

生児マスキリーニングの社会的意義
と課題. 公衆衛生情報 44(3): 5-8, 2014
(6月)

- (27) 山口清次: ミトコンドリア脂肪酸β酸化異常症. 編: 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.29 神経症候群 (第2版) III -その他の神経疾患を含めて- -VII 先天代謝異常-, 日本臨床社, 大阪, p627-631, 2014 (6月, 883)
- (28) 山口清次: 有機酸代謝異常. 編: 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.29 神経症候群 (第2版) III -その他の神経疾患を含めて- -VII 先天代謝異常-, 日本臨床社, 大阪, p622-626, 2014 (6月, 883)
- (29) 山口清次: 有機酸・脂肪酸代謝異常症. 編: 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.31 神経症候群 (第2版) VI -その他の神経疾患を含めて- -X IVてんかん症候群 全般てんかんおよび症候群 症候性 特異症候群 先天代謝異常-, 日本臨床社, 大阪, p205-211, 2014 (12月)
- (30) N. Nagano, Y. Nagano, M. Toyama, T. Nakazawa, S. Sasaki, K. Shibayama, Y. Arakawa. Successful detection of blaNDM-1-harboring but modified Hodge test-negative *E. coli* by modified SMA-Disk method, and first characterization of XDR-klebsiella pneumonia harboring blaNDM-1 and/or blaOXA-181 from a foreigner visited to Japan. *Jpn J Infect Dis* 2015; Manuscript under review.
- (31) S. Sasaki, Y. Yoshioka, R. Ko, Y. Katsura, Y. Namba, T. Shukuya, K. Kido, S. Iwakami, S. Tominaga, K.

Takahashi. Diagnostic significance of cerebrospinal fluid EGFR mutation analysis for non-small cell lung cancer patients harboring an active EGFR mutation with leptomeningeal metastasis following gefitinib therapy failure. *Respir Investig* 2015; Manuscript under review.

- (32) 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* 2013; 2: 79-84.
- (33) 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, 山口哲生. *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. *Therapeutic Research* 2013; 34: 759-760.
- (34) 磯部 全, 佐々木 信一, 富永 滋, 前野敏孝, 倉林 正彦. 喘鳴を伴わずに発症した好酸球性細気管支炎の1例. *日本呼吸器学会誌* 2013; 2: 607-611.
- (35) 磯部 全, 佐々木信一, 神戸将彦, 相澤智弘, 原 健一郎, 前野敏孝. 咯血を主訴とし、びまん性肺泡出血との鑑別を要した気管支管支骨軟骨形成症の1例. *気管支学* 2014; 36: 73-77.
- (36) 井上貴昭, 中澤武司, 麻生恭代, 成田久美, 秋田美佳, 中村美子, 石井幸, 佐々木信一, 田中裕. 多職種 ICT ラウンドがもたらす効果について. *日臨救医会誌* 2014; 17: 25-31.
- (37) Nishimura H, Okusa Y. A verification of an overestimation of “deaths associated with influenza pandemic of 1918-1919, Japan” claimed in a

- demographic study. JJID, in press, 2014.
- (38) Katsushima Y, Katsushima F, Suzuki Y, Seto J, Mizuta K, Nishimura H, Matsuzaki Y. Characteristics of mycoplasma pneumoniae infection identified by culture in a pediatric clinic. *Pediatr Int.* 2014, 57: doi: 10.1111/ped. 12513.
- (39) M Yamaya, LK Nadine, C Ota, H Kubo, T Makiguchi, R Nagatomi, H Nishimura: Magnitude of influenza virus replication and cell damage is associated with interleukin-6 production in primary cultures of human tracheal epithelium. *Resp Physiol Neurol.* 2014, 202, 16-23.
- (40) E Hatagishi, Okamoto, Ohmiya, H Yano, T Hori, W Saito, H Miki, Y Suzuki, R Saito, T Yamamoto, M Shoji, Y Morisaki, S Sakata, H Nishimura. Establishment and Clinical Applications of a Portable System for Capturing Influenza Viruses Released through Coughing. *PLOS ONE*, 2014, 9(8), e103560. doi: 10.1371.
- (41) Yamaya M, Nishimura H, Nadine LK, Ota C, Kubo H, Nagatomi R. Ambroxol inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial cells. *Arch Pharm Res.* 2014, 37: 520-529.
- (42) Yamaya M, Nishimura H, Nadine L, Kubo H, Nagatomi R. Formoterol and budesonide inhibit rhinovirus infection and cytokine production in primary cultures of human tracheal epithelial cells. *Resp Invest.* 2014, 52, 251-260.
- (43) M Yamaya, L Nadine, H Kubo, K Saito, R Saito, H Nishimura: Effects of neuraminidase inhibitors on the release of oseltamivir-sensitive and oseltamivir-resistant influenza viruses from human airway epithelial cells. *J Med Virol* 2014, DOI: 10.1002/jmv. 23974.
- (44) 小山田厚子、三木祐、鈴木克之、佐々木悟、深瀬真由美、伊藤洋子、大宮卓、他 ICT メンバー、西村秀一. 地域流行前の一病棟内でのインフルエンザ集団発生と対応, 医療 (印刷中) 2015
- (45) 大宮卓、佐々木純一、西村秀一. イムノクロマト法を原理とする種々のアデノウイルス迅速抗原検出キットの、ウイルス検出感度の比較. 医学検査 (印刷中) 2015
- (46) 菊地祐樹、鈴木優子、伊藤洋子、西村秀一. 噴霧式インフルエンザ生ワクチンの力価についての検討. 仙台医療センター医学雑誌 2014, 4: 39-41.
- (47) 菱川容子、橋本真帆、倉橋宏和、別府玲子、大谷可菜子、西村秀一. 重症心身障害児 (者) 施設におけるヒトメタニューモウイルスの集団感染と重症例の発生. 日本重症心身障害学会誌, 2014, 39: 379-383.

2. 学会発表

- (1) Indalao IL, Yanmane K, Kido H. PDK4 inhibitor suppresses cytokine storm and multiple organ failure induced by lethal doses of influenza A virus infection through restoration of energy metabolic disorder. 第 87 回日本生化学会大会. 平成2

6年10月15日—10月18日(京都国際会議場)

(2) Indalao IL, Yanmane K, Kido H. インフルエンザウイルスの体内複製を増強する trypsin の臓器内発現量は「代謝障害—サイトカイン」サイクルの調節下にある:PDK4 阻害剤の有効性 第19回日本病態プロテアーゼ学会学術集会. 平成26年8月8日—8月9日(千里ライフサイエンスセンター)

(3) インターフェロン γ によるレトロウイルス感染抑制に関与する新規細胞性因子の同定、久保嘉直、泉田真生、安井潔、林日出喜、松山俊文、第62回日本ウイルス学会学術総会、平成26年11月10~12日(パシフィコ横浜)

(4) Yamaguchi S: Organic Acidaemias and emergency treatments. 1st Asia Pacific Inborn Errors of Metabolism Course 講演. Tokyo, January 2014

(5) Yamaguchi S: Pediatric emergency and inborn metabolic disease. Seminar: Updates on Inborn Errors of Metabolism セミナー. Kubang Kerian Kelantan, Malaysia, April 2014

(6) Yamaguchi S: Current topics in mass screening and collaboration studies with Asian countries. Seminar: Updates on Inborn Errors of Metabolism セミナー. Kubang Kerian Kelantan, Malaysia, April 2014

