

**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25年度 総括・分担研究報告書**

**研究代表者 木戸 博**

**平成26(2014)年 3月**



# 目 次

## I . 総括研究報告

- 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

## II . 分担研究報告

1. 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：重症化発症機序と早期診断マーカー、Flu Alarminの検索 ----- 27  
木戸 博
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 -----41  
林 日出喜
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、インフルエンザ心筋炎におけるMMP-9の関与についての研究 ----- 53  
高橋悦久
4. 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 ---59  
久保田雅也
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 ----- 67  
西村匡司
6. 新型インフルエンザ肺炎・脳症の診断・治療法開発研究----- 75  
佐々木信一
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----- 79

西村秀一	
8 . 脳症発症と 酸化障害の関連性に関する研究	-----85
山口清次	
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 97
IV . 研究成果の刊行物・別刷（主なもの）	----- 105

## **I . 總括研究報告書**



## 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）

### （総括）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

インフルエンザ重症化(肺炎、脳症)発症機序の解明、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、重症化治療薬の検索、の3課題について昨年に続いて解析が行われ、それぞれの課題で大きな進展があった。中でもインフルエンザの重症化機序については、これまで提唱してきた「インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ (Trypsin, MMP-9)」サイクルに共役する「体内代謝障害 サイトカイン」サイクルが新たに証明され、治療標的酵素が発見されると共に治療薬が明らかになってきた。

1)重症化機序:インフルエンザウイルスの体内増殖は、「インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ」サイクルによるが、このサイクルのサイトカインを介して共役している「体内代謝障害 サイトカイン」サイクルが、インフルエンザ増殖と重症化に伴う代謝破綻を制御していることを明らかにした。体内代謝障害の中でも、生命活動に直結しているエネルギー代謝(糖代謝と脂質代謝)が重要で、中でも Pyruvate Dehydrogenase と Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 (PDK4) がサイトカインと密接に関係している事を見出した。PDK4 がサイトカインストームの治療薬の創薬ターゲット分子として注目される。さらに「インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ」サイクルの中で、感染で増加する Trypsinogen と共に、Enterokinase (EK: EK-v1, EK-v2) も増加して、速やかに活性型 Trypsin に変換していることが証明された。以上から、サイクルのプロテアーゼ群は、Trypsin, MMP-9, EK であることが判明した。一方、高病原性鳥インフルエンザウイルスは、季節性インフルエンザとは全く異なる宿主の Trypsin 型プロテアーゼで増殖が制御されているが、高病原性鳥インフルエンザ H5N1 ウイルスの Hemagglutinin (HA) 分解シグナル、RKKR、KKKR 配列を認識する酵素として TMPRSS13/MSPL と Furin を見出している。本研究では、TMPRSS13/MSPL の KO マウスでは、KKKR 配列を持つ H5N1 ウイルスの増殖が強く抑制され、RKKR 配列 H5N1 ウイルスの増殖は軽度障害に留まることを明らかにし、TMPRSS13/MSPL と Furin が H5N1 ウイルス感染に係わることを証明した。

2)インフルエンザ感染重症化に伴う Flu Alarmin として乳酸/ATP 比が検討され、ICU 入室した感染症重症化患者の予後予測因子、さらに重症患者の変化を簡便に経時的、客観的に捉えるスコアとしての有用性が確認された。インフルエンザ脳症を代表とする急性脳症では、乳酸/ATP 比が熱性痙攣重責症例に比較して有意に増加して、鑑別

診断に有用であることを明らかにした。また感染性疾患による急性脳症では、PDK4が増加してPDH活性が急速に低下して乳酸が増加してATPレベルが低下するが、その程度はミトコンドリア病のPyruvate Dehydrogenase Complex (PDC) 欠損症に匹敵して、両者間の有意差は見られなかった。従って、熱不安定性 Carnitine Palmitoyltransferase II (CPT II) 遺伝子多型を持つインフルエンザ脳症の場合、後天性のCPT IIとPDCが重なった状態として、重篤なエネルギー危機状態であることが判明した。Flu Alarminとして、インフルエンザウイルス感染センサーのRIG-1が候補になることを見出した。

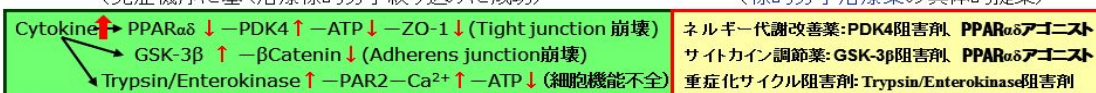
3)重症化治療薬の検索では、PDK4が重症化の創薬ターゲット分子であることを発見したことから、スクリーニングが開始され、既存薬のなかから副作用の強いDichloroacetateに代わって副作用の報告の無いDiisopropylamine dichloroacetateが検証され、極めて強い治療効果を動物実験で証明した。PDK4阻害剤であるが、サイトカインストームの治療薬、ウイルス増殖の抑制作用を示した。熱不安定性CPT II遺伝子多型を持つインフルエンザ脳症の治療薬としてPPARを介してCPT IIの転写を促進するBezafibrateを提唱していたが、患者の繊維芽細胞を用いた詳細な解析から、高熱下に低下したβ酸化を回復させることを明らかにした。また、感染と共に増加するサイトカインの中で、IL-1βとTNFがβ酸化を低下させ、IFNγとIL-6は影響が少ないことが判明した。さらに、血管内皮細胞の透過性亢進を抑制するターゲット分子として、GSK-3βが候補に挙がり阻害剤の検索を開始した。

## インフルエンザ感染による血管内皮細胞障害/多臓器不全の早期診断と治療薬

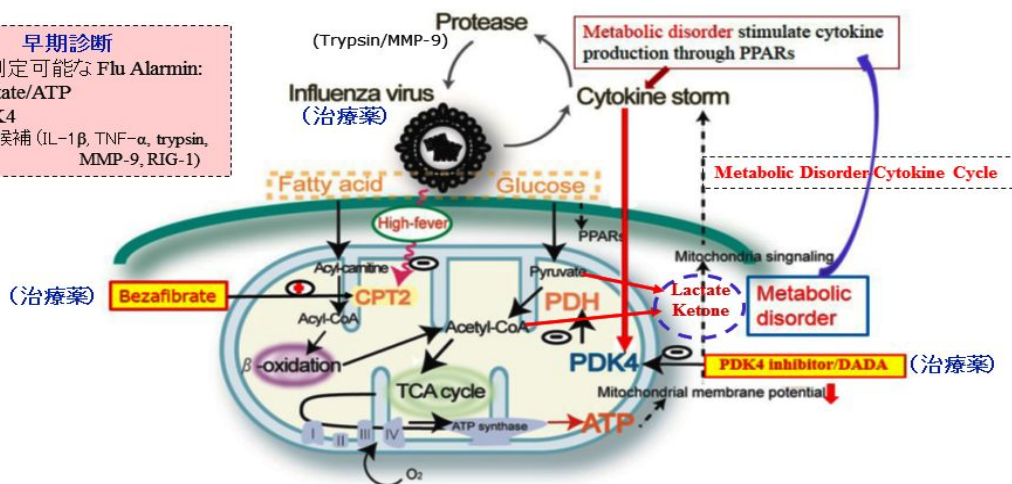
サイトカインが誘導する多臓器不全の発症機序と治療標的分子/治療薬の提案

(発症機序に基づく治療標的分子絞り込みに成功)

(標的分子治療薬の具体的提案)



**早期診断**  
 血液で測定可能な Flu Alarmin:  
 1) Lactate/ATP  
 2) PDK4  
 その他の候補 (IL-1β, TNF-α, trypsin, MMP-9, RIG-1)





## 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
- ・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)を公表しており、これを基盤の重症化機序とその治療法、Flu Alarmin 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」サイクルの検証を実施した。サイクル中のプロテアーゼについては、トリプシノーゲンの活性化酵素として知られているエンテロキナーゼ cDNA をクローニングして、293T 細胞に強制発現させてその役割を調査した。Flu Alarmin 検索として感染標的ヒト培養細胞として、インフルエンザ感染において易感染性の A549 細胞、感染しにくい H292 細胞の 2 種類を使用して、インフルエンザウイルス感染によって起きる感染関連遺伝子約 100 種類の発現パターンの変化を調査した。さらに気管支上皮初代培養細胞、十二指腸上皮細胞の初代培養を実施して、「インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ」サイクルを検証した。

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 MSPL/TMPRSS13 プロテアーゼ遺伝子の意義の解明を実施した。高病原性鳥インフルエンザウイルスは、採取時の RKKKR モチーフを持つ Influenza A/Crow/Kyoto/53/2004(H5N1) と KKKR モチーフを持つ遺伝子改変ウイルスの 2 種類を使用して感染実験を実施し、ウイルス増殖能の評価と、重症化の程度を組織化学的に解析した。

4. 【インフルエンザ脳症患者臨床検体】からの Flu Alarmin 解析。国立成育医療研究センターに入院した急性脳症患者 10 名を対象に、Flu Alarmin 解析を行った。急性脳症例と熱性けいれん重積例の鑑別診断、ミトコンドリア病との鑑別診断を実施した。特に、乳酸/ATP 比の Flu Alarmin としての有用性の検証を実施した。

5. 【ICU 入室患者の臨床検体】からの Flu Alarmin 解析。2009 年 11 月～2010 年 10 月までに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, PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>, ヘモグロビン値とともに乳酸値を測定し、中でも感染症の患者群で乳酸/ATP 比の Flu Alarmin としての有用性の検証を実施した。

6. 【呼吸器内科の臨床検体】を用いた Flu Alarmin の検索。順天堂大学医学部附属浦安病院の呼吸器内科で取り扱う患者検体、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に全国から依頼されるウイルス感染者検体の中から、インフォームドコンセントの得られた検体について Flu Alarmin の検索を実施した。

7. 【in vitro probe assay】インフルエンザ脳症の発症機序を視野に、患者の Fibroblast を使用した脂肪酸代謝障害の治療薬、Bezafibrate の治療効果の検討を実施した。

培養皮膚線維芽細胞を特殊なメディウム（最小限のブドウ糖遊離脂肪酸を含まずかつ過剰量のカルニチン）で培養し、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測定し、酸化能、および障害部位を評価した。これを In vitro probe (IVP) assay という。アシルカルニチンはタンデムマスによって測定した。インフルエンザ脳症のリスク因子、あるいは緩和因子を探索するために、IVP assay の系に以下のような温度環境の変化、サイトカイン環境の変化、薬剤添加等による酸化能の変化を評価した。

（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、「サイトカイン-代謝不全」サイクルと「インフルエンザ-サイトカイン-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証明された。即ち、インフルエンザ感染で引き起こされるサイトカインストームにより代謝不全が引き起こされ、血管内皮細胞障害と多臓器不全に進展する機序が明らかになった。②体内代謝の中でも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、その 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ている。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-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。現在、DADA よりもさらに効果的な PDK4 阻害剤の検索を開始している。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。

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インフルエンザウイルス (IAV) 感染感受性 A549 細胞と抵抗性 H292 細胞にウイルスを感染させ、各種遺伝子の定量を継時的に行い、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。

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。

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。

②トリプシノーゲンの活性化因子として昨年についてエンテロキナーゼ EK 遺伝子 (EK-v1) に加え、新たに EK-v2 もクローニングした。EK-v1 が EK-v2 に比べ、トリプシノーゲンをより効率的に活性化した。なお EK はトリプシノーゲンを活性化したが、TMPRSS2,4 と HAT はトリプシノーゲンを活性化できなかった。このように、EK によるウイルスの HA のプロセッシングを促進する新たな経路を確認した。

IAV 感染の際に、ウイルス RNA を RIG-I が検知し、IFN $\alpha/\beta$  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が、このことが 293T 細胞で確認することができた。

インフルエンザウイルスの初感染部位のヒト呼吸器上皮細胞の初代培養と、ヒト十二指腸上皮細胞の初代培養を試み成功した。これらの細胞を用いたインフルエンザ サイトカイン プロテアーゼサイクルの検証を今後実施する。

### 3. 【MSPL/TMPRSS13 ノックアウトマウスでの感染実験】

昨年までの研究により、HA の切断部位に RKKKR モチーフを持つ WT 高病原性鳥インフルエンザウイルス Influenza A/Crow/Kyoto/53/2004(H5N1) ウイルスの増殖は、野生型マウスにおいて著名であったが、ノックアウトマウスでの感染増殖は有意に低下しており、RKKKR モチーフウイルスの増殖に TMPRSS13/MSPL が関与していることが確認されていた。一方、KKKR モチーフを持つ遺伝子改変(Mut) 高病原性鳥インフルエンザウイルスの場合、ウイルスの増殖は野生型マウスにおいても著しく低く、ノックアウトマウスではウイルスの増殖が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。上記の事実を肺の病理組織像から確認することができた。

### 4. 【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。

インフルエンザ感染によるサイトカイン誘導で PDK4 が激しく誘導され、ミトコンドリアの PDH 活性が低下して糖代謝破綻によるエネルギー危機の生じることが本年度の動物実験で明らかになっている。ヒトのインフルエンザ脳症の病態でもこの病態が再現されており、PDH 活性が低下して糖代謝破

綻によるエネルギー危機の生じていることを示唆する血中 ATP、乳酸、乳酸 / ATP 比のデータが出ていることが確認された。血中 ATP、乳酸、乳酸 / ATP 比のレベルは、PDHC (pyruvate dehydrogenase complex) 欠損症患者の感染急性期病態とほぼ一致することが、本年度の両疾患群の示す類似の値から強く推定された。インフルエンザ脳症患者は、これまでの解析から熱不安定性 Carnitine Palmitoyltransferase II (CPT II) の遺伝子多型を持つことが多く、長鎖脂肪酸からの ATP 産生経路に障害があり、ATP 産生が低値である。このような患者がインフルエンザに感染して高熱状態になると、長鎖脂肪酸からの ATP 産生経路が益々低下するとともに、サイトカインストームによる PDK4 の誘導で PDH 活性が低下して糖代謝破綻が生じ、急速なエネルギー危機になる病態が明らかになった。しかし、PDHC 欠損症患者では脂質代謝の障害が無いため、低下したエネルギー産生を脂肪酸で補うことができる点でインフルエンザ脳症患者と異なる。実際に PDHC 欠損症 26 才男性の場合、連日のピーナツ摂取により神経症状が軽快・安定した。エネルギー危機ではインフルエンザ脳症と PDHC 欠損症では共通するが、PDHC 欠損症児がインフルエンザ感染に引き続き意識障害等を起こしたとき MRS 上乳酸の上昇とともにグルタミン-グルタミン酸 (Glx) の上昇を認め、病変は小脳歯状核が中心であり典型的な急性脳症 (AESD) とは異なっていたが、病態には共通するものがある。

血中 ATP、乳酸、乳酸 / ATP 比について急性脳症と熱性けいれん重積で比較検討した。その結果、乳酸 / ATP 比は急性脳症急性期では高値、回復期で正常化するが、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。以上により、インフルエンザ脳症患者の病態が明らかになると共に、熱性けいれん重積との差が明らかになってきた。

## 5.【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。

重症患者では ATP、A-LES がいずれも正常範囲を逸脱していた。特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。

末梢血 ATP は赤血球内に存在すると考えられるため、ヘモグロビン値で ATP 値を補正することで標準化する方法をとった。ヘモグロビン 10g/dL あたりで補正した結果、入室時の ATP (ヘモグロビン補正後) および A-LES は生存患者、死亡患者で差を認めなかった (それぞれ  $0.43 \pm 0.13$  vs.  $0.40 \pm 0.28$ ,  $9.6 \pm 8.6$  vs.  $16.8 \pm 17.2$ )。ICU 入室患者で予後が悪い代表疾患として敗血症があり、多臓器不全を来す疾患である。基礎疾患として感染症を有する患者で生存患者 (17 人) と死亡患者 (4 人) を比較した結果、ATP は生存患者と死亡患者で差を認めなかったが、A-LES は死亡患者で有意に高値であった。感染症患者での予後判定予測を APACH II スコア、ATP、A-LES で比較すると曲線下の面

積は APACH II 0.801、ATP (ヘモグロビン補正) 0.279、A-LES 0.941 で、A-LES が有意に良かった。

## 6.【呼吸器内科の臨床検体】を用いた Flu Alarmin の検索。

インフルエンザ脳症、重症肺炎症例をいち早く診断するバイオマーカーの解明と確立を目的とし、呼吸器内科で取り扱ったインフルエンザ患者血清および気管支肺胞洗浄液検体から、ATP をはじめとした各種バイオマーカーの検索を実施した。多くの症例で IL-6、MMP-9 や TNF- $\alpha$  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 の値で割った乳酸 / ATP 比 (A-LES, ATP-lactate energy risk score) の値は概ね 20 以下 (正常値: median A-LES, 2.7 (2.1 to 3.3)) を示し比較的高い値を示したが、B 型インフルエンザ 2 例ではさらに高値を示した。検討した症例内訳は、A 型インフルエンザ: 7 例、B 型インフルエンザ: 3 例、細菌性肺炎: 2 例、急性肺障害: 4 例であった。多くの症例で IL-6、MMP-9 や TNF- $\alpha$  といったサイトカインの高値が認められた。なお、A-LES 値が高値を示した B 型インフルエンザ症例 2 例では、A-LES 値: 91.7、40.4 の高値を示した。今後症例を増やして、さらなる検討を続けて行く。

## 7.【in vitro probe assay】

インフルエンザの重症化が酸化障害を介して発展してゆくという仮説のもとに、

酸化に影響する因子について検討した。主に患者の培養皮膚線維芽細胞を用い、タンデムマスによる脂肪酸代謝中間体解析を in vitro probe assay (IVP assay) で調査して、以下の結論が得られた。PPAR アゴニストで高脂血症薬のベザフィブラート

(BEZ)は、酸化異常を改善する効果が期待された。培養環境が、高温下(41)では長鎖脂肪酸の代謝が障害され、低温下(33)では酸化が改善した。変異タンパクの立体構造の安定化などがこの理由として考え得られる。さらに、サイトカインの酸化におよぼす影響について調べた。インフルエンザで増加するといわれるサイトカイン(IL1、IL6、INF および TNF)の存在下で酸化能の変化を評価した。結論として、IF と IL6 による酸化への影響は少なく、IL1 と TNF は、酸化障害を悪化させる可能性が高い。すなわちサイトカインの種類によって酸化に影響を及ぼしインフルエンザの病態を悪化させる可能性が示唆された。今後、インフルエンザに関連したこの他の諸因子についても酸化への影響をみる価値がある。

#### 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新たな発見がなされた。即ち感染重症化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明らかとなった。従来、インフルエンザの治療として抗ウイルス剤が使用されていたが、感染から4-5日目までが有効治療期間で5日を過ぎた感染者、特に重症化の始まった感染者には無効とされ、

有効な治療薬がこれまで無かった。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、DADA は糖代謝と脂質代謝を修復すると共にサイトカインストームの治療効果を示し、ウイルス増殖を抑制した。DADA はこれまで、副作用の報告の無い肝臓保護剤として約50年間使用されてきた薬剤であるが、新たに見出した PDK4 阻害活性は、 $IC_{50} = 50.9 \mu\text{M}$  と比較的弱いことから、今後より強力な PDK4 阻害剤をスクリーニングすることが強く望まれる。なお、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」サイクルは、「インフルエンザ以外の各種感染症の治療、さらには「サイトカイン-代謝不全」サイクルが関与する様々な疾患、例えば癌の悪液質、心不全、糖尿病治療への応用も可能と推定される。

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。

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、インフルエンザウイルス感染感受性 A549 細胞で、顕著な発現の上昇がみられた分子：CCL5、IFNB1、IFNL1、IFNL2、IL17F、STAT1 を第一と考え、今後、A型のみならずB型も含めた感染患者の血液細胞、あるいは気管支肺胞洗浄(BAL)細胞でモニターして、重症化診断に応用できる Flu Alarmin として同定する予定である。一方、インフルエンザウイルス感染抵抗性 H292 細胞で、顕著な発現の上昇がみられた分子：AIM2、CXCL10、IFITM1、IFITM2、IFITM3、MX2、PYHIN1、STING は、むしろウイルス排除に関わる防御分子

と考えられた。実際に、293T 細胞を使ったインフルエンザウイルス感染系で IFITM3 による IAV 感染増殖抑制が確認された。他の分子に関しても培養細胞系で細かく検討した後、実験動物レベルで、検討して治療への応用が期待できるかを検討したい。なお、これらの細胞系を使用して、EK がインフルエンザウイルス感染の成立、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。今後、ヒト呼吸器上皮細胞と、ヒト十二指腸上皮細胞の初代培養でも検討を進める。

### 3. 【MSPL/TMPRSS13 ノックアウトマウスでの感染実験】

高病原性鳥インフルエンザ感染において MSPL は、ウイルス増殖に必須な HA の解列に際して、解列シグナルの RKKR、KKKR タイプの両方に大きく関与していることが示唆された。したがって MSPL の阻害剤を探索することが高病原性鳥インフルエンザウイルスの増殖阻害と、ウイルス感染の重症化の治療に有用であると考えられた。

### 4. 【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 比はインフルエンザ脳症の急性期では高値 ( $6.00 \pm 5.95$ ) (正常値 : median A-LES,  $2.7(2.1 \text{ to } 3.3)$ ) を示し、回復期で正常化するパターンが確認された。このようなエネルギー危機は、インフルエンザ脳症患者の多くが持つ熱不安定性 CPT II の遺伝子多型から長鎖脂肪酸からの ATP 産生経路に障害があり、高熱状態で ATP 産生が低くなってしまふのに加えて、サイトカインストームによる PDK4 の誘導で PDH 活性が低下して糖代謝破綻が生じ、急速なエネルギー危機になる病態が明らかになった。そのため、長鎖脂肪酸代謝障害を持たない熱性けいれん重積患者の A-LES 価、(1.48

$\pm 0.69$ ) と比較すると有意差を持って高値で鑑別診断の一助になる。インフルエンザ脳症とインフルエンザに感染したミトコンドリア病の PDHC 欠損症患者では、PDH の低下が共通して起きて、乳酸 / ATP 比において有意差は付かない事例が多い。インフルエンザに感染した PDHC 欠損症患者の場合、MRS 上乳酸の上昇とともにグルタミン-グルタミン酸 (Glx) の上昇を認め、病変は小脳歯状核が中心であり典型的な急性脳症 (AESD) とは異なっていたが、病態には共通するものがあつた。

### 5. 【ICU 入室患者の臨床検体】からの Flu Alarmin 解析。

ATP、A-LES とともに ICU に入室した対象患者全員では生存患者と死亡患者で有意差を認めなかったが、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 APACH II を超えていた。敗血症は集中治療室で管理する患者群の中では多臓器不全の認められる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、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、多臓器不全に ATP 産生不全が関与している可能性は高い。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た。

### 6. 【呼吸器内科の臨床検体】を用いた Flu Alarmin の検索。

インフルエンザ症例や肺炎、急性肺障害例では、かなりの症例で各種サイトカインの高値が認められ、いわゆるサイトカインストームの状態が示唆された。現時点で死亡例は経験しておらず、それを反映してか A-LES は概ね 20 以下であったが、B 型インフルエンザ症例で高値になる傾向が認められた。この傾向がインフルエンザウイルス

タイプによる特性なのか、重症度の問題なのかは、現在症例を蓄積し検討中である。

ARDS に陥る症例はインフルエンザに限らず存在するため、そのメカニズム解明とインフルエンザ症例との比較検討のために、今後はインフルエンザ以外の ARDS 症例（細菌性肺炎、敗血症、重症外傷等）においても検討を加える予定である。

## 7.【in vitro probe assay】

酸化異常症のように代謝の脆弱な体質の個体では、インフルエンザ脳症のように感染などを契機に急性経過を取ることが少なくない。今回の検討の結果、高脂血症薬の BEZ は 酸化異常症を改善する可能性のあることを示した。その機序として、BEZ は PPAR アゴニストとして働き、PPAR は 酸化酵素の上流の配列に結合して酵素の転写を促進し、このために酵素タンパクの量を増加させ残存活性を上昇させることが考えられる。BEZ の作用機序については in vivo も含めて、さらに検討が必要であろう。

環境温度による影響をみた研究では、長鎖脂肪酸の代謝の脆弱な個体（または 酸化異常症）では、高温下では長鎖脂肪酸代謝が悪化する可能性がある。一方中鎖～短鎖の 酸化は高温下では促進される。一方低温下では、長鎖 酸化の異常も緩和されることが推測された。この機序として、変異タンパクでも低温下では立体構造が比較的保たれて安定化するために、酵素活性が保存されたことが考えられる。

インフルエンザで上昇するサイトカインのうち、IF と IL6 の 酸化への影響は少なく、IL1 と TNF では、 酸化異常症を悪化させる可能性が高いことが分かった。今後さらにこの他のサイトカインの影響についても検討する価値がある。

## E. 結論

①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「サイトカインー代謝不全」サイクルが見いだされた。このネットワーク機構の中で、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。サイトカインストームの治療効果はさらに、「インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ」サイクルの回転を抑制して、著明なウイルス増殖阻害効果を示した。

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」サイクルの検証では、早期診断マーカー、SOS シグナルとしての Flu Alarmin の候補分子がある程度絞り込むことができた。また、感染重症化に関わる可能性のある新たなトリプシン様タンパク質分解酵素として EK の存在が示唆された。

【MSPL/TMPRSS13 ノックアウトマウスでの感染実験】ノックアウトマウスの実験から、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 が係わっていると推定され、肺のウイルス増殖をモニターした組織化学的解析からも確認された。

【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、回復期で正常化するパターンが確認された。また急性脳症との鑑別が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た。乳酸 / ATP 比が急性脳症急性期と PDHC 欠損症等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。

【ICU入室患者の臨床検体】からの Flu Alarmin 解析。ICUに入室した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 APACH II を超えていた。

⑥【呼吸器内科の臨床検体】を用いた Flu Alarmin の検索。インフルエンザ症例、肺炎、急性肺障害例で、各種サイトカインの高値と 20 以下の A-LES 値を提示し、B 型インフルエンザ症例ではさらに高値になる傾向が認められた。

⑦ 酸化異常症を伴うインフルエンザ感染症において、BEZ は改善効果が期待された。またサイトカインの中でも、IF と IL6 の酸化への影響は少なく、IL1 と TNF は、酸化系を悪化させる可能性があることが明らかになった。

