

る経路の予想図である。

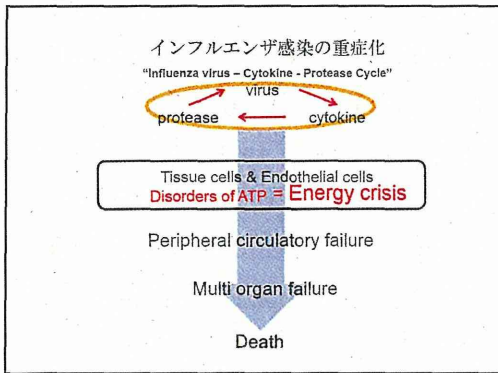


図4. サイトカインとエネルギー代謝不全

重症化は感染の中、後期に発症するが、図5に感染の進行に伴って PDK4 が急速に増加することが示されている。この現象は PDK4 に特異的で、PDK1, 2, 3 ではこのような激しい増加は見られない。増加した PDK4 は、PDH をリン酸化して PDH の活性低下を導き、ATP の産生成果と乳酸の増加を引き起こす。

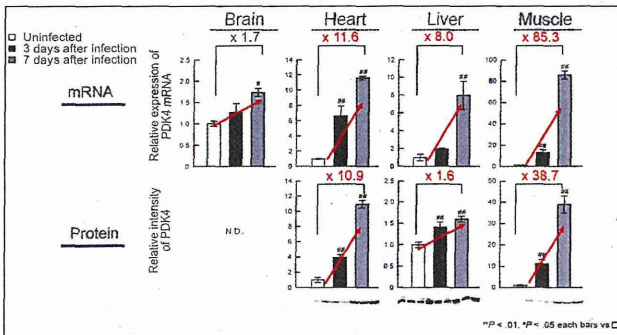


図5. 感染3日、7日目の各種臓器のPDK4値

上記に示したエネルギー危機を PDK4 阻害剤の DADA(Diisopropylamine dichloroacetate)で治療したマウスの生存率の改善 (100%生存を達成)、PDH 活性、ATP レベルの回復を図6、図7にそれぞれ示す。

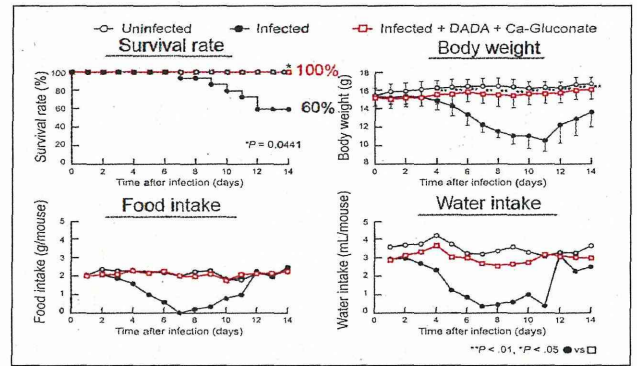


図6. DADA を処理したマウスはインフルエンザ感染マウスに特徴的な体重減少、摂食、摂水の低下は極軽度で、生存率も60%から100%に改善された。

図6で示した DADA の投与の有無による感染7日目の各臓器の PDH 活性の回復と、各臓器の ATP レベルを図7に示す。PDH 活性は、非感染レベルにまで回復しており、ATP レベルの回復も著名であった。このことは、エネルギー代謝の中で糖代謝の占める割合の大きさと、DADA の有効性が評価された。

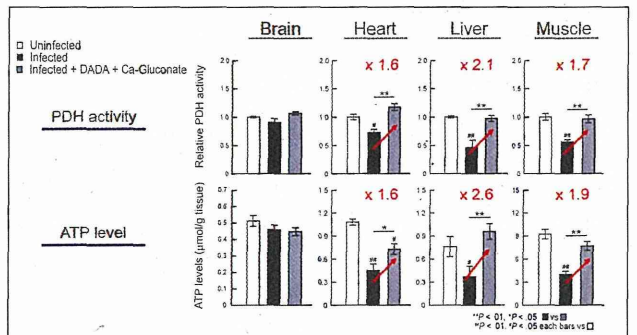


図7. インフルエンザ感染マウスへの DADA の効果

これまでに、糖代謝の破綻に連動した脂質代謝破綻も生じることを報告してきたが、脂質代謝の破綻し易い乳幼児として、熱不安定性 CPT II 遺伝子多型があり、インフルエンザ脳症患者者に集積していることを報告してきた。この治療として、熱に弱い CPT II であるが転写を活性化してミトコンドリア内の酵素量を増加させることで、酵素活性の低下(後天性酵素欠損症状態)を補う薬物を見出した。高脂血漿治療薬の Bezafibrate は、CPT II を