(7) Yamaguchi S, Liu L, Furui M, Yamada K, Taketani T, Shibata N, Kobayashi H, Hasegawa Y, Fukuda S: Improvement of fatty acid oxidation capacity of cells from fatty acid oxidation defects at low temperature: evaluation by in vitro probe assay. Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of

Metabolism. Innsbruck, Austria, September 2014

(8) Vatanavicharn N, Taketani T, Nabangchang C, Yamaguchi S: Isolated sulfite oxidase deficiency: A rare metabolic disorder with neuroimaging mimicking perinatal asphyxia. 第56回日本先天代謝異常学会. 仙台, 11 2014

(9) 長谷川有紀, 古居みどり, 小林弘典, 山田健治, 高橋知男, 竹谷 健, 山口清次: ミトコンドリア三頭酵素 (TFP) 欠損症の出生前診断 5 症例の経験. 第 11 回中国四国出生前医学研究会. 岡山, 2014 年 2 月

(10) 長谷川有紀, 小林弘典, 山田健治, 高橋知男, 新井真理, 室谷浩二, 山口清次: 尿中有機酸分析によりトルエン中毒が疑われた 5 ヶ月男児例: 虐待の疑いのある ALTE 症例. 第 20 回日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会. さいたま市, 2014 年 3 月

(11) 坊 亮輔, 山田健治, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: 管理に難渋している CPT-2 欠損症の4か月女児例. 第93回山陰小児科学会. 米子, 2014年9月

(12) 高橋知男, 坊亮輔, 山田健治, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: 解熱剤の脂肪酸 β 酸化に対する影響: サリチル酸、ジクロフェナクナトリウム、アセトアミノフェンの評価. 第56回日本先天代謝異常学会. 仙台, 2014年11月

(13) 山田憲一郎, 内木美紗子, 星野伸, 北浦靖之, 近藤雄介, 下澤伸行, 山口清次, 下村吉治, 三浦清邦, 若松延昭: HIBCH 欠損症の同定と変異タンパク質の生化学的解析. 第56回日本先天代謝異常学会. 仙台, 2014年11月

(14) 佐々木信一, 南條友央太, 中澤武司, 木下綾子, 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: 声帯部カポジ肉腫の生検時にキシロ

カインショックを生じ、治療に難渋した全身性カポジ肉腫合併 AIDS の一例. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪, 2014.12.03

(15) 岸井 絢, 吉岡泰子, 推名健太郎, 荒野直子, 関本康人, 栗山祥子, 南條友央太, 村木慶子, 佐々木信一, 富永 滋: 癌性髄膜炎に対し、VP shunt と WBRT、erlotinib 投与を施行し長期生存を得た EGFR 陽性肺線癌の一例 第 212 回日本呼吸器学会関東地方会, 横浜, 2014.11.22

(16) 村木慶子, 吉岡泰子, 鋤崎恵理子, 推名健太郎, 松野 圭, 栗山祥子, 南條友央太, 佐々木信一, 富永 滋: EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌における EGFR-TKI 耐性獲得後の 2 次変異検索の有用性. 第 55 回日本肺癌学会総会, 京都, 2014.11.16

(17) 推名健太郎, 高橋史行, SFariz Nurwidya, 小林 功, 宿谷威仁, 村上明子, 朝尾哲彦, 金丸良太, 柳下薫寛, 加藤元康, 村木慶子, 大橋里奈, 小山 良, 高橋元美, 嶋田奈緒子, 吉岡泰子, 佐々木信一, 富永 滋, 高橋和久: 非小細胞肺癌の EGFR-TKI 耐性獲得における ZEB1 の発現検討. 第 55 回日本肺癌学会総会, 京都, 2014.11.16

(18) 推名健太郎, 佐々木信一, 宿谷威仁, 松野 圭, 堤 建男, 栗山祥子, 南條友央太, 村木慶子, 吉岡泰子, 長岡鉄太郎, 富永 滋, 高橋和久: EML4-ALK 陽性非腺癌非小細胞肺癌に対するクリゾチニブ投与の 4 症例の検討. 第 55 回日本肺癌学会総会, 京都, 2014.11.14

(19) 南條友央太, 佐々木信一: 脊椎への直接浸潤をきたした菌球型肺アスペルギルス症の一例. 第 63 回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 東京, 2014.10.31

(20) 佐々木信一, 南條友央太: インフルエンザウイルス感染症におけるバイオマーカーの検討. 第 63 回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 東京, 2014.10.31

(21) 鈴木洋平, 南條友央太, 推名健太郎, 松野 圭, 村木慶子, 吉岡泰子, 佐々木信一,

富永 滋: 若年女性で緑膿菌と *M.kansasii* 共感染により肺膿瘍を形成した一例. 第 209 回日本呼吸器学会関東地方会, 幕張, 2014.05.24

(22) 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, 富永 滋: Bepridil が原因と考えられた薬剤性間質性肺炎の 3 例. 第 54 回日本呼吸器学会総会, 大阪, 2014.04.25

(23) 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

(23) 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

(24) 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

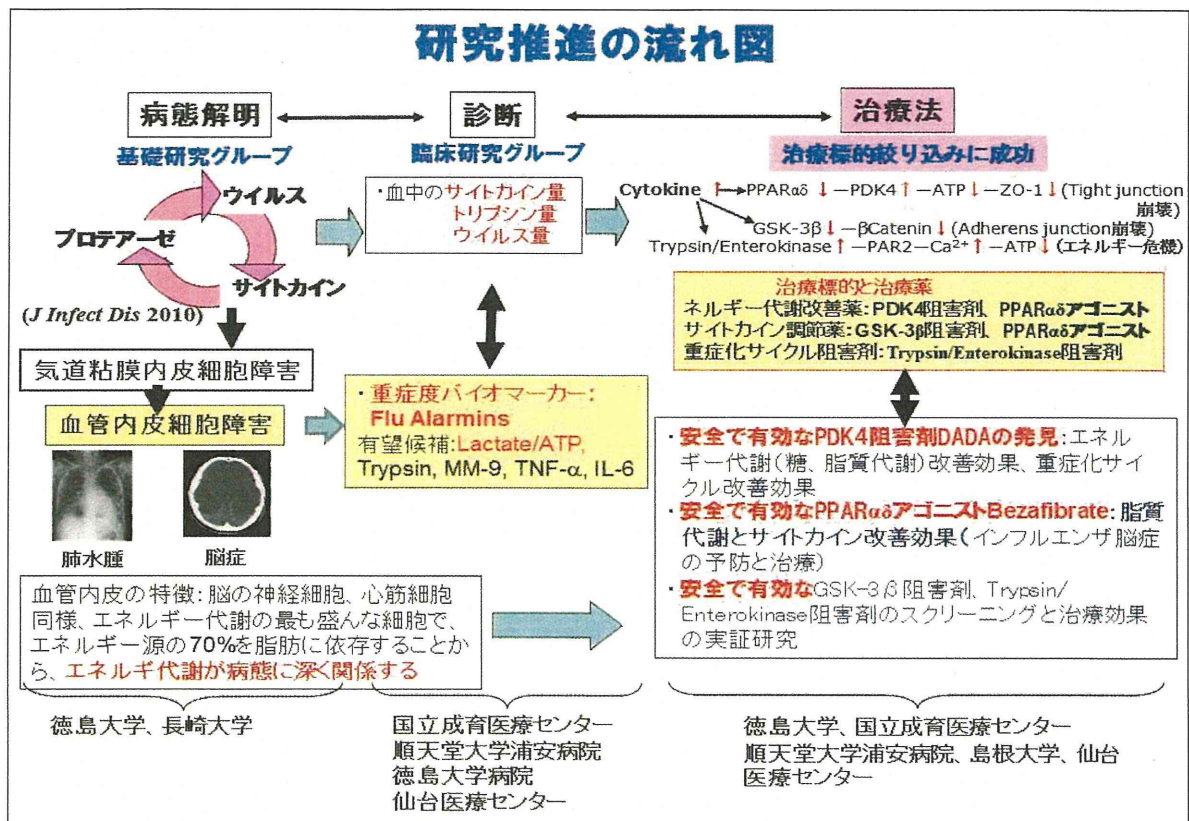
(25) 松岡遊貴, 吉岡泰子, 松野圭, 推名健太郎, 鈴木洋平, 南條友央太, 村木慶子, 佐々木信一, 二川俊郎, 富永 滋: リンパ管シンチと胸腔鏡により漏出部位を確認した乳糜胸の 1 例. 第 208 回日本呼吸器学会関東地方会, 東京, 2014.02.22

