

ii) これらの細胞に IAV を感染させ、ウイルス増殖の程度を IAV-HA の発現量で、宿主のインターフェロン(IFN β)、及び ISGs の誘導を Real-time PCR で、調べた。

iii) 293T 細胞に、いろいろなインターフェロン・シグナル伝達分子、及び EK を発現させ、IAV 感染への影響を調べた。

(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) 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 1)。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 2)。

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 3)。

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 4)。

2)

i) 従来から報告のあった 25 エクソンからなる EK 遺伝子(EK-v1)に加え、26 エクソンからなる新たな EK 遺伝子ア

イソフォーム(EK-v2)もクローニングした(図 5)。EK-v1 が EK-v2 に比べ、トリプシノーゲンをより効率的に活性化した(図 6)。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、調べたほとんどの培養細胞で EK の発現が観察されたが、HAT, TMPRSS2 及び TMPRSS4 の発現はある程度限られていた(図 7, 8)。また、PRSS1 及び PRSS3 も多くの細胞に発現がみられた(図 9, 10)。EK はトリプシノーゲンを活性化したが、TMPRSS2, 4 と HAT はトリプシノーゲンを活性化できなかった(図 11)。従来から報告されていた TMPRSS2, TMPRSS4, HAT を介した IAV-HA の活性化経路に加え、PRSS1&3 (トリプシノーゲン) の EK (エンテロキナーゼ) による活性化が、IAV-HA のプロセッシングを促進する新たな IAV の感染経路の存在が示唆された(図 12)。

ii) これらの細胞に IAV を感染させ、その増殖の程度を IAV-HA の発現量で見たと、前述のように H293 細胞に比べ A549 細胞では IAV-HA の発現が確認できた(図 13)。さらに、Huh7 と 293T 細胞ではより顕著な IAV-HA の発現がみられた。これらの細胞では polyI:C をトランスフェクトして RIG-I を活性化した際の IFN β の反応が弱かった(図 14)。特に 293T 細胞では、IFN α 刺激に比べ、polyI:C トランスフェクトによる IFIT1 等の ISGs の発現上昇が充分見られなかった(図 15)。

iii) IAV 感染の際には、図 16 に示すように、IAV RNA を RIG-I が検知し、ストレス顆粒(SG)と複合体を形成し、IPS-1 を介し、IFN α/β 誘導、さらに ISGs (IFN 誘導遺伝子群) の発現を上昇させ、ウイルスの排除を行うと考えられている。293T 細胞にいろいろなインターフェロン・シグナル伝達分子を強

制発現させ、IAV 感染への影響をみたところ、活性化型の RIG-I (RIG-I-CA)、IPS-1、IKK ϵ 、IFITM3 及び IRF1 を発現させると、IAV の増殖が明らかに抑制された (図 17)。活性化型の RIG-I (RIG-I-CA)、IPS-1、IKK ϵ は IFN α/β の発現を誘導することにより、IRF1 は多くの ISGs 発現を誘導することにより、IFITM3 は直接 IAV に作用して、IAV の感染を抑制していると考えられた。したがって、293T 細胞は IPS-1 以降、IFN α/β 発現誘導、それに続く ISGs 発現誘導、IAV 排除の過程は正常に機能しているものの、RIG-I と SG の複合体形成の段階での機能異常が示唆された。さらに、EK を発現させた 293T 細胞では、IAV がより増殖していた (図 18)。

D. 考察

1) 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ると考えられた。実際に、293T 細胞を使った IAV 感染系で IFITM3 による IAV 感染増殖抑制が確認された (図 17)。その他の分子に関してもこの系で細かく検討した後、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。

2) 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 (図 12)。さらに、EK-v1, v2 アイソフォームの PRSS 活性化能の相違が、IAV 感染に与える影響も検討したい。

E. 結論

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。また、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。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表 (平成 25 年度)

(ア) 論文発表

1. Shigematsu S, Hayashi H, Yasui K, Matsuyama T. SAM domain-containing N-terminal region of SAMHD1 plays a crucial role in its stabilization and restriction of HIV-1 infection. *Acta Med Nagasaki*, 2014, in press.
2. Kakoki K, Shinohara A, Izumida M, Koizumi Y, Honda E, Kato G, Igawa T, Sakai H, Hayashi H, Matsuyama T, Morita T, Koshimoto C, Kubo Y. Susceptibility of muridae cell lines to ecotropic murine leukemia virus and the cationic amino acid transporter 1 viral receptor sequences: implications for evolution of the viral receptor. *Virus Genes*. Epub 2014 Jan 28.
3. Chua KJ, Kubo Y, Ma Y, Yasui K, Matsuyama T, and Hayashi H. A

short variant BTBD2 as a novel negative regulator of IRF-associated signalling. *Int J Integrative Biol.* 14: 31-38, 2013.

4. 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
5. 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.
6. 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):1636-44, 2012

(イ) 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. インターフェロン γ 誘導遺伝子GILTによるHIV粒子産物抑制機構の解明、久保嘉直、神山陽香、泉田真生、田中勇悦、安井潔、佐藤祐徳、山本直樹、松山俊文、林日出喜、第61回日本ウイルス学会学術総会、平成25年11月10~12日(神戸)
3. 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)
4. 血清枯渇はG Protein β 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. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

- | | |
|-----|--------|
| (ア) | 特許取得 |
| なし | |
| (イ) | 実用新案登録 |
| なし | |
| (ウ) | その他 |
| なし | |

