

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13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。

⑥CPT II SNPの迅速診断

CPT IIの熱不安定性に係わる因子は、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14に示すように、F352CとF352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。

⑦Flu Alarminの検討

Flu AlarminとしてLactate/ATP比が有用であることがマウスの実験系で確認された。

D. 考察

平成24-26年間の研究により、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」が見いだされた。このネットワーク機構の中で、インフルエンザ感染による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阻害剤として新たにDADAが見いだされた。DADA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。

今後PDK4を分子標的としたDADAを超えるより有効で安全な薬剤の開発が期待される。ま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 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; 1098(1): 21-32.
- (11) Takahashi E, Kataoka K, Indalao IL, Konoha K, Fujii K, Chida J, Mizuno D, Fijihashi K, Kido H. Oral clarithromycin enhances airway immunoglobulin A (IgA) immunity through induction of IgA class switching recombination and B-cell-activating factor of the tumor necrosis factor family molecule on mucosal dendritic cells in mice infected with influenza A virus. *J. Virol.* 86(20):10924-10934, 2012.
- (12) Cissé Y, Inoue I, Kido H. Oseltamivir reduces hippocampal abnormal EEG activities after influenza A virus infection in isoflurane-anesthetized rats. *J. Exp. Pharmacol.* 4:69-76, 2012.
- (13) Kubota M, Chida J, Hoshino H, Kashii H, Ozawa H, Koide A, Hoshino A, Koyama A, Mizuno Y, Yamaguchi M, Yao D, Yao M, Kido H. Thermolabile CPT II variants and low blood ATP levels are closely related to severity of acute encephalopathy in Japanese children. *Brain Dev* 34(1):20-27, 2012.
- (14) Fujimoto C, Takeda N, Matsunaga A, Sawada A, Tanaka T, Kimoto T, Shinahara W, Sawabuchi T, Yamaguchi M, Hayama M, Yanagawa H, Yano M, Kido H. Induction and maintenance of anti-influenza antigen-specific nasal secretory IgA levels and serum IgG levels after influenza infection in adults. *Influenza Other Respi Viruses* 6(6):396-403, 2012.
- (15) 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.
- (16) 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.
- (17) 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.
- (18) 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.
- (19) 木戸博、高橋悦久、山根一彦、重症インフルエンザ感染の肺炎・脳症の最新知見と治療提案 日本臨床内科医会会誌 2013; 27(5): 578-583.
- (20) 木戸博 インフルエンザ脳症はここまでわかってきた！ プライマリケアのためのインフルエンザ診療 医薬ジャーナル社 2013: p30-35.
- (21) 木戸博 インフルエンザにおけるマクロライドの有効性の機序 2：インフルエンザにおける粘膜免疫増強作用と再感染抑制機序 呼吸器内科 2013; 24(4): 384-391.
- (22) 木本貴士、水野大、堺聡子、木戸博 肺サーファクタント由来人工合成粘膜アジュバント SF-10 の感染防御効果と液性・

細胞性免疫誘導効果の検討 日本肺サーファクタント・界面医学会誌 2013; 44: 59-61.

(23) 木戸博 アジュバント、予防接種 Q & A 小児内科 2013; 45: 60-64.

(24) 木戸博、高橋悦久、堺聡子 ウイルス性気道感染症における粘膜免疫の重要性 感染と抗菌薬 2013; 16(4): 361-367.

(25) 木戸博、高橋悦久、山根一彦 インフルエンザの生体防御 感染症内科 2013; 1(6): 544-551.

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)

(3) Indalao IL, Takahashi E, Kido H. Studies on the differences in host cellular responses by different influenza virus strains and subtypes. 第 54 回日本生化学会中国・四国支部例会。平成 25 年 5 月 31 日—6 月 1 日 (徳島大学)

(4) 高橋悦久、片岡宏介、Indalao IL、木戸博 インフルエンザ感染時のタミフル服用により低下した気道粘膜 IgA はクラリスロマイシンと併用することによって改善される。第 54 回日本生化学会中国・四国支部例会。

平成 25 年 5 月 31 日—6 月 1 日 (徳島大学)

(5) 木戸博 肺サーファクタントの新たな医学応用の可能性—粘膜アジュバントへの応用とワクチン開発— 第 12 回肺サーファクタント分子病態研究会 平成 25 年 6 月 22 日 (札幌医科大学)

(6) 木戸博。粘膜アジュバントとしてのクラリスロマイシンの臨床評価の検討。第 20 回マクロライド新作用研究会 平成 25 年 7 月 19 日 (家の光会館コンベンションホール)

(7) Indalao IL, Kido H. Activation of trypsin and interferon regulation factor contributes to different disease severity during infection of influenza A virus with different pathogenicity. 第 18 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 平成 25 年 8 月 16—17 日

(8) 山根一彦、山本善一、埴雅明、木戸博。インフルエンザ感染による重症化と多臓器不全の代謝改善を基盤とした新たな治療ターゲットと標的とその治療法の開発: diisopropylamine dichloroacetate (DADA) による energy crisis の回避 第 86 回日本生化学会大会。平成 25 年 9 月 11—13 日 (パシフィコ横浜)

(9) 高橋悦久、片岡宏介、Indalao IL、堺聡子、木戸博。インフルエンザ感染時においてタミフルとクラリスロマイシンの併用で気道粘膜での抗インフルエンザ特異 IgA 抗体の増強が認められた。第 86 回日本生化学会大会。平成 25 年 9 月 11—13 日 (パシフィコ横浜)

(10) Kido H. Critical illness and energy metabolism—Blood lactate/ATP ratio as a real-time alarm index. The 7th Asian Conference on Emergency Medicine. 平成 25 年 10 月 25 日 (東京国際フォーラム)

(11) 木戸博 新規リアルタイム重症度診断バ

- イオマーカー、血液の乳酸/ATP比 第60回
日本臨床検査医学会学術集会。平成25年10
月31-11月3日(福岡国際会議場)
- (12) 山根一彦、日吉峰麗、荒木光、榎本奈緒子、
山本善一、埴雅明、木戸博。インフルエンザ感
染による重症化と多臓器不全の新たな治療標
的とその治療法の開発：diisopropylamine
dichloroacetate (DADA)による糖代謝改善を基
盤とした energy crisis の回避。第85回日本生
化学会大会。平成24年12月14-16日(福岡国
際会議場)
- (13) 荒木光、日吉峰麗、山根一彦、榎本奈緒子、
木戸博。I型糖尿病におけるインフルエンザ感
染重症化の解析。第85回日本生化学会大会。
平成24年12月14-16日(福岡国際会議場)
- (14) 高橋悦久、奥村裕司、Irene Lorinda Indalao、
木葉敬子、木戸博。II型膜結合型セリンプロテ
アーゼのMSPL/TMPRSS13のノックアウト
マウスは高病原性鳥インフルエンザウイルスの
増殖を抑制する。第85回日本生化学会大会。
平成24年12月14-16日(福岡国際会議場)
- (15) 木葉敬子、高橋悦久、片岡宏介、Irene
Lorinda Indalao、木戸博。インフルエンザ感染
時のタミフル服用により低下した気道粘膜 IgA
はクラリスロマイシンと併用することによって改
善される。第85回日本生化学会大会。平成24
年12月14-16日(福岡国際会議場)
- (16) Irene Lorinda Indalao, Etsuhisa
Takahashi, Keiko Konoha, Hiroshi Kido.
Studies on the differences in the host
cellular responses by different influenza
virus strains and subtypes. 第85回日本生
化学会大会。平成24年12月14-16日(福岡
国際会議場)
- (17) 日吉峰麗、矢野仁康、木戸博。ヒト内皮細胞
に感染したインフルエンザウイルスは、アドヘレ
ンスジャンクソンの崩壊を誘導する。第85回日
本生化学会大会。平成24年12月14-16日
(福岡国際会議場)
- (18) 小野寺睦雄、中瀧恵実子、千田淳司、今
中秀光、木戸博、西村匡司。ICU入室患者に
おける抹消血アデノシン三リン酸(ATP)と
転帰との関係。本集中医治療医学会総会。平
成24年2月28-3月1日(千葉幕張メッセ)
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含
む)
- (1) PCT/JP2013/007649、出願日2013年12
月26日、発明者：木戸博、山根一彦、
他、PDK4阻害剤及びその利用
- (2) 特願2013-174874、出願日2013年8月
26日、発明者：木戸博、石田晃彦、他、
血液検体のATP測定方法及びキット
- (3) 特願2013/24953、出願日2013年7月14
日、発明者：木戸博、田中徹、他、イン
フルエンザウイルス感染症の予防・治療
剤
- (4) 台湾出願102121622、出願日2013年6
月18日、発明者：木戸博、田中徹、他、
インフルエンザウイルス感染症の予
防・治療剤
- (5) PCT/JP2013/003486、出願日2013年6
月3日、発明者：木戸博、田中徹、他、
インフルエンザウイルス感染症の予
防・治療剤
- (6) PCT/JP2013/002500、出願日2013年4
月12日、発明者：木戸博、大村智、他、
PDK4阻害剤及びその利用

