

201225051A

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

重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の診断・治療に
関する研究：新規診断・治療に関する提案と検証

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 木戸 博

平成 25 (2013) 年 3 月

目 次

| | | |
|--|-------|----|
| I. 総括研究報告 | | |
| 重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の診断・治療に関する研究：新規診断・治療に関する提案と検証 | | |
| 木戸 博 | ----- | 5 |
| II. 分担研究報告 | | |
| 1. 重症化モデル動物実験によるインフルエンザ肺炎・脳症診断・治療に関する研究：新規診断・治療に関する提案と検証 | | |
| 木戸 博 | ----- | 21 |
| 2. インフルエンザの重症化とサイトカイン、特にインターフェロン産生の機序解明に関する研究 | | |
| 林 日出喜 | ----- | 29 |
| 3. 高病原性鳥インフルエンザH5N1ウイルス感染におけるMSPL/TMPRSS13プロテアーゼ遺伝子の意義の解明【MSPL/TMPRSS13ノックアウトマウスの感染実験】 | | |
| 奥村 裕司 | ----- | 35 |
| 4. ICU入室患者における末梢血アデノシン三リン酸(ATP)と転帰との関係に関する研究 | | |
| 西村 匡司 | ----- | 39 |
| 5. Flu Alarminの検索 | | |
| 久保田 雅也 | ----- | 43 |
| 6. 新型インフルエンザ肺炎・脳症の診断・治療法開発研究 | | |
| 佐々木 信一 | ----- | 49 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- | 55 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷（主なもの） | ----- | 61 |

I. 総括研究報告書

/

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）

（総括）研究報告書

重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の診断・治療に関する研究：

新規診断・治療に関する提案と検証

研究代表者 木戸 博 徳島大学疾患酵素学研究センター・教授

研究要旨

インフルエンザ重症化（肺炎、脳症）の発症機序解明と、早期に重症化診断するためのバイオマーカー、Flu Alarmin の検索、重症化治療薬について解析が行われた。重症化は、インフルエンザサイトカインプロテアーゼ（Trypsin, MMP-9）サイクルが血管内皮細胞、各種臓器で回転することによって起きることを提唱しているが、発症機序、Flu Alarmin、治療薬について図1に示す以下の成果が示された。

1) インフルエンザサイトカインプロテアーゼサイクルの詳細な解析の結果、感染によって増加する Trypsinogen と共に、その活性化酵素の Enterokinase も増加して、速やかに活性型 Trypsin に変換していることが証明された。即ち、サイクルのプロテアーゼ群は、Trypsin, MMP-9, Enterokinase であることが判明した。またこれらのプロテアーゼを増加させるサイトカイン・ケモカイン候補が挙げられ、Flu Alarmin の候補として検証している。

2) 高病原性鳥インフルエンザ H5N1 ウイルス Hemagglutinin (HA) 膜融合領域の RKKR、KKKR 配列を限定分解する酵素に TMPRSS13/MSPL と Furin が見出されている。TMPRSS13/MSPL の KO マウスでは、KKKR 配列 H5N1 ウイルス増殖が強く抑制され、KKKR 配列 H5N1 ウイルス増殖は軽度阻害に留まることが判明した。このことから、KKKR 配列 H5N1 ウイルスは主に TMPRSS13/MSPL が、RKKKR 配列 H5N1 ウイルスは TMPRSS13/MSPL と Furin が感染に係わっていると推定された。

3) インフルエンザ感染重症化に伴う Flu Alarmin として、IL-33、血中 ATP、乳酸、乳酸/ATP 比が検討された。調査した中で乳酸/ATP 比は重症化に伴って有意な変化が見られ、重症化に伴うエネルギー代謝異常が観察された。IL-33 では有意な変化は見られなかった。急性脳症との鑑別が問題となる熱性けいれん重積との比較では、乳酸/ATP 比は有意差を持って高値で、有益なバイオマーカーと推定された。

4) 感染症患者で ICU 入室した重症化患者の予後予測因子として、APACHE II、ATP、乳酸/ATP 比を ROC 解析で検討した結果、乳酸/ATP 比が最も優れた予後予測マーカーで

あることが示された。さらに病状を経時的に示すバイオマーカーと推定された。

5) 感染初期の治療は抗インフルエンザ薬が主体であるが、抗ウイルス薬が適用にならない感染中期以後の重症化では、代謝破綻が重症化の重要な促進因子である。糖代謝破綻が、各種サイトカインによる Pyruvate Dehydrogenase kinase 4 (PDK4) の増加によることを、感染モデルマウスで明らかにした。治療薬として各種 PDK4 阻害剤が検索された結果、PDK4 阻害剤の使用で致死量のウイルス感染でも生存率 100%が証明され、各種臓器 ATP 量の正常化が確認された。小児のインフルエンザ重症化にインフルエンザ脳症がある。インフルエンザ脳症患者の繊維芽細胞では、熱不安定性 Carnitine Palmitoyltransferase II (CPT II) 遺伝子多型が見いだされ、その治療には CPT II の転写を促進してミトコンドリア機能の正常化と ATP 産生を促す高脂血漿治療薬の Bezafibrate が有効であることが示された。