図 1. 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

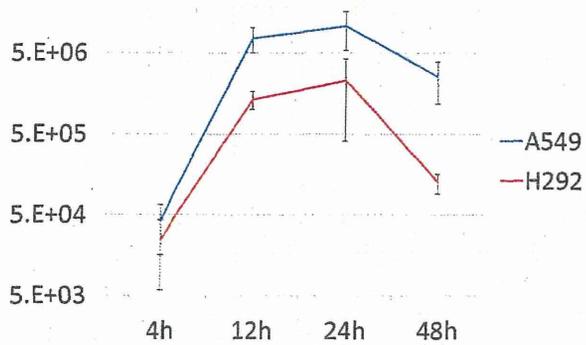


図 2. A549 細胞と H292 細胞の両方で、顕著な発現の上昇がみられた分子の例

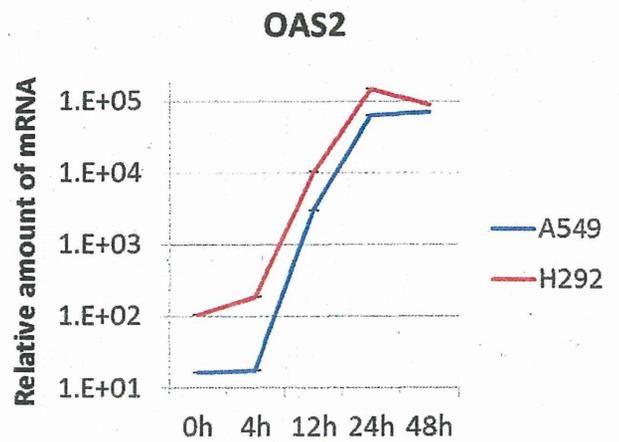


図 3. IAV 感染感受性 A549 細胞で、顕著な発現の上昇がみられた分子の例

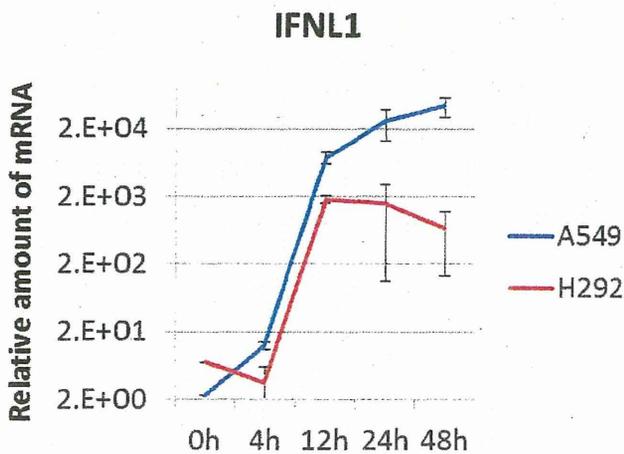


図 4. IAV 感染抵抗性 H292 細胞で、より顕著な発現の上昇がみられた分子

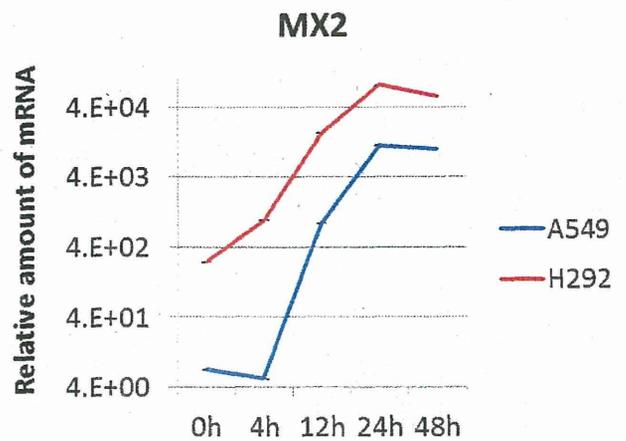


図 5. 従来の 25 エクソンからなる EK 遺伝子(EK-v1)と 26 エクソンからなる新たな EK 遺伝子アイソフォーム(EK-v2)の遺伝子構造の違い

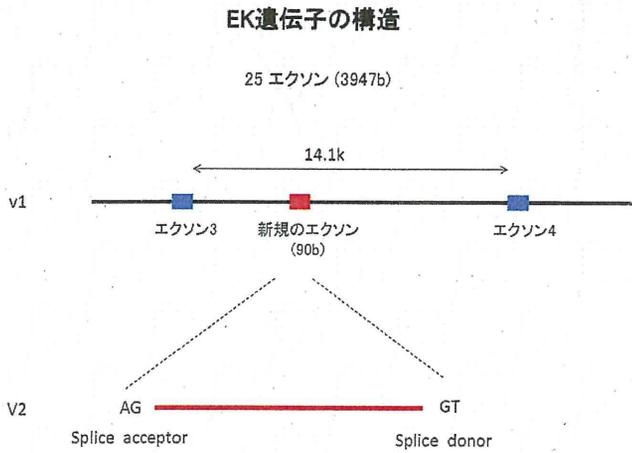


図 6. EK-v1, v2 の III 型トリプシノーゲン (PRSS3) 活性化能の違い

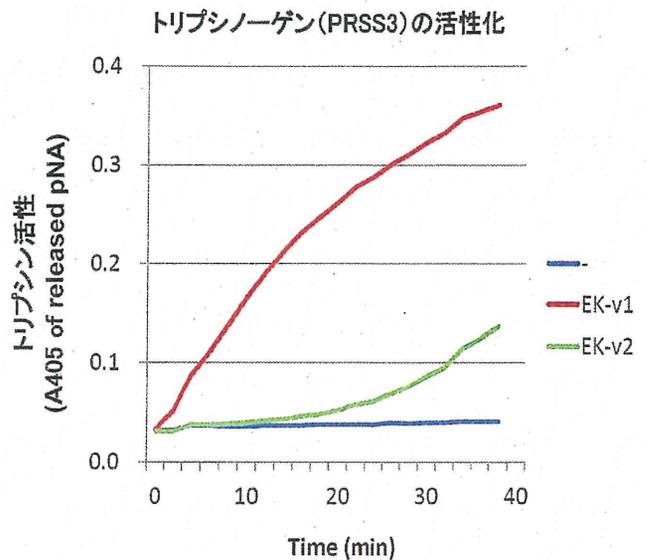
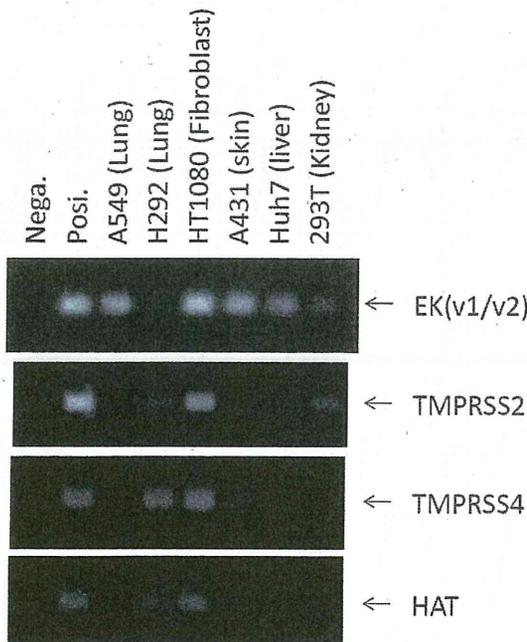
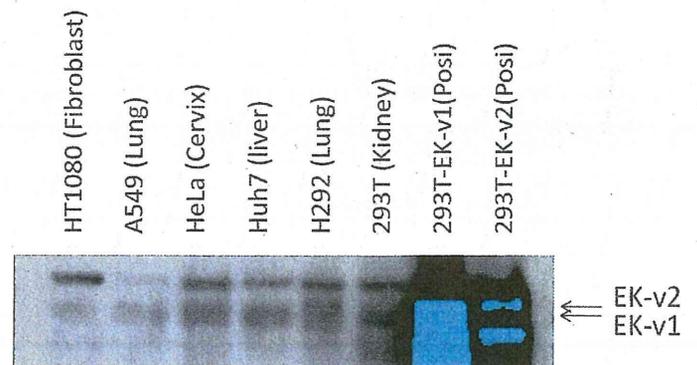


図 7. 各種培養細胞における細胞膜貫通型セリンプロテアーゼ (TMPRSSs) の発現 (RT-PCR)



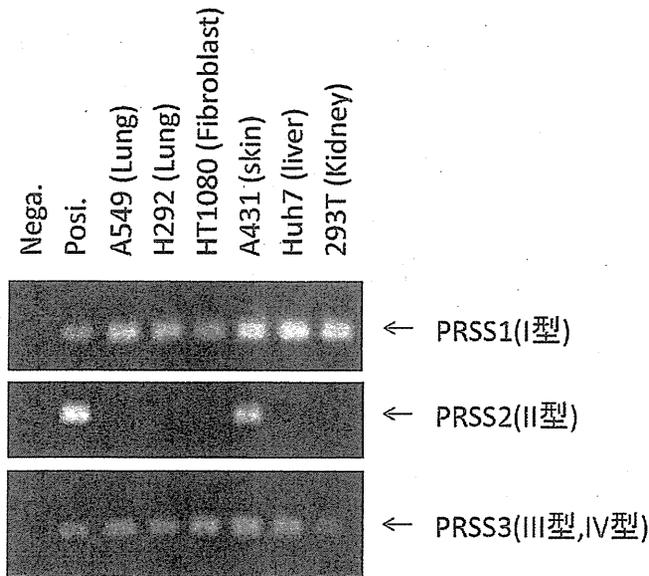
Nega.: H₂O, Posi.: 各遺伝子のcDNA

図 8. 各種培養細胞におけるエンテロキナーゼ遺伝子 (EK-v1, v2) の発現 (抗 EK 抗体を用いた Western blot)



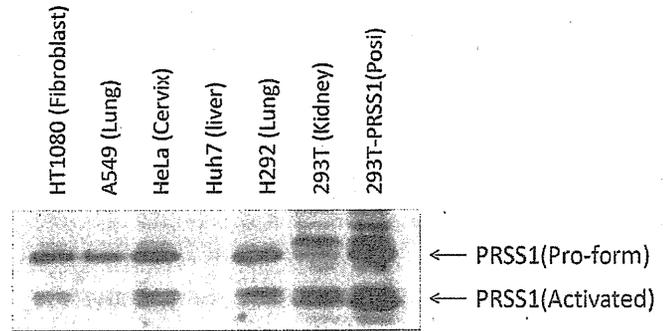
293T-EK-v1(posi.): EK-v1を強制発現させた293T細胞
293T-EK-v2(posi.): EK-v2を強制発現させた293T細胞

図 9. 各種培養細胞におけるトリプシノーゲン遺伝子 (PRSSs) の発現 (RT-PCR)



Nega.: H₂O、Posi.: 各遺伝子のcDNA

図 10. 各種培養細胞における I 型トリプシノーゲン遺伝子 (PRSS1) の発現 (抗 PRSS1 抗体を用いた Western blot)



293T-PRSS1(posi.): PRSS1を強制発現させた293T細胞
矢印はPRSS1のProformと切断、活性化型(Activated)を示す

図 11. エンテロキナーゼ特異的なトリプシノーゲン (PRSS3) の活性化

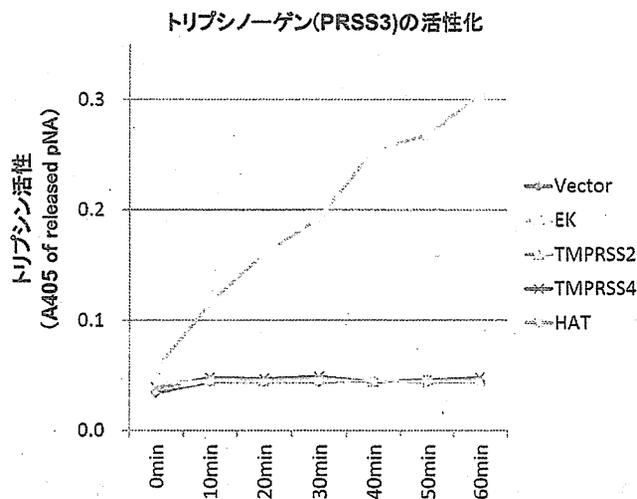


図 12. トリプシノーゲン (PRSS1&3) 及びエンテロキナーゼ (EK) を介した IAV 感染の促進機構

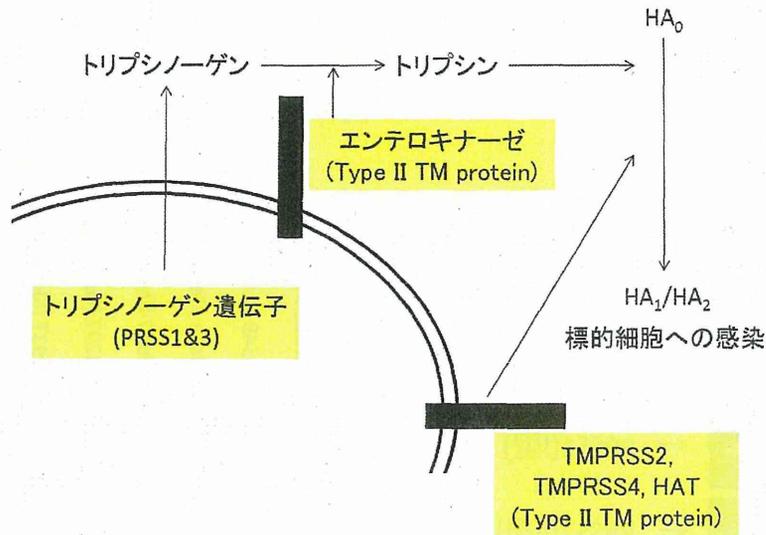


図 13. 各培養細胞に IAV を感染させ、24 時間後に抗 IAV-HA 抗体を用いてウイルスの増殖を調べた。

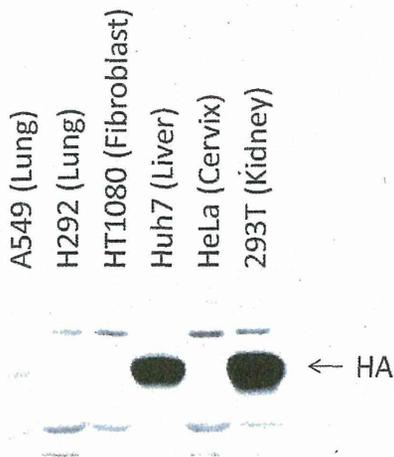


図 14. 各培養細胞に polyI:C をトランスフェクトして RIG-I を活性化 16 時間後の IFN β の発現を Real-time PCR で調べた。

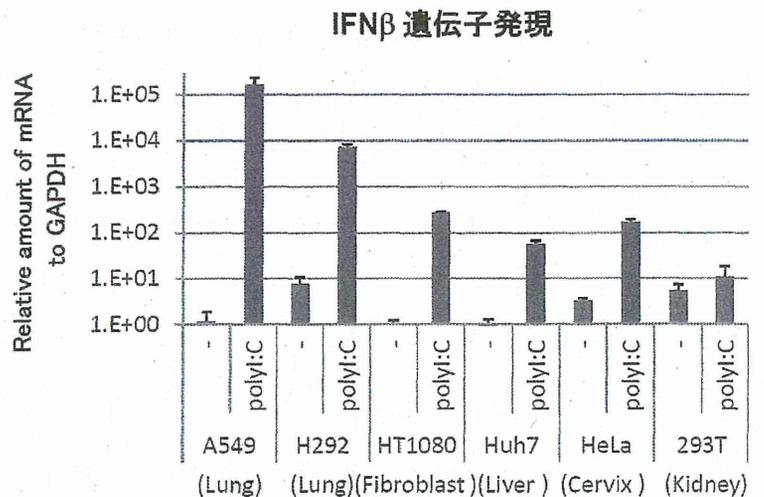


図 15. 各培養細胞を IFN α 刺激、あるいは polyI:C トランスフェクトして RIG-I を活性化し、16 時間後に、ISGs の一つである IFIT1 の発現を Real-time PCR で調べた。

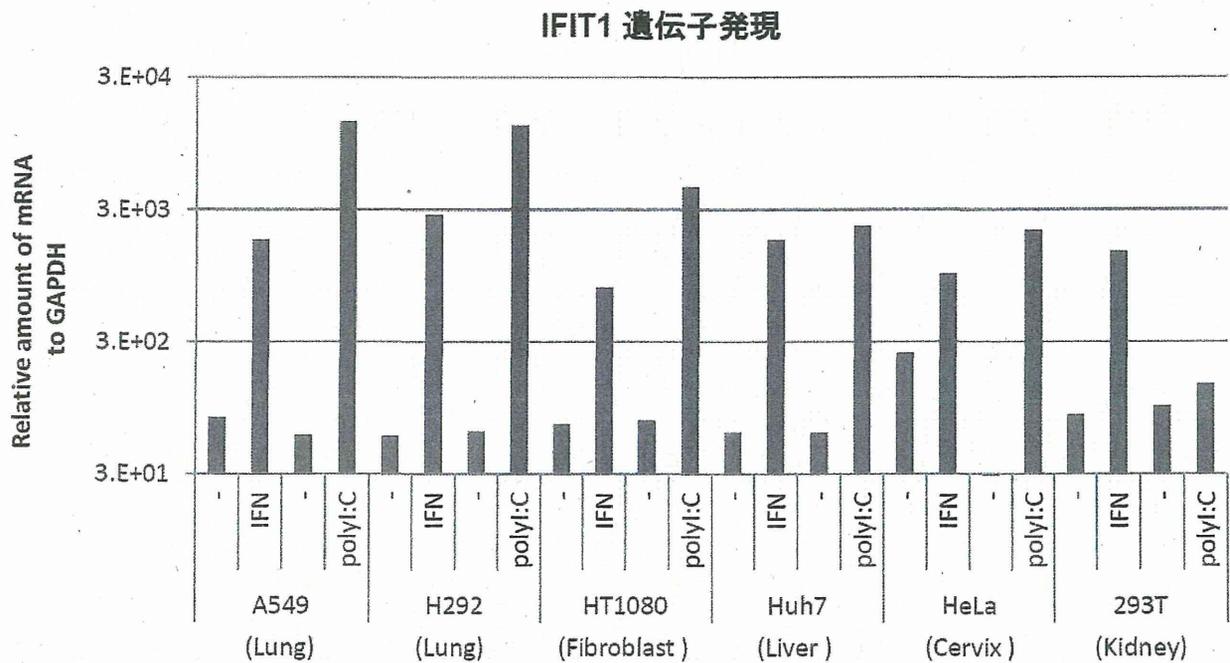
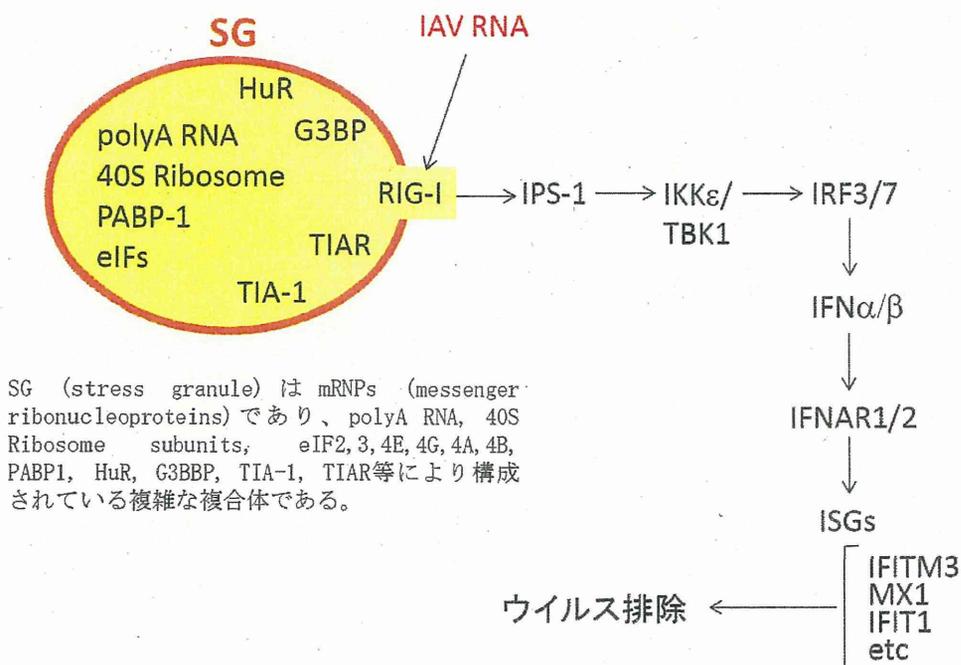


図 16.

IAV感染とストレス顆粒(SG)



SG (stress granule) は mRNPs (messenger ribonucleoproteins) であり、polyA RNA, 40S Ribosome subunits, eIF2, 3, 4E, 4G, 4A, 4B, PABP1, HuR, G3BP, TIA-1, TIAR 等により構成されている複雑な複合体である。

図 17. 293T 細胞にいろいろなインターフェロン・シグナル伝達分子を強制発現させた後、IAV を感染させ、抗 IAV-HA 抗体を用いてウイルスの増殖を調べた。

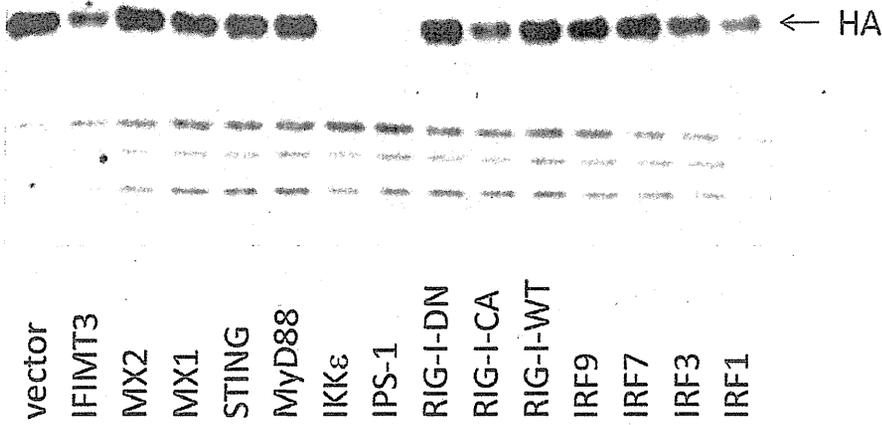
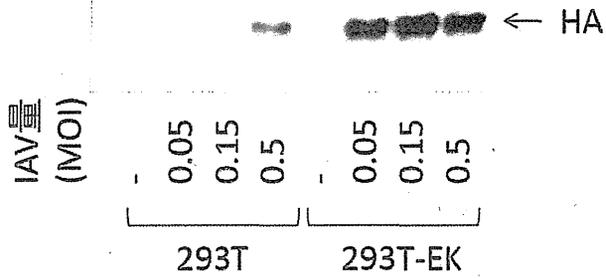


図 18. 293T 細胞及びEK を強制発現させた 293T 細胞(293T-EK)に、感染させる IAV の量を変化させ、抗 IAV-HA 抗体を用いてウイルス増殖への影響を調べた。



293T-EK:EKを強制発現させた293T細胞
感染させるIAVの量を
MOI:0(-), 0.05, 0.15, 0.5と変化させた。

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(GIP1)	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	IKKe	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			

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

感染重症化とプロテアーゼ：高病原性鳥インフルエンザウイルスの HA 解列酵素 MSPL の作用と、インフルエンザ心筋炎における MMP-9 の関与についての研究

研究分担者 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

我々はインフルエンザ感染における重症化は血管内皮と各臓器で誘発される“インフルエンザ—サイトカイン—プロテアーゼ”サイクルが主要原因で、このサイクルを介する血管内皮細胞障害が多臓器不全の根底にあることを明らかにした。MSPL は、II 型の膜結合型セリンプロテアーゼとしては初めて連続した塩基性アミノ酸を基質として認識し、特異的に加水分解する唯一の酵素であった。また、全身臓器での発現解析から MSPL がヒトと鳥に広く分布することが明らかとなったことから高病原性鳥インフルエンザ (HPAI) ウイルス HA の解列に関与することが示唆された。HPAI ウイルスは HA の切断部位配列として R-X-K/R-R と K-K/R-K/T-R (P4 位に R 又は K) の 2 型を持つことより、A/crow/Kyoto/53/2004 をもとにリバーシジェネティクス法を用いて 2 種類の切断部位配列を持つ HPAI ウイルス株を作成した。この変異株を用いて、ウイルスの増殖性を蛍光染色で見ると、MSPL が発現していない細胞株では増殖性が低いことが明らかとなった。この結果より、これまで高病原性鳥インフルエンザウイルス HA の解列に関与すると言われてきた Furin や PCs は、P4 位が K の場合 processing しないが、MSPL は P4 位が R/K のいずれに対しても作用するため、全ての高病原性鳥インフルエンザウイルスの増殖への関与が示唆された。更に MSPL-KO マウスに解列部位の異なる 2 型の HPAI を感染させて感染 3 日後と 6 日後の肺を HE 染色した結果 P4 位を K に置換したウイルスをノックアウトマウスに感染させたときの炎症が軽度であることが明らかとなった。また肺のホモジネート中では IL-1beta、INF-gamma の減少が確認された。これらの結果より MSPL の特異的阻害剤を用いることで高病原性鳥インフルエンザの重症化が阻止できると考えられる。(2) インフルエンザ感染によりインフルエンザ—サイトカイン—プロテアーゼ”サイクルを介するプロテアーゼとして MMP-9 の発現上昇が認められている。本研究でクラリスロマイシン(CAM)を経口投与したマウスでは、ゼラチンザイモグラフィとウエスタンブロッティングで確認した結果 MMP-9 の発現が低下することが明らかとなった。また、インフルエンザウイルスの活性化酵素であるトリプシンとともに MMP-9 の発現調節に関与している NF-kappaB の発現が感染 6 日目の肺において低下することが明らかとなった。更に、肺の HE 染色で炎症が軽減したことが確認された。

A. 研究目的

インフルエンザ脳症、多臓器不全の病態解析から、重症化は血管内皮と各臓器で誘発される“インフルエンザ-サイトカイン-プロテアーゼ”サイクルが主要原因で、このサイクルを介する血管内皮細胞障害が多臓器不全の根底にあることを明らかにした(*J. Infect. Dis.* 202;991-1001, 2010、*Cardiovasc. Res.* 89:596-603, 2011)。また、我々はインフルエンザ治療薬として使われているクラリスロマイシン(CAM)が免疫増強作用を有すること(*J. Virol.* 2012 Oct;86 (20):10924-34)を報告してきた。本プロジェクトでは(1)高病原性鳥インフルエンザの活性化酵素として見出されたMSPLについての酵素学的性状解析とMSPL-KO(knock-out)マウスの解析から本酵素の阻害剤を用いた重症化の治療を検証する。(2)インフルエンザ感染により誘発される心筋炎などの心機能低下に関与すると考えられるMMP-9の発現をCAM投与により抑制が可能かどうかを調べることにより重症化阻止につなげる。

B. 研究方法

(1)高病原性鳥インフルエンザウイルスが活性化されるかを調べるため、MSPL-KOマウスに、ヘマグルチニン(HA)の解列部位を高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染に関わるとされているFurinが認識できるRKKRタイプからFurinが認識出来ないKKKRタイプに変異させ、感染による体重変化、致死率、組織のHE染色像を確認した。また感染マウスから採取した肺ホモジネートを培養細胞(MDCK)に添加することで増殖したウイルスを蛍光染色で確認した。更に、肺ホモ

ジネート中の炎症性サイトカインを調べた。

(2)マウスに季節性インフルエンザ(PR8)を感染させてCAMを経口で投与した。感染3日目と6日目の血液・肺・心臓を採取しMMP-9の発現をゼラチンザイモグラフィ、ウエスタンブロッティングにより評価した。更に、MMP-9に関与する転写因子であるNF-kappaBの発現についてもウエスタンブロッティングにて確認した。

C. 研究結果

(1)MSPL-KOマウスに高病原性鳥インフルエンザを感染させたとき、感染3日後と6日後の肺で増殖したウイルスはWTマウスにFurin認識タイプのRKKR株を感染させた時よりMSPL-KOマウスが有意に減少することが明らかとなった(図1)。またKKKR株でも同様にKOマウスにおいて感染細胞数の減少が認められた。この時採取した肺のHE染色像でも、ウイルスの増加と相関して炎症が広がっていることが確認された(図2)。更にMSPL-KOマウスでは炎症性のサイトカインであるIL-1beta、TNF-alpha、IFN-gamma、MIP-1-alphaが減少していることが明らかとなった(図3)。

(2)PR8を感染させてCAMを経口投与したマウスではコントロール群と比べてMMP-9の発現が低下することがゼラチンザイモグラフィによる解析により明らかとなった(図4A)。この時、活性型への変換効率が低下していることが示された(図4B)。また、感染3日後の肺の気管近傍でメチルセルロース(MC)に比べてCAMを投与することで炎症が軽減されることをHE染色像で示す(図5)。エバンスブルーを静脈にインジェクションして肺組織への漏出を確認した結果CAM投与群

で軽度であった。更に感染6日目の肺では転写因子NF-kappaBの発現低下も認められた(図6)。

D. 考察

(1)高病原性鳥インフルエンザ感染においてMSPLはRKKR、KKKRタイプの株共にHA解列に大きく関与していることが示唆された。したがってMSPLの酵素学的性状を明らかにし、新たな阻害剤を探索することが高病原性鳥インフルエンザ感染の重症化の治療に有用であると考えられる。

(2)季節性インフルエンザ感染でCAMの服用でMMP-9の発現が低下することが確認できた。更にNF-kappaBの低下も認められていることからMMP-9の活性化酵素であるトリプシンの発現低下も示唆される。今後、心臓のエコー解析によりインフルエンザ重症化により引き起こされる心筋炎の治療に関してCAMの有用性を検証する。

E. 結論

G. 研究発表 (平成25年度)

論文発表

(1)Shoji M, Takahashi E, Hatakeyama D, Iwai Y, Morita Y, Shirayama R, Echigo N, Kido H, Nakamura S, Mashino T, Okutani T, Kuzuhara T. Correction: Anti-Influenza

Activity of C₆₀ Fullerene Derivatives. *PLoS One*. 2013 Nov 12;8(11)

(2) Shinahara W, Takahashi E, Sawabuchi T, Arai M, Hirotsu N, 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: A retrospective analysis., *PLoS ONE*, Vol.8(7), e70060, 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*, Vol.8(6), e66337, 2013

学会発表

1. 高橋悦久、片岡宏介、Irene Lorinda Indalao、堺 聡子、木戸 博、Airway mucosal IgA which reduced by oseltamivir is improved by combination with Clarithromycin in mice infected with influenza A virus、第86回日本生化学会大会

図1 MDCK 細胞に感染させた肺ホモジネート中のウイルス

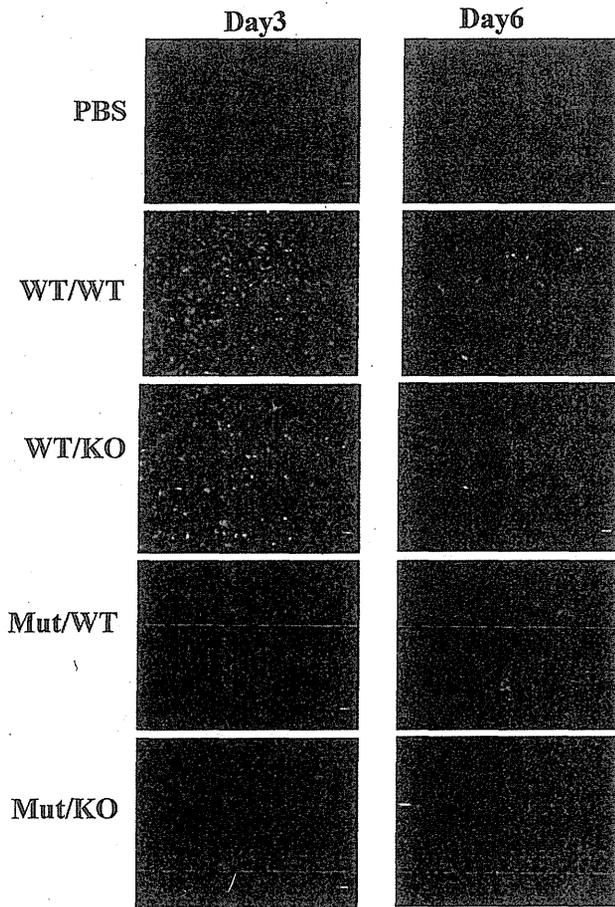


図2 高病原性鳥インフルエンザウイルス感染マウスの肺の HE 染色像

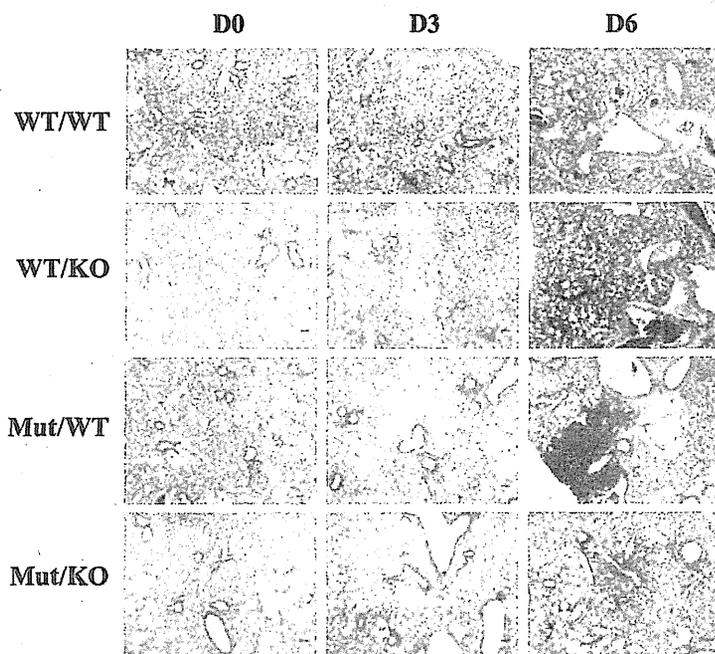


図3 高病原性鳥インフルエンザウイルス感染マウスの肺ホモジネート中の各

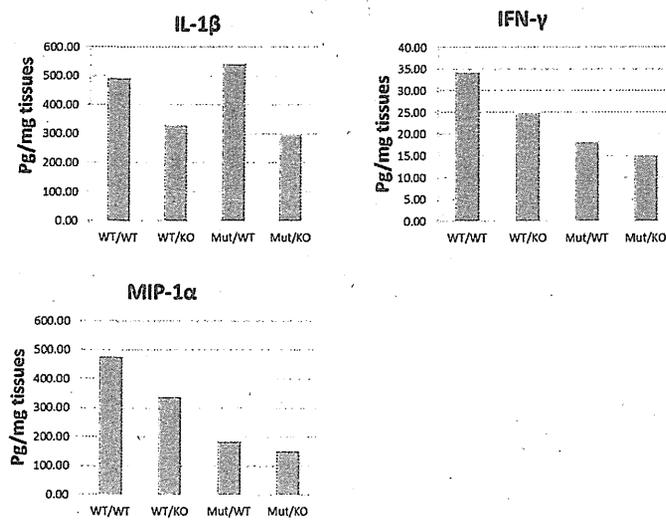
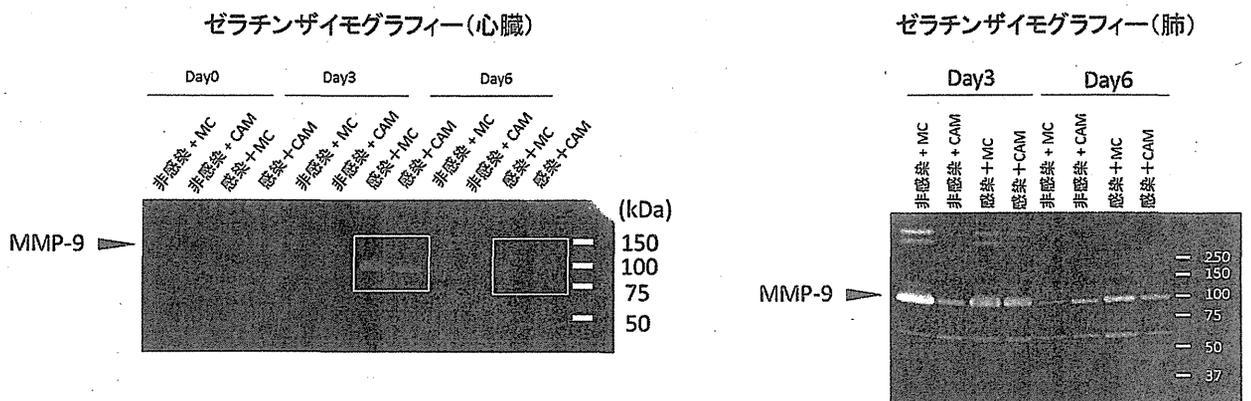


図4 CAM投与によるMMP-9の発現変化

A



B

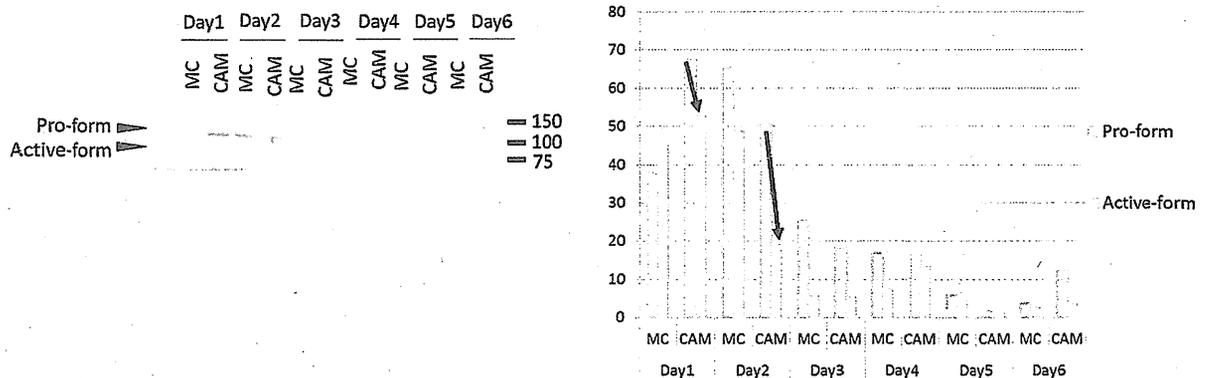


図5 感染3日目の肺のHE染色

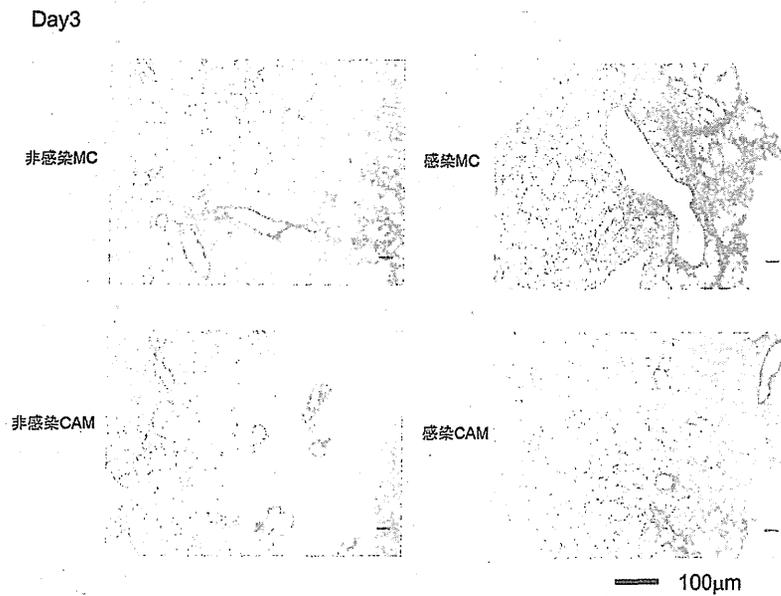
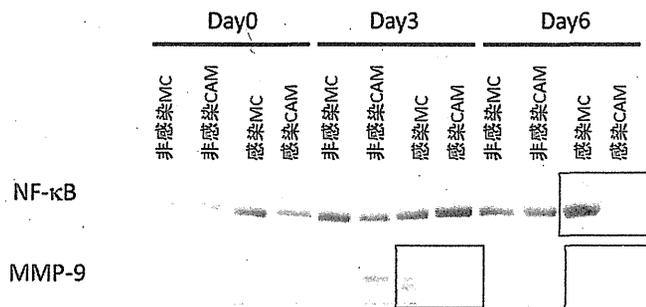


図5 ウェスタンブロッティングによるCAM投与マウスのNF-kappaBとMMP-9の発現変化



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

急性脳症とミトコンドリア病の急性期病態の類似性について

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)

研究要旨

インフルエンザ脳症の病態解明のため急性脳症とミトコンドリア病、特に PDHC (pyruvate dehydrogenase complex) 欠損症の急性期病態の異同を検討した。また血中 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さらに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。また各種ミトコンドリア病における解析も同様に行い急性脳症との病態の異同を検討した。PDHC 欠損症 9 才男児がインフルエンザ感染に引き続き意識障害等を起こしたとき MRS 上乳酸の上昇とともにグルタミン-グルタミン酸(Glx)の上昇を認め、回復とともに正常化した。この症例では病変は小脳歯状核が中心であり典型的な急性脳症 (AESD) とは異なるが、病態に共通するものがある。PDHC 欠損症 26 才男性では連日のピーナツ摂取により神経症状が軽快・安定した。また 3 日間のピーナツ中止で血中 ATP の低下と血中乳酸の高値を認めた。急性脳症一般にこの脂肪製剤投与が効果があるかどうかは不明であるが PDHC 活性が低下するような病態があれば一考の価値がある。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今回も確認された。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

急性脳症は我が国の小児に多く、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、ミトコンドリア機能不全、興奮毒性、酸化ストレスなどの多様な病態が進行し、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。

今回はミトコンドリア機能不全も想定される急性脳症とミトコンドリア病、特にPDHC (pyruvate dehydrogenase complex) 欠損症の急性期病態の異同を検討した。

また血中 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さらに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。また各種ミトコンドリア病における解析も同様に行い急性脳症との病態の異同を検討した。

B. 研究方法

当院でフォロー中の MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) 12才男児の脳卒中様発作の時の MRI, SPECT (Single Photon Emission CT), MRS (MR spectroscopy), PDHC 欠損症 9才男児のインフルエンザ感染における意識障害時の MRI, MRS と急性脳症 (AESD) のそれらを比較検討した。またピーナツを摂食することで臨床的な改善・安定を認めている PDHC 欠損症 26才男性のピーナツ中止3日間で血中 ATP と血中乳酸に与える効果をみて病態を検討した。

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 11例 (うち1例で急性期と回復期に測定)、ミトコンドリア病 11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

症例 1 MELAS 12才男児。初回の脳卒中様発作時の神経画像を図1に示す。左後頭頭頂葉に信号異常と血流低下、MRS で乳酸高値を認める。急性脳症 (AESD) で推測されている興奮毒性を反映するグルタミン-グルタミン酸 (図中 Glx) の上昇は認めず。

症例 2 PDHC 欠損症 9才男児。インフルエンザ感染に引き続き歩行障害、構語障害、意識変容をきたしたが糖、VB 群、カルニチンに加え脂肪製剤の投与で改善した。急性期と回復期の MRI, MRS を図2に示す。急性期には MRI 上小脳歯状核に信号異常を認め、MRS では乳酸の上昇とともにグルタミン-グルタミン酸 (図中 Glx) の上昇を認め、回復期にはそれらは全て改善した。急性期には血中乳酸は 4.20mM、回復期には 3.20mM、ATP 0.64mM、乳酸/ATP 比 5.02 であった。

症例 3 PDHC 欠損症 26才男性。1歳7ヶ月の時に発熱し感冒と診断された翌日より歩行不能、寝返り不能となった。血液・CSFの乳酸、ピルビン酸の上昇あり。筋生検を実施し、PDHC 欠損症と診断された。4才よりジクロロ酢酸、VB1 内服開始、12才よりピーナツの摂食開始 (40粒/日) したところ歩行や失調症状の改善を認めた。現在、足関節の拘縮、水平性眼振、姿勢保持異常、測定障害、企図振戦 (軽度)、構音障害、歩行障害、感覚障害はあるが比較的安定している。

ピーナツ3日間中止前後の結果

	中止前	中止後
血中ATP	0.95mM	0.64mM
血中乳酸値	3.2mM	4.9mM

ピーナツの摂食を中止したところ血中ATPの増加と血中乳酸の上昇を認めた。本患者のMRI, MRSを図3に示す。乳酸の上昇はない。

乳酸/ATP比について

図4に各疾患の乳酸/ATP比を示す。急性脳症16例の急性期(6.00±5.96)は熱性けいれん重積11例急性期(1.48±0.69)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11例のそれ(5.62±6.34)と比較し有意差は認めず。

図4中の症例4はDravet症候群1才10か月男児。染色体検査で2q24.3-q31の部分欠失あり。欠失部位にはDravet症候群の原因遺伝子であるSCN1Aの他、SCN2Aなど他のナトリウムチャネル遺伝子も含まれる。1歳8ヶ月、および1歳10ヶ月時けいれん重積型脳症に罹患し、MRIでびまん性的大脑・小脳萎縮を認め、重度の痙性四肢麻痺を後遺症をのこした。入院時ATP 0.2(mM)、乳酸5.00(mM)、乳酸/ATP比は24.48と異常高値であった。(正常値: 男 ATP 0.71±0.11(mM) 乳酸/ATP比 1.50±1.46)

症例5 インフルエンザ脳症4才10か月男児。入院時ATP 0.46(mM)、乳酸5.90(mM)、乳酸/ATP比12.8と高値であり、けいれん重積、意識障害が遷延し最重度の後遺症をのこした。

症例6 熱性けいれん重積1才6か月男児。けいれん頓挫までMDZ, PHT, thipental 静注などで100分を要した。脳波上右半球に徐波を認めたため急性脳症の可能性もありICU管理となった。入院時ATP 0.72(mM) 乳酸1.40(mM)、乳酸/ATP比1.94と以上を認めず。後遺症なく退院し2才過ぎの発達に問題はない。

D. 考察

遅発性拡散低下をともなう急性脳症(AESD)は病態仮説として興奮毒性が想定され急性期においてMRSでグルタミンーグルタミン酸(Glx)の増加がみられる。今回ミトコンドリアのうちPDHC

欠損症9才男児(症例2)がインフルエンザ感染に引き続き意識障害等を起こしたときMRS上乳酸の上昇とともにGlxの上昇を認め、回復とともに正常化した。この症例では病変は小脳歯状核が中心であり典型的なAESDと異なるが、病態に共通するものがあることがわかる。本例の治療には通常の治療に加え、脂肪製剤を導入した。PDHC欠損症では、ブドウ糖→ピルビン酸→アセチルCoAの流れが低下しているため中性脂肪→脂肪酸→アセチルCoAの反応からのアセチルCoA供給をねらったものである。ただし脳内でどの程度効果があるものか不明であるがWest症候群を呈するようなPDHC欠損症にケトン食が効果を示すことから脳内でも一定の効果がある可能性がある。事実、症例3のPDHC欠損症では連日のピーナツ摂取により神経症状が軽快・安定している。また3日間のピーナツ中止で血中ATPの低下と血中乳酸の高値を認めた。1日ピーナツ40粒で20g、120kCalとなる。ピーナツは果実の中で特に脂質含有量が多く、魚類ではサンマ、サバ、マグロのところに相当する。急性脳症一般にこの脂肪製剤投与が効果があるかどうかは不明であるがPDHC活性が低下するような病態があれば一考の価値がある。

症例1のMELASの脳卒中様発作時にはMRS上乳酸高値は認めたが、Glxの増加は認めず。嫌気性解糖の亢進はPDHC欠損症と共通するが興奮毒性による障害は少ないものと考えられた。Glxのうちglutamateは興奮性の伝達物質であり、またastrocyteに存在しglutaminに代謝され浸透圧調節物質としても働く。glutamine作動性神経が過度に興奮するとastrocyteにglutamineが過剰に蓄積し細胞性浮腫をきたす。急性脳症(AESD)やPDHC欠損症ではこの細胞性浮腫が共通していると思われる。両者ともにインフルエンザウイルスが引き起こしやすいことも共通の機序が想定される。

乳酸/ATP比は急性脳症急性期では高値(6.00

±5.95)、回復期で正常化するパターンが今回も確認された。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(1.48±0.69)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、細胞内部の病理の有無を反映していると考えられた。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、乳酸/ATP比は重症例の抽出、予後の推定に有用であった。その3例はインフルエンザ脳症(症例5)、Dravet症候群の急性脳症(症例4)、脳幹脳炎であった。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。

熱性けいれん重積急性期11例中4例はインフルエンザに関連したもののだが乳酸/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。症例5と6のように1時間以上のけいれん重積が共通する症例でも予後良好例(症例6)は乳酸/ATP比が正常であり予後を推定するマーカーとして有用であることが示された。

意識障害の遷延が急性脳症の定義であるが熱性けいれん重積に置いても発作後の意識障害が遷延することはある。この場合、脳波検査が鑑別に有用であるが、脳波を持ってしても画然と鑑別できない場合も多い。図4のように乳酸/ATP比も両者での重なりも多く単独での予後推定や鑑別は困難な場合がある。臨床経過、特に発熱からけいれん発作までの時間は重要であり、熱性けいれんは12時間以内、急性脳症はそれより長く、20時間を超えてのけいれんも多く、鑑別の一助となりうる。現段階の戦略としては臨床経過、脳波所見、乳酸/ATP比、画像を適宜あわせて診断をその都度再考していくことが重要である。

今回のデータでも乳酸/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(5.62±6.34)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、間接的にミトコンドリア機能の温存をはかっている。まだ予備的検討ではあるがビタミンB6投与により急性脳症の経過が短くなっている。

今回の乳酸/ATP比も前述のように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

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今回も確認された。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) Haga N, Kubota M, Miwa Z. Epidemiology of hereditary sensory and autonomic neuropathy type IV and V in Japan. Am J Med Genet Part A 2013;161A:871-874.
- (2) 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