

## 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25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591179

研究課題名（和文）小児ウイルス関連脳症におけるチオレドキシン（レドックス制御）の役割

研究課題名（英文）The role of thioredoxin-1 administration to severe influenza A virus infection.

## 研究代表者

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

## 研究成果の概要（和文）：

レドックス制御（酸化ストレス）に関連するチオレドキシン蛋白（Thioredoxin, TRX）がインフルエンザ感染に果たす影響を検討した。【結果】インフルエンザウイルス感染(A/PR8、致死量)モデルマウスに、感染前日から TRX 投与すると、生存率が約 40%向上した。その原因は、肺炎の改善であった。インフルエンザ感染 4 時間後に投与開始した場合には生存率の差はなく、感染前の「肺のレドックス制御」の重要性が示された。

研究成果の概要（英文）：Extragenous preventive administration of recombinant human thioredoxin-1 significantly improved the survival rate and attenuated lung histological change in the murine model of influenza pneumonia.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012 年度	400,000	120,000	520,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：インフルエンザ、チオレドキシン、レドックス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) インフルエンザ脳症をはじめとした重症インフルエンザ感染症の生命学予後は改善したが、未だ神経学的後遺症を残す症例も多い。特に小児においては「後遺症なき生存」をめざすために、新たな治療法

を模索する必要がある。

(2) 現在、京都大学の淀井教授らのグループにより、レドックス（酸化還元）調節に作用する新しい治療が示されつつある。レドックス（酸化還元）制御はウイルス感

感染症・急性肺障害・癌など様々な疾患と関係がある生体防御反応システムのひとつである。チオレドキシシン系(Thioredoxin:TRX)は、レドックス制御に関わる重要な調節系の一つであり、様々なストレス(ウイルス感染、放射線、抗癌剤など)で誘導される、いわゆる「抗酸化ストレス作用」のあるタンパク質である(図1)。淀井教授らのグループは、既に遺伝子組み換えヒトチオレドキシシン(rhTRX)を開発し、rhTRXはウイルス性の急性肺炎、急性肺障害・急性呼吸窮迫症候群に対して臨床研究を検討される段階に至っている。

(3) 自験例(ロタウイルス関連脳症)での遺伝子発現をマイクロアレイで検討した結果、TRXは感染免疫反応に属する遺伝子群に次いで高発現していた(表1)。また14名の急性脳症症例では血清TRXが100ng/mlを超えて高値であった。

## 2. 研究の目的

重症インフルエンザ感染における、レドックス制御の果たす役割を解明する。またこれをもとにして「小児疾患におけるレドックス制御の役割」を明らかにし、新しい治療法の可能性を探る。

## 3. 研究の方法

C57BL/6マウスに、インフルエンザウイルスA/Puerto Rico/8/34(H1N1)を、300 PFU/mouseで経鼻感染させ、インフルエンザ感染モデルとした。また、rhTRX(40ug/mouse)を、感染前日から感染後13日まで、腹腔内に隔日投与した。

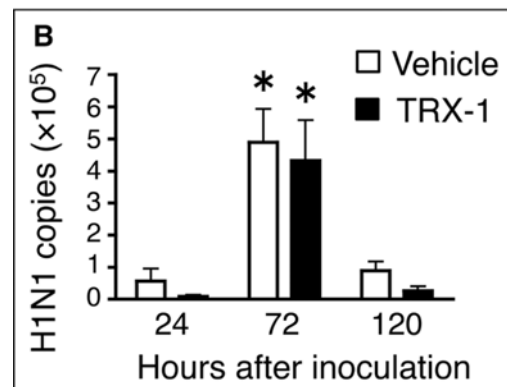
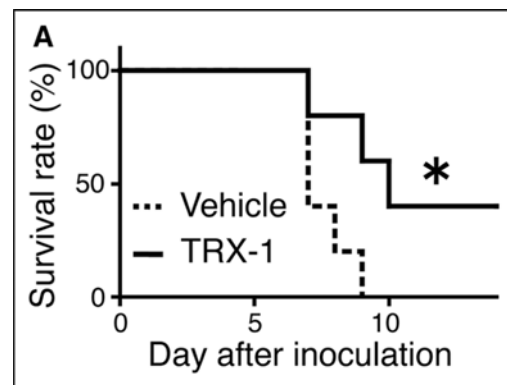
rhTRX投与群と非投与群で、マウスの生存曲線、肺のインフルエンザウイルス量、肺病理学的組織像、血清中サイトカイン等を比較検討した。

## 4. 研究成果

(1) マウスにおけるTRX-1の発現を臓器別(脳・肺・肝・腎・脾)で検討した。肺が最も高発現(TRX-1 mRNA/GAPDH mRNA=1)であった。またrhTRXを投与後1-3時間後に、肺の発現が有意差をもって抑制されていた。

