

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

研究代表者 岡山大学大学院特命教授 森島恒雄

共同研究者 八代将登、野坂直之

研究要旨

平成 24～26 年度の 3 年間で主に以下の 3 点について研究を実施し、結果を得た。

1. インフルエンザ脳症及び肺炎の発症機序の解明：宿主の急性期遺伝子発現について、中枢神経症状を伴う患児と肺炎罹患児において DNA マイクロアレイ解析を実施し、それぞれ急性期遺伝子発現のプロファイルが異なることを明らかにした。すなわち、前者では COX2 及び神経マーカー関連遺伝子が強く発現したのに比べ、後者では酸化ストレスマーカー及び IgE 関連遺伝子群の強発現を確認した。これは、治療法を考えるうえで重要な知見と考えられた。

2. 新規治療薬の開発：抗酸化の働きを持つチオレドキシン (TRX) のマウスにおけるインフルエンザ肺炎治療効果を検討し、TRX が肺炎による致命率を大幅に改善することを明らかにした。すなわち、好中球の肺局所への浸潤や局所におけるサイトカイン/ケモカインの産生を抑制し、また種々の酸化ストレスマーカーの抑制が認められた一方、ウイルスの肺内増殖には影響を与えなかった。TRX は、現在ヒト化精製物も作られており、今後臨床応用が期待できる。HMGB1 は細胞外では炎症のメディエーターとして知られ、サイトカイン/ケモカインの誘導の引き金となり、重症インフルエンザにおいて病態悪化に関連することが知られている。抗 HMGB1 抗体は、マウスのインフルエンザ肺炎の治療薬として有用であることを明らかにした。すなわち、好中球の肺浸潤を抑制し、サイトカイン/ケモカインの産生を抑え、同時に ROS を抑制した。現在、脳血管障害や肺損傷などインフルエンザ以外にも本剤の有用性が推定されており、臨床応用に向けた重要な成果と考えられた。

3. 重症インフルエンザの診療体制の整備とガイドラインの作成：「新型インフルエンザ」侵入時における治療法を含む迅速な診療体制整備にむけて、厚生労働省担当部局、関連学会（日本救急医学会、日本集中治療医学会、日本呼吸器学会、日本小児科学会、日本感染症学会など）、関連研究班（森島班、大石班、）による検討組織を立ち上げ、その中で重症インフルエンザ肺炎の診療ガイドラインを作成した。この組織の維持・発展は重篤なインフルエンザに対する治療法の確立・普及の上で、極めて重要と思われる。

以上、多くの点で重要な成果を上げることができた。

A. 研究目的

目的

1. 新型インフルエンザの侵入に備えて、肺炎・脳症・多臓器不全など重症例の海外動向・病理・ウイルス学的特徴・臨床像・

病態などを解析し、重症化に備えた「診療ガイドライン」を作成することを目的とした。これは「既存の治療薬」及びその認可された適応の範囲で進めた。同時に病態解析に基づく重症インフルエンザに対する新

規治療薬を開発する。具体的には、病態の悪化につながる「炎症」「高サイトカイン血症」「酸化ストレス」などを抑制する効果のある抗HMGB1抗体、チオレドキシニンについて重症化予防の検証を進め、臨床応用への道を開いた。

「診療ガイドライン」の作成・改訂・普及を円滑に進めるために厚労省関連学会・関連研究班による連携組織を維持発展させた。特に、今後さらにAH7N9、AH5N1、AH1pdm薬剤耐性株などの蔓延を想定して治療法の確立と普及を進めていく。

## B. C . 研究方法および研究結果

**1. インフルエンザ脳症及び肺炎の発症機序の解明：** H1N1pdm における重症肺炎の発症機序が明らかになった。すなわち、図 1 に示す如く、宿主側の素因として喘息などアレルギー疾患を有すること、肺炎患者は有意に高い IgE を示すこと、喘息モデルマウスにおいて H1N1pdm ウイルスは、局所において炎症性サイトカインを強く産生し、肺の病原性も高まることが示され、これらは同ウイルスにより肺炎で入院した患児の急性期遺伝子発現 (DNA マイクロアレイ解析) において、2009pdm における小児の肺炎において DNA マイクロアレイ解析により SOD-2(ミトコンドリア膜の antioxidant) 関連遺伝子発現の増強が認められ、IgE 関連遺伝子および酸化ストレス関連遺伝子が高発現していることなどが示された(図 2)。

図 1 .