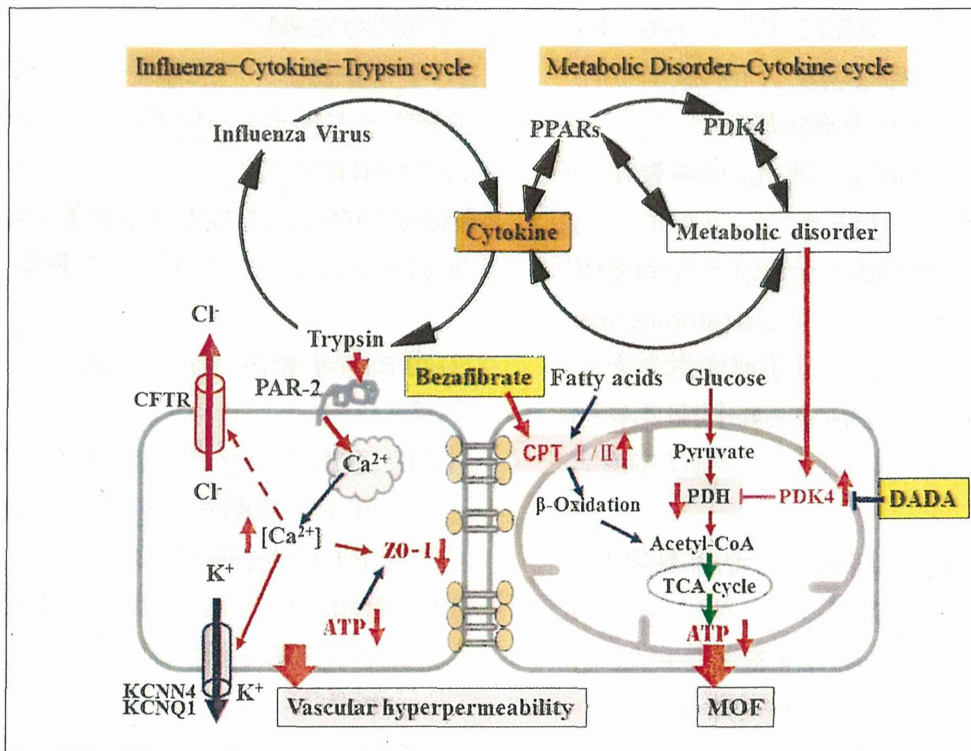


図1. 感染重症化のカスケードを構成する“インフルエンザ-サイトカイン-プロテアーゼ”サイクルにカップルした“サイトカイン-代謝不全サイクル”、このサイクルとリンクする細胞機能障害

