

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860865

研究課題名(和文) 小児重症インフルエンザ(肺炎・脳症)におけるレドックス制御蛋白の役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of redox-active protein in severe influenza (pneumonia, encephalopathy)

研究代表者

八代 将登 (Yashiro, Masato)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：80585943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：TBP2K0マウスの解析を進めることで代謝異常型インフルエンザ脳症(Reye症候群)モデルマウスの可能性が示唆された。さらに、抗酸化・抗炎症効果をもつTRX,抗HMGB1抗体の両者がマウスの重症インフルエンザ肺炎に有効であることが示された。今後は脳症モデルマウスに抗酸化・抗炎症効果をもつ薬剤を使用し治療的効果を確認する予定である。

研究成果の概要(英文)：TBP2K0 mouse was suggested possibility of a metabolic disorder type influenza encephalopathy (Reye syndrome) model mice. In addition redox-active protein of TRX and anti-HMGB1 antibody has been shown to be effective in severe influenza pneumonia in mice. It is expected to confirm the therapeutic effect using a drug with anti-oxidative and anti-inflammatory effect in encephalopathy model mice.

研究分野：感染免疫

キーワード：小児感染症学 インフルエンザ 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

(1)インフルエンザウイルスは毎年世界で流行を引き起こし、感染地域の人口の10~20%が罹患すると推計されている。インフルエンザ感染そのものは致死性ではないが、2009シーズンの新型インフルエンザで多く認められた重症急性肺傷害や、小児に多いインフルエンザ脳症など致死的な合併症が存在し、その対策は緊急の課題である。

(2)近年、酸化ストレスが様々な病態に関与することが報告されている。重篤なインフルエンザ合併症に抗酸化治療が有効であることから、我々は強力な抗酸化作用を有するチオレドキシン(Thioredoxin:TRX)に注目した。

(3)インフルエンザ脳症は、病態によって代謝異常 サイトカインストーム 神経細胞興奮毒性の3群に大別される。病態解明には疾患モデル動物が有用であるが、いずれも作成は困難である。今回我々はTRXの負の制御因子作用をもつチオレドキシン結合蛋白2(thioredoxin binding protein 2:TBP-2)に注目した。TBP-2はTRXへの関与の他に糖・脂質代謝調節の統御、癌抑制、NK細胞発生制御など多くの重要な役割をもつ近年注目されているレドックス制御蛋白である。非常に興味深いことにTBP2KOマウスで観察されるクエン酸サイクル不全はヒトのReye症候群(脳症)に類似している。これらよりTBP2KOマウスがインフルエンザ脳症モデルマウスである可能性が示唆されている。

## 2. 研究の目的

小児の重症インフルエンザ関連疾患(急性肺傷害、インフルエンザ脳症)において、レドックス(酸化還元)制御蛋白(チオレドキシン:TRX、チオレドキシン結合蛋白2:TBP-2)の役割を解明することで、新たな治療の可能性を探る。

## 3. 研究の方法

(1)インフルエンザ肺炎モデルマウスの各臓器別TRX mRNA、TBP-2 mRNAの発現量と病理学的所見を比較する。

(2)rhTRX投与下にてインフルエンザ感染を行い、血清・BALF・尿・各種臓器を用いて、ELISA法・リアルタイムPCR法を用いた解析および病理学的評価を行う。

(3)TBP2KOマウスの血清・髄液でのサイトカイン解析および脳病理評価を行い、代謝異常型インフルエンザ脳症(Reye症候群)モデルマウスを確立する。

(4)代謝異常型インフルエンザ脳症(Reye症候群)モデルマウスを用い、各種薬剤の治療効果の検討を行う

## 4. 研究成果

(1)インフルエンザ肺炎モデルマウスの各臓器別TRX mRNA、TBP-2 mRNAの発現量と病理学的所見を比較した。感染前ではTRX、TBP2共に肺での発現が最も多く、脳での発現量は低値であった。TRXとTBP2は肺と脾臓では感染3日目では発現が増加した。脳と肝臓では感染後に発現が低下した。腎臓ではTRXは感染後に発現が増加したが、TBP2は発現が低下した。TRXとTBP2は脳・肺・脾臓・肝臓での感染後の発現に相関を示したが、腎臓では逆相関を示した。

(2)代謝異常型インフルエンザ脳症 (Reye症候群様)モデルマウスを確立し、野生型マウスと比較した。

TBP2K0マウスに1と同様にインフルエンザ感染を行い、野生型マウスとの生存率・臨床症状を比較した。生存率に有意差は認めなかった。野生型マウスは肺炎を来し死亡したのに対し、TBP2K0マウスでは肺炎像が軽微であった。TBP2K0マウスでは著明な脂肪肝を認めた。

感染後のマウス血清中のサイトカインを測定した。野生型では感染3日目にTNF とCXCL1の上昇を認めたが、TBP2K0マウスでは上昇を認めなかった。

(3)インフルエンザ脳炎モデルマウスを確立し、全身(血液)と局所(髄液)のサイトカインを比較した。野生型マウスにインフルエンザを脳内に直接感染させ、生存率・臨床症状を確認した。

血液ではG-CSF, IFN $\gamma$ , IL-12, MCP-1, IP-10, TNF $\alpha$ が上昇し、髄液ではIL-10, IL-13が上昇した。

