

図12. *in vitro* でのIAV-HA プロセッシング

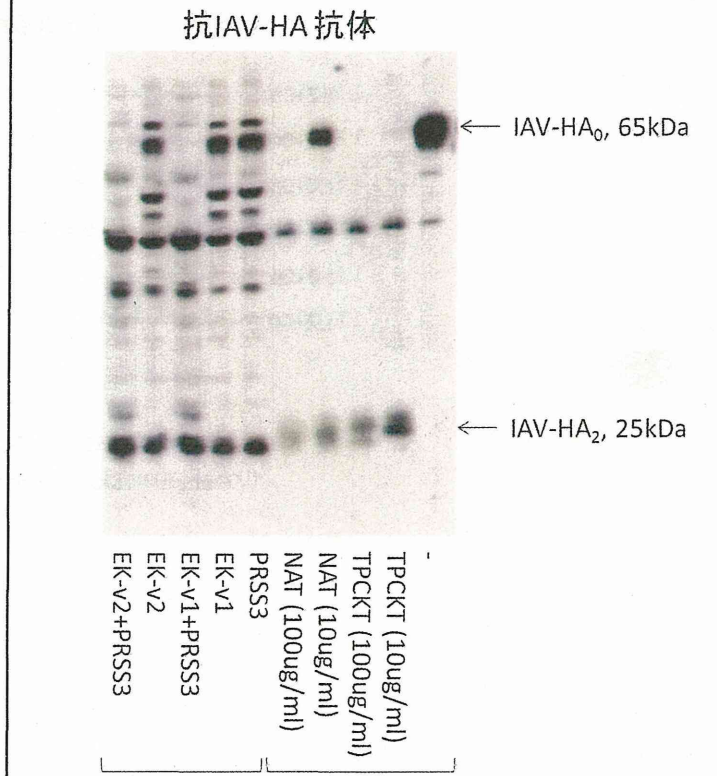


図13. トリプシノーゲン遺伝子 (PRSSs) 及び エンテロキナーゼ遺伝子 (EK) を介したIAV感染促進の機序

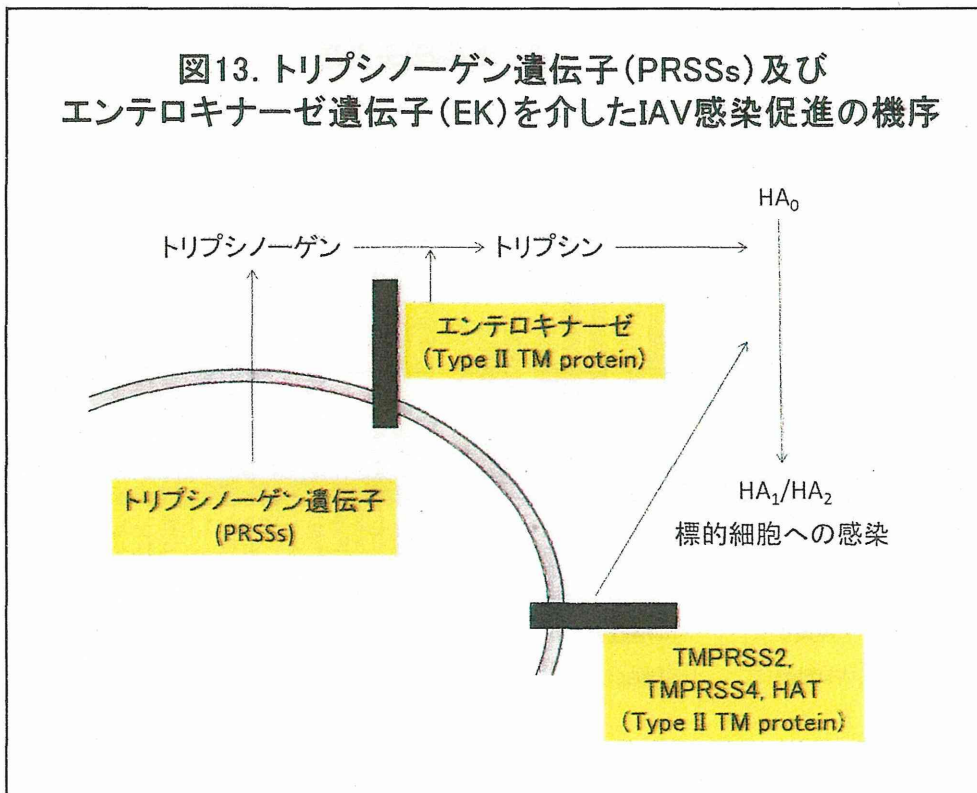


図 14. 各培養細胞に IAV を感染させ、24

時間後に抗 IAV-HA 抗体を用いてウイルス

の増殖を調べた。



フェクトして RIG-I を活性化 16 時間後の IFN $\beta$  の発現を Real-time PCR で調べた。

### IFN $\beta$ 遺伝子発現

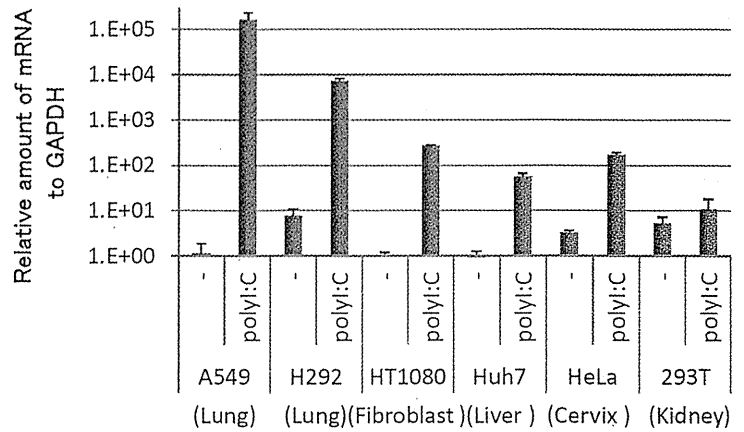


図 15. 各培養細胞に polyI:C をトランス

図 16. 各培養細胞を IFN $\alpha$  刺激、あるいは polyI:C トランスフェクトして RIG-I を活性化し、16 時間後に、ISGs の一つである IFIT1 の発現を Real-time PCR で調べた。

### IFIT1 遺伝子発現

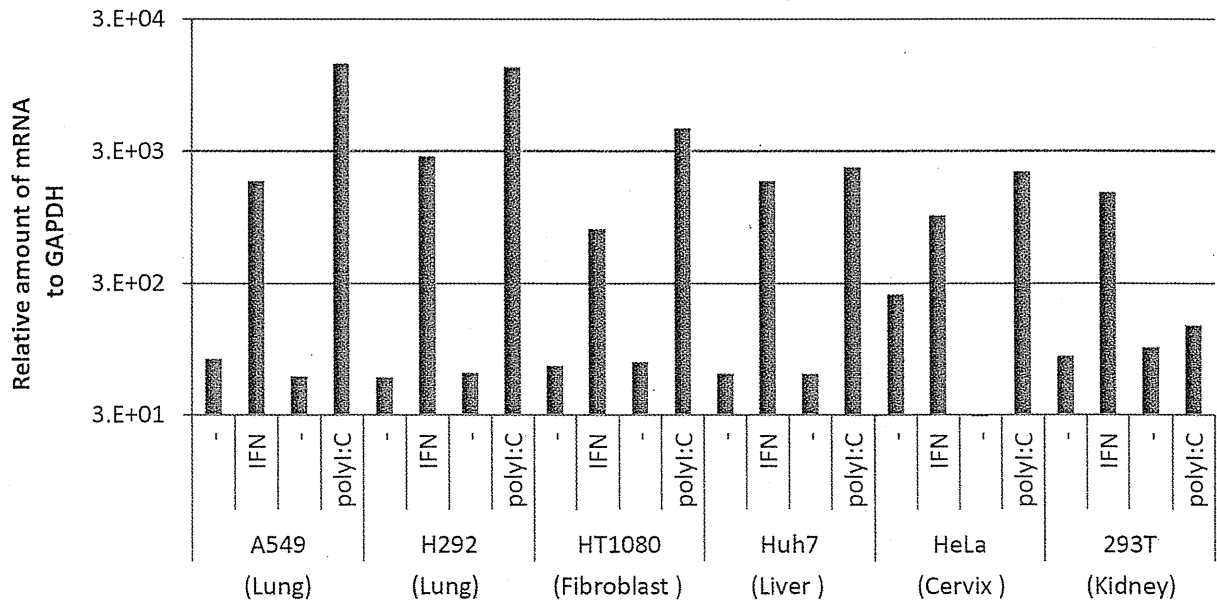


図 17.