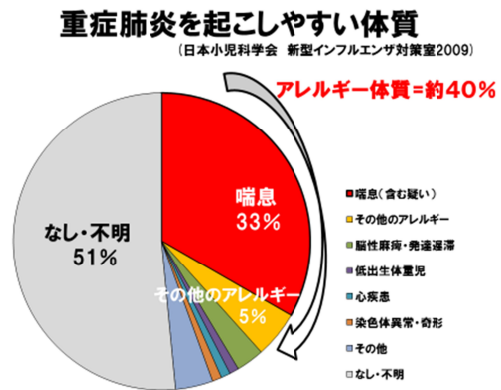
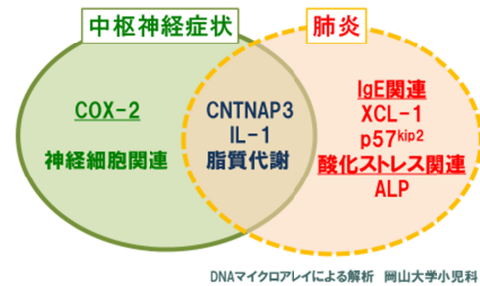


図 2 .

AH1・2009pdmの急性期に発現が上昇した遺伝子(小児)

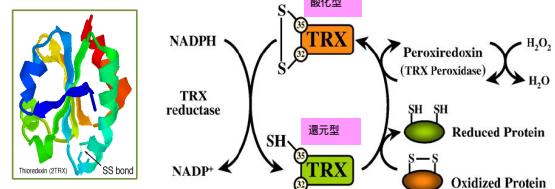


## 2. 新規治療薬の開発：

チオレドキシニン (TRX) の概要については、図 3 に示すように ROS を除去することで細胞を酸化ストレスから保護する役割を持つ。

図 3 .