(2) rhTRX投与(TRX-1)による変化:

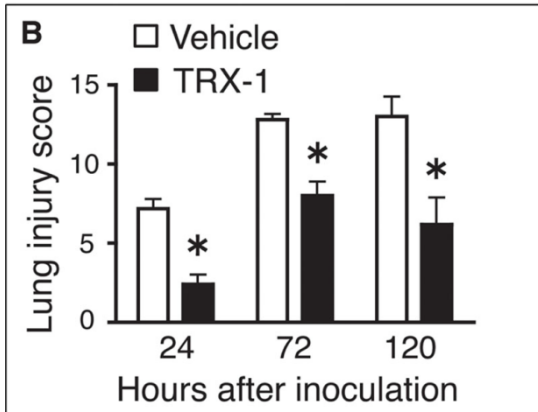
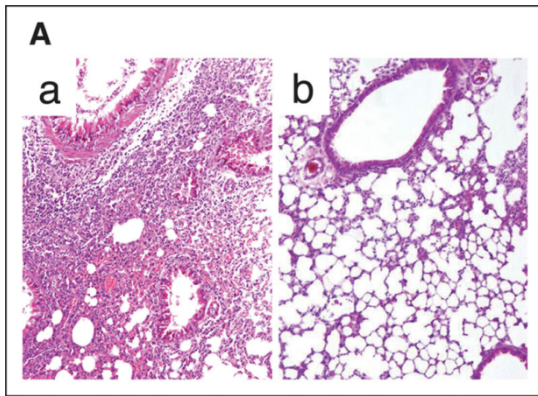
A. マウス生存曲線、非投与群ではウイルス感染後7-9日で全例が死亡したが、投与群では約40%が生存した。B.肺のインフルエンザウイルス量:感染72時間後にrhTRX投与



群で低下していた(p<0.001)。

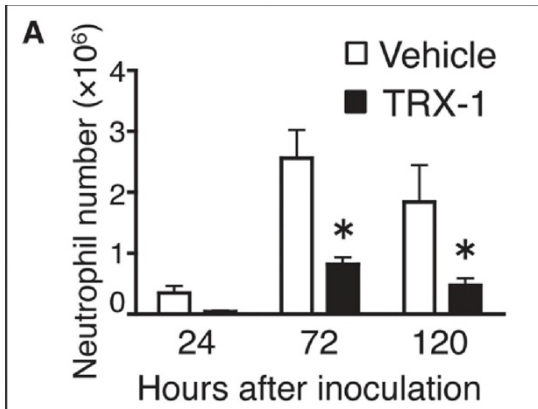
(3) 肺の病理組織学的像の変化:

A. 感染後72時間後、非投与群では、間質浮腫や炎症細胞の浸潤、出血などの炎症像が著明であった。B. Lung injury scoreでは、感染後24、72、120時間後のいずれでも、非投



与群と rhTRX 投与群の間に有意差( $p < 0.001$ )が認められた。

(4) rhTRX 投与群では、感染後 24、72

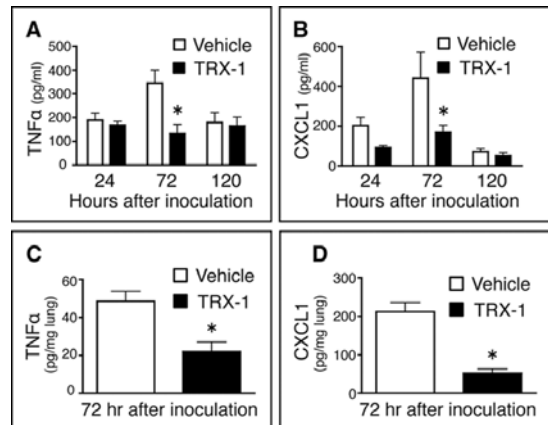


時間、120 時間のいずれでも、肺への好中球浸潤が低下していた。

(5) rhTRX 投与におけるサイトカインの変化

マウス肺胞洗浄液中の TNF- $\alpha$  (A) と CXCL1(B) を測定した。rhTRX 投与群では、総じてどちらの値も低い傾向にあったが、特に感染後 72 時間で有意差を認めた ( $p <$

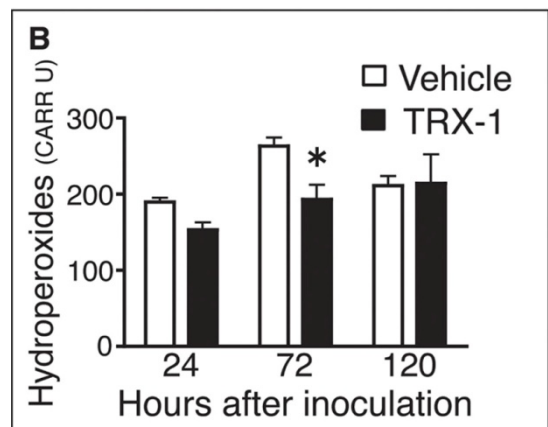
0.05)。感染後 72 時間後の、肺組織中の TNF- $\alpha$  (C) と CXCL1(D) でも有意差を認める ( $p$