(26) 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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況なし。



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)
梶本奈緒子 (徳島大学疾患酵素学研究センター 研究員)

研究要旨

インフルエンザ重症化(肺炎、脳症)発症機序の解明、重症化を早期に診断するためのバイオマーカー、Flu Alarmin の検索、重症化治療薬の検索について、昨年について解析が行われ、これまで提唱してきた「インフルエンザ—サイトカイン—プロテアーゼ (Trypsin, MMP-9)」サイクルに共役する「体内代謝障害—サイトカイン」サイクルが確認され、重症化阻止の戦略が明確になった。体内代謝障害の中でも、生命活動に直結しているエネルギー代謝の中で、特に Pyruvate Dehydrogenase と Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 (PDK4) がサイトカインと密接に関係しており、PDK4 阻害剤の治療効果が確認された。抗インフルエンザ薬とこの PDK4 阻害剤の併用で、半数致死量の20倍の極めて高濃度のウイルス感染でも生存率100%が達成され、その治療効果が注目された。昨年報告した PDK4 阻害剤の Diisopropylamine Dichloroacetate 以外のより強力な PDK4 阻害剤がスクリーニングされ、有望な新規化合物が数種同定された。

従来インフルエンザ脳症リスク因子として、熱不安定性 Carnitine Palmitoyltransferase II (CPT II) 遺伝子多型を見出してきた。インフルエンザ脳症が当初日本人種に特徴的と言われてきたが、大規模な遺伝子解析と脳症調査が中国で我々との共同研究で実施され、熱不安定性 CPT II と脳症との関係が海外でも確認された。このことから熱不安定性 CPT II によるインフルエンザ脳症は、東アジア人種に共通する疾患と考えられた。さらに、全血を用いて診療の現場で熱不安定性 CPT II SNP を30-40分以内に診断する方法として、理化学研究所が開発した SMART AMP 法を用いて検証することで、実用化が可能と判定された。

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

害による血管透過性亢進と多臓器不全にある。発症機序として、これまでに本研究グループでは「インフルエンザ—サイトカイン—

プロテアーゼ” ウイルス増殖サイクルを見出し、さらに昨年度の研究によりウイルス増殖サイクルと重症化の発症を結びつける“サイトカイン—代謝不全”サイクルを見出した。図1に示す2つのサイクルがサイトカインを介して共役したときに重症化が発症すると考えられることから、早期重症化診断と治療に関する検討を実施した。昨年までの研究から、エネルギー代謝を改善する図2に示す Pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) 阻害剤がこの2つのサイクルを効果的に阻害して、サイトカインストームを治療すると共に、“インフルエンザ—サイトカイン—プロテアーゼ” ウイルス増殖サイクルを抑制することが判明している。これらを基盤に、①抗インフルエンザ薬のタミフルと PDK4 阻害剤の diisopropylamine Dichloroacetate (DADA) との併用効果を検討した。② DADA は肝臓保護薬として約 50 年前前から使用されてきた既存薬であるが、DADA より強力な PDK4 阻害剤の検索を実施した。③ 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。この疾患が日本で最初に発見されたことから、従来日本人に特有な疾患として位置付けられてきた。しかし、この疾患の発症リスク因子として、ミトコンドリアの脂肪酸代謝酵素の Carnitine Palmitoyltransferase (CPT II) の熱不安定性 SNP が原因であることを突き止めたことから、日本人に特徴的な疾患では無く、東アジア人種の CPT II SNP を背景とする可能性が考えられた。そこで、中国人でのインフルエンザ脳症の発症と、CPT II SNP を調査した。④ インフルエンザ脳症は、脳の血管内皮細胞の機能不全が病気の本態であると推定されるため、機能不全になる前に早期に診断して治療に着手する必要がある。そこで、高熱が持続することで障害の起きやすい患者に、診療の現場で熱不安定性

CPT II SNP を調べる方法の開発に取り組んだ。

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 Influenza A/PR/8/34 (H1N1) 株を用いた。なお、タミフルと DADA との併用実験では、半数致死量の 20 倍を示す極めて高濃度のウイルスの経鼻投与で検討した。

DADA より強力な PDK4 阻害剤の検索では、北里大学生命科学研究所の創薬ライブラリーを動員して、北里大学生命科学研究所が共同で実施した。中国のインフルエンザ脳症患者の Fibroblast を用いた熱不安定性 CPT II SNP の性状解析は、南通医学院との共同研究として実施された。

(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

①抗インフルエンザ薬のタミフルと DADA との併用によるインフルエンザ感染重症化の阻止効果

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3は、半数致死量の 20 倍量、致死量 120 PFU の 10 倍量の高濃度ウイルス (1200 PFU) を経鼻感染させて DADA の効果を検討した。この過酷な感染条件でも DADA 単独で生存率 50% が得られた。また

この条件でヒト治療量のタミフル (10 mg/kg/day) はマウスに対して生存率 70%を示したが、タミフルの量を増やしてもさらなる効果は期待できなかった (data not shown)。この条件下で、タミフルと DADA を併用するとマウスの生存率は 100%を達成した。なお、タミフルと DADA の併用療法は、感染初日から投与した時の効果を示しており、できるだけ早期の治療開始が好ましいと推定された。

②新規 PDK4 阻害剤のスクリーニング

DADA は、PDK4 に対して $IC_{50} = 50.9 \mu\text{M}$ を示し、類似アイソマーの PDK2 には $IC_{50} = 636.0 \mu\text{M}$ を示して、PDK4 に対する高い特異性を示した。これらの値は、従来 PDK 阻害剤として知られていた Dichloroacetate (DCA) の示す $IC_{50} = 57.8 \mu\text{M}$ (PDK4)、 $IC_{50} = 676.0 \mu\text{M}$ (PDK2) とほぼ同等の阻害効果と考えられる。そこで、これまでに報告されている PDK4 の X 線結晶構造解析データから、活性中心の立体構造と ATP 結合部位の構造を参考に、活性中心部位に入りうる化合物のサイズを推定して、Protein Kinase 阻害剤とその類縁体をスクリーニングして、誘導体作成に適したリード化合物をスクリーニングした。毒性が低くより強い PDK4 阻害活性を示す 4 種の化合物が選択されたが、これらの中で、各種誘導体の作成に有利な KIS-012 (Vit K3) を選択して、各種誘導体の作成を実施し、DADA の約 100 倍強力な PDK4 新規阻害剤を数種類見出すことに成功した。

