

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の病態解析・診断・治療に  
関する研究（重症肺炎・脳症の実験病理学的研究）

研究分担者 新矢恭子 神戸大学・准教授

**研究要旨**

インフルエンザ感染症では一般的に全身症状を伴う。しかしながらこれまでに、呼吸器への重篤なウイルス感染時に、脳の遺伝子発現状態がどの程度影響されるのかについては、あまり研究されていない。本研究では、ウイルスを致死量投与したマウスの脳内遺伝子発現状態を、薬剤治療をした生残群の脳と比較した。マウス脳における遺伝子発現量は、呼吸器疾患の進行に応じて大きく変動した。本データに基づいて、呼吸器疾患による生死および脳の遺伝子発現レベルの間の相互関係を調べる。つまり、生死に応じた脳の遺伝子発現のパターンを解析し、生死に大きく関与して動いていると考えられる分子機構群を浮き彫りにする。この研究は、進行性の呼吸器疾患モデルのマウス脳内遺伝子発現に関する包括的な経時的データを提供するとともに、致死に連動している脳内遺伝子群の把握を可能にする。

**A . 研究目的**

以前の研究で、細菌の LPS 暴露後のインフルエンザウイルス重感染を想定したマウスの脳浮腫発症における脳内遺伝子発現プロファイリングを行った。その際、正常な状態や致死的なウイルス感染状態の脳内遺伝子発現の変動についての経時的データが不足していた。本研究では、マウスモデルにて致死量のウイルス感染を行い、薬剤治療をした生残群の脳を対照として経時的な

検索を行った。

**B . 研究方法**

ウイルス： A/Puerto Rico/8/34; H1N1。  
50% マウス致死量 (MLD50)は、 $6 \times 10^2$  pfu/50  $\mu$ l.

動物： Balb/c マウス、SPF、6 週令、雌。

実験計画：マウスを 3 グループに分類(グループ 1：ウイルス、グループ 2：ウイルス + 治療、グループ 3：無処置)し、ウイ

ウイルス感染群には、10 倍量の 50% マウス致死量/ 50  $\mu$ l を経鼻投与、薬剤投与群にはラニナビル:CS-compound, 13.3  $\mu$ g/50  $\mu$ l/匹)をウイルス接種後 2 時間目に経鼻投与した。

ウイルス学的検索：MDCK 細胞を用いたブラック法を行った。

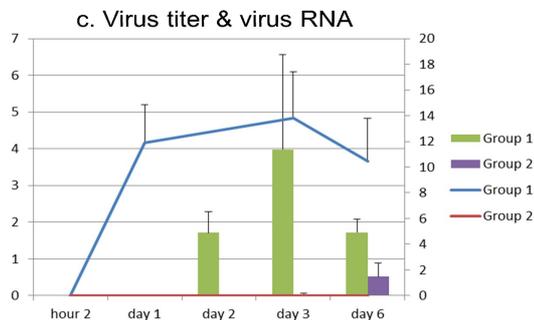
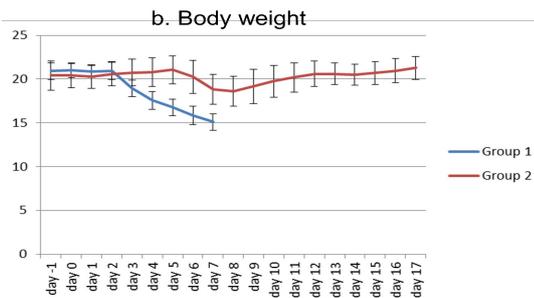
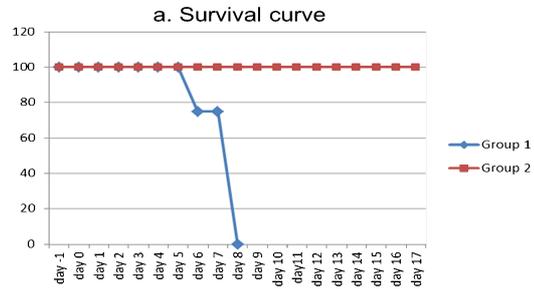
RNA 抽出とマイクロアレイ解析：脳組織全体を凍結粉碎し、全 RNA を採取した (Absolutely RNA miRNA kit; Agilent Technologies, CA, USA)。抽出した RNA は Takara Dragon Genomics Center (Takara Bio, Shiga, Japan) にて Agilent Expression Array, SurePrint G3 Mouse GE 8x60K を用いて解析した。Gene Ontology 検索には、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) を用いた。

(倫理面への配慮)

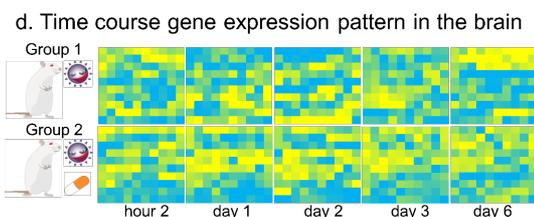
第一三株式会社での動物実験の一環として行われた。

### C . 研究結果

実験モデルは、ウイルス感染群では完全致死、ウイルス感染 + 薬剤治療群では完全生存の条件下にあることが確認された (Fig.a)。マウスの臨床症状は体重変動に比例していた (Fig.b)。観察期間中の肺内ウイルス量は、通常感染群では顕著に増加し、薬剤治療群ではほぼ抑制されていた (Fig.c)。



脳内での遺伝子発現パターンは、致死感染群にて、接種後 1 日目から大きく変動していた (Fig.d)。



Gene ontology による解析では development, morphogenesis, alpha-beta T cell activation, RNA metabolic process, transcription, antigen processing via MHC class II, nitrogen compound metabolic process 等が発現減少、amine/ketone metabolic process, immune response, antigen processing via MHC

class Ib, heterocycle metabolic process, negative regulation of cell death 等が発現上昇していた。

#### **D . 考察**

G0 解析による、更なる詳しい解析は、現在進行中である。また、本研究で得られた複数条件の大規模時系列データを用いて、生残・致死の結果決定に大きく関与している因子を探索する予定である。

#### **E . 結論**

本研究は、進行性の呼吸器疾患モデルのマウス脳内遺伝子発現に関する包括的な経時的データを提供するとともに、致死に連動している遺伝子群の把握を可能にする。

#### **F . 研究発表**

##### 1 . 論文発表

Kyan et al., Transcriptome profiling

of brain edemas caused by influenza infection and lipopolysaccharide treatment. J. Med. Virol. (2013 Nov 8. doi: 10.1002/jmv.23801. [Epub ahead of print])

##### 2 . 学会発表

ByoDynamics2013: Sep11-13,2013, Bristol, UK

#### **G . 知的所有権の取得状況**

##### 1 . 特許取得

該当なし

##### 2 . 実用新案登録

該当なし

##### 3 . その他

該当なし