

## 分担研究報告書

平成 26 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

脳症発症と  $\beta$  酸化障害の関連性に関する研究

研究分担者 山口清次 (島根大学医学部小児科学 教授)  
研究協力者 長谷川有紀 (島根大学医学部小児科学 助教)  
小林弘典 (島根大学医学部小児科学 助教)  
山田健治 (島根大学医学部小児科 医科医員)  
高橋知男 (島根大学医学部小児科学 大学院生)  
坊 亮輔 (島根大学医学部小児科 医科医員)

### 研究要旨

インフルエンザの重症化(または急性脳症)に、後天的因子による  $\beta$  酸化障害が関与するという仮説のもとに、培養細胞とタンデムマスを用いて  $\beta$  酸化能を評価する in vitro probe (IVP) assay で種々の要因を検討した。その結果、以下の成果が得られた。

①環境温度は  $\beta$  酸化に影響を与える、すなわち高温下では長鎖脂肪酸の  $\beta$  酸化障害が増強し、低温下では  $\beta$  酸化障害を緩和する可能性がある。②解熱剤の一部(本研究ではサリチル酸とジクロフェナク)は  $\beta$  酸化を抑制して急性脳症への発展のリスクを高める。一方アセトアミノフェンは  $\beta$  酸化に影響を与えない。これまで知られてきた臨床疫学的な現象を裏付ける。③食中毒を引き起こすセレウス菌の毒素セレウリドは  $\beta$  酸化を抑制し、 $\beta$  酸化異常症のような発症形態をとる可能性が示唆された。これらを踏まえて急性脳症発症の予防、或いは軽減のための戦略を考える必要がある。

### A. 研究目的

小児期にはインフルエンザ脳症や急性脳症のように発熱を契機に急速に重篤化する疾患がある。このような病態に陥ると死亡したり、後遺症を残すことが少なくない。一方、先天性脂肪酸  $\beta$  酸化異常症 ( $\beta$  酸化異常症) も、正常と変わらぬ生活をしてきた小児が、感染などを契機に急激に悪化して急性脳症、乳幼児突然死様の経過をとることがよく知られている。インフルエンザ脳症等と発症形

態において類似点がある。そこで、ヒト培養細胞を用いて  $\beta$  酸化能を評価する in vitro probe (IVP) assay を用いて、培養細胞の温度条件、解熱剤の種類、および食中毒毒素と  $\beta$  酸化能の関連性について検討した。

### B. 方法

1) in vitro probe (IVP) assay による  $\beta$  酸化能評価

培養細胞の  $\beta$  酸化能を評価するために in

in vitro probe (IVP) assay を用いた。IVP assay では、培養皮膚線維芽細胞を特殊なメEDIUM (ブドウ糖、遊離脂肪酸欠乏かつカルニチン過剰) で培養し、 $\beta$ 酸化を亢進させた状態で、パルミチン酸などの脂肪酸を添加してメ

ディウム中に分泌されるアシルカルニチンをタンデムマスで測定した。これにより培養細胞の $\beta$ 酸化能、および障害部位を評価した。アシルカルニチンはタンデムマスによって測定した。その原理を図1に示す。

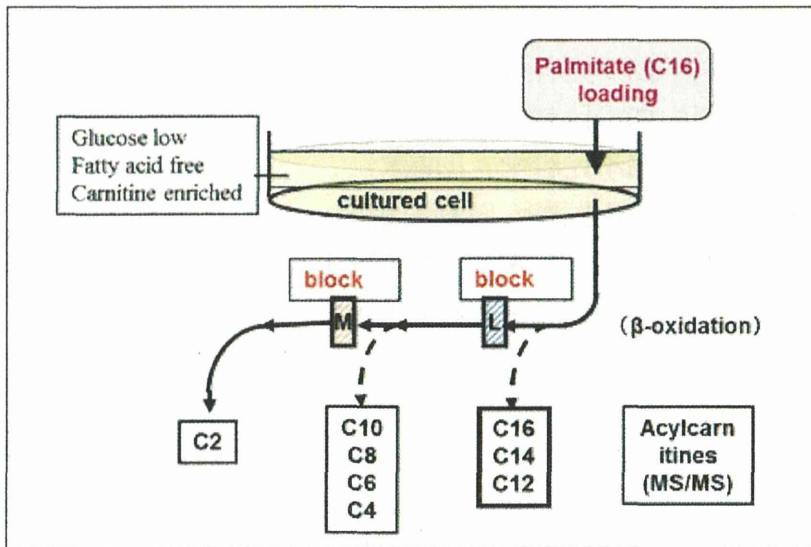


図1. In vitro probe assay の原理

M、L=それぞれ中鎖と長鎖脂肪酸をさす。中鎖 $\beta$ 酸化 (M) が障害されると、中鎖アシルカルニチン (C4, C6, C8, C10) が増加する。長鎖脂肪酸 $\beta$ 酸化 (L) が障害されると長鎖アシルカルニチン (C12, C14, C16) が増加する。アシルカルニチンはタンデムマス (MS/MS) によって測定する。

## 2) 環境温度の影響

培養環境を、高温下 (41°C) と低温下 (33°C)、および37°C環境下で培養して IVP assay を行った。正常および $\beta$ 酸化異常症の細胞における $\beta$ 酸化能の変化を検討した。

## 3) 解熱剤による $\beta$ 酸化への影響

小児の感染症ではライ症候群等の危険性のために使用されなくなっている解熱剤がある。解熱剤の $\beta$ 酸化系に対する影響を調べるために、正常細胞を用いてサリチル酸 (アスピリン代謝産物) 5 mM、ジクロフェナク 0.3 mM、およびアセトアミノフェン 7.5 mM の存在下で IVP assay を行った。

## 4) 食中毒セレウス菌のセレウリド毒素による $\beta$ 酸化への影響

症例：前日作り保存していたチャーハンを温めなおして食べた30分後から、食べた家族が激しい嘔吐が始まった。この家族の臨床経過を表1に示している (Shiota S, et al: Pediatrics, 2010;25:e951-e955)。

症例1：弟 (1才) は、激しい嘔吐が始まり、ぐったりして、けいれん意識障害に陥り、高カリウム血症、低血糖、肝機能障害をきたして6時間後に死亡した (突然死)。

症例2：姉 (2才) は、発熱、おう吐、意識障害に陥ったが、血漿交換によって救命し

て、1週間後に退院した。急性期の検査所見は、低血糖と高アンモニア血症がみられた。

症例3:母親(26才)は激しい嘔吐が始ま

ったが、輸液のみで翌日には回復して退院した。

表1. セレウス菌食中毒のを起こした一家族のプロフィール

症例	家族	症状	検査所見	転帰
1	弟 (1才)	嘔吐 ぐったり 急性脳症	高カリウム血症 低血糖 肝機能障害	6時間後 死亡
2	姉 (2才)	発熱 嘔吐 意識障害	低血糖 高アンモニア	輸液 血漿交換 1週間後退院
3	母親 (26才)	激しい嘔吐		翌朝回復

Shiota S, et al: Pediatrics, 2010;25:e951-e955

## C. 結果

### 1) IVP assay による $\beta$ 酸化能評価の有効性の確認

IVP assay によって正常コントロールと種々の $\beta$ 酸化異常症の細胞をテストした。結果を図2に示す。正常コントロール(図2A)ではC2(アセチルカルニチン)のみが有意なピークとして観察された。MCAD欠損症(図

2B)では、C4、C6、C8、およびC10(短鎖・中鎖のアシルカルニチン)の増加がみられた。VLCAD欠損症(図2C)では、C12、C14、およびC16(長鎖アシルカルニチン)の増加がみられた。CPT2欠損症(図2D)では、長鎖アシルカルニチン(C16)のみが増加していた。以上のように、IVP assay によって $\beta$ 酸化の障害の有無、障害部位が評価できることを確認した。

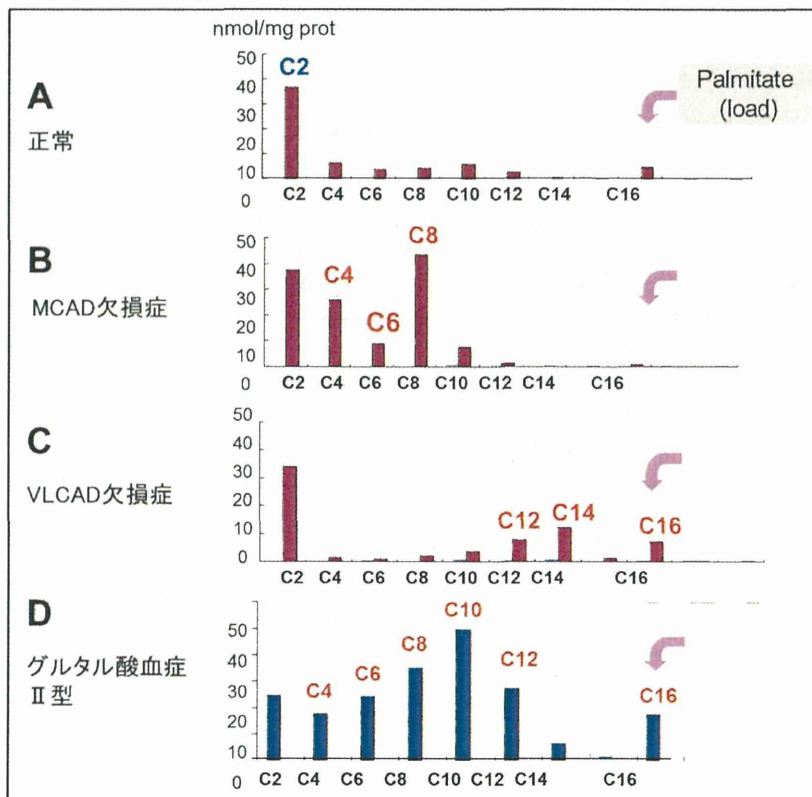


図 2. IVP assay による  $\beta$  酸化能評価の有効性の確認

縦軸はアシルカルニチン (nmol/mL)、横軸はアシルカルニチンの炭素鎖長を示す。

略字: MCAD=中鎖アシル-CoA 脱水素酵素; VLCAD=極長鎖アシル-CoA 脱水素酵素;

CPT2=カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ-II; GA2=グルタル酸血症 II型。

## 2) 培養環境の温度による $\beta$ 酸化能の変化

33°C(低温下)、37°C、および 41°C(高温下)の環境下で細胞を培養して IVP assay を行った。その結果、図 3 に示すように、VLCAD 欠損症では、41°C(高温下)で、C12、C14、C16 のアシルカルニチンが増加した。一方 33°C では、C14、C16 は低下した。

広範囲の  $\beta$  酸化障害の起こる GA2 では、高温下では C12~C16 アシルカルニチンは増加し、C4~C10 の中鎖アシルカルニチンは低下した。一方、低温下(33°C)では、長鎖を含む

すべての炭素鎖長のアシルカルニチンが低下した。

高温環境と低温環境で対照的な結果を示した。すなわち、VLCAD 欠損症も GA2 も長鎖脂肪酸の  $\beta$  酸化は高温下ではむしろ悪化した。GA21 においては中鎖短鎖の  $\beta$  酸化は改善しているかのような所見を示した。すなわち高温環境では長鎖脂肪酸の  $\beta$  酸化障害は悪化し、低温下ではすべての鎖長の  $\beta$  酸化障害が緩和すると推測された。

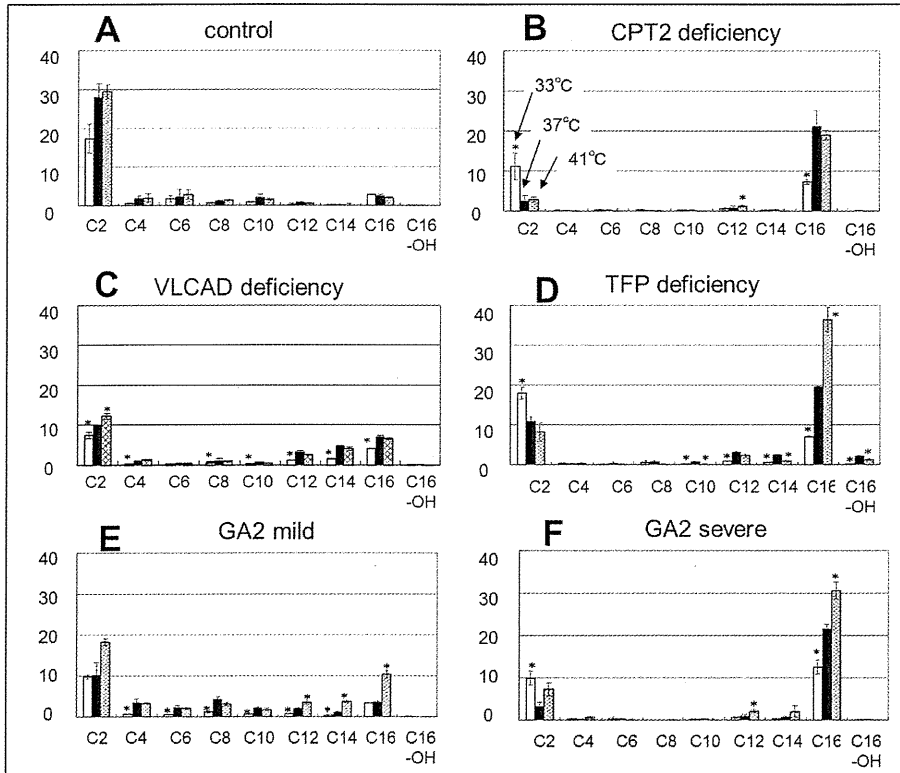


図3. 温度環境による $\beta$ 酸化能の変化 (IVP assay)

33°C、37°C、および41°Cで培養した。略字は図2と同じ。TFP=ミトコンドリア三頭酵素。

### 3) 解熱剤の $\beta$ 酸化能への影響

IVP assayの実験系では図4に示すように、サリチル酸とジクロフェナクを添加した時、中鎖～長鎖のアシルカルニチン (C6～C12) の増加が認められた。この結果は、サリチル

酸とジクロフェナクは $\beta$ 酸化を障害する可能性があることを示した。一方、安全とされているアセトアミノフェンでは $\beta$ 酸化への影響はなく、経験的な情報を裏付ける結果を示した。

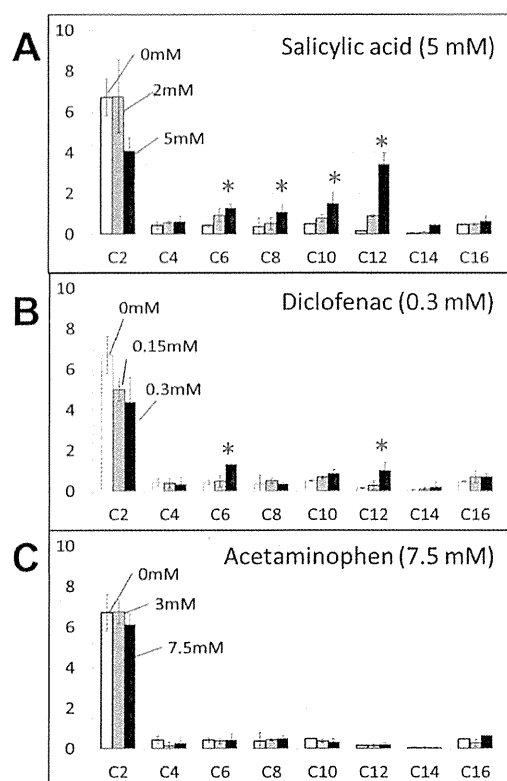


図4. 解熱剤の $\beta$ 酸化能への影響

A=サリチル酸；B=ジクロフェナク；C=アセトアミノフェン。\*印のアシルカルニチンは有意に増加したことを示す。

#### 4) セレウリド存在下における $\beta$ 酸化能の変化

正常細胞を用いて、セレウリドを添加(100 ng/mLと50 ng/mL)してIVP assayを

行った。図5に示すように、セレウリド存在下では、C2が減少し、C16の増加が顕著であった。このことはセレウリドが長鎖脂肪酸の $\beta$ 酸化を抑制することを示唆した。

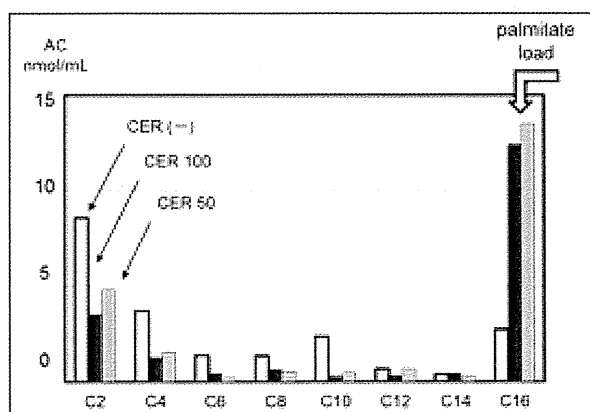


図5. セレウリドの $\beta$ 酸化能への影響

セレウリドの濃度50ng/mLと100ng/mLでテストした。

## D. 考察

それまで正常と変わらぬ生活をしていた小児が発熱を契機に電撃的に発症し、急性経過をとる点でインフルエンザ脳症と先天性 $\beta$ 酸化異常症の発症形態に類似点がある。前年度に引き続いて、培養細胞を用いる IVP assay の手法によって、培養環境の $\beta$ 酸化への影響を調べた。

環境温度は $\beta$ 酸化に影響を与えることが分かった。すなわち①高温下では長鎖脂肪酸の $\beta$ 酸化障害が増強する；②高温下では全体として $\beta$ 酸化そのものは促進される；③低温下では長鎖 $\beta$ 酸化障害は緩和される；④低温下では一部はアセチル-CoA 産生が改善するが、他方では長鎖も短鎖も $\beta$ 酸化自体が抑制されることもある

解熱剤の一部が小児でライ症候群のリスクがあることは知られていた。本研究によって、アスピリン（代謝産物のサリチル酸）とジクロフェナクは $\beta$ 酸化を抑制する傾向があり、アセトアミノフェンは $\beta$ 酸化に影響を与えないことが観察された。これは疫学的情報と一致する。

セレウス菌による急性食中毒で突然死した小児例の報告があるが、セレウス菌の毒素セレウリドは $\beta$ 酸化障害を引き起こし、急性脳症の原因になることが推定された。そのパターンは、CPT2 欠損症またはグルタル酸血症 II 型のパターンに類似していた。すなわち細菌毒素が $\beta$ 酸化に影響を及ぼす危険性を示す。

本年度の研究成果によって、小児の後天的要因に基づくインフルエンザ脳症などの急性脳症が、発熱ストレスや解熱剤、或いは細菌毒素による $\beta$ 酸化障害を介して発症する可能性を示した。これらの事実をふまえた対策によって急性脳症の予防、重篤化予防に役

立つ可能性がある。

## E. 結論

インフルエンザ脳症など小児の急性脳症発症に、後天的要因による $\beta$ 酸化障害が関与をしている可能性があることが明らかになった。一方低温下では $\beta$ 酸化障害が緩和される可能性がある。また一部の解熱剤は小児に対して急性脳症（またはライ症候群）を引き起こす可能性のあることが示された。

## F. 研究発表

### 1. 発表論文

- 1) Naiki M, Ochi N, Kato YS, Purevsuren J, Yamada K, Kimura R, Fukushi D, Hara S, Yamada Y, Kumagai T, Yamaguchi S, Wakamatsu N: Mutations in HADHB, which encodes the  $\beta$ -subunit of mitochondrial trifunctional protein, cause infantile onset hypoparathyroidism and peripheral polyneuropathy. *American Journal of Medical Genetics A* 164(5): 1180-1187, 2014 (May)
- 2) Yasuno T, Osafune K, Sakurai H, Asaka I, Tanaka A, Yamaguchi S, Yamada K, Hitomi H, Arai S, Kurose Y, Higaki Y, Sudo M, Ando S, Nakashima H, Saito T, Kaneoka H: Functional analysis of iPSC-derived myocytes from a patient with carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 448(2): 175-181, 2014 (May)
- 3) Shioya A, Takuma H, Yamaguchi S, Ishii A, Hiroki M, Fukuda T, Sugiee H, Shigematsu Y, Tamaoka A: Amelioration of

- acylcarnitine profile using bezafibrate and riboflavin in a case of adult-onset glutaric acidemia type 2 with novel mutations of the electron transfer flavoprotein dehydrogenase (ETFHDH) gene. *Journal of The Neurological Sciences* 346(1-2): 350-352, 2014 (November)
- 4) Vatanavicharn N, Yamada K, Aoyama Y, Fukao T, Densupsoontorn N, Jirapinyoe P, Sathienkijkanchai A, Yamaguchi S, Wasant P: Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency: two neonatal cases with common splicing mutation and in vitro bezafibrate response. *Brain and Development*, inpress
  - 5) Sakai C, Yamaguchi S, Sasaki M, Miyamoto Y, Matsushima Y, Goto YI: ECHS1 mutations cause combined respiratory chain deficiency resulting in Leigh syndrome. *Human Mutation*, inpress
  - 6) Kobayashi T, Minami S, Mitani A, Tanizaki Y, Booka M, Okutani T, Yamaguchi S, Ino K: Acute fatty liver of pregnancy associated with fetal mitochondrial trifunctional protein deficiency. *J Obstet Gynaecol Res*, inpress (November)
  - 7) 山口清次, 長谷川有紀: 小児栄養性ビタミン欠乏症の有機酸分析による診断- ビタミンB1欠乏症、ビタミンB12欠乏症、ビオチン欠乏症. *小児科臨床* 67(5): 787-794, 2014 (5月)
  - 8) 山口清次: タンデムマスを導入した新生児マススク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)
  - 9) 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)
  - 10) 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)
  - 11) 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)
- ## 2. 学会発表
- 1) Yamaguchi S: Organic Acidaemias and emergency treatments. 1st Asia Pacific Inborn Errors of Metabolism Course 講演. Tokyo, January 2014
  - 2) 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
  - 3) 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
  - 4) 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

- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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  $\beta$  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

- 10) 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

## G. 知的財産権の出願・登録状況

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

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版
Min Yao, Min Cai, Dengfu Yao, Xi Xu, Rongrong Yang, Yuting Li, Yuanyuan Zhang, <u>Hiroshi Kido</u> , Dengbing Yao.	Abbreviated half-lives and impaired fuel utilization in carnitine palmitoyltransferase II variant fibroblasts.	PLoS ONE	10(3)	e0119936	2015
Toshihiro Maekawa, Takashi Kimoto, Dai Mizuno, Yuichi Furukawa, Masayuki Ida, Etsuhisa Takahashi, Takayuki Izumo, Yoshiko Ono, Hiroshi Shibata, <u>Hiroshi Kido</u> .	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	2(1)	5	2015
Mineyoshi Hiyoshi, Irene L. Indalao, Mihiro Yana, Kazuhiko Yamane, Etsuhisa Takahashi, <u>Hiroshi Kido</u> .	Influenza A virus infection of vascular endothelial cells induces GSK-3 $\beta$ -mediated $\beta$ -catenin degradation in adherens junctions, with a resultant increase in membrane permeability.	Arch Virol	160	225-234	2015
Hai-Yan Pan, Hua-Mei Sun, Lu-Jing Xue, Min Pan, Yi-Ping Wang, <u>Hiroshi Kido</u> , Jian-Hua Zhu.	Ectopic trypsin in the myocardium promotes dilated cardiomyopathy after influenza A virus infection.	Am J Physiol Circ Physiol	307	H922-H932	2014

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	9(5)	e98032	2014
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	16(2)	5-6	2014
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	61(634)	13-16	2014
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	30(11)	1540-1544	2014
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	143	41-46	2014
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	216-222	2014
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
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	448-456	2014

Shiihara T, Miyake T, Izumi S, Sugihara S, Watanabe M, Takanashi J, <u>Kubota M</u> , Kato M.	Serum and CSF biomarkers in acute pediatric neurological disorders.	Brain Dev	36	489-495	2014
Nakashima M, Kashii H, Murakami Y, Kato M, Tsurusaki Y, Miyake N, <u>Kubota M</u> , Kinoshita T, Saito H, Matsumoto M.	Novel compound heterozygous PIGT mutations caused multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome 3.	Neurogenetics		DOI 10.1007/s10048-014-0408-y	2014
Shimada S, Shimajima K, Okamoto N, Sangu N, Hirasawa K, Matsuo M, Ikeuchi M, Shimakawa S, Shimizu K, Mizuno S, <u>Kubota M</u> et al.	Microarray analysis of 50 patients reveals the critical chromosomal regions responsible for 1p36 deletion syndrome-related complications.	Brain Dev		In press	2014
Saitoh M, Shinohara M, Ishii A, Ihara Y, Hirose S, Shiomi M, Kawaguchi H, <u>Kubota M</u> et al.	Clinical and genetic features of acute encephalopathy in children taking theophylline.	Brain Dev		In press	2014
Tanuma N, Miyata R, Nakajima K, Okumura A, <u>Kubota M</u> , Hamano S, Hayashi M.	Changes in Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Human Herpesvirus-6-Associated Acute Encephalopathy/Febrile Seizures.	Mediators of Inflammation	Volume 2014	Article ID 564091, <a href="http://dx.doi.org/10.1155/2014/564091">http://dx.doi.org/10.1155/2014/564091</a>	2014
Hoshino H, <u>Kubota M</u> .	Canavan disease: Clinical features and recent advances in research.	Pediatrics International	56	477-483	2014

Haga N, Kubota M, Miwa Z.	Hereditary sensory and autonomic neuropathy types IV and V in Japan.	Pediatrics International.		in press	2014
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		in press	2015
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, びまん性肺胞出血との鑑別を要した気管気管支骨軟骨形成症の1例.	気管支学	36	73-77	2014
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	17	25-31	2014
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	2015
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.	57	doi: 10.1111/ped. 12513	2014
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	202	16-23	2014

E Hatagishi, Okamoto, Ohmiya, H Yano, T Hori, W Saito, H Miki, Y Suzuki, R Saito, T Yamamoto, M Shoji, Y Morisaki, S Sakata, <u>H Nishimura</u> .	Establishment and Clinical Applications of a Portable System for Capturing Influenza Viruses Released through Coughing.	PLOS ONE	9(8)	e103560	2014
Yamaya M, <u>Nishimura H</u> , Nadine LK, Ota C, Kubo H, Nagatomi R.	Ambroxol inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial cells.	Arch Pharm Res.	37	520-529	2014
Yamaya M, <u>Nishimura H</u> , 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.	52	251-260	2014
M Yamaya, L Nadine, H Kubo, K Saito, R Saito, <u>H Nishimura</u>	Effects of neuraminidase inhibitors on the release of oseltamivir-sensitive and oseltamivir-resistant influenza viruses from human	J Med Virol		DOI: 10.1002/jmv.23974.	2014
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、 <u>西村秀一</u> 。	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		In press	2015
大宮卓、佐々木純一、 <u>西村秀一</u> 。	免疫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		In press	2015
菊地祐樹、鈴木優子、伊藤洋子、 <u>西村秀二</u> 。	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	4	39-41	2014

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	39	379-383	2014
Naiki M, Ochi N, Kato YS, Purevsuren J, Yamada K, Kimura R, Fukushi D, Hara S, Yamada Y, Kumagai T, Yamaguchi S, Wakamatsu N	Mutations in HADHB, which encodes the $\beta$ -subunit of mitochondrial trifunctional protein, cause infantile onset hypoparathyroidism and peripheral polyneuropathy.	American Journal of Medical Genetics A	164(5)	1180-1187	2014
Yasuno T, Osa fune K, Sakurai H, Asaka I, Tanaka A, Yamaguchi S, Yamada K, Hitomi H, Arai S, Kurose Y, Higaki Y, Sudo M, Ando S, Nakashima H, Saito T, Kaneoka H	Functional analysis of iPSC-derived myocytes from a patient with carnitine palmitoyltransferase II deficiency.	Biochem Biophys Res Commun.	448(2)	175-181	2014
Shioya A, Takuma H, Yamaguchi S, Ishii A, Hiroki M, Fukuda T, Sugiee H, Shigematsu Y, Tamaoka A	Amelioration of acylcarnitine profile using bezafibrate and riboflavin in a case of adult-onset glutaric acidemia type 2 with novel mutations of the electron transfer flavoprotein dehydrogenase (ETFDH) gene.	J Neurol Sci	346(1-2)	350-352	2014
Vatanavicharn N, Yamada K, Aoyama Y, Fukao T, Densupsoontorn N, Jirapinyoe P, Sathienkijkanchai A, Yamaguchi S, Wasant P	Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency: two neonatal cases with common splicing mutation and in vitro bezafibrate response.	Brain Dev		In press	2015



Sakai C, Yamaguchi S, Sasaki M, Miyamoto Y, Matsushima Y, Goto YI	ECHS1 mutations cause combined respiratory chain deficiency resulting in Leigh syndrome.	Human Mutation,		In press	2015
Kobayashi T, Minami S, Mitani A, Tanizaki Y, Booka M, Okutani T, Yamaguchi S, Ino K	Acute fatty liver of pregnancy associated with fetal mitochondrial trifunctional protein deficiency	J Obstet Gynaecol Res		In press	2015
山口清次, 長 谷川有紀	小児栄養性ビタミン欠乏症 の有機酸分析による診断-ビ タミンB1欠乏症、ビタミン B12欠乏症、ビオチン欠乏 症.	小児科臨床	67(5)	787-794	2014
山口清次	ミトコンドリア脂肪酸β酸 化異常症.	日本臨床	29	627-631	2014
山口清次	有機酸代謝異常	日本臨床	29	622-626	2014
山口清次	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	日本臨床	31	205-211	2014

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷（主なもの）



# Diisopropylamine Dichloroacetate, a Novel Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 Inhibitor, as a Potential Therapeutic Agent for Metabolic Disorders and Multiorgan Failure in Severe Influenza

Kazuhiko Yamane<sup>1</sup>, Irene L. Indalao<sup>1</sup>, Junji Chida<sup>1</sup>, Yoshikazu Yamamoto<sup>2</sup>, Masaaki Hanawa<sup>2</sup>, Hiroshi Kido<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Division of Enzyme Chemistry, Institute for Enzyme Research, The University of Tokushima, Tokushima, Japan, <sup>2</sup> R&D Department, Daiichi Sankyo Healthcare Co., Ltd., Tokyo, Japan

## Abstract

Severe influenza is characterized by cytokine storm and multiorgan failure with metabolic energy disorders and vascular hyperpermeability. In the regulation of energy homeostasis, the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex plays an important role by catalyzing oxidative decarboxylation of pyruvate, linking glycolysis to the tricarboxylic acid cycle and fatty acid synthesis, and thus its activity is linked to energy homeostasis. The present study tested the effects of diisopropylamine dichloroacetate (DADA), a new PDH kinase 4 (PDK4) inhibitor, in mice with severe influenza. Infection of mice with influenza A PR/8/34(H1N1) virus resulted in marked down-regulation of PDH activity and ATP level, with selective up-regulation of PDK4 in the skeletal muscles, heart, liver and lungs. Oral administration of DADA at 12-h intervals for 14 days starting immediately after infection significantly restored PDH activity and ATP level in various organs, and ameliorated disorders of glucose and lipid metabolism in the blood, together with marked improvement of survival and suppression of cytokine storm, trypsin up-regulation and viral replication. These results indicate that through PDK4 inhibition, DADA effectively suppresses the host metabolic disorder-cytokine cycle, which is closely linked to the influenza virus-cytokine-trypsin cycle, resulting in prevention of multiorgan failure in severe influenza.

**Citation:** Yamane K, Indalao IL, Chida J, Yamamoto Y, Hanawa M, et al. (2014) Diisopropylamine Dichloroacetate, a Novel Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 Inhibitor, as a Potential Therapeutic Agent for Metabolic Disorders and Multiorgan Failure in Severe Influenza. *PLoS ONE* 9(5): e98032. doi:10.1371/journal.pone.0098032

**Editor:** Amy Lynn Adamson, University of North Carolina at Greensboro, United States of America

**Received:** January 23, 2014; **Accepted:** April 28, 2014; **Published:** May 27, 2014

**Copyright:** © 2014 Yamane et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This research was funded in part by Grants-in-Aid (#24249059) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan; by Health and Labor Sciences Research Grants (Grant #12103307) from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan. The funding agencies have no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** YY and MH are employed by Daiichi Sankyo Healthcare Co., Ltd. Their jobs are product planners. In this study, they provided diisopropylamine dichloroacetate, together with chemical and medical information on the product. HK, KY, JC, YY and MH are inventors of an applied patent on diisopropylamine dichloroacetate (patent application #WO 2012/101846 A1), entitled "Therapeutic or prophylactic agent for influenza". The patent is co-owned by the University of Tokushima and Daiichi Sankyo Healthcare Co., Ltd. The publication of the data reported here is at the discretion of the University of Tokushima. The authors confirm that Daiichi Sankyo Healthcare Co., Ltd did not control the data presented in this manuscript or interpretation of the data within the paper. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials. The other authors declare no competing interests.

\* E-mail: kido@ier.tokushima-u.ac.jp

## Introduction

Influenza A virus (IAV) is the most common infectious pathogen in humans and causes significant morbidity and mortality, particularly in infants and elderly population [1,2]. Multiorgan failure (MOF) with severe edema is reported in the progressive stage of seasonal influenza virus pneumonia and influenza-associated encephalopathy, particularly in patients with underlying risk factors [3–5] and is common in the highly pathogenic avian IAV infection [6]. The antiviral neuraminidase inhibitors are used for treatment in the initial stage of IAV infection and a 5-day course of these compounds is recommended for individuals with flu symptoms of not more than 2 days. A proportion of individuals with progressive symptoms after the initial stage of infection develop MOF with metabolic disorders and vascular hyperperme-

ability. To date, the pathogenesis and treatment target molecules of MOF by IAV remain poorly understood.

We reported previously that the influenza virus-cytokine-trypsin cycle is one of the main underlying mechanisms of vascular hyperpermeability and MOF in severe influenza [7]. Severe influenza causes marked increases in the levels of proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-6, and IL-1 $\beta$ , coined the cytokine storm. These cytokines alter the cellular redox state through their receptors and reduce the expression of four complex I subunits, oxygen consumption [8,9] and ATP synthesis in mitochondria, as well as increase mitochondrial O<sub>2</sub>- production and intracellular calcium concentration [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> [10]. ATP depletion dissociates zonula occludens-1, intracellular tight junction component, from the actin cytoskeleton and increases junctional permeability [11]. These cytokines also upregulate trypsin, which mediates the post-translational proteo-

lytic cleavage of viral envelope hemagglutinin and is crucial for viral entry and replication cycle [12], in various organs and endothelial cells. Trypsin also increases  $[Ca^{2+}]_i$  and enhances loss of zonula occludens-1 in cells via the protease-activated receptor (PAR)-2 [7,13,14]. In addition, we reported recently that metabolic disorders and energy crisis in brain endothelial cells by IAV infection are the main mechanisms of influenza-associated encephalopathy, which is characterized in infancy and early childhood in East Asian countries by persistently high fever and severe brain edema [5,15,16]. Patients with influenza-associated encephalopathy exhibit thermal instability of compound variants for [1055T>G/F352C] and [1102G>A/V368I] of carnitine palmitoyltransferase II (CPT II), resulting in secondary CPT II deficiency and mitochondrial energy crisis through disorders of long-chain fatty acid metabolism during hyperpyrexia. These findings indicate that MOF is the final outcome of metabolic and mitochondrial fuel disorders in severe influenza, although the precise signaling pathways involved in these disorders are still unknown.