③中国人におけるインフルエンザ脳症のリスク因子、熱不安定性 CPT II SNP の再現性の検証

インフルエンザ脳症は日本で最初に発見されたことから、日本人に特有な疾患として位置付けられてきた。しかし、この疾患の発

症リスク因子として、ミトコンドリアの脂肪酸代謝酵素の Carnitine Palmitoyl-transferase (CPT II) の熱不安定性 SNP が原因であることを我々が突き止めたことから、東アジア人種に特徴的な疾患の可能性を推定して、詳細な検討を中国で実施した。中国、南通医学院でインフルエンザ脳症と診断された 12 名の患者の白血球から、遺伝子診断でこれまでに日本で報告されていた 3 型の CPT II SNP を確認できた。具体的には、[c.1102 G>A (p.V368I)] (heterozygous)、[c.1102 G>A (p.V368I)] (homozygous)、[c.1055T>G (p.F352C)] (heterozygous)+ [c.1102 G>A (p.V368I)] (homozygous) の 3 型であった。患者のファイブプロブラストを用いて、酵素の熱不安定性、細胞内 Half-life、ミトコンドリアでの β -酸化と ATP 産生量の測定を実施した。

その結果、図 5 に示すように、F352C (heterozygous) + V368I (homozygous) では、 37°C では Control の wild type に比較して約 63%に酵素活性は減少し、さらに 41°C の高熱条件下では、32%に減少した。V368I (homozygous)、V368I (heterozygous) では、 37°C において wild type (WT) に比較して有意な減少は観察されず、 41°C の高熱条件下で僅かに減少して約 82%を示した。以上のことから、F352C (heterozygous) + V368I (homozygous) の熱不安定性 SNP が確認された。さらに、細胞内の蛋白を [^{35}S]-methionine で 2 時間 Pulse ラベルした後、細胞を洗浄して Chase 実験を実施した。図 6 に示すように、WT CPT II は half-life=18 時間を示したが、V368I (homozygous) は 10 時間を、F352C (heterozygous) + V368I (homozygous) の half-life は 4 時間を示した。このような状況下における細胞内ミトコンドリアの β 酸化と ATP 産生レベルを測定した結果を図 7 に示

す。F352C (heterozygous) + V368I (homozygous) では、β酸化と ATP 産生レベルは共に 37 ° C で WT の 75%を、41 ° C で WT の 52%を示した。ATP レベルは、40-50%以下で致命的であり、F352C (heterozygous) + V368I (homozygous) の SNP を持つ細胞では 41 ° C の条件下では危険な状態にあることが判る。

④ CPT II SNP の迅速診断

CPT II の熱不安定性に係わる因子は、図 5、6、7 に示すように、F352C であることから、F352C (heterozygous)、F352C (homozygous) と WT を迅速に外来で判定する方法の開発を検討した。これまでに理化学研究所では、全血を用いて DNA の抽出操作なしに 30-40 分以内に遺伝子増幅する SMART AMP システムを開発している。そこで本プロジェクトではこの迅速性と簡易性に注目して、F352C の遺伝子解析を SMART AMP システムで検討した。図 8 に示すように、F352C と F352C の homozygous と heterozygous を 30-40 分以内に解析が可能であることが確認された。

D. 考察

平成 26 年度の研究により、サイトカインを介して共役する“インフルエンザ-サイトカイン-プロテアーゼ”サイクルと“サイトカイン-代謝不全”サイクルが、重症化発症の主要な原因であることが確認され、治療薬として PDK4 阻害剤の DADA を介する糖代謝の改善、CPTII 発現を促進する Bezafibrate による長鎖脂肪酸代謝の改善が、有効であることが確認された。これらを基盤に、抗インフルエンザ薬と DADA の併用効果が検討され、感染早期からの両薬剤の併用で著明な重症化阻止効果を示すことが判明した。

さらに小児のインフルエンザ重症化の代

表的疾患であるインフルエンザ脳症において、日本人種に特徴的な疾患といわれていたが、この疾患の発症原因が CPT II の熱不安定性 SNP にあることを、中国人のインフルエンザ脳症患者でも確認することができた。

インフルエンザ脳症は、脳の血管肺皮細胞の血液脳関門が開いてからでは治療が困難になるため、早期の診断が重要である。そこで外来でインフルエンザ脳症のリスク因子の熱不安定性 SNP、F352C を患者の全血で 30-40 分以内に診断する方法を明らかにしており、今後の医療現場での応用が期待される。

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」が確認された。このネットワーク機構の中で、抗インフルエンザ薬と糖代謝不全の治療薬の DADA との併用による著明な治療効果が確認された。

従来インフルエンザ重症化の発症リスク因子として見出していた CPT II の熱不安定性 SNP が、中国のインフルエンザ脳症患者でも共通して見いだされたことから、東アジア人種に共通したリスク因子になることを確認し、その迅速診断法を確立した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Min Yao, Min Cai, Dengfu Yao, Xi Xu, Rongrong Yang, Yuting Li, Yuanyuan Zhang, Hiroshi Kido, Dengbing Yao. Abbreviated half-lives and impaired fuel utilization in carnitine

- palmitoyltransferase II variant fibroblasts. *PLoS ONE*, 2015; 10(3), e0119936.
- (2) Toshihiro Maekawa, Takashi Kimoto, Dai Mizuno, Yuichi Furukawa, Masayuki Ida, Etsuhisa Takahashi, Takayuki Izumo, Yoshiko Ono, Hiroshi Shibata, Hiroshi Kido. Oral administration of lactobacillus pentosus strain S-PT84 enhances anti-influenza virus specific IgG production in plasma after limited doses of influenza virus vaccination in mice. *J Vaccine Immuno* 2015; 2(1):5.
- (3) Mineyoshi Hiyoshi, Irene L Indalao, Mihiro Yana, Kazuhiko Yamane, Etsuhisa Takahashi, Hiroshi Kido. Influenza A virus infection of vascular endothelial cells induces GSK-3 β -mediated β -catenin degradation in adherens junctions, with a resultant increase in membrane permeability. *Arch Virol* 2015; 160: 225-234.
- (4) Hai-Yan Pan, Hua-Mei Sun, Lu-Jing Xue, Min Pan, Yi-Ping Wang, Hiroshi Kido, Jian-Hua Zhu. Ectopic trypsin in the myocardium promotes dilated cardiomyopathy after influenza A virus infection. *Am J Physiol Circ Physiol* 2014; 307: H922-H932.
- (5) Yamane K, Indalao IL, Yamamoto Y, Hanawa M, Kido H. Diisopropylamine dichloroacetate, a novel pyruvate dehydrogenase kinase 4 inhibitor, as a potential therapeutic agent for multiorgan failure in severe influenza. *PLoS ONE*, 2014; 9(5): e98032.
- (6) 木戸博, インフルエンザ感染症の予防と治療に関する新展開 インフルエンザ 2014; 16(2): 5-6.
- (7) 木戸博 インフルエンザ脳症と CPT-II 熱不安定性遺伝子多型 クリニシアン 2014; 61(634): 13-16.
- (8) 木戸博 インフルエンザ感染症の重症化メカニズム *J Otolaryngo Head Neck Surgery* 2014; 30(11): 1540-1544.
- (9) 木戸博 インフルエンザ感染の重症化機序、肺炎・脳症の最新知見と治療法の提案 *都耳鼻会報* 2014; 143: 41-46.
- ## 2. 学会発表
- (1) Indalao IL, Yanmane K, Kido H. PDK4 inhibitor suppresses cytokine storm and multiple organ failure induced by lethal doses of influenza A virus infection through restoration of energy metabolic disorder. 第 87 回日本生化学会大会。平成26年10月15日—10月18日(京都国際会議場)
- (2) Indalao IL, Yanmane K, Kido H. インフルエンザウイルスの体内複製を増強する trypsin の臓器内発現量は「代謝障害—サイトカイン」サイクルの調節下にある:PDK4 阻害剤の有効性 第19回日本病態プロテアーゼ学会学術集会。平成26年8月8日—8月9日(千里ライフサイエンスセンター)
- ## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)
- 該当なし。