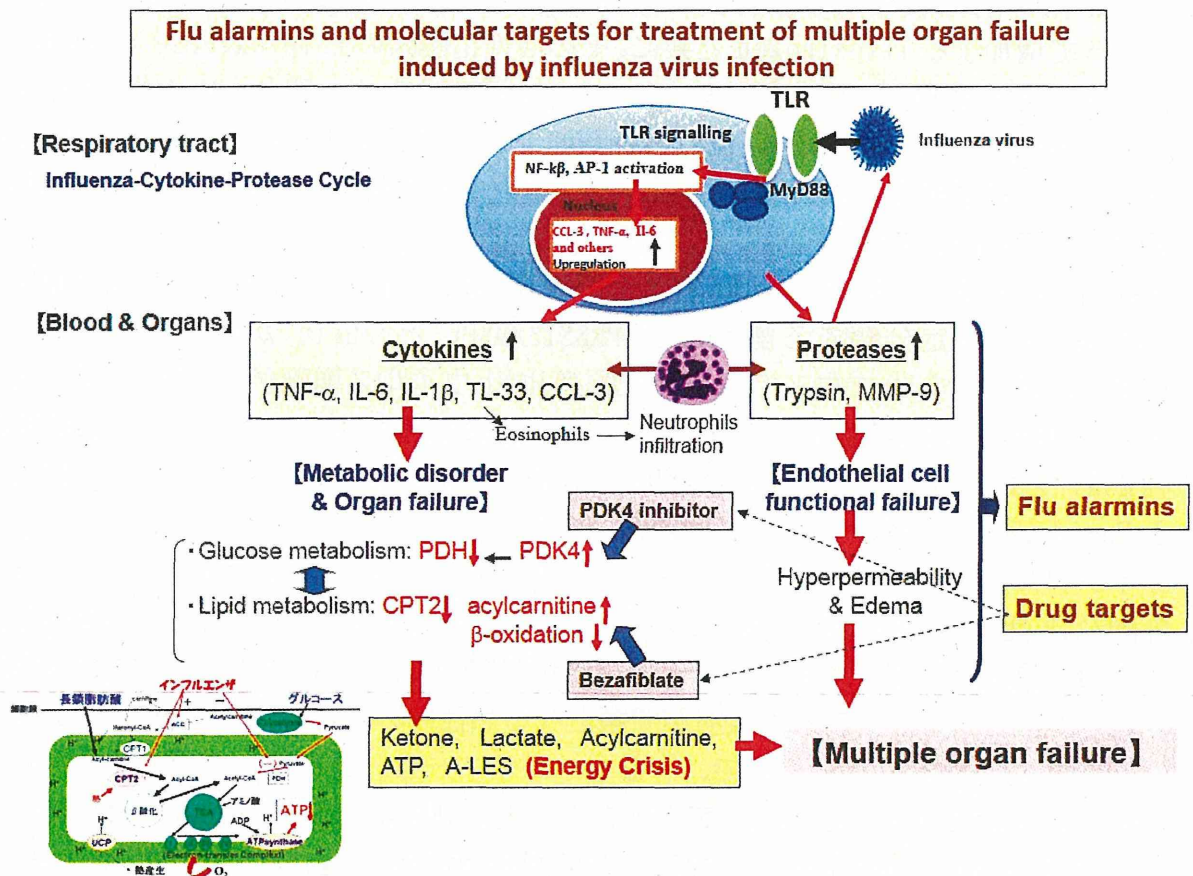


図1. 重症インフルエンザ（肺炎・脳症）の診断・治療に関する新規バイオマーカー、Flu Alarmin 検索と治療の分子標的

研究分担者

- ・木戸博：徳島大学疾患酵素学研究センター・応用酵素疾患代謝研究部門・教授
- ・林日出喜：長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染防因子解析学分野・準教授
- ・奥村裕司：徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部生体栄養学分野・準教授
- ・西村匡司：徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部救急集中治療医学分野・教授
- ・久保田雅也：国立成育医療研究センター神経内科・医長
- ・佐々木信一：順天堂大学医学部附属浦安病院呼吸器内科・準教授

A. 研究目的

重症のインフルエンザによる肺炎・脳症・心筋炎の主要な病因は、血管内皮細胞障害による透過性亢進である。これを基盤に新規診断・治療に関する提案と検証を実施する。インフルエンザ脳症、肺炎の病態解明から、血管内皮と臓器に誘発されるインフルエンザ・サイトカイン・プロテアーゼサイクルが、血管内皮細胞障害と多臓器不全の主要原因であることを解明した (*J Infect Dis* 202:991, 2010, *Cardiovasc Res* 89:596, 2011)。一方サイトカインストームは、血管内皮細胞の sphingosine-1-phosphate (SIP) レセプターのアゴニストで抑制される (*Cell* 146:980, 2011)。本プロジェクトは上記エビデンス相互関係を明らかにして重症化機序と治療法を解明する。

インフルエンザウイルスの増殖にプロテアーゼは必須であるが、インフルエンザウイルスはその遺伝子を持たないため体内の tryptase Clara, trypsin の発現部位でしか増殖できない。しかし感染後は、サイトカ

インを介して各臓器で trypsin を誘導し、ウイルス増殖と血管透過性亢進を引き起こす。僅かなサイクル回転で重度の血管内皮細胞障害が起きるケースに、糖尿病等で既に内皮障害のある場合や、エネルギー源の70%を脂質に依存するエネルギー代謝の盛んな血管内皮は、脂質代謝酵素の遺伝子多型で活性が低下する場合、血管内皮細胞障害が好発する (インフルエンザ脳症)。下記の治療標的が挙げられる。

1) インフルエンザ・サイトカイン・プロテアーゼサイクルの抑制による重症化防止。抗 IFV 薬、プロテアーゼ阻害剤、抗サイトカイン療法を検証する。プロテアーゼ阻害剤は、trypsin と高病原性鳥 IFV の MSPL/TMPRSS13 が標的となる。

2) インフルエンザ感染でミトコンドリア機能と ATP 産生低下が起きるが、原因として糖代謝の低下が pyruvate dehydrogenase (PDH) の活性低下に由来することを見出した。PDH 活性化剤を重症化改善薬として検討する。脂質代謝では carnitine palmytoyl-transferase II (CPT II) の活性低下が脳症患者で好発するが、CPT II の転写促進剤 Bezafibrate で細胞内 ATP レベルの改善を見た。この治療効果を検証する。

3) 重症度診断に末梢血 ATP 測定が有用である事を見出した。臨床検体で検証する。

B. 研究方法

1. 【重症化モデル動物実験】によるインフルエンザ・サイトカイン・プロテアーゼサイクルの検証、Flu Alarmin 検索、治療薬の検証。マウスの重症化モデル動物実験では、重症化しやすい離乳直後の3週齢マウス (C57BL/6CrSlc または、BALB/c) 雌を用いて実験した。インフルエンザウイルス株に

よって感染重症化しやすい臓器が異なるため、インフルエンザ脳症モデルでは Influenza A/WSN/33 (H1N1) 株を、肺炎、心筋炎のモデルでは InfluenzaA/PR/8/34 (H1N1) 株を用いた。

2. 【培養細胞実験系】によるインフルエンザサイトカイン-プロテアーゼサイクルの検証を実施した。サイクル中のプロテアーゼについては、IV型トリプシノーゲンの活性化機序を解明するため、トリプシノーゲン I、II、III型の活性化酵素として知られているエンテロキナーゼ cDNA をクローニングして、293T 細胞に強制発現させてその役割を調査した。Flu Alarmin 検索として感染標的ヒト培養細胞として、A549 細胞、H292 細胞を使用して、インフルエンザウイルス感染によって起きる感染関連遺伝子約 100 種類の発現パターンの変化を調査した。

3. 【MSPL/TMPRSS13 ノックアウトマウスでの感染実験】による、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染におけ MSPL/TMPRSS13 プロテアーゼ遺伝子の意義の解明を実施した。高病原性鳥インフルエンザウイルスは、採取時の RKKKR モチーフを持つ Influenza A/Crow/Kyoto/53/2004 (H5N1) と KKKR モチーフを持つ遺伝子改変ウイルスの 2 種類を使用して感染実験を実施し、ウイルス増殖能と重症化の程度を組織化学的に解析した。

