

## 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

# メタボローム解析を用いたインフルエンザ脳症患者血清中の バイオマーカー候補の検討

分担研究者 伊藤 嘉規 名古屋大学医学部小児科学・講師

**研究要旨** インフルエンザ脳症における血清中の新規バイオマーカーを探索する目的で、インフルエンザ脳症12例と神経合併症のないインフルエンザ22名において、急性期・回復期血清検体中の代謝物プロファイリングをメタボローム解析にて検討した。検出された物質の中で、脳症群(急性期)では、コントロール群(急性期)と比較して、3種類の代謝物質の平均値に有意な上昇が認められた。これらの中で、tryptophan-kynurenine代謝経路の中間産物であるキヌレニンは、神経毒性が報告されている物質であり、病態に關与するバイオマーカー候補と考えられた。さらにkynurenineの下流代謝物であるquinolinic acidも、検体を追加して検討した結果、バイオマーカーの可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

インフルエンザ脳症では、感染に伴って惹起されるサイトカインなどの炎症性物質が病態に關与するとの報告があるが、なぜ脳症が起こるのか、どのようにして病態が進展するのかは十分に明らかにされていない。さらに、病態に關連する新規のバイオマーカーの探索は臨床上の意義が大きい。インフルエンザに關連するライ症候群では、病態として代謝異常が存在するため、インフルエンザ脳症で代謝プロファイル調べることが、病態に關係する新規バイオマーカーの発見につながる可能性がある。最近、代謝プロファイルを解析する手法としては、メタボローム解析が注目されていることから、私共は、臨床検体として使用しやすい血清検体を用いて、インフルエンザ脳症のメタボローム解析を試みた。

#### B. 研究方法

1. インフルエンザ脳症と診断した患者 12名と神経合併症のないインフルエンザ患者（コントロール群）22名の急性期および回復期血清を採取し、比較検討した(計68検体)。
2. CE-TOFMS装置（キャピラリー電気泳動時間飛行型質量分析、Agilent Technologies）を用いてカチオンモード、アニオンモードによる測定を行った。
3. 検出されたピークは自動積分ソフトウェアを用いて、ピーク情報を得た後、代謝物質データベースに登録された物質との

照合・検索を行った。

4. 主成分分析、階層クラスター分析、代謝経路の描出を行った。
5. 定量系のあるものでは定量値を算出し同様に比較を行った。
6. 解析結果を群間で比較し、バイオマーカー候補の検討を行った。
7. quinolinic acid について、さらに検討するため、インフルエンザ脳症 18例、熱性けいれん例 12例、神経合併症のない対照群 25例で、血清中のquinolinic acid濃度を測定し、比較検討した。

#### C. 研究結果

1. 血清 68 検体について、CE-TOFMS によるメタボローム解析を行い、174 ピークに候補物質が付与された。
2. 検出されたピークを用いて主成分分析を行った(Data not shown)。階層クラスターリングを行い、HeatMap 表示させた結果を得た。
3. 候補化合物について、解糖系/糖新生、ペントースリン酸経路、クエン酸回路、尿素回路、プリン代謝経路、ピリミジン代謝経路、ニコチン酸・ニコチンアミド代謝経路および各種アミノ酸代謝経路に描画した(以上は、昨年度の報告書に詳細を記載した)。
4. 49 の物質で定量が可能であった。これらのうち、脳症群(急性期)では、コントロール群(急性期)と比較して、3 種類の代謝物質の平均値に有意な上昇がみられ、

- 他方、2種類で有意な低下が認められた(図1)。(検出ピークの情報詳細に分析し、代謝物が付与できた物質を絞り込んだため、昨年の報告より修正・更新した)。
5. 上記の物質のなかで、kynurenineは、tryptophan-kynurenine代謝経路の中間代謝物質で、神経毒性が報告されており、この代謝経路における解析結果を図2に示す。
  6. kynurenineの下流の代謝物であるquinolinic acidについて、症例数を増やして検討した結果、脳症群の血清で有意な上昇を認めた(図3)。

#### D. 考察

メタボローム解析の結果を検討したところ、tryptophan-kynurenine経路の代謝物であるkynurenineとquinolinic acidが、病態に係るバイオマーカー候補と考えられた。これらの代謝物は、中枢神経感染症、HIV関連脳症、筋萎縮性側索萎縮症等で血清/髄液中の濃度上昇が報告されている。また、実験的に複数の作用機序による神経毒性も示されている。今後は、臨床的な応用の可能性についてさらに検討を加えていくことが重要と考えられる。

#### E. 結論

インフルエンザ脳症の患者血清を用いた代謝物プロファイリングを行い、脳症群で有意な変動を示した代謝物は、新しいバイオマーカー候補と考えられた。今後、より詳細な解析を行い、その意義を確認する予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Ohta R, Kimura H, Okumura A. Human Herpesvirus 6-Associated Encephalopathy in a Child with Dravet Syndrome. *Neuropediatrics*, 44:155-158, 2013
- 2) Kimura H, Kawada J, Ito Y. Epstein Barr-viruses-associated lymphoid malignancies: the expanding spectrum of hematopoietic neoplasms. *Nagoya J Med Sci*, 75:169-179, 2013.
- 3) Kawano Y, Iwata S, Kawada J, Gotoh K, Suzuki M, Torii Y, Kojima S, Kimura H, Ito Y. Plasma Viral MicroRNA Profiles Reveal Potential Biomarkers for Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. *J Infect Dis*. 208(5):771-779. 2013
- 4) Ito Y, Kimura H, Torii Y, Hayakawa M,

Tanaka T, Tajiri H, Yoto Y, Tanaka-Taya K, Kanegane H, Nariai A, Sakata H, Tsutsumi H, Oda M, Yokota S, Morishima T, Moriuchi H, Risk factors for poor outcome in congenital cytomegalovirus infection and neonatal herpes on the basis of a nationwide survey in Japan. *Pediatr Int* 55(5):566-571, 2013

- 5) Suzuki M, Torii Y, Kawada J, Kimura H, Kamei H, Onishi Y, Kaneko K, Ando H, Kiuchi T, Ito Y. Immunogenicity of inactivated seasonal influenza vaccine in adult and pediatric liver transplant recipients over two seasons. *Microbiol Immunol*, 57(10):715-722, 2013.
- 6) Imahashi N, Nishida T, Ito Y, Kawada J, Nakazawa Y, Toji S, Suzuki S, Terakura S, Kato T, Murata M, Naoe T. Identification of a novel HLA-A\*24:02-restricted adenovirus serotype 11-specific CD8+ T-cell epitope for adoptive immunotherapy. *Mol Immunol* 56(4):399-405, 2013
- 7) Kato S, Miyata T, Takata K, Shimada S, Ito Y, Tomita A, Elsayed A, Takahashi E, Asano N, Kinoshita T, Kimura H, Nakamura S. Epstein-Barr virus-positive cytotoxic T-cell lymphoma followed by chronic active Epstein-Barr virus infection-associated T/NK-cell lymphoproliferative disorder: a case report *Human Pathology* 44(12):2849-2852, 2013
- 8) Suzuki M, Ito Y, Shimada A, Saito M, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Kimura H, Kojima S. Long-term parvovirus B19 infections with genetic drift after cord blood transplantation complicated by persistent CD4+ lymphocytopenia. *J Ped Hematol Onc*, 36(1):e65-68, 2014
- 9) Hara S, Kawada J, Kawano Y, Yamashita T, Minagawa H, Okumura N, Ito Y. Hyperferritinemia in Neonatal and Infantile Human Parechovirus-3 Infection in Comparison with Other Infectious Diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 20(1):15-19, 2014

##### 2. 学会発表

- 1) 伊藤嘉規、小児科病棟での迅速診断とその応用-入院児のウイルス感染症早期診

- 断と院内感染対策-、分野別シンポジウム 9、第 116 回日本小児科学会学術集会、広島、2013.4.19-21、日本小児科学会雑誌 117(2):S48,2013
- 2) 鳥居ゆか、河野好彦、神谷泰子、鈴木道雄、川田潤一、伊藤嘉規、メタボローム解析を用いたインフルエンザ脳症の新規バイオマーカーの探索、第 116 回日本小児科学会学術集会、広島、2013.4.19-21、日本小児科学会雑誌 117(2):158,2013
  - 3) 鳥居ゆか、河野好彦、神谷泰子、鈴木道雄、川田潤一、伊藤嘉規、メタボローム解析によるインフルエンザ脳症患者血清中の代謝物プロファイリング、第 87 回日本感染症学会学術講演会、横浜、2013.6.5-6、感染症学雑誌 87(臨時増刊号):330,2013
  - 4) Yuka Torii, Yoshihiko Kawano, Hajime Sato, Tamaki Fujimori, Kazunori Sasaki, Jun-ichi Kawada, Yoshiaki Ohashi, Yoshinori Ito, Quantitative metabolome profiling reveals novel potential biomarkers in influenza-associated encephalopathy, IDWeek 2013, San Francisco, USA, October 2-6, 2013
  - 5) Yoshihiko Kawano, Yuka Torii, Hajime Sato, Tamaki Fujimori, Kazunori Sasaki, Jun-ichi Kawada, Yoshiaki Ohashi, Yoshinori Ito, Quantitative metabolome profiling reveals novel potential biomarkers in human herpesvirus 6 encephalopathy, IDWeek 2013, San Francisco, USA, October 2-6, 2013
  - 6) 鳥居ゆか、河野好彦、神谷泰子、鈴木道雄、川田潤一、伊藤嘉規、メタボローム解析を用いたインフルエンザ脳症・HHV-6 脳症における新規バイオマーカーの探索、第 45 回日本小児感染症学会総会・学術集会、札幌、2013.10.26
  - 7) 伊藤嘉規、河野好彦、鳥居ゆか、安藤将太郎、神谷泰子、鈴木道雄、川田潤一、木村宏、国際標準物質を用いた EBV・CMV 定量 PCR 系の標準化、第 45 回日本小児感染症学会総会・学術集会、札幌、2013.10.26
  - 8) 川本愛里、岩澤賢太郎、近藤健夫、角野知之、十河剛、小松陽樹、乾あやの、伊藤嘉規、森雅亮、横田俊平、藤沢知雄、全身型若年性突発性関節炎に伴う肝機能異常の検討、第 45 回日本小児感染症学会総会・学術集会、札幌、2013.10.26
  - 9) 鈴木道雄、中川光、岩田誠子、五島典、伊藤嘉規、村田貴之、鶴見達也、木村宏、EBV 関連 T/NK 腫瘍に対する Hsp90 阻害剤の効果、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2013.11.10-12
- G. 知的財産権の取得状況**
1. 特許取得  
特になし
  2. 実用新案登録  
特になし
  3. その他  
特になし

## (図1) バイオマーカー候補

	同定された化合物	定量された物質
インフルエンザ脳症	174種	49種

脳症で有意に上昇/低下していた代謝物質

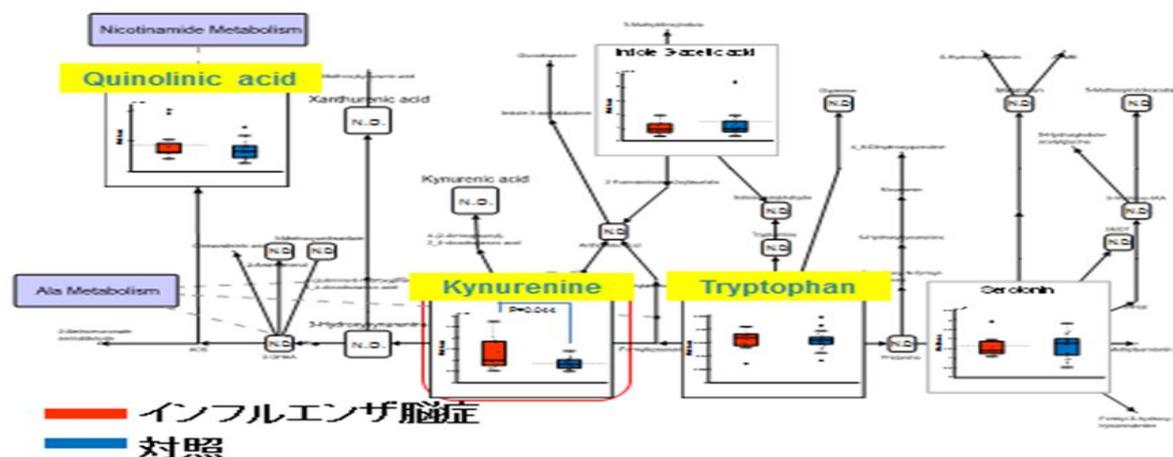
インフルエンザ脳症 > 対照

**Kynurenine**  
**Succinic Acid**  
**Undecanoic acid**

インフルエンザ脳症 < 対照

Cystine  
Decanoic acid

## (図2) Kynurenine代謝経路の代謝物の動態



## (図3) Quinolinic acidの定量結果