(4)各種薬剤の治療的効果の判定。核酸結合タンパクであるHMGB1 (High-Mobility Group Box-1)はTRXと同様に複数のチオール基を有しており、細胞内においてレドックス制御に関与する一方で、細胞外では炎症性サイトカイン因子としての性質を持つ。インフルエンザ肺炎モデルマウスでは血清中に増加したHMGB-1が病態形成に関与しており、抗HMGB-1抗体が抗炎症作用・抗酸化作用により病態を改善することを証明した。

(5)TBP2K0マウスの解析を進めることで代謝異常型インフルエンザ脳症 (Reye症候群)モデルマウスの可能性が示唆されている。

また、抗酸化・抗炎症効果をもつTRX, 抗HMGB1抗体の両者がマウスの重症インフ

ルエンザ肺炎に有効であることが示された。今後は脳症モデルマウスに抗酸化・抗炎症効果をもつ薬剤を使用し治療的効果を確認する予定である。

## 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)

9名, Yashiro M(2番目), Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody treatment provides protection against influenza A virus (H1N1)-induced pneumonia in mice. Critical Care、査読有、Vol.19,2015, DOI 10.1186/s13054-015-0983-9.

9名, Yashiro M(3番目). Inhibitory Effects of Edaravone, a Free Radical Scavenger, on Cytokine-induced Hyperpermeability of Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells: A Comparison with Dexamethasone and Nitric Oxide Synthase Inhibitor. Acta Med Okayama, 査読有, Vol.19, No.5, 2015, pp.279-290, URL [http://www.lib.okayama-u.ac.jp/www/acta/pdf/69\\_5\\_279.pdf](http://www.lib.okayama-u.ac.jp/www/acta/pdf/69_5_279.pdf)

八代将登、マウスインフルエンザ肺炎におけるレドックス制御蛋白チオレドキシン(TRX-1)の治療的効果、岡山医学会雑誌、査読無、Vol.125、No.2、2013、pp109-112、DOI 10.4044/joma.125.109

〔学会発表〕(計 4 件)

Nobuyuki Nosaka, Masato Yashiro, Therapeutic Effects of Anti-High Mobility Group Box-1 Monoclonal Antibody for Influenza A virus(H1N1)-induced Pneumonia, The 11<sup>th</sup> Asian Society for Pediatric Research 2015, 16/4/15, Osaka, Osaka

八代将登、レドックス制御蛋白チオレドキシ( TRX )のインフルエンザ肺炎における治療的効果、第 56 回臨床ウイルス学会、平成 27 年 6 月 14 日、岡山県・岡山市

野坂宜之、インフルエンザ肺炎モデルにおける抗 HMGB1 抗体の治療効果、第 118 回日本小児科学会学術集会、平成 27 年 4 月 18 日、大阪府・大阪市

八代将登、インフルエンザ脳症の現状と課題、第 90 回岡山小児てんかん懇話会、平成 26 年 2 月 26 日、岡山県・岡山市

〔図書〕(計 8 件)

Hirokazu Tsukahara, Masato Yashiro, Willey Blackwell, The Science of Free Radical Biology and Disease, The Science of Free Radical Biology and Disease, Disorders of children, 2016, 133-154

八代将登、メディカルレビュー社、Pharma Medica、インフルエンザ診療最前線、重症インフルエンザ、そのメカニズムと診療、Vol. 33, No11, 2015, 23-28

八代将登、森島恒雄、医歯薬出版株式会社、医学のあゆみ、レドックス UPDATE、インフルエンザ急性肺障害におけるチオレドキシ( TRX-1 )の役割、2015, 133-154

Masato Yashiro, Hirokazu Tsukahara,, Tsuneo Morishima、Springer Link, Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice, Studies on Pediatric Disorders, Thioredoxin Therapy: Challenges in Translational Research, 2014, 233-252

Hirokazu Tsukahara, Masato Yashiro, Yoshiharu Nagaoka, Tsuneo Morishima、Springer Link, Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice, Studies on Pediatric Disorders, Infectious and Inflammatory Disorders, 2014, 371-386

森島恒雄、八代将登、医薬ジャーナル社、化学療法の領域、インフルエンザ脳症の発症メカニズムと治療法の新展開、インフルエンザ脳症、Vol. 30, No12, 2014, 58-66

八代将登、森島恒雄、中山書店、アクチュアル 脳・神経疾患の臨床、神経感染症を極める、インフルエンザ脳症、2014、68-75

八代将登、森島恒雄、ライフメディコム、カレントセラピー、インフルエンザ 診断と治療の最前線、インフルエンザ脳症、2014、28-33

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

八代 将登 (YASHIRO, Masato)

岡山大学病院・小児科・助教

研究者番号：80585943

(2)研究協力者

山田 睦子 (YAMADA, Mutsuko)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・小

児科・非常勤研究員

研究者番号：

藤井 洋輔 (FUJII, Yousuke)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・小

児科・助教

研究者番号：80549775

野坂 宜之 (NOSAKA, Nobuyuki)

岡山大学病院・小児科・医員

研究者番号：30713961

塚原 宏一 (TSUKAHARA, Hirokazu)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科小

児医科学・教授

研究者番号：90207340

森島 恒雄 (MORISHIMA, Tsuneo)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科小

児医科学・特命教授

研究者番号：90157892