## F. 健康被害情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) 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.
- (2) 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.
- (3) 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.
- (4) 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.
- (5) Chida J, Kido H. Extraction and quantification of adenosine triphosphate in mammalian tissues and cells. *Methods Mol Biol*, 2014; 1098(1): 21-32.
- (6) 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 in press.
- (7) 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.
- (8) 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.
- (9) 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.
- (10) 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.
- (11) 木戸博 アジュバント、予防接種 Q & A 小児内科 2013; 45: 60-64.
- (12) 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.
- (13) 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.
- (14) Haga N, Kubota M, Miwa Z. Epidemiology of hereditary sensory and autonomic neuropathy type IV and V in Japan. *Am J Med Genet Part A* 2013;161A:871–874.
- (15) 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 (in press)
- (16) Kato M, Yamagata T, Kubota M, et al. Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutation. *Epilepsia*. 2013 Apr 26. doi: 10.1111/epi.12200. [Epub ahead of print]
- (17) Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, Kosho T, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, Mabe H, Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T, Takanashi J-i, Shotelersuk V, Tekin M, Ochi N, Kubota M, et al. MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome. *Am J Med Genet* 2013;Part A 161A:2234–2243.
- (18) Nakamura K, Kodera H, Akita T, Shiina M, Kato M, Hoshino H, Terashima H, Kubota M et al. De Novo Mutations in *GNAO1*, Encoding a Gα Subunit of Heterotrimeric G Proteins, Cause Epileptic Encephalopathy. *The Am J Hum Genet* 2013; 93, 1–10
- (19) Shiihara T, Miyake T, Izumi S, Sugihara S, Watanabe M, Takanashi J, Kubota M, Kato M. Serum and CSF biomarkers in acute pediatric neurological disorders. *Brain Dev* 2013 in press.
- (20) 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*, 2014, in press.
- (21) 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*. Epub 2014 Jan 28.
- (22) 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*. 2013; 14: 31-38.
- (23) 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*. 2013; 29(2):279-288.
- (24) Kubo Y, Hayashi H, Matsuyama T, Sato H, Yamamoto N. Retrovirus entry by endocytosis and cathepsin proteases. *Adv Virol*. 2012:640894.
- (25) Kohno T, Kubo Y, Yasui K, Haraguchi M, Shigematsu S, Chua KJ, Matsuyama T, Hayashi H. Serum starvation activates NF- $\kappa$ B through G protein  $\beta$ 2 subunit-mediated signal. *DNA Cell Biol* 2012; 31(11):1636-1644.
- (26) Ihara K, Yoshino M, Hoshina T, Harada N, Kojima-Ishii K, Makimura M, Hasegawa Y, Watanabe Y, Yamaguchi S, Hara T. Coagulopathy in patients with late-onset ornithine transcarbamylase deficiency in remission state: A previously unrecognized complication. *Pediatrics* 2013; 131(1): e327-330.
- (27) Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamada K, Takahashi T, Takayanagi M, Fukao T, Fukuda S, Yamaguchi S. Intracellular in vitro probe acylcarnitine assay for identifying deficiencies of carnitine transporter and carnitine palmitoyltransferase-1. *Anal Bioanal Chem* 2013; 405(4): 1345-1351.
- (28) Yamaguchi S, Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Furui M, Taketani T, Fukuda S, Fukao T, Shigematsu Y: Expanded newborn mass screening with MS/MS and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency in Japan. *日本マススクリーニング学会誌* 2013; 23(3): 270-276.
- (29) 山口清次 MS解析による代謝障害の診断. *分子消化器病* 2013; 10(1): 72-78.
- (30) 山口清次 新生児スクリーニングの新時代; タンデムマス法の導入. *日本周産期・新生児医学会雑誌* 2013; 48(4): 827-829.
- (31) 山田健治, 長谷川有紀, 吉川陽子, 高橋知男, 小林弘典, 虫本雄一, Jamiyan Purevsuren, 山口清次 成人後に診断された有機酸・脂肪酸代謝異常症の臨床的検討. *臨床神経学* 2013; 53(3): 191-195.
- (32) 山口清次 タンデムマスを用いた新生児マススクリーニングによる先天代謝異常症の早期診断. *小児科臨床* 2013; 66(2): 193-198.
- (33) 山口清次 小児科領域におけるタンデムマスとGC/MSの臨床応用: 最近の進歩. *臨床病理* 2013; 61(9): 817-824.
- (34) 山口清次(編): タンデムマス・ガイドブック、診断と治療社、東京、2013
- (35) Nagashima O, Ohashi R, Yoshioka Y, Inagaki A, Tajima M, Koinuma Y, Iwakami S, Iwase A, Sasaki S, Tominaga S, Takahashi K. High prevalence of gene abnormalities in young patients with lung cancer. *J*

- Thorac Dis* 2013;5:27-30.
- (36) Mori T, Tajima K, Hiramama M, Sato T, Kido K, Iwakami S, Sasaki S, Iwase A, Shiomi K, Maeda M, Hino O, Takahashi K. The n-erc index is a novel monitoring and prognostic marker for advanced malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Dis* 2013;5:145-148.
- (37) 門屋講太郎, 吉岡 泰子, 難波由喜子, 桂 蓉子, 高 遼, 小池 建吾, 吉岡 正剛, 佐々木信一, 富永 滋, 高橋 和久. 肺膿瘍・膿胸 7 例における歯周病細菌 PCR 検査の臨床的意義の検討. 日本呼吸器学会雑誌 2013; 2: 79-84.
- (38) 南條友央太, 佐々木信一, 松野 圭, 石森絢子, 牧野文彦, 吉岡正剛, 吉岡泰子, 富永 滋, 山口哲生. *Nocardia wallacei* が検出され、ST 合剤投与で軽快した気管支拡張症の 1 例. *Therapeutic Research* 2013; 34: 759-760.
- (39) 磯部 全, 佐々木 信一, 富永 滋, 前野敏孝, 倉林 正彦. 喘鳴を伴わずに発症した好酸球性細気管支炎の 1 例. 日本呼吸器学会誌 2013; 2: 607-611.
- (40) 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支軟骨形成症の 1 例. 気管支学 2014; 36: 73-77.
- (41) Takashita E, Ejima M, Miura M, Ohnishi A, Nishimura H, Odagiri T, Tashiro M. A community cluster of influenza A(H1N1)odm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013. *Euro Surveill.* 2014; 19: pii=20666.
- (42) Nguyen, Abe S, Sun G, Matsuoka A, Nishimura H, Ishihara M, Matsui. Rapid screening for influenza using a multivariable logistic regression model to save labor at a clinic in Iwaki, Fukushima, Japan. *Am J Infection Control*, 2014, in press.
- (43) Nishimura H, Sakata S, Kaga A: A New methodology for studying dynamics of aerosol particles in sneeze and cough using a digital high-vision, high-speed video system and vector analyses. *PLoS ONE* 2013; 8: e80244. doi:10.1371/journal.pone.0080244
- (44) Yamaya M, Nishimura H, Nadine LK, Ota C, Kubo H, Nagatomi R: Ambroxol inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial cells. *Arch. Pharm. Res. Arch Pharm Res.* [Epub ahead of print] 2013
- (45) Yamaya M, Nishimura H, Lusamba Nadine L, Kubo H, Nagatomi R: Tulobuterol inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial cells. *Physiological Reports* 2013. 1: e00041.
- (46) Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Matsuzaki Y, Hongo S, Itagaki T, Katsushima N, Ohmi A, Nishimura H, and Ahiko T: Molecular epidemiology of Coxsackievirus A16 strains isolated from children in Yamagata, Japan between 1988 and 2011. *Microbiol. Immunol.* 2013; 57: 400-405.
- (47) 山口育男, 青山知枝, 山本優, 木下恵子, 伊藤由美, 西村秀一: イムノクロマト法インフルエンザウイルス抗原検出キット BD ベリターシステム Flu における機器判定の感度とその目視判定に対する優越性の検討. 日本臨床微生物学雑誌 2013; 23:39-44..

## 2. 学会発表

- (1) 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)
- (2) 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)
- (3) 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)
- (4) 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)
- (5) 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
- (6) 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)
- (7) 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)
- (8) Kido H. Critical illness and energy metabolism-Blood lactate/ATP ratio as a real-time alarm index. The 7<sup>th</sup> Asian Conference on Emergency Medicine. 平成25年10月25日(東京国際フォーラム)
- (9) 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(神戸国際会議場)
- (10) Hayashi H. Identification of poly(I:C)-induced pancreatitis-related genes in IRF2-deficient mice, 3rd International conference on "Current advances in Microbiology and Immunology" June 21-22, 2012 (ULAANBAATAR, MONGOLIA)
- (11) インターフェロン $\gamma$ 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)
- (12) 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)
- (13) 血清枯渴はG Protein  $\beta 2$ を介したNF- $\kappa$ 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)
- (14) Yamaguchi S: GC-MS for diagnosis of Organic Acidurias. International Conference on Inborn Errors of

Metabolism 2013 講演. New Delhi, India, April 2013

(15) Yamaguchi S: Fatty acid oxidation defects. International Conference on Inborn Errors of Metabolism 2013 講演. New Delhi, India, April 2013

(16) Yamaguchi S, Purevsuren J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Furui M, Fukao T, Shigematsu Y, Fukuda S: Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency and newborn screening in Japan. 2013 Joint Meeting of the Newborn Screening and Genetic Testing Symposium (NBS&GTS) and the International Society for Neonatal Screening (ISNS). Atlanta, USA, May 2013

(17) Yamaguchi S: Diagnosis and treatment of mitochondrial fatty acid oxidation defects. The Second Forum of International Translational Medicine of Clinical Genetics in Beijing - Development and Application of Genetic Technology 講演. Beijing, China, August 2013

(18) Yamada K, Kobayashi H, Takahashi T, Hasegawa Y, Purevsuren J, Fukuda S, Ito M, Yamaguchi S: Responsiveness of bezafibrate for neonatal onset form of glutaric acidemia type 1: comparison with milder form using in vitro probe assay. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Barcelona, September 2013

(19) Yamaguchi S, Yamada K, Kobayashi H, Takahashi T, Hasegawa Y, Purevsuren J, Ohkubo T, Watanabe M, Tsunemi T, Ishii A, Takuma H, Tamaoka A, Shigematsu Y, Fukuda S: Two Japanese cases of adult onset myopathic form of

glutaric acidemia type 1. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Barcelona, September 2013

(20) Yamaguchi S: A new treatment option for mitochondrial fatty acid oxidation defects: Bezafibrate, a PPAR agonist. 12th Asian Oceanian Congress on Child Neurology. Riyadh, Saudi Arabia, September 2013

(21) Yamaguchi S: Beriberi (Vitamin B1 deficiency) of young children lurking in modern life: A new approach for biochemical detection. 2013 Joint Meeting of 13th Asian Pan-Pacific Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition and 40th Japanese Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition シンポジウム. 東京, October 2013

(22) Yamaguchi S: Screening, diagnosis, and treatment of organic and fatty acid disorders. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD), The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD) Educational lecture. Chiba, November 2013

(23) 高橋知男, 山田健治, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: SIDS, ALTE 様症状で発症し先天代謝異常症と判明した 10 例の検討. 第 40 回日本マス・スクリーニング学会. 大阪, 2013 年 8 月

(24) 高橋知男, 山田健治, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: サリチル酸の酸化に及ぼす影響: in vitro probe assay による評価. 第 38 回日本医用マススペクトル学会年会. 神戸, 2013 年 9 月

(25) 高 遼, 佐々木 信一, 松野 圭, 石森 絢子, 南條 友央太, 牧野 文彦, 吉岡 正剛, 吉岡 泰子, 富永 滋, 高橋 和久: Fexofenadine は EGFR TKI 投与に伴う interstitial lung disease 発症を抑制する.

第 53 回日本呼吸器学会総会, 東京,  
2013.04.19

(26) 石森 絢子, 佐々木 信一, 松野 圭, 南  
條 友央太, 牧野 文彦, 吉岡 正剛, 吉岡 泰  
子, 中沢 武司, 富永 滋: 幼少期に発症した  
気管支拡張症の経過観察中に、喀痰培養で  
*Aspergillus lentulus* を検出した一例. 第  
87 回日本感染症学会学術集会, 2013.06.05

(27) 笹野仁史, 吉岡泰子, 松野 圭, 石森絢  
子, 南條友央太, 牧野文彦, 吉岡正剛, 佐々  
木信一, 富永 滋: 早期の PMX-DHP を含  
む集学的治療を行った amyopathic  
dermatomyositis 合併急速進行性間質性肺  
炎の 1 例. 第 205 回日本呼吸器学会関東地  
方会, 2013.07.13

(28) 井上 貴昭, 中沢 武司, 麻生 恭代, 成  
田 久美, 秋田 美佳, 石井 幸, 田中 裕, 南  
條 友央太, 大日方 薫, 佐々木 信一, 堀  
賢: ICU が抱える感染症の諸問題 救命セ  
ンターに発端をなす 2 剤耐性 *Acinetobacter*  
*Baumannii* アウトブレイクとその制御過程.  
第 61 回感染症学会東日本地方会,  
2013.10.10

(29) Yasuko Yoshioka, **Shinichi Sasaki**,  
Kei Matsuno, Ayako Ishimori, Yuta Nanjo,  
Humihiko Makino, Keiko Muraki,  
Shigeru Tominaga, Kazuhisa  
Takahashi: Two Cases Of Rapidly  
Progressive Interstitial Pneumonia  
Associated With Clinically Amyopathic  
Dermatomyositis Successfully Treated  
With Early Intensive Therapy. 18th  
Congress of Asian Pacific Society of  
Respirology, Yokohama, 2013.11.12

(30) 南條友央太, 佐々木信一, 中澤武司,  
木下綾子, 関口康宣, 成田久美, 岩崎沙奈美,  
飯田美奈子, 月山智美, 古田あずさ, 金森由  
和, 玉野知佐, 伊藤友美, 鈴木俊介, 唐島孝  
彰, 米山桂一, 富永 滋: 当院における ART  
導入した HIV 感染症 21 症例の検討. 第 27

回日本エイズ学会総会, 熊本, 2013.11.20

(31) 木下綾子, 佐々木信一, 中沢武司, 南  
條友央太, 高森建二, 須賀 康: 順天堂大学  
浦安病院における過去 10 年間の新規 HIV  
感染者にともなった皮膚症状の検討. 第 27  
回日本エイズ学会総会, 熊本, 2013.11.20

(32) 村木 慶子, 松野 圭, 小池 建吾, 推名  
健太郎, 朝尾 哲彦, 本間 裕一郎, 宿谷 威  
仁, 柴山 里奈, 小山 良, 嶋田 奈緒子, 木  
戸 健治, 佐々木 信一, 富永 滋, 高橋 和  
久: 順天堂大学におけるクリゾチニブの使  
用経験. 第 54 回日本肺癌学会総会, 東京,  
2013.11.22

(33) 長野則之, 長野由紀子, 外山雅美,  
佐々木信一, 中澤武司, 堀 賢, 柴山恵吾,  
荒川宜親: NDM-1 メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ,  
OXA-181 カルバペネマーゼ等同時産生の広  
範囲抗菌薬耐性 *Klebsiella pneumoniae* の  
出現. 第 25 回日本臨床微生物学会総会, 名  
古屋, 2014.02.01

(34) 中村美子, 中澤武司, 秋田美佳, 成田  
久美, 井上貴昭, 大日方薫, 佐々木信一:  
選択培地を用いた *Acinetobacter* の環境リ  
ザーバーに関する環境調査. 第 29 回日本環  
境感染学会総会, 品川, 2014.02.15

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

(36) 中澤武司, 南條友央太, 井上貴昭,  
佐々木信一, 西田香南, 大出恭代, 三澤 成  
毅, 横山栄二, 菊池 俊: 肝膿瘍より分離さ  
れた *Desulfovibrio desulfuricans* の 1 例.  
第 44 回日本嫌気性菌感染症学会総会・学術  
講演会, 那覇, 2014.02.22

### 3. 著書

(1) 佐々木信一. がん性髄膜炎に対する治療戦略. 編集:大江裕一郎, 加藤晃史, 堀之内秀仁. ガイドラインに載っていない肺がん Practical Treatment. 東京:Medical View 社, 2014; 181-5.

### H. 知的財産権の出願・登録状況

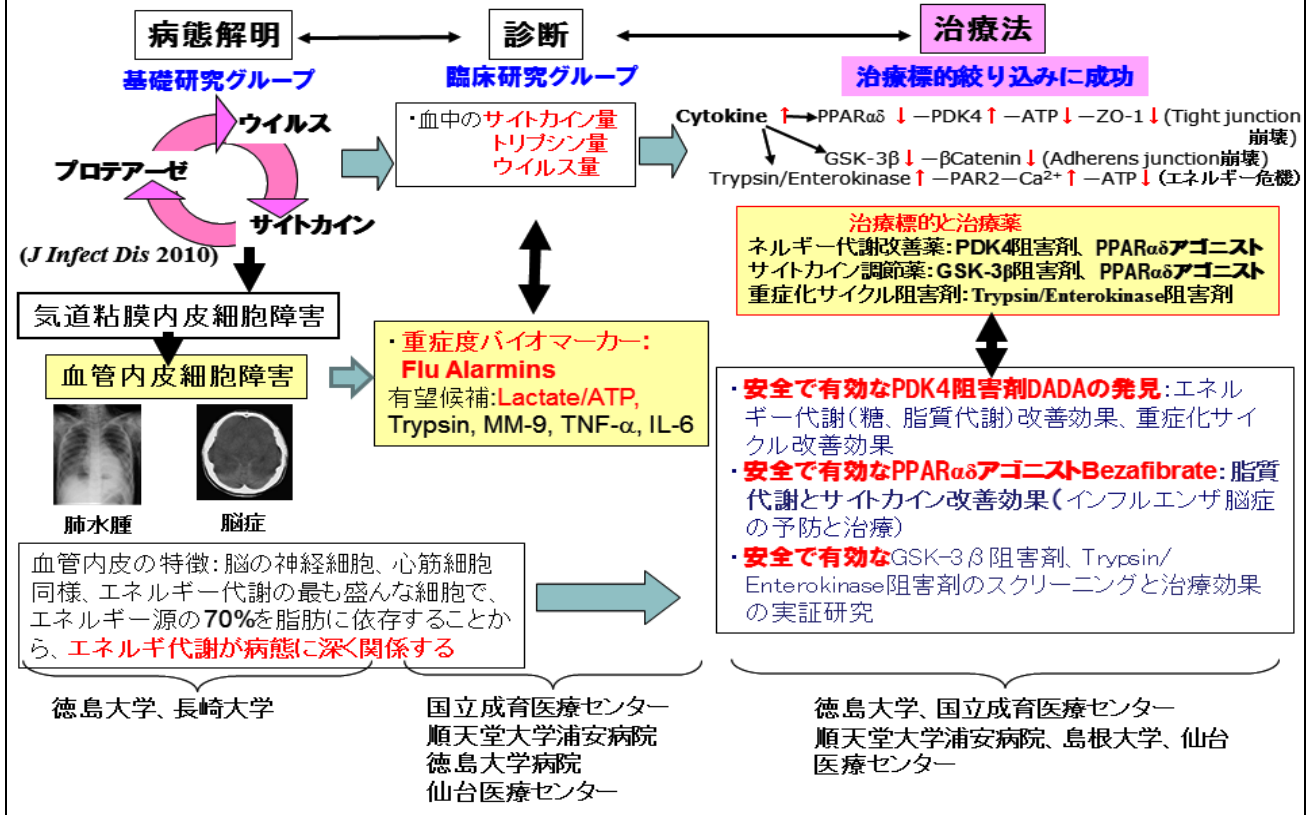
- 1) PCT/JP2013/007649、出願日 2013 年 12 月 26 日、発明者:木戸博、山根一彦、他、PDK4 阻害剤及びその利用
- 2) 特願 2013-174874、出願日 2013 年 8 月 26 日、発明者:木戸博、石田晃彦、他、血液検体の ATP 測定方法及びキット
- 3) 特願 2013/24953、出願日 2013 年 7 月 14 日、発明者:木戸博、田中徹、他、インフルエンザウイルス感染症の予防・治療剤
- 4) 台湾出願 102121622、出願日 2013 年 6

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



# 研究推進の流れ図



研究組織図



## II. 分担研究報告書



## 分担研究報告書

平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金「重症のインフルエンザによる肺炎・脳症診断・治療に関する研究：新規診断・治療に関する提案と検証」

### 分担研究報告書

重症化モデル動物実験によるインフルエンザ肺炎・脳症診断・治療に関する研究：  
新規診断・治療に関する提案と検証

研究分担者 木戸博（徳島大学疾患酵素学研究センター 特任教授）  
研究協力者 高橋悦久（徳島大学疾患酵素学研究センター 特任助教）  
山根一彦（徳島大学疾患酵素学研究センター 大学院生）  
Irene Lorinda Indalao（徳島大学疾患酵素学研究センター 大学院生）  
榎本奈緒子（徳島大学疾患酵素学研究センター 研究員）

### 研究要旨

マウスのインフルエンザ感染モデル実験により、平成 25 年度は以下の結果を得た。①インフルエンザ感染による致死性重症化は、「サイトカインー代謝不全」サイクルと「インフルエンザー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証明された。即ち、インフルエンザ感染で引き起こされるサイトカインストームにより代謝不全が引き起こされ、血管内皮細胞障害と多臓器不全に進展する機序が明らかになった。②体内代謝の中でも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、その 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ている。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、インフルエンザー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。現在、DADA よりもさらに効果的な PDK4 阻害剤の検索を開始している。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。

## A. 研究目的

重症インフルエンザ感染による肺炎・脳症・心筋炎の主要な病因は、血管内皮細胞障害による透過性亢進、多臓器不全である。本年度の研究により図1に示すように、“インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ”サイクルの回転を制御する機構として、“サイトカインー代謝不全”サイクルが初めて明らかになった。これらの発見を基盤に、新規診断・治療に関する提案のための検証を実施した。

インフルエンザ脳症、肺炎の病態解明から、図1に示すインフルエンザ サイトカイン プロテアーゼサイクルが、血管内皮細胞障害と多臓器不全の主要原因であることをこれまで解明してきており(*J Infect Dis* 202:991, 2010、*Cardiovasc Res* 89:596, 2011)、重症化の治療にはこのサイクルの回転を抑制する以下の項目を想定して研究を進めた。

- ①インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼサイクルの個々の因子の抑制による重症化防止の可能性。抗インフルエンザ薬、プロテアーゼ阻害剤、抗サイトカイン療法を検証する必要がある。なお、プロテアーゼ阻害剤は、trypsin と高病原性鳥インフルエンザの MSPL/TMPRSS13 が標的となる。
- ② インフルエンザ感染により、代謝破綻に伴ってミトコンドリア機能の低下とエネルギー代謝の阻害、ATP 産生低下が起きる。そのため、糖代謝の PDH の活性低下の調節薬と、Carnitine Palmitoyltransferase (CPT II) の活性低下の調節薬を中心に検討する。
- ③モデル実験動物で各種 Flu Alarmin 候補を検索して、重症化に先立つ生体の SOS マーカーを同定する。

## B. 研究方法

マウスの重症化モデル動物実験では、重症化しやすい離乳期直後の3週齢マウス (C57BL/6CrSlc または、BALB/c) 雌を用いて実験した。インフルエンザウイルス株によって感染重症化の程度が異なるため、重症化しやすい InfluenzaA/PR/8/34(H1N1)株を用いた。

### (倫理面への配慮)

動物実験に当たっては、徳島大学動物実験委員会の承認を得て、動物実験ガイドラインに沿って実施した。

## C. 研究結果

PR/8 インフルエンザ感染モデルマウスの実験による代謝破綻の機序とその治療法の開発。

### ①抹消血の代謝不全に現れるインフルエンザ感染の重症化

インフルエンザ感染後の生体応答として各種サイトカインの誘導が感染2-3日目より生じ、生体防御系としての液性免疫誘導が感染4日目より開始されるが、代謝不全が明らかになる時期は感染7日目前後で、この時期から個体の死亡が出始める。図2は、死亡例が出る直前の感染7日目の血液中の代謝因子の変動をモニターした結果である。マウスは感染によって極端な食欲の低下が現れ、血糖値は低下して、これに伴って乳酸値が増加する。さらに糖代謝に連動してケトン体が急上昇するが、これらの変化は感染するウイルス量に比例した変化を示した。血液中のATP量はミトコンドリアの無い赤血球のATP値を表しており、比較的減少傾向はマイルドであった。このことから、抹消血の糖、ケトン体、

乳酸値は、肝臓、筋肉などの各臓器の糖代謝、脂質代謝不全、特に Acetyl-CoA の産生に係わるエネルギー代謝不全の現れと推定された。

### **インフルエンザ感染は、脳を除く各臓器の Pyruvate Dehydrogenase Complex (PDC) の中で、Pyruvate dehydrogenase 4 (PDK4) を増加させて Pyruvate Dehydrogenase (PDH) 活性の低下を導いた。**

図 2 から全身各臓器の糖代謝、脂質代謝不全、特に Acetyl-CoA の産生に係わるエネルギー代謝不全と推定され、その標的酵素として、PDH の活性調節因子の影響が推定された。表 1 は PDH 活性をリン酸化によってネガティブに調節する Pyruvate dehydrogenase 1-4 (PDK 1-4) と、脱リン酸化によって PDH 活性をポジティブに調節する、Pyruvate Dehydrogenase phosphate phosphatase (PDP) の mRNA レベルの変化を示している。感染 0 日の値を 1 としたときに、感染 3 日目、感染 7 日目の値を示しているが、感染 7 日目に PDK4 の著明な誘導が脳を除く心臓、肺、肝臓、筋肉で観察された。

### **インフルエンザ感染後のエネルギー代謝不全の誘導**

インフルエンザ感染による PDK4 の増加は、PDH をリン酸化して PDH 活性の低下を引き起こすと同時に、ミトコンドリアでの ATP 産生の低下を引き起こすことが明らかになった。図 3 に示すように、脳を除く肺、心臓、肝臓、筋肉で PDH 活性の低下とほぼ平行して各臓器の ATP レベルの低下が見られた。初感染部位の肺では、感染 3 日目より PDH、ATP の有意な低下が、心臓、肝臓、筋肉では感染後 7 日目に有意な低下が観察された。

### **既存薬中に見いだされた新規 PDK4 阻害剤**

以上の結果から、インフルエンザ感染時のミトコンドリアのエネルギー代謝の中で、糖代謝と脂質代謝の合流する Acetyl-CoA 量を調整する PDH 活性とその調節因子の PDK4 が極めて重要であることが明らかになった。そこで PDK4 阻害剤の検索を実施した。これまで PDK4 阻害剤として知られていた化合物に、副作用はあるものの古くより知られていた dichloroacetate (DCA)、その他 AZD7545、radicicol 等が知られていた。これらの中で副作用の報告があるものの先天性 PDH 酵素欠損症患者に使用されていた化合物が DCA である。我々は、従来 PDK4 阻害活性の報告の無かった DCA 誘導体、diisopropylamine dichloroacetate (DADA) に DCA とほぼ同等の PDK4 阻害活性を見出した。表 2 にその結果を示す。DCA の PDK4 に対する  $IC_{50}$  は  $57.8 \mu\text{M}$  であるのに対して、DADA の PDK4 に対する  $IC_{50}$  は  $50.9 \mu\text{M}$  でほぼ同等の阻害活性を認めた。DADA は従来肝臓保護剤として、約 50 年間臨床で使用されてきた薬剤で、副作用の報告は無い。さらに古くは vitamin B15 の pangamic acid の有効成分として広く安全に使用されてきた経緯のある化合物である。

### **インフルエンザ感染重症化に対する DADA の治療効果**

DADA が PDK4 を選択的に抑制することから、インフルエンザ感染重症化への DADA の治療効果の検討が行われた。図 4 に示すようにインフルエンザ感染と同時に DADA を 1 日 2 回、1 日量  $50 \text{ mg/kg}$  投与して感染後 7 日目の各臓器での PDH 活性と ATP レベルを測定した。DADA 投与群では、生理食塩水投与の感染群に比べて、PDH 活性と ATP レベルは非感染群のレベルにまで回復していた。なお脳では、PDH 活性、ATP レベルに DADA は影響しなかった。

## ⑥DADA のサイトカインストーム抑制効果

図1に示すようにサイトカイン誘導は体内代謝の破綻を誘導するが、体内代謝の回復はサイトカインレベルを正常化すると推定された。そこで、DADAの投与に伴う肺内の各種サイトカインの変動を調査した。図5に示す如く、感染2日目のTNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ はインフルエンザ感染で著明な誘導を引き起こして、サイトカインストーム状態であることが判る。一方DADAの投与群では各種サイトカインの誘導は抑制されていた。特に、DADAのTNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-2、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ の抑制効果は著名であった。

## ⑦DADA 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抑制効果

図1に示す如く、インフルエンザの増殖サイクルは、インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼサイクルで調整されている。サイトカインレベルが、DADAによって低下した場合、プロテアーゼレベル、インフルエンザウイルスの増殖レベルに影響すると推定される。図6は、初感染部位の肺の2日目、心臓、肝臓、筋肉では感染4日目で、trypsinが誘導され、ピークに至る。この条件下で、trypsin誘導へのDADAの効果を検証した。

いずれの臓器のtrypsin mRNA量もDADAの投与で有意に減少した。なお、図3、4に示すPDH活性、ATP量の場合、脳への影響は見られなかったが、trypsin mRNA量の場合、インフルエンザ感染で脳のtrypsin mRNAは有意に増加して、DADAはその増加を良く抑制した。脳のtrypsinが多く局在する部位として脳の血管内皮細胞があり、内皮細胞ではインフルエンザ感染で増加したサイトカインに

直接触れるため、内皮細胞ではtrypsin mRNAが増加したと推定された。脳の血管内皮細胞では、血液・脳関門をウイルスもサイトカインも通過できないため、神経細胞では感染による影響から免れていると考えられる。

「インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ」サイクルの中で、サイトカインとプロテアーゼレベルが低下した結果、インフルエンザウイルスの増殖が抑制されると推定された。そこで、ウイルス増殖の著明な肺でウイルス増殖を検討した。ウイルス遺伝子NS-1の定量的RT-PCRでモニターした結果を図7に示す。インフルエンザウイルスは感染後4日目をピークに増加したが、DADAの投与はウイルス増殖を感染後4日目と6日目で有意に抑制した。

## ⑧DADA の生存率改善効果

以上の結果から、図1に示すDADAのPDK4抑制効果は、代謝破綻、特にエネルギー代謝障害を抑制してサイトカインレベルを改善し、その結果インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼサイクルの回転を抑制した。そこで、これらの結果が生存率の改善にどのように影響するかを検証した。図8に示すように、マウスが感染後10日目までに全例死亡する120 pfuの致死量のウイルス感染でも、DADAの投与により半数のマウスが生存した。体重減少、摂食量、摂水量の減少の程度も生理食塩水投与の感染群に比較して軽度に推移した。また図には示していないが、60 pfu（半数致死量）のウイルス感染の場合、50%の生存率を示したが、DADAの投与はマウスを全例生存させた。この場合、体重減少、摂食量、摂水量の減少が生理食塩水投与の感染群で明確に観察されたが、DADA投与群ではほとんど観察されなかった。



初感染部位の肺の炎症を DADA 投与群と、生理食塩水投与の感染群で比較した。60 pfu のインフルエンザウイルスを経鼻感染させた後、2日目、4日目、6日目の肺の炎症をモニターした。図9に示すように、感染2日目以後6日目まで急速に炎症性細胞が肺に浸潤したが、DADA の投与は炎症性細胞の浸潤を抑制していることが明らかとなった。

#### ⑨Flu Alarmin の検討

昨年についてFlu AlarminとしてLactate/ATP比が有用であることが確認されたが、本年度の研究から、血液中のPDK4 mRNAレベルとPDH活性について検討を開始した。

#### ⑩インフルエンザ脳症の患者の熱不安定性CPT II 遺伝子を導入したモデルマウスの作成

熱不安定性CPT II 遺伝子、F352Cの遺伝子改変したマウスを作成して、感染動物実験が可能なレベルにまで増殖を試みているが、F352Cのホモマウスは生まれてこず、全てヘテロマウスとワイルドタイプマウスのみであった。なお、ヒトでは稀ではあるが、F352Cホモを患者の中に認めることができる。またBezafibrateをCPT II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。

#### D. 考察

平成25年度の研究により、インフルエンザ感染重症化機序で新たな発見がなされた。即ち感染重症化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明らかとなった。従来、インフルエンザ感染の治療の主体として抗ウイルス剤が使用されていたが、これらの治療薬は、感染から4-5日目までが有効期間で、5日を過ぎた感染者、特に重症化の始まった感染者には無効とされ、有効な治療薬がこれまで無かった。そのため、本プロジェクトにおいて、代謝不全の治療薬としてDADAが見いだされたことは極めて大きな意義を持つ。DADAが最も有効に作用するためには、できるだけ早期から抗インフルエンザ薬と併用して用いることが有効と考えられる。

図1に示す「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」は、インフルエンザ以外の各種感染症の治療、さらには「サイトカイン-代謝不全」サイクルが関与する様々な疾患、例えば癌の悪液質、心不全、糖尿病治療への応用が可能と推定される。

今後、これまでの成果を基盤に、抗インフルエンザ薬との併用効果、感染重症化が始まってからでも効果が期待できるか否かの検討が必要である。またDADAのPDK4に対する $IC_{50}$ は $50.9 \mu\text{M}$ と比較的弱く、今後より強力なPDK4阻害剤をスクリーニングすることが強く望まれる。

#### 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。サイトカインストームの治療効果はさらに、「インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ」サイクルの回転を抑制して、著明なウイルス増殖阻害効果を示すことが初めて明らかになった。

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。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 論文発表

#### 1. 論文発表

(1) Chida J, Ono R, Yamane K, Hiyoshi M, Nishimura M, Onodera M, Nakataki E, Shichijo K, 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.

