

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
（現：滋慶医療科学大学院大学・客員教授）

研究要旨

病理学的アプローチにより、重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の原因・発症過程に関する理論的な根拠を得て治療に貢献することを目的とした。本研究では、マウスの脳浮腫モデルの解析で、カルシウムイオンの恒常性崩壊が脳症発症の一因となっている可能性を示した。

A . 研究目的

実験病理学的アプローチにより、重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の原因・発症過程に関する理論的な根拠を得て治療に貢献することを目的とした。

以前、インフルエンザ脳症死亡例の延・脊髄を病理学的に検査する機会を得たことで、脳症患者の中樞神経系で起こっている病態には血管症が含まれていると判断した。獣医感染症領域では、脳脊髄血管症は、豚の大腸菌症の一病態として見られており、発症には志賀毒素もしくは志賀毒素と腸管毒素の相乗作用が起因すると考えられている。脳血管の病理所見が酷似していたため、二つの疾患には、病因は異なれども、類似した病理発生機序が発動している可能性があると考えた。

最近、インフルエンザウイルスはウイルス株によって、動物の細胞表面にある自然免疫における病原体の認識タンパク質、

Toll 様受容体 2 と 4 を刺激するものがあることが判明した。そのため、ヒトの細胞表面にある Toll 様受容体もインフルエンザウイルス粒子表面の物質によって刺激される可能性があると考えられた。Toll 様受容体は、先行刺激があることにより、後の刺激によって引き起こされるサイトカイン反応が通常より増強される場合がある。そのため、インフルエンザウイルス感染を引き金として甚急性経過をとる小児の脳症の発生機序として、Toll 様受容体刺激の関与を考慮し、実験的に調べることは重要だと考えた。本研究では、細菌リポ多糖（LPS）による Toll 様受容体先行刺激後に、インフルエンザウイルス重感染をし、その脳浮腫発症における影響を調べ、脳内遺伝子発現プロファイリングを行った。

B . 研究方法

ウイルス： A/Puerto Rico/8/34; H1N1。 50%

マウス致死量 (MLD50)は 6×10^2 pfu/50 μ l.
動物: Balb/c マウス、SPF、5 週令、雌。

実験計画(承認番号:神大・P110910): マウスを 4 グループに分類(PBS、 インフルエンザ (IAV)、 LPS、 LPS+IAV)し、先ず、PBS または LPS (1.25mg/kg, 100ul volume in PBS) を経鼻投与し、12 時間後に、PBS または IAV (100 MLD50 in 50ul PBS) を経鼻投与した。2 日後に、エバンスブルー (EB; 2% in PBS) を腹腔内投与した後、安楽死させ詳細な検索を行った。

脳浮腫の検証: マウスの脳 1.54g を、500 μ l ホルムアミド内で 2 日間 38 ° で EB を抽出 (630nm 波長フィルターで測定)

免疫染色 (IHC): 肺と脳組織を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定、パラフィン包埋切片にし、抗 H1 ウイルス抗体を用いた免疫染色を行った。

ウイルス学的検索: 肺と脳組織に対し、MDCK 細胞を用いたブラック法で検査を行った。

血清サイトカイン濃度測定: 血清 50 μ l を用いて ELISA 法により IL-6 および TNF- α 濃度を測定した (Quantikine Mouse Immunoassay; R&D Systems, USA)。

RNA 抽出とマイクロアレイ解析: 脳幹部分を採取し、全 RNA 抽出キットにて RNA を抽出した (Agilent Technologies, USA)。タカラバイオにマイクロアレイ解析を委託した (Agilent Expression Array 、 SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray)。データマイニングは、Subioplatform (Subio Inc., Japan) を活用した。その後、Gene ontology (GO) 解析を行った (DAVID)。

C . 研究結果

脳浮腫の評価: LPS + IAV 群において、他群と比較して強い脳浮腫が認められた (図 1)。

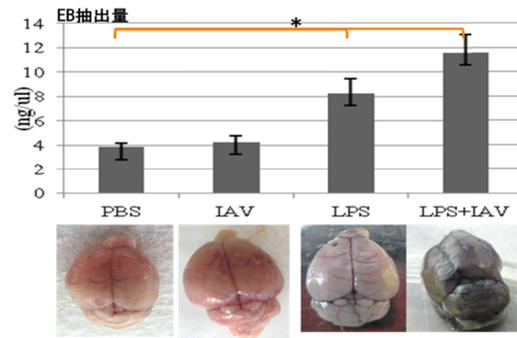
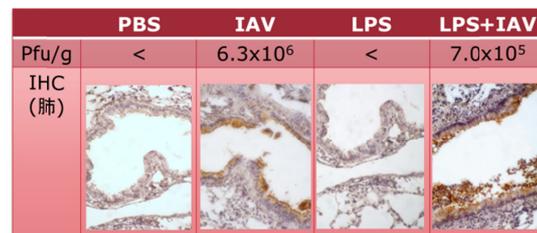