<0.05)。これは、肺の炎症像の病理学的違いと一致する。

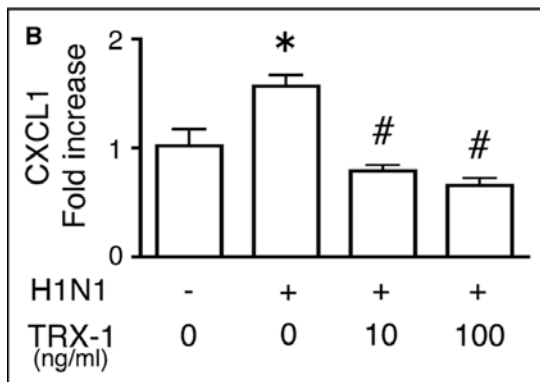
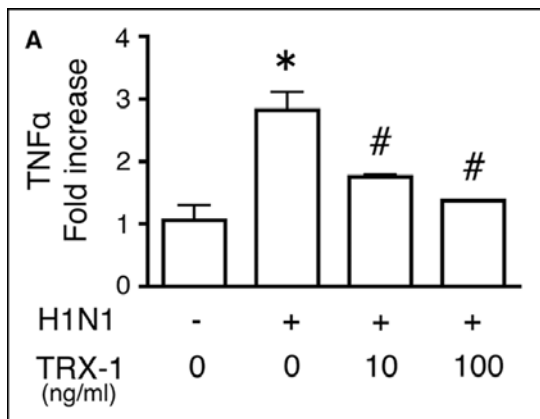
(6) rhTRX 投与がレドックス制御に与える影響

マウス血清中の酸化度 (ヒドロペルオキシド) を測定したところ、感染後 72 時間で rhTRX 投与群と非投与群の値に有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。



(7) インフルエンザウイルス感染後の肺上皮細胞(MLE-12)に与える rhTRX 投与インフルエンザウイルスを (MOI=10) で感染させた後、rhTRX を 0, 10, 100 ng/ml 加えて 6 時間培養し、TNF- $\alpha$  mRNA(A) と CXCL1mRNA (B) の発現量を比較した。rhTRX の濃度依存性に、TNF- $\alpha$  mRNA と

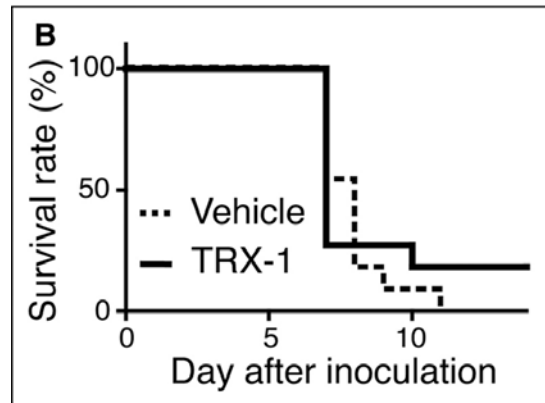
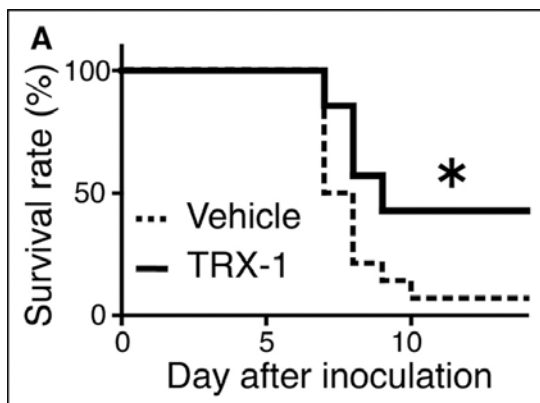
CXCL1mRNA の発現量が低下することが確認された。



(8) rhTRX の治療的投与が、生存率に及ぼす影響

インフルエンザ感染 30 分後に rhTRX 投与を開始した場合(A)と、感染 4 時間後から開始した場合の生存曲線を示す。

30 分差では、感染前治療と同様に生存率の改善が認められたが、4 時間後では効果が認められなかった。



## 5. 主な発表論文等

- ① Redox-active protein thioredoxin-1 administration ameliorates influenza A virus (H1N1)-induced acute lung injury in mice. 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. Crit Care Med. 2013 Jan;41(1):171-181. (査読あり)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (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