(2) 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, 2013.

(3) 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.

(4) Shinahara W, Takahashi E, Sawabuchi T, Arai

M, Hirotsu N, Takasaki Y, Shindo S, Shibao K, Yokoyama T, Nishikawa K, Mino M, Iwaya M, Yamashita Y, Suzuki S, Mizuno D, 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. *PLoS One* 2013; 8(7):e70060.

(5) Chida J, Kido H. Extraction and quantification of adenosine triphosphate in mammalian tissues and cells. *Methods Mol Biol* 2014; 1098(1): 21-32.

(6) 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 日本臨床内科医会誌 2013; 27(5): 578-583.

(7) 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.

(8) 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.

(9) 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.

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

(11) 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.

(12) 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, 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)
- (2) 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)
- (3) 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)
- (4) 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)
- (5) 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
- (6) 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)
- (7) 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)

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

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

### 【特許取得】

- 1) 特許取得、香港 HK1151733、登録日2013年9月13日、発明者:木戸博、武井恒知、水野大、合成ペプチドを含有する抗原薬物ビークルとこれを用いる粘膜ワクチン
- 2) 特許取得、中国 ZL200980111515.6、登録日2013年3月13日、発明者:木戸博、武井恒知、水野大、合成ペプチドを含有する抗原薬物ビークルとこれを用いる粘膜ワクチン
- 3) 特許取得、特許第5182753号、登録日2013年1月25日、発明者:木戸博、寺島薫、インフルエンザ罹患リスクの予測方法
- 4) 特許取得、CANADA 2,579,710 登録日2013年1月8日、発明者:木戸博、水野大、経粘膜及び経皮投与を可能にする抗原薬物ビークル、これを用いる粘膜免疫の誘導法、粘膜ワクチンおよび DDS
- 5) 特許取得、EPC No.1930025、登録日2013年6月12日、発明者:木戸博、水野大、IgA 抗体の選択的産生から IgA 及び IgG 両抗体産生への切換えを可能にする

抗原薬物ビークルとこれを用いる経鼻・粘  
膜ワクチン

**【特許出願】**

- 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

表1 Relative mRNA expression levels of PDPs and PDKs after severe IAV infection.

	Days after infection	Brain	Heart	Lung	Liver	Skeletal muscle
PDP1	Day 0	1.0±0.31	1.0±0.18	1.0±0.23	1.0±0.12	1.0±0.06
	Day 3	1.20±0.43	0.88±0.42	1.21±0.13	2.30±0.42**	0.72±0.21
	Day 7	0.68±0.24	0.66±0.20	0.43±0.11	2.77±0.22**	0.30±0.09**
PDP2	Day 0	1.0±0.37	1.0±0.12	1.0±0.12	1.0±0.18	1.0±0.18
	Day 3	2.0±0.52*	0.26±0.05**	1.51±0.58	2.19±0.24*	1.12±0.10
	Day 7	2.2±0.31*	0.20±0.06**	0.76±0.09	1.78±0.31*	2.17±0.27**
PDK1	Day 0	1.0±0.06	1.0±0.27	1.0±0.21	1.0±0.13	1.0±0.09
	Day 3	1.25±0.40	0.87±0.21	0.69±0.17	0.85±0.49	0.82±0.21
	Day 7	1.38±0.34	0.81±0.18	0.69±0.21	0.98±0.43	0.60±0.12*
PDK2	Day 0	1.0±0.06	1.0±0.18	1.0±0.23	1.0±0.12	1.0±0.18
	Day 3	1.66±0.34	0.93±0.43	0.40±0.11	2.06±0.37*	1.12±0.12
	Day 7	1.76±0.21	1.25±0.61	0.15±0.04	1.25±0.14	1.18±0.20
PDK3	Day 0	1.0±0.37	1.0±0.06	1.0±0.08	1.0±0.18	1.0±0.12
	Day 3	1.23±0.34	1.02±0.24	1.16±0.43	3.56±0.49**	0.68±0.18
	Day 7	1.01±0.24	1.07±0.15	1.01±0.09	4.68±0.31**	0.75±0.20
PDK4	Day 0	1.0±0.06	1.0±0.07	1.0±0.15	1.0±0.37	1.0±0.34
	Day 3	1.26±0.21	6.57±1.34**	5.01±1.23**	1.94±0.11	12.46±5.46**
	Day 7	1.37±0.1*	11.59±0.24**	3.59±1.34**	7.97±1.60**	65.32±7.99**

Data are mean ± SD. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , vs. before infection (Day 0) for each organ, by one-way analysis of variance and Turkey post hoc test.

表1 . インフルエンザ感染後の PDP、PDK mRNA レベル

表2 DCA- and DADA-induced percent inhibition and related  $IC_{50}$  values ( $\mu$ M).

		DCA			DADA		
		100 $\mu$ M	300 $\mu$ M	1000 $\mu$ M	100 $\mu$ M	300 $\mu$ M	1000 $\mu$ M
% inhibition	PDK2	9.0±0.3	33.0±0.18	58.4±3.3	16.6±0.2	37.8±0.2	57.2±4.1
	PDK4	63.9±3.3	88.0±1.0	97.8±12	70.2±2.1	93.4±10	99.1±13
$IC_{50}$ ( $\mu$ M)	PDK2		676.0			636.0	
	PDK4		57.8			50.9	

Data are mean ± SD.

表2 . PDK2、PDK4 に対する DCA と DADA の  $IC_{50}$  値

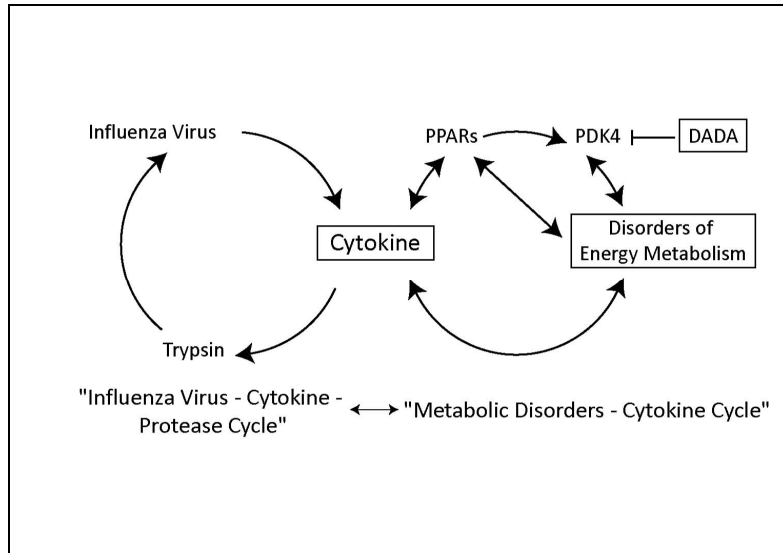


図1 . 感染重症化のカスケードを構成するインフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ サイクルにカップルしたサイトカイン-代謝不全サイクル

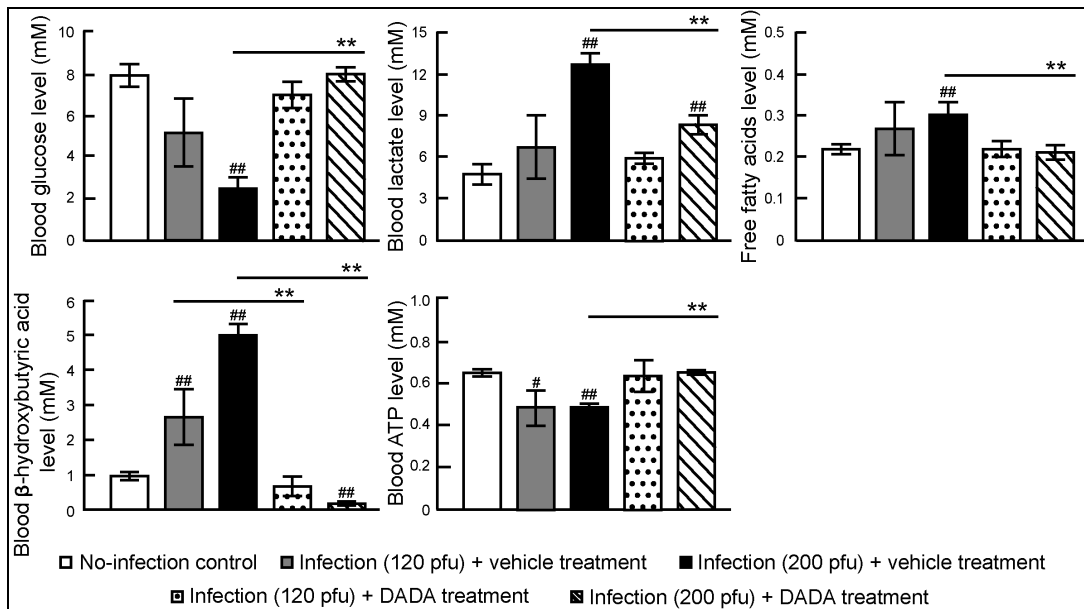


図2 . 致死量に近い120 pfuと致死量200 pfuのインフルエンザ感染に伴う感染第7病日目の血液中のGlucose、Lactate、Free fatty acids、b-Hydroxybutyric acid、ATP レベルの変化

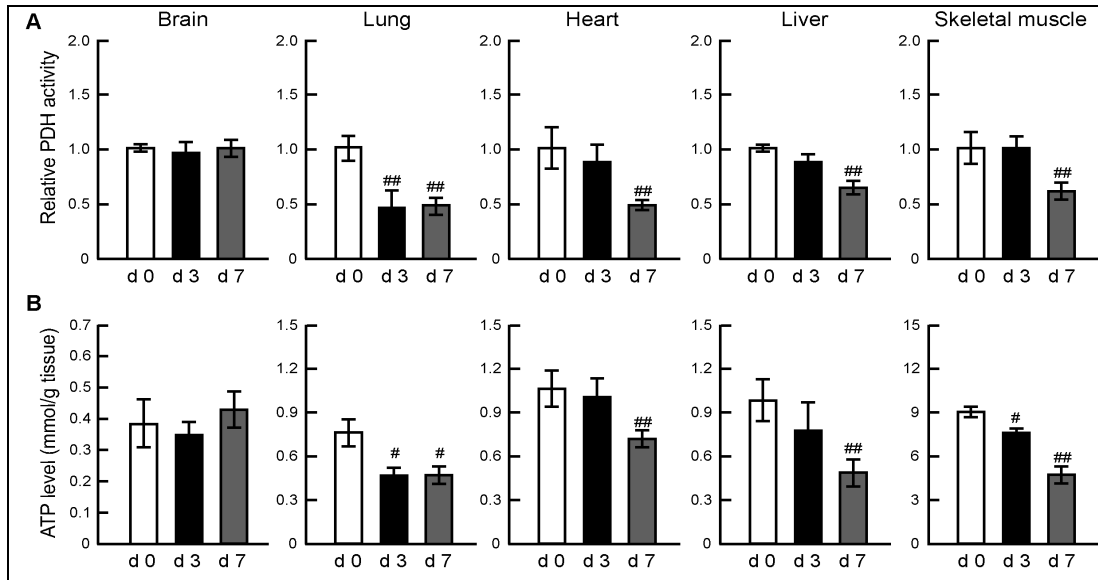


図3 . インフルエンザウイルス感染後 0, 3, 7 日目の各臓器の PDH 活性と ATP レベルの変化

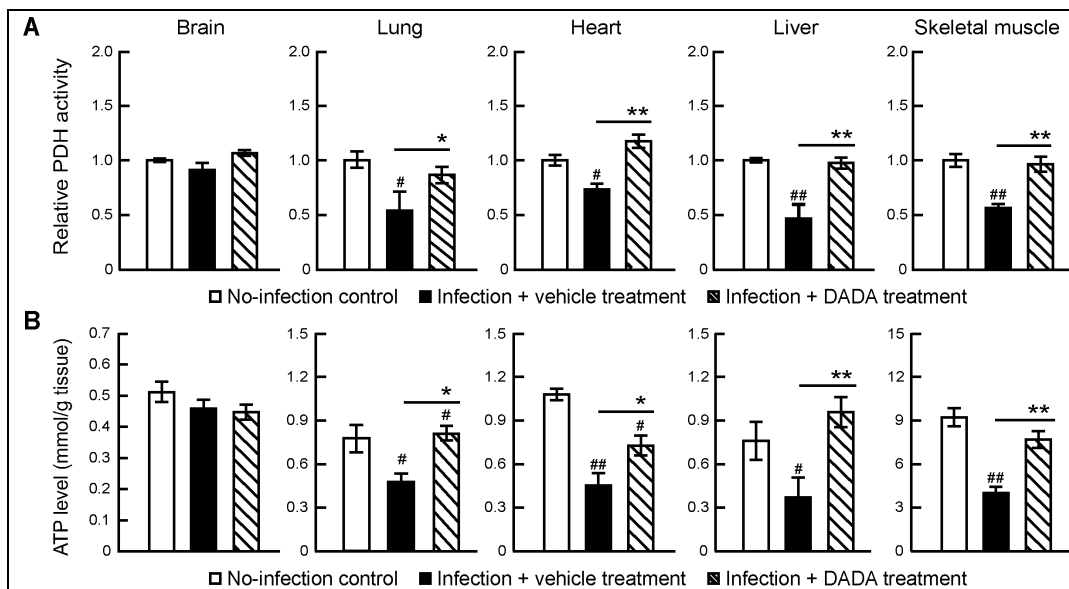


図4 . インフルエンザ感染による PDH 活性、ATP レベルの低下に対する DADA の治療効果

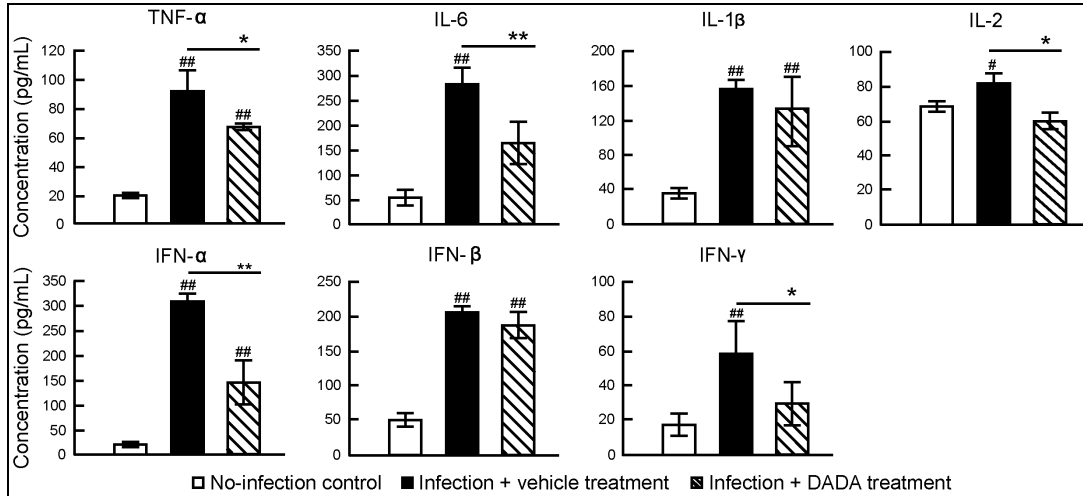


図5 . インフルエンザ感染に伴う各種サイトカイン誘導のDADAによる抑制効果

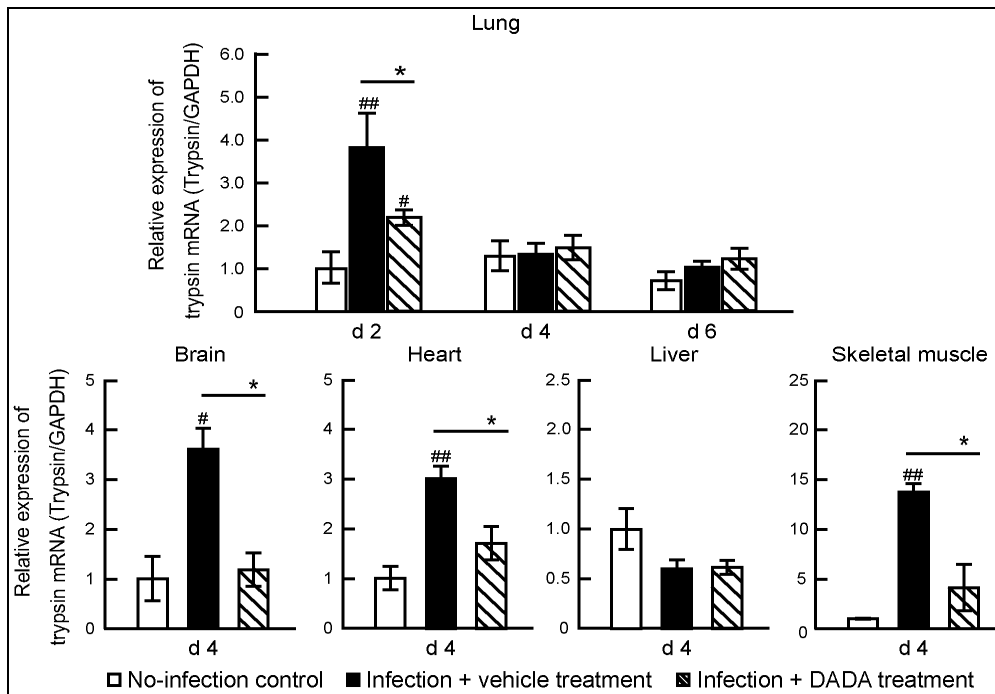


図6 . インフルエンザ感染に伴う各種臓器の trypsin mRNA レベルの変動に対するDADAの効果



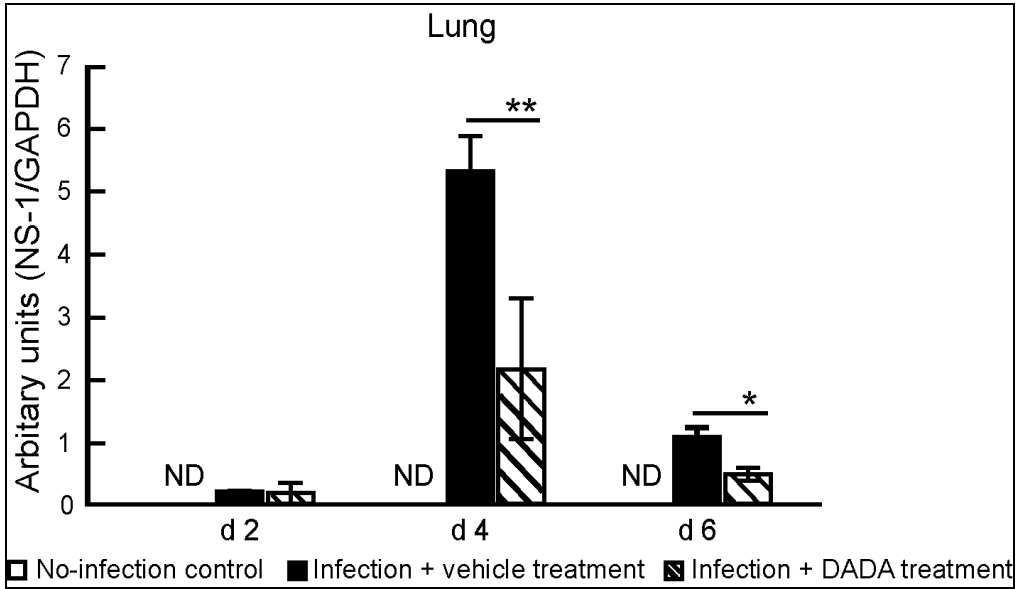


図7．肺におけるインフルエンザウイルスの増殖に対する DADA の抑制効果

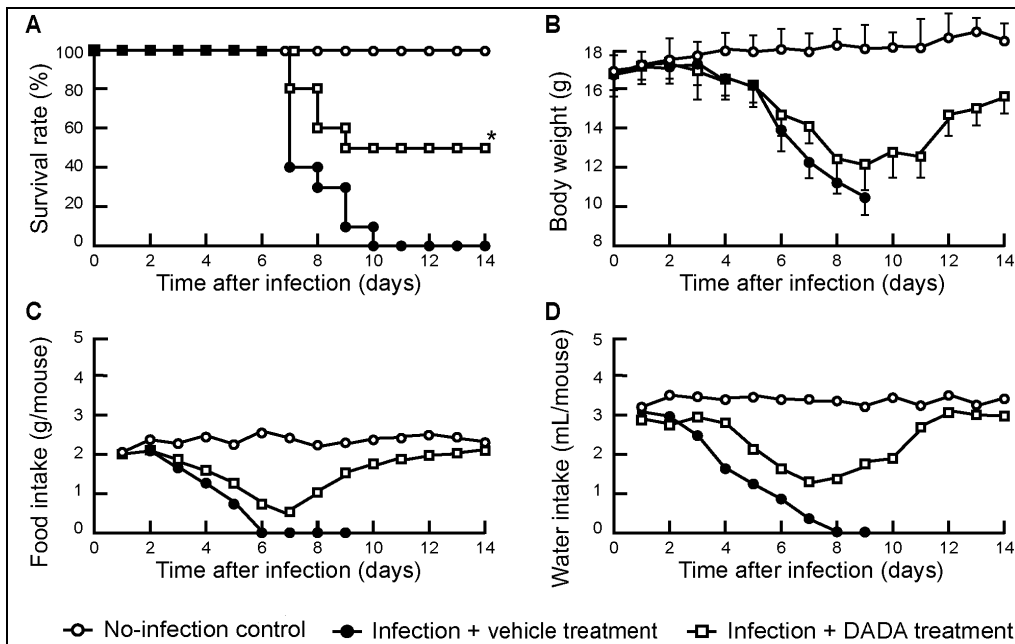


図8．インフルエンザ感染による生存率の DADA の改善効果

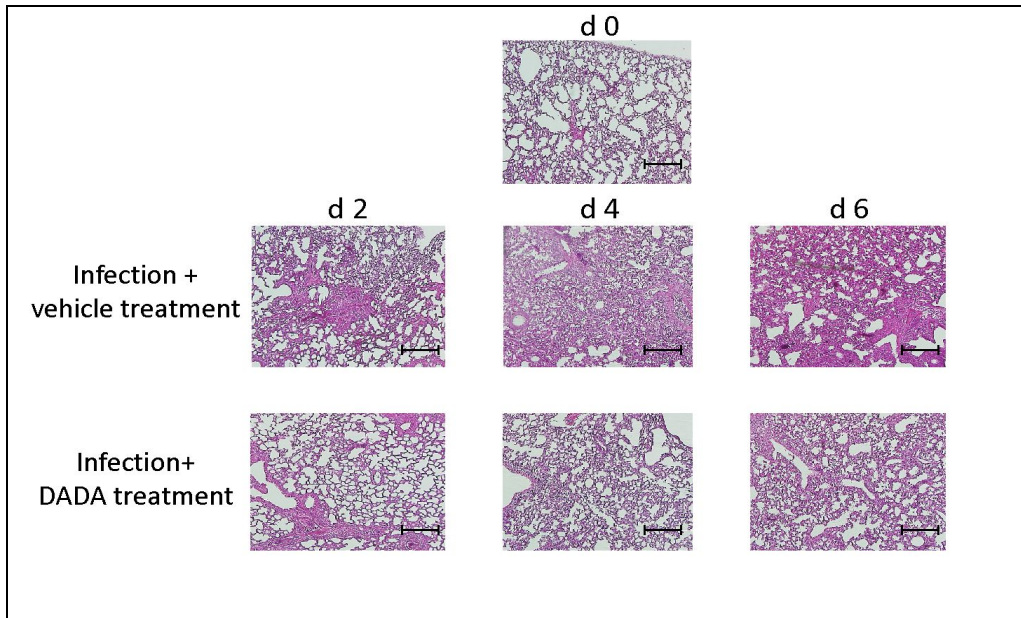


図9 . インフルエンザ感染による肺の炎症への DADA の抑制効果

## 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。さらにウイルスの感染成立、及び重症化に重要とされる宿主側のトリプシノーゲンを活性化する新たな酵素が存在する可能性を示した。

### 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。

### 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) i) 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(hPRS1, hPRSS2, hPRSS3-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(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。

ii)これらの細胞に 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 $\beta$ )、及び ISGs の誘導を Real-time PCR で、調べた。

iii)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、及び EK を発現させ、IAV 感染への影響を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究は、長崎大学動物実験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)

i)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)。EK-v1 が EK-v2 に比べ、トリプシノーゼンをより効率的に活性化した(図 6)。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、調べたほとんどの培養細胞で EK 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 7,8)。また、PRSS1 及び PRSS3 も多くの細胞に発現がみられた(図 9,10)。EK はトリプシノーゼンを活性化したが、TMPRSS2,4 と HAT はトリプシノーゼンを活性化できなかった(図 11)。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、PRSS1&3(トリプシノーゼン)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 12)。

ii)これらの細胞に IAV を感染させ、その増殖の程度を IAV-HA の発現量で見たとすると、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 13)。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 $\beta$  の反応が弱かった(図 14)。特に 293T 細胞では、IFN $\alpha$  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った(図 15)。

iii) IAV 感染の際には、図 16 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 $\alpha/\beta$  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 $\epsilon$ 、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 17)。活性化型の RIG-I (RIG-I-CA)、IPS-1、IKK $\epsilon$  は IFN $\alpha/\beta$  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 $\alpha/\beta$  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。さらに、EK を発現させた 293T 細胞では、IAV がより増殖していた (図 18)。

