

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：21601  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2014～2016  
 課題番号：26461590  
 研究課題名(和文) 難治性中枢神経感染症の発症・進展過程におけるDAMPsの役割とその制御システム  
  
 研究課題名(英文) A role and progress process of DAMPs with intractable central nerve infectious disease  
  
 研究代表者  
 陶山 和秀 (Suyama, Kazuhide)  
  
 福島県立医科大学・医学部・講師  
  
 研究者番号：90423798  
  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経感染症の発症・進展機序におけるDAMPsの役割を検討するために、急性脳炎脳症の福島県の疫学的臨床特徴と予後に関連する因子について検討した。意識障害遷延が予後不良群で多く、中枢神経の障害が予後に影響を与えられた。次に重症HUSマウスの作製を行い、DAMPsの代表的なマーカーであるHMGB1を測定した。HMGB1は6時間後にピークを認め48時間後には低下しており、HUSの進展の早期よりHMGB1の関与が示唆された。またヒト脳炎脳症発症時の髄液検体を用い炎症性蛋白の検索を行なった。急性散在性脊髄炎の髄液で $\alpha$ 2マクログロブリンの上昇を認め、脳症早期のバイオマーカーの可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：I examined an epidemiological clinical characteristic of Fukushima of the acute encephalitis and encephalopathy and a factor in conjunction with the convalescence to examine a role of DAMPs in the onset, the progress mechanism of the central nerve infectious disease. Disturbance of consciousness and respiratory failure were bad prognosis. I made some seriously HUS model mouse. Serum HMGB1 level in seriously HUS mouse were highest at 6hr and decreased 48hr. So participation of DAMPs was suggested for progress mechanism of the HUS. I searched the inflammatory protein using a cerebrospinal fluid specimen at human acute encephalitis and acute encephalopathy onset. Alpha2 macroglobulin in cerebrospinal fluid increased with the acute disseminated encephalomyelitis, and possibility of acute encephalopathy early biomarker was suggested.

研究分野：小児神経

キーワード：DAMPs HMGB1 脳炎脳症 バイオマーカー

### 1. 研究開始当初の背景

生体では、細胞死や細胞の損傷が生じると、細胞から様々な細胞死や細胞損傷によりダメージ関連分子パターン(damage-associated molecular patterns:DAMPs)が放出され、これらがマクロファージや樹状細胞の受容体と結合し、炎症性サイトカインの産生、好中球の遊走に伴う炎症、抗原提示細胞の活性化を介した自然免疫から獲得免疫の活性化などが引き起こされる。このDAMPs分子群の代表とされるHigh-mobility group box1(HMGB1)に関しては、Wangらにより1999年敗血症罹患患者の生死に關与する重要なkey mediatorであることが示されている。HMGB1の細胞外分布機構には、自然免疫系のマクロファージ/樹状細胞からの能動的分泌と障害細胞からの受動的分泌の2経路があり、分泌されたHMGB1は単球、血管平滑筋細胞、神経細胞などの細胞表面にあるRAGEに結合し、MAPキナーゼを活性化しNF- $\kappa$ Bが核内へ移行し種々の炎症プロセスが展開される。HMGB1は、現在、心筋障害、肺炎、DIC、慢性関節リウマチや動脈硬化、悪性腫瘍の増殖や侵潤、転移などのkey mediatorであることが言及されている。これまで私達は、SSPEや脳炎脳症の発症病態を明らかにするためモルモットモデルやヌードマウスを使用した病態解明や抗ウイルス薬を用いた治療報告を行ってきた(J Verol 2012, Antimicrob Agents Chemother 2004, 2001)。さらにヒト血管内皮細胞に対するインフルエンザウイルスのアポトーシス誘導過程を明らかにした(J Med Virol 2008)。しかしながら、脳障害が惹起した後いかに炎症過程が継続・増悪するのか、その詳細な機序は未だ不明である。脳障害にて死滅した細胞から放出されたDAMPsが自然炎症を惹起し炎症進展増悪機序の一つとなることも推察されうる。現在まで、中枢神経感染症、特に脳炎・脳症、髄膜炎、脊髄炎などの急性疾患やSSPEなどの慢性疾患におけるこれらHMGB1に関する報告

は少なく、病態への関連性やその役割は不明である。

### 2. 研究の目的

生体内で梗塞や壊死などにより大量の細胞死が起こると、DAMPが放出され、これが免疫細胞の受容体に認識され炎症反応が惹起されるという概念が知られている。DAMPsを代表する分子群には HMGB1やS100蛋白質があり、DAMPs受容体と結合することで獲得免疫が活性化される。HMGB1は、DNA結合蛋白でありReceptor for advanced glycation end products(RAGE)に作用して自然免疫、止血、侵襲局所の修復を誘導し敗血症やDICなどの病態と深く関与し、S100蛋白質もDAMPs受容体と結合後、炎症の進展に關連する。今回、私達は、難治性中枢神経感染症疾患におけるDAMPsの役割と制御機構を検討するために各種疾患動物モデルにおいてDAMPsの脳組織中の発現や局在を検索し、炎症進展やアポトーシス、修復・再生過程における関連性を評価する。さらにヒトの脳炎・脳症、髄膜炎、脊髄炎などの急性疾患や亜急性硬化性全脳炎(SSPE)などの慢性疾患を含めた中枢神経感染症罹患後の経時的DAMPsの血中・髄液濃度を測定し病態との関連性を検討する。