### IAV感染とストレス顆粒(SG)

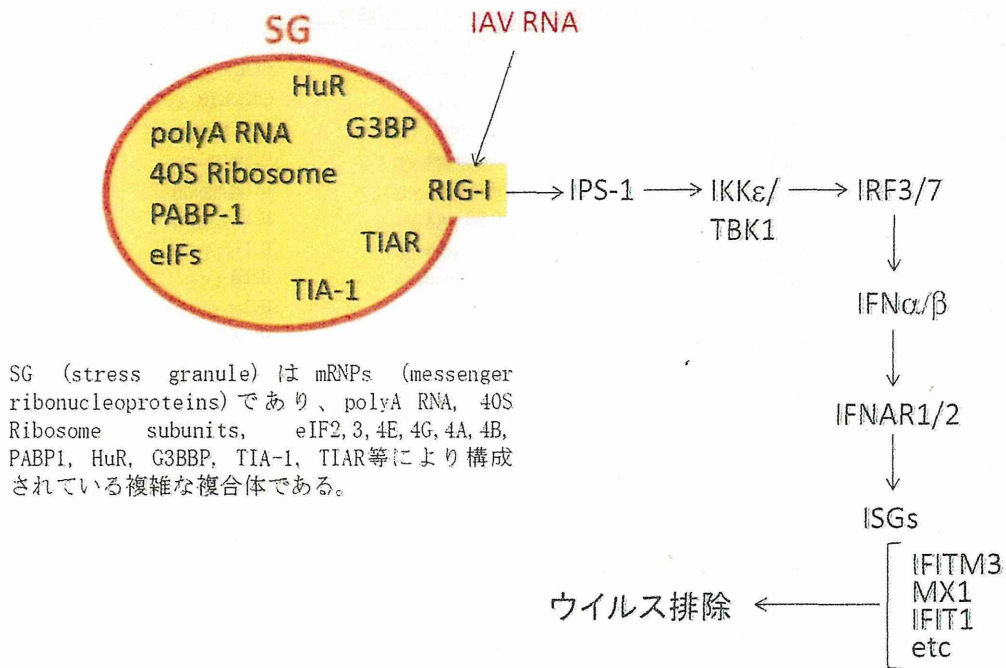


図 18. 293T 細胞にいろいろなインターフェロン・シグナル伝達分子を強制発現させた後、IAV を感染させ、抗 IAV-HA 抗体を用いてウイルスの増殖を調べた。

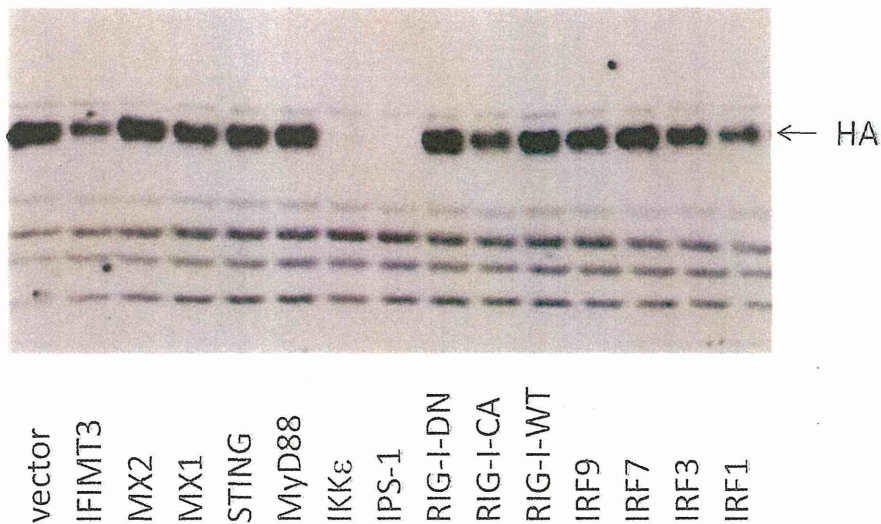


表1. ヒト・インターフェロン(IFN)、サイトカイン・シグナル伝達関連遺伝子

IFNシグナル伝達遺伝子	IFN誘導遺伝子群(ISGs)	Toll-like receptor関連遺伝子	トリプシン関連遺伝子	サイトカイン・ケモカイン類
CARDIF(IPS-1,MAVS)	ADAR1(G1P1)	ASC	ChymotrypsinC	CCL2
IFNA21(Alpha)	AHSG	FADD	Enterokinase	CCL5
IFNA6	AIM2	IkBA	PRSS1	CXCL10
IFNAR1 (Receptor)	ANXA10	IkBB	PRSS2	CXCL13
IFNB (Beta)	APOBEC3G	IKKA	PRSS3-v1	IL10
IFNG(Gamma)	CASP1	IKKB	PRSS3-v2	IL12p40
IFNGR1 (Receptor)	CASP2	IKKe	PRSS3-v3	IL17B
IFNL1(Lambda)	DR4	IRAK1	PRSS3-v4	IL17F
IFNL2	DR5	IRAK4	TMPRSS2	IL1B
IFNL3	FETUB	IRAKM		IL2
IRF1	GBP1	NALP1		IL33
IRF2	GBP2	NALP3		IL4
IRF3	IFIT1	NEMO		IL6
IRF5	IFIT2	p50		IL8(CXCL8)
IRF7	IFIT3	p65		IL9
IRF9	IFIT5	TLR2		TGFB
MDA5	IFITM1	TLR3		TNFA
MYD88	IFITM2	TLR4		
RIG-I	IFITM3	TLR7		
STAT1	ISG15(G1P2)	TLR9		
TBK1	MX1	TRADD		
TRIF	MX2	TRAF2		
	OAS1	TRAF6		
	OAS2			
	OASL			
	PKR			
	PYHIN1			
	REG3G			
	RNaseL			
	STING			
	TSPAN1			

### (資料 3)

#### 感染重症化とプロテアーゼ：高病原性鳥インフルエンザウイルスの HA 解列酵素 MSPL の作用と、インフルエンザ感染重症化の発症機序についての研究

研究分担者 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 特任助教)

研究協力者 Irene Lorinda Indalao (徳島大学疾患酵素学研究センター 大学院生)

#### 研究要旨

我々はインフルエンザ感染における重症化は血管内皮と各臓器で誘発される“インフルエンザ—サイトカイン—プロテアーゼ”サイクルが主要原因で、このサイクルを介する血管内皮細胞障害が多臓器不全の根底にあることを明らかとしてきた。(1) MSPL は、II 型の膜結合型セリンプロテアーゼとしては初めて連続した塩基性アミノ酸を基質として認識し、特異的に加水分解する唯一の酵素であった。また、全身臓器での発現解析から MSPL がヒトと鳥に広く分布することが明らかとなったことから高病原性鳥インフルエンザ (HPAI) ウイルス HA の解列に関与することが示唆された。HPAI ウイルスは HA の切断部位配列として  $R-X-K/R-R$  と  $K-K/R-K/T-R$  (P4 位に R 又は K) の 2 型を持つことより、A/crow/Kyoto/53/2004 をもとにリバーシジェネティクス法を用いて 2 種類の切断部位配列を持つ HPAI ウイルス株を作成した。この変異株を用いて、ウイルスの増殖性を蛍光染色で見ると、MSPL が発現していない細胞株では増殖性が低いことが明らかとなった。この結果より、MSPL は全てのタイプの高病原性鳥インフルエンザウイルス HA の解列に関与することが示唆された。更に MSPL-KO マウスに解列部位の異なる 2 型の HPAI を感染させて感染 3 日後と 6 日後の肺を HE 染色した結果、P4 位を K に置換したウイルスをノックアウトマウスに感染させたときの炎症が軽度であることが明らかとなった。肺ホモジネート中の IL-1 $\beta$ 、INF- $\gamma$  の減少が確認された。これらの結果より MSPL の特異的阻害剤を用いることで高病原性鳥インフルエンザの重症化が阻止できると考えられる。(2) インフルエンザ感染により発現が上昇するプロテアーゼとして MMP-9 が確認されている。一方、クラリスロマイシン (CAM) が MMP-9 の発現を抑制することが知られていることからインフルエンザ感染マウスに CAM を経口投与して MMP-9 の発現の変化を調べた。ゼラチンザイモグラフィとウエスタンブロッティングで確認した結果、MMP-9 の発現が低下することが明らかとなった。また、インフルエンザウイルスの活性化酵素であるトリプシンとともに MMP-9 の発現調節に関与している NF- $\kappa$ B の発現が感染 6 日目の肺において低下することが明らかとなった。更に、肺の HE 染色で炎症が軽減したことが確認された。(3) インフルエンザ感染重症化は血管透過性の亢進による多臓器不全が原因であり、

高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染でも同様であると考えられる。我々は、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) にインフルエンザウイルス/Puerto Rico/8/34 (PR8) (H1N1) を感染させて透過性亢進のメカニズムを調べた。血管内皮においてカドヘリンと  $\beta$  カテニンのレベルは細胞接着複合体を形成するための重要な分子であるが、インフルエンザ感染後にタンパクレベルで  $\beta$  カテニンの発現が減少することが明らかとなった。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と  $\beta$  カテニンの分解が抑制されたことから、プロテアソームによる分解の開始段階での GSK-3 $\beta$  が示唆された。HUVEC において GSK-3 $\beta$  をノックダウンしたときの  $\beta$  カテニンの抑制の効果を調べた結果、インフルエンザ感染によって誘発される  $\beta$  カテニンの分解は、GSK-3 $\beta$ -ノックダウン細胞で有意に抑制された。マウスをモデルとした動物実験においても同様で、インフルエンザ感染後 0 日目から 6 日目の肺を経時的に調べたところ  $\beta$  カテニンの分解と GSK-3 $\beta$  の活性化が確認された。これらの知見から、アドヘレンスジャンクションにおいて GSK-3 $\beta$  を介した  $\beta$  カテニン分解がインフルエンザ重症化を引き起こす血管透過性亢進の重要な機構の 1 つであることが示唆された。

#### A. 研究目的

インフルエンザ脳症、多臓器不全の病態解析から、重症化は血管内皮と各臓器で誘発される“インフルエンザサイトカイン-プロテアーゼ”サイクルが主要原因で、このサイクルを介する血管内皮細胞障害が多臓器不全の根底にあることを明らかにした (*J. Infect. Dis.* 202:991-1001, 2010、*Cardiovasc. Res.* 89:596-603, 2011)。また、インフルエンザ治療薬として使われているクラリスロマイシン (CAM) が免疫増強作用を有すること (*J. Virol.* 2012 Oct;86 (20): 10924-34) を報告してきた。本プロジェクトでは (1) 高病原性鳥インフルエンザの活性化酵素として見出された MSPL についての酵素学的性状解析と MSPL-KO (knock-out) マウスの解析から本酵素の阻害剤を用いた重症化の治療を検証する。 (2) インフルエンザ感染により誘発される心筋炎などの心機能低下に関与すると考えられる MMP-9 の発現を CAM 投与により抑制が

可能かどうかを調べることにより重症化阻止につなげる。 (3) インフルエンザ感染により血管内皮細胞の透過性が亢進するが、相互作用のメカニズムについては解明されていない。そこでアドヘレンスジャンクションにおける細胞間接着分子である VE カドヘリンと  $\beta$  カテニンについてインフルエンザ感染において重症化の発症機序について解明する。

#### B. 研究方法

(1) 高病原性鳥インフルエンザウイルスには大きく分けて Furin や PC が認識できる RKKR タイプと KKKR タイプの株が存在する。両方の株について活性化するか否かを調べるため、MSPL-KO マウスに、ヘマグルチニン (HA) の解列部位が異なる高病原性鳥インフルエンザウイルスをそれぞれ感染させて体重変化、致死率、組織の HE 染色像を確認した。また感染マウスから採取した肺ホモジネートを培養細胞

(MDCK)に添加することで増殖したウイルスを蛍光染色で確認した。

(2) マウスにインフルエンザウイルス(PR8)を感染させてCAMを経口で投与した。感染3日目と6日目の血液・肺・心臓を採取しMMP-9の発現をゼラチンザイモグラフィ、ウエスタンブロットティングにより評価した。更に、MMP-9に關与する転写因子であるNF-kappaBの発現についてもウエスタンブロットティングにて確認した。

(3) ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に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。細胞を回収し、VEカドヘリンと $\beta$ カテニンの発現をウエスタンブロットティングとRT-PCRにより確認した。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すると共に臓器を摘出し、細胞間接着分子の発現を確認した。

### C. 研究結果

(1) MSPL-KO マウスに高病原性鳥インフルエンザを感染させたとき、感染3日後と6日後の肺で増殖したウイルスはWTマウスにFurin認識タイプのRKKR株を感染させた時よりMSPL-KOマウスが有意に減少することが明らかとなった(図1)。またKKKR株でも同様にKOマウスにおいて感染細胞数の減少が認められた。この時採取した肺のHE染色像でも、ウイルスの増加と相関して炎症が広がっていることが確認された(図2)。更にMSPL-KOマウスでは炎症性のサイトカインであるIL-1beta、TNF-alpha、IFN-gamma、MIP-1-alphaが減少していることが明らかとなった(図3)。

(2) PR8を感染させてCAMを経口投与したマウスではコントロール群と比べてMMP-9の発現が低下することがゼ

ラチンザイモグラフィによる解析により明らかとなった(図4A)。この時、活性型への変換効率が低下していることが示された(図4B)。また、感染3日後の肺の気管近傍でメチルセルロース(MC)に比べてCAMを投与することで炎症が軽減されることをHE染色像で示す(図5)。エバンスブルーを静脈にインジェクションして肺組織への漏出を確認した結果CAM投与群で軽度であった。更に感染6日目の肺では転写因子NF-kappaBの発現低下も認められた(図6)。

(3) 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 $\beta$ カテニンとVEカドヘリンの発現をウエスタンブロットティングによって検出した結果、 $\beta$ 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(図7A)。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 $\beta$ カテニンの発現に有意な差は認められていない(図7B)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。感染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、 $\beta$ 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(図8)。これによりインフルエンザ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。

$\beta$ カテニンは、活性化したGSK-3 $\beta$ 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。感染したHUVECでは不活性型であるphospho-GSK-3 $\beta$ の発現が有意に低下(図9)したが、全体のGSK-3 $\beta$ の発現は有意差が認められなかった。更に、GSK-3 $\beta$ をノックダウンすると $\beta$ カテニンの発現が回復した(図

10)。アドヘレンスジャンクションにおいて VE カドヘリンと  $\beta$  カテニンの複合体形成には GSK-3 $\beta$  が関与し、制御していることが示唆された。

次に、マウスに PR8 を経鼻感染させて生体分子での比較を行った。体重変化では非感染コントロールと比べて3日目より減少が認められ、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(図 11-A)。また、肺における  $\beta$  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-3 $\beta$  の減少が認められた(図 11-B)。

#### D. 考察

(1) 高病原性鳥インフルエンザ感染において MSPL は RKKR、KKKR タイプの株共に HA 解列に大きく関与していることが明らかとなった。また、以前の結果から炭疽菌毒素の解列にも関与する可能性も考えられる。更に、最近世界的に問題となっているエボラウイルスも解列部位の配列が高病原性鳥インフルエンザウイルス HA と類似しており、MSPL の関与が示唆される。したがって MSPL の酵素学的性状を明らかにし、新たな阻害剤を探索することが高病原性鳥インフルエンザ感染及び新興感染症の治療に関しても有用であると考えられる。

(2) 季節性インフルエンザ感染で CAM の服用で MMP-9 の発現が低下することが確認できた。更に NF-kappaB の低下も認められていることから MMP-9 の活性化酵素であるトリプシンの発現低下も示唆される。インフルエンザ重症化により引き起こされる心筋炎の治療やインフルエンザ肺炎に関して CAM の有用性を検証する。

(3) 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  $\beta$  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。インフルエンザ感染により  $\beta$  カテニンの分解が亢進され、その制御に GSK-3 $\beta$  が関与することを証明した(図 12)。更に GSK-3 $\beta$  ノックダウンにより  $\beta$  カテニンの分解が抑制されたことから GSK-3 $\beta$  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。

#### E. 結論

MSPL が高病原性鳥インフルエンザウイルスの活性化酵素の一つであることが明らかとなり、本酵素の特異的な阻害剤の探索は高病原性鳥インフルエンザの世界的流行の阻止に役立つと考えられる。免疫増強効果のある CAM が MMP-9 の発現を抑制したことでインフルエンザ重症化に伴う肺炎や心筋炎の予防に対して有用であることが示唆された。更に、重症化発症機序の一つである血管透過性に関わる VE カドヘリン- $\beta$  カテニンを調節する GSK-3 $\beta$  は、新たな創薬ターゲットになり得ると考えられる。

#### G. 研究発表 (平成 25-26 年度) 論文発表

(1) 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*, 12;8(6), e66337, 2013



(2)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*, Vol.8(7), e70060, 2013

(3)Hiyoshi M, Indalao I.L, Yano M, Yamane K, Takahashi E, Kido H; Influenza A virus infection of vascular endothelial cells induces GSK-3b-mediated b-catenin degradation in adherens junctions, with a resultant increase in membrane permeability, *Archives of Virology*, 10.1007/s00705-014-2270-5. 2014.11

(4)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, *Journal of Vaccine & Immunotechnology* Vol.2, Issue 1, 2015

#### 学会発表

高橋悦久、片岡宏介、Irene Lorinda Indalao、堺 聡子、木戸 博; Airway mucosal IgA which reduced by oseltamivir is improved by combination with Clarithromycin in mice infected with influenza A virus、第86回日本生化学会大会

図 1 MDCK 細胞に感染させた肺ホモジネート中のウイルス

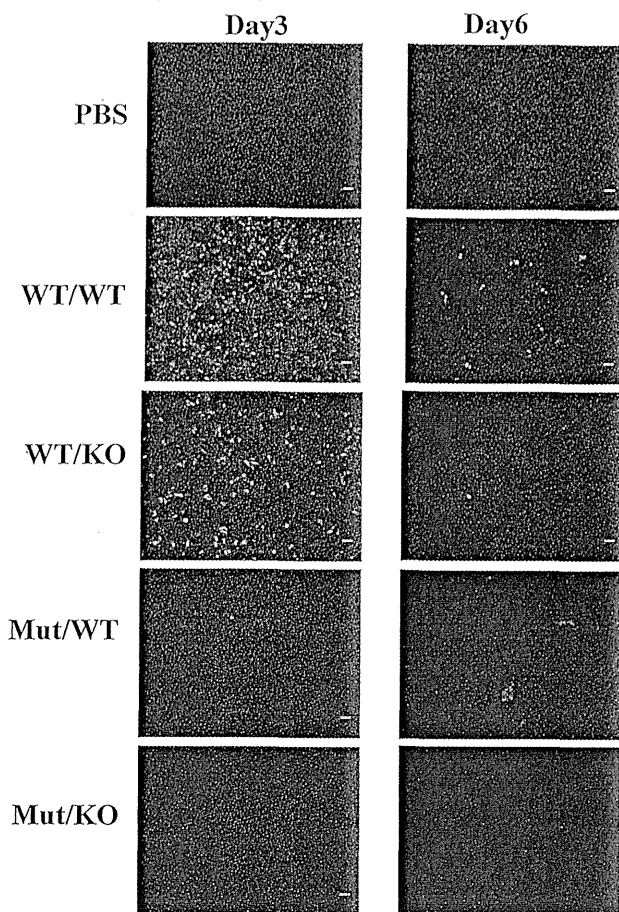


図 2 高病原性鳥インフルエンザウイルス感染マウスの肺の HE 染色像

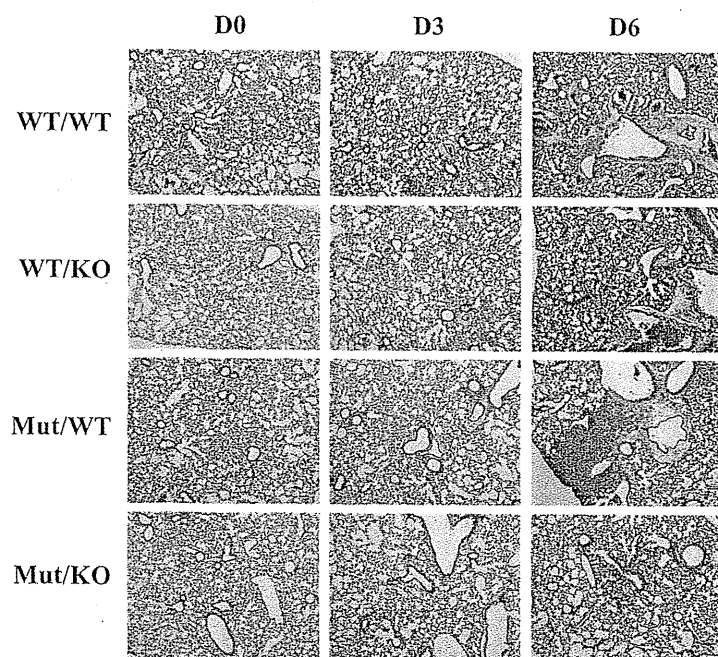


図3 高病原性鳥インフルエンザウイルス感染マウスの肺ホモジネート中サイトカイン

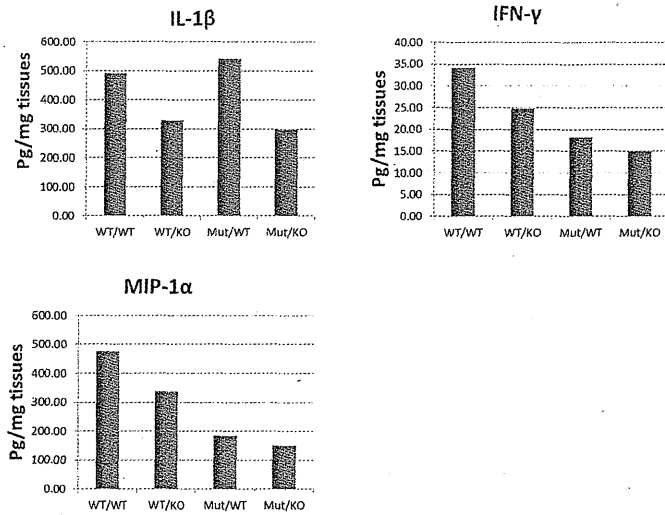


図4 CAM 投与による MMP-9 の発現変化

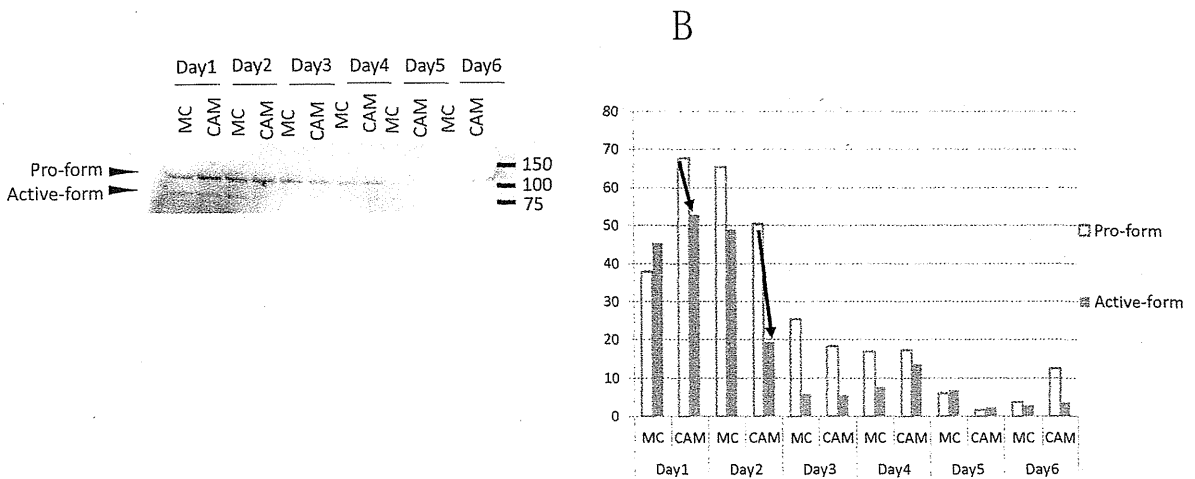
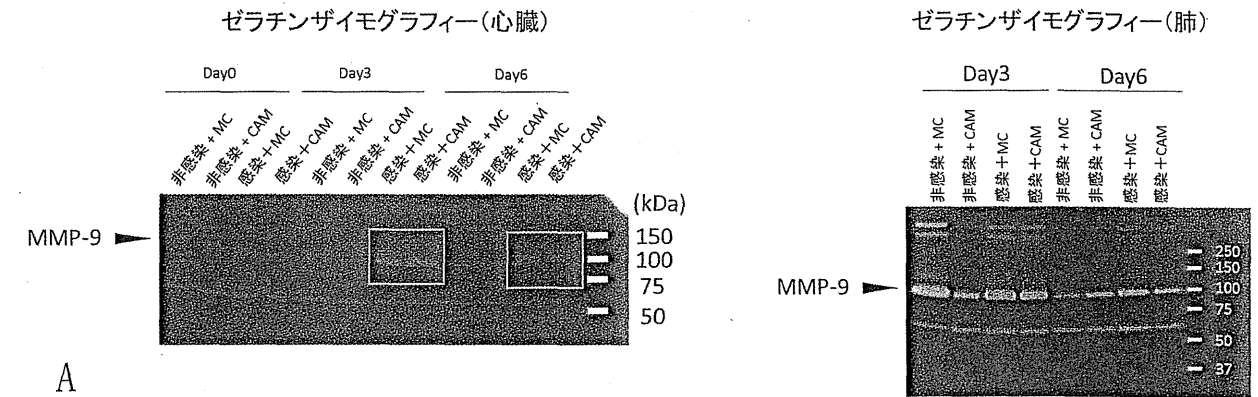


図5 感染3日目の肺のHE染色

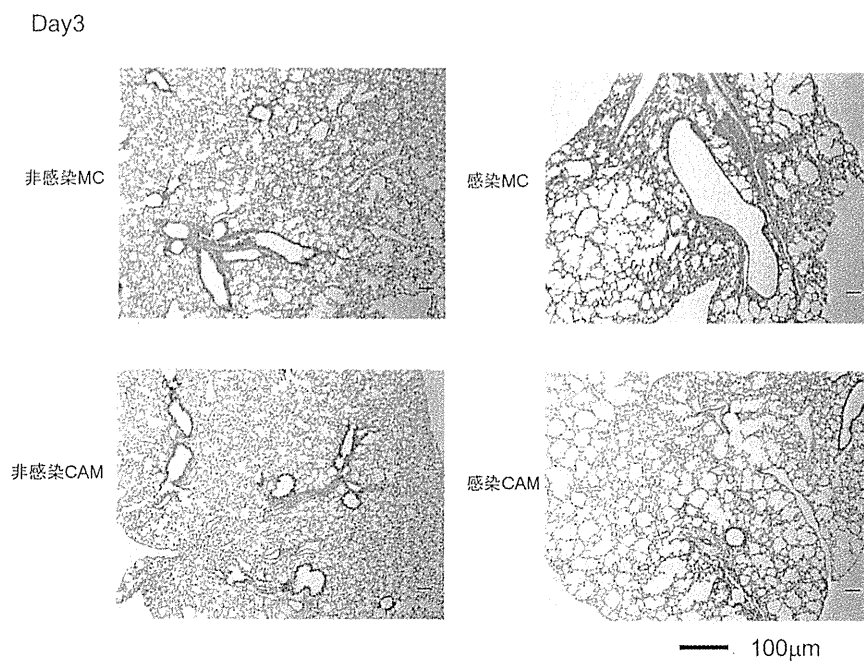


図6 ウェスタンブロッティングによるCAM投与マウスのNF-kappaBとMMP-9の発現変化

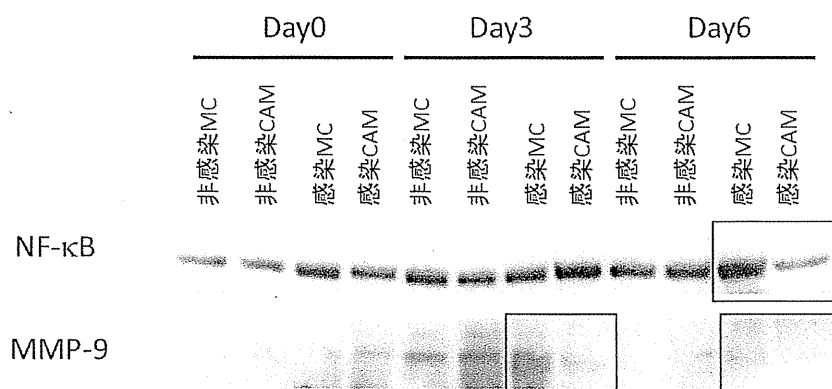


図7 インフルエンザ感染によるアドヘレンスジャンクションのβカテニンの発現変化

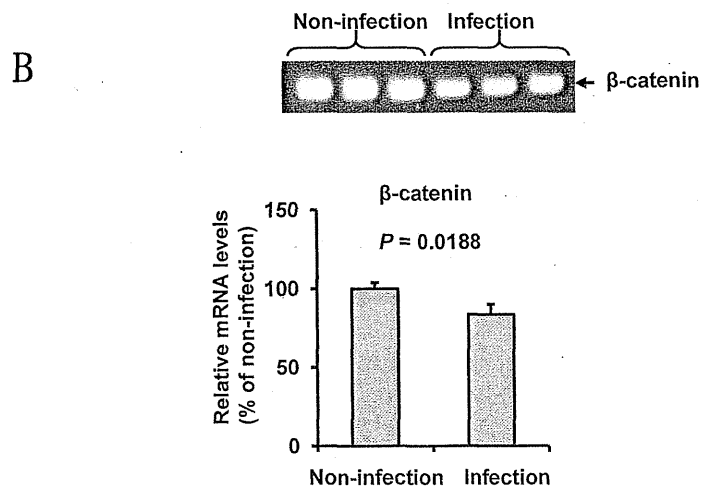
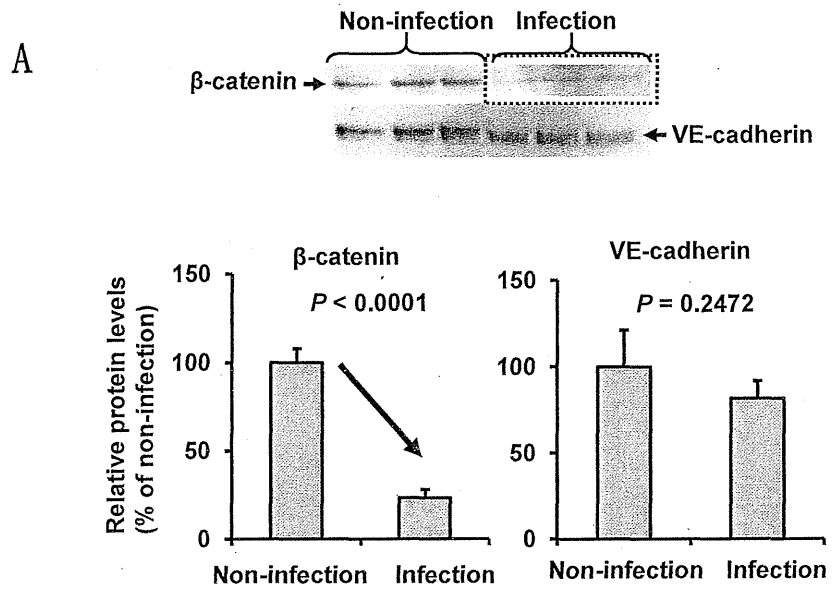


図8 プロテアソーム阻害剤による  $\beta$  カテニンの分解抑制

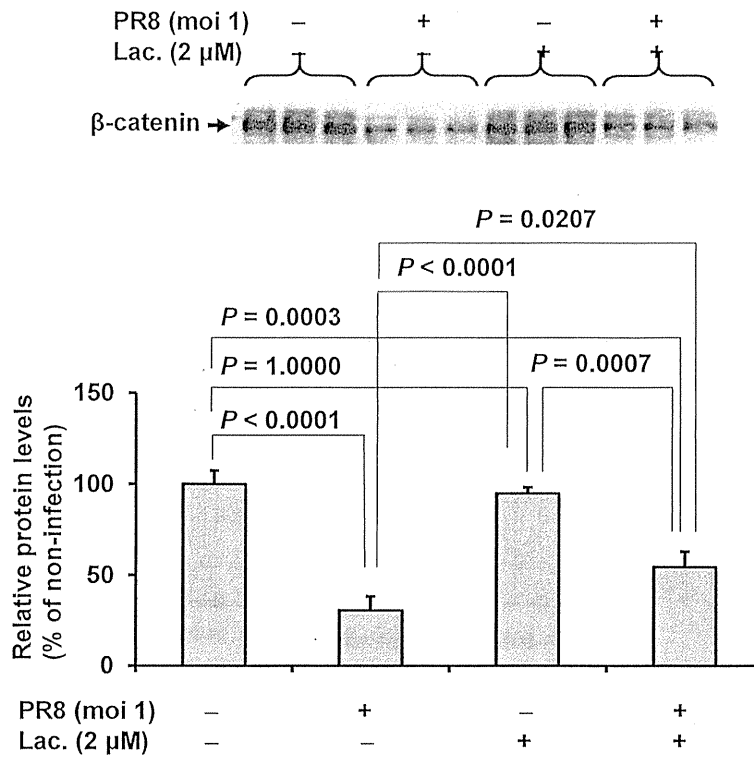


図9 インフルエンザ感染による GSK-3 $\beta$  の活性化

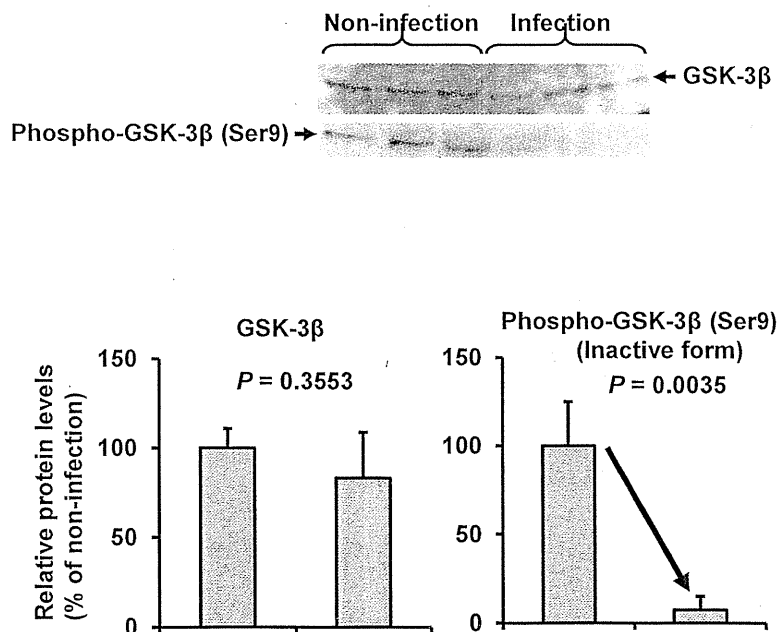


図 1 0 GSK-3 $\beta$  ノックダウンによる $\beta$ カテニンの発現回復

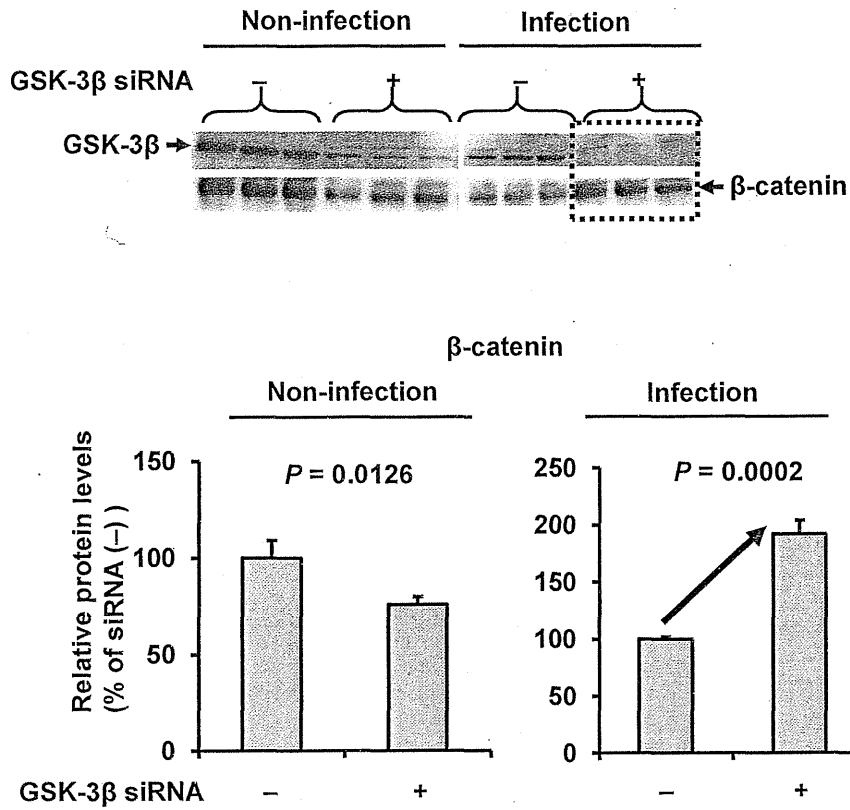
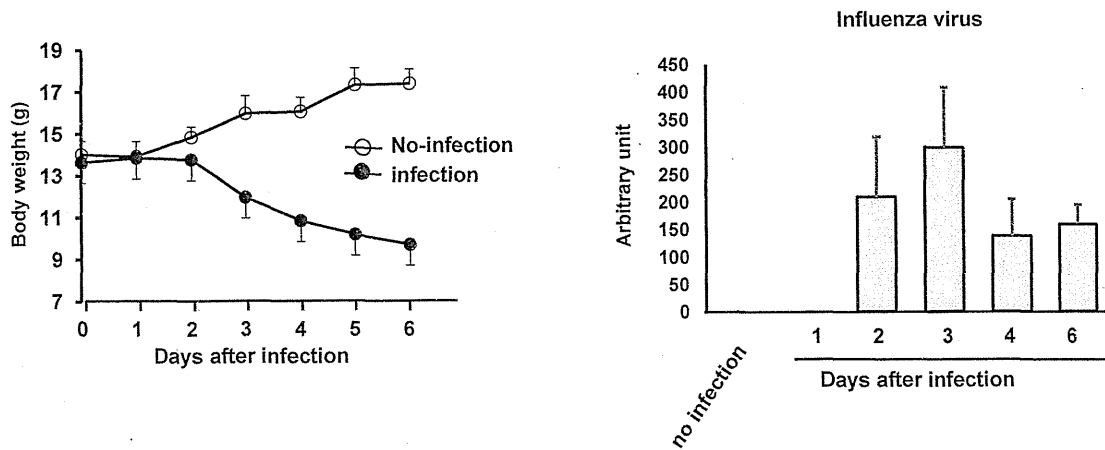


図 1 1 インフルエンザ感染マウスの肺における VE-カドヘリンと  $\beta$ -カテニン及び GSK-3 $\beta$  の発現変化

A



B

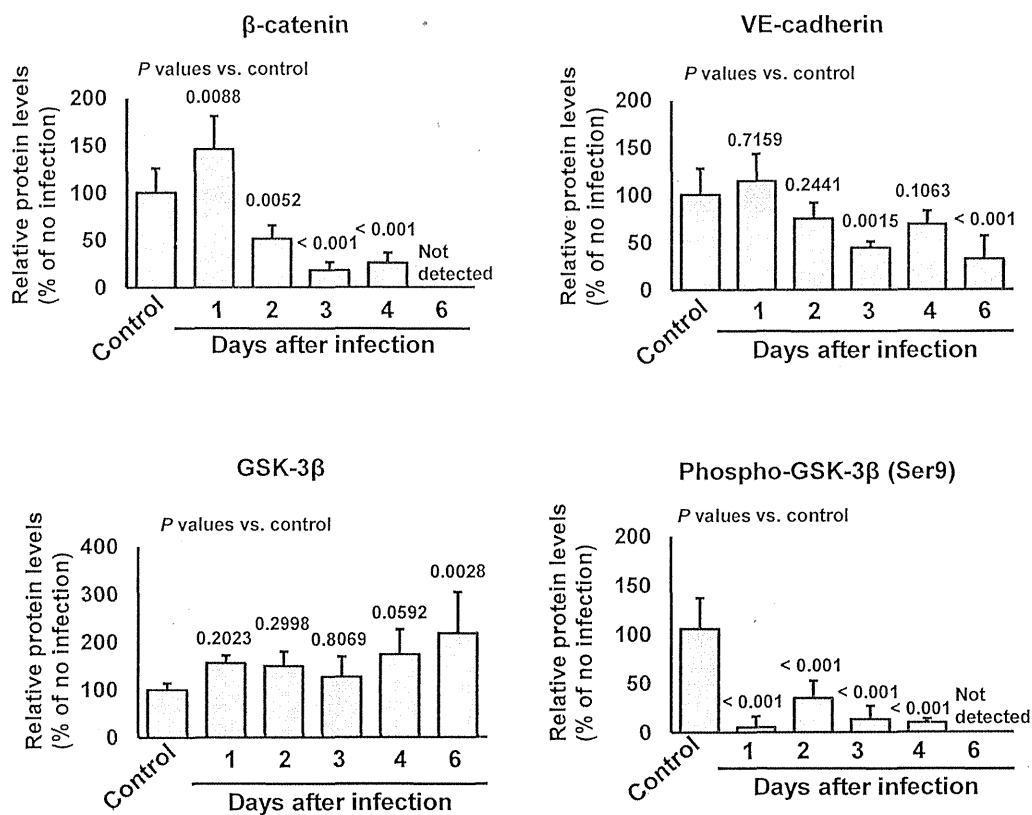
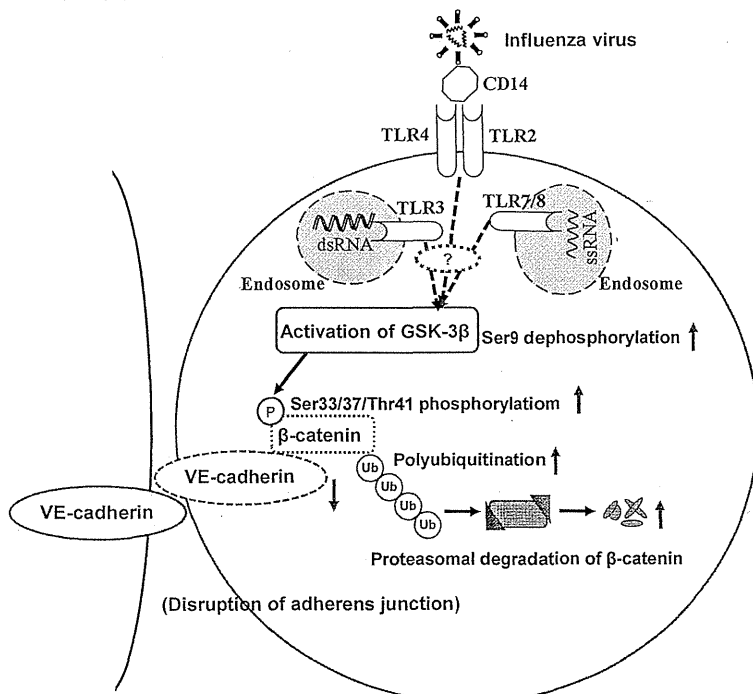


図 1 2 急性脳症における血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクションの崩壊機序





## (資料 4)

### 急性脳症の病態：急性脳症初期バイオマーカーおよびミトコンドリア病の急性期病態との類似性について

研究分担者 久保田雅也 (国立成育医療研究センター 神経内科医長)  
研究協力者 寺嶋宙 (国立成育医療研究センター 神経内科医員)  
柏井洋文 (東京大学 大学院生)  
林雅晴 (東京都医学研究所 脳発達・神経再生研究分野 分野長)  
田沼直之 (東京都立府中療育センター小児科 医長)

#### 研究要旨

急性脳症において IL-33-IL33R 経路がどの程度初期病態成立に関与しているのかは不明であるが少なくとも一部の急性脳症の初期病態には IL-33-IL33R 経路を含む免疫反応が関与した可能性がある。また乳酸/ATP 比は急性脳症急性期では高値、回復期で正常化し、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た。またその値は重症例の予後とも相関した。急性脳症を起こした PDHC 欠損症男児の急性期 MRS 所見は一部発性拡散低下をともなう急性脳症 (AESD) と共通し glutamine 作動性神経が過度に興奮したための浮腫が考えられた。2008-2013 年で経年的にみると通常の脳症治療に加えた早期 3 剤 (VB1, VB6, 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た。これらの投与が 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。急性脳症の初期病変は血管内皮 (脳血管関門) を場とするミトコンドリア機能不全があり、ニューロンの障害はそれに引き続くものであるという我々の仮説を支持するものである。

#### A. 研究目的

急性脳症は我が国の小児に多く、各種のウイルス感染症を契機として急激に発症し、遷延する意識障害を特徴とする。その臨床像は多彩で重症の病型はしばしば難治で、予後も不良である。近年臨床像に加え MRI 所見を加味して細分類が進み、急性壊死性脳症 (ANE)、遅発性拡散低下をともなう急性脳症 (AESD) などの病態解析がなされつつある。病初期に

熱性けいれん重積との鑑別が困難で感度の高いバイオマーカーの検索が重要な課題となっている。この 3 年間で血中 ATP, 乳酸、乳酸/ATP 比について急性脳症、熱性けいれん重積での解析を行い病初期バイオマーカーとしての有用性の検討を行った。また IL-1 family に属するサイトカインである IL33 の急性脳症バイオマーカーとしての検討も行った。また各種ミトコンドリア病における

ATP 等の解析も同様に行い急性脳症との病態の異同を検討した。急性脳症を発症したミトコンドリア病の経過を詳細に解析し、ミトコンドリア機能不全の意義を検討した。ミトコンドリアレスキューとしてのビタミン B1, B6, カルニチン投与の AESD に対する影響を評価し、治療上の意義を検討した。

## B. 研究方法

### ①急性脳症と IL-33

IL-33 を測定した急性脳症の患者 10 名を表 1 に示す。血液採取後血清を $-70^{\circ}\text{C}$ で凍結保存し AdipoGen 社 ELISA kit (AG-45A-0033TP-KI01) を用いて IL-33 を測定した (林、田沼)。

### ②急性脳症と血中 ATP, 乳酸

血中 ATP に関しては既報告の方法により木戸研究室において測定が行われた。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。

### ③ミトコンドリア病と急性脳症

症例 PDHC 欠損症 9 才男児。インフルエンザ感染に引き続き歩行障害、構語障害、意識変容をきたしたが糖、VB1, 6, カルニチンに加え脂肪製剤の投与で改善した。臨床経過を MRI, MRS 画像、ATP 測定等とあわせ検討した。

### ④AESD 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

対象：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。後者 11 例には発症早期からビタミン B1, B6, および L カルニチン投与が行われていたが前者 10 例にはそれらの投与はなされていなかった。両群に男女比や発症月齢の差はなかった。両群で 2 相めのけいれん発作、MRI 画

像から AESD の発症の有無を比較検討した。

### (倫理面への配慮)

研究及び研究結果の発表にあたっては、患者のプライバシー保護に十分配慮した。

## C. 研究結果

### ①急性脳症と IL-33

図 1 に急性脳症 10 例の IL-33 の値を示す。10 例中 5 例で経過中 IL-33 が検出された。比較的后遺症の重い遅発性拡散低下をともなう急性脳症 (AESD) では検出されず。検出されたのは比較的前後のよい急性脳症であった。

### ②乳酸/ATP 比について

図 2 に各疾患の乳酸/ATP 比を示す。急性脳症 20 例の急性期 ( $5.65 \pm 5.55$ ) は熱性けいれん重積 16 例急性期 ( $1.65 \pm 1.01$ ) 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 ( $5.65 \pm 5.85$ ) と比較し有意差は認めず。

### ③ミトコンドリア病と急性脳症

症例の急性期と回復期の MRI, MRS を図 3 に示す。急性期には MRI 上小脳歯状核に信号異常を認め、MRS では乳酸の上昇とともにグルタミン-グルタミン酸 (図中 Glx) の上昇を認め、回復期にはそれらは全て改善した。急性期には血中乳酸は  $4.20\text{mM}$ , 回復期には  $3.20\text{mM}$ , ATP  $0.64\text{mM}$ , 乳酸/ATP 比  $5.02$  であった。

### ④AESD 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

これら 3 剤を投与しなかった

(1)2008-2010 年の 10 例のうち 6 例が 2 相目のけいれんを起こし AESD と診断された。  
(2)2011-2013 年 11 例中 10 例は早期 3 剤投与を行い 2 相めのけいれんは起こらず MRI

画像変化もなく結果的に軽症脳症であった  
(図4)。

## D. 考察

### ①急性脳症と IL-33

IL-33 は IL-1 family に属するサイトカインで Th2 タイプのサイトカインに関連した免疫反応に関与する。IL-33 は細胞内では転写因子として細胞外では NF- $\kappa$ B を誘導する因子として働く。炎症性サイトカインとしての性質も持ち IL-33-IL33R 経路はウイルス感染の成立にも関与する。今回の IL-33 測定で比較的后遺症の重い遅発性拡散低下をともなう急性脳症 (AESD) では検出されず比較的前後のよい急性脳症で検出されたことは AESD の発症機序が IL-33-IL33R 経路を介さないものであることを示唆する。IL-33 が検出された 5 例中 3 例は発症 2 日以内に検出され、1 例は発症後 5、7 日めに、1 例は発症 20 日めに検出されており、この IL-33-IL33R 経路がどの程度初期病態成立に関与しているのかは不明であるが少なくとも一部の急性脳症の初期病態には IL-33-IL33R 経路を含む免疫反応が関与した可能性がある。ステロイドパルス療法にもかかわらず軽度の後遺症を残していることは血管内皮由来の IL-33-IL33R 経路活性化の可能性もある。

### ②乳酸/ATP 比について

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。こ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。

### ③ミトコンドリア病と急性脳症

急性脳症を起こした PDHC 欠損症男児の急性期 MRS 所見 (乳酸の上昇とともにグルタミン-グルタミン酸 (図中 Glx) の上昇) は一部 AESD の急性期 MRI 所見と共通する。Glx のうち glutamate は興奮性の伝達物質であり、また astrocyte に存在し glutamin に代謝され浸透圧調節物質としても働く。glutamine 作動性神経が過度に興奮すると astrocyte に glutamine が過剰に蓄積し細胞性浮腫をきたす。急性脳症 (AESD) や PDHC 欠損症ではこの細胞性浮腫が共通していると思われる。両者ともにインフルエンザウイルスが引き起こしやすいことも共通の機序が想定される。

### ④AESD 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

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。通常の脳症治療に加えた早期 3 剤 (VB1, VB6, 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。

## E. 結論

小児急性脳症の根本的な原因は不明なままであるが病態の中でミトコンドリア機能不全の可能性ががあることは (おそらくニューロンより先に) 今回の研究で明らかになり、AESD の病勢を緩和する治療もミトコンドリアレスキューとしての位置づけができるものであった。今後のより効率的な薬剤の知見集積が期待される。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 論文発表

#### 1. 論文発表

- 1 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* 2012;34:20-7.
- 2 Miyata R, Tanuma N, Hayashi M, Imamura T, Takanashi JI, Nagata R, Okumura A, Kashii H, Tomita S, Kumada S, Kubota M. Oxidative stress in patients with clinically mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenial lesion (MERS) *Brain Dev.* 2012;34:124-7. Epub 2011 May 14.
- 3 Hayashi M, Saito-Miwa N, Tanuma N, Kubota M. Brain vascular change in Cockayne syndrome. *Neuropathology* 2012;32:113-7.
- 4 Hoshino A, Saitoh M, Oka A, Okumura A, Kubota M, Saito Y, Takanashi JI, Hirose S, Yamagata T, Yamanouchi H, Mizuguchi M. Epidemiology of acute encephalopathy in Japan, with emphasis on the association of viruses and syndromes. *Brain Dev.* 2012;34:337-43. Epub 2011 Sep 15.
- 5 Saitoh M, Shinohara M, Hoshino H, Kubota M, Amemiya K, Takanashi JI, Hwang SK, Hirose S, Mizuguchi M. Mutations of the SCN1A gene in acute encephalopathy. *Epilepsia.* 2012; 53: 558-564.
- 6 Hachiya Y, Hayashi M, Negishi T, Atsumi S, Kubota M, Nishihara T. A Case of Osteogenesis Imperfecta Type II Caused by a Novel *COL1A2* Gene Mutation: Endoscopic Third Ventriculostomy to Prevent Hydrocephalus. *Neuropediatrics* 2012; 43(04): 225-228
- 7 Haga N, Kubota M, Miwa Z. 2013. Epidemiology of hereditary sensory and autonomic neuropathy type IV and V in Japan. *Am J Med Genet Part A* 2013;161A:871-4.
- 8 Shinohara, M, Saitoh, M, Nishizawa, D, Ikeda, K, Hirose, S, Takanashi, JI, Takita J, Kikuchi K, Kubota M et al. ADORA2A polymorphism predisposes children to encephalopathy with febrile status epilepticus. *Neurology.* 2013; 80: 1571-1576.
- 9 Kato M, Yamagata T, Kubota M, Arai H, Yamashita S, Nakagawa T, Fujii T, Sugai K, Imai K, Uster T, Chitayat D, Weiss S, Kashii H, Kusano R, Matsumoto A, Nakamura K, Oyazato Y, Maeno M, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito K, Hayasaka K, Matsumoto N, Saito H. Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutation. *Epilepsia.* 2013 Apr 26. doi: 10.1111/epi.12200. [Epub ahead of print]
- 10 Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, Kosho T, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, Mabe H,