#### 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 を第一と考え、今後、A 型のみならず B 型も含めたインフルエンザウイルス (IFV) 感染患者さんの血液細胞、あるいは気管支肺胞洗浄 (BAL) 細胞におけるこれらの遺伝子発現を詳細にモニターして、ヒトの診断に応用できる Flu Alarmin を同定したい。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 17)。その他の分子についてもこの系で細かく検討した後、実験動物レベ

ルで、IAV 排除能を調べ、治療への応用が期待できるか検討したい。

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 12)。さらに、EK-v1, v2 アイソフォームの PRSS 活性化能の相違が、IAV 感染に与える影響も検討したい。

#### 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、感染の成立、重症化に関わる可能性のある新たなトリプシン様タンパク質分解酵素の存在が示唆された。

#### F . 健康危険情報

なし。

#### G . 研究発表 (平成 25 年度)

(ア) 論文発表

1. 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*, 2014, in press.
2. 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*. Epub 2014 Jan 28.
3. 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.
4. 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
5. 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.
6. Kohno T, Kubo Y, Yasui K, Haraguchi M, Shigematsu S, Chua KJ, Matsuyama T, Hayashi H. Serum Starvation Activates NF- $\kappa$ B Through G Protein  $\beta$ 2 Subunit-Mediated Signal. *DNA Cell Biol.* 31(11):1636-44, 2012

(イ) 学会発表

1. Hayashi H, Identification of poly(I:C)-induced pancreatitis-related genes in IRF2-deficient mice, 3rd International conference on "Current advances in Microbiology and Immunology"

June 21-22, 2012 (ULAANBAATAR, MONGOLIA)

2. インターフェロン $\gamma$ 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)
3. 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)
4. 血清枯渴はG Protein  $\beta$ 2を介したNF- $\kappa$ 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

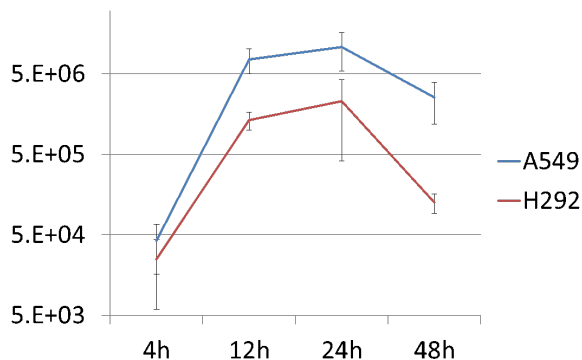


図 2. A549 細胞と H292 細胞の両方で、顕著な発現の上昇がみられた分子の例

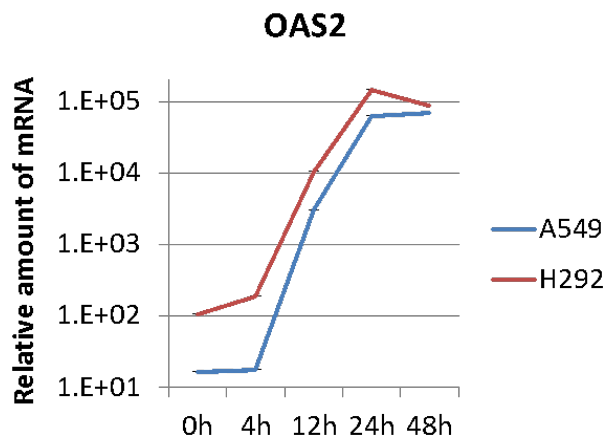


図 3. IAV 感染感受性 A549 細胞で、顕著な発現の上昇がみられた分子の例

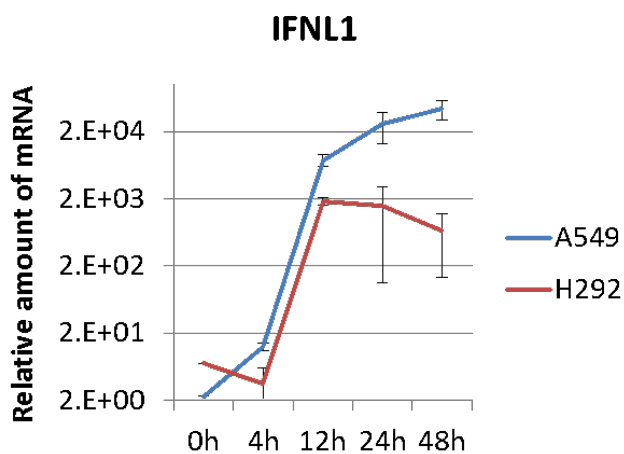


図 4. IAV 感染抵抗性 H292 細胞で、より顕著な発現の上昇がみられた分子の例

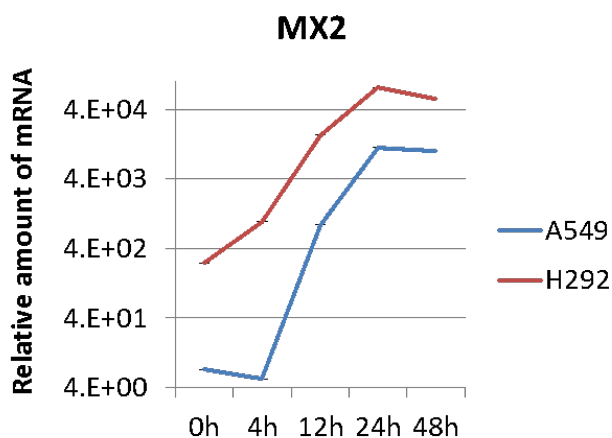


図5.従来の25エクソンからなるEK遺伝子(EK-v1)と26エクソンからなる新たなEK遺伝子アイソフォーム(EK-v2)の遺伝子構造の違い

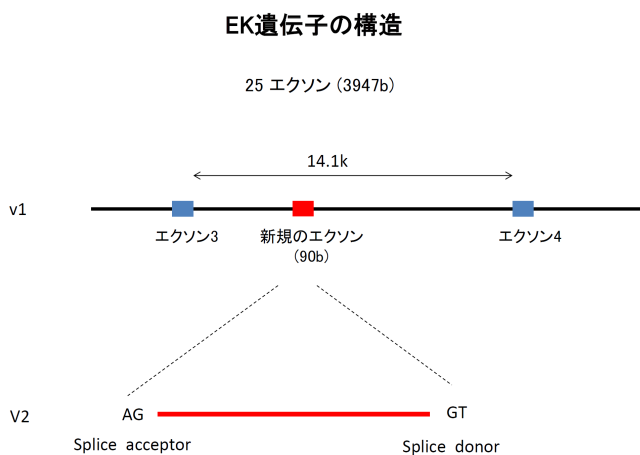


図6. EK-v1,v2 の III 型トリプシノーゲン (PRSS3) 活性化能の違い

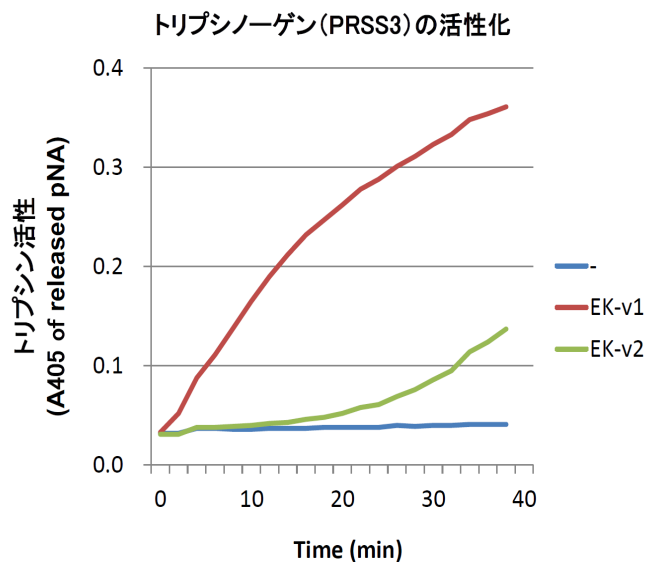
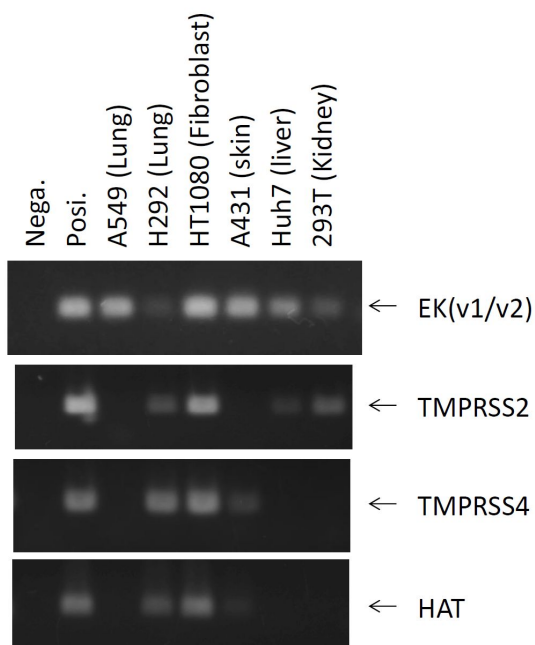


図7.各種培養細胞における細胞膜貫通型セリンプロテアーゼ (TMPRSSs) の発現 (RT-PCR)



Nega. : H<sub>2</sub>O、Posi.: 各遺伝子のcDNA

図8.各種培養細胞におけるエンテロキナーゼ遺伝子 (EK-v1,v2) の発現 (抗EK抗体を用いたWestern blot)

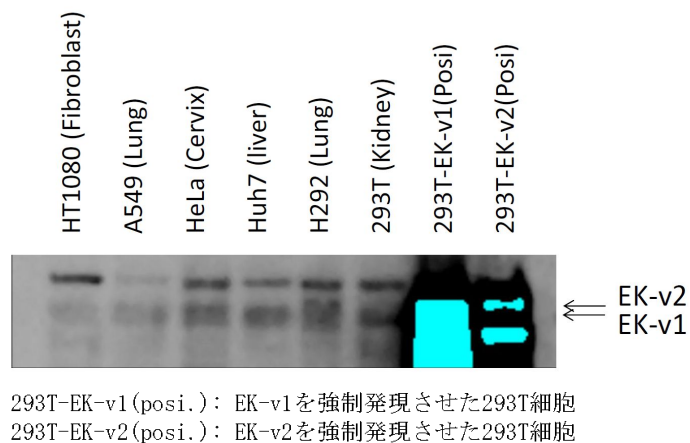
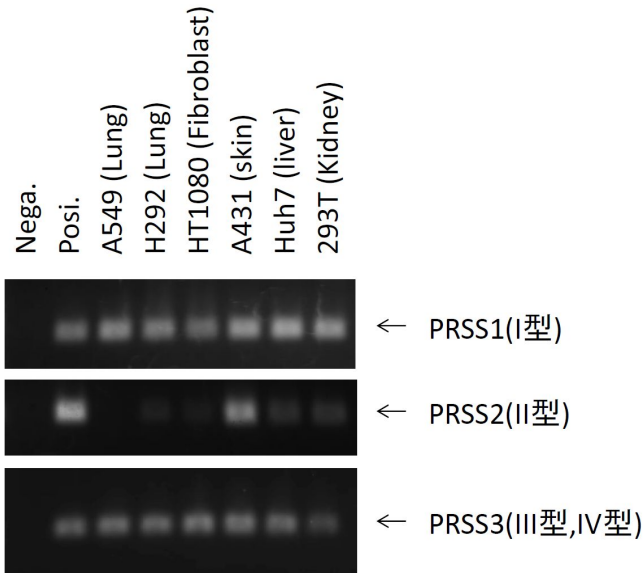


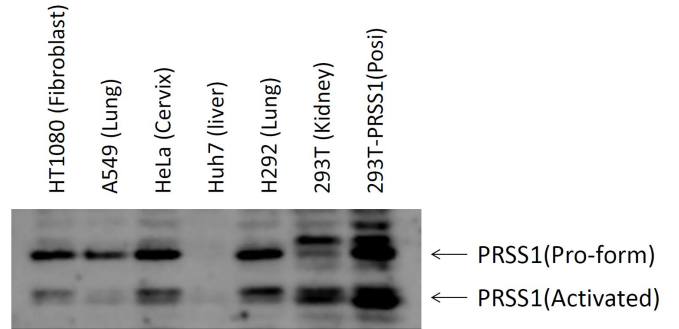


図 9 . 各種培養細胞におけるトリプシノーゲン遺伝子 ( PRSSs ) の発現 ( RT-PCR )



Nega. : H<sub>2</sub>O、Posi.: 各遺伝子のcDNA

図 10 . 各種培養細胞における I 型トリプシノーゲン遺伝子 ( PRSS1 ) の発現 ( 抗 PRSS1 抗体を用いた Western blot )



293T-PRSS1 (posi.) : PRSS1 を強制発現させた293T細胞  
矢印はPRSS1のProformと切斷、活性化型 ( Activated ) を示す。

図 11 . エンテロキナーゼ特異的なトリプシノーゲン ( PRSS3 ) の活性化

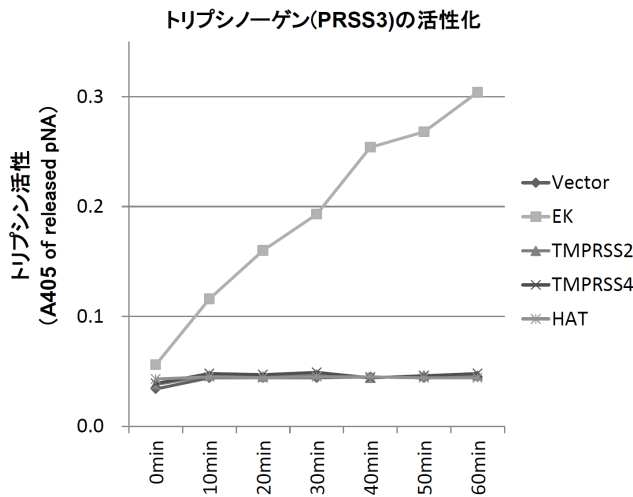


図 12 . トリプシノーゲン(PRSS1&3)及びエンテロキナーゼ(EK)を介した IAV 感染の促進機構

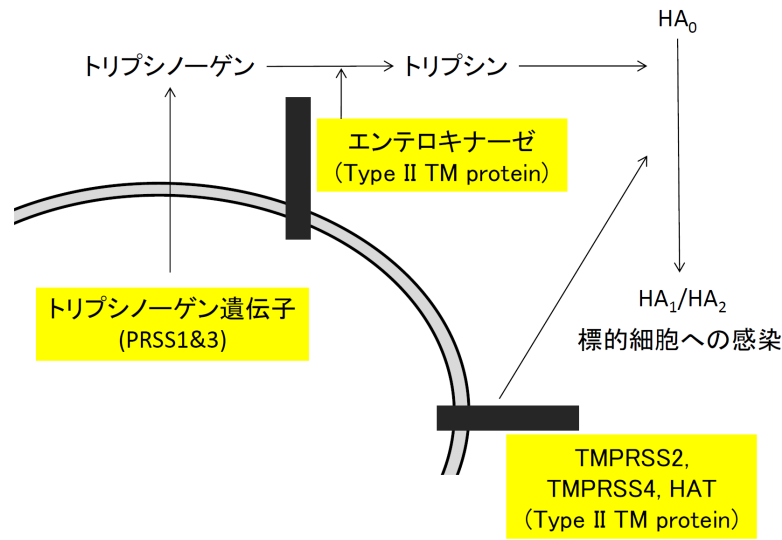


図 13 . 各培養細胞に IAV を感染させ、24 時間後に抗 IAV-HA 抗体を用いてウイルスの増殖を調べた。

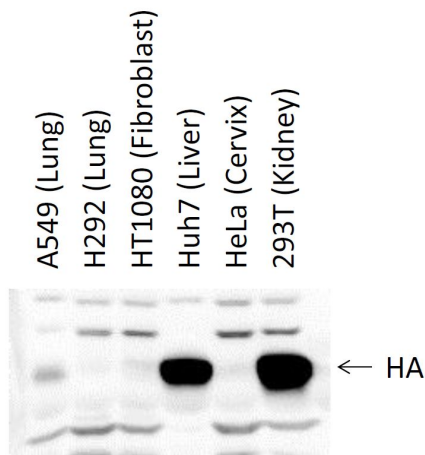


図 14 . 各培養細胞に polyI:C をトランスフェクトして RIG-I を活性化 16 時間後の IFN $\beta$  の発現を Real-time PCR で調べた。

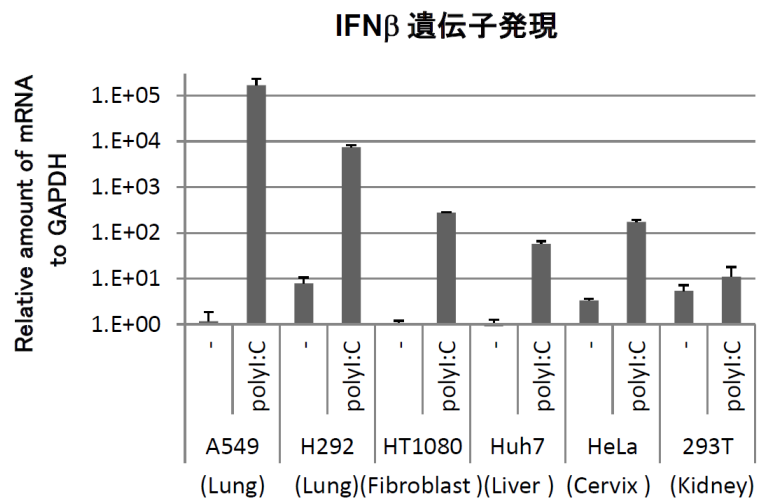


図 15 .各培養細胞を IFN $\alpha$ 刺激、あるいは polyI:C トランスフェクトして RIG-I を活性化し、16 時間後に、ISGs の一つである IFIT1 の発現を Real-time PCR で調べた。

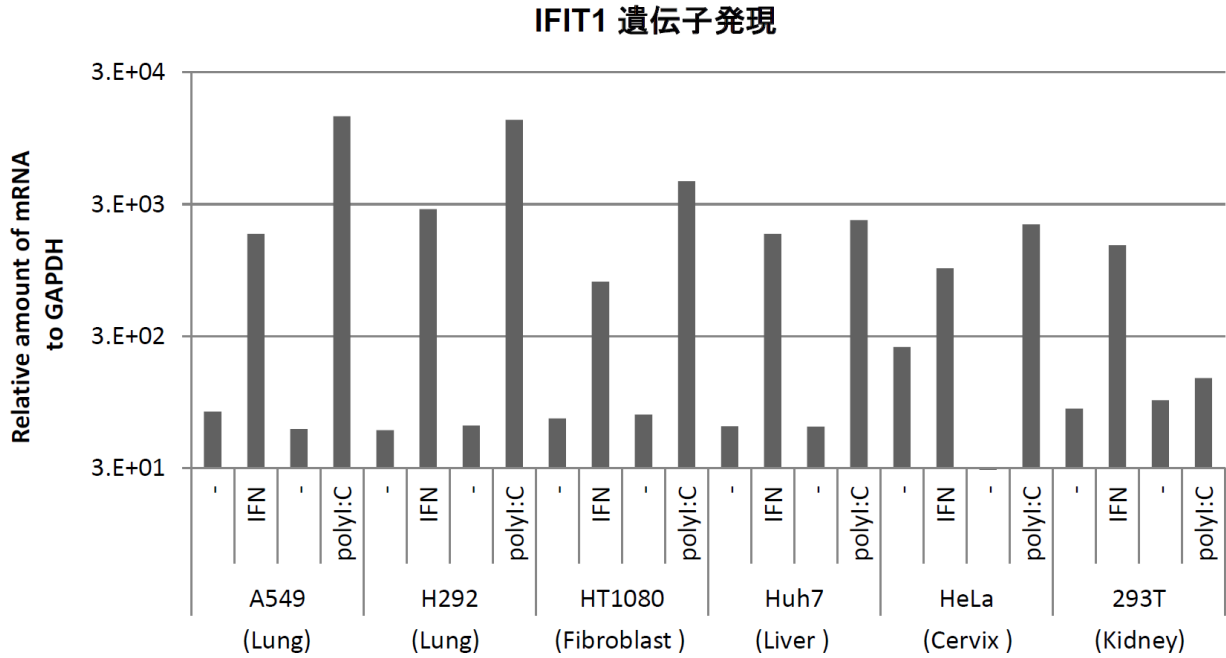


図 16 . **IAV感染とストレス顆粒(SG)**

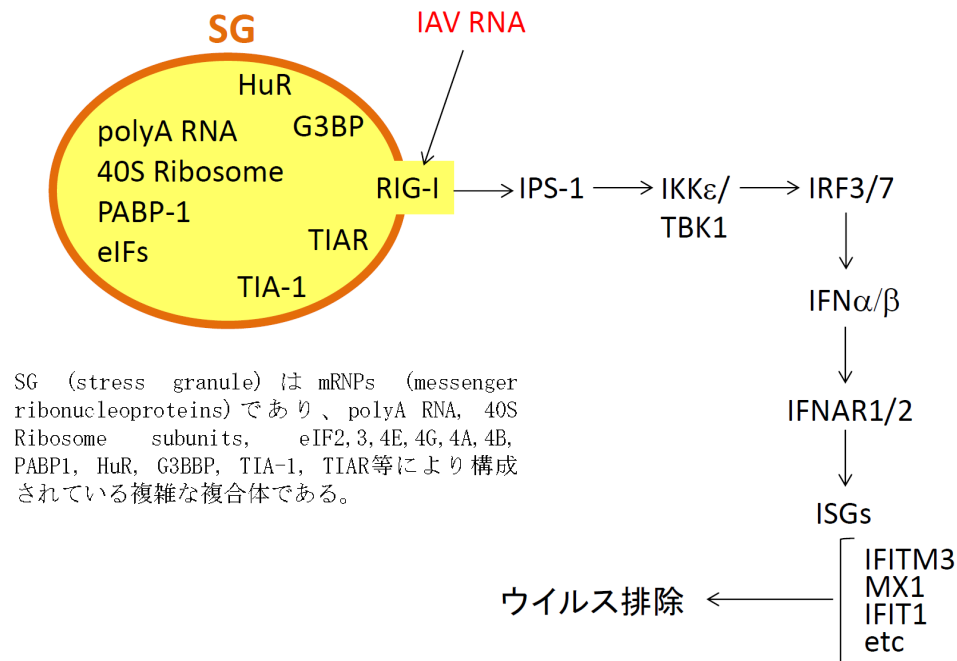


図 17 . 293T 細胞にいろいろなインターフェロン・シグナル伝達分子を強制発現させた後、IAV を感染させ、抗 IAV-HA 抗体を用いてウイルスの増殖を調べた。

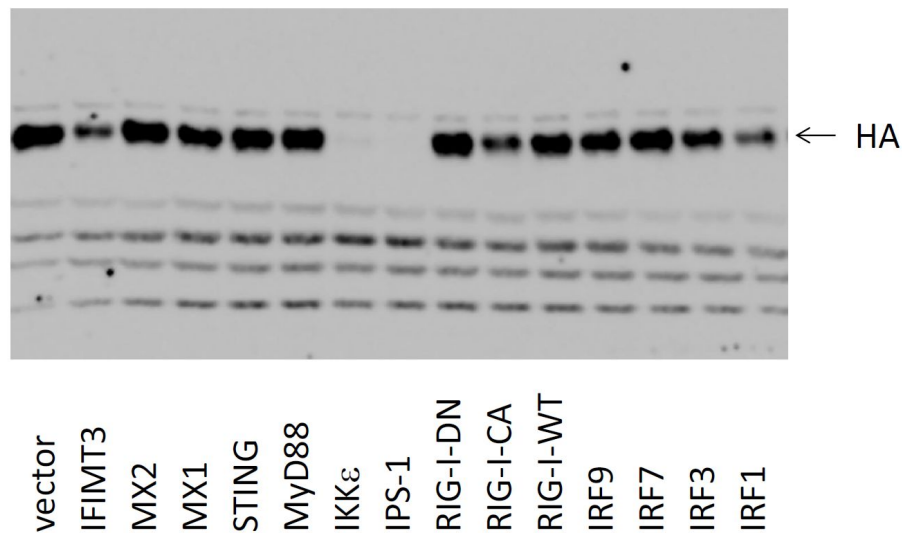
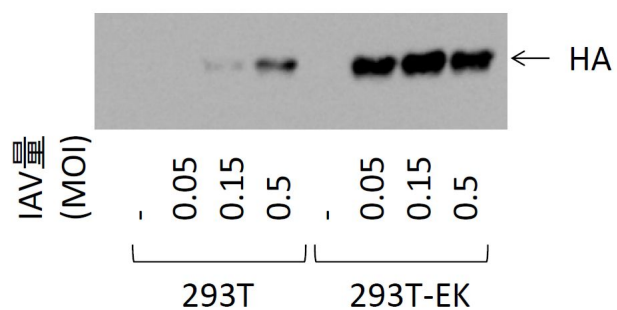


図 18 . 293T 細胞及び EK を強制発現させた 293T 細胞(293T-EK)に、感染させる IAV の量を変化させ、抗 IAV-HA 抗体を用いてウイルス増殖への影響を調べた。



293T-EK: EKを強制発現させた293T細胞  
 感染させるIAVの量を  
 MOI:0(-), 0.05, 0.15, 0.5と変化させた。

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			



厚生労働科学研究費補助金  
( 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 )  
分担研究報告書

**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、インフルエンザ心筋炎における MMP-9 の関与についての研究**

研究分担者 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にした。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 をもとにリバース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、これまで高病原性鳥インフルエンザウイルス HA の解列に関与すると言われてきた Furin や PCs は、P4 位が K の場合 processing しないが、MSPL は P4 位が R/K のいずれに対しても作用するため、全ての高病原性鳥インフルエンザウイルスの増殖への関与が示唆された。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。また肺のホモジネート中では IL-1beta、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インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ ” サイクルを介するプロテアーゼとして MMP-9 の発現上昇が認められている。本研究でクラリスロマイシン (CAM) を経口投与したマウスでは、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-kappaB 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。

## 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、我々は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-K0(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。

## B . 研究方法

(1)高病原性鳥インフルエンザウイルスが活性化されるかを調べるため、MSPL-K0 マウスに、ヘマグルチニン(HA)の解列部位を高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染に関わるとされているFurinが認識できるRKKRタイプからFurinが認識出来ないKKKRタイプに変異させ、感染による体重変化、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。更に、肺ホモ

ジネート中の炎症性サイトカインを調べた。

(2)マウスに季節性インフルエンザ(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に関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。

## C . 研究結果

(1)MSPL-K0 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-K0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K0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-K0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)。エバンズ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)。

#### 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示唆された。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の重症化の治療に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。今後、心臓のエコー解析により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に関して CAM の有用性を検証する。

#### E . 結論

#### G . 研究発表 (平成 25 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. Correction: Anti-Influenza

Activity of C<sub>60</sub> Fullerene Derivatives. PLoS One. 2013 Nov 12;8(11)