### ■ チオレドキシニン (TRX) とは



生体作用

) 抗酸化作用

活性酸素種 (ROS) を除去することで、酸化ストレスから細胞を保護する。

) 抗炎症作用

好中球の活性を制御することで炎症を抑制する。

この TRX についてインフルエンザ肺炎の治療効果について検討した。

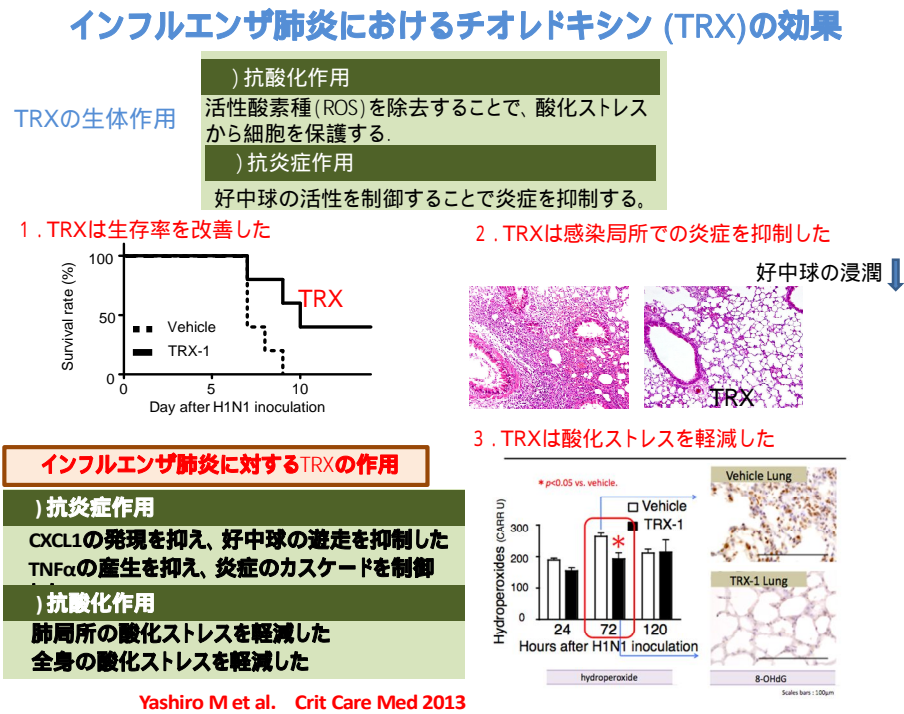
方法：

マウスにインフルエンザウイルス PR8 を経口感染させ、その後チオレドキシンを腹腔

内投与し、生存率・肺内ウイルス量・肺胞洗浄液中の好中球数、サイトカイン/ケモカイン濃度、肺組織中の酸化ストレスマーカーなどを継時的に測定した。

結果を図 4 に示す。

図 4 .



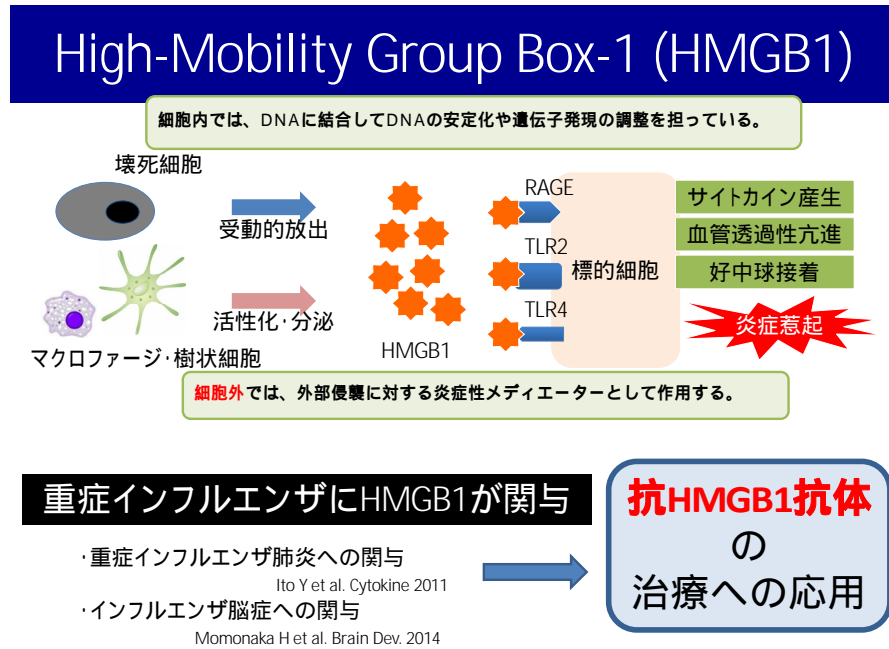
TRX はインフルエンザ肺炎によるマウスの致死率を著明に改善させた。これはウイルスの肺での増殖抑制効果によるものではなく、抗炎症(好中球の局所浸潤を抑え、また炎症性サイトカイン・ケモカインの産生を抑制)効果および抗酸化作用によるものであった。

抗 HMGB1 抗体のインフルエンザ肺炎治療効果の検討

HMGB1 は図 5 に示す如く、細胞内では DNA に結合して DNA の安定化や遺伝子発現の調

整を行っているが、細胞外では外部刺激に対する炎症性メディエーターとして作用する。HMGB1 は現在様々な病態で悪化に関与することが示されている(脳血管障害、外傷性肺障害など)。また本研究班の研究成果では、インフルエンザ肺炎などで HMGB1 の高値が確認されており、サイトカインストームおよび局所におけるサイトカイン・ケモカインの抑制に抗 HMGB1 抗体が有用かどうかの検討は極めて重要である。