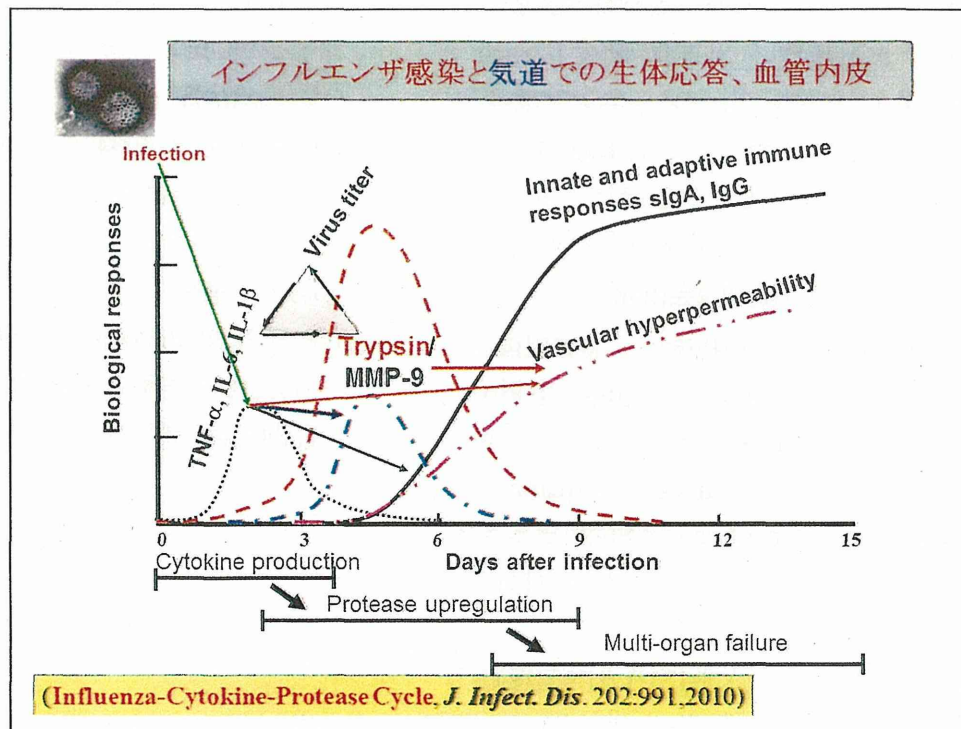


図2. インフルエンザ感染で誘発される気道の応答

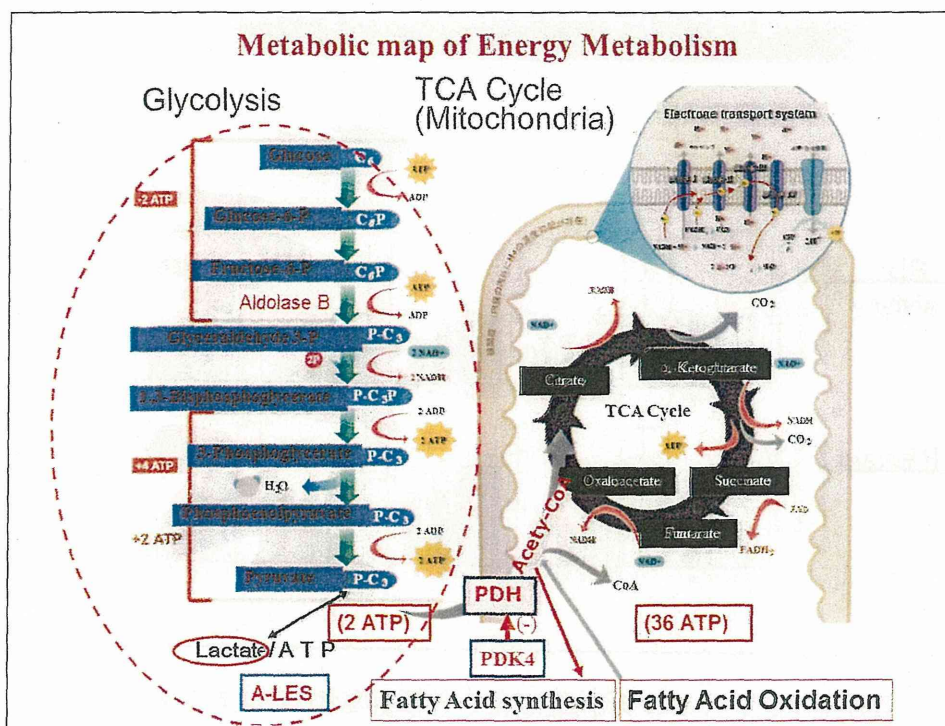


図3. エネルギー産生系と PDH、PDK4

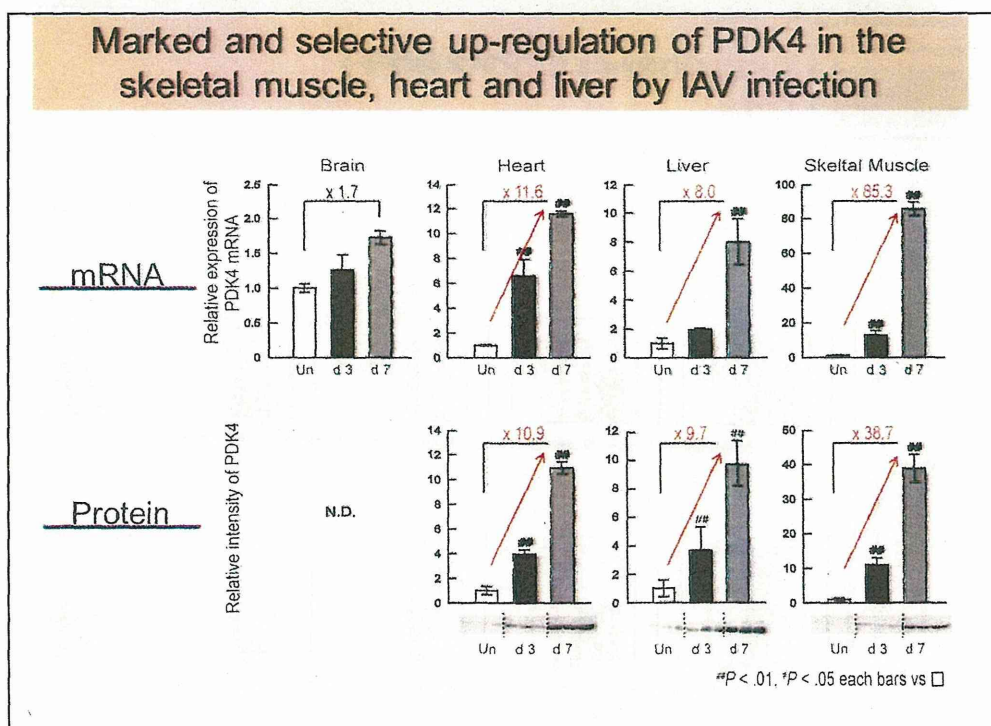


図4. インフルエンザ感染に伴う各種臓器の PDK4 の誘導効果

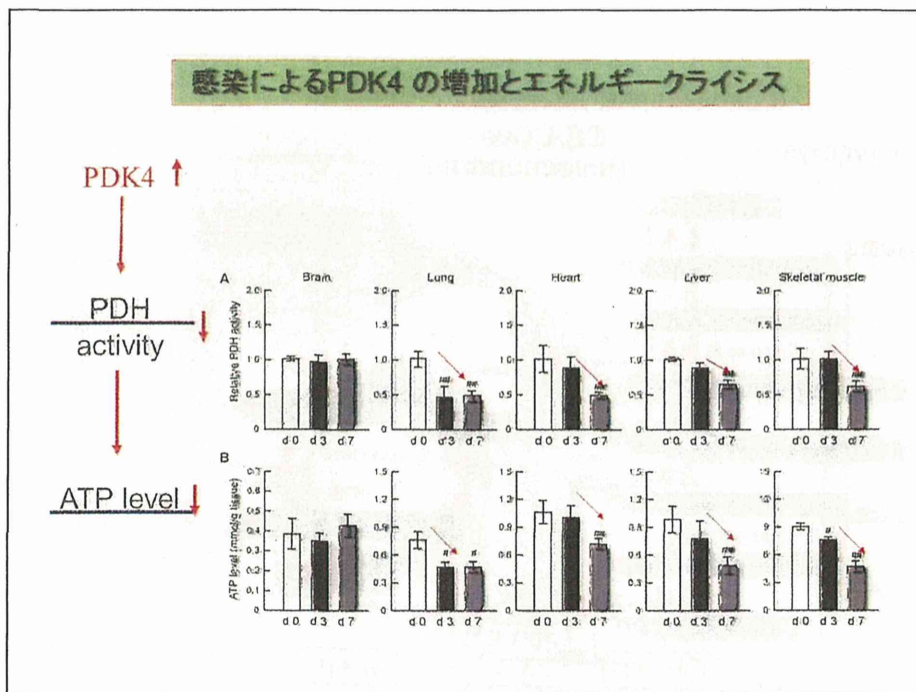


図5. インフルエンザ感染による各種臓器のPDK4の誘導

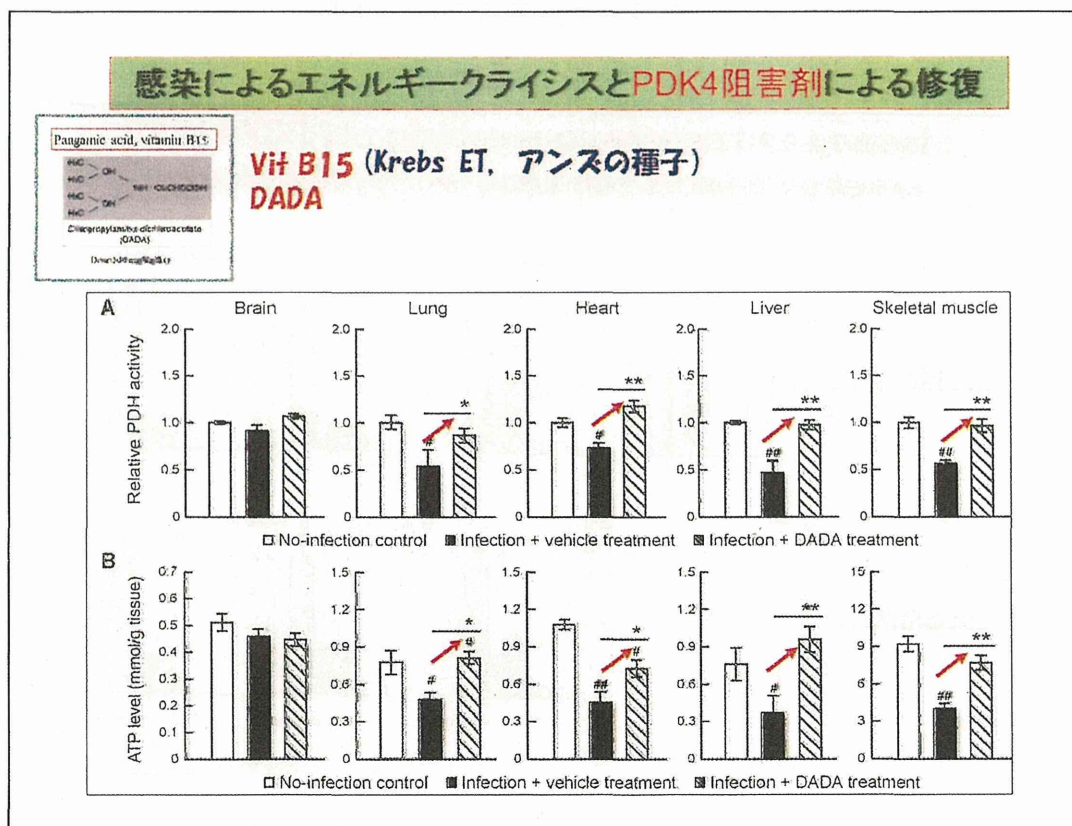


図6. PDK4阻害剤のDADAによる各種臓器のPDH活性とATPレベルの回復

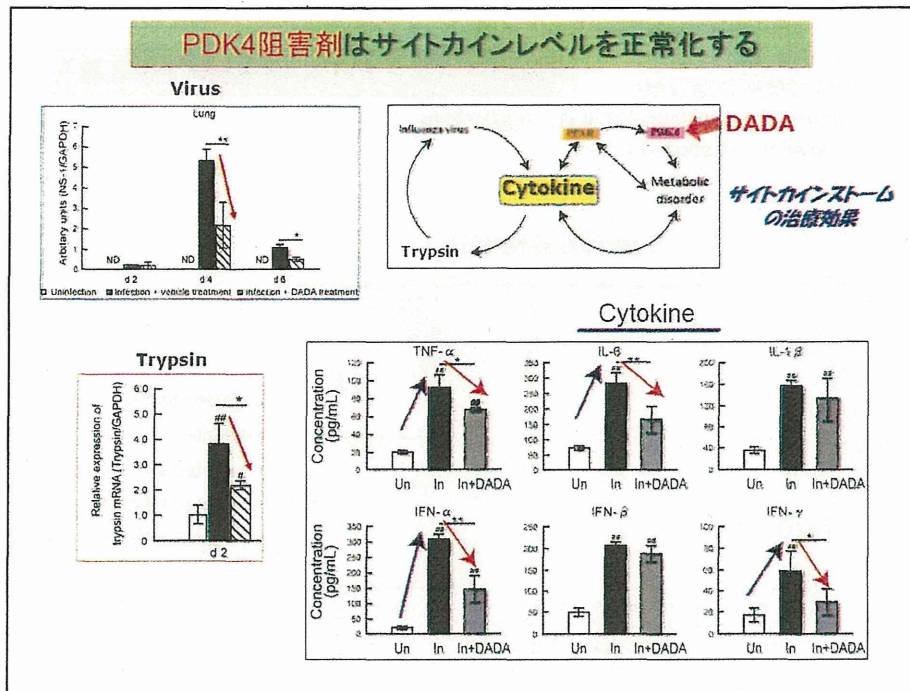


図 7. PDK4 阻害剤の“インフルエンザ-サイトカイン-プロテアーゼ”サイクルに与える影響

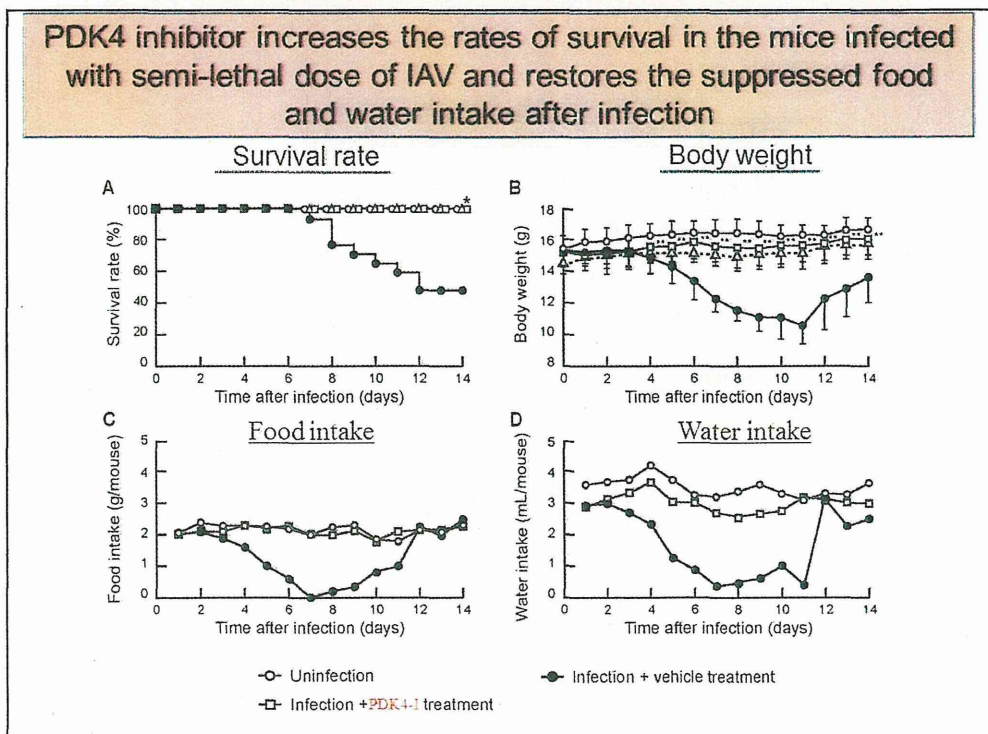


図 8. DADA によるインフルエンザ感染マウス生存率への改善効果

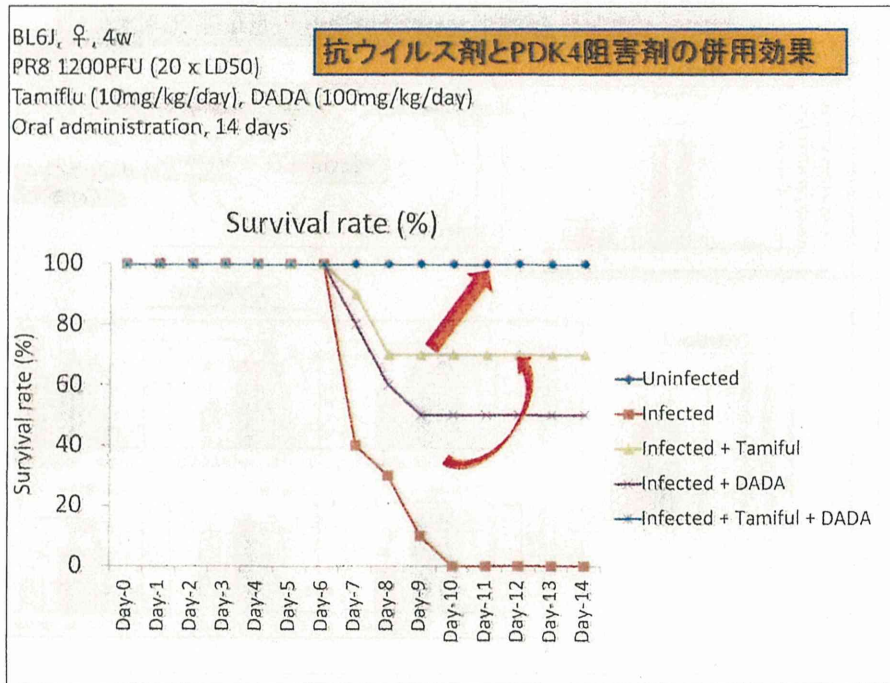


図 9. 20 × LD50=1200 pfu の高濃度インフルエンザ感染に対する抗インフルエンザ薬 Tamiflu と糖代謝改善薬 DADA の単独効果と併用効果

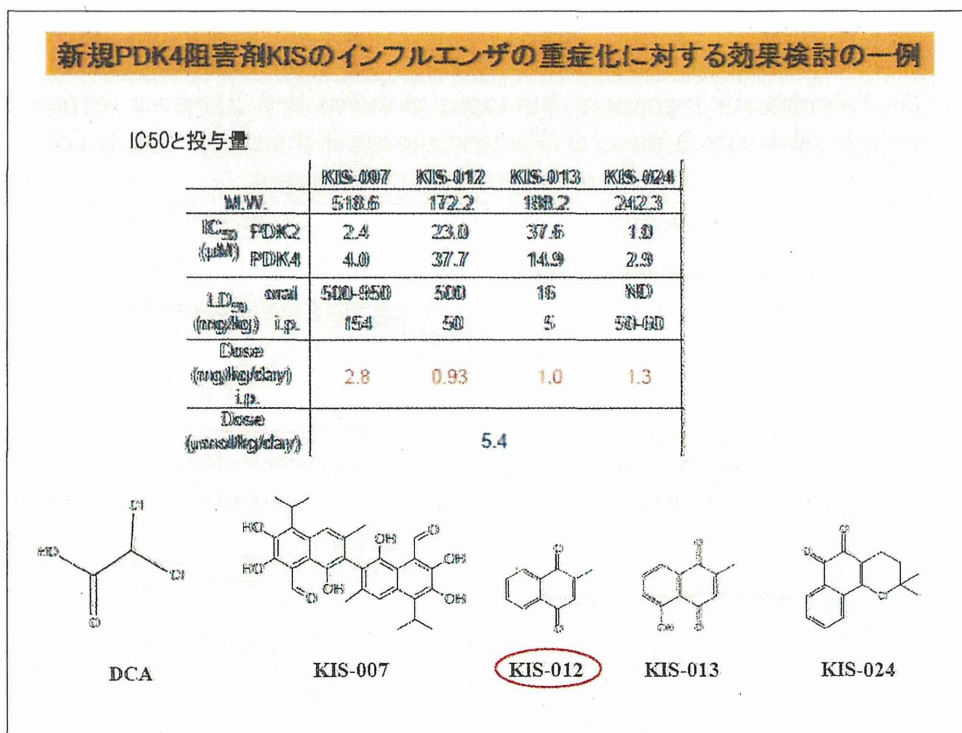


図 10. PDK4 の活性中心立体構造に結合可能な新規 PDK4 阻害剤開発のためのリード化合物

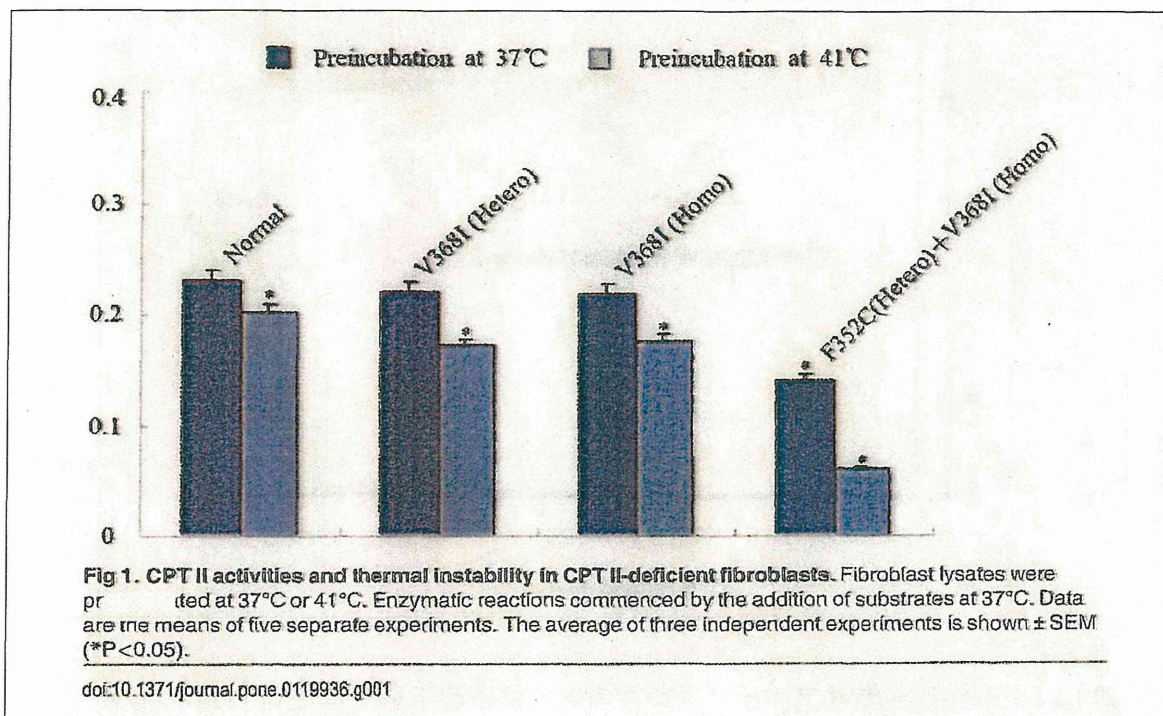


図 11. 中国のインフルエンザ脳症患者に検出された熱不安定性 CPT II SNP とその熱不安定性

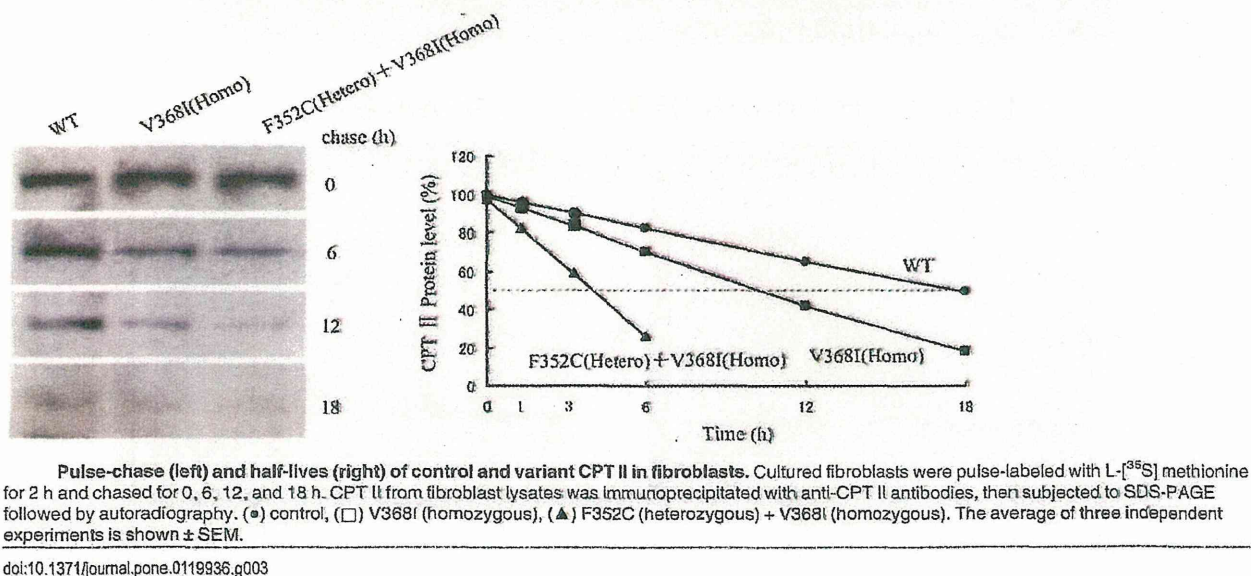


図 12. WT、中国脳症患者ファイブロブラストにおける熱不安定性 CPT II SNP の Half-life

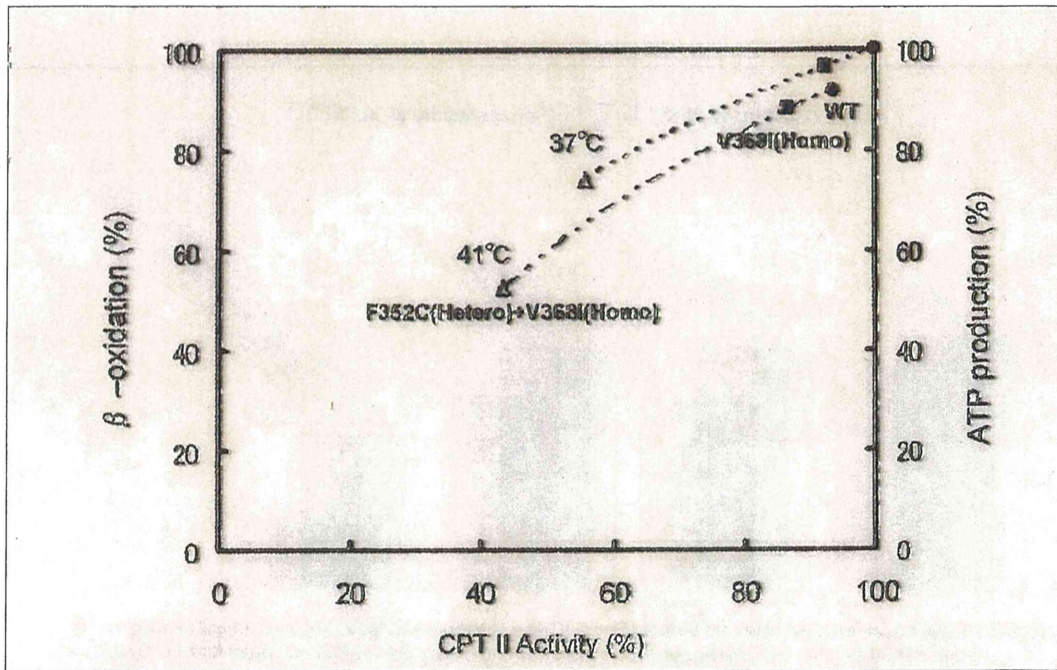


図 13. WT、中国脳症患者ファイibroblastにおける熱不安定性 CPT II SNP とミトコンドリア内のβ-酸化と ATP 産生量

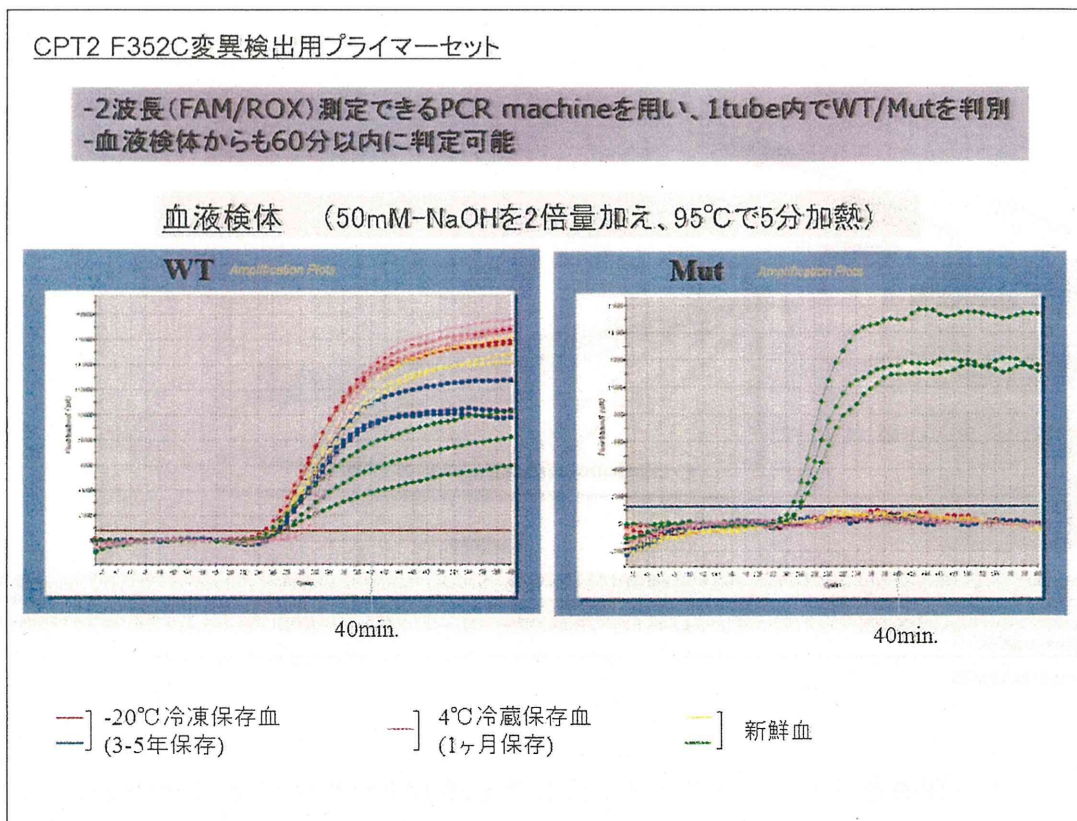


図 14. SMART AMP を用いた熱不安定性 CPT II SNP の迅速診断システム

(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

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

インフルエンザウイルス (IFV) 感染の成立、重症化の機序には、ウイルス側、宿主側の因子が複雑に関与し、多様性が示されている。まず、重症化の早期診断マーカー、SOS シグナルとしての Flu Alarmin の候補を絞り込み、治療標的となりうる分子を推定した。また、ウイルスの感染成立、及び重症化に関わ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

A 型インフルエンザウイルス (IAV) 初期感染、及びその後の感染拡大の防止に宿主細胞のインターフェロン・シグナル伝達経路が重要な役割を果たしているが、この中心にある分子が IRFs (Interferon regulatory factors) である。我々は IRF2-KO (knock-out) マウスの解析から IRF2 がトリプシノーゲン遺伝子発現、及び細胞内輸送、分泌にかかわることを明らかにしたが、宿主細胞のトリプシン活性は IAV 感染、及びその重症化において重要な働きをしている。そのため、特に IRFs とトリプシン活性化が、IAV の感染成立・拡大、あるいは感染防御にどのように関わるか検討し、重症化の早期診断マーカー、SOS シグナルとしての Flu Alarmin を同定し、適切な治療につなげることを目的とする。

その過程で、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げることも本研究の目的である。

B. 研究方法

1) IAV 感染の主たる標的細胞である肺胞細胞由来の培養細胞株、A549 細胞と H292 細胞は IAV 感染後のウイルス増殖に関して際立った相違が報告されている。A549 細胞ではウイルスが増殖を続けるが、H292 細胞では最初増殖

したウイルスが時間経過に伴いより速やかに排除される。ウイルスの排除に関する宿主側の反応の違いによると考えられ、その原因分子を特定することは、重症化の早期診断マーカー、SOS シグナルとしての Flu Alarmin を同定することにつながると考えられた。そのため、インターフェロン(IFN)シグナル伝達遺伝子、IFN 誘導遺伝子群(ISGs)、Toll-like receptor シグナル伝達遺伝子、トリプシノーゲン関連遺伝子、炎症性サイトカイン・ケモカイン類、約 100 種類の遺伝子をクローニング(表 1)して、Real-time PCR 法で各遺伝子の発現量を定量した。

2) ヒトのいろいろな培養細胞での I[~]IV 型トリプシノーゲン(PRSS1、PRSS2、PRSS3-v2、PRSS3-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(ヘマグルチニン)を切断活性化することが知られている HAT、TMPRSS2、TMPRSS4 の調べるため、それらの cDNAs をクローニングした。

3) これらの培養細胞に 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。さらに 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、EK-v2)、及び細胞膜貫通型セリンプロテアーゼ(HAT、TMPRSS2、TMPRSS4)の発現量も Real-time PCR、及びウェスタンブロットで検討した。

4) 293T 細胞に、EK-v1、EK-v2、PRSS3-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。

5) *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。

6) *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(TPCKT)、あるいは N 末端-アセチル化トリプシン(NAT)と同様に IAV-HA のプロセッシングを行うか調べた。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。

(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) 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) 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)。

3) 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 6)。また、PRSS1 及び PRSS3 も多くの細胞に発現がみられた(図 7)。

4) EK-v1、EK-v2、PRSS3-v2 を強制発現させた 293T 安定細胞株(図 8)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 9)。

5) 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 を活性化できなかつた(図 10、11)。

6) *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 12)。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つたが、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(図 13)。

8) 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 14)。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 の反応が弱かつた(図 15)。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つた(図 16)。

iii) IAV 感染の際には、図 17 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18)。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。

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が第一候補と考えられた。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18)。

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13)。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9)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

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、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).
4. 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.
 5. 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
 6. 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.
 7. 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
- (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)
 2. Hayashi H, Identification of poly(I:C)-induce pancreatitis-related genes in IRF2-deficient mice, 3rd International conference on "Current advances in Microbiology and Immunology" June 21-22, 2012 (ULAANBAATAR, MONGOLIA)
 3. 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)
 4. 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)
 5. 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

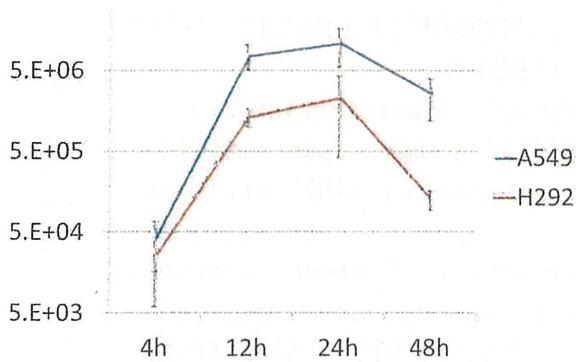


図 2. A549 細胞と H292 細胞の両方で、顕著な発現の上昇がみられた分子の例

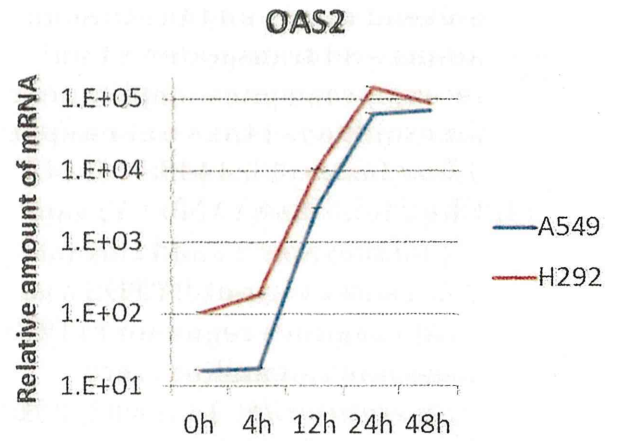


図 3. IAV 感染感受性 A549 細胞で、顕著な発現の上昇がみられた分子の例

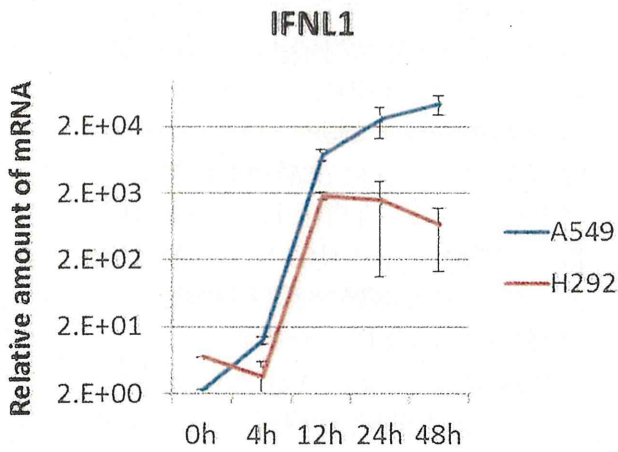


図 4. IAV 感染抵抗性 H292 細胞で、より顕著な発現の上昇がみられた分子

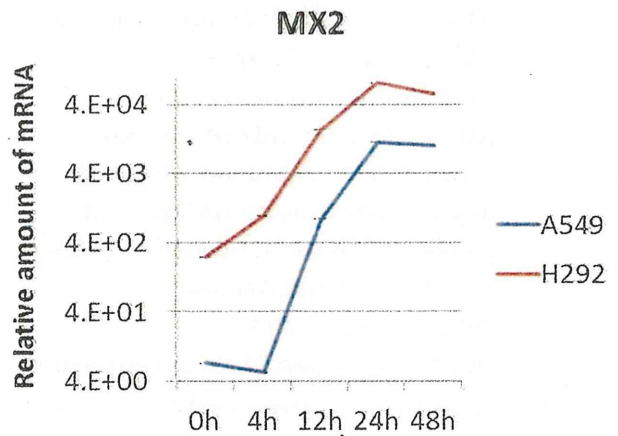


図5. EK(エンテロキナーゼ)遺伝子の構造

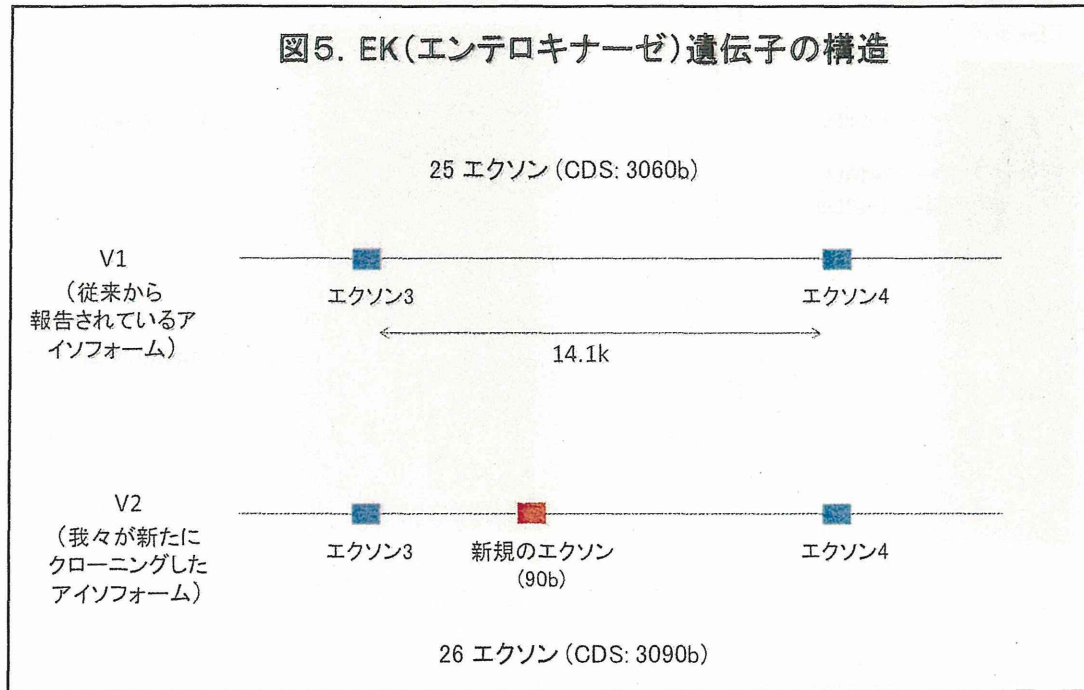


図6. 各種培養細胞における膜貫通型セリンプロテアーゼの発現
-mRNA (PCR)-

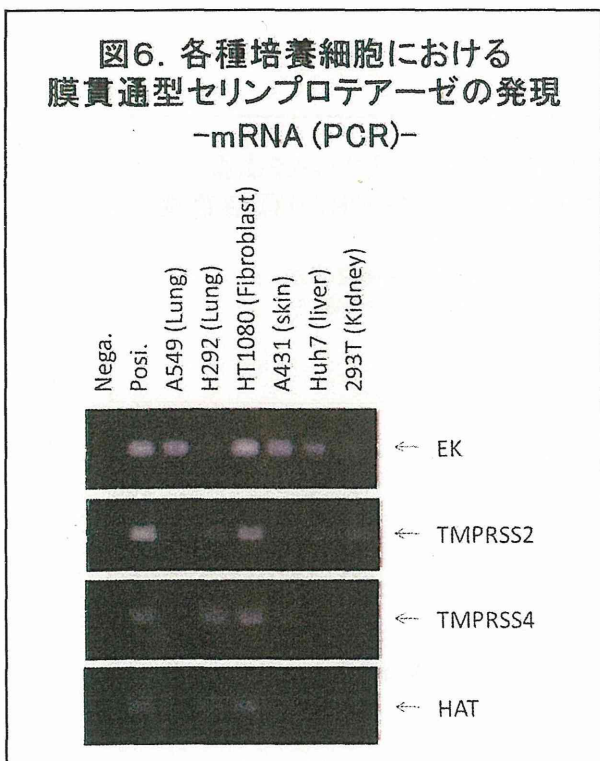


図7. 各種培養細胞におけるトリプシノーゲン遺伝子(PRSSs)の発現
-mRNA (PCR)-

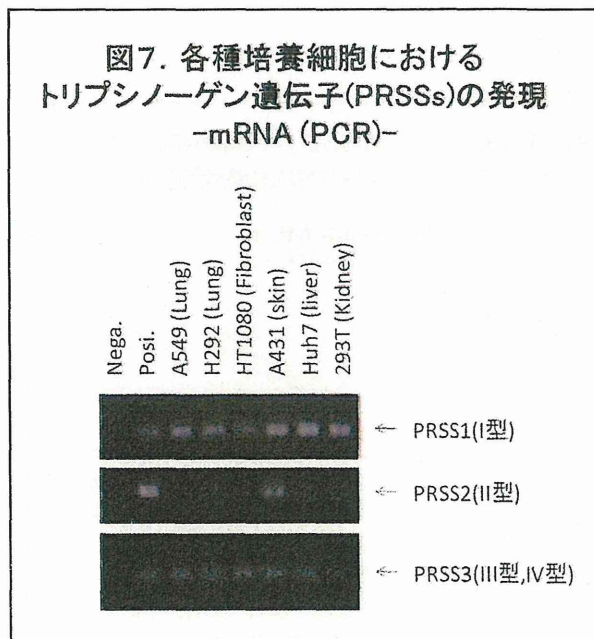


図8. EK-v1、EK-v2を強制発現させた293T細胞

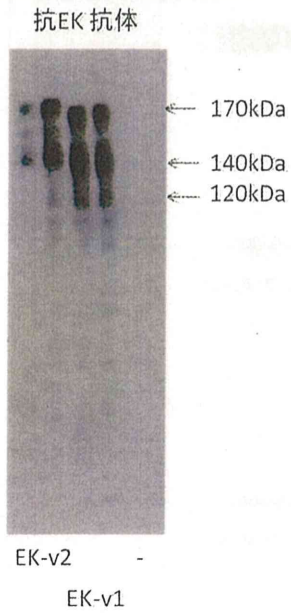


図9. EK-v1、EK-v2及びPRSS3を強制発現させた293T細胞におけるIAV-HAのプロセッシング

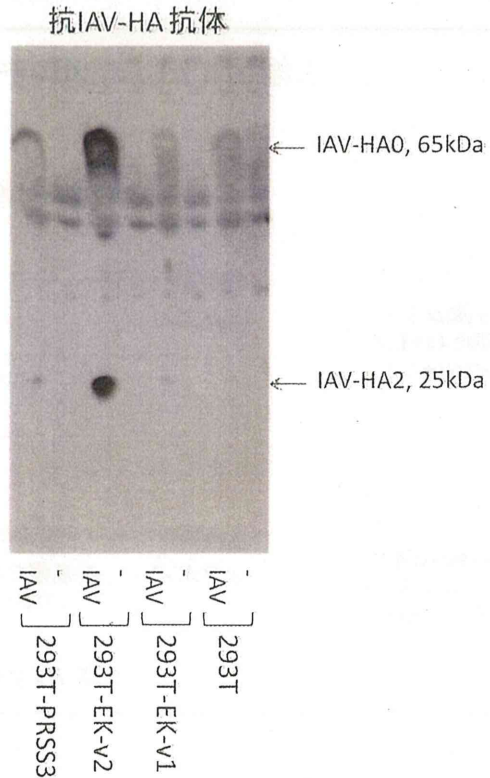


図10. EK-v1、TMPRSS2、TMPRSS4によるトリプシノーゲン (PRSS3) の活性化

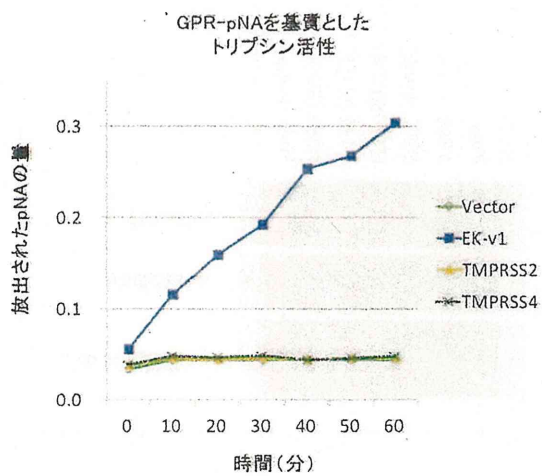


図11. EK-v1、EK-v2によるトリプシノーゲン (PRSS3) の活性化