図 1

ウイルス学的/病理学的検索結果: ウイルス感染群では、LPS 処理の有無に関わらず肺へのウイルスの感染が確認された。脳ではウイルスが検出されなかった (図 2)。



<: 検出限界以下

図 2

血清中サイトカイン濃度: LPS+IAV 群において、血清中、IL-6・TNF- α の著しい増加が見られた (図 3)。

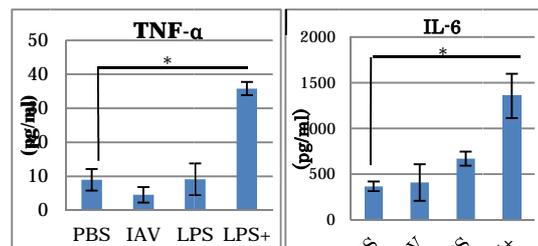


図 3

脳内遺伝子発現: LPS+IAV 群に特異的な遺伝子動態として、309 個の発現上昇、382 個の発現減少が観察された (図 4)。

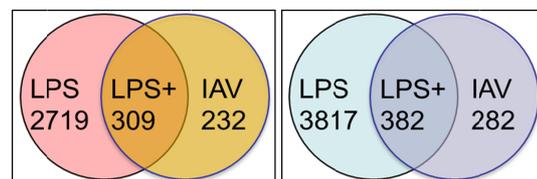


図 4

GO 解析によって、LPS+IAV 群に特異的に発現変動している遺伝子群は、主に、channel

activities、calcium、ion 等であることが判明した (表 1)。

表 1

- calcium ion binding
- passive transmembrane transporter activity
- substrate specific channel activity
- ion channel activity
- gated channel activity
- cation channel activity
- voltage-gated channel activity
- Voltage-gated ion channel activity
- SH3 domain binding
- calcium channel activity
- ion binding
- metal ion binding

Up-regulated Gene Expression

- calcium ion binding
- channel activity
- passive transmembrane transporter activity
- substrate specific channel activity
- ion channel activity
- calcium channel activity
- cation channel activity
- ion binding
- gated channel activity
- metal ion binding
- voltage-gated channel activity
- Voltage-gated ion channel activity
- SH3 domain binding

Down-regulated Gene Expression

D . 考察

本実験で、LPS 先行刺激後の IAV 感染があった場合には、IAV または LPS の単独投与時よりも、強い脳浮腫が惹起されることが示された。この 2 つの物質投与による生体でのアナジー効果は、Toll 様受容体の先行刺激と引き続く IAV 感染の時間的な間隔によってその程度が変化し、12 時間という時間間隔でそのアナジー効果が最大になり易いことが、先行研究に続いて再確認された。

本実験モデルにおいて、強い脳浮腫が起こっている個体の脳内では、calcium、ion および channel の機能に分類される遺伝子が大きく動いていることが判明した。したがって、カルシウムイオンの恒常性のバランス崩壊が脳症発症の一因となっている可能性がある。実際、近年になって糖尿病性脳症の病理発生機序にカルシウムイオンの

関与が報告され、また、急性脳炎または急性脳症の罹患リスク判定にカルシウムイオンチャンネルのサブユニットの遺伝子多型を標的とした判定法が申請されている (特開 2009-112251)。したがって、カルシウムイオンチャンネルの不均衡に陥る原因を探ることは脳症の病態解明の一助となる可能性がある。

E . 結論

脳症発症の一因に、血中高サイトカイン濃度に加えカルシウムイオンの不均衡が関与している可能性がある。

F . 研究発表

1 . 論文発表

Shinya K, et al., J Virol. 2012; 86(11): 6055-66.

Kyan Y, et al., J Med Virol. 2014; 86(5):905-11.

2 . 学会発表

Shinya K, et al., Gene expression profiling in the brains of mice suffering from respiratory disease. 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