

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15638

研究課題名（和文）インフルエンザ脳症の発症機序解明—感染症に伴う脳病変共通の治療法開発を目指して

研究課題名（英文）Pathogenesis of Influenza virus-associated encephalopathy

研究代表者

木村 志保子（Kimura-Ohba, Shihoko）

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教（常勤）

研究者番号：70824184

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：血管内皮細胞へのインフルエンザウイルスの直接感染とインフルエンザウイルス蛋白の蓄積がインフルエンザ関連脳症（IAE）の引き金となる。脳の血管内皮細胞に感染したウイルスが血管内皮細胞内に蓄積し、血管内皮細胞の壊死、破綻を引き起こすこと、加えて何等かの形でアストロサイトに感染し、ウイルス蛋白が蓄積して機能低下を引き起こすことにより、高度脳浮腫が出現する。この際、インフルエンザウイルスの複製は必ずしも必要ではなかった。この現象は、血管内皮細胞におけるウイルス蛋白の翻訳を早期に止めることにより治療が可能であったため、インフルエンザウイルスの転写翻訳を制御することが、IAE治療の要となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザ関連脳症（IAE）は明確な発症原因が不明で、根本的治療法も存在しない疾患でしたが、今回インフルエンザウイルスの脳の血管内皮細胞への直接感染とウイルス蛋白の内皮細胞への蓄積がIAEの発症原因になっていることがわかりました。

ウイルスが感染することとウイルス蛋白が大量に産生されることが脳症を引き起こし脳浮腫の進行を促進しているため、このウイルス蛋白の転写/翻訳を止める薬剤を投与したところ、予防投与では100%、時間差投与でも50%脳症の発症を抑制できました。脳内でのウイルス蛋白の産生を抑えることができれば、脳症の発症を予防/進行を防ぐことができますので、実際の診療に還元する予定です。

研究成果の概要（英文）：Influenza viral entry to brain endothelia and translation of viral protein in the endothelia provokes Influenza-associated encephalopathy (IAE). Viral protein accumulation in brain endothelia induced endothelial necroptosis and this viral protein was also found in astrocytic cytoplasm and footprocess. Both endothelial necroptosis and astrocytic functional deterioration lead to blood brain disruption and severe vasogenic brain edema. This IAE pathogenesis, with severe brain edema caused by IAV, could be established without viral proliferation. Earlier inhibition of viral transcription and translation in brain endothelia improved lethality of IAE model mice. The regulation of viral transcription and translation is the key for the treatment of IAE.

