437649
 徳島大学・疾患酵素学研究センター・研究員
 研究者番号：80437649
 (H20 研究分担者→H20.9月～H21 研究代表者)

山田 博司 (YAMADA HIROSHI)
 徳島大学・疾患酵素学研究センター・助教
 研究者番号：30343304
 (H20)

(2) 研究分担者

木戸 博 (KIDO HIROSHI)
 徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授
 研究者番号：50144978