重症化治療の新展開: 予防と治療の可能性

| 薬剤 | 主な作用 | 重症化: 代謝破綻・ATPクライシス/ 血管透過性亢進/細胞結合崩壊等 |
|--------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ・アプロチニン (牛肺由来: BAYER) | トリプシン阻害 | <p>プロテアーゼ: トリプシン↑ MMP-9↑</p> <p>PDK4↑ ↓ 糖代謝抑制 /ATPクライシス 脂肪酸代謝抑制</p> <p>・血管内皮細胞障害 ・多臓器不全 ・熱による後天性 CPTII欠損症状態 (エネルギー代謝不全)</p> |
| ・ジクロロ酢酸 ジソプロピルアミン(DADA) (サイトカインストームの治療薬) Vit B15 | PDK4阻害 | |
| ・ベザフィブレート | CPTII転写促進 | |
| ・70%炭水化物/中鎖脂肪酸ミルク ・解熱(一部解熱剤は不可) | | |
| ・クラリスロマイシン | MMP-9発現抑制 | |
| ・クラリスロマイシン | 再感染抑制 (粘膜免疫増強) | ⇒重症化抑制(症状改善) 再感染予防 |

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”

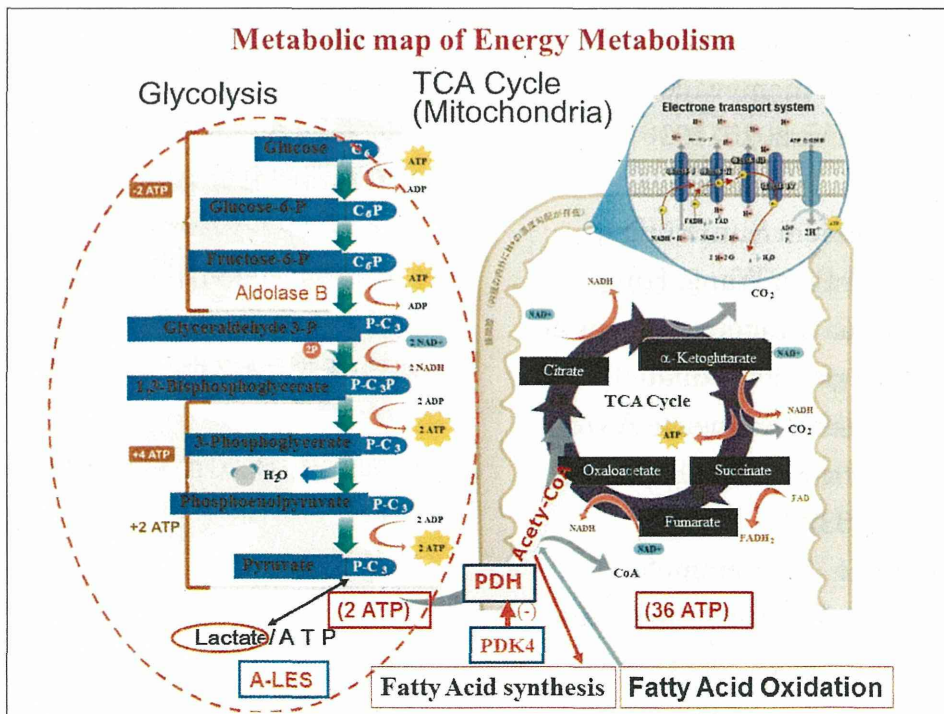


図2. エネルギー産生系とPDH、PDK4

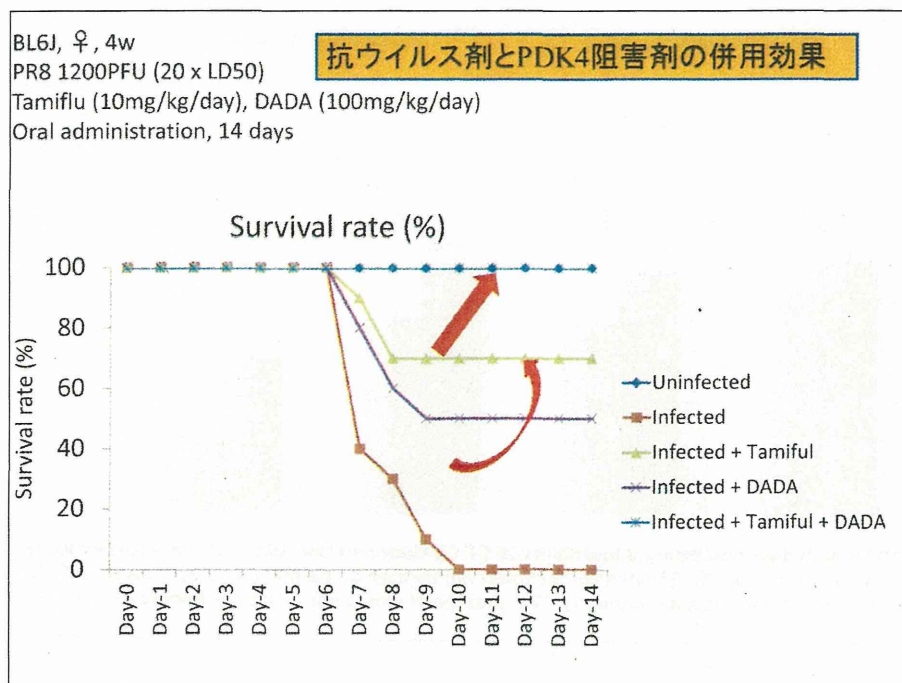


図 3. 20 × LD50=1200 pfu の高濃度インフルエンザ感染に対する抗インフルエンザ薬 Tamiflu と糖代謝改善薬 DADA の単独効果と併用効果

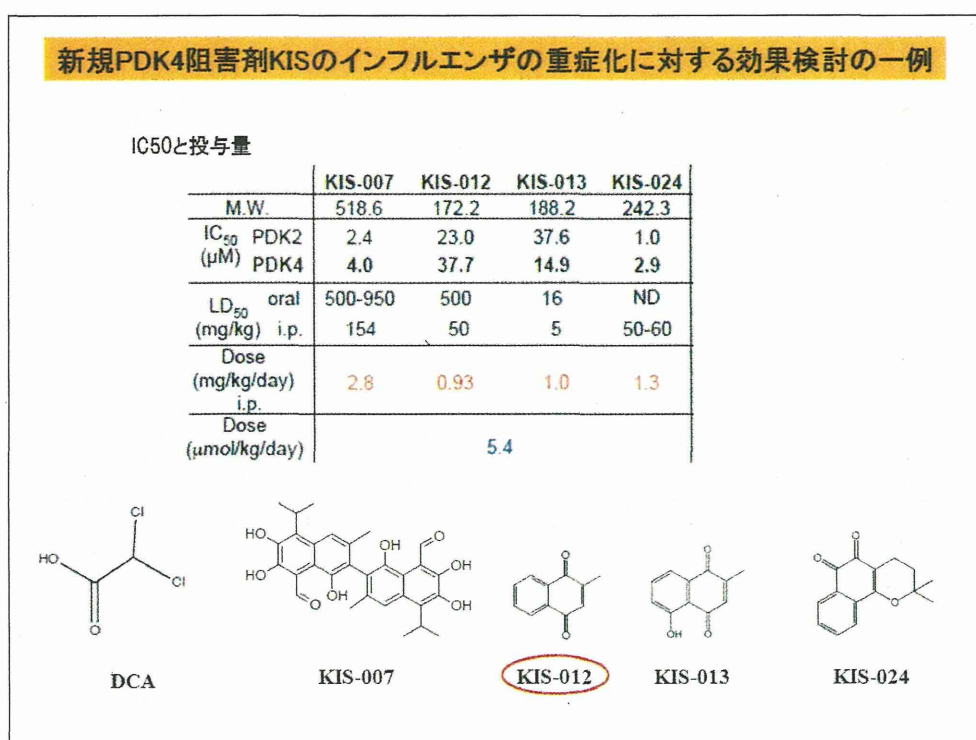


図 3. PDK4 の活性中心立体構造に結合可能な新規 PDK4 阻害剤開発のためのリード化合物

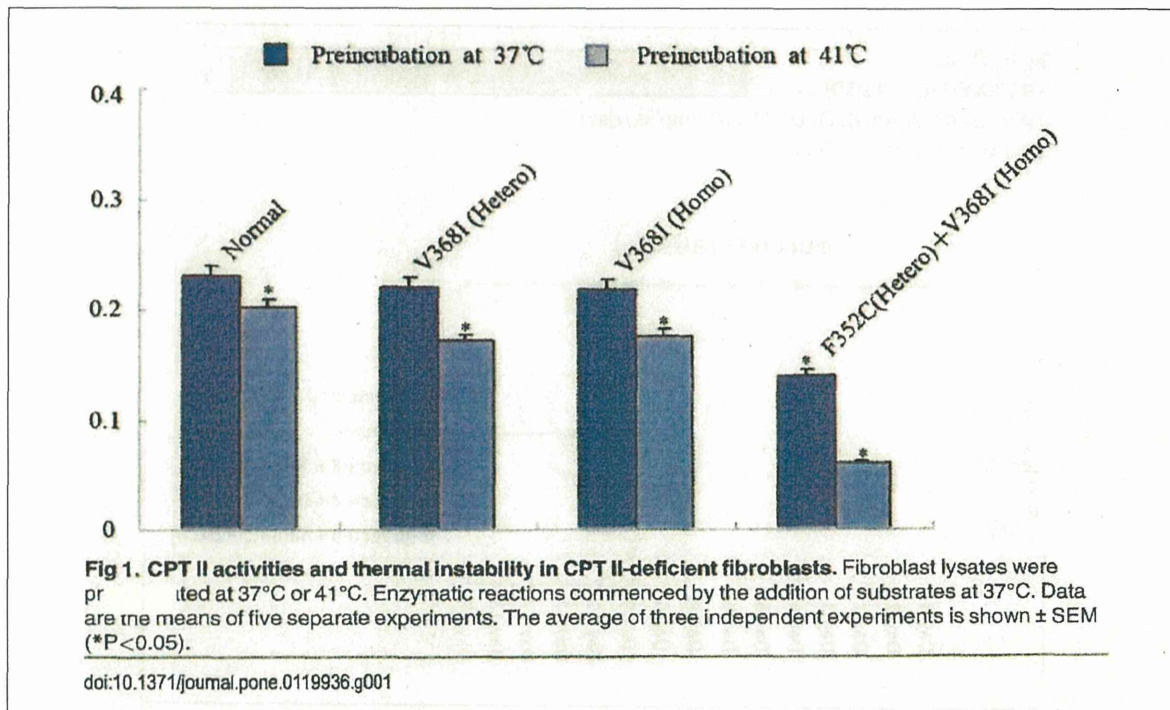


図 4. 中国のインフルエンザ脳症患者に検出された熱不安定性 CPT II SNP とその熱不安定性

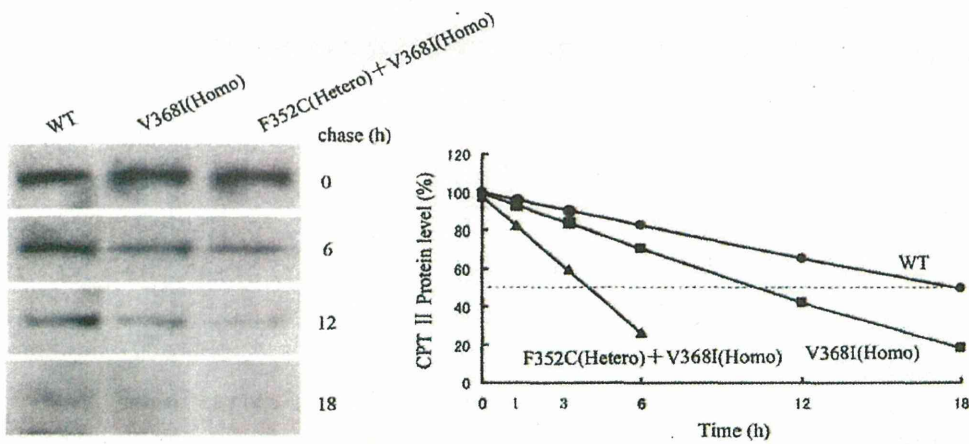


図 5. WT、中国脳症患者ファイibroblastにおける熱不安定性 CPT II SNP の Half-life

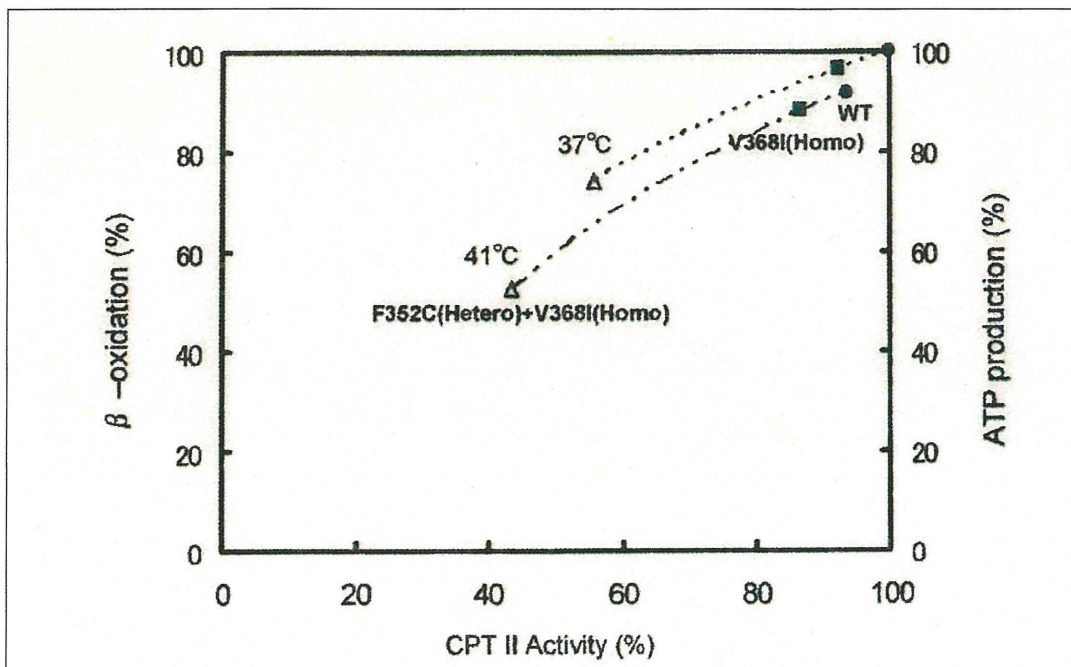


図6. WT、中国脳症患者ファイibroblastにおける熱不安定性CPT II SNPとミトコンドリア内のβ-酸化とATP産生量

CPT2 F352C変異検出用プライマーセット

- 2波長(FAM/ROX)測定できるPCR machineを用い、1tube内でWT/Mutを判別
- 血液検体からも60分以内に判定可能

血液検体 (50mM-NaOHを2倍量加え、95°Cで5分加熱)

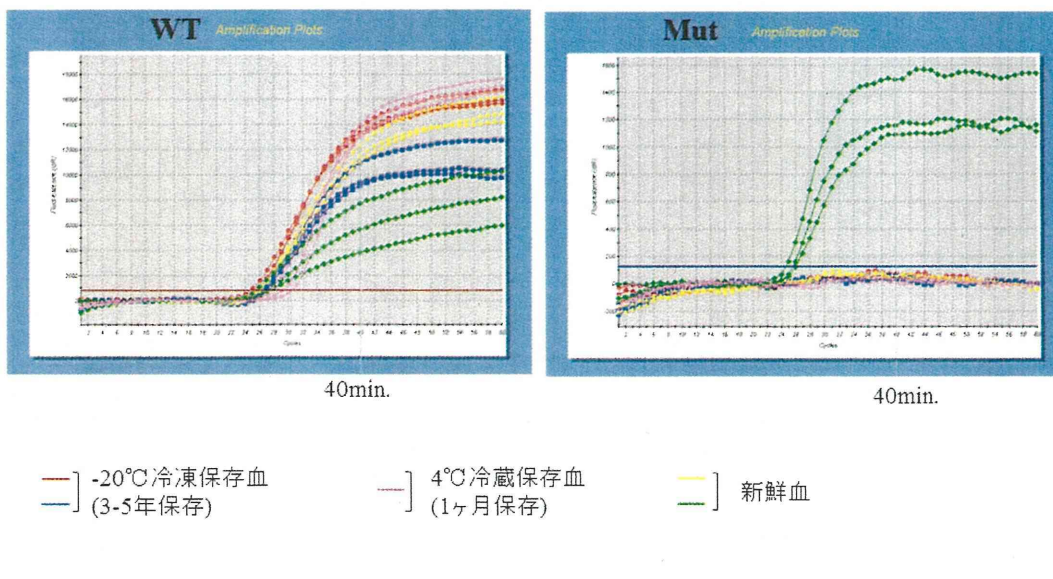


図7. SMART AMPを用いた熱不安定性CPT II SNPの迅速診断システム

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
(H26 年度)

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

A 型インフルエンザウイルス (IAV) 感染の成立、重症化の機序には、ウイルス側、宿主側双方の因子が複雑に関与し、多様性が示されている。宿主側の因子のひとつとしてトリプシン様タンパク質分解酵素が IAV 感染の成立、重症化に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。我々は消化酵素として十二指腸上皮で発現しトリプシノーゲンを活性化するエンテロキナーゼ (EK) が、一般のいろいろな培養細胞でも発現しており、トリプシノーゲンを切断、活性化することで、IAV-HA (ヘマグルチニン) のプロセッシングを促進するという、IAV 感染の新たな経路の存在を明らかにした。特に、EK の新しいアイソフォームとして発見した EK-v2 の IAV 感染における役割を明らかにし、その機構を標的とした抗ウイルス薬の開発につながる可能性が示唆された。

A. 研究目的

我々は消化酵素として十二指腸上皮で発現しトリプシノーゲンを活性化するエンテロキナーゼ (EK) が、一般のいろいろな培養細胞でも発現していることを明らかにした。この EK がトリプシノーゲンを切断、活性化することで、IAV-HA (ヘマグルチニン) のプロセッシングを促進するという、IAV 感染の新たな経路が存在する可能性を示してきた。その際、従来から報告のある EK (ここでは簡便性のため EK-v1 と呼ぶことにする) に加え、その酵素活性を有する細胞膜外ドメインに 30 アミノ酸の挿入がある新規アイソフォーム (EK-v2 と呼ぶことにする) をクローニングした。IAV 感染における EK-v1、EK-v2 の役割を明らかにし、その機構を標的とした抗ウイルス薬の開発につながることを本研究の目的である。

B. 研究方法

- 1) ヒトの培養細胞から mRNA を調整、cDNA に変換し、I~IV 型トリプシノーゲン (PRSS1, PRSS2, PRSS3-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 を切断、活性化することが知られている HAT、TMPRSS2、及び TMPRSS4 の役割を調べるため、それらの cDNAs をクローニングした。
- 2) ヒトのいろいろな培養細胞における I~IV 型トリプシノーゲン (PRSS1, PRSS2, PRSS3-v2, PRSS3-v1)、エンテロキナーゼ (EK-v1, v2)、及び細胞膜貫通型セリンプロテアーゼ (HAT、TMPRSS2、TMPRSS4) の発現量を Real-time PCR、及びウェスタンブロットで、調べた。
- 3) 293T 細胞に、EK-v1、EK-v2、hPRSS3-

v2 を強制発現させた、安定細胞株 (293T-EK-v1、293T-EK-v2、293T-PRSS3) を作成し、IAV を感染させ、一定時間後に細胞内、及び培養上清に放出された IAV の量を IAV に対する特異的抗体を用いて測定した。

4) *in vitro* において EK-v1、EK-v2 が PRSS3-v2 を切断し、そのトリプシン活性を上げるか、293T-EK-v1、293T-EK-v2、293T-PRSS3 細胞株のライセートを使い、GPR-pNA を基質としてトリプシン活性を測定した。

5) *in vitro* において EK-v1、EK-v2 により切断、活性化された PRSS3 が、TPCK 処理トリプシンで放出された IAV の量を IAV-HA に対するトリプシンと同様の IAV-HA のプロセッシングを行うか、IAV を感染、増殖させた U937 細胞ライセートと 293T-EK-v1、293T-EK-v2、293T-PRSS3 細胞株のライセートを使って調べた。コントロールとして TPCK 処理トリプシン (TPCKT)、あるいは N 末端-アセチル化トリプシン (NAT) で処理した後、IAV-HA に対する特異的抗体を使ったウェスタンで調べた。

(倫理面への配慮)

本研究は、長崎大学組み換え DNA 実験安全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) ヒト培養細胞から、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) の cDNAs をクローニングした (図 1)。

2) 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、Real-time PCR 法で調べたほとんどの培養細胞で EK mRNA 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 2)。また、PRSS1 及び PRSS3 も多くの細胞に発現がみられた (図 3)。

3) EK-v1、EK-v2、PRSS3-v2 を強制発現させた 293T 安定細胞株 (図 4) に、IAV を感染させ、80 時間後に培養上清に放出された IAV の量を IAV-HA に対する特異的抗体を用いて測定したところ、他の細胞に比べ、293T-EK-v2 細胞内、及び上清に放出されたウイルスを調べたところ、IAV の顕著な増殖と IAV-HA プロセッシングの更新がみられた (図 5)。

4) 293T-EK-v1、293T-EK-v2、293T-PRSS3 細胞株、及び TMPRSS2、TMPRSS4、HAT を一過性に強制発現させた 293T 細胞のライセートを使い、GPK-pNA を基質としてトリプシン活性を測定した。この *in vitro* の系で EK-v1、EK-v2 は PRSS3-v2 トリプシノーゼンを活性化したが、TMPRSS2、TMPRSS4、HAT は PRSS3 を活性化できなかった (図 6、7)。

5) *in vitro* で U937 細胞に由来する IAV ライセートを TPCK 処理トリプシン (TPCKT)、あるいは N 末端-アセチル化トリプシン (NAT) で室温 30 分処理すると、65-kDa の IAV-HA₀ が消失し、代わりに 25-kDa の IAV-HA₂ が出現し、IAV-HA のプロセッシングが確認された (図 8)。PRSS3-v2、EK-v1、EK-v2 のみでは IAV-HA のプロセッシングがみられなかったが、PRSS3-v2 により EK-v1 あるいは EK-v2 を活性化させると、トリプシン処理した場合同様に 65-kDa の IAV-HA₀ が消失し、代わりに 25-kDa の IAV-HA₂ が出現し、IAV-HA のプロセッシングが確認された。これらのことから、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、PRSS (トリプシノーゼン

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9)。

D. 考察

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9)。in vitro においては EK-v1, EK-v2 とも PRSS を活性化する酵素活性、および IAV のプロセッシング能は同程度有していたが、in vivo では EK-v2 が顕著な IAV 感染促進作用を示した(図5)ことから、新たに発見した EK-v2 が、IAV 感染の成立、重症化に強く関わっている可能性がある。EK-v2 と EK-v1 の違いは30アミノ酸の挿入の有無だけで、その部位は細胞の外からアクセスできるため、今後、この30アミノ酸部位を中心に EK 分子をターゲットとして、IAV 感染の抑制ができるかどうか検討したい。

E. 結論

新たな EK-v2→PRSS→HA プロセッシングの経路が、IAV 感染の成立、重症化に関わる可能性が高いことが示唆された。この経路をターゲットとした新たな IAV 感染治療薬の開発につながることを期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表 (平成26年度)

(ア) 論文発表

1. Kakoki K, Kamiyama H, Izumida M, Yashima Y, Hayashi H, Yamamoto N, Matsuyama T, Igawa T, Sakai H, Kubo Y. Androgen-independent proliferation of LNCaP prostate cancer cells infected by xenotropic murine leukemia virus-related virus.

Biochem Biophys Res Commun. 447, 216-22 (2014).

2. 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*, 58, 103-111 (2014).
3. 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.* 48, 448-56 (2014).

(ア) 学会発表

1. インターフェロン γ によるレトロウイルス感染抑制に関与する新規細胞性因子の同定、久保嘉直、泉田真生、安井潔、林日出喜、松山俊文、第62回日本ウイルス学会学術総会、平成26年11月10~12日 (パシフィコ横浜)

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. EK (エンテロキナーゼ) 遺伝子の構造

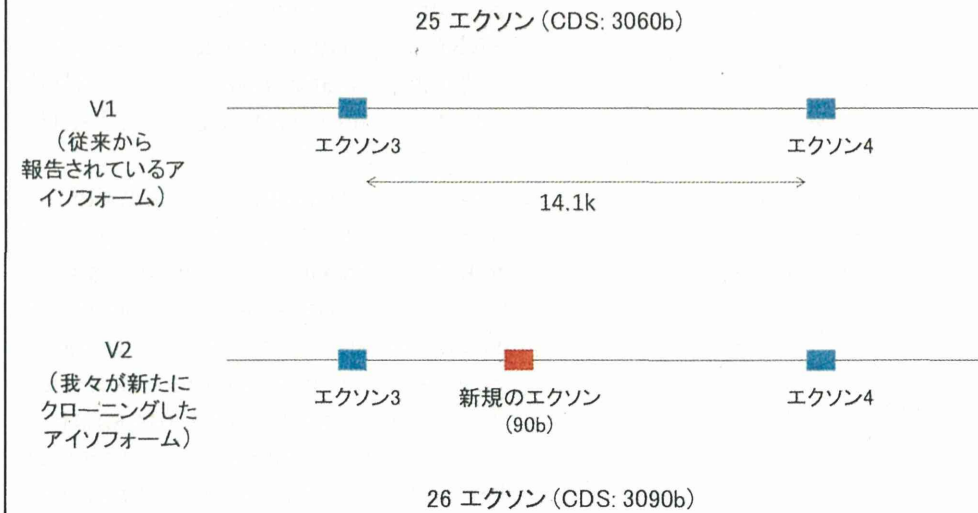


図2. 各種培養細胞における膜貫通型セリンプロテアーゼの発現
-mRNA (PCR)-

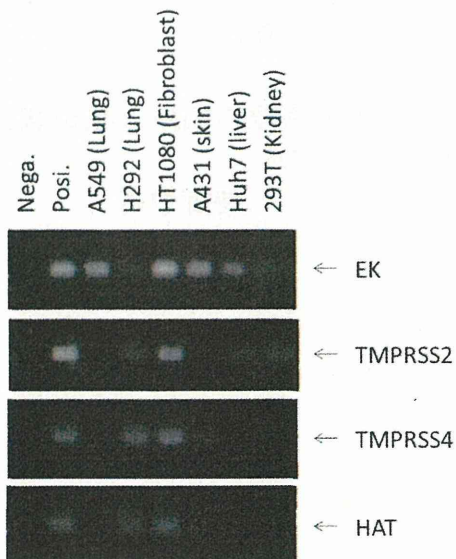


図3. 各種培養細胞におけるトリプシノーゲン遺伝子(PRSSs)の発現
-mRNA (PCR)-

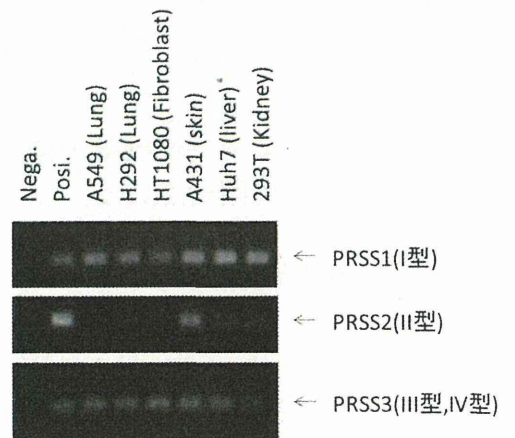


図4. EK-v1,v2を強制発現させた293T細胞

抗EK抗体



図5. EK-v1、EK-v2及びPRSS3を強制発現させた293T細胞におけるIAV-HAのプロセッシング

抗IAV-HA抗体



図6. EK-v1、TMPRSS2、TMPRSS4によるトリプシノーゲン (PRSS3) の活性化

GPR-pNAを基質としたトリプシン活性

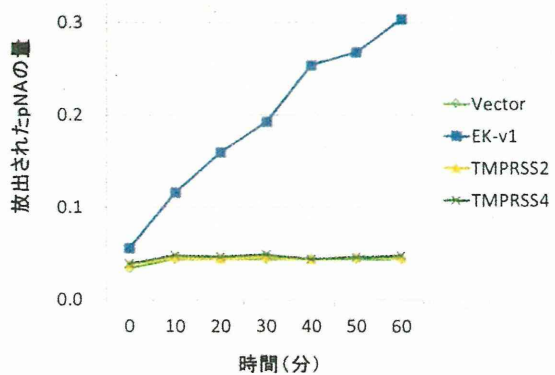


図7. EK-v1、EK-v2によるトリプシノーゲン (PRSS3) の活性化

GPR-pNAを基質としたトリプシン活性