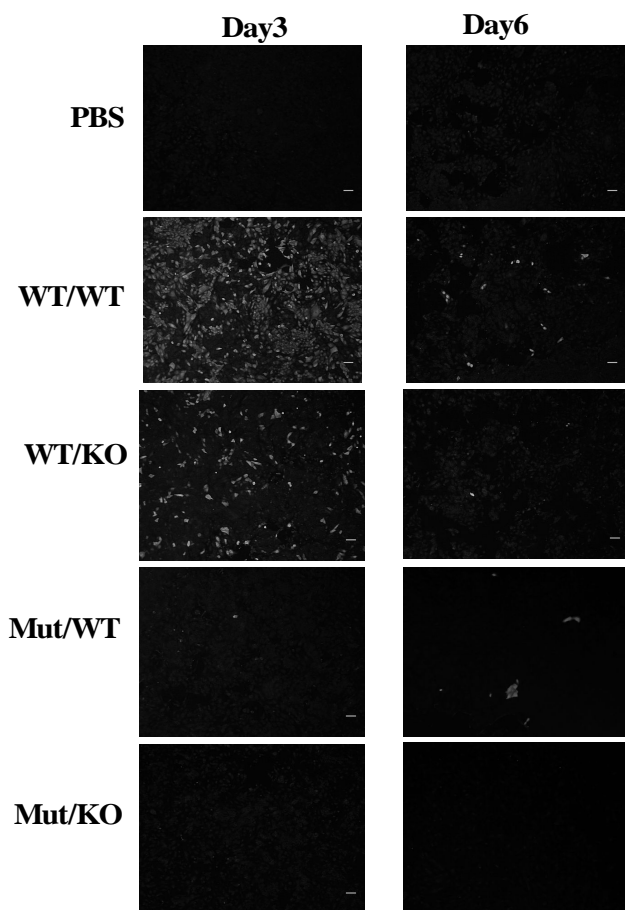
(2) Shinahara W, Takahashi E, Sawabuchi T, Arai M, Hirotsu N, Kido H. Immunomodulator clarithromycin enhances mucosal and systemic immune responses and reduces re-infection rate in pediatric patients with influenza treated with antiviral neuraminidase inhibitors: A retrospective analysis., *PLoS ONE*, Vol.8(7), e70060, 2013

(3) 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*, Vol.8(6), e66337, 2013

##### 学会発表

1. 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

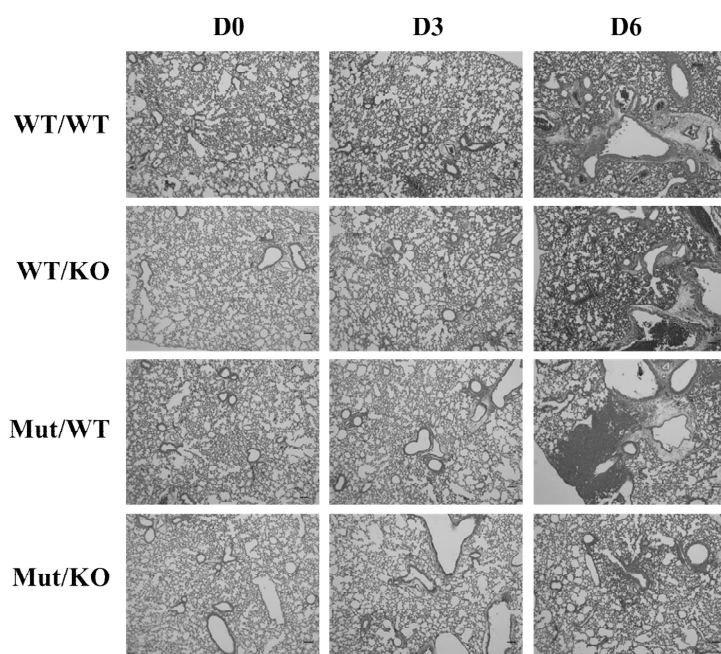


図3 高病原性鳥インフルエンザウイルス感染マウスの肺ホモジネート中の各

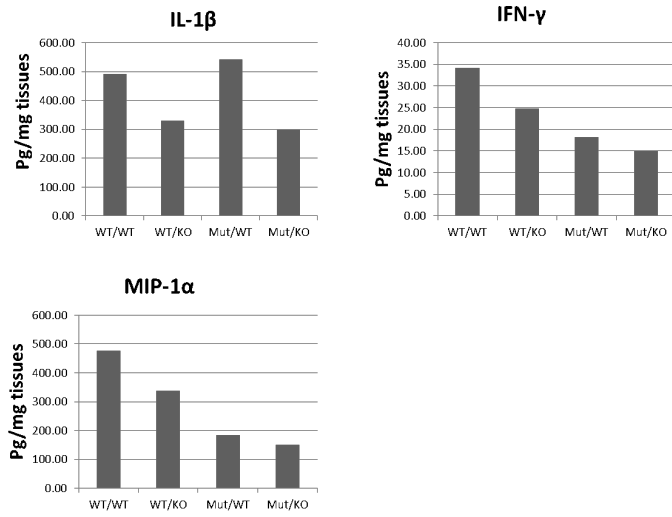
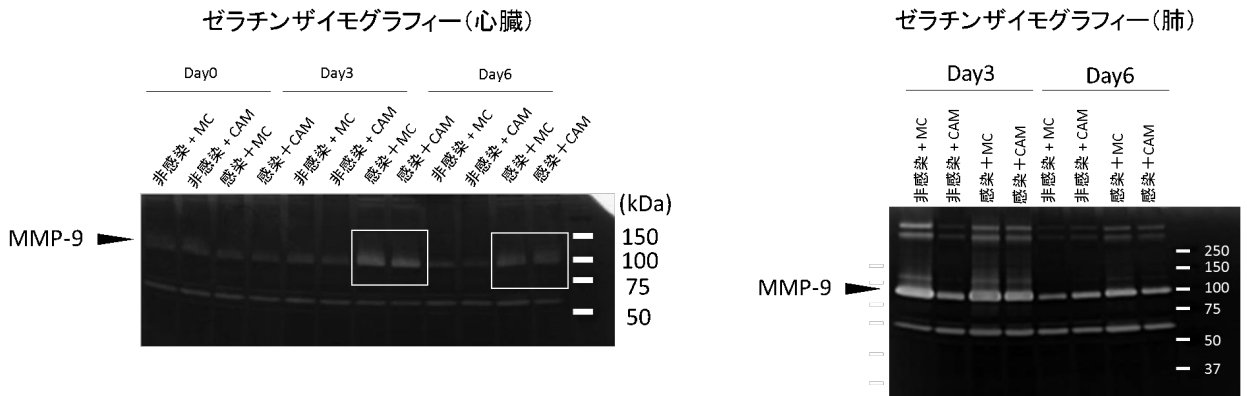
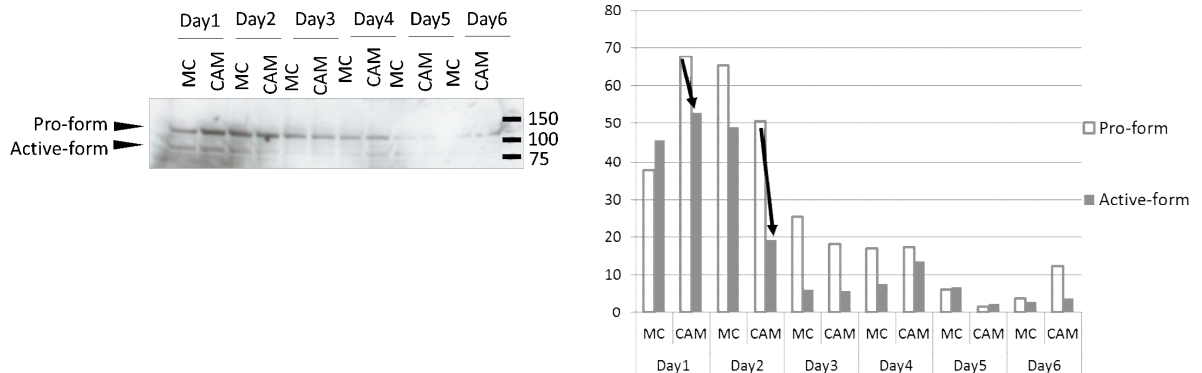


図4 CAM 投与による MMP-9 の発現変化

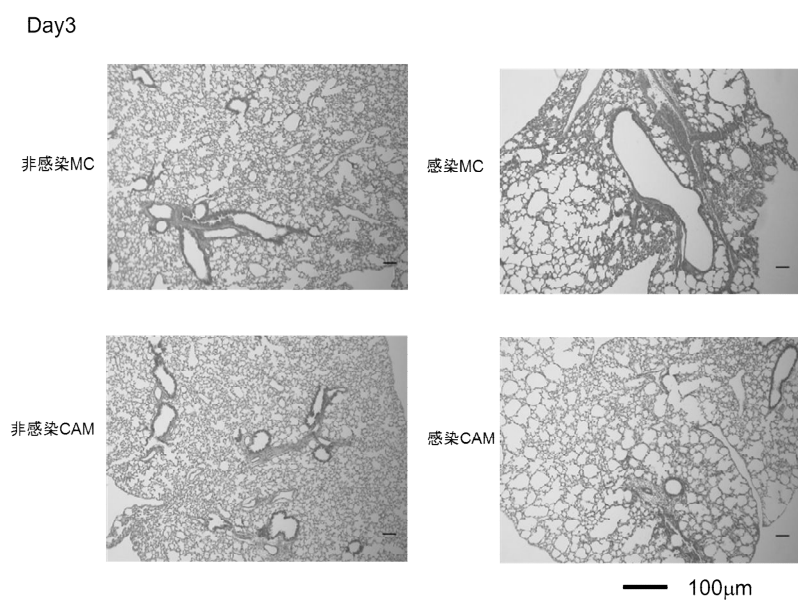
A



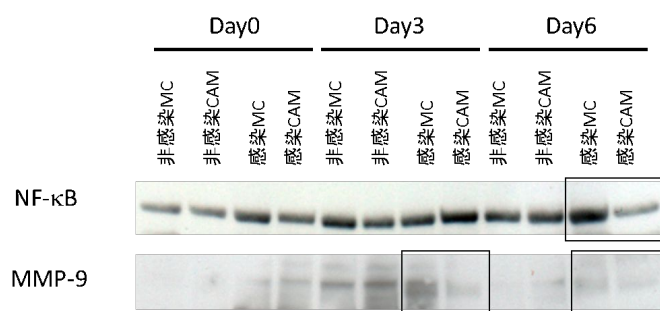
B



**図5** 感染3日目の肺のHE染色



**図5** 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



## 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

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 柏井洋文（国立成育医療研究センター 神経内科医員）  
寺嶋宙（国立成育医療研究センター 神経内科フェロー）

### 研究要旨

インフルエンザ脳症の病態解明のため急性脳症とミトコンドリア病、特に PDHC (pyruvate dehydrogenase complex) 欠損症の急性期病態の異同を検討した。また血中 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さらに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。また各種ミトコンドリア病における解析も同様に行い急性脳症との病態の異同を検討した。PDHC 欠損症 9 才男児がインフルエンザ感染に引き続き意識障害等を起こしたとき MRS 上乳酸の上昇とともにグルタミン-グルタミン酸(Glx)の上昇を認め、回復とともに正常化した。この症例では病変は小脳歯状核が中心であり典型的な急性脳症 (AESD) とは異なるが、病態に共通するものがある。PDHC 欠損症 26 才男性では連日のピーナツ摂取により神経症状が軽快・安定した。また 3 日間のピーナツ中止で血中 ATP の低下と血中乳酸の高値を認めた。急性脳症一般にこの脂肪製剤投与が効果があるかどうかは不明であるが PDHC 活性が低下するような病態があれば一考の価値がある。乳酸 / ATP 比は急性脳症急性期では高値、回復期で正常化するパターンが今回も確認された。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。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。

### 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。これらは感染症を契機としてサイトカインストーム、ミトコンドリア機能不全、興奮毒性、酸化ストレスなどの多様な病態が進行し、脳および諸臓器でアポトーシスと血管機能低下 (透過性亢進、血流障害) をきたす。支持療法に加え、抗サイトカイン療法 (副腎皮質ステロイド・パルス療法など) や脳保護療法 (脳低体温療法など) が行われているが効果は限定的である。また病初

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。これまでに我々は急性脳症における重症度、予後とサイトカイン (IL-6, IL-10, sTNFR1) の関連、急性脳症と熱性けいれん重積との鑑別、神経軸索障害の指標としてのタウ蛋白、AESD での 2 相めの予測可能性、血液脳関門の攻撃因子 (MMP-9) と防御因子 (TIMP-1) について、急性脳症における血中 ATP の変化などについて報告してきた。

今回はミトコンドリア機能不全も想定される急性脳症とミトコンドリア病、特に PDHC (pyruvate dehydrogenase complex) 欠損症の急性期病態の異同を検討した。

また血中 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さらに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。また各種ミトコンドリア病における解析も同様に行い急性脳症との病態の異同を検討した。

## B. 研究方法

当院でフォロー中の MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) 12 才男児の脳卒中様発作の時の MRI, SPECT (Single Photon Emission CT), MRS (MR spectroscopy), PDHC 欠損症 9 才男児のインフルエンザ感染における意識障害時の MRI, MRS と急性脳症 (AESD) のそれらを比較検討した。またピーナツを摂食することで臨床的な改善・安定を認めている PDHC 欠損症 26 才男性のピーナツ中止 3 日間で血中 ATP と血中乳酸に与える効果をみて病態を検討した。

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。乳酸 / ATP 比を計算した症例は急性脳症 16 例 (うち 2 例で急性期と回復期に測定)、熱性けいれん

重積 11 例 (うち 1 例で急性期と回復期に測定)、ミトコンドリア病 11 例である。

## (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

症例 1 MELAS 12 才男児。初回の脳卒中様発作時の神経画像を図 1 に示す。左後頭頭頂葉に信号異常と血流低下、MRS で乳酸高値を認める。急性脳症 (AESD) で推測されている興奮毒性を反映するグルタミン-グルタミン酸 (図中 Glx) の上昇は認めず。

症例 2 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、VB 群、カルニチンに加え脂肪製剤の投与で改善した。急性期と回復期の MRI, MRS を図 2 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 4.20mM, 回復期には 3.20mM, ATP 0.64mM, 乳酸 / ATP 比 5.02 であった。

症例 3 PDHC 欠損症 26 才男性。1 歳 7 ヶ月の時に発熱し感冒と診断された翌日より歩行不能、寝返り不能となった。血液・CSF の乳酸、ピルビン酸の上昇あり。筋生検を実施し、PDHC 欠損症と診断された。4 才よりジクロロ酢酸、VB 1 内服開始、12 才よりピーナツの摂食開始 (40 粒 / 日) したところ歩行や失調症状の改善を認めた。現在、足関節の拘縮、水平性眼振、姿勢保持異常、測定障害、企図振戦 (軽度)、構音障害、歩行障害、感覚障害はあるが比較的安定している。

ピーナツ 3 日間中止前後の結果

	中止前	中止後
血中 ATP	0.95mM	0.64mM
血中乳酸値	3.2mM	4.9mM

ピーナツの摂食を中止したところ血中ATPの増加と血中乳酸の上昇を認めた。本患者のMRI, MRSを図3に示す。乳酸の上昇はない。

乳酸/ATP比について

図4に各疾患の乳酸/ATP比を示す。急性脳症16例の急性期( $6.00 \pm 5.96$ )は熱性けいれん重積11例急性期( $1.48 \pm 0.69$ )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11例のそれ( $5.62 \pm 6.34$ )と比較し有意差は認めず。

図4中の症例4はDravet症候群1才10か月男児。染色体検査で2q24.3-q31の部分欠失あり。欠失部位にはDravet症候群の原因遺伝子であるSCN1Aの他、SCN2Aなど他のナトリウムチャンネル遺伝子も含まれる。1歳8ヶ月、および1歳10ヶ月時けいれん重積型脳症に罹患し、MRIでびまん性的大脑・小脳萎縮を認め、重度の痙性四肢麻痺を後遺症をのこした。入院時ATP 0.2(mM)、乳酸5.00(mM)、乳酸/ATP比は24.48と異常高値であった。(正常値: 男 ATP  $0.71 \pm 0.11$ (mM) 乳酸/ATP比  $1.50 \pm 1.46$ )

症例5 インフルエンザ脳症4才10か月男児。入院時ATP 0.46(mM)、乳酸5.90(mM)、乳酸/ATP比12.8と高値であり、けいれん重積、意識障害が遷延し最重度の後遺症をのこした。

症例6 熱性けいれん重積1才6か月男児。けいれん頓挫までMDZ, PHT, thipental 静注などで100分を要した。脳波上右半球に徐波を認めたため急性脳症の可能性もありICU管理となった。入院時ATP 0.72(mM) 乳酸1.40(mM)、乳酸/ATP比1.94と以上を認めず。後遺症なく退院し2才過ぎの発達に問題はない。

#### D. 考察

遅発性拡散低下をともなう急性脳症(AESD)は病態仮説として興奮毒性が想定され急性期においてMRSでグルタミン-グルタミン酸(Glx)の増加がみられる。今回ミトコンドリアのうちPDHC

欠損症9才男児(症例2)がインフルエンザ感染に引き続き意識障害等を起こしたときMRS上乳酸の上昇とともにGlxの上昇を認め、回復とともに正常化した。この症例では病変は小脳歯状核が中心であり典型的なAESDと異なるが、病態に共通するものがあることがわかる。本例の治療には通常の治療に加え、脂肪製剤を導入した。PDHC欠損症では、ブドウ糖、ピルビン酸、アセチルCoAの流れが低下しているため中性脂肪、脂肪酸、アセチルCoAの反応からのアセチルCoA供給をねらったものである。ただし脳内でどの程度効果があるのか不明であるがWest症候群を呈するようなPDHC欠損症にケトン食が効果を示すことから脳内でも一定の効果がある可能性がある。事実、症例3のPDHC欠損症では連日のピーナツ摂取により神経症状が軽快・安定している。また3日間のピーナツ中止で血中ATPの低下と血中乳酸の高値を認めた。1日ピーナツ40粒で20g、120kCalとなる。ピーナツは果実の中で特に脂質含有量が多く、魚類ではサンマ、サバ、マグロのところに相当する。急性脳症一般にこの脂肪製剤投与が効果があるかどうかは不明であるがPDHC活性が低下するような病態があれば一考の価値がある。

症例1のMELASの脳卒中様発作時にはMRS上乳酸高値は認めたが、Glxの増加は認めず。嫌気性解糖の亢進はPDHC欠損症と共通するが興奮毒性による障害は少ないものと考えられた。Glxのうちglutamateは興奮性の伝達物質であり、またastrocyteに存在しglutamine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。

乳酸/ATP比は急性脳症急性期では高値(6.00

±5.95)、回復期で正常化するパターンが今回も確認された。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(1.48±0.69)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、細胞内部の病理の有無を反映していると考えられた。急性期に乳酸/ATP比が6を超えた4例のうち3例はいずれも最重症の後遺症を残し、乳酸/ATP比は重症例の抽出、予後の推定に有用であった。その3例はインフルエンザ脳症(症例5)、Dravet症候群の急性脳症(症例4)、脳幹脳炎であった。1例は乳酸/ATP比が9.43であったが後遺症なく回復したサルモネラ脳症であった。

熱性けいれん重積急性期11例中4例はインフルエンザに関連したもののだが乳酸/ATP比は平均1.6である。いずれも30分以上のけいれん重積であるが後遺症は残さず。症例5と6のように1時間以上のけいれん重積が共通する症例でも予後良好例(症例6)は乳酸/ATP比が正常であり予後を推定するマーカーとして有用であることが示された。

意識障害の遷延が急性脳症の定義であるが熱性けいれん重積に置いても発作後の意識障害が遷延することはある。この場合、脳波検査が鑑別に有用であるが、脳波を持ってしても画然と鑑別できない場合も多い。図4のように乳酸/ATP比も両者での重なりも多く単独での予後推定や鑑別は困難な場合がある。臨床経過、特に発熱からけいれん発作までの時間は重要であり、熱性けいれんは12時間以内、急性脳症はそれより長く、20時間を超えてのけいれんも多く、鑑別の一助となりうる。現段階の戦略としては臨床経過、脳波所見、乳酸/ATP比、画像を適宜あわせて診断をその都度再考していくことが重要である。

今回のデータでも乳酸/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(5.62±6.34)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。当院では急性脳症の治療

としてステロイドパルス療法、フリーラディカルスカベンジャーとしてエダラボン投与、ビタミンB1、B6、カルニチン投与、体温管理、血糖管理など直接、間接的にミトコンドリア機能の温存をはかっている。まだ予備的検討ではあるがビタミンB6投与により急性脳症の経過が短くなっている。

今回の乳酸/ATP比も前述のように有意差はあるが急性脳症と熱性けいれん重積で画然と分かれるものではなく種々の要因が関与した結果をみているものと思われる。より感度の高い急性脳症マーカーの出現が望まれる。

## E. 結論

乳酸/ATP比は急性脳症急性期では高値、回復期で正常化するパターンが今回も確認された。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。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。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### (ア) 論文発表

- (1) Haga N, Kubota M, Miwa Z. Epidemiology of hereditary sensory and autonomic neuropathy type IV and V in Japan. Am J Med Genet Part A 2013;161A:871-874.
- (2) 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 (in press)

- (3) Kato M, Yamagata T, Kubota M, et al.  
Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutation. *Epilepsia*. 2013 Apr 26. doi: 10.1111/epi.12200. [Epub ahead of print]
- (4) Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, Kosho T, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, Mabe H, Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T, Takanashi J-i, Shotelersuk V, Tekin M, Ochi N, Kubota M, et al. MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome. *Am J Med Genet* 2013;Part A 161A:2234–2243.
- (5) Nakamura K, Kodera H, Akita T, Shiina M, Kato M, Hoshino H, Terashima H, Kubota M et al. De Novo Mutations in *GNAO1*, Encoding a Gαo Subunit of Heterotrimeric G Proteins, Cause Epileptic Encephalopathy. *Am J Hum Genet* 2013; 93, 1–10
- (6) Shiihara T, Miyake T, Izumi S, Sugihara S, Watanabe M, Takanashi J, Kubota M, Kato M. Serum and CSF biomarkers in acute pediatric neurological disorders. *Brain Dev* 2013 in press.

(イ) 学会発表  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

(ア) 特許取得

なし

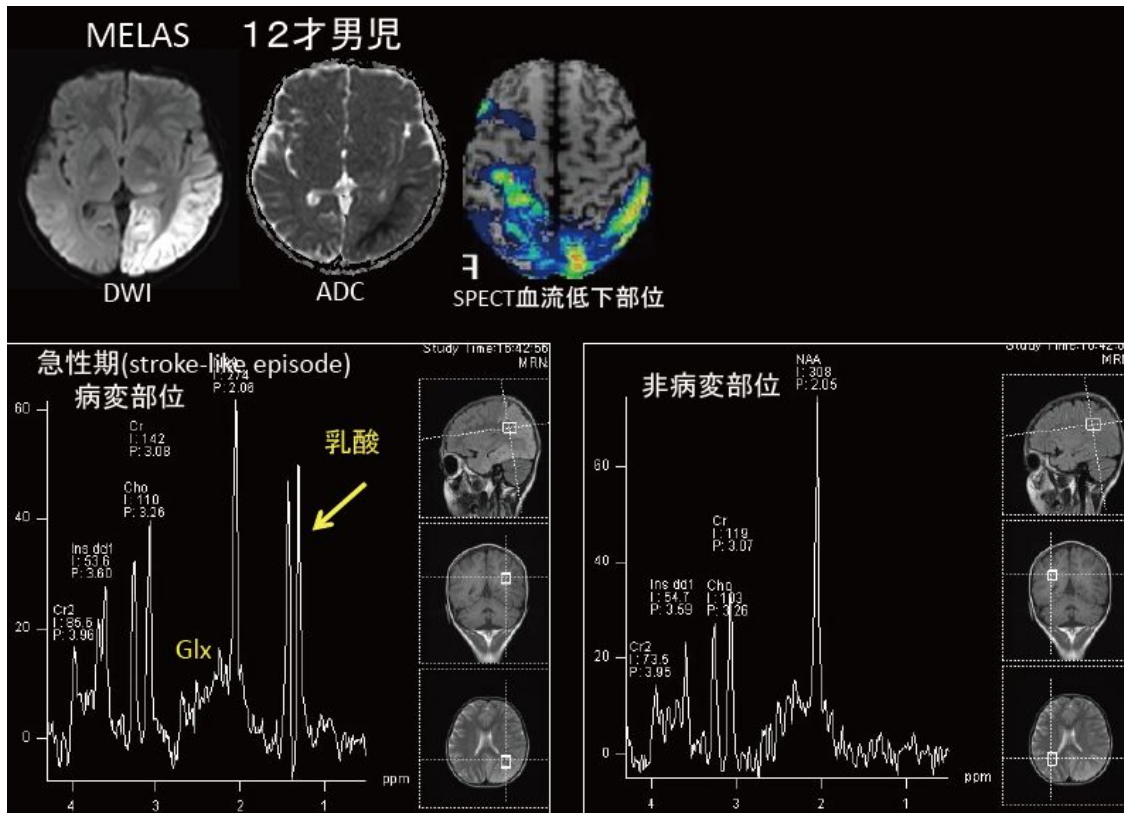
(イ) 実用新案登録

なし

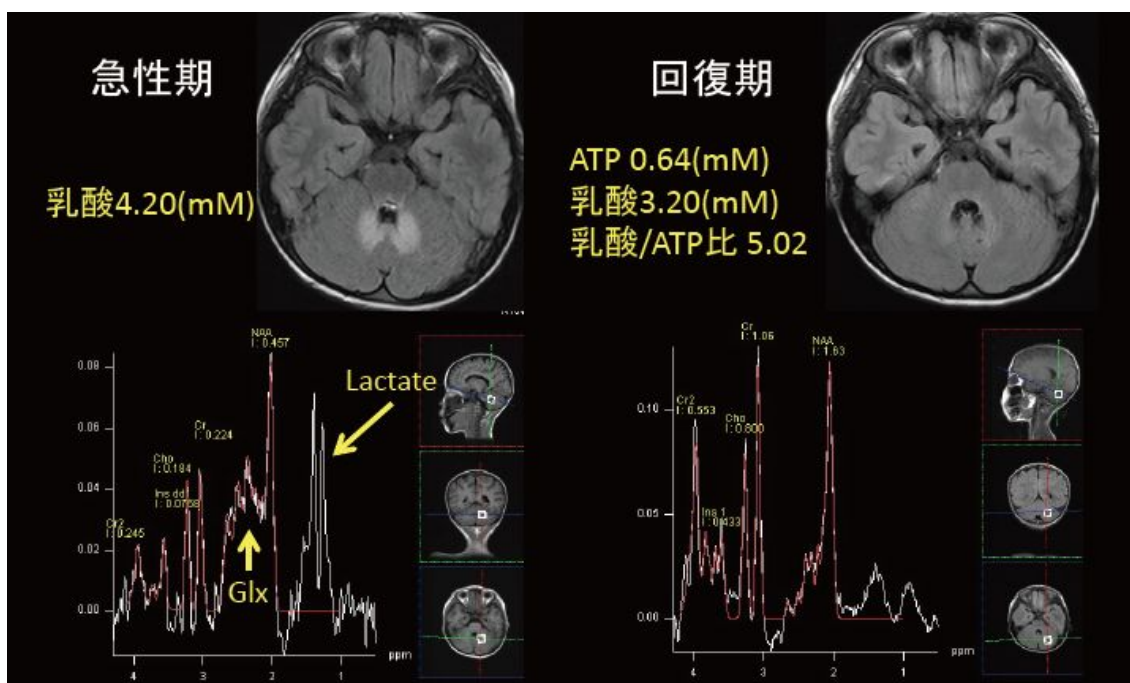
(ウ) その他

なし

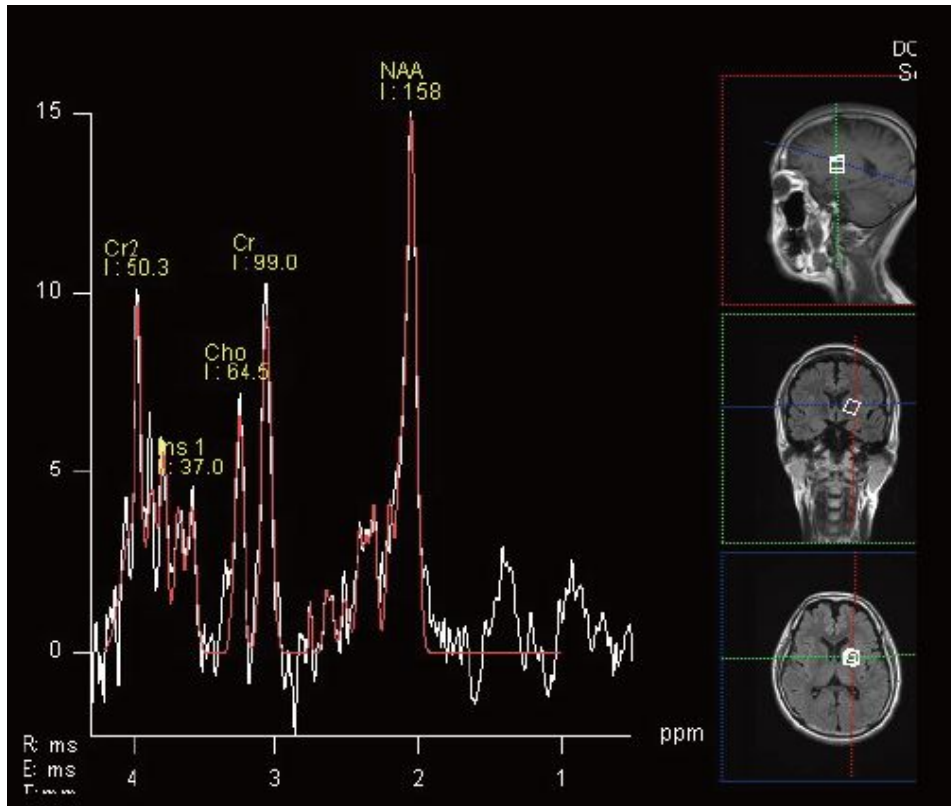
**図1** MELAS 12才男児。初回の脳卒中様発作時の神経画像。左後頭頭頂葉に信号異常と血流低下、MRSで乳酸高値を認める（矢印）



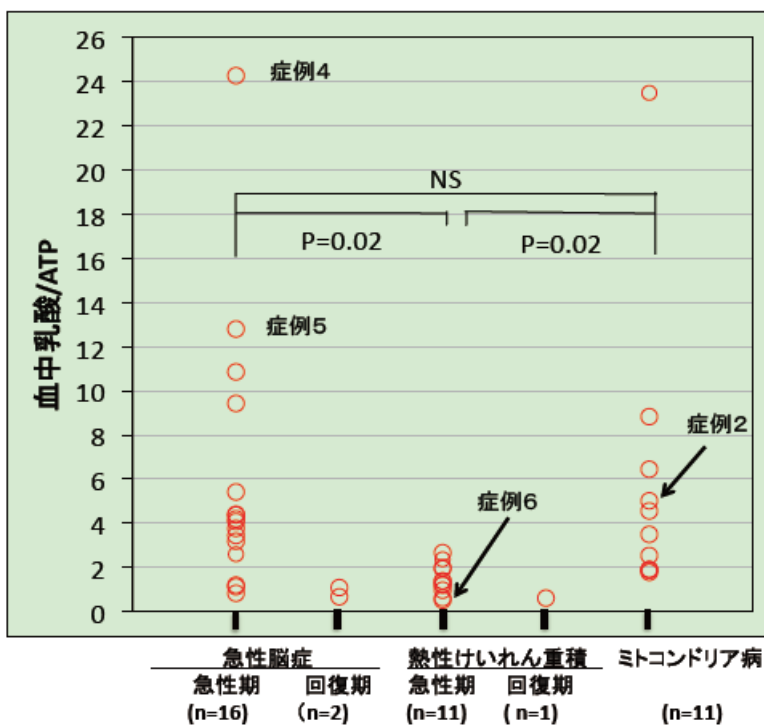
**図2** PDHC 欠損症 9才男児。インフルエンザ感染による意識障害の急性期および回復期のMRI, MRS。急性期には小脳歯状核の病変、乳酸上昇（長矢印）、Glutamate-glutamin complex (Glx)の増加（短矢印）を認める。



**図3** PDHC 欠損症 26才男性の頭部 MRI, MRS。ピーナツ40粒を連日摂取している時。乳酸上昇はない。



**図4 急性脳症、熱性けいれん重積、ミトコンドリア病における乳酸/ATP 比**





## 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

研究分担者 西村匡司 徳島大学大学院救急集中治療医学 教授

### 研究要旨

重症度スコアは必ずしも患者予後を反映しない。また、多くのスコアは経時的な変化をとらえることができない。簡便に重症患者の変化を経時的、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、A-LES ( ATP-lactate energy risk score ) を測定し、重症患者の予後および従来のスコアとの関連を検討した。ATP、A-LES は重症患者ではいずれも正常範囲を逸脱していた。特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。

### 研究協力者

・小野寺 睦雄

徳島大学大学院救急集中治療医学  
講師

### A . 研究目的

集中治療を必要とする患者では、重症度を評価するためさまざまな指標が用いられる。普及率の高いものに APACHE ( acute physiology and chronic health evaluation ) II スコアや SAPS ( simplified acute physiology score ) があり、集中治療室に入室した際の重症度評価は予後と良い相関を示す。これらのスコアと予後が相関しない症例も稀ではない。わが国では APACHE II スコアが一般的であるが、これは集中治療室 ( ICU ) 入室後 24 時間の検査値やバイタルサインから算出するものである。しかし、重症患者のバイタルサインは時々刻々変化していく。簡便、客観的かつ継続的に重症度を評価できる指標があれば、患者管理に有用である。重症患者では呼

吸・循環不全のため抹消組織への酸素供給が悪化することが多い。そのような病態では ATP 産生が低下している可能性がある。しかし、末梢血における ATP 濃度の意義は明らかでない。抹消循環不全、抹消での酸素利用の悪化の指標として乳酸値が良く用いられている。この二つを組み合わせることにより、重症患者の重症度評価がより正確になることが推測される。本研究では判定することが。本研究では末梢血 ATP 濃度、乳酸値、ATP/乳酸比 ( ATP-lactate energy risk score : A-LES ) が重症患者における重症度や予後予測の指標となり得るか検討した。

### B . 研究方法

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, PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>, 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。

(倫理面への配慮)

本研究は、徳島大学病院倫理委員会の承認を得た上で、対象者には研究内容を説明し、同意を得た上で実施した。

## C . 研究結果

表 1 に対象となった患者の基本情報を示す。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 スコアが高かった。

### 1. 入室時の ATP および A-LES

図 1 に示すように、入室時の ATP および A-LES は生存患者、死亡患者で統計学的に有意差を認めなかった。末梢血 ATP は赤血球内に存在すると考えられる。ICU に入室する患者ではヘモグロビン値が正常範囲にない場合が多い。ヘモグロビン値で ATP 値を補正することで標準化する方法をとった。ヘモグロビン 10g/dL あたりで補正した結果を図 2 に示す。入室時の ATP(ヘモグロビン補正後)および A-LES は生存患者、死亡患者で差を認めなかった(それぞれ  $0.43 \pm 0.13$  vs.  $0.40 \pm 0.28$ 、 $9.6 \pm 8.6$  vs.  $16.8 \pm 17.2$ )。

### 2. ATP 及び A-LES と APACHE II スコアの相関

図 - 3 に ATP 及び A-LES と従来利用されている APACHE II スコアの相関を示す。有意な相関を認めなかった。M 抗原間では、ルシフェラーゼ活性に変化は無く、プラトーに達していると判定した。

### 3. ATP 及び A-LES の経時的変化

ATP の特徴は経時的な変化を見ることが出来る点にある。時間経過を生存患者と死亡患者で検討した結果が表 - 2 である。入室翌日の値は ATP では差を認めなかったが、A-LES は死亡患者で悪化傾向にあった。

## 4. 感染症患者での解析

ICU 入室患者で予後が悪い代表疾患として敗血症がある。感染症に伴う多臓器不全を来す疾患である。基礎疾患として感染症を有する患者で生存患者(17人)と死亡患者(4人)を比較した(図 - 4)。ATP は生存患者と死亡患者で差を認めなかったが、A-LES は死亡患者で有意に高値であった。感染症患者での予後判定予測を APACHE II スコア、ATP、A-LES で比較すると曲線下の面積は APACHE II 0.801、ATP(ヘモグロビン補正) 0.279、A-LES 0.941 で、A-LES で有意に良かった(図 - 5)。

## D . 考察

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重症化の機序に同様に 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。

## E . 結論

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。

## F . 健康危険情報

なし。

**表 - 1 対象患者の基本情報**

	Survivor (n=74)	Non-survivor (n=18)	P value
年齢	66.0±14.4	66.3±10.3	.918
性別 (男性:女性)	45:29	7:11	.115
APACHE II score	18.3±8.1	27.7±10.6	.000
基礎疾患			
感染症	17	4	
心原性肺水腫	10	0	
虚血性心疾患	8	1	
呼吸器疾患	6	2	
神経系疾患	8	0	
術後	22	1	
熱傷	0	3	
その他	3	7	

**表 - 2 ATP と A-LES の入室日と翌日での比較**

	ATP/Hb*10			A-LES/Hb*10		
	入室日	翌日	変化	入室時	翌日	変化
Survivor	0.43±0.13	0.47±0.15	0.05±0.14	9.6±8.6	4.6±3.3	-4.9±8.0
Non-Survivor	0.40±0.28	0.39±0.28	-0.01±0.16	16.8±17.2	23.8±35.6	7.0±20.2



図 - 1 入室時の ATP と A-LES

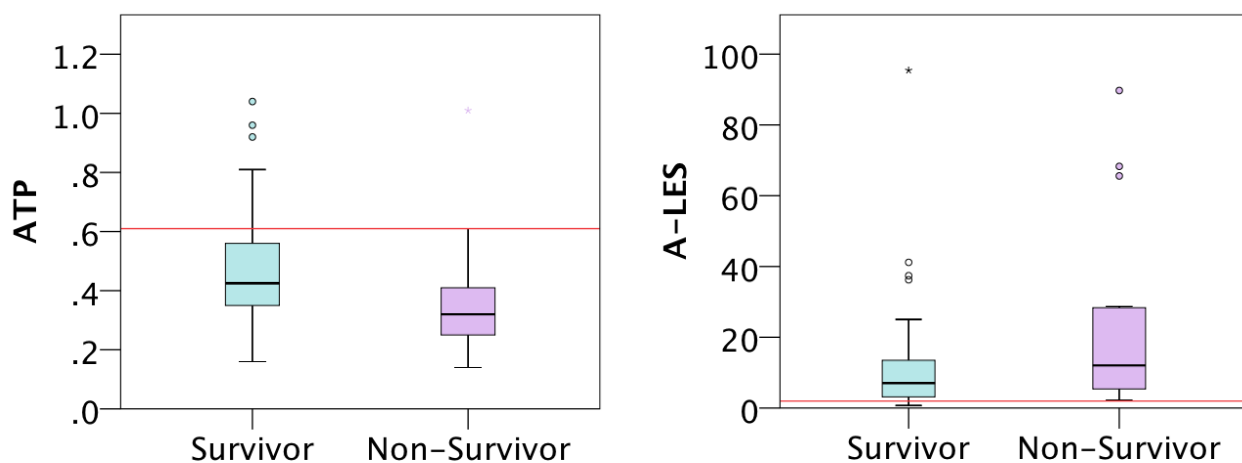


図 - 2 ヘモグロビン値で標準化した入室時の ATP と A-LES

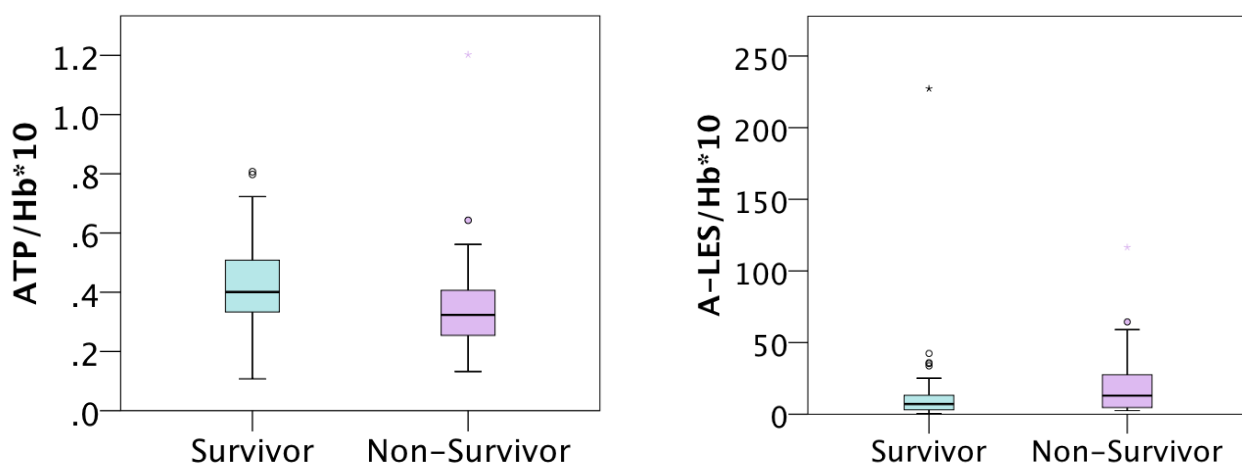


図 - 3 ATP、A-LES と APACHE II スコアの関係

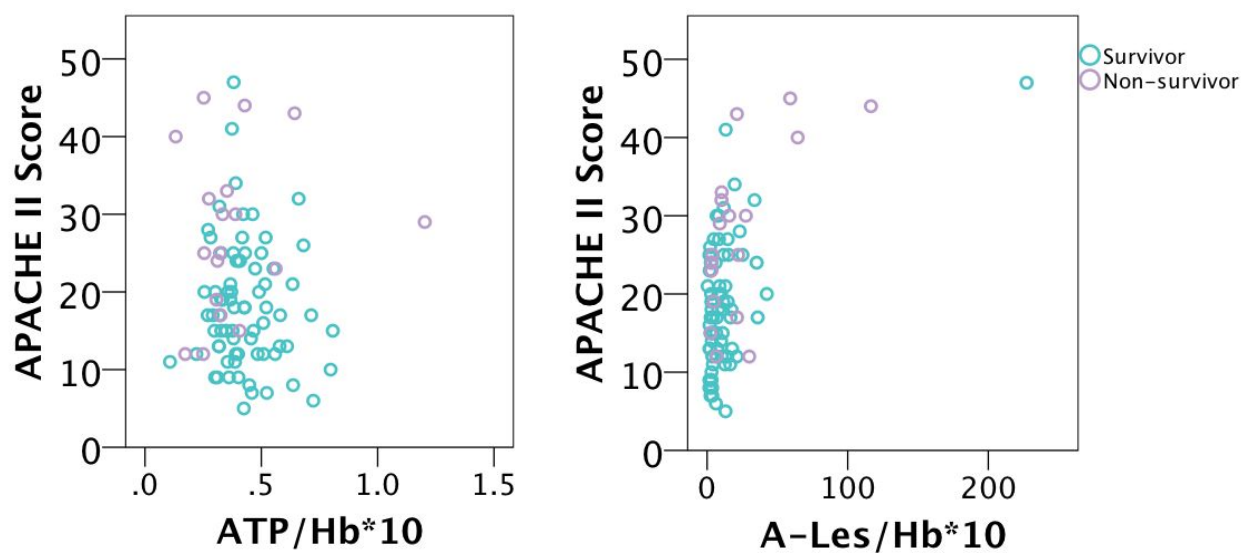


図 - 4 感染症患者のICU入室時ATPとA-LES

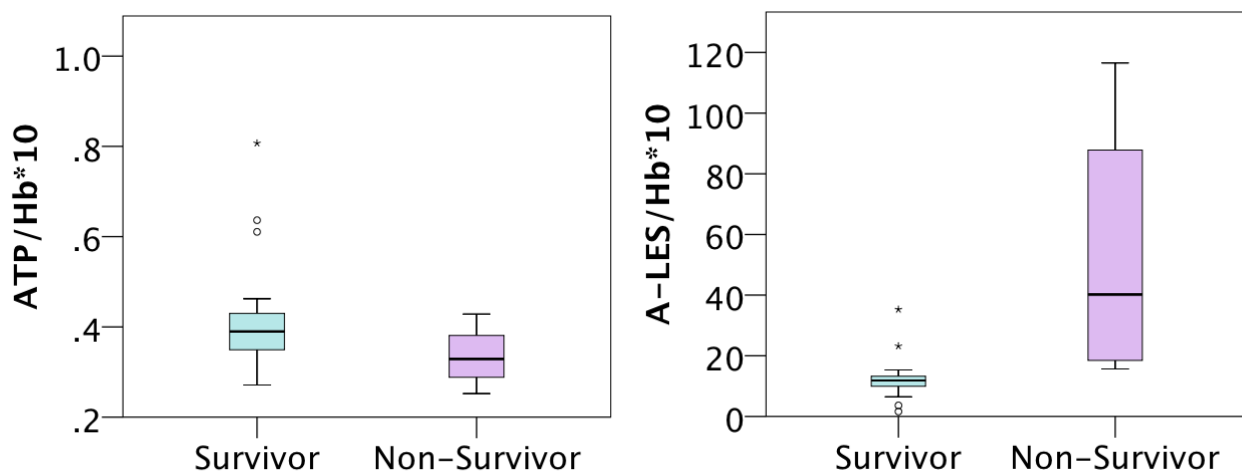
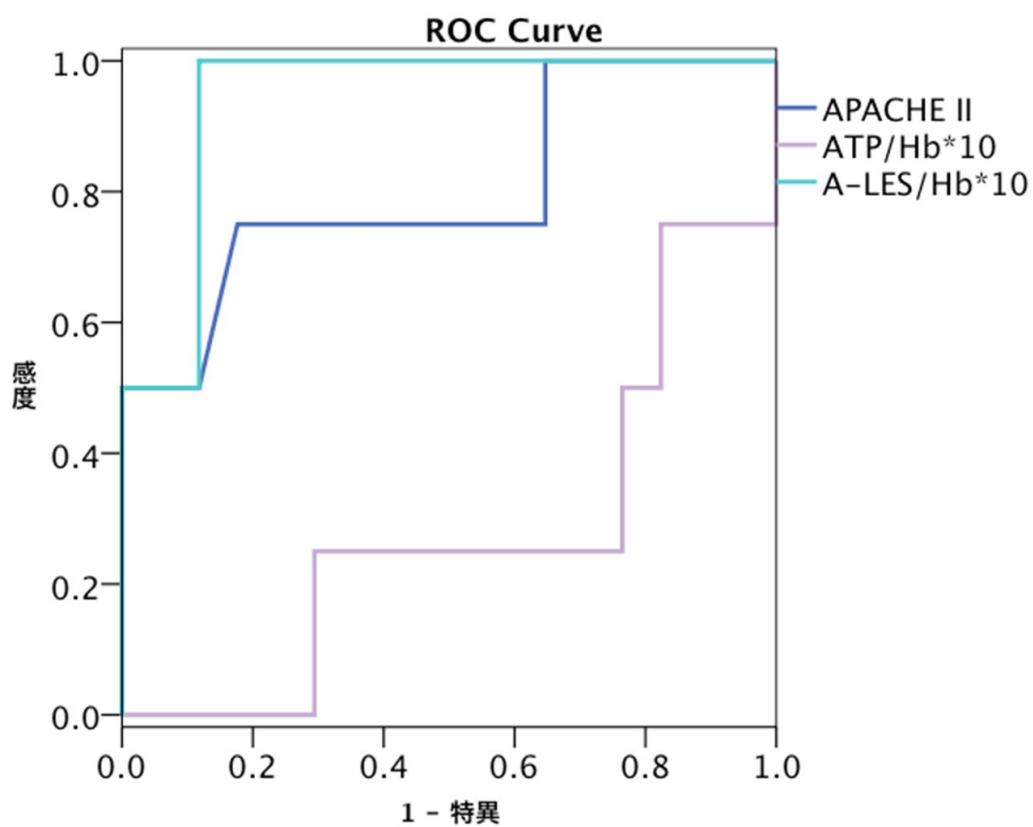


図 - 5 感染症患者の ROC 曲線





## 新型インフルエンザ肺炎・脳症の診断・治療法開発研究

研究分担者 佐々木 信一（順天堂大学医学部附属浦安病院 呼吸器内科 准教授）  
研究協力者 南條 友央太（順天堂大学医学部附属浦安病院 呼吸器内科 助教）

### 研究要旨

インフルエンザ(IFV)脳症、重症肺炎症例をいち早く診断するバイオマーカーの解明と確立を目的とし、インフルエンザ患者血清および気管支肺胞洗浄液検体からの ATP をはじめとした各種バイオマーカー検査体制を整え、インフルエンザ患者を中心に計 16 症例において各種 marker を測定した。多くの症例で IL-6、MMP-9 や TNF- $\alpha$  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) の値は概ね 20 以下の低値を示したが、B 型インフルエンザ 2 例で高値を示した。今後症例を増やして、さらなる検討を続けて行く。

### A. 研究目的

2009 年に勃発した新型インフルエンザ（A/H1N1pdm09）では小児における脳症（図 1、2）ならびに ARDS に陥る重症肺炎が認められ問題となった。本プロジェクトの主任研究者の木戸らによりインフルエンザ(IFV)脳症、重症肺炎の病態には、血管内皮と臓器に誘発される IFV サイトカイン プロテアーゼサイクルが深く関わっていることが解明されてきている。しかしながら、重症化する症例をいち早く診断するバイオマーカーは現在のところ不明で、診断の遅れが問題となっている。本年度の研究目的は、これら重症化のバイオマーカー（Flu alarmin）の測定系を確立し、早期診断に向けた戦略を構築することにある。Flu alarmin の候補として、患者末梢血の ATP-lactate energy risk score (ALES)、各種サイトカイン等を測定し、その実用性の検証を行う。

### B. 研究方法

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- $\alpha$  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。

(倫理面への配慮)

本研究は、順天堂大学医学部附属浦安病倫理委員会の承認を得た上で、対象者には研究内容を説明し、同意を得た上で実施した。

### C. 研究結果

昨年度、当院の倫理委員会に諮り、本研究(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」)は承認された。これを元に、今インフルエンザシーズンは計16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。現在各マーカーの検証中である。検討した症例内訳は、A型インフルエンザ:7例、B型インフルエンザ:3例、細菌性肺炎:2例、急性肺障害:4例である。途中経過であるが、主な結果を図1に示す。多くの症例でIL-6、MMP-9やTNF- $\alpha$ といったサイトカインの高値が認められたが、血中の乳酸をATPの値で割ったATP-lactate energy risk score(A-LES)の値は概ね20以下の低値を示したが、B型インフルエンザ症例2例で比較的高値を示した(値:91.7、40.4)。

### D. 考察

本年度は、現時点で計16症例において各種markerを測定することが出来た。現在各種病態とmarkerの値の関係を解析中である。インフルエンザ症例や肺炎、急性肺障害例では、かなりの症例で各種サイトカインの高値が認められ、いわゆるサイトカインストームの状態が示唆された。現時点で死亡例は経験しておらず、それを反映してかA-LESは概ね低値であったが、B型インフルエンザ症例で高値になる傾向が認められた。この傾向がインフルエンザウイルススタ

イプによる特性なのか、単に重症度の問題なのかは、現在症例を蓄積し検討中である。

ARDSに陥る症例はインフルエンザに限らず存在するため、そのメカニズム解明とインフルエンザ症例との比較検討のために、今後はインフルエンザ以外のARDS症例(細菌性肺炎、敗血症、重症外傷等)においても検討を加える予定である。

また、当院は東京ディズニーランドに隣接しており、現在中国において問題となっている鳥インフルエンザ(A/H7N9)患者が中国からの観光客として来訪する可能性も秘めているため、患者トリアージシステムを構築し、疑い例を直ちに隔離する体制を確立している。鳥インフルエンザ(A/H7N9)疑いの患者が当院を受診した際には、中国語等で同意を得、本研究に生かせるよう現在同意書の翻訳版(英語版、中国語版)を準備している。

### E. 結論

今後さらに症例数を増やし、さらに検討を深めていく。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

#### (ア) 論文発表

1. Nagashima O, Ohashi R, Yoshioka Y, Inagaki A, Tajima M, Koinuma Y, Iwakami S, Iwase A, **Sasaki S**, Tominaga S, Takahashi K. High prevalence of gene abnormalities in young patients with lung cancer. J Thorac Dis 2013;5:27-30.
2. Mori T, Tajima K, Hiramama M, Sato T, Kido K, Iwakami S, **Sasaki S**, Iwase A, Shiomi K, Maeda M, Hino O, Takahashi K. The n-erc

index is a novel monitoring and prognostic marker for advanced malignant pleural mesothelioma. J Thorac Dis 2013;5:145-148.

3. 門屋講太郎, 吉岡 泰子, 難波由喜子, 桂 蓉子, 高 遼, 小池 建吾, 吉岡 正剛, **佐々木信一**, 富永 滋, 高橋 和久. 肺膿瘍・膿胸 7 例における歯周病細菌 PCR 検査の臨床的意義の検討. 日本呼吸器学会雑誌 2013; 2: 79-84.

4. 南條友央太, **佐々木信一**, 松野 圭, 石森絢子, 牧野文彦, 吉岡正剛, 吉岡泰子, 富永 滋, 山口哲生. *Nocardia wallacei* が検出され, ST 合剤投与で軽快した気管支拡張症の 1 例. Therapeutic Research 2013; 34: 759-60.

5. 磯部 全, **佐々木 信一**, 富永 滋, 前野敏孝, 倉林 正彦. 喘鳴を伴わずに発症した好酸球性細気管支炎の 1 例. 日本呼吸器学会誌 2013; 2: 607-11.

6. 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支骨軟骨形成症の 1 例. 気管支学 2014; 36: 73-7.