含む脂質代謝酵素群を転写因子の PPAR $\delta$  を介して発現増加を誘導して高脂血漿を治療している。我々は熱不安定性 CPT II 遺伝子多型を示すインフルエンザ脳症患者の Fibroblast を用いて、Bezafibrate の有効性を検証した。図 8 に示すように、41 度の高熱によって失活した CPT II は、細胞内の ATP 量の減少を引き起こすが、Bezafibrate の添加と CPT II の安定化剤の Carnitine を同時添加することで、細胞内の ATP は回復して、ほぼ加熱処理以前の状態にまで回復した。図にはしめていないが、ミトコンドリア膜電位を測定する JC-1 色素を用いて Bezafibrate の添加と Carnitine の効果を検討したところ、ミトコンドリアの膜電位改善は ATP の回復よりも敏感に反応して、改善されていたことが判明した。

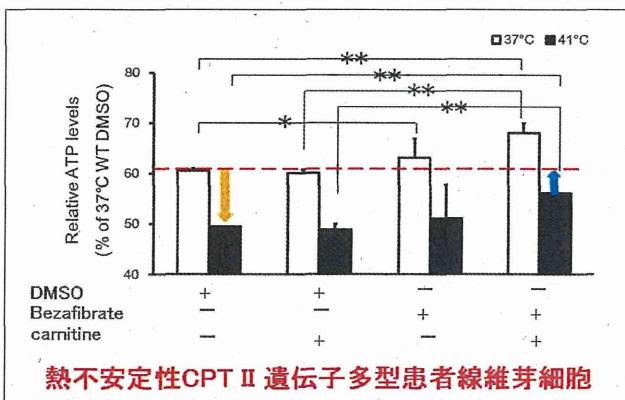


図 8. Bezafibrate によるインフルエンザ脳症患者の細胞内 ATP レベルの改善効果

以上より、インフルエンザ脳症の患者での、Bezafibrate の予防的、治療的投与の有用性を推定した。

#### D. 考察

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、治療薬の検証が行われた。

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 (A-LES) 値については、マウスの重症度と深く関係していることが示され、ICU に入室した重症化患者のモニターに使用され、極めて敏感で有用なバイオマーカーであることが判明した。Flu Alarmin としての応用が期待された。

③インフルエンザの重症化時に糖代謝障害が起きるが、その原因の一つとして、サイトカインの増加による PDK4 の選択的増加、続いて起きる PDH 活性の低下、その結果 ATP 産生の低下と乳酸の蓄積が送るが、この増悪機序が PDK4 阻害剤で治療できることを示した。今後、サイトカインを介する PDK4 の選択的増加の機序を解明する必要がある。

インフルエンザ脳症患者に高頻度に見られる熱不安定性 CPT II 遺伝子多型による後天性酵素欠損症状と、その Bezafibrate による予防的、治療的投与の有用性が示唆された。今後治験にまで進める必要がある。

#### 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 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。③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. 健康危険情報  
なし。

## G. 研究発表

### 論文発表

#### 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) 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* 2013;8(4):e60561.

#### 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 MSPL/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ショ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)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特願 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

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

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

研究分担者 林 日出喜（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染防御因子解析学分野准教授）

#### 研究要旨

インフルエンザウイルス (IFV) 感染の成立、重症化の機序には、ウイルス側、宿主側の因子が複雑に関与し、多様性が示されている。まず、ウイルスの感染成立、及び重症化に重要とされる宿主側のトリプシノーゲンを活性化する新たな酵素が存在する可能性を示した。また、重症化の早期診断マーカー、SOS シグナルとしての Flu Alarmin の候補を絞り込み、治療標的となりうる分子を推定した。

#### A. 研究目的

A 型インフルエンザウイルス (IAV) 初期感染、及びその後の感染拡大の防止に宿主細胞のインターフェロン・シグナル伝達経路が重要な役割を果たしているが、この中心にある分子が IRFs (Interferon regulatory factors) である。我々は IRF2-KO (knock-out) マウスの解析から IRF2 がトリプシノーゲン遺伝子発現、及び細胞内輸送、分泌にかかわることを明らかにしたが、宿主細胞のトリプシン活性は IAV 感染、及びその重症化において重要な働きをしている。そのため、特に IRFs とトリプシン活性化が、IAV の感染成立・拡大、あるいは感染防御にどのように関わるか検討し、重症化の早期診断マーカー、SOS シグナルとしての Flu Alarmin を同定し、適切な治療につなげることを目的とする。

#### B. 研究方法

1) ヒトのいろいろな細胞に発現している IV 型トリプシノーゲン (hPRSS3-v1) がどのように活性化されるか解明するため、膵

臓から主要な消化酵素として分泌される I、II、III 型トリプシノーゲン (hPRSS1、2、3-v2) を活性化する酵素として知られるエンテロキナーゼ (EK) の cDNA をクローニングし、トリプシノーゲンの活性化機序を調べた。さらに、EK を IAV が本来感染しにくい 293T 細胞に強制発現させ、IAV 感染の影響を調べた。

2) IAV 感染の主たる標的細胞である肺胞細胞由来の培養細胞株、A549 細胞と H292 細胞は IAV 感染後のウイルス増殖に関して際立った相違が報告されている。A549 細胞ではウイルスが増殖を続けるが、H292 細胞では最初増殖したウイルスが時間経過に伴いより速やかに排除される。ウイルスの排除に関する宿主側の反応の違いによると考えられ、その原因分子を特定することは、重症化の早期診断マーカー、SOS シグナルとしての Flu Alarmin を同定することにつながると考えられた。そのため、インターフェロン (IFN) シグナル伝達遺伝子、IFN 誘導遺伝子群 (ISGs)、Toll-like receptor シグナル伝達遺伝子、トリプシノーゲン関連遺伝

子、炎症性サイトカイン・ケモカイン類、約100種類の遺伝子をクローニング(表1)して、Real-time PCR法で各遺伝子の発現量を定量した。

(倫理面への配慮)

本研究は、長崎大学動物実験委員会の承認を受け、その指針に従い実施した。

### C. 研究結果

1) EKは実際にヒトトリプシノーゲン(hPRSS3-v2)を活性化させた(図1)。また、EKの十二指腸上皮以外での発現や役割については不明な点が多かったが、いくつかの培養細胞においてEKの発現を確認した。さらに、EKを強制発現させた293T細胞にIAVを感染させると、IAV感染の指標となる分子の発現が上昇した(図2)。

2) まず、IAV感染感受性A549細胞と抵抗性H292細胞でのIAVウイルス量を継時的に測定し、H292細胞ではウイルスがより速やかに排除されることを確認した(図3)。次に表1にあげた遺伝子の定量を継時的に行い、IAV感染により3倍以上の変化がみられた遺伝子を以下3つのグループに分けることができた。

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(図4)。

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(図5)。

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(図6)。

### D. 考察

1) EKがIAV感染の成立、重症化に関わる新たなトリプシン様タンパク質分解酵素の一つと考えられた。

2) 重症化の早期診断マーカー、SOSシグナルとしてのFlu Alarminの候補遺伝子としては、IAV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を第一と考え、今後、A型のみならずB型も含めたインフルエンザウイルス(IFV)感染患者さんの血液細胞、あるいは気管支肺胞洗浄(BAL)細胞におけるこれらの遺伝子発現を詳細にモニターして、ヒトの診断に応用できるFlu Alarminを同定したい。一方、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は、むしろIAVの排除により関わる分子の可能性があり、まず培養細胞及び実験動物レベルで、IAV排除能を調べ、治療への応用が期待できるか検討したい。

### E. 結論

感染の成立、重症化に関わる可能性のある新たなトリプシン様タンパク質分解酵素の存在が示唆された。また、重症化の早期診断マーカー、SOSシグナルとしてのFlu Alarminの候補分子をある程度絞り込むことができた。

F. 健康危険情報  
なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Kohno T, Kubo Y, Yasui K, Haraguchi M, Shigematsu S, Chua KJ, Matsuyama T,

Hayashi H. Serum Starvation Activates NF- $\kappa$ B Through G Protein  $\beta$  2 Subunit-Mediated Signal. DNA Cell Biol. 31 (11):1636-44, 2012

2. 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. 29 (2):279-88, 2013
3. Kubo Y, Hayashi H, Matsuyama T, Sato H, Yamamoto N. Retrovirus entry by endocytosis and cathepsin proteases. Adv Virol. 2012:640894. Epub 2012 Dec 6.

## 2. 学会発表

1. 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 (ULAANBAATAR, MONGOLIA)
2. 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)
3. 血清枯渇はG Protein  $\beta$  2を介したNF- $\kappa$ 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(予定も含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

図1. EKによるヒトトリプシノーゲン(hPRSS3-v2)の活性化

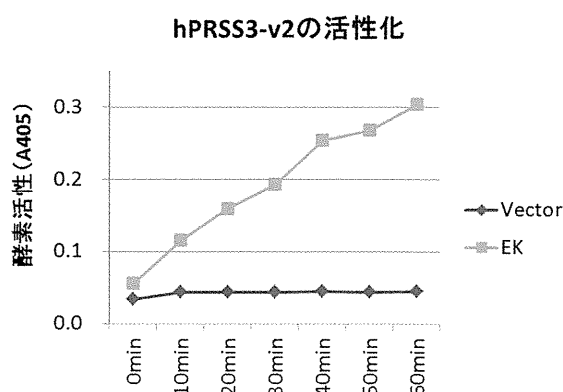


図2. EKを強制発現させ、さらにIAVを感染させた293T細胞での遺伝子発現の変化

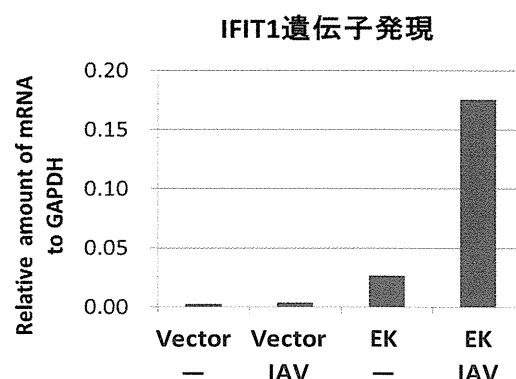


図 3. IAV 感染感受性 A549 細胞と抵抗性 H292 細胞における、感染させた IAV ウィルス量の継時的変化

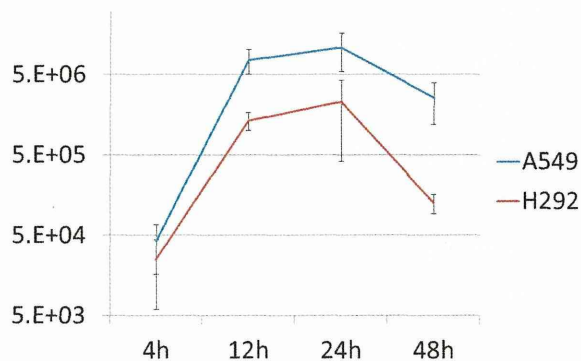


図 5. IAV 感染感受性 A549 細胞で、顕著な発現の上昇がみられた分子の例

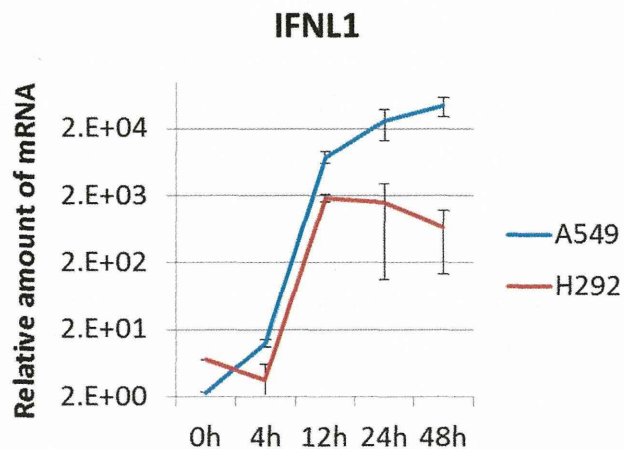


図 4. A549 細胞と H292 細胞の両方で、顕著な発現の上昇がみられた分子

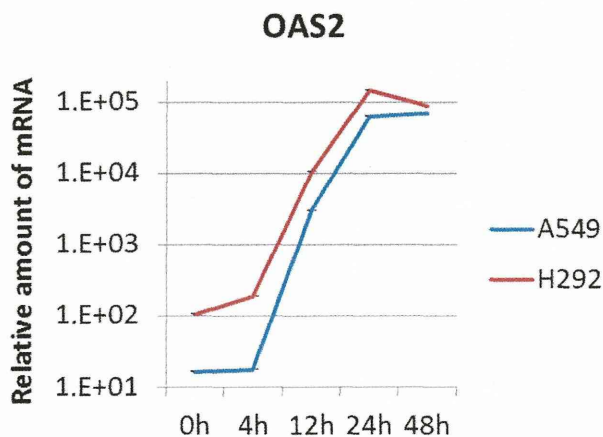


図 6. IAV 感染抵抗性 H292 細胞で、より顕著な発現の上昇がみられた分子の例

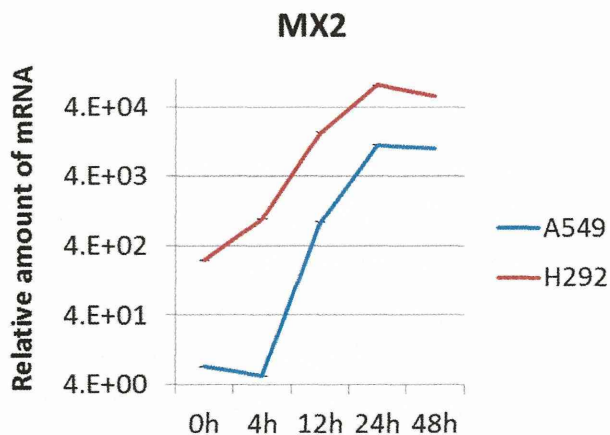




表1. ヒト・インターフェロン(IFN)、サイトカイン・シグナル伝達関連遺伝子

IFNシグナル伝達遺伝子	IFN誘導遺伝子群 (ISGs)	Toll-like receptor関連遺伝子	トリプシン関連遺伝子	サイトカイン・ケモカイン類
CARDIF(IPS-1,MAVS)	ADARI(G1P1)	ASC	ChymotrypsinC	CCL2
IFNA21(Alpha)	AHSG	FADD	Enterokinase	CCL5
IFNA6	AIM2	IκBA	PRSS1	CXCL10
IFNAR1 (Receptor)	ANXA10	IκBB	PRSS2	CXCL13
IFNB (Beta)	APOBEC3G	IKKA	PRSS3-v1	IL10
IFNG(Gamma)	CASP1	IKKB	PRSS3-v2	IL12p40
IFNGR1 (Receptor)	CASP2	IKKε	PRSS3-v3	IL17B
IFNL1(Lambda)	DR4	IRAK1	PRSS3-v4	IL17F
IFNL2	DR5	IRAK4	TMPRSS2	IL1B
IFNL3	FETUB	IRAKM		IL2
IRF1	GBP1	NALP1		IL33
IRF2	GBP2	NALP3		IL4
IRF3	IFIT1	NEMO		IL6
IRF5	IFIT2	p50		IL8(CXCL8)
IRF7	IFIT3	p65		IL9
IRF9	IFIT5	TLR2		TGFB
MDA5	IFITM1	TLR3		TNFA
MYD88	IFITM2	TLR4		
RIG-I	IFITM3	TLR7		
STAT1	ISG15(G1P2)	TLR9		
TBK1	MX1	TRADD		
TRIF	MX2	TRAF2		
	OAS1	TRAF6		
	OAS2			
	OASL			
	PKR			
	PYHIN1			
	REG3G			
	RNaseL			
	STING			
	TSPAN1			

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

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】

研究分担者 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）  
研究協力者 高橋悦久（徳島大学疾患酵素学研究センター 特任助教）

研究要旨

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 Wild type 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た。その結果、MSPL/TMPRSS13 ノックアウトマウスでは、KKKR モチーフ Influenza A/Crow/Kyoto/53/2004 (H5N1) の増殖は、ワイルドタイプマウスに比較してほとんどウイルス増殖が見られなくなるまでに減少した。一方、Wild type の RKKR モチーフを持つ Influenza A/Crow/Kyoto/53/2004 (H5N1) ウイルスの増殖も有意に減少したが、ウイルス増殖は残存しており MSPL/TMPRSS13 以外の酵素の関与も推定された。これまでの我々の解析では、MSPL/TMPRSS13 以外では Furin の可能性が高いと推定している。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。

A. 研究目的

高病原性鳥インフルエンザは重症化率が高く、罹患患者の約半数が重症化されている。この場合は多臓器不全が比較的早期に発症するが、インフルエンザサイトカイン-プロテアーゼサイクルが重症化に深く関わっている。高病原性鳥インフルエンザでは、季節性インフルエンザと決定的に異なる点が、インフルエンザの感染と増殖に関与する宿主のプロテアーゼ（図1）である。これまでに明らかになっているウイルス感染と増殖に関与するプロテアーゼには、Furin

と我々が見出した MSPL/TMPRSS13 がある。季節性インフルエンザウイルスの感染と増殖に関与するプロテアーゼが気道と腸管に局限しているのに比して、Furin と MSPL/TMPRSS13 は、全身のどの臓器にも分布しており、特に発現量の多い臓器が、肺、血管内皮、脳の神経細胞である。高病原性鳥インフルエンザの重症化を防ぐためには、抗インフルエンザ薬以外に、感染初期の段階からウイルス感染と増殖に関与するプロテアーゼの作用を抑制することが望ましい。

図2に示すように、高病原性鳥インフルエ

ンザウイルスの Hemagglutinin (HA) の切断部位には、2種類あることが知られており、一つは RKKR モチーフを持つウイルスで、他は KKKR モチーフを持つウイルスである。これまでの研究から、Furin は RKKR モチーフを持つウイルスのみを活性化し、MSPL/TMPRSS13 は RKKR モチーフと KKKR モチーフの両方を切断して、膜融合活性の発現とウイルス増殖に関与することを細胞培養系で明らかにしてきた。

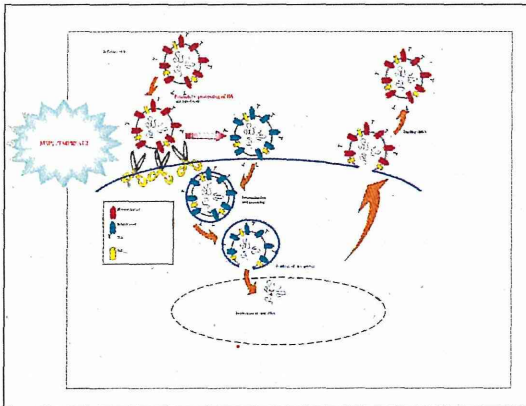


図1. インフルエンザウイルスの増殖サイクル

本年度の研究では、MSPL/TMPRSS13 ノックアウトマウスを作成して、高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染と増殖における MSPL/TMPRSS13 の役割を検証した。

ヘマグルチニン分解シグナル	
<ul style="list-style-type: none"> <li>低病原性 インフルエンザ (季節性インフルエンザ)</li> </ul>	
Type I: -Q/E-X-R↓-	
Trypsin, Chymotrypsin, Pancreatic Trypsin, Mini-plasmin, (Trypsin TC30, Mast cell tryptase from porcine lung)	
<ul style="list-style-type: none"> <li>高病原性トリインフルエンザウイルス</li> </ul>	
Type II: -R/R/K-R/K-R↓-	
Furin, PC5/6, (MSPL/TMPRSS13)	
Type III: -K/R/K-R/K-R↓-	
(MSPL/TMPRSS13) (J. Virol. 84: 5089-5096, 2010)	

図2. インフルエンザウイルスの HA 切断部位の切断モチーフ

## B. 研究方法

MSPL/TMPRSS13 ノックアウトマウス (C57BL/6J) に、RKKKR モチーフを持つ高病原性鳥インフルエンザウイルス 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 (Mut) 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。

### (倫理面への配慮)

高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染実験は、大阪大学微生物病研究所の承認を得て、大阪大学の動物実験ガイドラインに沿って実施した。

## C. 研究結果

MSPL/TMPRSS13 ノックアウトマウスへの高病原性鳥インフルエンザウイルス実験により以下の研究結果を得た。

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種類を使用してそれぞれのウイルスを  $1 \times 10^6$  PFU/30  $\mu$ l/匹、経鼻感染させ、ウイルス量がピークとなる感染3日と、感染後期の6日目の肺をホモジネートした。各々のホモジネートを MDCK 細胞に添加して11時間後のウイルス量を測定した(図3)。

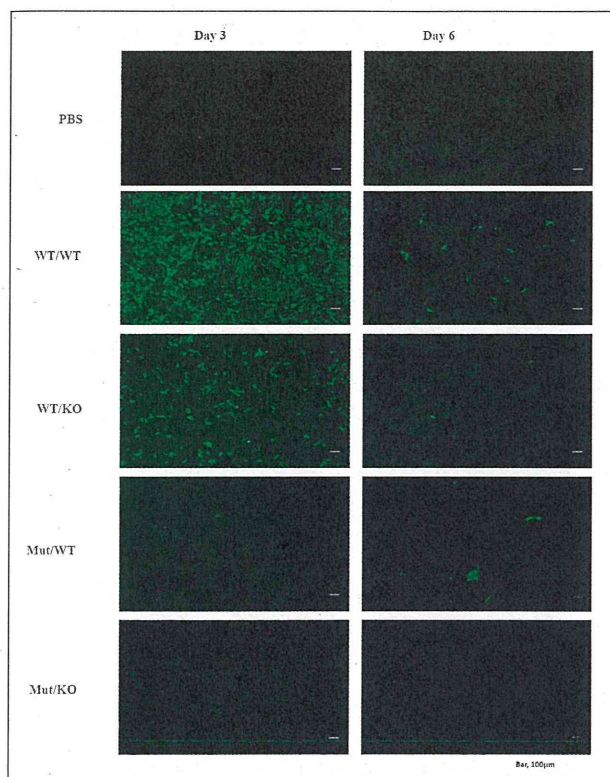


図3. TMPRSS13/MSPL-ノックアウトマウスと野生型へ、高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 株：野生株 (WT) RKKKR モチーフと、遺伝子変異株 (Mut) KKKR モチーフ を経鼻感染した。感染後、3日目と6日目のウイルス量の測定結果を示した。

測定の結果、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。

#### D. 考察

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。

#### E. 結論

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 が係わっていると推定された。

#### F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 学会発表

- (1) 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MSPL/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)

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

該当なし。

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

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

研究分担者 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)

研究要旨

重症度スコアは必ずしも患者予後を反映しない。また、多くのスコアは経時的な変化をとらえることができない。簡便に重症患者の変化を経時的にとらえることが可能となれば、重症患者の治療効果をより早期に把握することができ、予後改善にも役立つ可能性がある。本研究では ATP、A-LES (ATP-lactate energy risk score) を測定し、重症患者の予後および従来スコアとの関連を検討した。ATP、A-LES は重症患者ではいずれも正常範囲を逸脱していた。感染症患者では予後との相関が高く、重症患者の予後予測因子として重要な役割を果たす可能性が示唆された。

A. 研究目的

集中治療を必要とする患者では、重症度を評価するためさまざまな指標が用いられる。普及率の高いものに APACHE (acute physiology and chronic health evaluation) II スコアや SAPS (simplified acute physiology score) があり、集中治療室に入室した際の重症度評価は予後と良い相関を示す。しかし、これらのスコアと予後が相関しない症例も稀ではない。簡便、客観的かつ経時的に重症度を評価できる指標があれば、患者管理に有用である。重症患者では呼吸・循環不全のため抹消組織への酸素供給が悪化することが多い。そのような病態では ATP 産生が低下している可能性がある。しかし、末梢血における ATP 濃度の意義は明らかでない。抹消循環不全、抹消での酸素利用の悪化の指標として乳酸値が良く用いられている。この二つを組み合わせ

ることにより、重症患者の重症度評価がより正確になることが推測される。本研究では判定することが。本研究では末梢血 ATP 濃度、乳酸値、ATP/乳酸比 (ATP-lactate energy risk score : A-LES) が重症患者における重症度や予後予測の指標となり得るか検討する。

B. 研究方法

ヒトの代謝は年齢により変化する。健康成人での末梢血 ATP 濃度を知る必要がある。各年齢層の健康成人の静脈血を採取し、ATP を測定した。

また、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, PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>, 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。

(倫理面への配慮)

本研究は、徳島大学病院倫理委員会の承認を得た上で、対象者には研究内容を説明し、同意を得た上で実施した。

### C. 研究結果

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、A-LES 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  $0.62 \pm 0.19$  mM、乳酸値  $1.19 \pm 0.50$  mM、A-LES  $2.00 \pm 0.83$  であった。

集中治療部に入室した患者では 92 人が対象となった (表 - 1)。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。

入室時の ATP (ヘモグロビン補正後) および A-LES は生存患者、死亡患者で差を認めなかった (それぞれ  $0.43 \pm 0.13$  vs.  $0.40 \pm 0.28$ 、 $9.6 \pm 8.6$  vs.  $16.8 \pm 17.2$ )。入室翌日の値は ATP では差を認めなかったが、A-LES は死亡患者で悪化傾向にあった。