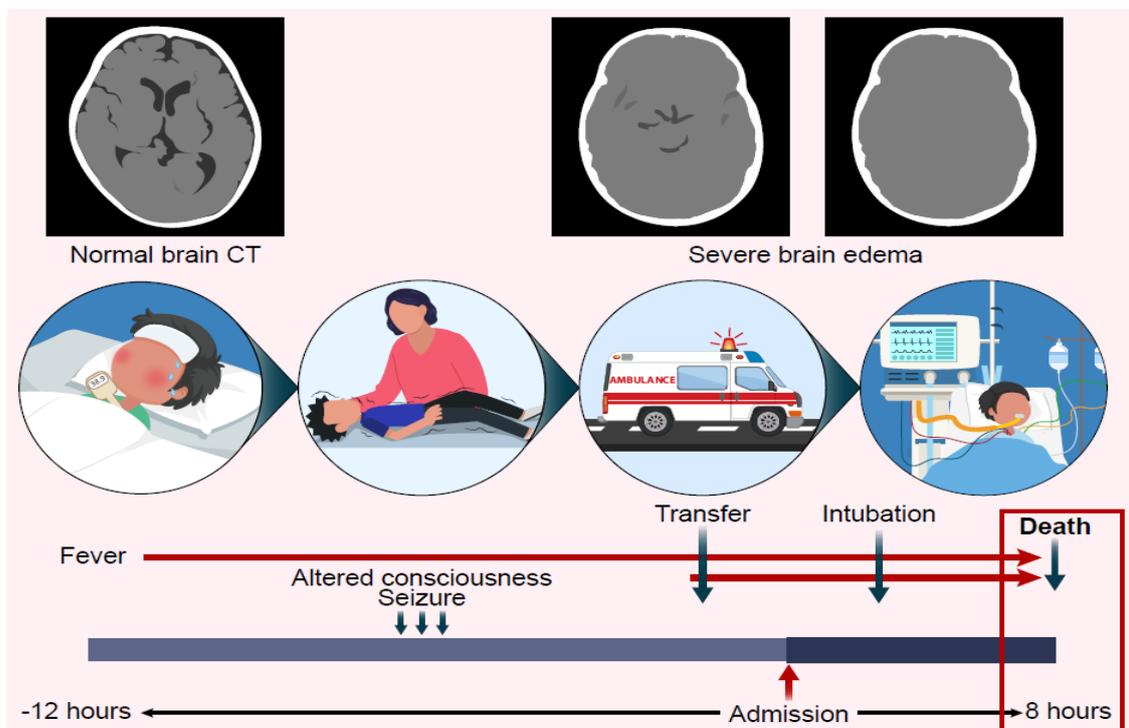
研究分野：小児神経学

キーワード：インフルエンザ脳症 脳血管内皮細胞 脳浮腫 インフルエンザウイルス ウイルス蛋白

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザ関連脳症 (IAE) は 20 世紀後半から東アジアで報告が相次ぎ、日本からも急性壊死性脳症 (ANE ; Mizuguchi et al 1998 脳と発達) 等多数の報告がなされた。IAE にはインフルエンザという名前が入っているが急性脳症としての原因はウイルス、その他の病原体を含め多岐にわたる。最近の二度目の日本の全国調査では、インフルエンザウイルスによるものが減り、より原因が多岐にわたるが、予後には大きな変化がなく軽症症例を含めても後遺症なしは 6 割未満であると報告されている (Kasai et al 2020 B&D)。IAE にはいくつかの型が存在し、重症例の多い「急性の臨床経過、びまん性脳浮腫、多臓器障害・血液障害をとめないやすい脳症」、痙攣重積型 (二相性) 脳症、MERS (可逆性脳梁膨大部病変を有する軽症脳炎・脳症)、その他に大きく分けられる (インフルエンザ脳症の診療戦略 ; 平成 30 年)。

IAE の研究は、東アジアからの報告が多かったため宿主因子としての遺伝子多型、autopsy 検体を用いた組織学的検討、そして画像的検討を含む治療介入から試行錯誤されてきた一方で、動物モデル作成は困難でありあまり検討されていなかった。組織学的には剖検例より、高度脳浮腫が認められるが脳からウイルス検出がないこと、炎症細胞の浸潤がないことが特徴とされるが、少数だが臓器からのウイルス検出の報告も存在する (Frankova et al 1977 Arch Virol; Nakano et al 1993 Neuropathol)。下図は最重症の IAE の典型的な経過を示したが、図に見られるように、IAE の経過はあまりにも急であり、臨床においても研究においても、所見を捉えることができてそれが原因なのか結果なのか判別が難しいことが研究する上での最大の問題であるため、本疾患の急性期を再現できる動物実験は非常に重要である。



申請者は臨床医として IAE を含む子供たちの診療にあたってきたが、IAE には抜本的な治療法がないためいくら手を尽くしても重度の障害が残るもしくは亡くなっていかれる子供達が多かった。そのため、次第に研究面からのアプローチの重要性を真剣に考えるようになり、基礎医学分野で神経分野、感染症分野の研究を開始するに至った。まず学振特別研究員 RPD として、

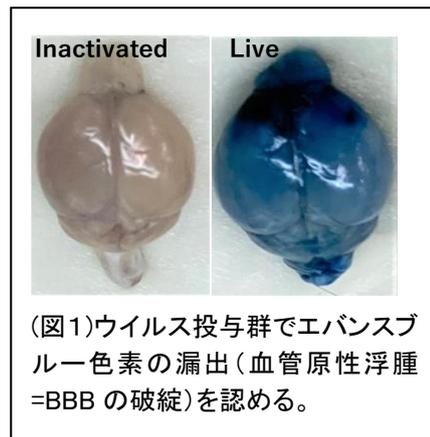
IAE の動物モデルを使用した研究を開始した。IAE 動物モデルの作成はほぼ終了し、組織学的検討やウイルス学的検討をすでに開始している。若手研究申請時は、関連病院との臨床研究を開始する準備をしておき、初年度よりヒト検体における検討を開始する予定である。動物モデルに関しては、時間経過を含めた検討を進め、メカニズムの解明に取り組んでいく予定である。

2. 研究の目的

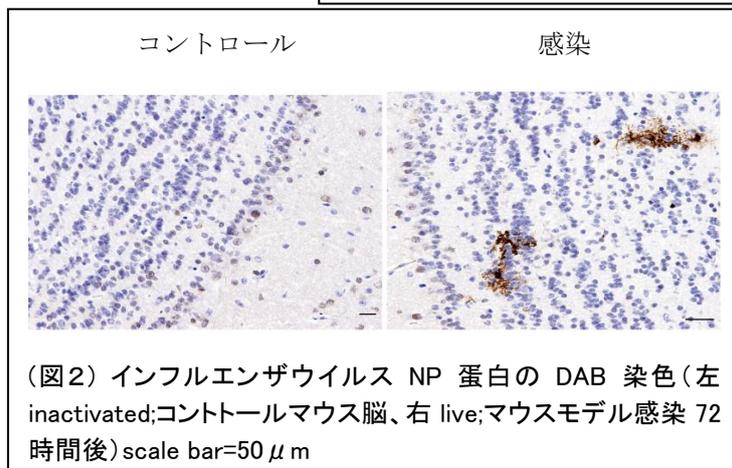
IAE モデル動物を利用して、ウイルス感染後から高度脳浮腫に至るまでのウイルス動態、それに関与する細胞、病態を探り、引き金になる発症因子を同定して IAE の治療法開発につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

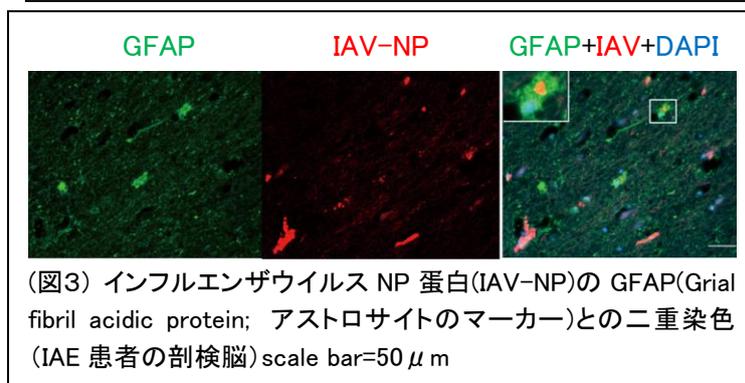
3 週齢の C57BL/6 マウスに量とルートを調整して、A 型インフルエンザウイルスを投与し、投与後 72 時間まで時系列で観察したところ、ウイルス投与後 48 時間以降より脳浮腫と神経学的所見を呈した (図 1)。組織学的には、びまん性脳浮腫、微小血栓・出血、血管透過性亢進、アストロサイトの突起断裂所見である clasmotodendrosis 等を認めた。またウイルス蛋白を脳血管内皮細胞やアストロサイトにびまん性に大量に認めた (図 2)。ただ、モデル動物脳に感染性のあるウイルス粒子はわずかに認める程度であった。ウイルス蛋白の脳からの検出は IAE 脳症患者脳でも同様の結果であった (図 3)。次にヒト血管内皮細胞由来の培養細胞のインフルエンザウイルスを感染させた。インフルエンザウイルスは血管内皮細胞に感染し、細胞死を誘導し、細胞内に多量のウイルス蛋白を検出したが、インフルエンザウイルスの増殖自体はモデル動物脳でわずかであったのと



(図1)ウイルス投与群でエバンスブルー色素の漏出(血管原性浮腫=BBBの破綻)を認める。



(図2) インフルエンザウイルス NP 蛋白の DAB 染色(左 inactivated;コントロールマウス脳、右 live;マウスモデル感染 72 時間後) scale bar=50 μm



(図3) インフルエンザウイルス NP 蛋白(IAV-NP)の GFAP(Grial fibril acidic protein; アストロサイトのマーカー)との二重染色 (IAE 患者の剖検脳) scale bar=50 μm

同様、培養細胞ではほとんど見られなかった。ウイルス蛋白のモデル動物脳への蓄積を認めたため、次に血管内皮細胞由来細胞とウイルス感染マウスへの抗インフルエンザ薬による介入試験を行った。培養血管内皮細胞とモデル動物の双方に有効であったのは RNA 転写と蛋白翻訳に効果がある薬剤のみであった。特に、モデルマウスに対しては、予防投与において死亡率を 100%、時間差投与(感染後 8 時間)においてはほぼ半数まで低下させ、脳症発症・進行の抑制に顕著な