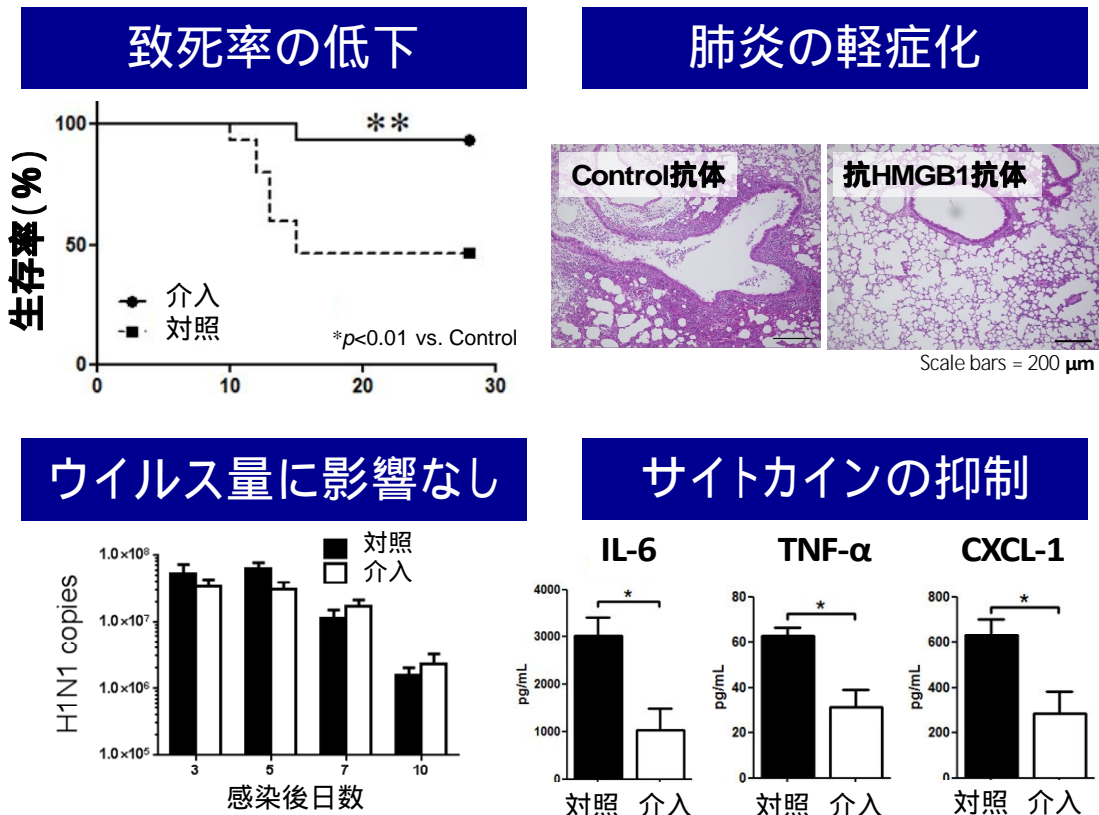
図 5 .



方法：抗 HMGB1 モノクローナル抗体をインフルエンザウイルス PR8 感染マウスに静脈注射し、マウスの生存率、肺の病理像、気管支洗浄液中の好中球数、サイトカイン/

ケモカイン濃度、酸化ストレスマーカーなどの推移を検討した。結果を下の図 6 に示す。

図 6 .