基礎疾患として感染症患者で A-LES の予後判定予測が最も良かった (図 - 1)。

### D. 考察

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ている。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。

これら以外の疾患でも重症化の機序に同様に ATP 産生不全が関与している可能性は

十分にある。敗血症は集中治療室で管理する患者群の中では予後不良の疾患である。敗血症は細菌感染が原因で臓器不全が起きる病態である。この疾患の重症化にも ATP 産生不全が関与しているか可能性もある。患者予後を予測するには 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。患者数が少なく、基礎疾患も多いため明確なことは言えないが、A-LES 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。

### E. 結論

健常成人と重症患者で ATP、A-LES を測定した。健常人では年齢、性別による差は認めなかった。重症患者ではいずれも正常範囲を逸脱していた。さらに感染症患者では予後との相関が高く、重症患者の予後予測因子として重要な役割を果たす可能性が示唆された。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. 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.

#### 2. 学会発表

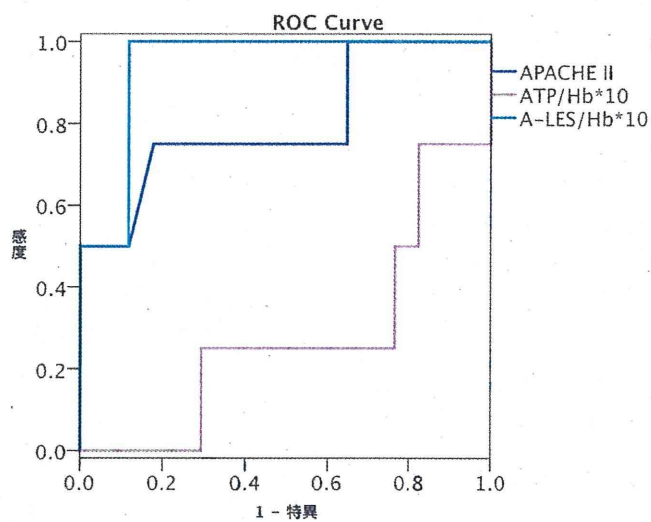
1. 小野寺睦雄、中瀧恵実子、千田淳司、今中秀光、木戸博、西村匡司。ICU 入室患

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)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

図 - 1



曲線下の面積は APACHE II 0.801、ATP (ヘモグロビン補正) 0.279、A-LES 0.941.

表 - 1. 患者の基礎情報

	生存 (74)	死亡 (18)
年齢	66.0±14.4	66.3±10.3
性別 (M:F)	45:29	7:11
APACHE II	18.3±8.1	27.7±10.6
基礎疾患		
感染症	17	4
CPE	10	0
ACS	8	1
呼吸器	6	2
神経	8	0
術後	22	1
その他	3	10



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

Flu Alarmin の探索

研究分担者 久保田雅也 (国立成育医療研究センター 神経内科医長)

研究協力者 柏井洋文 (国立成育医療研究センター 神経内科医員)

寺嶋宙 (国立成育医療研究センター 神経内科フェロー)

林雅晴 (東京都医学研究所 副参事研究員)

田沼直之 (東京都立府中療育センター小児科 医長)

#### 研究要旨

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。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。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。

#### A. 研究目的

急性脳症は小児期に多く、各種のウイルス感染症を契機として急激に発症し、遷延する意識障害を特徴とする。その臨床像は多彩で重症の病型はしばしば難治で、予後も不良である。近年臨床像に加え MRI 所見を加味して細分類が進み、急性壊死性脳症 (ANE)、遅発性拡散低下をともなう急性脳症 (AESD) などの病態解析がなされつつある。これらは感染症を契機としてサイトカインストーム、

代謝異常 (ミトコンドリア等)、興奮毒性などの病態が進行し、脳および諸臓器でアポトーシスと血管機能低下 (透過性亢進、血流障害) をきたす。支持療法に加え、抗サイトカイン療法 (副腎皮質ステロイド・パルス療法など) や脳保護療法 (脳低体温療法など) が行われているが効果は限定的である。また病初期に熱性けいれん重積との鑑別が困難で感度の高いバイオマーカーの検索が重要な課題となっている。これまでに我々は急性脳

症における重症度、予後とサイトカイン (IL-6, IL-10, sTNFR1) の関連、急性脳症と熱性けいれん重積との鑑別、神経軸索障害の指標としてのタウ蛋白、AESD での 2 相めの予測可能性、血液脳関門の攻撃因子(MMP-9) と防御因子(TIMP-1)について、急性脳症における血中 ATP の変化などについて報告してきた。

今回は 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。

## B. 研究方法

IL-33 を測定した急性脳症の患者 10 名を表 1 に示す。血液採取後血清を $-70^{\circ}\text{C}$ で凍結保存し AdipoGen 社 ELISA kit (AG-45A-0033TP-KI01)を用いて IL-33 を測定した(林、田沼)。血中 ATP に関しては既報告の方法により木戸研究室において測定が行われた。乳酸は ATP 検体採取時に最も近い時刻の値を解析に用いた。乳酸/ATP 比を計算した症例は急性脳症 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(うち 1 例で急性期と回復期に測定)、ミトコンドリア病 9 例である。