効果を認めた。

4. 研究成果

本研究において、脳血管内皮細胞へのウイルスの直接感染がインフルエンザ関連脳症（IAE）の発症の引き金となることが判明した。インフルエンザ関連脳症の発症において、ウイルスの直接感染と RNA 転写や翻訳は必須であるが、ウイルスの増殖は必ずしも必要ではなかった。また、ウイルス蛋白の転写翻訳に関わる薬剤は本疾患に非常に効果的であることが判明した。

本研究を通して、インフルエンザ関連脳症においてウイルスの直接的な作用が発症に大きくかかわっていることが判明した。またウイルス蛋白の蓄積を抑制することで脳浮腫を予防することができることがわかったため、既存薬も含め、脳症の治療ができる可能性がでてきた。この成果は *Acta Neuropathologica* に掲載された (Kimura-Ohba et al 2024)。

治療薬の開発、またウイルス蛋白の細胞レベルでの病態への関与のメカニズムがまだ判明していないため、その亜急性期・慢性期への影響も含め、今後も研究を継続していく予定である。

1. Shihoko Kimura-Ohba, Mieko Kitamura et al. Viral entry and translation in brain endothelia provoke influenza-associated encephalopathy. *Acta Neuropathol.* 2024 Apr 30;147(1):77. doi: 10.1007/s00401-024-02723-z. 脳血管内皮細胞へのウイルスの直接感染とウイルス蛋白の蓄積はインフルエンザ関連脳症の発症の引き金となる。

2. Shihoko Kimura-Ohba, Yoshitsugu Takabatake, et al Blood levels of d-amino acids reflect the clinical course of COVID-19 *Biochemistry and Biophysics Reports* 34 (2023)101452 Doi.org/10.1016/j.bbrep.2023.101452

D アミノ酸の血中濃度は COVID-19 患者において重症化や回復におけるマーカーとなる。

3. Shihoko Kimura-Ohba, Masamitsu N Asaka, et al. Tomonori Kimura d-Alanine as a biomarker and a therapeutic option for severe influenza virus infection and COVID-19 *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2023 Jan 1;1869(1):166584. doi: 10.1016/j.bbadis.2022.166584.

d-Alanine は重症 Influenza virus 感染症や COVID-19 において biomarker かつ治療候補製剤になりうる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kimura-Ohba Shihoko, Asaka Masamitsu N., Utsumi Daichi, Takabatake Yoshitsugu, Takahashi Atsushi, Yasutomi Yasuhiro, Isaka Yoshitaka, Kimura Tomonori	4. 巻 1869
2. 論文標題 d-Alanine as a biomarker and a therapeutic option for severe influenza virus infection and COVID-19	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease	6. 最初と最後の頁 166584 ~ 166584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2022.166584	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 -

1. 著者名 Kimura-Ohba Shihoko, Takabatake Yoshitsugu, Takahashi Atsushi, Tanaka Yoko, Sakai Shinsuke, Isaka Yoshitaka, Kimura Tomonori	4. 巻 34
2. 論文標題 Blood levels of d-amino acids reflect the clinical course of COVID-19	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101452 ~ 101452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2023.101452	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 -

1. 著者名 Shihoko Kimura-Ohba, Mieko Kitamura, Yusuke Tsukamoto, Shigetoyo Kogaki 7, Shinsuke Sakai 6 5 8, Hiroaki Fushimi 9, Keiko Matsuoka 9 10, Makoto Takeuchi 10, Kyoko Itoh 11, Keiji Ueda 12, Tomonori Kimura 6 5 8	4. 巻 147
2. 論文標題 Viral entry and translation in brain endothelia provoke influenza-associated encephalopathy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00401-024-02723-z.	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shihoko Kimura-Ohba, Mieko Kitamura, Yusuke Tsukamoto, Shigetoyo Kogaki, Hiroaki Fushimi, Tomonori Kimura
2. 発表標題 脳血管内皮細胞へのウイルスの直接感染はインフルエンザ関連脳症の発症の引き金となる。
3. 学会等名 第65回 日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shihoko Kimura-Ohba, Mieko Kitamura, Yusuke Tsukamoto, Shigetoyo Kogaki, Hiroaki Fushimi, Keiji Ueda, Tomonori Kimura
2. 発表標題 脳血管内皮細胞へのウイルスの直接感染はインフルエンザ関連脳症の発症の引き金となる。
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2023年

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

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