4. 【インフルエンザ脳症患者臨床検体】からの Flu Alarmin 解析。国立成育医療研究センターに入院した急性脳症患者 10 名を対象に、血液採取後に IL-33 の測定を実施した。また、急性脳症 16 例（うち 2 例で急性期と回復期に測定）熱性けいれん重積 6 例、ミトコンドリア病 9 例で、乳酸/ATP 比の検証を実施した。

5. 【ICU 入室患者の臨床検体】からの Flu Alarmin 解析。2009 年 11 月～2010 年 10 月

までに集中治療部に入室した重症患者から血液を経時的に採取し、血液ガス測定装置で pH, PaO₂, PaCO₂, ヘモグロビン値とともに乳酸値を測定した。同時に ATP 測定用の血液を EDTA 含有チューブで -20℃で保存した。重症度評価としては集中治療部に入室 24 時間での APACHE II スコアを計算し用いた。

6. 【呼吸器内科の臨床検体】を用いた Flu Alarmin の検索。順天堂大学医学部附属浦安病院の呼吸器内科が取り扱ったインフルエンザ感染患者検体を用いて、各種検査、サイトカイン、乳酸/ATP 比の検索を実施した。

研究の実施は、図 2 の組織図にある役割分担で実施した。

(倫理面への配慮)

各実施機関毎に、倫理委員会の承認、その他倫理面での配慮の上で実施した。

C. 結果

1. 【重症化モデル動物実験】によるインフルエンザサイトカイン-プロテアーゼサイクルの検証、Flu Alarmin 検索、治療薬の検証。

マウスのインフルエンザ感染モデル実験により、以下の研究結果を得た。①致死性重症化はインフルエンザサイトカイン-プロテアーゼ (Trypsin) サイクルで、血管内皮細胞障害が現れることを強病原性 PR8 株で証明したが、異なる病原性ウイルス株でも程度の異なる障害を証明した。またこのサイクルに関与するプロテアーゼとして、Trypsin 以外に MMP-9 も重症化重要因子であることを明らかにした。②Flu Alarmin の同定：感染初期の炎症性サイトカイン、好中球ケモカイン、IL-33、Pyruvate

Dehydrogenase (PDH) 活性低下、感染中期の血中 Trypsin、MMP-9、乳酸/ATP 比、Acylcarnitine、好中球比の増加が同定された。③重症化の治療薬と予防薬の提案：重症化に先立つ PDH の活性低下、これを導く PDH Kinase (PDK) 4 の選択的増加が糖代謝破綻を導くことを見出し、PDK4 阻害剤の有効性を証明した。糖代謝破綻に連動した脂質代謝破綻を補正する既存薬の Bezafibrate の有用性を見出し、インフルエンザ脳症の患者での、予防的、治療的投与の有用性を推定した。

2. 【培養細胞実験系】によるインフルエンザサイトカイン-プロテアーゼサイクルの検証。

①293T細胞に強制発現させたEKはヒトトリプシノーゲン(hPRSS3-v2)を活性化すること、インフルエンザウイルスの増殖が増進することが示唆された。またいくつかの培養細胞においてEKの発現を確認した。②インフルエンザウイルス感染感受性A549細胞と抵抗性H292細胞でウイルス感染時の遺伝子発現パターンの比較を実施した。その結果、i) 両細胞で同程度発現の上昇がみられた分子：ADAR1、GBP1、GBP2、IFIT1、IFIT2、IFIT3、IFIT5、IFNL3、IRF1、IL6、IRF7、IRF9、ISG15、MDA5、MX1、MYD88、OAS1、OAS2、PKR、RIG-I、TLR3、TNFA。ii) IAV感染感受性A549細胞で、より顕著な発現の上昇がみられた分子：CCL5、IFNB1、IFNL1、IFNL2、IL17F、STAT1。iii) IAV感染抵抗性H292細胞で、より顕著な発現の上昇がみられた分子：AIM2、CXCL10、IFITM1、IFITM2、IFITM3、MX2、PYHIN1、STINGが同定された。

3. 【MSPL/TMPRSS13ノックアウトマウスでの感染実験】による、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染の感染実験。RKKKRモチーフを持つWTのInfluenza A/Crow/Kyoto

/53/2004 (H5N1) ウイルスの増殖は、野生型マウスにおいて著名であったが、ノックアウトマウスでの感染増殖は有意に低下しており、RKKKRモチーフウイルスの増殖にTMPRSS13/MSPLが関与していることが確認された。しかし、増殖が完全に消失したわけではなく、ウイルス増殖が残っていたことから、TMPRSS13/MSPL以外の酵素による感染、増殖が考えられた。その候補としてはこれまでの研究からFurinが考えられる。一方、KKKRモチーフを持つ遺伝子改変(Mut)ウイルスの場合、ウイルスの増殖は野生型マウスにおいても低く、増殖率の低いことが観察された。この場合、ノックアウトマウスではウイルスの増殖がほとんど検出できなかったことから、Mutウイルスの増殖にはTMPRSS13/MSPLが主として関与していると推定された。上記のように、MSPL/TMPRSS13ノックアウトマウスでは、KKKRモチーフを持つウイルスが主に増殖阻害を受けることが判明した。

4. 【インフルエンザ脳症患者臨床検体】からのFlu Alarmin解析。

インフルエンザ脳症の病態解明のためIL-33、血中ATP、乳酸、乳酸/ATP比について急性脳症、熱性けいれん重積での解析を行い、病初期バイオマーカーとしての有用性の検討を行った。またミトコンドリア病における解析も行い急性脳症との病態の異同を検討した。①急性脳症10例中5例で経過中IL-33が検出された。比較的後遺症の重い遅発性拡散低下をともなう急性脳症(AESD)では検出されず比較的予後のよい急性脳症で検出されたことはAESDの発症機序がIL-33-IL33R経路を介さないものであることを示唆する。②乳酸/ATP比は急性脳症急性期では高値、回復期で正常化するパターンが確認された。また急性脳症との鑑

別が常に問題となる熱性けいれん重積と比較すると有意差を持って高値であり発症初期の病態の違いを反映している。乳酸/ATP比が急性脳症急性期と種々のミトコンドリア病の患者での値と有意差がなかったことはミトコンドリアを場とする共通の energy failure が起こっている可能性を示唆する。

5. 【ICU入室患者の臨床検体】からの Flu Alarmin 解析。

①健常成人155人の末梢血ATPを測定した。20歳未満、以後は10歳毎に70歳未満まで、70歳以上の8段階の年齢層に分けて比較した。ATP、乳酸値、乳酸/ATP比、いずれも年齢層による差はなかった。性別による差も認めなかった。全155人の値はそれぞれATP 0.62 ± 0.19 mM、乳酸値 1.19 ± 0.50 mM、乳酸/ATP比 2.00 ± 0.83 であった。