(倫理面への配慮)

研究及び研究結果の発表にあたっては、患者のプライバシー保護に十分配慮した。

## C. 研究結果

図 1 に急性脳症 10 例の IL-33 の値を示す。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。検

出されたのは比較的予後のよい急性脳症であった。

図 2 に乳酸/ATP 比を示す。急性脳症急性期 ( $6.01 \pm 6.00$ ) は熱性けいれん重積急性期 ( $1.49 \pm 0.85$ ) よりも有意に乳酸/ATP 比は高値であった。また急性脳症急性期の乳酸/ATP 比はミトコンドリア病のそれ ( $3.75 \pm 2.51$ ) と比較し有意差は認めず。

## D. 考察

IL-33 は IL-1 family に属するサイトカインで Th2 タイプのサイトカインに関連した免疫反応に関与する。IL-33 は細胞内では転写因子として細胞外では NF- $\kappa$ B を誘導する因子として働く。炎症性サイトカインとしての性質も持ち IL-33-IL33R 経路はウイルス感染の成立にも関与する。喘息などの好酸球性の炎症反応にも重要な役割を持つ。またヒト血管内皮細胞で生じる IL-33 による炎症反応はステロイド薬で抑制されないとされる。急性脳症がウイルス感染により起こることは疑いないがその機序は不明である。今回の IL-33 測定で比較的后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。現在まで AESD の病態仮説としてはグルタミン酸による興奮毒性が推定されているが今回の結果も間接的にこれを支持する。今回は IL-6 などのサイトカインは測定していないが従来から高サイトカイン血症が主病態となる急性脳症の存在も提唱されている。IL-33 が検出された 5 例中 3 例は発症 2 日以内に検出され、1 例は発症後 5、7 日めに、1 例は発症 20 日めに検出されており、この IL-33-IL33R 経路がどの程度初期病態成立に関与しているのかは不明である

が少なくとも一部の急性脳症の初期病態には IL-33-IL33R 経路を含む免疫反応が関与した可能性がある。ステロイドパルス療法にもかかわらず軽度の後遺症を残していることは血管内皮由来の IL-33-IL33R 経路活性化の可能性もある。

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。急性期に乳酸/ATP 比が6を超えた4例のうち3例はいずれも最重症の後遺症を残し、診断はインフルエンザ脳症(12.8)、Dravet 症候群の急性脳症(24.48)、脳幹脳炎(10.86)であった。1例は乳酸/ATP 比が9.43であったが後遺症なく回復したサルモネラ脳症であった。例外はあるが概ね乳酸/ATP 比が高値であれば予後は重篤であるといえる。上記インフルエンザ脳症は4才男児で発熱1日めから急激な脳浮腫の進行を認め、瞳孔散大、脳波平坦化を認め、治療に全く反応せず。Dravet 症候群は SCN1A 遺伝子変異による重症乳児ミオクローヌステんかんであるが本症候群は急性脳症の合併も多いとされる。初期病態として重篤な energy failure が起こっていることが推測される。

熱性けいれん重積急性期6例中4例はインフルエンザに関連したものだが乳酸/ATP 比は平均1.6である。いずれも30分以上のけいれん重積であるが後遺症は残さず。インフルエンザ脳症のなかで1例初期に脳症かどうかの診断に迷った1才7か月女児例があったが AESD の2相めに当たる時期(発症5日め)にけいれんは起こらなかったものの持続脳波検査で高振幅徐波の出現を認め急性脳症と判断した症例がある。この例は当初から急性脳症に準じた治療を行って

いた為か2相めのけいれんは回避できた。また後遺症は認めていない。この例の入院時乳酸/ATP 比は5.42であり、上記熱性けいれん重積急性期の値からは大きく外れ、単なる熱性けいれん重積とは異なる病態の進行が推測された。急性脳症軽症例においてもこの乳酸/ATP 比は熱性けいれん重積との鑑別に利用できると考えられる。またこの例のように AESD において2相めのアタックがなく MRI 上も変化のない例もあり、AESD 自体が重症度の異なるスペクトラムを構成する可能性も示唆する。

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。当院では急性脳症の治療としてステロイドパルス療法、フリーラディカルスカベンジャーとしてエダラボン投与、ビタミン B1、B6、カルニチン投与、体温管理、血糖管理など直接、間接にミトコンドリア機能の温存をはかっている。急性脳症の初期の病変の場が血管内皮-ミトコンドリアにあるのは確からしく思われるがいまだ決定的な病態は記述されていない。今回の乳酸/ATP 比も有意差はあるが急性脳症と熱性けいれん重積で画然と分かれるものではなく種々の要因が関与した結果をみているものと思われる。より感度の高い急性脳症マーカーの出現が望まれる。

## E. 結論

一部の急性脳症の初期病態には IL-33-IL33R 経路を含む免疫反応が関与した可能性がある。今回の IL-33 測定で比較的后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。

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。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### (ア) 論文発表

1. 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* 2012;34:20-7.
2. 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*. 2012;34:337-43. Epub 2011 Sep 15.
3. 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*. 2012; 53: 558-564.

4. 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)

##### (イ) 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし