

201420010B

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

重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の診断・治療に
関する研究：新規診断・治療に関する提案と検証

平成 24 年度～ 26 年度 総合研究報告書

研究代表者 木戸 博

平成 27 (2015) 年 3 月

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

重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の診断・治療に
関する研究：新規診断・治療に関する提案と検証

平成24年度～26年度 総合研究報告書

研究代表者 木戸 博

平成27（2015）年 3月

目 次

I. 総合研究報告

- 重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の診断・治療に関する研究：新規診断・治療に関する提案と検証 ----- 5
木戸 博
- (資料 1) 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 ----- 37
分担研究者：木戸 博
- (資料 2) 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 ----- 53
分担研究者：林 日出喜
- (資料 3) 高病原性鳥インフルエンザ H5N1 ウイルス感染におけ MSPL/TMPRSS13 プロテアーゼ遺伝子の意義の解明/急性脳症における血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクションの崩壊機序 ----- 65
分担研究者：高橋 悦久/奥村裕司
- (資料 4) 急性脳症の病態：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 ----- 77
分担研究者：久保田 雅也
- (資料 5) ICU入室患者における末梢血アデノシン三リン酸(ATP)と転帰との関係に関する研究 ----- 87
分担研究者：西村 匡司
- (資料 6) 新型インフルエンザ肺炎・脳症の診断・治療法開発研究 ----- 95
分担研究者：佐々木 信一

(資料 7) 重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の診断・治療に関する研究：検体収集とインフルエンザ重症化バイオマーカーの検索	-----	105
分担研究者：西村 秀一		
(資料 8) 脳症発症とβ酸化障害の関連性に関する研究	-----	115
分担研究者：山口 清次		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	127
III. 研究成果の刊行物・別刷（主なもの）	-----	149

I. 総合研究報告書

重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の診断・治療に関する研究：

新規診断・治療に関する提案と検証

研究代表者 木戸 博

徳島大学疾患酵素学研究センター・特任教授

研究要旨

平成24年度～26年度にかけて、1) インフルエンザ重症化（肺炎、脳症）の発症機序解明、2) 早期に重症化を診断するためのバイオマーカー、Flu Alarmin の検索、3) 重症化治療薬開発についての研究が進められた。重症化機序の全容が解明されると共に、重症化バイオマーカーが明確になり、具体的な治療薬が提案され、大きな成果を挙げることができた。

1) インフルエンザ重症化（肺炎、脳症）発症機序解明では、生体内のインフルエンザウイルス増殖のメカニズムとして、これまでに“インフルエンザ—サイトカイン—プロテアーゼ (Trypsin, MMP-9)” サイクルを提案していたが、感染重症化はこのサイトカインを介してさらに“体内代謝障害—サイトカイン”サイクルが共役した時に発症することを発見した。従って、基礎疾患としての体内代謝障害が、重症化リスク因子になることが判明した。両サイクルの密接な共役は、代謝不全の治療でサイトカインストームが改善され、さらにウイルス増殖まで抑制されることから証明された。両サイクルが血管内皮細胞で回転すると、肺では肺水腫、脳では脳症、各種臓器で回転すると多臓器不全として表れる。体内代謝障害の中でも、最も主要な代謝がミトコンドリアでのエネルギー代謝で、糖代謝と脂質代謝がこれに深く関与する。糖代謝障害の糖尿病、肥満、先天性脂質代謝障害者が重症化のハイリスク者として挙げられていることの理論的背景が明確になった。

ウイルス増殖サイクルでは、従来提唱してきた“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、さらに Trypsinogen を活性化する Enterokinase も重要で、感染と共に増加することが新たに発見された。

高病原性鳥インフルエンザ H5N1 ウイルスの増殖サイクルについても解析が進んだ。高病原性鳥インフルエンザの増殖は、上記の Trypsin では無く、Hemagglutinin (HA) 膜融合領域の RKKR、KKKR 配列を限定分解する TMPRSS13/MSPL が、既知の Furin よりも広範囲に増殖に関与することを発見している。プロジェクトでは TMPRSS13/MSPL の KO マウスを作成することで、KKKR 配列 H5N1 ウイルスは主に TMPRSS13/MSPL が、RKKR 配列 H5N1 ウイルスは TMPRSS13/MSPL と Furin が増殖に係わっていることを証明することができた。

2) 早期に重症化診断するためのバイオマーカー、Flu Alarmin の検索では、多様な候補因子の中から、インフルエンザ脳症患者、ICU 入室した感染重症化患者を対象にして評価を進めた。その結果、多くの Flu Alarmin 候補因子の中で、サイトカインやシ

グナル伝達物質の場合、多くの影響因子の支配下にあるため、それらの数値の増減で単純に重症化を示すには至らないことが判明した。重症化がエネルギー代謝破綻と密接にリンクしていることから、検討した中で血中 ATP の減少、糖代謝不全時に蓄積される乳酸から、乳酸/ATP 比が最も的確な重症化のリアルタイムバイオマーカーと判定された。インフルエンザ脳症患者では、熱性けいれん重積との鑑別が重要であるが、乳酸/ATP 比はこれを的確に鑑別する。さらに、ICU 入室した重症化患者の予後予測因子として、APACHE II に代わって乳酸/ATP 比が最も優れた予後予測マーカーであることが確認された。またこれまでにインフルエンザ脳症のリスク因子として、熱不安定性 Carnitine Palmitoyltransferase II (CPT II) 遺伝子多型を見出して提案してきたが、中国でも大規模な遺伝子解析と脳症の発症調査が行われ、当初日本人種に特徴的疾患と言われてきたインフルエンザ脳症が東アジア人種に特徴的な疾患として位置付けられた。熱不安定性 CPT II 遺伝子多型を診断する方法として、理化学研究所が開発した SMART AMP を使用して、外来で 30 分以内に診断する方法が確立されて早期治療が可能となった。

3) 重症化治療薬研究では、目覚ましい進展があった。感染重症化が代謝破綻をきっかけとして発症することから、重症化促進因子が網羅的に検索され、各種サイトカインによって誘導される Pyruvate Dehydrogenase (PDH) kinase 4 (PDK4) が同定された。PDK4 が増加すると、PDH がリン酸化されてミトコンドリアの糖代謝が著しく低下し、ATP クライシスを招く。PDK4 阻害剤の検索から、既存薬中に Diisopropylamine Dichloroacetate (DADA) の阻害効果が新たに同定され、これを発端に DADA の約 100 倍強力な新薬候補が見いだされた。DADA の使用で致死量のウイルス感染でも生存率 100% が証明され、サイトカインストームの改善効果と各種臓器 ATP 量の正常化が確認された。一方小児のインフルエンザ脳症が、エネルギー産生を脂肪酸代謝に依存している血管内皮細胞の ATP クライシスの結果であることが解明された。そのため、熱不安定性 CPT II 遺伝子多型患者では、高熱時に脂肪酸代謝が障害され、脳症が発症すると推定された。治療薬では、CPT II の転写を促進してミトコンドリア機能の正常化と ATP 産生を促す高脂血漿治療薬の Bezafibrate が有効と推定され、脳症患者の繊維芽細胞で Bezafibrate の有効性を立証した。多臓器不全の治療では、DADA や Bezafibrate に加え、血管内皮細胞の Adherens junction の崩壊を引き起こす GSK-3 β の活性化阻害剤が有効であることを発見することができた。今後、GSK-3 β を新たな創薬ターゲット分子として提唱している。

研究分担者

- ・木戸博：徳島大学疾患酵素学研究センター・生体防御・感染症病態代謝研究部門・特任教授
- ・林日出喜：長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染防因子解析学分野・準教授
- ・奥村裕司：徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部生体栄養学分野・準教授
- ・高橋悦久：徳島大学疾患酵素学研究センター・生体防御・感染症病態代謝研究部門・特任助教
- ・西村匡司：徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部救急集中治療医学分野・教授
- ・久保田雅也：国立成育医療研究センター神経内科・医長
- ・佐々木信一：順天堂大学医学部附属浦安病院呼吸器内科・準教授
- ・山口清次：島根大学医学部小児科学・教授
- ・西村秀一：国立病院機構仙台医療センター・臨床研究部ウイルス疾患研究室長

A. 研究目的

重症のインフルエンザによる肺炎・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である。これまでのインフルエンザ感染の治療は、感染による臨床症状が出てから4日以内に抗インフルエンザ薬を5日間投与することだけで、感染後4日を過ぎた患者には対症療法だけであった。そのため感染後4日を過ぎた頃から始まる感染重症化への対策、サイトカインストームへの対策は、これまで有効な治療法の提案がされていなかった。国際的な研究開発状況においても、インフルエンザ

の増殖を抑制する抗インフルエンザ薬の開発に企業は凌ぎを削っているが、重症化への対策、サイトカインストームへの対策に関しては、その発症機序の解析が不十分なことからほとんど実施されていないと言っても過言ではない。このような現状から、本研究では重症化に発展する可能性をいち早く捉えて対処できるバイオマーカー、Flu Alarmin の検索を実施すると同時に、重症化の発症機序の解明に根差した有効な治療法の開発、サイトカインストームの治療法の開発、血管内皮細胞の透過性亢進の抑制剤の開発、これらの研究目的の解決を目指した研究を推進する。なお研究推進の基盤となるこれまでの成果に、重症化の機序とウイルス増殖機序を世界に先駆けて解明した「インフルエンザ—サイトカイン—プロテアーゼ」サイクル説 (*J Infect Dis* 202:991, 2010、*Cardiovasc Res* 89:596, 2011) を発表しており、これを基盤に重症化機序の解明とその治療法、Flu Alarmin の検索を進める。具体的には下記の3課題に絞った研究を進める。

- 1) インフルエンザ重症化(肺炎、脳症)発症機序の解明
- 2) 早期に重症化診断するためのバイオマーカー、Flu Alarmin の検索
- 3) 重症化治療薬の検索

B. 研究方法

1. 【重症化モデル動物実験による“インフルエンザ—サイトカイン—プロテアーゼ”サイクルの検証、重症化の発症機序の解析、Flu Alarmin 検索、治療薬の検証】
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では感染重症化しやすい InfluenzaA/PR/8/34(H1N1)株を用いた。

2. 【培養細胞実験系による“インフルエンザ-サイトカイン-プロテアーゼ”サイクルの検証】

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。

3. 【MSPL/TMPRSS13 ノックアウトマウスでの感染実験】による、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染における MSPL/TMPRSS13 プロテアーゼ遺伝子の意義解明を実施した。

4. 【急性脳症における血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクションの崩壊機序の解析実験】

1) 感染：ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に IAV (PR8) を MOI=1 で 1 時間感染させて、培地交換後 28 時間培養した。

(2) C57BL/6CrSlc マウスに PR8 を 100 PFU で経鼻感染させて体重をモニターした。動物実験に関しては徳島大学の規定に基づき行った。

2) ウェスタンブロッティング：培養細胞及びマウス肺のホモジネートは RIPA バッファーで作製し使用した。

3) RT-PCR：HUVEC より RNA を抽出し、One-Step RT-PCR Kit を用いて、それぞれの遺伝子発現を検出した。

5. 【インフルエンザ脳症患者臨床検体を用いた Flu Alarmin の解析】

1) 血中乳酸/ATP 比について：血中 ATP 測定は急性脳症急性期 20 例、熱性けいれん重積急性期 16 例、各種ミトコンドリア病 13 例に対して既報告の方法により測定が行われた。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。

2) 急性脳症、AESD に対する早期 3 剤 (ビタミン B1, B6, および L カルニチン) 投与：国立成育医療研究センターにおいて 2008 年 1

月から2013年12月までに感染を契機とした急性脳症として入院加療を行った症例をリストアップしたところ6年間で合計82名を数えた(図2)。脳症の診断としては、インフルエンザ脳症ガイドラインを参考に、二相目も含め“初期症状発症24時間以降の意識障害の遷延を認めた”症例とした。基礎疾患がなく、有熱時けいれんで発症し、AESDの可能性が考慮されて発症早期より当院で対応し、結果的に急性脳症と診断された症例に限定すると(1)2008-2010年10名と(2)2011-2013年11名が該当した。この21名に関して以下を比較した。

3) 評価項目: 早期ビタミンB1, B6, およびLカルニチン投与の有無(けいれん発症24時間以内から投与開始), 二相目のけいれんの有無、および画像変化(bright tree appearance, BTA)。投与量はビタミンB1 10mg/kg, ビタミンB6 20mg/kg, L-カルニチン 30-100mg/kgである。

6. 【ICU入室患者の臨床検体からのFlu Alarmin解析】

集中治療部に入室した重症患者から血液を経時的に採取し、血液ガス測定装置でpH, PaO₂, PaCO₂, ヘモグロビン値とともに乳酸値を測定した。同時にATP測定用の血液をEDTA含有チューブで-20℃で保存した。重症度評価としては集中治療部に入室24時間でのAPACHE IIスコアを計算し用いた。

7. 【呼吸器内科の臨床検体を用いたFlu Alarminの検索】

患者の鼻腔もしくは咽頭ぬぐい棒検体からインフルエンザ迅速キットで検査し、インフルエンザと診断された症例を対象に、同意を得られた患者より血液もしくは肺胞洗浄液を採取し検査を施行した。ATPの測定は、和光純薬工業株式会社のATP測定キット(AMERIC-ATP Kit)を用いて、患者検体(血

液・気管支肺胞洗浄液)から測定。同時に採取した検体から各種検査(アルブミン、グルコース、乳酸、LDH、尿酸、ケトン体、トリプシン、CRP、IL-6、IL-33、MMP-9、TNF- α 等)を測定した。具体的には、ATPは当院で患者検体からATP抽出溶液を作成し凍結保存後、SRL社に委託してルミノメーターで測定。同時に採取した血清から、他の項目もSRL社に委託し測定した。

さらに国立病院機構仙台医療センター臨床研究部が収集した検体を用いて、Toll-like Receptorの下流のシグナルや各種サイトカイン、プロテアーゼ等の測定を試みた。また、重症化にかかわる遺伝子候補の検索においては、脳症を含む多臓器不全の遺伝子解析をCPT2を対象としていたが、重症肺炎症例についても、インフォームドコンセントのもとCPT2検査を試みた。

8. 【脂質代謝異常のin vitro probe assay】

1) インフルエンザ脳症の発症機序を視野に、患者のFibroblast培養細胞の β 酸化能を評価するために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ディウム(ブドウ糖、遊離脂肪酸欠乏かつカルニチン過剰)で培養し、 β 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 β 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。

2) 環境温度の影響: 培養環境を、高温下(41℃)と低温下(33℃)、および37℃環境下で培養してIVP assayを行った。正常および β 酸化異常症の細胞における β 酸化能の変化を検討した。

3) 解熱剤による β 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β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。

（倫理面への配慮）

各実施機関毎に、倫理委員会の承認、その他倫理面での配慮の上で実施した。

C. 結果

1. 【重症化モデル動物実験によるインフルエンザ感染重症化の機序の解析と治療法の検索】

マウスのインフルエンザ感染モデル実験により以下の結果を得た。①インフルエンザ感染による致死性重症化は、C サイトカインー代謝不全” サイクルと “インフルエンザ 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確認された。②体内代謝の中で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、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たが、これらは重症化の過程に関与する因子で、しかも様々な因子の影響下にあるため、Flu Alarmin として評価することは困難であると判定した。重症化を的確に示す Flu Alarmin はエネルギー代謝の最終産物の ATP と、貯蔵される中間代謝産物の乳酸との

組み合わせが的確なバイオマーカーと判定された。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 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。さらに、DADA よりも効果的な PDK4 阻害剤の検索を開始して、少なくとも数十倍強力な新規 PDK4 阻害剤を見出した。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。

従来から CPT II の熱不安定性 SNP が発症リスク因子になることを見出して発表してきたが、インフルエンザ脳症が日本人に特有な疾患では無く、東アジア人種に特徴的な疾患で、その発症も CPT II の熱不安定性 SNP が原因になることを、中国人の患者を対象とした中国の研究者との共同研究で確認して論文発表を行った。

2. 【培養細胞実験系による “インフルエンザ サイトカインープロテアーゼ” サイクルの検証】

1) ヒト培養細胞から、従来報告のあった 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。

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。また、PRSS1 及び PRSS3 も多くの細胞で発現がみられた。

3) EK-v1、EK-v2、PRSS3-v2 を強制発現させた 293T 安定細胞株に、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。

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 トリプシノーゲンを活性化したが、TMPRSS2、TMPRSS4、HAT は PRSS3 を活性化できなかった。

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。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。

3. 【MSPL/TMPRSS13 ノックアウトマウスでの感染実験】による、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染の感染実験。KKKR モチーフを持つ遺伝子改変 (Mut) ウイルスの場合、ノックアウトマウスではウイルスの増殖がほとんど検出できなかったことから、Mut ウイルスの増殖には TMPRSS13/MSPL が主として関与していると推定された。

4. 【急性脳症における血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクションの崩壊機序の解析実験】

1) アドヘレンスジャンクションにおいて重要な分子である β カテニンと VE カドヘリンの発現をウエスタンブロッティングによって検出した。その結果、 β カテニンの発現は非感染コントロールと比べて 24% まで低下した。一方、VE カドヘリンの発現に有意な変化は認められなかった。また、遺伝子発現に関しては β カテニンの発現に有意な差は認められていないことから、タンパク合成後にプロテアソームによる分解の可能性が示唆された。

2) IAV に感染させた HUVEC 細胞にプロテアソーム阻害剤であるラクタシスチンを添加することで、 β カテニンの分解が抑制され、未処理と比べて 1.8 倍まで回復した。この結果より、IAV 感染で、プロテアソームによる分解が増強されることが明らかとなった。

3) β カテニンは、活性化した GSK-3 β によってリン酸化されることでユビキチン化されてプロテアソームの分解を受けるが、IAV に感染することで不活性型である phospho-GSK-3 β の発現が有意に低下したが全体の GSK-3 β の発現には有意差は認められなかった。更に、GSK-3 β をノックダウ

ンするとβカテニンの発現が回復した。これらの結果からPR8に感染したHUVECにおいて、アドヘレンスジャンクションでのVEカドヘリンとβカテニンの複合体形成の制御にはGSK-3βが関与していることが明らかとなった。

4) マウスにPR8を経鼻感染させた時、非感染コントロールと比べて3日目より体重の減少が認められた。また、NP抗体で検出した肺のウイルス量は2日目から増加し始めて3日目にピークを迎えた。肺におけるβカテニンは2日目から6日目まで減少が続き、それに伴い不活性型のphospho-GSK-3βの減少が認められた。

5. 【インフルエンザ脳症患者臨床検体を用いたFlu Alarminの解析】

1) 乳酸/ATP比について：各疾患の乳酸/ATP比を検討した。急性脳症20例の急性期(5.65±5.55)は熱性けいれん重積16例急性期(1.65±1.01)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13例のそれ(5.65±5.85)と比較し有意差は認めなかった。

2) AESDに対する早期3剤(ビタミンB1, B6, およびLカルニチン)投与：2008-2013年を(1)2008-2010年と(2)2011-2013年に分けて比較すると通常の脳症治療に加えた早期3剤(ビタミンB1, B6, およびLカルニチン)投与によりAESDの割合が減少し軽症タイプの脳症の数が増加していることがわかった。つまりAESDの予防および軽症化に上記3剤投与が有効である可能性が考えられた。この2群に男女比や発症月齢に有意差はなかった。

6. 【ICU入室患者の臨床検体からのFlu Alarmin解析】

これまで臨床で使用されてきたAPACH II

等の重症度スコアは必ずしも患者予後を反映しない。そこで、重症患者の重症度の変化を簡便に経時的、客観的にとらえることが可能となれば、重症患者の治療効果を早期に把握することができ、予後改善にも役立つ可能性がある。本研究ではATP、乳酸/ATP比(A-LES, ATP-lactate energy risk score)を測定し、重症患者の予後およびAPACH IIスコアとの関連を検討した。

その結果、平均年齢、性別、基礎疾患には死亡患者と生存患者で差はなかった。死亡患者は生存患者と比較して有意に入室24時間でのAPACHE IIスコアが高いという結果が得られた。

7. 【呼吸器内科の臨床検体を用いたFlu Alarminの検索】

順天堂大学倫理委員会の承認(浦倫24-43号：「重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の診断・治療に関する研究：新規診断・治療に関する提案と検証」)を元に、計23例のインフルエンザ患者等から同意を得、患者血液検体から各種markerを測定した。検討対象はA型インフルエンザ：5例、B型インフルエンザ：3例、対称として各種呼吸器疾患：細菌性肺炎：4例、間質性肺炎急性増悪：5例、PCP：1例、CVD-IP：2例、過敏性肺炎：1例、薬剤性肺炎：1例、放射線肺炎：1例で検討した。多くの症例でIL-6、MMP-9やTNF-αといったサイトカインの高値が認められた。血中の乳酸をATPの値で割ったATP-lactate energy risk score(A-LES)の値は、正常者の既報値(<2.00)より高値を示した。特にB型インフルエンザ症例2例で著明な高値を示した(値：91.7、40.4)。A-LES値と各種サイトカインの比較検討では、CRPとIL-6で弱い相関が認められた。重症度別での検討では、重症度が高いほど、ATP低値、A-LES値高値の傾向が

認められた。

国立病院機構仙台医療センター・臨床研究部ウイルス疾患研究室では、以下の結果が得られた。

1) 臨床検体としてのインフルエンザ罹患者由来の発症急性期の気道分泌液や血液の収集：前回の2013-2014年インフルエンザシーズンは、A/H1N1pdm09 亜型の再出現があり、このウイルス感染による成人の肺炎症例が全国で見られ、その中で当院に寄せられたいくつかの症例について、ペア血清ならびに急性期全血を確保し、それらについて Toll-like Receptor の下流のシグナルや各種サイトカイン、プロテアーゼ等の測定ならびに、CPT2 についての遺伝子解析のため徳島に送付できたが、本シーズンは、既往症を有する高齢者の肺炎が多く、全シーズンのような健康成人での重症肺炎例は少ない（毎年検体を送ってくれる臨床医の印象）。そのためか、ほとんど検体の確保ができなかった。

一方、比較的高齢者でヒトパラインフルエンザ3型やヒトメタニューモウイルスやRSウイルスによる肺炎入院例は多数経験しており、それらの検体の気管支洗浄液や血清の確保はできている。

2) 病理解剖由来のヒト気管支細胞の初代培養とその不死化の試み：

昨年度は協力研究者の山谷がつくった3人のドナー由来の、気管支上皮細胞でレンチウイルスベクターを用いてSV40のLarge T 抗原遺伝子等の導入による不死化を何度か試みたが、結果的に成功しなかった。この不成功を受け、本年度はさらに Large T 抗原遺伝子に加えて、c-myc あるいは H-ras 遺伝子の導入による不死化を試みた。しかし、また一時的には成功したかのように見えることがしばしばあったものの、最終的

にはどれも培養を継続できず、現在に至るまで成功していない。

3) 外科手術材料由来の十二指腸および扁桃腺上皮細胞の初代培養と、その不死化の試み：昨年度から本年度にかけて、外科手術で摘出された組織を材料に十二指腸上皮細胞の培養の試みを3度行い、うち2回で培養に成功し、十二指腸上皮細胞の培養法を習得した。

それらの細胞についても凍結保存をするとともに、レンチウイルスベクターを用いてSV40のLarge T 抗原遺伝子の導入による不死化と、それらの細胞のウイルス感受性の検討を試み成功している。本年度、本細胞については、インフルエンザウイルスを含む種々のウイルスに対する感受性を検討してきたが、残念ながら未だインフルエンザを含めた特定のウイルスに対する感受性は見出せていない。

さらに本年度開始した、扁桃腺上皮細胞の培養は、一応初代培養まで成功したが、その不死化には至らず、また継代培養しているうちに最終的に繊維芽細胞に置き替わってしまった。

4) インフルエンザウイルスに感染性を与えるセリンプロテアーゼ TMPRSS2 の初代ヒト気管上皮細胞における発現を、蛍光抗体法で確認した。さらに、培養上清を材料とする ELISA で調べたところ、膜結合型である同酵素が、前立腺がん細胞での所見と同様、培養上清中に50-100ng/ml という濃度で検出された。また、同細胞に対するインフルエンザウイルス感染によって IL6 が誘導され、その IL6 自体が同細胞に障害を引き起こすことを見出した。

8. 【脂質代謝異常の in vitro probe (IVP) assay】

1) IVP assay による β 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 β 酸化異常症の細胞をテストした。正常コントロールでは 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 β 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。

2) 培養環境の温度による β 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、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 β 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 β 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 β 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 β 酸化障害は悪化し、低温下ではすべての鎖長の β 酸化障害が緩和すると推測された。

3) 解熱剤の β 酸化能への影響: IVP assay の実験系では、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

β 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 β 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。

D. 考察

1. 【重症化モデル動物実験によるインフルエンザ感染重症化の機序の解析と治療法の検索】

インフルエンザ感染重症化機序では、発症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、“サイトカイン代謝不全” サイクルを形成している。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確認された。本プロジェクトにおいて、“サイトカイン代謝不全” サイクルの中核となっている PDK4 阻害剤として DADA が見いだされ、さらに強力な PDK4 阻害剤が見いだされ、その薬効が確認されている。今後、前臨床試験を実施して治験を目指す。なお、サイトカインストームの治療に PDK4 阻害剤が有効なことから、インフルエンザ以外の各種感染症の治療、さらには癌の悪液質、心不全、糖尿病治療への応用も可能と推定される。一方、インフルエンザ脳症の発症リスク因子として発見していた CPT II の熱不安定性 SNP が、日本以外に中国でも脳症のリスク因子として確認された。この遺伝子を高い頻度で保有する東アジア人種に共通なリスク因子と言える。

2. 【培養細胞実験系による“インフルエンザサイトカインプロテアーゼ” サイクルの検証】

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。*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。

3. 【MSPL/TMPRSS13ノックアウトマウスでの感染実験】から、高病原性鳥インフルエンザKKKR配列H5N1ウイルスの増殖には主にTMPRSS13/MSPLが、RKKKR配列H5N1ウイルスの増殖にはTMPRSS13/MSPLとFurinが関わっていると推定された。

4. 【急性脳症における血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクションの崩壊機序の解析実験】

ノイラミニダーゼ阻害剤がインフルエンザ治療薬として一般的に使用されている。しかし、“インフルエンザウイルス-サイトカイン-プロテアーゼ（トリプシン、MMP-9）”サイクルを通して起こる循環不全、低酸素血症、内皮細胞における血管透過性の亢進による重症化の治療には効果は期待できない。そこで、重症化の新たな治療法のターゲットとして血管透過性亢進機序の解明を行った。血管内皮細胞ではVEカドヘリンが発現しており、細胞間接着において β カテニンと複合体を形成することで重要な役割を果たしている。本研究では、IAV感染により β カテニンの分解が亢進されることを明らかとし、その制御がGSK-3 β の活性化により起こることを証明した。更に

GSK-3 β ノックダウンにより β カテニンの分解が抑制されたことからGSK-3 β に対して新たな阻害剤を探索することがインフルエンザ重症化の治療につながると考えられる。

5. 【インフルエンザ脳症患者の病態解析と診断バイオマーカー】の検索。

乳酸/ATP比は急性脳症急性期では高値、回復期で正常化した。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。その値は重症例の予後と関連した。