②集中治療部に入室した患者では92人を対象とした。死亡患者は生存患者と比較して有意に入室24時間でのAPACHE IIスコアが高かった。一方、入室時のATP（ヘモグロビン補正後）および乳酸/ATP比は生存患者、死亡患者で差を認めなかった（それぞれ 0.43 ± 0.13 vs. 0.40 ± 0.28 、 9.6 ± 8.6 vs. 16.8 ± 17.2 ）。しかし、入室翌日の値はATPでは差を認めなかったが、乳酸/ATP比は死亡患者で悪化傾向にあった。中でも、基礎疾患として感染症患者で乳酸/ATP比の予後判定予測が最も良かった。

6. 【呼吸器内科の臨床検体】を用いた Flu Alarmin の検索。

インフルエンザ脳症、重症肺炎症例をいち早く診断するバイオマーカーの解明と確立を目的とし、インフルエンザ患者血清および気管支肺胞洗浄液検体からのATPをはじめとした各種バイオマーカー検査体制を整え、A型インフルエンザ患者検体を用いて検討を行った。まだ症例数が少ないが、今後

症例を増やして、さらなる検討を続けて行く。特に重症肺炎症例を中心に検索して行く。

D. 考察

1. 【重症化モデル動物実験】によるインフルエンザサイトカイン-プロテアーゼサイクルの検証、Flu Alarmin 検索、治療薬の検証。

①インフルエンザサイトカイン-プロテアーゼサイクルのプロテアーゼメンバーとして血管基底膜のタイプIVコラーゲンの分解酵素、MMP-9の増加は、重症化に伴う血管の透過性の亢進を引き起こす直接の原因になっていると推定された。さらに発現増加するPro-MMP9のMMP-9への転換に、同じく発現増加したトリプシンが最も効率良く作用していることが明らかになり、両者の相乗効果で増悪が加速されると推定された。

②致死量のインフルエンザウイルスに感染させたマウスの血液では、IL-33、Trypsin、MMP-9、Acylcarnitine、好中球比の増加が観察されたが、Flu Alarminとしてのそれぞれの因子の重み付けは、今後の課題である。しかし、乳酸/ATP比については、マウスの重症度と深く関係していることが示され、重症化は体内代謝の破綻、特にエネルギー代謝に深く関係することが明らかとなった。

3. 【MSPL/TMPRSS13 ノックアウトマウスでの感染実験】による、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染の感染実験。今回の実験では、Furin ノックアウトマウスが致死性であるため、MSPL/TMPRSS13 ノックアウトマウスだけの実験である。細胞培養系の実験では、MSPL/TMPRSS13はRKKKRモチーフとKKKRモチーフのH5N1ウイルスの増殖に関与し、FurinはRKKKRモチーフH5N1ウイルスのみの増殖に関与することが判明している。

MSPL/TMPRSS13 ノックアウトマウスの実験では、MSPL/TMPRSS13 が KKKR モチーフ H5N1 ウイルスの増殖に関与していることが、動物実験で確認され、RKKKR モチーフ H5N1 ウイルスの増殖に部分的に関与しており、Furin も増殖に深く関与していることが実証された。

4. 【インフルエンザ脳症患者臨床検体】からの Flu Alarmin 解析。

①臨床検体に解析からは、気道組織がウイルス等で障害された際に極初期に増加することが示唆されてきた IL-33 は、重症化を予測する Flu Alarmin にはならないことが示唆された。今回の IL-33 測定で比較的後遺症の重い遅発性拡散低下をとまなう急性脳症 (AESD) では検出されず比較的予後のよい急性脳症で検出されたことは AESD の発症機序が IL-33-IL33R 経路を介さないものであることを示唆している。②乳酸/ATP 比は急性脳症急性期では高値、回復期で正常化するパターンが確認された。また急性脳症との鑑別が常に問題となる熱性けいれん重積と比較すると有意差を持って高値であり発症初期の病態の違いを反映していた。

5. 【ICU 入室患者の臨床検体】からの Flu Alarmin 解析。

インフルエンザ感染症では重症化機序に熱不安定性フェノタイプによる ATP 産生不全が関与していると報告され、熱中症患者の重症化にも同様の機序の関与が示唆されている。これら以外の疾患、特に敗血症では ATP 産生不全が重症化の病態に関与している可能性が推定された。患者の予後予測には APACHE II スコアがあるが、経時的な変化をとらえることはできない。今回の解析から、乳酸/ATP 比は簡便に測定できるとともに、経時的変化を追うことができる点で従来のスコアより優れている可能性がある。

6. 【呼吸器内科の臨床検体】を用いた Flu Alarmin の検索。

本年度は、倫理委員会承認後、検体処理から測定系を構築することができた。今シーズン (インフルエンザシーズン) は 3 症例のみの測定となっているが、今後は多くの患者をリクルートすると共に、インフルエンザ以外の ARDS 症例 (細菌性肺炎、敗血症、重症外傷等) においても検討を予定している。

E. 結論

①インフルエンザ—サイトカイン—プロテアーゼサイクルの詳細な解析の結果、感染によって増加する Trypsinogen、Pro-MMP-9 と共に Enterokinase も増加して、これら 3 種のプロテアーゼの相乗効果が、重症化に関与していると示唆された。②高病原性鳥インフルエンザ変異株 KKKR 配列 H5N1 ウイルスは、野生株の RKKKR 配列 H5N1 ウイルスに比べて、野生型マウスでの感染増殖能は低いことが判明した。さらに MSPL/TMPRSS13 ノックアウトマウスの実験から、KKKR 配列 H5N1 ウイルスの増殖には主に TMPRSS13/MSPL が、RKKKR 配列 H5N1 ウイルスの増殖には TMPRSS13/MSPL と Furin が関わっていると推定された。

③感染重症化に伴う Flu Alarmin として、乳酸/ATP 比は重症化に伴って有意な変化が見られ、重症化に伴うエネルギー代謝異常が観察された。他の因子は今後更に症例数を増加させて検討する必要がある。④感染の重症化は、代謝破綻が重要な促進因子である。糖代謝破綻は、各種サイトカインによる Pyruvate Dehydrogenase kinase 4 (PDK4) の増加によることを、感染モデルマウスで明らかにした。治療薬として各種 PDK4 阻害剤の有効性が証明された。小児の