#### (イ) 学会発表

1. 高 遼, **佐々木 信一**, 松野 圭, 石森 絢子, 南條 友央太, 牧野 文彦, 吉岡 正剛, 吉岡 泰子, 富永 滋, 高橋 和久: Fexofenadine は EGFR TKI 投与に伴う interstitial lung disease 発症を抑制する. 第 53 回日本呼吸器学会総会, 東京, 2013.04.19

2. 石森 絢子, **佐々木 信一**, 松野 圭, 南條 友央太, 牧野 文彦, 吉岡 正剛, 吉岡 泰子, 中沢 武司, 富永 滋: 幼少期に発症した気管支拡張症の経過観察中に、喀痰培養で *Aspergillus lentulus* を検出した一例. 第

87 回日本感染症学会学術集会, 2013.06.05

3. 笹野仁史, 吉岡泰子, 松野 圭, 石森絢子, 南條友央太, 牧野文彦, 吉岡正剛, **佐々木信一**, 富永 滋: 早期の PMX-DHP を含む集学的治療を行った amyopathic dermatomyositis 合併急速進行性間質性肺炎の 1 例. 第 205 回日本呼吸器学会関東地方会, 2013.07.13

4. 井上 貴昭, 中沢 武司, 麻生 恭代, 成田 久美, 秋田 美佳, 石井 幸, 田中 裕, 南條 友央太, 大日方 薫, **佐々木 信一**, 堀賢: ICU が抱える感染症の諸問題 救命センターに発端をなす 2 剤耐性 *Acinetobacter Baumannii* アウトブレイクとその制御過程. 第 61 回感染症学会東日本地方会, 2013.10.10

5. Yasuko Yoshioka, **Shinichi Sasaki**, Kei Matsuno, Ayako Ishimori, Yuta Nanjo, Humihiko Makino, Keiko Muraki, Shigeru Tominaga, Kazuhisa Takahashi: Two Cases Of Rapidly Progressive Interstitial Pneumonia Associated With Clinically Amyopathic Dermatomyositis Successfully Treated With Early Intensive Therapy. 18th Congress of Asian Pacific Society of Respiriology, Yokohama, 2013.11.12

6. 南條友央太, **佐々木信一**, 中澤武司, 木下綾子, 関口康宣, 成田久美, 岩崎沙奈美, 飯田美奈子, 月山智美, 古田あずさ, 金森由和, 玉野知佐, 伊藤友美, 鈴木俊介, 唐島孝彰, 米山桂一, 富永 滋: 当院における ART 導入した HIV 感染症 21 症例の検討. 第 27 回日本エイズ学会総会, 熊本, 2013.11.20

7. 木下綾子, **佐々木信一**, 中沢武司, 南條友央太, 高森建二, 須賀 康: 順天堂大学浦安病院における過去 10 年間の新規 HIV 感染者にともなった皮膚症状の検討. 第 27 回

日本エイズ学会総会, 熊本, 2013.11.20

8. 村木 慶子, 松野 圭, 小池 建吾, 推名 健太郎, 朝尾 哲彦, 本間 裕一郎, 宿谷 威仁, 柴山 里奈, 小山 良, 嶋田 奈緒子, 木戸 健治, **佐々木 信一**, 富永 滋, 高橋 和久: 順天堂大学におけるクリゾチニブの使用経験. 第 54 回日本肺癌学会総会, 東京, 2013.11.22

9. 長野則之, 長野由紀子, 外山雅美, **佐々木信一**, 中澤武司, 堀 賢, 柴山恵吾, 荒川宜親: NDM-1 メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ, OXA-181 カルバペネマーゼ等同時産生の広範囲抗菌薬耐性 *Klebsiella pneumoniae* の出現. 第 25 回日本臨床微生物学会総会, 名古屋, 2014.02.01

10. 中村美子, 中澤武司, 秋田美佳, 成田久美, 井上貴昭, 大日方薫, **佐々木信一**: 選択培地を用いた *Acinetobacter* の環境リザーバーに関する環境調査. 第 29 回日本環境感染学会総会, 品川, 2014.02.15

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

12. 中澤武司, 南條友央太, 井上貴昭, **佐々木信一**, 西田香南, 大出恭代, 三澤 成毅, 横山栄二, 菊池 俊: 肝膿瘍より分離された *Desulfovibrio desulfuricans* の 1 例. 第 44 回日本嫌気性菌感染症学会総会・学術講演会, 那覇, 2014.02.22

(ウ) 著書

1. **佐々木信一**. がん性髄膜炎に対する治療戦略. 編集:大江裕一郎, 加藤晃史, 堀之内秀仁. ガイドラインに載っていない肺がん Practical Treatment. 東京:Medical

View 社, 2014; 181-5.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

(ア)特許取得

なし

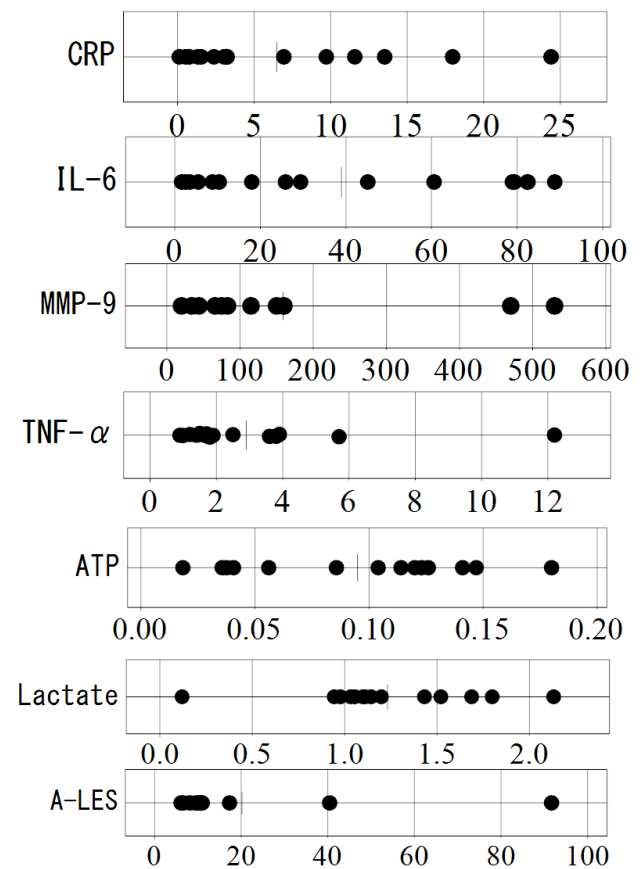
(イ)実用新案登録

なし

(ウ)その他

なし

図 1





**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**

研究分担者 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

**研究要旨**

1) 肺炎・脳症・多臓器不全のきっかけとなる「血管内皮細胞障害」の発症因子の解明と早期診断マーカーの候補である Flu Alarmin を、実際の患者血清等を対象に検索するための下準備を行った。まずは、これまでの本研究班における重症化にかかわる遺伝子候補の検索において、脳症を含む多臓器不全にかかわる因子として検討されてきた CPT2 遺伝子や Toll-like Receptor の下流のシグナルや各種サイトカイン、プロテアーゼ等の解析を行う目的で、小児科のインフルエンザの二峰性発熱研究グループや内科の成人・高齢者の肺炎研究グループ等との連携により、多方面で発症急性期の気道分泌液や血液検体等の検体収集を行った。

2) インフルエンザウイルスの最初の感染病巣のひとつとして重要な組織であり、細胞自らが産生する蛋白分解酵素がウイルスの感染に重要な働きを持つことが知られている実際のヒト呼吸器上皮細胞を実験系として得るために、病理解剖由来のヒト気管支細胞の初代培養を試み、3人のドナー由来の、気管支上皮細胞を凍結保存した。さらに、これらについて培養時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を試みている。

インフルエンザ脳症の重症化にかかわる因子としての異所性トリプシン産生にかかわるエンテロキナーゼを産生する細胞として知られるヒト十二指腸上皮細胞を得る目的で、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初代培養を試み成功した。それらの細胞についても、凍結保存するとともに不死化を試みている

**研究協力者**

- ・ 山谷睦夫 東北大学大学院医学系研究科先進感染症予防学寄附講座 教授
- ・ 織田慶子 川崎医科大学附属川崎病院小児科医師
- ・ 高橋洋 宮城厚生協会坂総合病院呼吸器科部長
- ・ 武田和憲 国立病院機構仙台医療センター臨床研究部長
- ・ 手島伸 同上 外科医長

**A . 研究目的**

1) 新型インフルエンザや高病原性鳥インフルエンザの出現とその流行による肺炎・脳症・多臓器不全の多発が危惧され、健康危機管理としての対策が急がれている。本研究では、肺炎・脳症・多臓器不全のきっかけとなる「血管内皮細胞障害」の発症因子の解明と早期診断マーカーの候補である Flu Alarmin を実際の患者

血清等を対象に検索する。

それによって重症化の早期診断バイオマーカーが明らかになる。

また、これまでは小児科領域における脳症を対象に研究を行ってきたが、本研究では、成人の肺炎の重症化例について研究範囲を拡げた。

2) ヒト呼吸器上皮細胞は、インフルエンザウイルスの最初の感染病巣のひとつとして重要な組織と考えられる。そこでの増殖においては、細胞自らが産生する蛋白分解酵素がウイルスの感染に重要な働きを持つことが知られているが、さらに我々の研究で呼吸器組織以外の異所性産生の同酵素がインフルエンザの脳症において重要な働きをしていることが明らかになっている。

その一方で、膵臓以外のヒト組織細胞における同酵素の産生に関する研究は、ほとんど見あたらず、よって呼吸器上皮細胞が常に供給されるような状態にあれば極めて重要な解析実験系となりうると考えられる。また、そうした細胞がインフルエンザ感染の再産生する何らかの物質がサイトカイン等のFlu Alamin候補に何らかの影響を与える、あるいはその逆にサイトカイン等の物質が呼吸器系上皮にそのもの、あるいはそこでのインフルエンザ感染に何らかの影響を与える可能性についても検討の価値はあると考えられる。

さらに、そうした細胞にウイルス感染や種々の外的刺激を与えることでインフルエンザ重症化の本体の理解につながる可能性のある何らかの新たな所見が得られる可能性もある。そうした細胞系を種々の実験に用いることのできる態勢を整えるためのいくつかの試みを開始する。

## B. 研究方法

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を収集：

1 - 1) 小児科のインフルエンザの二峰性発熱研究グループならびに

1 - 2) 内科の成人・高齢者の肺炎研究グループとの連携により発症急性期の気道分泌液や血液検体を収集する

1 - 3) さらに当ウイルスセンターには、ウイルス感染による重症肺炎や脳症についての検査目的で、仙台市ならびに全国各地から臨床検体が寄せられているが、そうした症例の主治医に対して急性期ならびに回復期血清やFlu Alarmin 検索のための検体の確保とその後の送付を受ける。

2) これまでのインフルエンザ罹患者の凍結保存検体のピックアップ：

これまでに種々の呼吸器感染症患者や急性脳症患者から採取した急性期血清ならびにペア血清を当院血清ライブラリーからのピックアップし、Flu Alarmin の候補の検索対象とする。

3) 上記1) 2) で収集した検体について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を行う。

また、これまでの本研究班における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はCPT2のみを対象としていたが、重症肺炎症例医についても、インフォームドコンセントのもとCPT検査を試みる。

4) ヒト、初代細胞の確保は、上記目的の項目で説明したとおり、インフル

エンザの重症化の機序解明の一手段として大きな可能性を秘めている。

4 - 1 ) まずは、協力研究者の山谷らによる病理解剖由来の気管支上皮細胞の培養系について、その一部凍結保存とライブラリーづくりとを行う。

また、そうした細胞の初代ではないが、その性質をある程度保ったまま長期継代が可能な系を作ることを目的に、上記細胞に対して SV40 の Large T 抗原遺伝子導入による不死化を試した。

4 - 2 ) インフルエンザ脳症の重症化にかかわる因子としての異所生産トリプシンがつくられるためには、トリプシノーゲンが PRSS3 と呼ばれるエンテロキナーゼの作用によってトリプシンに変わる必要がある。ヒト十二指腸上皮細胞は、このエンテロキナーゼがつくられる組織として知られている。エンテロキナーゼのヒト細胞での種々の動きに関して解析のためには、ヒト十二指腸上皮細胞の初代継代細胞がぜひとも必要である。そこで、本研究では、インフォームド Consent のもと、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を試みた。

## C . 研究結果

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 :

2013-2014 年インフルエンザシーズンは、それまで鳴りを潜めていた 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た。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、それらについての 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した。

そのほか、ヒトパラインフルエンザ 3 型による脳症についても数例分、ペア血清を確保しており、今後解析予定である。また、ヒト・メタニューモの施設内流行を捉えており、そこでも重症化例のペア血清を確保している。

4 - 1 ) 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 :

協力研究者の山谷がつくった 3 人のドナー由来の、気管支上皮細胞を凍結保存した。さらに、これらについて培養時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を試みており、現在継続中である。(図 1)

4 - 2 ) 消化器外科手術材料由来の十二指腸細胞の初代培養と、その不死化の試み :

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、十二指腸上皮細部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を試みており、現在継続中である。(図 2)

## E . 結論

臨床検体としての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収集を広く行い、解析を開始している。

ヒトの気管支上皮ならびに十二指腸上皮の初代培養細胞に成功し、今後の応用のために凍結保存を完了し、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。

#### F . 健康危険情報

なし。

#### G . 研究発表（平成 25 年度）

##### 論文発表

- 1) Takashita E, Ejima M, Miura M, Ohnishi A, Nishimura H, Odagiri T, Tashiro M. A community cluster of influenza A(H1N1)odm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013. Euro Surveill. 19: pii=20666, 2014
- 2) Nguyen, Abe S, Sun G, Matsuoka A, Nishimura H, Ishihara M, Matsui. Rapid screening for influenza using a multivariable logistic regression model to save labor at a clinic in Iwaki, Fukushima, Japan. Am J Infection Control, 2014, in press.
- 3) Nishimura H, Sakata S, Kaga A: A New methodology for studying dynamics of aerosol particles in sneeze and cough using a digital high-vision, high-speed video system and vector analyses. PLoS ONE 8: e80244. doi:10.1371/journal.pone.0080244
- 4) Yamaya M, Nishimura H, Nadine LK, Ota C, Kubo H, Nagatomi R: Ambroxol inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial

cells Arch. Pharm. Res. Arch Pharm Res. [Epub ahead of print] 2013

- 5) Yamaya M, Nishimura H, Lusamba Nadine L, Kubo H, Nagatomi R: Tulobuterol inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial cells. Physiological Reports 2013. 1: e00041.
- 6) Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Matsuzaki Y, Hongo S, Itagaki T, Katsushima N, Ohmi A, Nishimura H, and Ahiko T: Molecular epidemiology of Coxsackievirus A16 strains isolated from children in Yamagata, Japan between 1988 and 2011. Microbiol. Immunol. 57: 400-405, 2013.
- 7) 山口育男、青山知枝、山本優、木下恵子、伊藤由美、西村秀一: イムノクロマト法インフルエンザウイルス抗原検出キット BD ベリターシステム Flu における機器判定の感度とその目視判定に対する優越性の検討. 日本臨床微生物学雑誌 23:39-44, 2013.

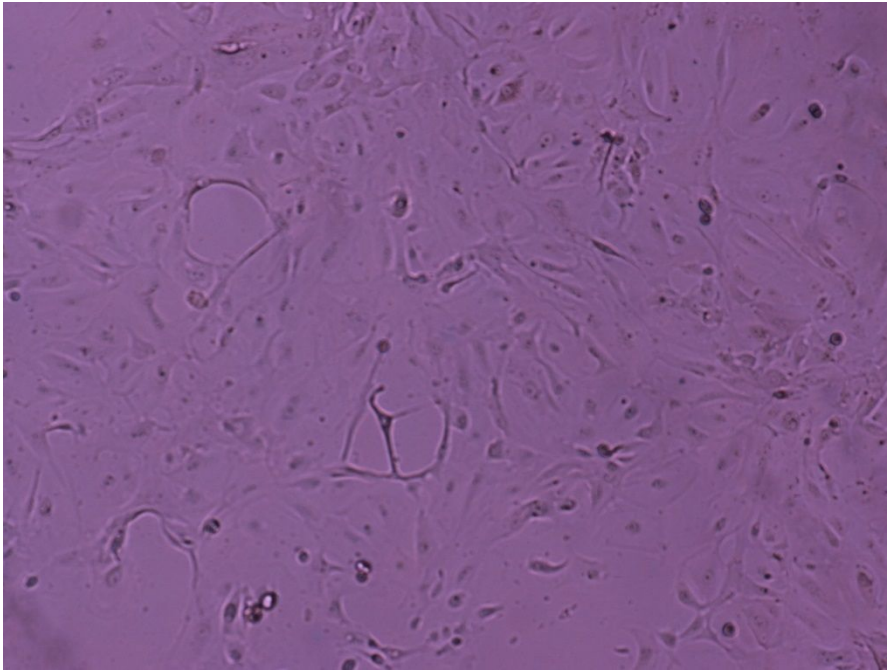
##### 学会発表

とくになし

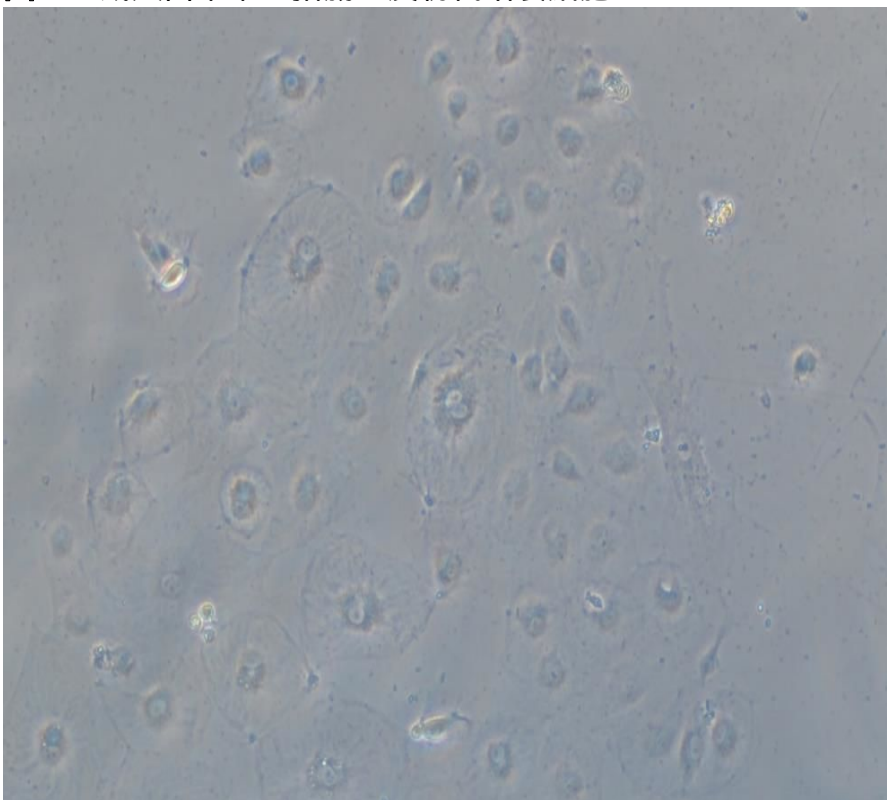
#### H . 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

とくになし

**圖 1** 成人由来気管支上皮初代培養細胞



**圖 2** 成人由来十二指腸上皮初代培養細胞





## 脳症発症と 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 )

### 研究要旨

正常だった小児が感染などを機に急性増悪するミトコンドリア 酸化異常症( 酸化異常症)はインフルエンザ脳症の発症形態と類似点がある。このため、インフルエンザの重症化が 酸化障害を介して発展してゆくという仮説のもとに、酸化に影響する因子について、培養皮膚線維芽細胞とタンデムマスを用いる in vitro probe assay ( IVP assay ) を用いて調べた。以下の結論が得られた。 PPAR アゴニストで高脂血症薬のベザフィブラート ( BEZ ) は、酸化異常を改善する効果が期待される。

培養環境が、高温下 ( 41 ) では長鎖脂肪酸の代謝が障害され、低温下 ( 33 ) では酸化が改善する。変異タンパクの立体構造の安定化などがこの理由として考え得られる。さらに、サイトカインの酸化におよぼす影響について調べた。インフルエンザで増加するといわれるサイトカイン ( IL1、IL6、INF および TNF ) の存在下で酸化能の変化を評価した。結論として、IF と IL6 による酸化への影響は少なく、IL1 と TNF は、酸化障害を悪化させる可能性が高い。すなわちサイトカインの種類によって酸化に影響を及ぼしインフルエンザの病態を悪化させる可能性が示唆された。インフルエンザに関連したこの他の諸因子についても酸化への影響をみる価値がある。

### 研究協力者

長谷川有紀 ( 島根大学小児科助教 )  
小林弘典 ( 島根大学小児科助教 )  
山田健治 ( 島根大学小児科医科医員 )  
高橋知男 ( 島根大学小児科医科医員 )

に急激に悪化して、急性脳症、乳幼児突然死様の経過をとり、インフルエンザ脳症と 酸化異常症の臨床的特徴に類似性がある。インフルエンザ脳症等の急性増悪における 酸化障害の関わりの有無を明らかにする。

### A . 研究目的

正常だった小児がインフルエンザ感染を機に短時間のうちに急性脳症に発展し、死亡することもある。これは「インフルエンザ脳症」として知られている。一方、ミトコンドリア脂肪酸 酸化異常症 ( 酸化異常症 ) も、安定している時はふつうと変わりなく、感染などを契機

### B . 方法

1 ) in vitro probe assay  
培養皮膚線維芽細胞を特殊なメEDIUM ( 最小限のブドウ糖遊離脂肪酸を含まずかつ過剰量のカルニチン ) で培養し、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EDIUM

中に分泌されるアシルカルニチンを測定し、酸化能、および障害部位を評価した。これを *In vitro* probe (IVP) assay という。アシルカルニチンはタンデムマスによって測定した(図 1)。インフルエンザ脳症のリスク因子、あるいは緩和因子を探索するために、IVP assay の系に以下のような環境変化、薬剤添加等によって酸化能の変化を評価した。

#### 2) 高脂血症薬ベザフィブラート (BEZ)

Peroxisome proliferating receptor (PPAR) アゴニストとして知られ、高脂血症薬として使用されている BEZ (400 nmol/mL) の存在下で、酸化異常症患者の細胞を培養し、酸化能改善効果を評価した。

#### 3) 環境温度の影響

培養環境を、高温下(41)と低温下(33)にして、37 環境下での酸化能と比較した。

#### 4) サイトカインの影響

インフルエンザで増加するといわれるサイトカイン(IL1、IL6、INF および TNF)存在下で酸化能の変化を評価した。

### C. 結果

#### 1) IVP assay の結果

IVP assay による結果を図 2 に示す。正常コントロール(図 2A)におけるアシルカルニチンプロファイルは、アセチルカルニチン(C2)のみが主なピークで、他のアシルカルニチンは低い。これに対し、中鎖アシル-CoA 脱水素酵素(MCAD)欠損症(図 2B)では、代謝障害部位に対応して、C4、C6、C8 の増加がみられ、中鎖脂肪酸の代謝障害を反映している。極長鎖アシル-CoA 脱水素酵素(VLCAD)欠損症(図 2C)では、長鎖脂肪酸の代謝障害を反映して C12、C14、C16 の長鎖アシルカルニチンの増加がみられた。

#### 2) ベザフィブラート (BEZ) の酸化異常症への影響

図 3 に、VLCAD 欠損症とグルタル酸血症型(GA2)の IVP assay の結果を示している。VLCAD 欠損症では長鎖脂肪酸の代謝障害を示し、一方 GA2 では、広範囲の酸化障害の病態を反映して、C4 から C16 まで全体的に増加している。

これに対し BEZ 存在下で培養した時のアシルカルニチンプロファイルは、図 3 の下段のように異常ピークが正常化している。このことから BEZ は、酸化異常症における代謝異常を改善する効果が推測された。

種々の酸化異常症の培養細胞で同様の実験を行ったところ、図 4 に示すようにほとんどすべての酸化異常症の細胞で酸化能の改善が認められた。

#### 3) 環境温度の影響

33 (低温下)、37、および 41 (高温下)で酸化異常症の細胞を用いて IVP assay を行った。その結果、図 5 に示すように、VLCAD 欠損症では、41 (高温下)で、C12、C14、C16 のアシルカルニチンが増加した。一方 33 では、C14、C16 は低下した。

広範囲の酸化障害の起こる 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)では、長鎖アシルカルニチン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 も長鎖脂肪酸の酸化は高温下では悪化した。GA2 においては中鎖短鎖の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酸化障害は悪化し、低温下ではすべての鎖長の酸化障害が緩和すると推測された。

#### 4) サイトカインによる酸化への影響



インフルエンザで上昇するサイトカインのうち、INF、IL1、IL6、およびTNFをそれぞれ10 ng/mLの濃度で添加してIVP assayを行った。結果はアシルカルニチンのC2に対する比で表した。インフルエンザ脳症等による死亡例で報告されているサイトカイン濃度は以下のとおりである：IF 0.1~0.15 ng/mL；IL1 22.6±4.7 pg/mL；IL6 1.1~16.1 ng/mL；TNF 8.8~315 ng/mL。

図6に示すように、正常細胞ではサイトカインの有無によって酸化能は影響を受けなかった(図6A)。MCAD欠損症では、C8は4種類のサイトカインの存在下で増加し、C10はIL1とTNFの存在下で増加した(図6B)。

VLCAD欠損症では、IFとIL6による影響はみられなかったが、IL1とTNF存在下でC14とC16の増加がみられた(図6C)。GA2では、IFとIL6による影響はみられなかったが、IL1とTNF存在下でC4~C16のすべてのアシルカルニチンの増加がみられた(図6D)。

検査した4種類のINF、IL1、IL6、およびTNFのうち、IFとIL6による酸化への影響は少なく、IL1とTNFは、酸化異常症の障害部位の代謝を悪化させる可能性が高い。

#### D. 考察

インフルエンザ脳症のように電撃的に急性経過を取る疾患が、酸化障害を介して起こるといふ仮説のもとに、種々の薬剤や環境による変化を評価した。酸化異常症のように代謝の脆弱な体質の個体では、感染などを契機に急性経過を取ることが少なくない。今回の検討の結果、高脂血症薬のBEZは酸化異常症を改善する可能性のあることを示した。その機序として、BEZはPPARアゴニストとして働き、PPARは酸化酵素の上流の配列に結合して酵素の転写を促進

し、このために酵素タンパクの量を増加させ残存活性を上昇させることが考えられている。酸化は連続して働く代謝経路であり、もしも正常な酵素も同じように増加させるならば、変異タンパクの増加量とのアンバランスが起こることも考えられる。BEZの作用機序についてはin vivoも含めて、さらに検討が必要であろう。

環境温度による影響をみた研究では、長鎖脂肪酸の代謝の脆弱な個体(または酸化異常症)では、高温下では長鎖脂肪酸代謝が悪化する可能性がある。一方中鎖~短鎖の酸化は高温下では促進される。一方低温下では、長鎖酸化の異常も緩和されることが推測された。この機序として、変異タンパクでも低温下では立体構造が比較的保たれて安定化するために、酵素活性が保存されたことが考えられる。

インフルエンザで上昇するサイトカインのうち4種類の酸化に対する影響を調べた実験では、IFとIL6の酸化への影響は少なく、IL1とTNFでは、酸化異常症を悪化させる可能性が高いことが分かった。インフルエンザはウィルスそのものの毒性というよりもサイトカインストームが病態を悪化するとされており、今後さらにこの他のサイトカインの影響についても検討する価値がある。

#### E. 結論

インフルエンザの症状のうち、酸化に影響を与える可能性のある薬剤、環境温度、およびサイトカインの影響を調べた。結論として、BEZは酸化異常症を改善する効果が期待される。環境温度では、低温下の方が酸化にとって良い可能性が高い。またサイトカインの中でも、IFとIL6の酸化への影響は少なく、IL1とTNFは、酸化系を悪化させ

る可能性があるということが明らかになった。この他のインフルエンザに関連した諸因子について検討する価値がある。

## F. 研究発表

### 1. 発表論文

- 1) Ihara K, Yoshino M, Hoshina T, Harada N, Kojima-Ishii K, Makimura M, Hasegawa Y, Watanabe Y, Yamaguchi S, Hara T: Coagulopathy in patients with late-onset ornithine transcarbamylase deficiency in remission state: A previously unrecognized complication. *Pediatrics* 131(1): e327-30, 2013 (January)
- 2) Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamada K, Takahashi T, Takayanagi M, Fukao T, Fukuda S, Yamaguchi S: Intracellular in vitro probe acylcarnitine assay for identifying deficiencies of carnitine transporter and carnitine palmitoyltransferase-1. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405(4): 1345-1351, 2013 (February)
- 3) Yamaguchi S, Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Furui M, Taketani T, Fukuda S, Fukao T, Shigematsu Y: Expanded newborn mass screening with MS/MS and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency in Japan. *日本マススクリーニング学会誌* 23(3): 270-276, 2013
- 4) 山口清次: MS 解析による代謝障害の診断. *分子消化器病* 10(1): 72-78, 2013
- 5) 山口清次: 新生児スクリーニングの新時代 ; タンデムマス法の導入. *日本周産期・新生児医学会雑誌* 48(4): 827-829, 2013
- 6) 山田健治, 長谷川有紀, 吉川陽子, 高橋知男, 小林弘典, 虫本雄一, Jamiyan Purevsuren, 山口清次: 成人後に診断された有機酸・脂肪酸代謝異常症の臨床的検討. *臨床神経学* 53(3): 191-195, 2013
- 7) 山口清次: タンデムマスを用いた新生児マススクリーニングによる先天代謝異常症の早期診断. *小児科臨床* 66(2): 193-198, 2013
- 8) 山口清次: 小児科領域におけるタンデムマスと GC/MS の臨床応用: 最近の進歩. *臨床病理* 61(9): 817-824, 2013
- 9) 山口清次(編): タンデムマス・ガイドブック、診断と治療社、東京、2013

### 2. 学会発表

- 1) Yamaguchi S: GC-MS for diagnosis of Organic Acidurias. International Conference on Inborn Errors of Metabolism 2013 講演. New Delhi, India, April 2013
- 2) Yamaguchi S: Fatty acid oxidation defects. International Conference on Inborn Errors of Metabolism 2013 講演. New Delhi, India, April 2013
- 3) Yamaguchi S, Purevsuren J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Furui M, Fukao T, Shigematsu Y, Fukuda S: Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency and newborn screening in Japan. 2013 Joint Meeting of the

- Newborn Screening and Genetic Testing Symposium (NBS&GTS) and the International Society for Neonatal Screening (ISNS). Atlanta, USA, May 2013
- 4) Yamaguchi S: Diagnosis and treatment of mitochondrial fatty acid oxidation defects. The Second Forum of International Translational Medicine of Clinical Genetics in Beijing - Development and Application of Genetic Technology 講演. Beijing, China, August 2013
  - 5) Yamada K, Kobayashi H, Takahashi T, Hasegawa Y, Purevsuren J, Fukuda S, Ito M, Yamaguchi S: Responsiveness of bezafibrate for neonatal onset form of glutaric acidemia type 1 : comparison with milder form using in vitro probe assay. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Barcelona, September 2013
  - 6) Yamaguchi S, Yamada K, Kobayashi H, Takahashi T, Hasegawa Y, Purevsuren J, Ohkubo T, Watanabe M, Tsunemi T, Ishii A, Takuma H, Tamaoka A, Shigematsu Y, Fukuda S: Two Japanese cases of adult onset myopathic form of glutaric acidemia type 1 . 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Barcelona, September 2013
  - 7) Yamaguchi S: A new treatment option for mitochondrial fatty acid oxidation defects: Bezafibrate, a PPAR agonist. 12th Asian Oceanian Congress on Child Neurology. Riyadh, Saudi Arabia, September 2013
  - 8) Yamaguchi S: Beriberi (Vitamin B1 deficiency) of young children lurking in modern life: A new approach for biochemical detection. 2013 Joint Meeting of 13th Asian Pan-Pacific Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition and 40th Japanese Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition シンポジウム. 東京, October 2013
  - 9) Yamaguchi S: Screening, diagnosis, and treatment of organic and fatty acid disorders. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD), The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD) Educational lecture. Chiba, November 2013
  - 10) 高橋知男, 山田健治, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: SIDS, ALTE 様症状で発症し先天代謝異常症と判明した 10 例の検討. 第 40 回日本マス・スクリーニング学会. 大阪, 2013 年 8 月
  - 11) 高橋知男, 山田健治, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: サリチル酸の β 酸化に及ぼす影響: in vitro probe assay による評価. 第 38 回日本医用マススペクトル学会年会. 神戸, 2013 年 9 月
- F . 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