The mitochondrial pyruvate dehydrogenase (PDH) complex (PDC) catalyzes the oxidative decarboxylation of pyruvate, linking glycolysis to the energetic and anabolic functions of the tricarboxylic acid cycle and fatty acid synthesis via acetyl-CoA. Therefore, PDC is a key enzyme for regulation of whole body glucose, lipid, lactate and ATP homeostasis. PDC is a structurally complex enzyme of three components [PDH (E1), dihydrolipoamide acetyltransferase (E2), and dihydrolipoamide dehydrogenase (E3)] with two specific regulatory enzymes, pyruvate dehydrogenase kinases (PDKs) 1–4 for phosphorylation (inactivation) of the  $\alpha$ -subunit of PDH and pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatases (PDPs) 1 and 2, for dephosphorylation (activation, reactivation) of the  $\alpha$ -subunit of PDH [17,18]. Expression of PDKs is linked to homeostasis of glucose, lipid, lactate, ATP, cytokines, and hormone levels in various diseases and suppressively regulates PDH activity [17–20].

In the present study, we describe selective and marked up-regulation of PDK4, an isoform of PDK, together with down-regulation of PDH activity and ATP levels in the skeletal muscles, heart, liver and lungs, but not the brain, in mice with the progressive stage of severe influenza and cytokine storm conditions. The results also showed that diisopropylamine dichloroacetate (DADA), which is the active component of pangamic acid [21] and commercially available as a Liverall (Daiichi Sankyo Co., Tokyo, Japan) for over 50 years for the treatment of chronic liver diseases, is a safe inhibitor of PDK4. DADA selectively and effectively inhibited PDK4, resulting in significant restoration of PDH activity as well as various metabolic disorders, such as ATP levels in various organs, and improved glucose, lactate and  $\beta$ -hydroxybutyric acid levels in the blood. Amelioration of PDH suppression in the infected mice by DADA was associated with significant vital improvements, such as restoration of energy metabolism, suppression of cytokine storm and viral proliferation, with marked improvement of survival.

## Methods

### Reagents

DADA was obtained from Daiichi Sankyo Healthcare Co. (Tokyo). Sodium DCA was purchased from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan).

### Animals and virus

All animals were treated according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85–23,

1996), and the study was approved by the Animals Care Committee of the University of Tokushima. Specified pathogen-free 4-week-old weanling C57BL/6CrSlc (B6) female mice were obtained from Japan SLC and maintained at 12-h light/dark cycle in a temperature-controlled room with free access to food and water. IAV/PR/8/34(H1N1) was kindly provided by The Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University (Kagawa, Japan). Under ketamine and xylazine anesthesia, 60, 120 and 200 plaque-forming units (pfu) of IAV/PR/8/34(H1N1) in 15  $\mu$ L of saline or saline alone as non-infected control was instilled intranasally in mice. Mice were treated orally with DADA, a PDK inhibitor, starting immediately after infection at 50 mg/kg at 12-h intervals for 14 days in 100  $\mu$ L sterilized 0.5% methylcellulose 400 (MC) solution mixed with calcium gluconate, a food additive, in commercially available medicine format at 4.68 mg/mL. The dose of DADA was adjusted to yield daily molar doses similar to the range of DCA used clinically (clinical doses, 25–100 mg/kg/day [22,23]). Positive control mice were treated with intraperitoneal injection of 100  $\mu$ L of DCA at 28 mg/kg, an equivalent molar dose to DADA, at 12-h intervals daily. Mice were monitored daily for body weight and food and water intake and assessed visually for signs of clinical diseases including inactivity, ruffled fur, labored respiration and huddling behavior. Mice that lost  $\geq 30\%$  of their original body weight and/or displayed evidence of pneumonia were euthanized by overdose of intraperitoneal injection of ketamine and xylazine.

### Blood glucose, lactate, free fatty acids and $\beta$ -hydroxybutyric acid assays

Whole blood levels of glucose, lactate, and  $\beta$ -hydroxybutyric acid were measured according to the protocols recommended by Medisafe-Mini GR-102 (Terumo, Japan), Lactate-Pro LT-1710 (Arkray, Japan) and Precision Xceed (Abbot, Japan) hand-held meter, respectively. Serum levels of free fatty acids were measured according to the protocols provided with the Free Fatty Acid Quantification Kit (Abcam, Japan).

### Blood and tissues ATP assays

Tissue ATP levels were measured by the firefly bioluminescence assay kit with an improved phenol-based ATP extraction reagent [24] (AMERIC-ATP (T) kit; Wako Pure Chemical Industries) according to the protocol supplied by the manufacturer. Freshly prepared brain, heart, lungs, liver and skeletal muscle (gastrocnemius muscle) tissues were homogenized immediately with 3.0 mL of ice-cold phenol-based ATP extraction reagent by Ultra-Turrax (Ika Japan, Nara, Japan). The tissue ATP levels were normalized against wet-tissue weight. Blood ATP levels were also measured by AMERIC-ATP kit for blood and cells using the procedure described previously [25].

### $IC_{50}$ analysis

The half maximal inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) of DADA and DCA against human PDK2 and PDK4 recombinant proteins expressed baculovirus system were measured by the method of off-chip mobility shift assay using a panel of human recombinant active kinases [26] from Carna Biosciences, Inc. (Kobe, Japan).

### PDH activity

PDH activity was measured in the brain, heart, lungs, skeletal muscles, and liver by the PDH Enzyme Activity Microplate Assay Kit (MSP18) (MitoSciences, Eugene, OR). The PDH was immunocaptured within the microplate and activity was determined by following the reduction of  $NAD^+$  to NADH, coupled to