インフルエンザ脳症では、熱不安定性 CPT II 遺伝子多型が見いだされ、治療には CPT II の転写を促進する Bezafibrate の有効性が示された。

F. 健康被害情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Takahashi E, Kataoka K, Indalao IL, Konoha K, Fujii K, Chida J, Mizuno D, Fijihashi K, Kido H. Oral clarithromycin enhances airway immunoglobulin A (IgA) immunity through induction of IgA class switching recombination and B-cell-activating factor of the tumor necrosis factor family molecule on mucosal dendritic cells in mice infected with influenza A virus. *J. Virol.* 86(20): 10924-10934, 2012.
- (2) Cissé Y, Inoue I, Kido H. Oseltamivir reduces hippocampal abnormal EEG activities after influenza A virus infection in isoflurane-anesthetized rats. *J. Exp. Pharmacol.* 4:69-76, 2012.
- (3) Kubota M, Chida J, Hoshino H, Kashii H, Ozawa H, Koide A, Hoshino A, Koyama A, Mizuno Y, Yamaguchi M, Yao D, Yao M, Kido H. Thermolabile CPT II variants and low blood ATP levels are closely related to severity of acute encephalopathy in Japanese children. *Brain Dev* 34(1):20-27, 2012.
- (4) Fujimoto C, Takeda N, Matsunaga A, Sawada A, Tanaka T, Kimoto T, Shinahara W, Sawabuchi T, Yamaguchi M, Hayama M, Yanagawa H, Yano M, Kido H. Induction and maintenance of anti-influenza antigen-specific nasal secretory IgA levels and serum IgG levels after influenza infection in adults. *Influenza Other Respi Viruses* 6(6):396-403, 2012.
- (5) Hoshino A, Saitoh M, Oka A, Okumura A, Kubota M, Saito Y, Takanashi JI, Hirose S, Yamagata T, Yamanouchi H, Mizuguchi M. Epidemiology of acute encephalopathy in Japan, with emphasis on the association of viruses and syndromes. *Brain Dev.* 34:337-343, 2012
- (6) Saitoh M, Shinohara M, Hoshino H, Kubota M, Amemiya K, Takanashi JL, Hwang SK, Hirose S, Mizuguchi M. Mutations of the SCN1A gene in acute encephalopathy. *Epilepsia* 53: 558-564, 2012
- (7) Shinohara, M, Saitoh, M, Nishizawa, D, Ikeda, K, Hirose, S, Takanashi, JI, Takita J, Kikuchi K, Kubota M et al. ADORA2A polymorphism predisposes children to encephalopathy with febrile status epilepticus. *Neurology.* 2013 (in press)
- (8) Kubo Y, Hayashi H, Matsuyama T, Sato H, Yamamoto N. Retrovirus entry by endocytosis and cathepsin proteases. *Adv Virol.* 2012:640894, 2012

- (9) Kohno T, Kubo Y, Yasui K, Haraguchi M, Shigematsu S, Chua KJ, Matsuyama T, Hayashi H. Serum starvation activates NF- κ B through G protein β 2 subunit-mediated signal. *DNA Cell Biol*. 31(11):1636-1644, 2012.
- (10) Kamiyama H, Kakoki K, Shigematsu S, Izumida M, Yashima Y, Tanaka Y, Hayashi H, Matsuyama T, Sato H, Yamamoto N, Sano T, Shidoji Y, Kubo Y. CXCR4-Tropic, But Not CCR5-Tropic, Human Immunodeficiency Virus Infection Is Inhibited by the Lipid Raft-Associated Factors, Acyclic Retinoid Analogs, and Cholera Toxin B Subunit. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012 (in press)
- (11) Nagashima O, Ohashi R, Yoshioka Y, Inagaki A, Tajima M, Koinuma Y, Iwakami S, Iwase A, Sasaki S, Tominaga S, Takahashi K. High prevalence of gene abnormalities in young patients with lung cancer. *J Thorac Dis* 5:27-30, 2013
- (12) Muraki K, Koyama R, Honma Y, Yagishita S, Shukuya T, Ohashi R, Takahashi F, Kido K, Iwakami S, Sasaki S, Iwase A and Takahashi K. Hydration with magnesium and mannitol without furosemide prevents the nephrotoxicity induced by cisplatin and pemetrexed in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis* 4(6):562-568, 2012.
- (13) Mori T, Tajima K, Hiramama M, Sato T, Kido K, Iwakami S, Sasaki S, Iwase A, Shiomi K, Maeda M, Hino O, Takahashi K. The n-erc index is a novel monitoring and prognostic marker for advanced malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Dis* 5:145-148, 2013
- (14) 門屋講太郎, 吉岡泰子, 難波由喜子, 桂 蓉子, 高 遼, 小池建吾, 吉岡正剛, 佐々木信一, 富永 滋, 高橋和久. 肺膿瘍・膿胸 7 例における歯周病細菌 PCR 検査の臨床的意義の検討. 日本呼吸器学会雑誌 2:79-84, 2013
- (15) Takeda S, Kotani T, Nakagawa S, Ichiba S, Aokage T, Ochiai R, Taenaka N, Kawamae K, Nishimura M, Ujike Y, Tajimi K. Extracorporeal membrane oxygenation for 2009 influenza A (H1N1) severe respiratory failure in Japan. *J Anesth* 26: 650-657, 2012.
- (16) Chida J, Ono R, Yamane K, Hiyoshi M, Nishimura M, Onodera M, Nakataki E, Shichijo K, Matushita M, Kido H. Blood lactate/ATP ratio, as an alarm index and real-time biomarker in critical illness. *PLoS One* 8(4):e60561, 2013

2. 学会発表

- (1) 山根 一彦、日吉 峰麗、荒木 光、榎本 奈緒子、山本 善一、埴 雅明、木戸 博。インフルエンザ感染による重症化と多臓器不全の新たな治療標的とその治療法の開発：diisopropylamine dichloroacetate (DADA) による糖代謝改善を基盤とした energy crisis の回避。第 85 回日本生化学会大会。平成 24 年 12 月 14-16 日(福岡国際会議場)