### 3. 研究の方法

実際の難治性中枢神経感染症の発症、進展過程におけるDAMPsの役割を検討するために、福島県の小児が入院可能な病院全施設の脳炎脳症の症例についてアンケート調査を行い予後不良因子について調査した。また対象期間は1986年から2014年の28年間とした。

マウスに志賀毒素及びLPSを投与することにより、重症HUSモデルマウスを作成した。またその際の血清HMGB1をELISAキットを使用し測定した。

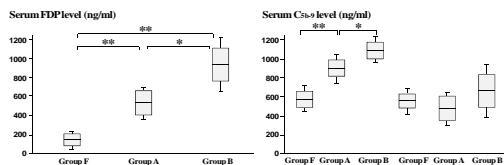
急性散在性脳脊髄炎、急性脳症、熱性痙攣

で入院したヒト髄液を用い、抗ヒツジ 2M 抗体を使用しウエスタンブロットを行ない髄液中の 2 マクログロブリンの濃度を測定した。

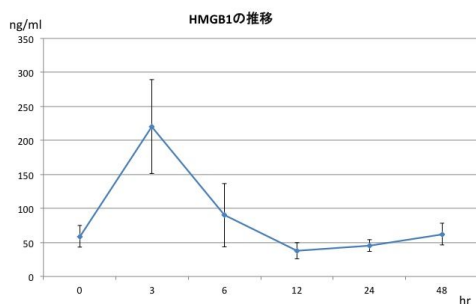
#### 4. 研究成果

近年福島県内の脳炎脳症予後は改善しているが（死亡例は減少している）予後不良群では意識障害の遷延野症例と呼吸不全を伴った症例が多かった。

志賀毒素及びLPSをマウスに投与することにより、重症 HUS マウスを作成することが出来た。またリコモジュリン投与により HUS における血液凝固亢進状態を改善させ、またケモカイン及びサイトカインを抑制した。



GroupA コントロール, GroupA HUS+リコモジュリン, GroupB 重症 HUS  
また重症 HUS マウスでは志賀毒素及び LPS 投与 6 時間後に HMGB1 の頂値を認め、48 時間後には正常化していた。

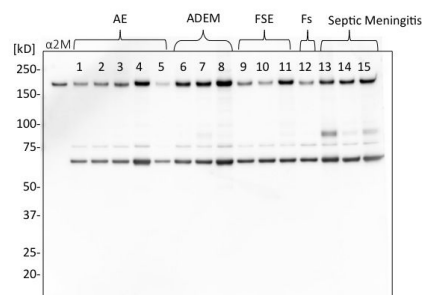


以上ことより、HUS モデルマウスにおいて HMGB1 の関与が示唆された。

脳症、急性散在性脳脊髄炎（ADEM）、熱性痙攣の患者髄液を用い神経炎症の際に上昇すると言われている 2 マクログロブリンの蛋白をウエスタンブロットで測定した。急性脳症及び ADEM で 2 マクログロブリンの上昇を認め、中枢神経感染症のバイオマーカーの可能性が示唆された。DAMPs との関連を今後検討していく必要

があると思われた。

Fig. 1



#### 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 1 件)

Suyama K. The efficacy of recombinant human soluble thrombomodulin for the treatment of shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome model mice. *Nephrol Dial Transplant.* 査読有, 2015,30(6)969-77 DOI: 10.1093/ndt/gfv004  
〔学会発表〕(計 1 件)

川崎幸彦、福島県過去 26 年間における小児期発症急性脳炎、脳症 260 例の疫学的臨床的検討 最近の発症動向と予後関連因子、第 5 8 回小児神経学会学術集会、2016 年 6 月 3 日、京王プラザホテル新宿

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

陶山 和秀 (SUYAMA Kazuhide)  
福島県立医科大学小児科・講師  
研究者番号：90423798

(2)研究分担者

川崎 幸彦 (KAWASAKI Yukihiro)  
福島県立医科大学小児科・准教授  
研究者番号：305369

橋本 浩一 (HASHIMOTO Kouichi)  
福島県立医科大学小児科・准教授  
研究者番号：50322342

佐藤 晶論 (SATOU Masatoki)  
福島県立医科大学小児科・講師  
研究者番号：60423795

細矢 光亮 (HOSOYA Mitsuaki)  
福島県立医科大学小児科・教授  
研究者番号：80192318

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )