

Metabolism 2013 講演. New Delhi, India, April 2013

(15) Yamaguchi S: Fatty acid oxidation defects. International Conference on Inborn Errors of Metabolism 2013 講演. New Delhi, India, April 2013

(16) Yamaguchi S, Purevsuren J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Furui M, Fukao T, Shigematsu Y, Fukuda S: Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency and newborn screening in Japan. 2013 Joint Meeting of the Newborn Screening and Genetic Testing Symposium (NBS>S) and the International Society for Neonatal Screening (ISNS). Atlanta, USA, May 2013

(17) Yamaguchi S: Diagnosis and treatment of mitochondrial fatty acid oxidation defects. The Second Forum of International Translational Medicine of Clinical Genetics in Beijing - Development and Application of Genetic Technology 講演. Beijing, China, August 2013

(18) Yamada K, Kobayashi H, Takahashi T, Hasegawa Y, Purevsuren J, Fukuda S, Ito M, Yamaguchi S: Responsiveness of bezafibrate for neonatal onset form of glutaric acidemia type II: comparison with milder form using in vitro probe assay. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Barcelona, September 2013

(19) Yamaguchi S, Yamada K, Kobayashi H, Takahashi T, Hasegawa Y, Purevsuren J, Ohkubo T, Watanabe M, Tsunemi T, Ishii A, Takuma H, Tamaoka A, Shigematsu Y, Fukuda S: Two Japanese cases of adult onset myopathic form of

glutaric acidemia type II. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Barcelona, September 2013

(20) Yamaguchi S: A new treatment option for mitochondrial fatty acid oxidation defects: Bezafibrate, a PPAR agonist. 12th Asian Oceanian Congress on Child Neurology. Riyadh, Saudi Arabia, September 2013

(21) Yamaguchi S: Beriberi (Vitamin B1 deficiency) of young children lurking in modern life: A new approach for biochemical detection. 2013 Joint Meeting of 13th Asian Pan-Pacific Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition and 40th Japanese Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition シンポジウム. 東京, October 2013

(22) Yamaguchi S: Screening, diagnosis, and treatment of organic and fatty acid disorders. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD), The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD) Educational lecture. Chiba, November 2013

(23) 高橋知男, 山田健治, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: SIDS, ALTE 様症状で発症し先天代謝異常症と判明した10例の検討. 第40回日本マス・スクリーニング学会. 大阪, 2013年8月

(24) 高橋知男, 山田健治, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: サリチル酸のβ酸化に及ぼす影響: in vitro probe assay による評価. 第38回日本医用マススペクトル学会年会. 神戸, 2013年9月

(25) 高 遼, 佐々木 信二, 松野 圭, 石森 絢子, 南條 友央太, 牧野 文彦, 吉岡 正剛, 吉岡 泰子, 富永 滋, 高橋 和久: Fexofenadine は EGFR TKI 投与に伴う interstitial lung disease 発症を抑制する.

第 53 回日本呼吸器学会総会, 東京,
2013.04.19

(26) 石森 絢子, 佐々木 信一, 松野 圭, 南
條 友央太, 牧野 文彦, 吉岡 正剛, 吉岡 泰
子, 中沢 武司, 富永 滋: 幼少期に発症した
気管支拡張症の経過観察中に、喀痰培養で
Aspergillus lentulus を検出した一例. 第
87 回日本感染症学会学術集会, 2013.06.05

(27) 笹野仁史, 吉岡泰子, 松野 圭, 石森絢
子, 南條友央太, 牧野文彦, 吉岡正剛, 佐々
木信一, 富永 滋: 早期の PMX-DHP を含
む集学的治療を行った amyopathic
dermatomyositis 合併急速進行性間質性肺
炎の 1 例. 第 205 回日本呼吸器学会関東地
方会, 2013.07.13

(28) 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, 南
條 友央太, 大日方 薫, 佐々木 信一, 堀
賢: ICU が抱える感染症の諸問題 救命セ
ンターに発端をなす 2 剤耐性 *Acinetobacter*
Baumannii アウトブレイクとその制御過程.
第 61 回感染症学会東日本地方会,
2013.10.10

(29) Yasuko Yoshioka, Shinichi Sasaki,
Kei Matsuno, Ayako Ishimori, Yuta Nanjo,
Humihiko Makino, Keiko Muraki,
Shigeru Tominaga, Kazuhisa
Takahashi: Two Cases Of Rapidly
Progressive Interstitial Pneumonia
Associated With Clinically Amyopathic
Dermatomyositis Successfully Treated
With Early Intensive Therapy. 18th
Congress of Asian Pacific Society of
Respirology, Yokohama, 2013.11.12

(30) 南條友央太, 佐々木信一, 中澤武司,
木下綾子, 関口康宣, 成田久美, 岩崎沙奈美,
飯田美奈子, 月山智美, 古田あずさ, 金森由
和, 玉野知佐, 伊藤友美, 鈴木俊介, 唐島孝
彰, 米山桂一, 富永 滋: 当院における ART
導入した HIV 感染症 21 症例の検討. 第 27

回日本エイズ学会総会, 熊本, 2013.11.20

(31) 木下綾子, 佐々木信一, 中沢武司, 南
條友央太, 高森建二, 須賀 康: 順天堂大学
浦安病院における過去 10 年間の新規 HIV
感染者にともなった皮膚症状の検討. 第 27
回日本エイズ学会総会, 熊本, 2013.11.20

(32) 村木 慶子, 松野 圭, 小池 建吾, 推名
健太郎, 朝尾 哲彦, 本間 裕一郎, 宿谷 威
仁, 柴山 里奈, 小山 良, 嶋田 奈緒子, 木
戸 健治, 佐々木 信一, 富永 滋, 高橋 和
久: 順天堂大学におけるクリゾチニブの使
用経験. 第 54 回日本肺癌学会総会, 東京,
2013.11.22

(33) 長野則之, 長野由紀子, 外山雅美,
佐々木信一, 中澤武司, 堀 賢, 柴山恵吾,
荒川宜親: NDM-1 メタロ-β-ラクタマーゼ,
OXA-181 カルバペネマーゼ等同時産生の広
範囲抗菌薬耐性 *Klebsiella pneumoniae* の
出現. 第 25 回日本臨床微生物学会総会, 名
古屋, 2014.02.01

(34) 中村美子, 中澤武司, 秋田美佳, 成田
久美, 井上貴昭, 大日方薫, 佐々木信一:
選択培地を用いた *Acinetobacter* の環境リ
ザーバーに関する環境調査. 第 29 回日本環
境感染学会総会, 品川, 2014.02.15

(35) 松岡遊貴, 吉岡泰子, 松野圭, 推名健
太郎, 鈴木洋平, 南條友央太, 村木慶子,
佐々木信一, 二川俊郎, 富永 滋: リンパ管
シンチと胸腔鏡により漏出部位を確認した
乳糜胸の 1 例. 第 208 回日本呼吸器学会関
東地方会, 東京, 2014.02.22

(36) 中澤武司, 南條友央太, 井上貴昭,
佐々木信一, 西田香南, 大出恭代, 三澤 成
毅, 横山栄二, 菊池 俊: 肝膿瘍より分離さ
れた *Desulfovibrio desulfuricans* の 1 例.
第 44 回日本嫌気性菌感染症学会総会・学術
講演会, 那覇, 2014.02.22

3. 著書

(1) 佐々木信一. がん性髄膜炎に対する治療戦略. 編集:大江裕一郎, 加藤晃史, 堀之内秀仁. ガイドラインに載っていない肺がん Practical Treatment. 東京:Medical View 社, 2014; 181-5.

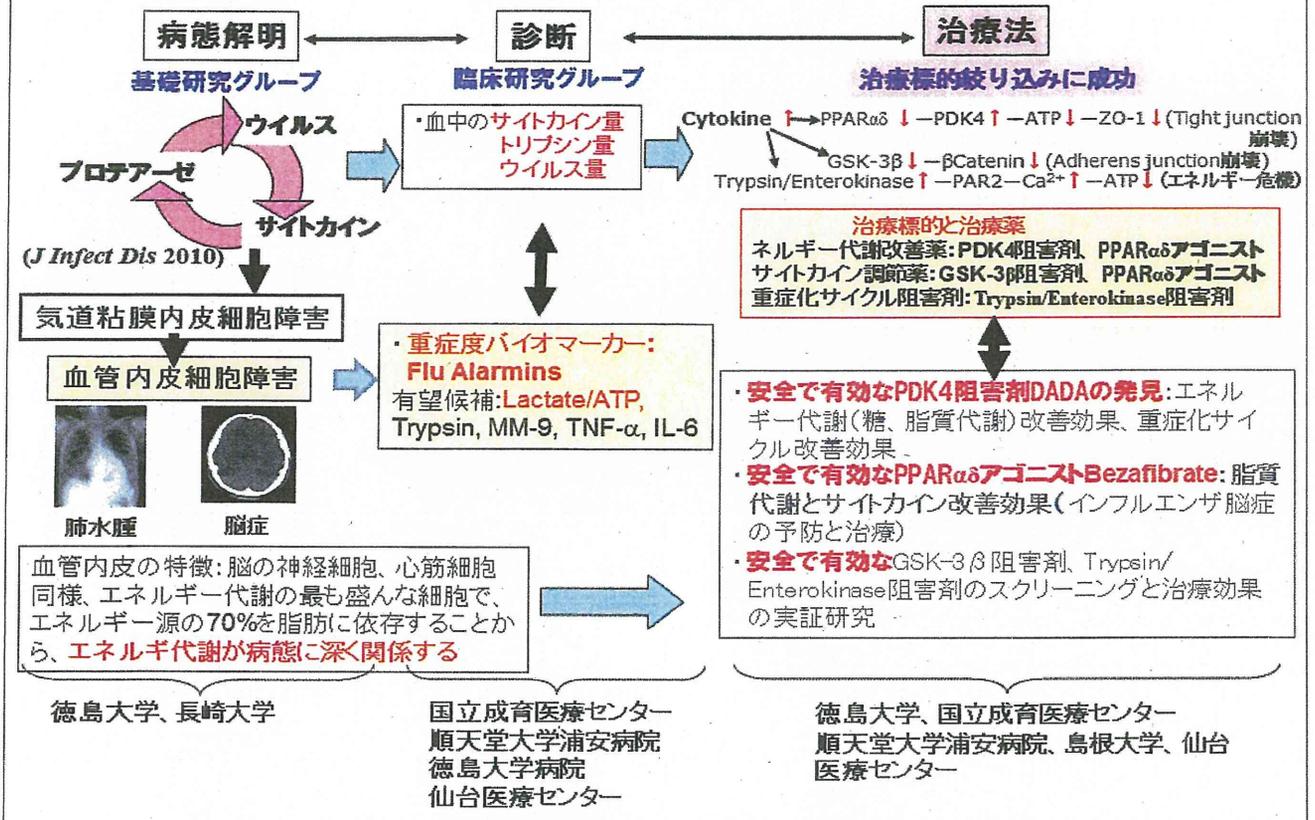
H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) PCT/JP2013/007649、出願日 2013 年 12 月 26 日、発明者:木戸博、山根一彦、他、PDK4 阻害剤及びその利用
- 2) 2. 特願 2013-174874、出願日 2013 年 8 月 26 日、発明者:木戸博、石田晃彦、他、血液検体の ATP 測定方法及びキット
- 3) 特願 2013/24953、出願日 2013 年 7 月 14 日、発明者:木戸博、田中徹、他、インフルエンザウイルス感染症の予防・治療剤
- 4) 台湾出願 102121622、出願日 2013 年 6

月 18 日、発明者:木戸博、田中徹、他、インフルエンザウイルス感染症の予防・治療剤

- 5) PCT/JP2013/003486、出願日 2013 年 6 月 3 日、発明者:木戸博、田中徹、他、インフルエンザウイルス感染症の予防・治療剤
- 6) PCT/JP2013/002500、出願日 2013 年 4 月 12 日、発明者:木戸博、大村智、他、PDK4 阻害剤及びその利用

研究推進の流れ図



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 特任教授）
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）
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）
榎本奈緒子（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、平成25年度は以下の結果を得た。①インフルエンザ感染による致死性重症化は、「サイトカインー代謝不全」サイクルと「インフルエンザーサイトカインープロテアーゼ(Trypsin)」のサイクルが、サイトカインを共通の因子として連動して引き起こされる病態であると証明された。即ち、インフルエンザ感染で引き起こされるサイトカインストームにより代謝不全が引き起こされ、血管内皮細胞障害と多臓器不全に進展する機序が明らかになった。②体内代謝の中でも糖代謝と脂質代謝が合流してエネルギー産生系に伝達される Acetyl-CoA の産生の係わる酵素として特に Pyruvate Dehydrogenase (PDH) 活性が重要であることが明らかとなった。そこでエネルギー代謝破綻を示すバイオマーカーとして乳酸/ATP 比が検討され、その Flu Alarmin としての有用性が明らかになった。他の Flu Alarmin バイオマーカーとして、血中 Trypsin、MMP-9、サイトカイン群の検討を引き続き検討している。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と脂質代謝破綻を導くことを見出し、安全な PDK4 阻害剤を既存薬 (Diisopropylamine dichloroacetate, DADA) に新たに見出すことに成功した。これにより、糖代謝と脂質代謝が補正されることで、サイトカイン産生量が低下して、インフルエンザーサイトカインープロテアーゼサイクルの回転が抑制され、生存率の改善に極めて効果的であると判明した。現在、DADA よりもさらに効果的な PDK4 阻害剤の検索を開始している。一方、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) の治療薬として、Bezafibrate を長鎖脂肪酸代謝酵素の転写促進因子として見出しており、その有効性をミトコンドリア機能、エネルギー代謝の改善を指標に確認した。

A. 研究目的

重症インフルエンザ感染による肺炎・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、多臓器不全である。本年度の研究により図1に示すように、“インフルエンザ—サイトカイン—プロテアーゼ”サイクルの回転を制御する機構として、“サイトカイン—代謝不全”サイクルが初めて明らかになった。これらの発見を基盤に、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これまで解明してきており (*J Infect Dis* 202:991, 2010, *Cardiovasc Res* 89:596, 2011)、重症化の治療にはこのサイクルの回転を抑制する以下の項目を想定して研究を進めた。

- 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個々の因子の抑制による重症化防止の可能性。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必要がある。なお、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により、代謝破綻に伴ってミトコンドリア機能の低下とエネルギー代謝の阻害、ATP 産生低下が起きる。そのため、糖代謝の PDH の活性低下の調節薬と、Carnitine Palmitoyltransferase (CPT II) の活性低下の調節薬を中心に検討する。
- ③モデル実験動物で各種 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。

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期直後の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の程度が異なるため、重症化しやすい InfluenzaA/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

PR/8 インフルエンザ感染モデルマウスの実験による代謝破綻の機序とその治療法の開発。

①抹消血の代謝不全に現れるインフルエンザ感染の重症化

インフルエンザ感染後の生体応答として、各種サイトカインの誘導が感染2-3日目より生じ、生体防御系としての液性免疫誘導が感染4日目より開始されるが、代謝不全が明らかになる時期は感染7日目前後で、この時期から個体の死亡が出始める。図2は、死亡例が出る直前の感染7日目の血液中の代謝因子の変動をモニターした結果である。マウスは感染によって極端な食欲の低下が現れ、血糖値は低下して、これに伴って乳酸値が増加する。さらに糖代謝に連動してケトン体が急上昇するが、これらの変化は感染するウイルス量に比例した変化を示した。血液中の ATP 量はミトコンドリアの無い赤血球の ATP 値を表しており、比較的減少傾向はマイルドであった。このことから、抹消血の糖、ケトン体、

乳酸値は、肝臓、筋肉などの各臓器の糖代謝、脂質代謝不全、特に Acetyl-CoA の産生に係わるエネルギー代謝不全の現れと推定された。

②インフルエンザ感染は、脳を除く各臓器の Pyruvate Dehydrogenase Complex (PDC) の中で、Pyruvate dehydrogenase 4 (PDK4)を増加させて Pyruvate Dehydrogenase (PDH) 活性の低下を導いた。

図2から全身各臓器の糖代謝、脂質代謝不全、特に Acetyl-CoA の産生に係わるエネルギー代謝不全と推定され、その標的酵素として、PDH の活性調節因子の影響が推定された。表1はPDH活性をリン酸化によってネガティブに調節する Pyruvate dehydrogenase 1-4 (PDK 1-4) と、脱リン酸化によってPDH活性をポジティブに調節する、Pyruvate Dehydrogenase phosphate phosphatase (PDP) の mRNA レベルの変化を示している。感染0日の値を1としたときに、感染3日目、感染7日目の値を示しているが、感染7日目にPDK4の著明な誘導が脳を除く心臓、肺、肝臓、筋肉で観察された。

③インフルエンザ感染後のエネルギー代謝不全の誘導

インフルエンザ感染によるPDK4の増加は、PDHをリン酸化してPDH活性の低下を引き起こすと同時に、ミトコンドリアでのATP産生の低下を引き起こすことが明らかになった。図3に示すように、脳を除く肺、心臓、肝臓、筋肉でPDH活性の低下とほぼ平行して各臓器のATPレベルの低下が見られた。初感染部位の肺では、感染3日目よりPDH、ATPの有意な低下が、心臓、肝臓、筋肉では感染後7日目に有意な低下が観察された。

④既存薬中に見いだされた新規PDK4阻害剤

以上の結果から、インフルエンザ感染時のミトコンドリアのエネルギー代謝の中で、糖代謝と脂質代謝の合流する Acetyl-CoA 量を調整するPDH活性とその調節因子のPDK4が極めて重要であることが明らかになった。そこでPDK4阻害剤の検索を実施した。これまでPDK4阻害剤として知られていた化合物に、副作用はあるものの古くより知られていた dichloroacetate (DCA)、その他 AZD7545、radicicol 等が知られていた。これらの中で副作用の報告があるものの先天性PDH酵素欠損症患者に使用されていた化合物がDCAである。我々は、従来PDK4阻害活性の報告の無かったDCA誘導体、diisopropylamine dichloroacetate (DADA)にDCAとほぼ同等のPDK4阻害活性を見出した。表2にその結果を示す。DCAのPDK4に対する IC_{50} は57.8 μ Mであるのに対して、DADAのPDK4に対する IC_{50} は50.9 μ Mでほぼ同等の阻害活性を認めた。DADAは従来肝臓保護剤として、約50年間臨床で使用されてきた薬剤で、副作用の報告は無い。さらに古くはvitamin B15の pangamic acidの有効成分として広く安全に使用されてきた経緯のある化合物である。

⑤インフルエンザ感染重症化に対するDADAの治療効果

DADAがPDK4を選択的に抑制することから、インフルエンザ感染重症化へのDADAの治療効果の検討が行われた。図4に示すようにインフルエンザ感染と同時にDADAを1日2回、1日量50 mg/kg投与して感染後7日目の各臓器でのPDH活性とATPレベルを測定した。DADA投与群では、生理食塩水投与の感染群に比べて、PDH活性とATPレベルは非感染群のレベルにまで回復していた。なお脳では、PDH活性、ATPレベルにDADAは影響しなかった。

⑥DADAのサイトカインストーム抑制効果

図1に示すようにサイトカイン誘導は体内代謝の破綻を誘導するが、体内代謝の回復はサイトカインレベルを正常化すると推定された。そこで、DADAの投与に伴う肺内の各種サイトカインの変動を調査した。図5に示す如く、感染2日目のTNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-2、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ はインフルエンザ感染で著明な誘導を引き起こして、サイトカインストーム状態であることが判る。一方DADAの投与群では各種サイトカインの誘導は抑制されていた。特に、DADAのTNF- α 、IL-6、IL-2、IFN- α 、IFN- γ の抑制効果は著名であった。

⑦DADA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抑制効果

図1に示す如く、インフルエンザの増殖サイクルは、インフルエンザ-サイトカイン-プロテアーゼサイクルで調整されている。サイトカインレベルが、DADAによって低下した場合、プロテアーゼレベル、インフルエンザウイルスの増殖レベルに影響すると推定される。図6は、初感染部位の肺の2日目、心臓、肝臓、筋肉では感染4日目で、trypsinが誘導され、ピークに至る。この条件下で、trypsin誘導へのDADAの効果を検証した。

いずれの臓器のtrypsin mRNA量もDADAの投与で有意に減少した。なお、図3、4に示すPDH活性、ATP量の場合、脳への影響は見られなかったが、trypsin mRNA量の場合、インフルエンザ感染で脳のtrypsin mRNAは有意に増加して、DADAはその増加を良く抑制した。脳のtrypsinが多く局在する部位として脳の血管内皮細胞があり、内皮細胞ではインフルエンザ感染で増加したサイトカインに

直接接触するため、内皮細胞ではtrypsin mRNAが増加したと推定された。脳の血管内皮細胞では、血液・脳関門をウイルスもサイトカインも通過できないため、神経細胞では感染による影響から免れていると考えられる。

「インフルエンザ-サイトカイン-プロテアーゼ」サイクルの中で、サイトカインとプロテアーゼレベルが低下した結果、インフルエンザウイルスの増殖が抑制されると推定された。そこで、ウイルス増殖の著明な肺でウイルス増殖を検討した。ウイルス遺伝子NS-1の定量的RT-PCRでモニターした結果を図7に示す。インフルエンザウイルスは感染後4日目をピークに増加したが、DADAの投与はウイルス増殖を感染後4日目と6日目で有意に抑制した。

⑧DADAの生存率改善効果

以上の結果から、図1に示すDADAのPDK4抑制効果は、代謝破綻、特にエネルギー代謝障害を抑制してサイトカインレベルを改善し、その結果インフルエンザ-サイトカイン-プロテアーゼサイクルの回転を抑制した。そこで、これらの結果が生存率の改善にどのように影響するかを検証した。図8に示すように、マウスが感染後10日目までに全例死亡する120 pfuの致死量のウイルス感染でも、DADAの投与により半数のマウスが生存した。体重減少、摂食量、摂水量の減少の程度も生理食塩水投与の感染群に比較して軽度に推移した。また図には示していないが、60 pfu（半数致死量）のウイルス感染の場合、50%の生存率を示したが、DADAの投与はマウスを全例生存させた。この場合、体重減少、摂食量、摂水量の減少が生理食塩水投与の感染群で明確に観察されたが、DADA投与群ではほとんど観察されなかった。

初感染部位の肺の炎症を DADA 投与群と、生理食塩水投与の感染群で比較した。60 pfu のインフルエンザウイルスを経鼻感染させた後、2日目、4日目、6日目の肺の炎症をモニターした。図9に示すように、感染2日目以後6日目まで急速に炎症性細胞が肺に浸潤したが、DADA の投与は炎症性細胞の浸潤を抑制していることが明らかとなった。

⑨Flu Alarmin の検討

昨年につづいてFlu AlarminとしてLactate/ATP比が有用であることが確認されたが、本年度の研究から、血液中のPDK4 mRNAレベルとPDH活性について検討を開始した。

⑩インフルエンザ脳症の患者の熱不安定性CPT II 遺伝子を導入したモデルマウスの作成

熱不安定性CPT II 遺伝子、F352Cの遺伝子改変したマウスを作成して、感染動物実験が可能なレベルにまで増殖を試みているが、F352Cのホモマウスは生まれてこず、全てヘテロマウスとワイルドタイプマウスのみであった。なお、ヒトでは稀ではあるが、F352Cホモを患者の中に認めることができる。またBezafibrateをCPT IIの転写促進因子として見出しており、その有効性をミトコンドリア機能、エネルギー代謝の改善を指標に確認した。

D. 考察

平成25年度の研究により、インフルエンザ感染重症化機序で新たな発見がなされた。即ち感染重症化の重要な引き金の因子としてエネルギー代謝不全があり、この代謝不全はサイトカインレベルと密にリンクしている。さらにこのサイトカインを介して、ウイ

ルス増殖を制御する「インフルエンザ—サイトカイン—プロテアーゼサイクル」に大きな影響を与えていることが明らかとなった。従来、インフルエンザ感染の治療の主体として抗ウイルス剤が使用されていたが、これらの治療薬は、感染から4-5日目までが有効期間で、5日を過ぎた感染者、特に重症化の始まった感染者には無効とされ、有効な治療薬がこれまで無かった。そのため、本プロジェクトにおいて、代謝不全の治療薬としてDADAが見いだされたことは極めて大きな意義を持つ。DADAが最も有効に作用するためには、できるだけ早期から抗インフルエンザ薬と併用して用いることが有効と考えられる。

図1に示す「感染重症化のカスケードを構成するインフルエンザ—サイトカイン—プロテアーゼサイクルにカップルしたサイトカイン—代謝不全サイクル」は、インフルエンザ以外の各種感染症の治療、さらには「サイトカイン—代謝不全」サイクルが関与する様々な疾患、例えば癌の悪液質、心不全、糖尿病治療への応用が可能と推定される。

今後、これまでの成果を基盤に、抗インフルエンザ薬との併用効果、感染重症化が始まってからでも効果が期待できるか否かの検討が必要である。またDADAのPDK4に対する IC_{50} は $50.9 \mu\text{M}$ と比較的弱く、今後より強力なPDK4阻害剤をスクリーニングすることが強く望まれる。

E. 結論

インフルエンザ感染重症化機序として、「インフルエンザ—サイトカイン—プロテアーゼサイクルにカップルしたサイトカイン—代謝不全サイクル」が見いだされた。このネットワーク機構の中で、インフルエンザ感染による代謝不全を誘導するターゲット

分子として PDK4 が明らかになり、PDK4 阻害剤として新たに DADA が見いだされた。DADA は、PDK4 活性の阻害効果から糖代謝、脂質代謝不全を正常化し、サイトカインストームへの治療効果を示した。サイトカインストームの治療効果はさらに、「インフルエンザ—サイトカイン—プロテアーゼ」サイクルの回転を抑制して、著明なウイルス増殖阻害効果を示すことが初めて明らかになった。

今後 PDK4 を分子標的とした DADA を超えるより有効で安全な薬剤の開発が期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. 論文発表

- (1) Chida J, Ono R, Yamane K, Hiyoshi M, Nishimura M, Onodera M, Nakataki E, Shichijo K, Matsushita 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) Kimoto T, Mizuno D, Takei T, Kunimi T, Ono S, Sakai S, Kido H. Intranasal influenza vaccination using a new synthetic mucosal adjuvant SF-10: induction of potent local and systemic immunity with balanced Th1 and Th2 responses. *Influenza and Other Resp. Viruses* 2013; 7(6):1218-1226, 2013.
- (3) Shoji M, Takahashi E, Hatakeyama D, Iwai Y, Morita Y, Shirayama R, Echigo N, Kido H, Nakamura S, Mashino T, Okutani T, Kuzuhara T. Anti-influenza activity of C60 fullerene derivatives. *PLoS One* 2013; 8(6):e66337.
- (4) Shinahara W, Takahashi E, Sawabuchi T, Arai M, Hirotsu N, Takasaki Y, Shindo S, Shibao K, Yokoyama T, Nishikawa K, Mino M, Iwaya M, Yamashita Y, Suzuki S, Mizuno D, Kido H. Immunomodulator clarithromycin enhances mucosal and systemic immune responses and reduces re-[^]infection rate in pediatric patients with influenza treated with antiviral neuraminidase inhibitors. *PLoS One* 2013; 8(7):e70060.
- (5) Chida J, Kido H. Extraction and quantification of adenosine triphosphate in mammalian tissues and cells. *Methods Mol Biol* 2014; 1098(1): 21-32.
- (6) 木戸博、高橋悦久、山根一彦、重症インフルエンザ感染の肺炎・脳症の最新知見と治療提案 日本臨床内科医会会誌 2013; 27(5): 578-583.
- (7) 木戸博 インフルエンザ脳症はここまでわかってきた！ プライマリケアのためのインフルエンザ診療 医薬ジャーナル社2013: p30-35.
- (8) 木戸博 インフルエンザにおけるマクロライドの有効性の機序2：インフルエンザにおける粘膜免疫増強作用と再感染抑制機序 呼吸器内科 2013; 24(4): 384-391.
- (9) 木本貴士、水野大、堺聡子、木戸博 肺サーファクタント由来人工合成粘膜アジュバント SF-10 の感染防御効果と液性・細胞性免疫誘導効果の検討 日本肺サーファクタント・界面医学会誌 2013; 44: 59-61.
- (10) 木戸博 アジュバント、予防接種 Q&A 小児内科 2013; 45: 60-64.
- (11) 木戸博、高橋悦久、堺聡子 ウイルス性気道感染症における粘膜免疫の重要性 感染と抗菌薬 2013; 16(4): 361-367.
- (12) 木戸博、高橋悦久、山根一彦 インフルエンザの生体防御 感染症内科 2013; 1(6): 544-551.

2. 学会発表

- (1) Indalao IL, Takahashi E, Kido H. Studies on the differences in host cellular responses by different influenza virus strains and subtypes. 第54回日本生化学会中国・四国支部例会。平成25年5月31日—6月1日(徳島大学)
- (2) 高橋悦久、片岡宏介、Indalao IL、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54回日本生化学会中国・四国支部例会。平成25年5月31日—6月1日(徳島大学)
- (3) 木戸博 肺サーファクタントの新たな医学応用の可能性—粘膜アジュバントへの応用とワクチン開発— 第12回肺サーファクタント分子病態研究会 平成25年6月22日(札幌医科大学)
- (4) 木戸博。粘膜アジュバントとしてのクラリスロマイシンの臨床評価の検討。第20回マクロライド新作用研究会 平成25年7月19日(家の光会館コンベンションホール)
- (5) Indalao IL, Kido H. Activation of trypsin and interferon regulation factor contributes to different disease severity during infection of influenza A virus with different pathogenicity. 第18回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 平成25年8月16—17日
- (6) 山根一彦、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代謝改善を基盤とした新たな治療ターゲットと標的とその治療法の開発: diisopropylamine dichloroacetate (DADA)による energy crisis の回避 第86回日本生化学会大会。平成25年9月11—13日(パシフィコ横浜)
- (7) 高橋悦久、片岡宏介、Indalao IL、埴聡子、木戸博。インフルエンザ感染時においてタミフルとクラリスロマイシンの併用で気道粘膜での抗インフルエンザ特異 IgA 抗体の増強が認め

られた。第86回日本生化学会大会。平成25年9月11—13日(パシフィコ横浜)

(8) Kido H. Critical illness and energy metabolism—Blood lactate/ATP ratio as a real-time alarm index. The 7th Asian Conference on Emergency Medicine. 平成25年10月25日(東京国際フォーラム)

(9) 木戸博 新規リアルタイム重症度診断バイオマーカー、血液の乳酸/ATP比 第60回日本臨床検査医学会学術集会。平成25年10月31—11月3日(神戸国際会議場)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

【特許取得】

- 1) 特許取得、香港 HK1151733、登録日2013年9月13日、発明者:木戸博、武井恒知、水野大、合成ペプチドを含有する抗原薬物ビークルとこれを用いる粘膜ワクチン
- 2) 特許取得、中国 ZL200980111515.6、登録日2013年3月13日、発明者:木戸博、武井恒知、水野大、合成ペプチドを含有する抗原薬物ビークルとこれを用いる粘膜ワクチン
- 3) 特許取得、特許第5182753号、登録日2013年1月25日、発明者:木戸博、寺島薫、インフルエンザ罹患リスクの予測方法
- 4) 特許取得、CANADA 2,579,710 登録日2013年1月8日、発明者:木戸博、水野大、経粘膜及び経皮投与を可能にする抗原薬物ビークル、これを用いる粘膜免疫の誘導法、粘膜ワクチンおよび DDS
- 5) 特許取得、EPC No.1930025、登録日2013年6月12日、発明者:木戸博、水野大、IgA 抗体の選択的産生から IgA 及び IgG 両抗体産生への切換えを可能にする

抗原薬物ビークルとこれを用いる経鼻・粘
膜ワクチン

ルエンザウイルス感染症の予防・治療剤

- 6) PCT/JP2013/002500、出願日2013年4月
12日、発明者:木戸博、大村智、他、
PDK4阻害剤及びその利用

【特許出願】

- 1) PCT/JP2013/007649、出願日2013年12
月26日、発明者:木戸博、山根一彦、他、
PDK4阻害剤及びその利用
- 2) 特願2013-174874、出願日2013年8月26
日、発明者:木戸博、石田晃彦、他、血液
検体のATP測定方法及びキット
- 3) 特願2013/24953、出願日2013年7月14
日、発明者:木戸博、田中徹、他、インフ
ルエンザウイルス感染症の予防・治療剤
- 4) 台湾出願102121622、出願日2013年6
月18日、発明者:木戸博、田中徹、他、イ
ンフルエンザウイルス感染症の予防・治療
剤
- 5) PCT/JP2013/003486、出願日2013年6月
3日、発明者:木戸博、田中徹、他、インフ

表1 Relative mRNA expression levels of PDPs and PDKs after severe IAV infection.

	Days after infection	Brain	Heart	Lung	Liver	Skeletal muscle
PDP1	Day 0	1.0±0.31	1.0±0.18	1.0±0.23	1.0±0.12	1.0±0.08
	Day 3	1.20±0.43	0.88±0.42	1.21±0.13	2.30±0.42**	0.72±0.21
	Day 7	0.88±0.24	0.88±0.20	0.43±0.11	2.77±0.22**	0.30±0.09**
PDP2	Day 0	1.0±0.37	1.0±0.12	1.0±0.12	1.0±0.16	1.0±0.16
	Day 3	2.0±0.52*	0.28±0.05**	1.51±0.58	2.19±0.24*	1.12±0.10
	Day 7	2.2±0.31*	0.20±0.06**	0.76±0.09	1.73±0.31*	2.17±0.27**
PDK1	Day 0	1.0±0.08	1.0±0.27	1.0±0.21	1.0±0.13	1.0±0.08
	Day 3	1.25±0.40	0.87±0.21	0.69±0.17	0.87±0.49	0.52±0.21
	Day 7	1.39±0.34	0.61±0.18	0.69±0.21	0.96±0.43	0.60±0.12*
PDK2	Day 0	1.0±0.08	1.0±0.18	1.0±0.23	1.0±0.12	1.0±0.16
	Day 3	1.58±0.34	0.83±0.43	0.40±0.11	2.05±0.37*	1.12±0.12
	Day 7	1.78±0.21	1.25±0.61	0.16±0.04	1.25±0.14	1.18±0.20
PDK3	Day 0	1.0±0.37	1.0±0.08	1.0±0.08	1.0±0.18	1.0±0.12
	Day 3	1.23±0.34	1.02±0.24	1.16±0.43	3.55±0.45**	0.53±0.18
	Day 7	1.01±0.24	1.07±0.18	1.01±0.09	4.66±0.31**	0.75±0.20
PDK4	Day 0	1.0±0.08	1.0±0.07	1.0±0.15	1.0±0.37	1.0±0.34
	Day 3	1.26±0.21	6.57±1.34**	5.01±1.23**	1.84±0.11	12.46±2.46**
	Day 7	1.37±0.1*	11.59±0.24**	3.89±1.34**	7.97±1.60**	89.32±7.85**

Data are mean ± SD. *P<0.05, **P<0.01, vs. before infection (Day 0) for each organ, by one-way analysis of variance and Turkey post hoc test.

表1. インフルエンザ感染後のPDP、PDK mRNA レベル

表2 DCA- and DADA-induced percent inhibition and related IC₅₀ values (μM).

		DCA			DADA		
		100 μM	300 μM	1000 μM	100 μM	300 μM	1000 μM
% inhibition	PDK2	9.0±0.3	33.0±0.18	58.4±3.3	16.6±0.2	37.8±0.2	57.2±4.1
	PDK4	63.9±3.3	88.0±1.0	97.8±12	70.2±2.1	93.4±10	99.1±13
IC ₅₀ (μM)	PDK2		676.0			636.0	
	PDK4		57.8			50.9	

Data are mean ± SD.

表2. PDK2、PDK4に対するDCAとDADAのIC₅₀値

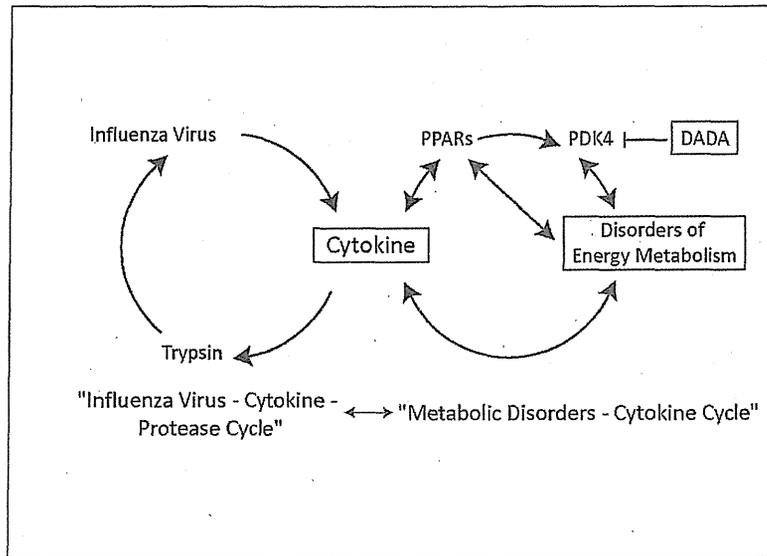


図1. 感染重症化のカスケードを構成するインフルエンザ-サイトカイン-プロテアーゼサイクルにカップルしたサイトカイン-代謝不全サイクル

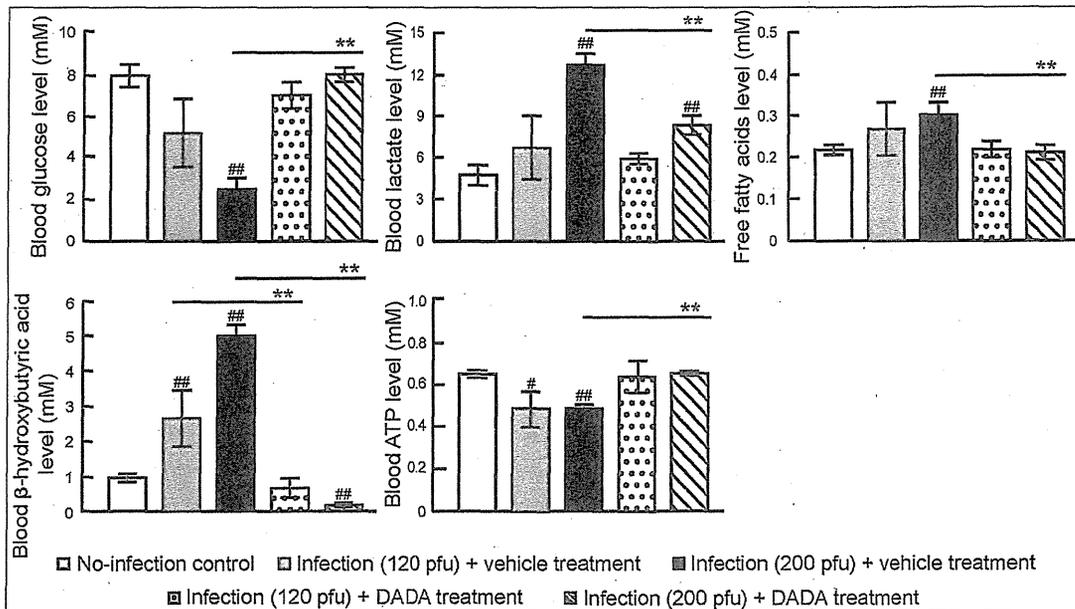


図2. 致死量に近い 120 pfu と致死量 200 pfu のインフルエンザ感染に伴う感染第7病日目の血液中の Glucose、Lactate、Free fatty acids、 β -Hydroxybutyric acid、ATP レベルの変化

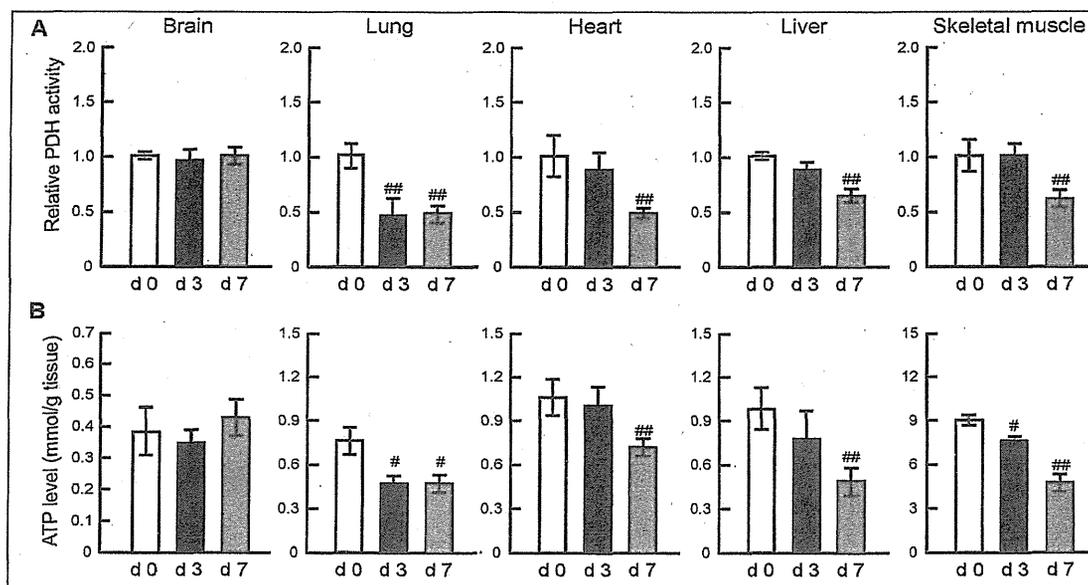


図3. インフルエンザウイルス感染後0, 3, 7日目の各臓器のPDH活性とATPレベルの変化

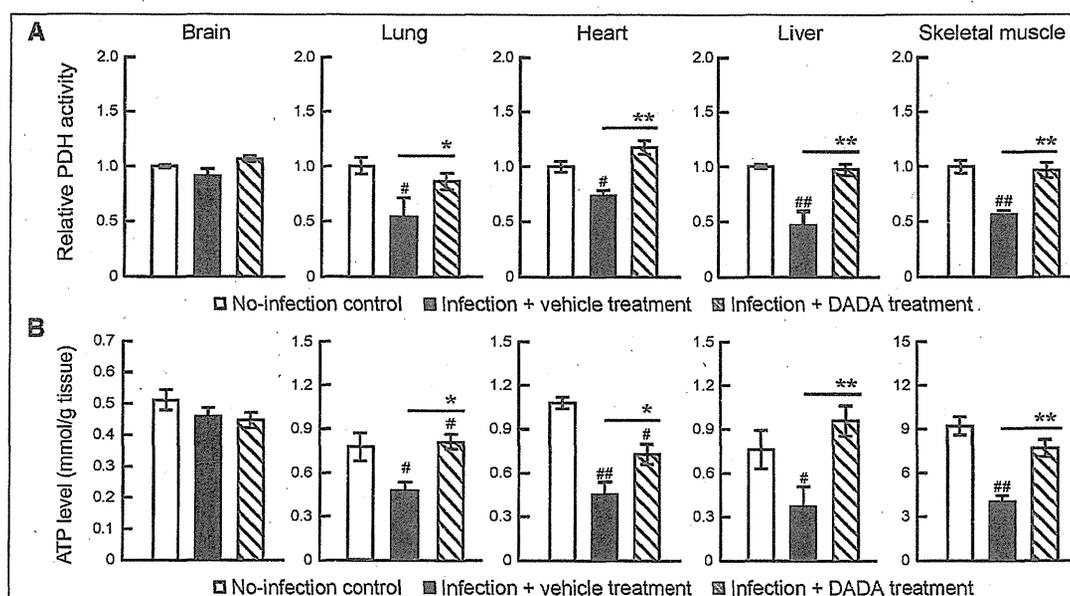


図4. インフルエンザ感染によるPDH活性、ATPレベルの低下に対するDADAの治療効果

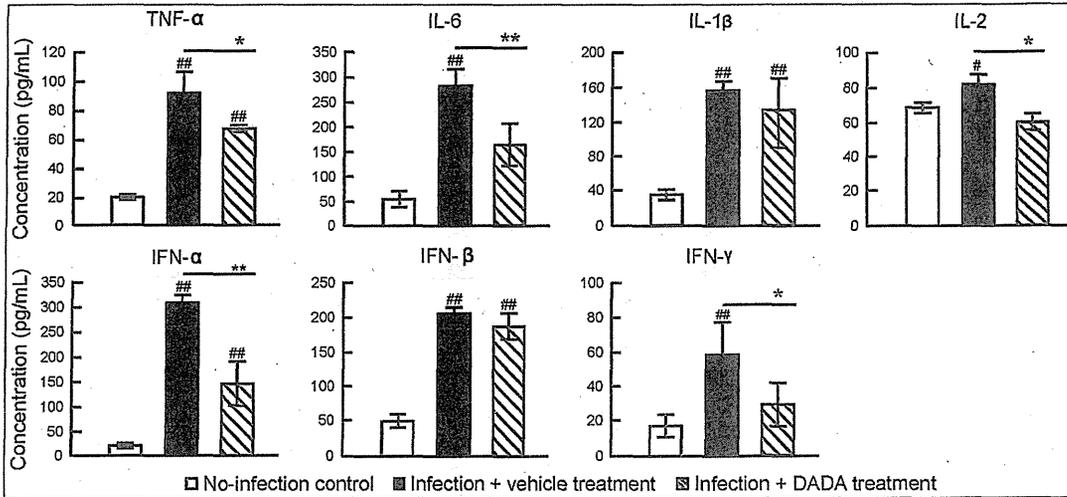


図5. インフルエンザ感染に伴う各種サイトカイン誘導のDADAによる抑制効果

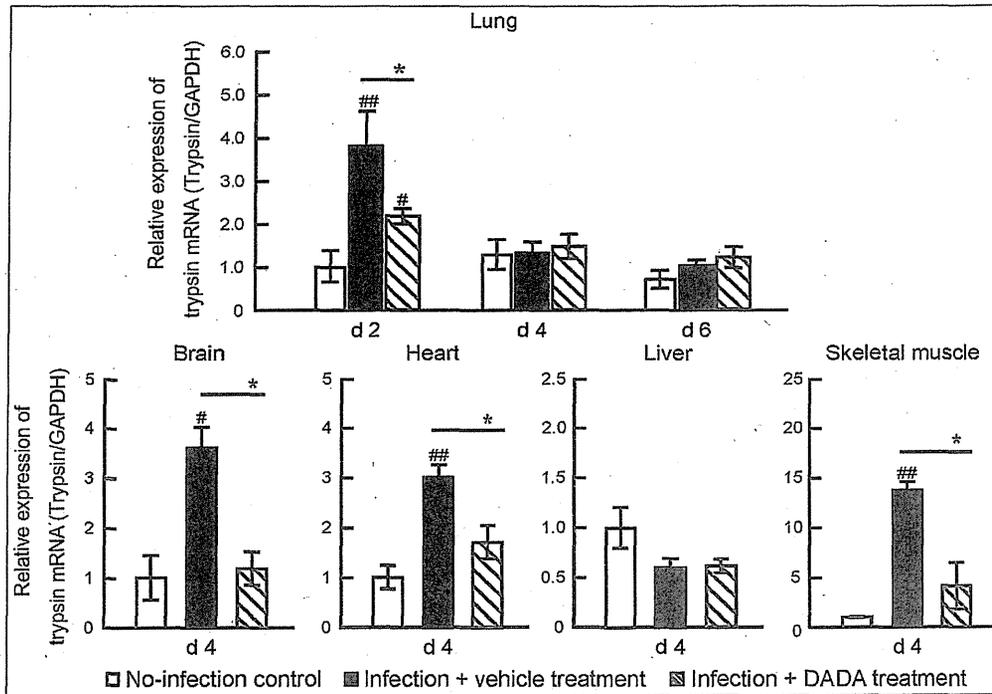


図6. インフルエンザ感染に伴う各種臓器の trypsin mRNA レベルの変動に対するDADAの効果

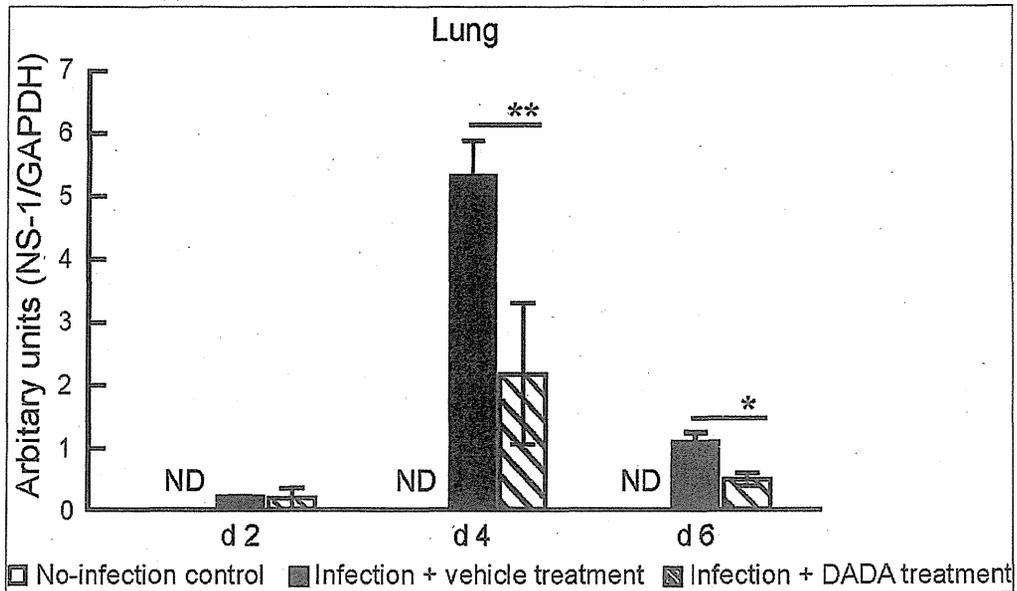


図7. 肺におけるインフルエンザウイルスの増殖に対するDADAの抑制効果

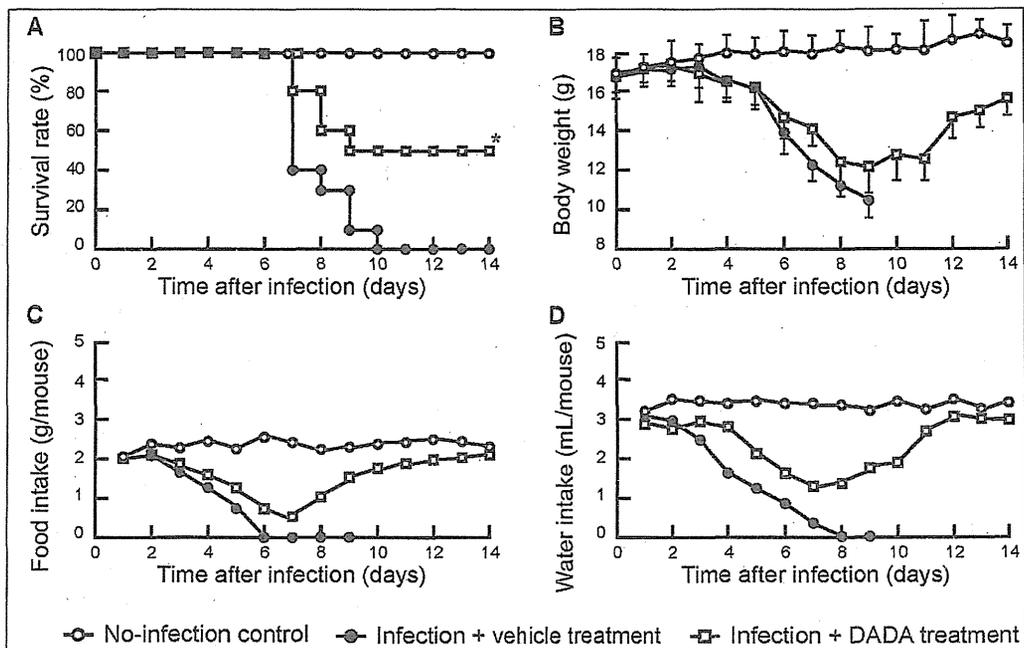


図8. インフルエンザ感染による生存率のDADAの改善効果

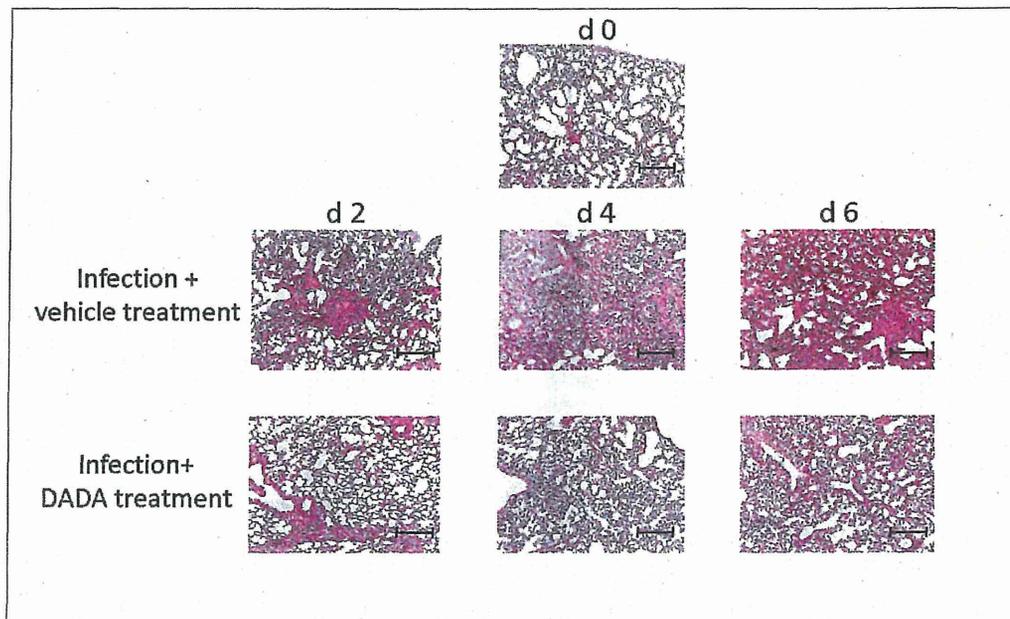


図9. インフルエンザ感染による肺の炎症への DADA の抑制効果

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 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、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。さらに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。

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) 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。

2)

i) ヒトのいろいろな培養細胞での I^{IV} 型トリプシノーゲン (hPRS1, hPRSS2, hPRSS3-v2, hPRSS3-v1)、及びその活性化する酵素として知られるエンテロキナーゼ (EK)、さらに、細胞膜上に発現しこれまでに IAV-HA (ヘマグルチニン) を切断活性化することが知られている HAT, TMPRSS2, TMPRSS4 の調べるため、それらの cDNAs をクローニングした。