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。

AESDの発症の遺伝的素因として、*CPTII*や*ADORA2A*の遺伝子多型、*SCN1A*の遺伝子変異などが判明してきており、患者により発症の引き金となる病因が異なる可能性がある。今回の検討では一般的な抗けいれん薬に加えて、CPTIIが関与する代謝障害に対する治療（ビタミンB1, Lカルニチン）、およびADORA2Aに関連してはテオフィリンによりアデノシン受容体同様に抑制性の影響を受けるビタミンB6を、間接的な効果を期待して投与を行った。ビタミンB6に関しては、既にAESD予防効果として推奨されており、AESDの病態の一つとされる興奮毒性に関して、グルタミン酸脱炭酸酵素を介してのグルタミン酸減少効果も期待した。

AESDの早期治療介入に関しては、ビタミンB6投与、脳低温療法が報告されているが、現時点は早期診断が難しいことから、その介入効果の判断も難しい。通常脳症治療に加えた早期3剤（VB1, VB6, Lカルニチン）

ン) 投与により AESD の割合が減少し軽症タイプの脳症の数が増加した。AESD の予防および軽症化に有効である可能性が考えられた。今回の3剤はミトコンドリアレスキューにもなっており興味深い。脳の血管内皮(脳血管関門)のミトコンドリア密度は他の臓器よりも高く、小児期の体重あたりの血管内皮のミトコンドリア密度は成人よりも高い。そのため種々の energy failure により小児の脳血管内皮は機能低下に陥りやすい。急性脳症の最初の障害はニューロンではなく血管内皮に起こるとするのが我々の仮説である。ただし厚生労働科学研究・水口班の調査結果からは、2010年までの統計では急性脳症の中で AESD の頻度が最も高かったとされているが、それ以降の疫学は不明であり、今回の結果の解釈は注意を要すると思われる。

6. 【ICU入室患者の臨床検体からの Flu Alarmin 解析】

インフルエンザ感染症では重症化機序に熱不安定性フェノタイプによる ATP 産生不全が関与していると報告されている。熱中症患者の重症化にも同様の機序の関与が示唆されている。これら以外の疾患でも同様に重症化の機序に ATP 産生不全が関与している可能性は十分にある。ICU に入室する患者は呼吸・循環動態が不安定なことが多い。肺での酸素取り込み、心不全による酸素供給の問題から、組織での酸素利用が障害される。一般的に末梢組織での酸素不足を見るには嫌気性代謝の産物である乳酸を測定する。しかし、理論的には乳酸よりも ATP は酸素供給に対し、より鋭敏な反応を示すはずである。

今回、ICU入室患者の ATP および A-LES の予後判定効果を検討した。ATP、A-LES ともに対象患者全員では生存患者と死亡患者で

差を認めなかった。基礎疾患により酸素供給、末梢組織での酸素利用が異なることが原因と考えられる。従来用いられている重症度評価スコアである。APACHE II スコアは死亡患者で高く、ICU入室患者の予後判定としての APACHE II スコアの精度を示す結果となった。しかし、APACHE II スコアの計算には24時間を要するという欠点がある。ATP 及び A-LES の測定は入室時に可能であり、その後も経過を追って変化をとらえることができる。入室時と翌日の検査値の変化を評価した結果でも生存患者と死亡患者で有意差は認めなかったが、生存患者では ATP は増加傾向、A-LES は減少傾向、死亡患者では反対の傾向が認められた。患者数を増やすことで経時的変化の意義が明らかになると期待できる。

感染症患者を対象とすると A-LES の予後判定予測値は最も良好であった。敗血症は集中治療室で管理する患者群の中では予後不良の疾患である。敗血症は細菌感染が原因で臓器不全が起きる病態である。抹消組織での酸素利用障害が病態生理の一つとして考えられている。敗血症患者で発症する多臓器不全に ATP 産生不全が関与しているか可能性は高い。これが感染症患者で A-LES の予後判定予測が良好であった理由の一つと考えられる。全ての患者に当てはまるわけではないが、A-LES は簡便に測定できるとともに、経時的変化を追うことができる点で優れている可能性がある。

7. 【呼吸器内科の臨床検体を用いた Flu Alarmin の検索】

Chida らは、ICU入室した症例に対して、血中 ATP と乳酸値を測定し、その比である Lactate/ATP Ratio (A-LES 値) が real time の予後因子として有用であることを報告した。(Chida J, et al. Blood lactate/ATP

ratio, as an alarm index and real-time biomarker in critical illness. PLoS One 2013; 8: e60561.) 本研究におけるインフルエンザ患者の A-LES 値は、他の呼吸器疾患と同等かそれ以上に上昇傾向が認められ、バイオマーカーとしての有用性が示唆された。今回の検討では、症例数が少なく、正常コントロールが取られていないという limitation がある。今後、検討症例を増やすと共に、健常者のコントロールも確認し、詳細に解析予定である。

また臨床応用可能な、最適な Flu Alamin の同定は、インフルエンザ等の急性感染症罹患者由来の発症急性期の気道分泌液や血液等の臨床検体の収集と解析を今後も粘り強く継続していくことが必要である。

ヒトの気管支上皮ならびに十二指腸と扁桃腺上皮の初代培養細胞に成功し、一部は今後の応用のために凍結保存を完了しており、また通常種々の実験に頻繁に使えるように不死化を試みている。だが、不死化に成功した小腸上皮と思われた細胞は、未だインフルエンザを含め特定のウイルスに対する感受性は見出せておらず、また気管上皮と扁桃腺上皮の不死化は未だ成功していない。これらの試みは、あきらめることなく継続していく必要がある。

8. 【脂質代謝異常の in vitro probe (IVP) assay】

それまで正常と変わらぬ生活をしてき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β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β酸化への影響を調べた。

環境温度はβ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β酸化障害が増強する；②高温下では全体としてβ酸化そのものは促進される；③低温下では長鎖β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β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β酸化を抑制する傾向があり、アセトアミノフェンはβ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。

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β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

【重症化モデル動物実験によるインフルエンザ感染重症化の機序の解析と治療法の検索】

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”サイクルの重要性が確認された。このネットワーク機構の中で、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 DADA と新規化合物が見いだされた。これらの阻害剤は、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。また、従来我が国でのみインフルエンザ脳症が発症すると言われていたが、その発症リスク因子が

CPT II の熱不安定性 SNP であることを発見したことから、日本以外に中国でもインフルエンザ脳症のリスク因子として確認され、東アジア人種に共通なリスク因子として明らかになった。

【培養細胞実験系による“インフルエンザ—サイトカイン—プロテアーゼ”サイクルの検証】

新たな EK-v2→PRSS→HA プロセシングの経路が、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。

【MSPL/TMPRSS13 ノックアウトマウスでの感染実験】から、高病原性鳥インフルエンザ H5N1 ウイルスの増殖には TMPRSS13/MSPL の阻害剤開発が必要と推定された。

【急性脳症における血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクションの崩壊機序の解析実験】

インフルエンザに感染させた HUVEC で VE カドヘリンと複合体を形成する β カテニンが減少することが明らかとなった。IAV 感染によって β カテニンのプロテアソームによる分解が亢進されたためであった。これらの結果から、VE カドヘリン- β カテニンの結合がインフルエンザ重症化発症機序の一つである可能性が示唆された。ユビキチン-プロテアソーム経路の GSK-3 β によって調節されることが明らかとなったことで、新たな創薬ターゲットになり得ると考えられる。

【インフルエンザ脳症患者の病態解析と診断バイオマーカー】の検索

乳酸/ATP 比は急性脳症急性期の有用なバイオマーカーの可能性はある。また急性脳症急性期の早期 3 剤 (VB1, VB6, L-カルニチン) 投与により AESD の予防および軽症化に有効である可能性が考えられた。いずれ

も急性脳症の病態として特に脳血管内皮のミトコンドリア機能不全が病態と深く関連することを示唆すると思われる。

【ICU 入室患者の臨床検体からの Flu Alarmin 解析】

重症患者で ATP、A-LES を測定した。重症患者ではいずれも正常範囲を逸脱していた。

さらに感染症患者では予後との相関が高く、重症患者の予後予測因子として重要な役割を果たす可能性が示唆された。

【呼吸器内科の臨床検体を用いた Flu Alarmin の検索】

血中 ATP 値、ならびに乳酸値との比である A-LES 値は、インフルエンザのバイオマーカーとして、その有用性が示唆された。また、今回行ったヒト気管上皮初代細胞を用いた解析のような、蛋白分解酵素や IL6 に関する仕事は、治療薬の選択も視野に入れつつ、今後も *in vitro*, *in vivo* で継続していく必要がある。

【脂質代謝異常の *in vitro* probe (IVP) assay】

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 β 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 β 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. 健康被害情報

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 Immunol* 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) 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*, 2013; 8(7), e70060.
- (7) 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.
- (8) Chida J, Ono R, Yamane K, Hiyoshi M, Nishimura M, Onodera M, Nakataki E, Matushita M, Kido H. Blood Lactate/ATP Ratio, as an Alarm Index and Real-Time Biomarker in Critical Illness., *PLoS ONE*, 2013; 8(4), e60561.
- (9) 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. doi:10.1111/irv.12124.
- (10) Chida J, Kido H. Extraction and quantification of adenosine triphosphate in mammalian tissues and cells. *Methods Mol Biol*, 2014;