結果：抗 HMGB1 抗体はマウスの肺炎による致命率を著明に改善させた。その効果は TRX と同様ウイルスの肺での増殖抑制によるものではなかった。肺では好中球の浸潤を抑制した、IL-6、TNF、CXCL-1 などのサイトカイン・ケモカインを抑制し、酸化ストレスマーカーも低値を示した。

### 3. 重症インフルエンザの診療体制の整備とガイドラインの作成：

重症インフルエンザの診療体制整備は重要な課題であり、我々の研究班では厚生労働省大石班と連携をとり、厚生労働省担当部局、厚生労働省関連研究班(森島班・大

石班)、関連学会の参加により「新型インフルエンザ等に対する標準診療ガイドライン策定のための合同班会議」を組織した。計4回の会議の中で AH7N9 などのウイルス学的特徴および臨床像と病態が討議され、国内侵入時の対策の必要性が協議された。またこの過程で、成人のインフルエンザ肺炎に対する診療ガイドラインが初めて作成された。また2014年WHOの呼びかけによる講習会が中国で開催され、日本から2人の研究者(うち1人は清水分担研究者)を派遣し、帰国後成果を国内にフィードバックした。その概要について下の図7に示した。

## 図7 「新型インフルエンザ」の診療体制整備

### 重要な事項

- ・国内侵入前から、病態解明を実施し、
- ・「既存薬」によるガイドライン策定(想定)
- ・新規治療薬の開発
- ・速やかな連携組織を構築していく。

「新型インフルエンザ等に対する標準診療ガイドライン策定のための合同会議」

2013-2014

厚生労働省 + 対応研究班(森島班・大石班) + 関連学会

(日本感染症学会、日本小児科学会、  
日本呼吸器学会、日本集中治療学会、その他)

**ガイドラインの作成・改訂とその普及**

今後、この組織の維持・発展が「新型インフルエンザ」対応に極めて重要となる。

## D. E. 考察とまとめ：

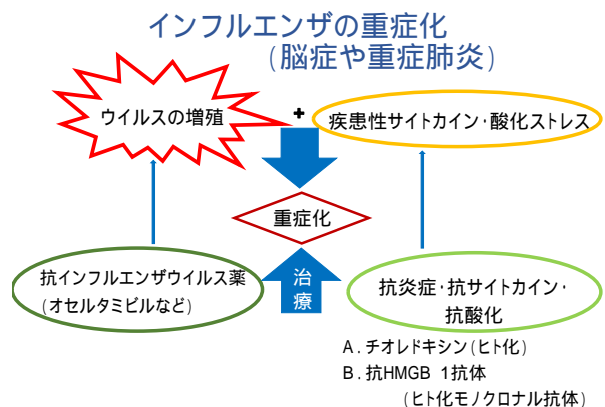
2009年の「新型インフルエンザ」AH1pdmにおいて、小児の重症インフルエンザが多発した。また図1に示したようにアレルギー素因特に気管支喘息を有する児で重症肺炎がみられた。この機序について研究を進めたところ、DNAマイクロアレイ解析により宿主の急性期遺伝子発現において、IgE関連遺伝子群および酸化ストレスマーカー関連遺伝子の高発現が認められ興味深い結果となった。一方、中枢神経症状を示す群においては、種々の神経疾患関連遺伝子群やCOX-2遺伝子の高発現を認め、すなわち、脳症と重症肺炎では異なる宿主の背景が存在することが示唆された。興味深いことに本稿では詳細は省いたが、同じ痙攣重積を示したロタウイルス胃腸炎とインフルエンザでは、それぞれ異なる急性期遺伝子の発現が認められ、ウイルスによっても宿主の反応が異なることが明らかになった。2013/14インフルエンザシーズンでは、久しぶりにAH1pdmの流行がみられ、その中で小児および成人にパンデミックの時と同様に肺炎の多発がみられた。今後これら肺炎およびアレルギー素因と関連するAH1pdmウイルス学的要因を探ることが大きな課題である。

図8.



新規治療薬の開発は重要である。今回特にインフルエンザウイルス増殖抑制効果を示さず、抗炎症・抗サイトカイン・酸化ストレス効果を示し、結果としてマウスの致命率を著明に改善する2つの薬剤が確認された。今後AH7N9やAH1pdm薬剤耐性株など抗インフルエンザ薬の効果が低い可能性が示唆されているため、これらの効果を示す薬剤の開発は急務である。従来はインフルエンザ脳症においてステロイドがパルス療法として用いられてきた。これは脳内でインフルエンザウイルスの増殖は認められないため使用が可能となった側面もある。一方、肺内でウイルスが増殖する場合、ステロイドが使いにくい状況が考えられる。その時この2剤は極めて重要となろう。特に抗HMGB1抗体についてはヒト化モノクローナル抗体がすでに完成しており、現在岡山大学においてインフルエンザ肺炎に対する治療薬として特許申請中である。

図9.





## F . 研究発表

### 論文(英語論文)

- ・Yamashita N, Tsukahara H, Tsuge M, Nagaoka Y, Yashiro M, Saito Y, Fujii Y, Oka T, Morishima T. Pathogenic mechanisms of influenza A(H1N1)pdm09 infection elucidated on gene expression profiling. *Pediatr Int* 55 (5): 572-577, 2013.
- ・Tsuge M, Oka T, Yamashita N, Saito Y, Fujii Y, Nagaoka Y, Yashiro M, Tsukahara H, Morishima T. Gene expression analysis in children with complex seizures due to influenza A(H1N1)pdm09 or rotavirus gastroenteritis. *J NeuroVirol* 20 (1): 73-84, 2014.
- ・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. Redox-active protein thioredoxin-1 administration ameliorates influenza A virus (H1N1)-induced acute lung injury in mice. *Crit Care Med* 41(1):166-176, 2013.
- ・Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam. *Mod Pathol*.26, 357-369, 2013
- ・Okada S, Hasegawa S, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Ikemoto K, Sasaki K, Toda S, Shirabe K, Takahara M, Harada S, Morishima T, Ichiyama T. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. *Cytokine*. 2013 Aug;63(2):194-200.
- ・Momonaka H, Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Kajimoto M, Okada S, Nakatsuka K, Morishima T, Ichiyama T. High mobility group box 1 in patients with 2009 pandemic H1N1 influenza-associated encephalopathy. *Brain Dev*. 2013; in press.
- ・Okada S, Hasegawa S, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Ikemoto K, Sasaki K, Toda S, Shirabe K,

Takahara M, Harada S, Morishima T, Ichiyama T. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. *Cytokine*. 2013; 63: 194-200.

- ・Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Takahara M, Kajimoto M, Momonaka H, Ishida C, Tanaka S, Morishima T, Ichiyama T. Serum soluble CD163 levels in patients with influenza-associated encephalopathy. *Brain Dev*. 2013; 35: 626-9.
- ・Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Muguruma T, Saito O, Fujimoto J, Toida C, Kuga S, Imamura T, Shimizu T, Kondo N, Morishima T. Unexpected cardiopulmonary arrest associated with influenza: our experience during the 2009 pandemic in Japan. *Influenza Other Respir Viruses*. 2013;7(5):759-60.
- ・Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Morichi S, Muguruma T, Saito O, Fujimoto J, Toida C, Kuga S, Imamura T, Shimizu T, Kondo N, Morishima T. Severe form of encephalopathy associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Japan. *J Clin Virol*. 2013;56(1):25-30.
- ・Nakatsukasa Y, Tsukahara H, Tabuchi K, Tabuchi M, Magami T, Yamada M, Fujii Y, Yashiro M, Tsuge M, Morishima T. Thioredoxin-1 and oxidative stress status in pregnant women at early third trimester of pregnancy: Relation to maternal and neonatal characteristics. *J Clin Biochem Nutr* 52(1):27-31, 2013.

### 国際会議発表

- ・Morishima T. Overview Acute encephalitis /encephalopathy in Japan. PAS (Pediatric Academic Societies Annual Meeting) 2013 meeting in Washington, DC (2013,5.3-5)

## G . 知的所有権の取得状況

抗 HMGB1 抗体によるインフルエンザ肺炎の治療 岡山大学において特許出願中