- (2) 荒木光、日吉峰麗、山根一彦、榎本奈緒子、木戸博。I 型糖尿病におけるインフルエンザ感染重症化の解析。第 85 回日本生化学会大会。平成 24 年 12 月 14-16 日 (福岡国際会議場)
- (3) 高橋悦久、奥村裕司、Irene Lorinda Indalao、木葉敬子、木戸博。II 型膜結合型セリンプロテアーゼの MSP L /TMPRSS13 のノックアウトマウスは高病原性鳥インフルエンザウイルスの増殖を抑制する。第 85 回日本生化学会大会。平成 24 年 12 月 14-16 日 (福岡国際会議場)
- (4) 木葉敬子、高橋悦久、片岡宏介、Irene Lorinda Indalao、木戸博。インフルエンザ感染時のタミフル服用により低下した気道粘膜 IgA はクラリスロマイシンと併用することによって改善される。第 85 回日本生化学会大会。平成 24 年 12 月 14-16 日 (福岡国際会議場)
- (5) Irene Lorinda Indalao, Etsuhisa Takahashi, Keiko Konoha, Hiroshi Kido. Studies on the differences in the host cellular responses by different influenza virus strains and subtypes. 第 85 回日本生化学会大会。平成 24 年 12 月 14-16 日 (福岡国際会議場)
- (6) 日吉峰麗、矢野仁康、木戸博。ヒト内皮細胞に感染したインフルエンザウイルスは、アドヘレンスジャンクソンの崩壊を誘導する。第 85 回日本生化学会大会。平成 24 年 12 月 14-16 日 (福岡国際会議場)
- (7) 小野寺睦雄、中瀧恵実子、千田淳司、今中秀光、木戸博、西村匡司。ICU 入室患者における抹消血アデノシン三リン酸 (ATP) と転帰との関係。本集中医治療医学会総会。平成 24 年 2 月 28-3 月 1 日 (千葉幕張メッセ)
- (8) Y. Namba, S. Sasaki, R. Ko, A. Ishimori, M. Yoshioka, Y. Yoshioka, S. Tominaga, K. Takahashi: Early Intervention Could Be Beneficial In Early-Stage Nontuberculous Mycobacterium Lung Disease. 2012 American Thoracic Society (ATS) International Conference, San Francisco, 2012. 05. 22
- (9) 石森絢子, 佐々木信一, 門屋講太郎, 高 遼, 難波由喜子, 吉岡正剛, 吉岡泰子, 中澤武司, 富永 滋: 気管支鏡後の粘液栓子喀出で軽快した、スエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) による気管支粘液栓の 1 例. 第 199 回日本呼吸器学会関東地方会, 東京, 2012. 05. 26
- (10) 佐々木信一: 感染対策の基礎と実践〜順天堂大学医学部附属浦安病院 Team “JIN” の軌跡〜. 越谷市立病院・感染対策講習会特別講演, 2012. 06. 18
- (11) 高 遼, 佐々木信一, 難波由喜子, 石森絢子, 吉岡正剛, 吉岡泰子, 富永 滋, 高橋和久: Fexofenadine による tyrosine kinase inhibitor (TKI) 投与に伴う interstitial lung disease (ILD) 発症抑制効果についての

検討. 第10回日本臨床腫瘍学会学術集会, 大阪, 2012. 07. 27

- (12) 南條友央太, 佐々木信一, 松野 圭, 難波由喜子, 石森絢子, 吉岡正剛, 吉岡泰子, 富永 滋: ニューモシスチス肺炎加療経過中に著明な嚢胞性変化をきたし、気胸を繰り返した AIDS の 1 例. 第 201 回日本呼吸器学会関東地方会, 横浜, 2012. 09. 15
- (13) 南條友央太, 佐々木信一, 井上貴昭, 大日向 薫, 中沢武司, 堀 賢: コリスチンの髄注および静注にて救命し得た *Acinetobacter baumannii* の 1 例. 第 61 回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 東京, 2012. 10. 11
- (14) 南條友央太, 佐々木信一, 松野 圭, 石森絢子, 牧野文彦, 吉岡正剛, 吉岡泰子, 富永 滋: *Nocardia wallacei* が検出され, ST 合剤投与で軽快した気管支拡張症の 1 例. 第 202 回日本呼吸器学会関東地方会, 東京, 2012. 11. 10
- (15) 井上貴昭, 中沢武司, 麻生恭代, 成田久美, 秋田美佳, 石井 幸, 田中 裕, 大日方 薫, 佐々木信一, 堀 賢: 外科領域での多剤耐性菌対策 救命センターに発端をなす耐性 *Acinetobacter Baumannii* アウトブレイクとその制御過程. 第 25 回日本外科感染症学会・学術集会, 千葉, 2012. 11. 21
- (16) 上原久明, 吉岡正剛, 松野 圭, 石森絢子, 南條友央太, 牧野文彦, 吉岡泰子, 中沢武司, 佐々木信一, 富永 滋: 抗原隔離と吸入ステロイドにて軽快した夏型過敏性肺炎の 1 例. 第 593 回日本内科学会関東地方会, 東京, 2012. 12. 08
- (17) 佐々木信一, 中沢武司: 多剤耐性菌保有患者の管理と環境整備～当院 outbreak 事例から～. 第 24 回臨床微生物学会総会・ICD 講習会, 横浜, 2013. 02. 03
- (18) 中村 愛, 吉岡正剛, 松野 圭, 石森絢子, 牧野文彦, 吉岡泰子, 佐々木信一, 富永 滋: Stevens-Johnson 症候群後に発症した閉塞性細気管支炎の 1 例. 第 203 回日本呼吸器学会関東地方会, 東京, 2013. 02. 23
- (19) 佐々木信一: 間質性肺炎診療の最近の潮流～特発性肺線維症 (IPF) とその周辺～. 江戸川区医師会学術講演会, 東京, 2013. 03. 16
- (20) Hayashi H, Identification of poly (I:C)-induced pancreatitis-related genes in IRF2-deficient mice, 3rd International conference on “Current advances in Microbiology and Immunology” June 21-22, 2012 (ULANBAATAR, MONGOLIA)
- (21) ATL 細胞株の細胞死を TRAIL-依存性に促進させる生物活性物質のスクリーニング, 林日出喜, 長谷川寛雄, 河野友子, 中尾一彦, 松山俊文, 第 71 回日本癌学会学術総会, 平成 24 年 9 月 19~21 日 (札幌)
- (22) 血清枯渴は G Protein $\beta 2$ を介した NF- κ B 経路を活性化する, 安井 潔

河野友子、久保嘉直、原口恵、重松小百合、蔡君柔、松山俊文、林日出喜、第 35 回日本分子生物学会、平成 24 年 12 月 13 日 (マリンメッセ福岡)

H. 知的財産権の出願・登録状況

- (1) 特許出願 PDK4 INHIBITOR AND THE USE THEREOF U. S. Provisional Application 643103001100 ;12April 2012; Satoshi OMURA, Hirofumi NAKANO, Kenzaburo YAMAJI, Tsuyoshi YAMAMOTO, Hitoshi KIDO, Junji CHIDA, Kazuhiko YAMANE 2012
- (2) 特許出願 インフルエンザの治療剤または予防剤 木戸博、千田淳司 他、PCT2012/101846 2012
- (3) 特許出願 インフルエンザウイルス感染症の予防・治療剤 木戸博、千田淳司、山根一彦、他 特願2012-160999 2012
- (4) 特許出願 熱中症に対する発症感受性や発症耐性の判定方法 木戸博 PCT/JP2012/004209 2012

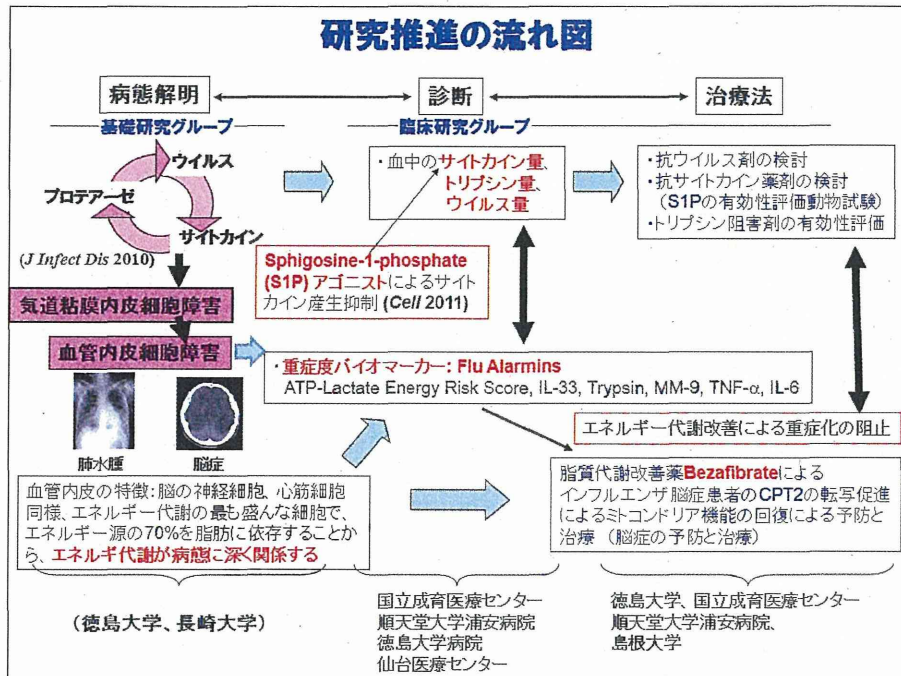


図2. 研究組織図

II. 分担研究報告書

分担研究報告書

平成24年度厚生労働科学研究費補助金「重症のインフルエンザによる肺炎・
脳症診断・治療に関する研究：新規診断・治療に関する提案と検証」

分担研究報告書

重症化モデル動物実験によるインフルエンザ肺炎・脳症診断・治療に関する研究：
新規診断・治療に関する提案と検証

研究分担者 木戸博（徳島大学疾患酵素学研究センター 教授）
研究協力者 日吉峰麗（徳島大学疾患酵素学研究センター 助教）
高橋悦久（徳島大学疾患酵素学研究センター 特任助教）
山根一彦（徳島大学疾患酵素学研究センター 大学院生）
Irene Lorinda Indalao（徳島大学疾患酵素学研究センター 大学院生）
木葉敬子（徳島大学疾患酵素学研究センター 研究員）
荒木光（徳島大学疾患酵素学研究センター 大学院生）
榊本奈緒子（徳島大学疾患酵素学研究センター 研究員）

研究要旨

マウスのインフルエンザ感染モデル実験により、以下の研究結果を得た。①致死性重症化はインフルエンザサイトカインプロテアーゼ (Trypsin) サイクルで、血管内皮細胞障害が現れることを強い病原性を示す PR8 株で証明したが、異なる病原性ウイルス株でも程度の異なる障害を証明した。またこのサイクルに関与するプロテアーゼとして、Trypsin 以外に MMP-9 も重症化重要因子であることを明らかにした。また MMP-9 の前駆体 Pro-MMP-9 の MMP-9 への変換に Trypsin が大きく作用していることを、RNAi を用いて Trypsin の発現抑制することで証明した。②Flu Alarmin の同定：感染初期の炎症性サイトカイン、好中球ケモカイン、IL-33、Pyruvate Dehydrogenase (PDH) 活性低下、感染中期の血中 Trypsin、MMP-9、乳酸/ATP 比、Acylcarnitine、好中球比の増加が同定された。これらの中で、Flu Alarmin としての意義づけを検討して行く。中でも乳酸/ATP 比は、代謝破綻特にエネルギー代謝破綻を示すバイオマーカーとして、有益なパラメーターと考えている。③重症化の治療薬と予防薬の提案：重症化に先立つ PDH の活性低下、これを導く PDH Kinase (PDK) 4 の選択的増加が糖代謝破綻を導くことを見出し、PDK4 阻害剤の有効性を証明した。また糖代謝破綻に連動した脂質代謝破綻を補正する既存薬の Bezafibrate が、長鎖脂肪酸代謝酵素の転写促進因子として作用し、インフルエンザ脳症の患者で見られる熱不安定性 Carnitine Palmitoyltransferase II (CPT II) の転写を促進して、ミトコンドリア機能、エネルギー代謝を改善させることを見出した。今後、Bezafibrate の予防的、治療的投与の有用性を実証する。

A. 研究目的

重症のインフルエンザによる肺炎・脳症・心筋炎の主要な病因は、血管内皮細胞障害による透過性亢進である。これを基盤に新規診断・治療に関する提案のための検証を実施した。インフルエンザ脳症、肺炎の病態解明から、図1に示すように血管内皮と臓器に誘発されるインフルエンザ-サイトカイン-プロテアーゼサイクルが、血管内皮細胞障害と多臓器不全の主要原因であることを解明してきた (*J Infect Dis* 202:991, 2010、*Cardiovasc Res* 89:596, 2011)。

そのため重症化の治療には、このサイクルの回転を抑制することが考えられる。

- ①インフルエンザ-サイトカイン-プロテアーゼサイクルの抑制による重症化防止。抗インフルエンザ薬、プロテアーゼ阻害剤、抗サイトカイン療法を検証する。プロテアーゼ阻害剤は、trypsin と高病原性鳥インフルエンザの MSPL/TMPRSS13 が標的となる。
- ② インフルエンザ感染でミトコンドリア機能とエネルギー代謝の障害、ATP 産生低下が起きる。その原因として PDH の活性低下が、糖代謝の破綻を引き起こしていることを示唆するデータを得ていた。本年度はこれを確認すると共に、PDH の活性低下を改善する薬剤を検討する。脂質代謝では CPT II の活性低下がインフルエンザ脳症患者で好発するが、CPT II 転写促進剤の Bezafibrate の作用を確認して、ミトコンドリア機能とエネルギー代謝の改善を検討する。
- ③モデル実験動物での各種 Flu Alarmin 候補を検索して、重症化に先立つ生体の SOS マーカーを同定する。

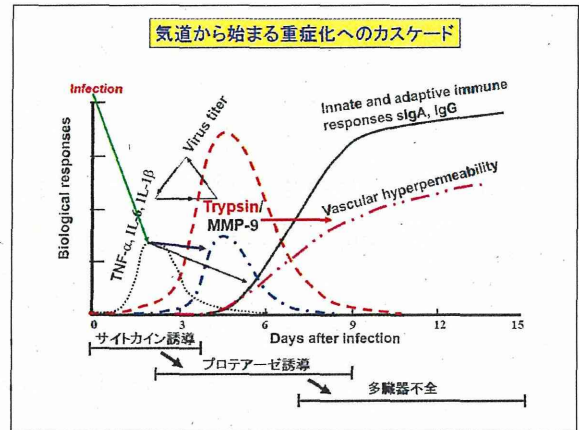


図1. 感染重症化のカスケード

B. 研究方法

マウスの重症化モデル動物実験では、重症化しやすい離乳直後の3週齢マウス (C57BL/6CrSlc または、BALB/c) 雌を用いて実験した。インフルエンザウイルス株によって感染重症化しやすい臓器が異なるため、インフルエンザ脳症モデルでは Influenza A/WSN/33 (H1N1) 株を、肺炎、心筋炎のモデルでは Influenza A/PR/8/34 (H1N1) 株を用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験に当たっては、徳島大学動物実験委員会の承認を得て、動物実験ガイドラインに沿って実施した。

C. 研究結果

マウスのインフルエンザ感染モデル実験により、以下の研究結果を得た。

- ①致死性重症化はインフルエンザ-サイトカイン-プロテアーゼ (Trypsin) サイクルで、血管内皮細胞障害が現れることを強病原性 PR8 株で証明したが、異なる病原性ウイルス株でも程度の異なる障害を証明した。またこのサイクルに関与するプロテアーゼとして、Trypsin 以外に MMP-9 も重症化重要因子であることを明らかにした。さらに Trypsin は MMP-9 が Pro-MMP-9 から活性型 MMP-9 に変換

する時に相互作用しており、相乗作用のあることを細胞培養系を用いて明らかにした。図2は Cardiomyocyte H9c2 cells (ATCC) に PR8 ウイルスを感染させて、Trypsin、pro-MMP-9 遺伝子の増加を確認した後、このシステムに Trypsin 阻害剤の Aprotinin を添加して Trypsin 活性を抑制した。その結果、Pro-MMP-9 から活性型 MMP-9 に変換が抑制されていることが判明した。このことは、Trypsin と MMP-9 は相乗作用によって血管周囲の組織を崩壊することが示唆された。

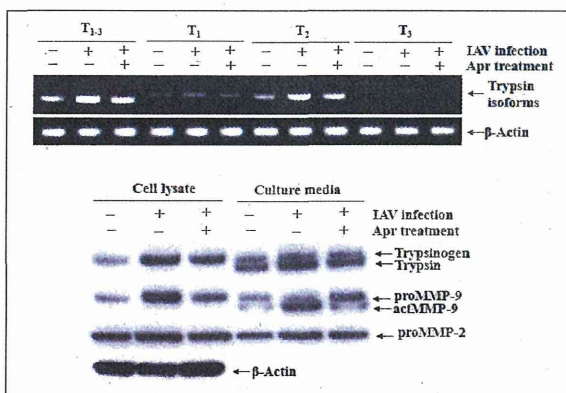


図2. Cardiomyocyte H9c2 にインフルエンザウイルス (IAV) を感染させた際の Trypsin, MMP-9, MMP-2 の発現。Trypsin アイソフォーム (T1, T2, T3) の発現と Trypsin 阻害剤 Aprotinin (Apr) の効果を示す。

②Flu Alarmin の同定：感染モデル動物実験で、感染初期の血中の炎症性サイトカイン、好中球ケモカイン、IL-33 の増加、Pyruvate Dehydrogenase (PDH) 活性低下が検出され、感染中期の血中の Trypsin、MMP-9、乳酸/ATP 比 (A-LES)、Acylcarnitine、好中球比の増加が検出された。これらのマーカーと重症化との関係解析から、Flu Alarmin を同定して行く。中でも代謝破綻を良く表すマーカーが、乳酸/ATP 比であることから、臨床検体での調査も行った。体内のエネルギー通貨としての ATP と、その供給源である糖代謝の流れが悪

くなった時に蓄積する中間代謝産物の乳酸を測定のパラメーターとする A-LES 値は、重症度と密接に関係していることが判明した。図3に A-LES 値、ATP 測定値が、患者の予後診断の能力において 14 項目から成る APACHE II とほぼ同等であることが、Receiver Operating Characteristic (ROC) 解析で明らかにされた (図3 (A))。さらに図3 (B) は、ICU からの軽快退出者 (左) と重症化死亡者 (右) の A-LES 値の推移を比較しており、A-LES 値がいかに予後判定に適しているかが判る。

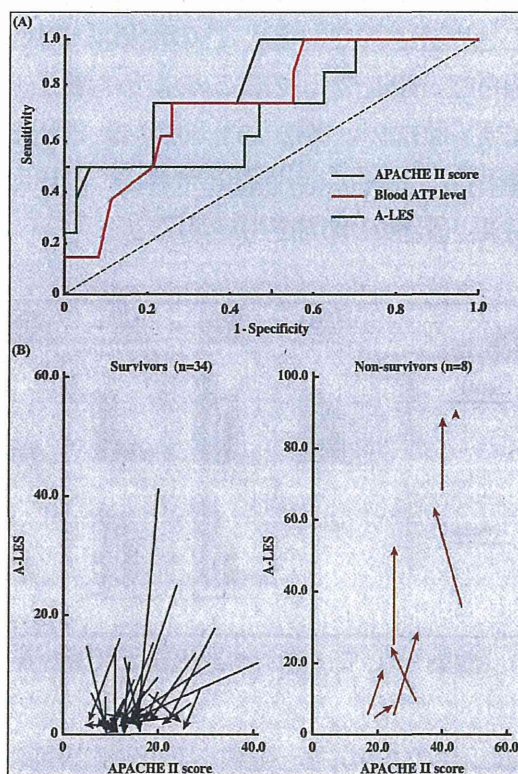


図3. APACHE II、血液 ATP、A-LES 値の ROC 解析(A)と、軽快退室者 (左) と死亡者 (右) に分けて示す。

③重症化の治療薬と予防薬の提案：重症化に先立つ PDH の活性低下、これを導く PDH Kinase (PDK) 4 の選択的増加が糖代謝破綻を導くことを見出し、PDK4 阻害剤の有効性を証明した。図4はインフルエンザ感染による血液中のサイトカインの増加 (サイトカインストーム) によってエネルギー代謝不全が起き