図1. In vitro probe assayの原理

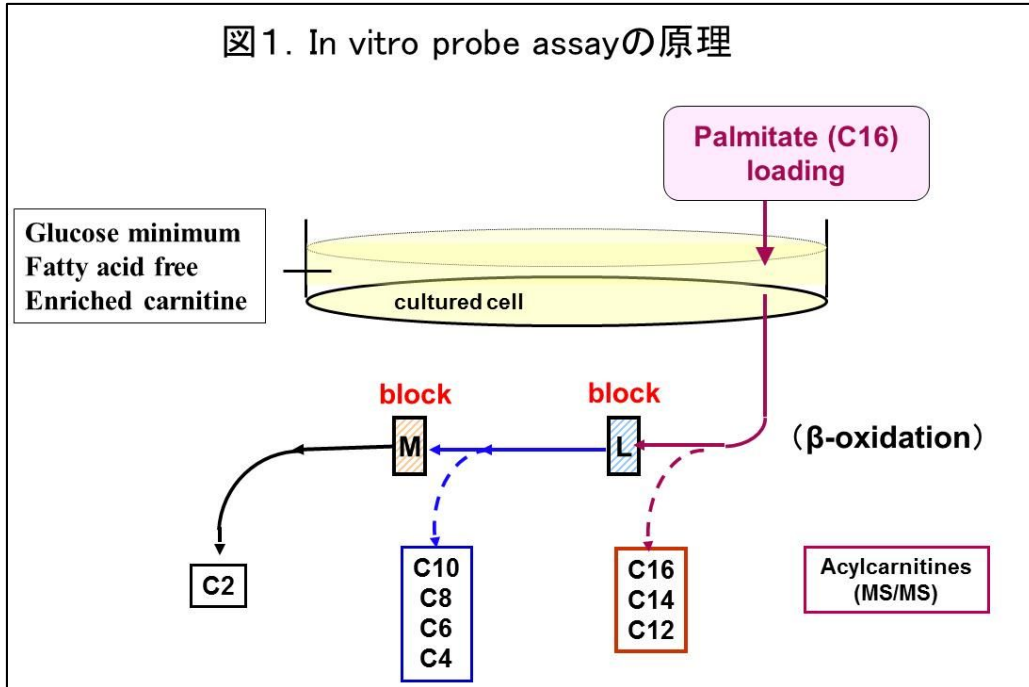


図2. In Vitro Probe Assayの結果の例

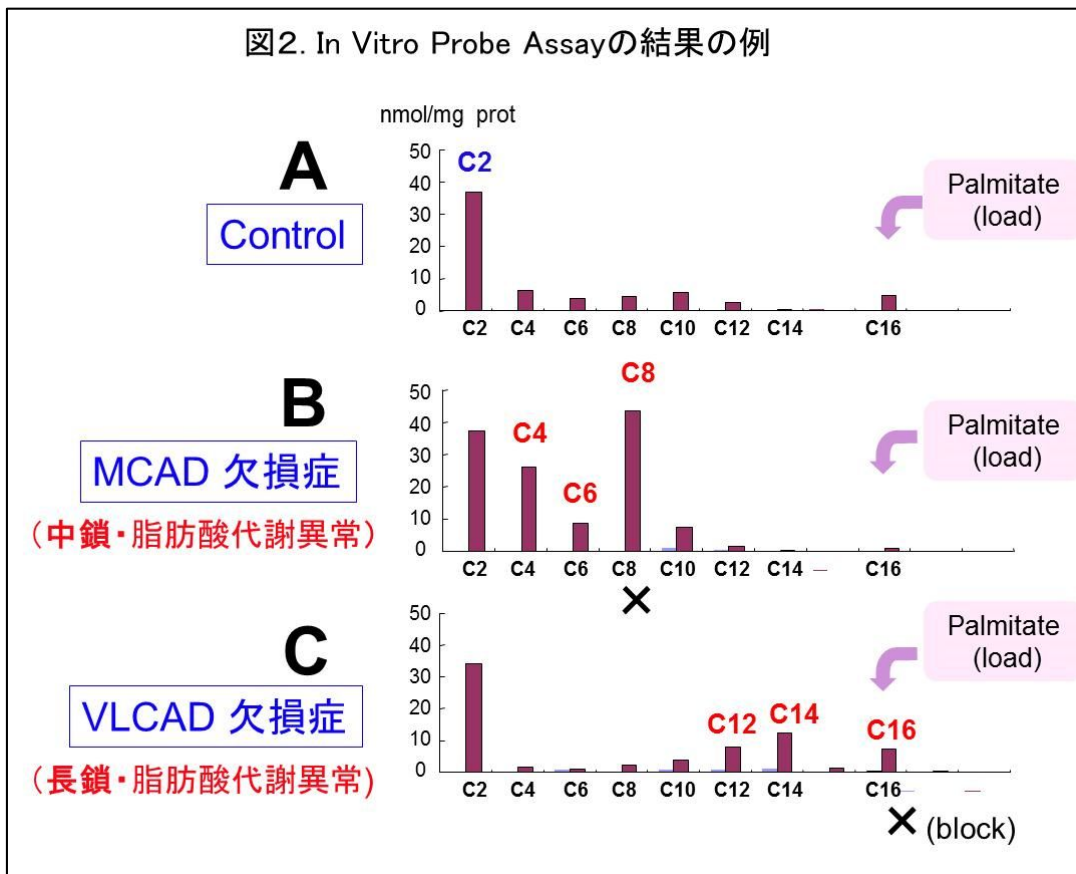


図3. ベザフィブラート添加前後のアシルカルニチンの変化

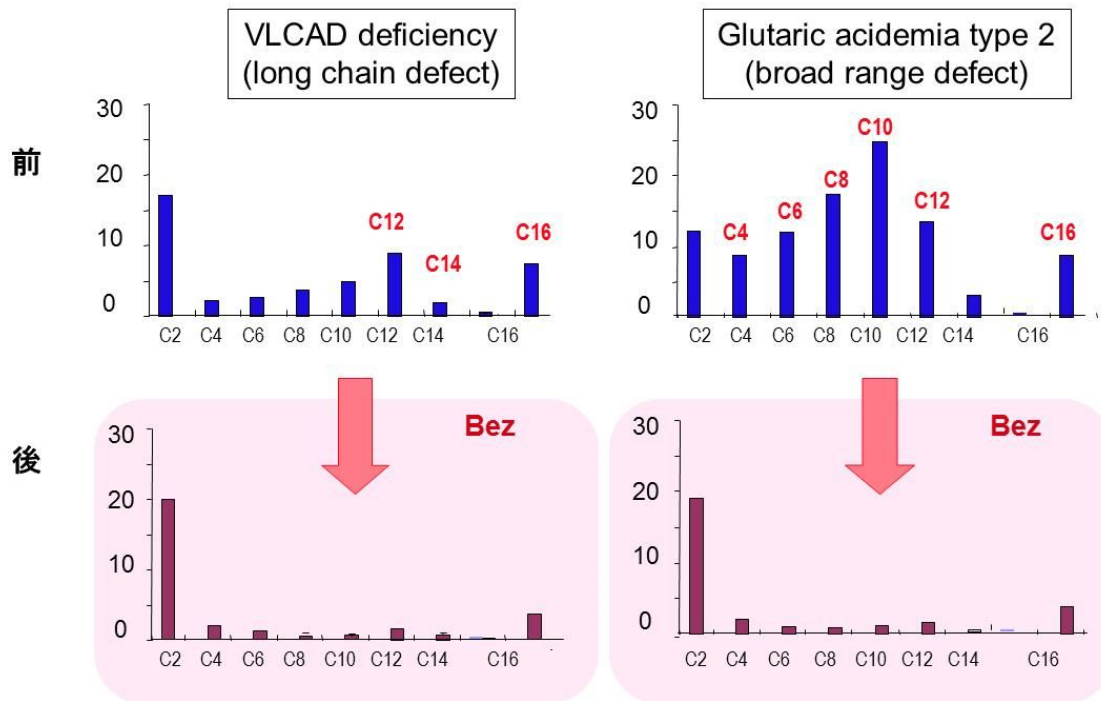
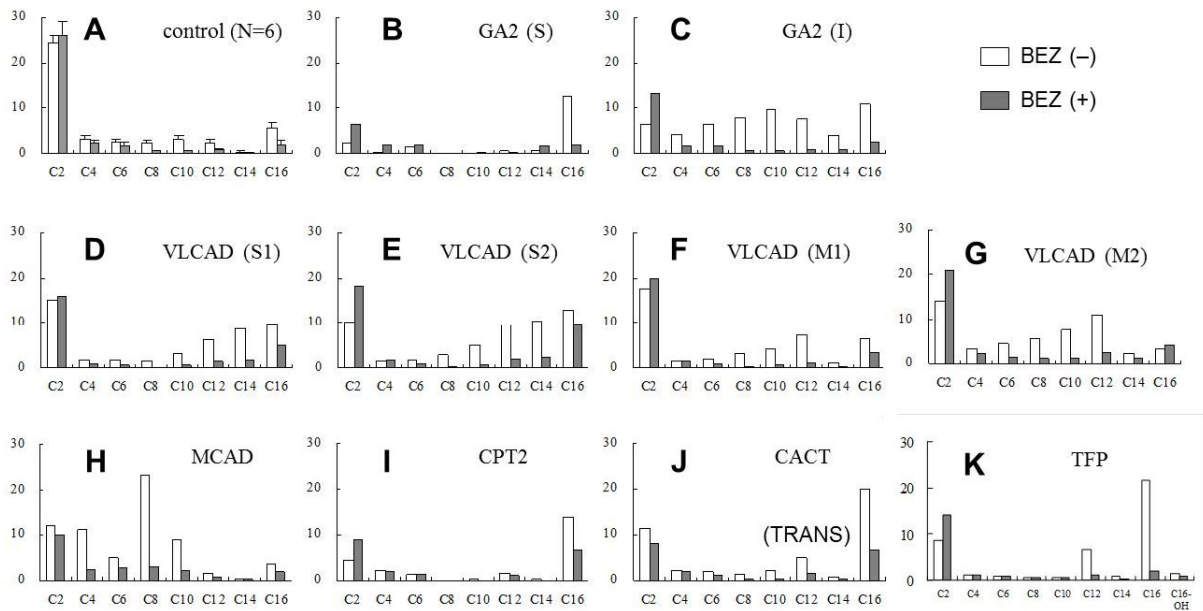


図4. ベザフィブレートの脂肪酸代謝異常改善効果in vitro probe assayによる評価



略字: GA2(S), GA2(I)=グルタル酸血症 II 型重症型と中間型; VLCAD(S), VLCAD(M)=VLCAD欠損症重症型と軽症型; MCAD=MCAD欠損症; CPT2=CPT2欠損症; CACT=カルニチン・アシルカルニチントランスロカーゼ欠損症; TFP=三頭酵素欠損症

図5. 高温下と低温下のアシルカルニチンの変化 (in vitro probe assay)

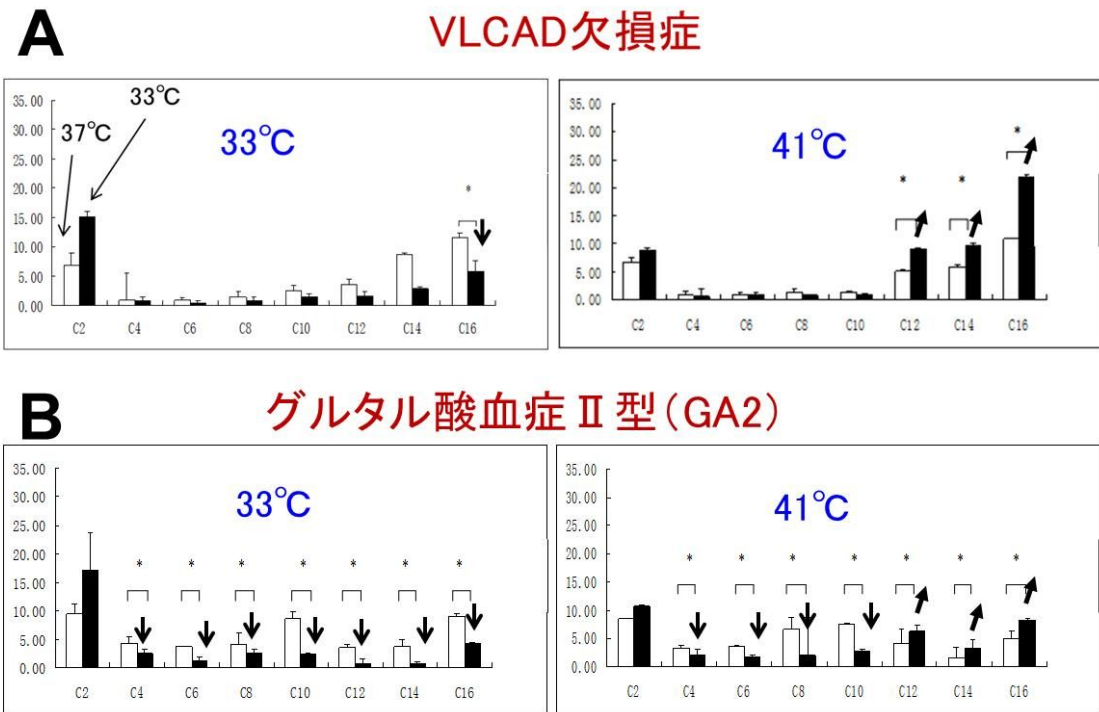


図6A. サイトカイン存在下におけるアシルカルニチンの変化

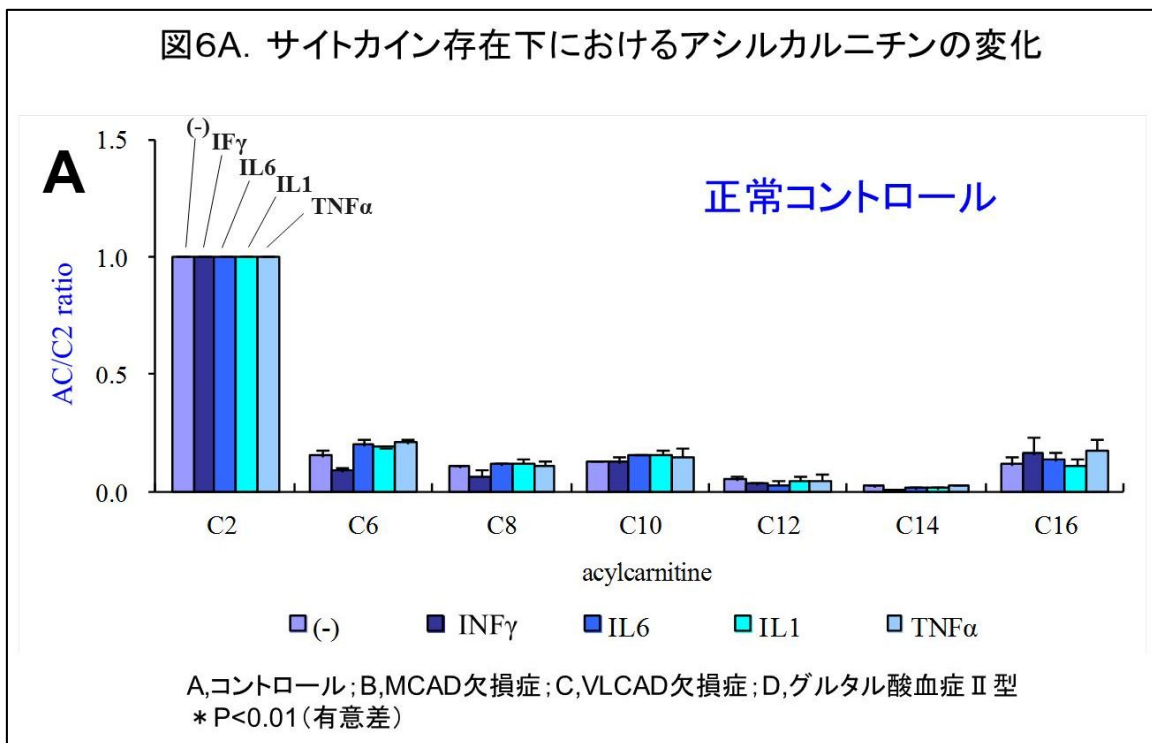


図6B. サイトカイン存在下におけるアシルカルニチンの変化

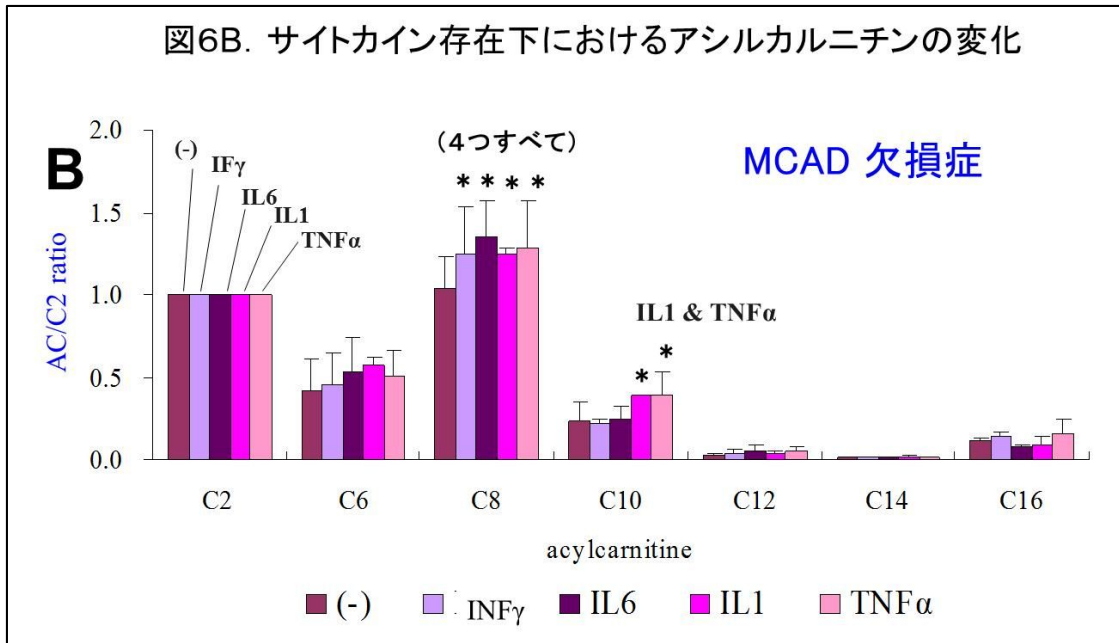


図6C. サイトカイン存在下におけるアシルカルニチンの変化

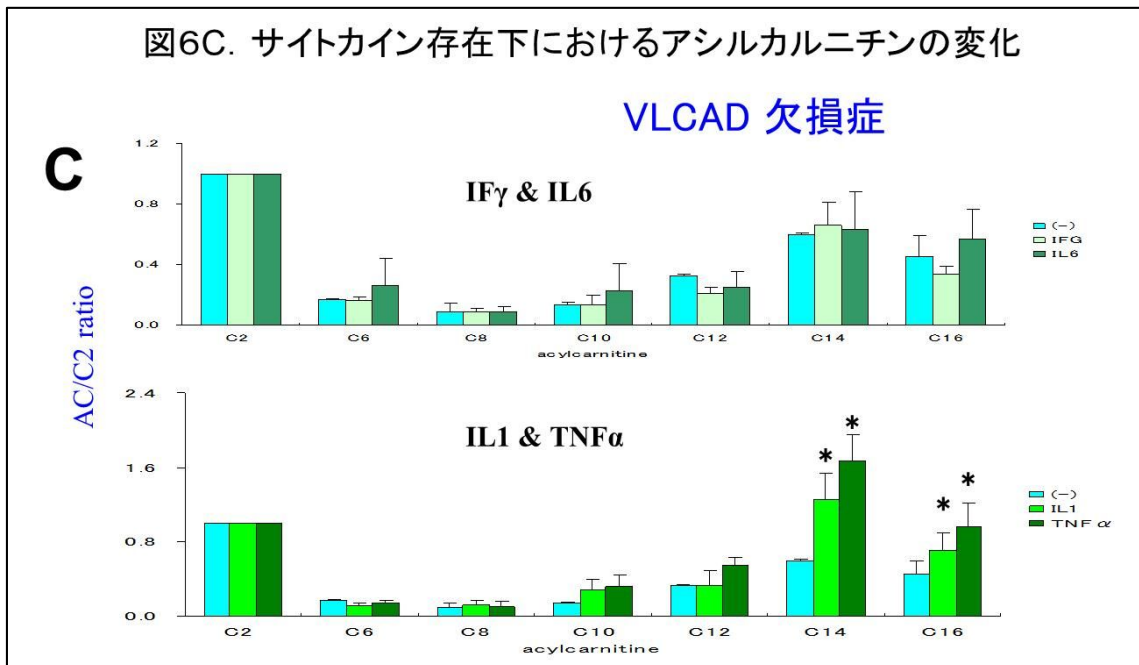
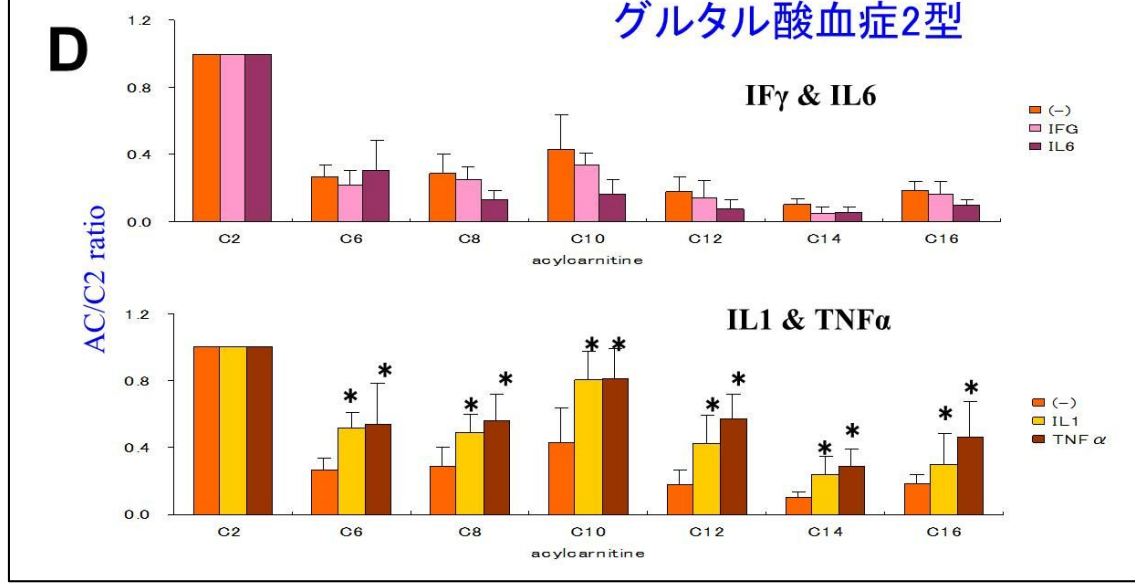


図6D. サイトカイン存在下におけるアシルカルニチンの変化







### III. 研究成果の刊行に関する一覧表



## 別紙 4

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
佐々木 信一	がん性髄膜炎に対する治療戦略.	大江裕一郎, 加藤晃史, 堀之内秀仁	ガイドラインに載っていない肺がん Practical Treatment	Medical View社	東京	2014	181-185

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shinahara W, Takahashi E, Sawabuchi T, Arai M, Hirotzu 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	8(7)	e70060	2013
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	8(6)	e66337	2013
Chida J, Ono R, Yamane K, Hiyoshi M, Nishimura M, Onodera M, Nakataki E, Shichijo K, Matushita M, Kido H	Blood lactate/ATP ratio, as an alarm index and real-time biomarker in critical illness.	PLoS ONE	8(4)	e60561	2013

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	7(6)	1218-1226	2013
Chida J, Kido H.	Extraction and quantification of adenosine triphosphate in mammalian tissues and cells.	Methods Mol Biol,	1098(1)	21-32	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		In press	2014
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	日本臨床内科学会誌	27(5)	578-583	2013
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		30-35	2013
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	24(4)	384-391	2013
木本貴士、水野大、子、堀野大、水野大、堀野大、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	44	59-61	2013
木戸博	アジュバント、予防接種Q & A	小児内科	45	60-64	2013
木戸博、高橋悦久、堀野大	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	16(4)	361-367	2013
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	1(6)	544-551	2013
Haga N, Kubota M, Miwa Z.	Epidemiology of hereditary sensory and autonomic neuropathy type IV and V in Japan.	Am J Med Genet Part A	161(A)	871-874	2013

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		In press	2013
Kato M, Yamagata T, Kubota M, et al.	Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutation.	Epilepsia		doi: 10.1111/epi.12200	2013
Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, Kosho T, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, Mabe H, Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T, Takanashi Ji, Shotelersuk V, Tekin M, Ochi N, Kubota M, et al.	MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome.	<i>Am J Med Genet</i>	Part A 161A	2234–2243	2013
Nakamura K, Kodera H, Akita T, Shiina M, Kato M, Hoshino H, Terashima H, Kubota M et al.	De novo mutations in <i>GNAO1</i> , Encoding a Gα subunit of heterotrimeric G proteins, cause epileptic encephalopathy.	The Am J Hum Genet	93	1-10	2013
Shiihara T, Miyake T, Izumi S, Sugihara S, Watanabe M, Takanashi J, Kubota M, Kato M.	Serum and CSF biomarkers in acute pediatric neurological disorders.	Brain Dev		in press	2013
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,		in press	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.	<i>Virus Genes</i>		Epub 2014 Jan 28	2014
Chua KJ, Kubo Y, Ma Y, Yasui K, Matsuyama T, Hayashi H	A short variant BTBD2 as a novel negative regulator of IRF-associated signalling.	<i>Int J Integrative Biol.</i>	14	31-38	2013
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.	<i>AIDS Res Hum Retroviruses</i>	29(2)	279-288.	2013
Kubo Y, Hayashi H, Matsuyama T, Sato H, Yamamoto N.	Retrovirus entry by endocytosis and cathepsin proteases.	<i>Adv Virol.</i>		640894	2012
Kohno T, Kubo Y, Yasui K, Haraguchi M, Shigematsu S, Chua KJ, Matsuyama T, Hayashi H.	Serum starvation activates NF- $\kappa$ B through G protein $\beta$ 2 subunit-mediated signal.	<i>DNA Cell Biol</i>	31(11)	1636-1644	2012
Ihara K, Yoshino M, Hoshina T, Harada N, Kojima-Ishii K, Makimura M, Hasegawa Y, Watanabe Y, Yamaguchi S, Hara T.	Coagulopathy in patients with late-onset ornithine transcarbamylase deficiency in remission state: A previously unrecognized complication.	<i>Pediatrics</i>	131(1)	e327-330	2013

Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamada K, Takahashi T, Takayanagi M, Fukao T, Fukuda S, Yamaguchi S.	Intracellular in vitro probe acylcarnitine assay for identifying deficiencies of carnitine transporter and carnitine palmitoyltransferase-1.	Anal Bioanal Chem	405(4)	1345-1351.	2013
Yamaguchi S, Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Furui M, Taketani T, Fukuda S, Fukao T, Shigematsu Y.	Expanded newborn mass screening with MS/MS and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency in Japan.	日本マススクリーニング学会誌	23(3)	270-276	2013
山口清次	MS解析による代謝障害の診断	分子消化器病	10(1)	72-78	2013
山口清次	新生児スクリーニングの新時代; タンデムマス法の導入.	日本周産期・新生児医学学会雑誌	48(4)	827-829	2013
山田健治, 長谷川有紀, 吉川陽子, 高橋知男, 小林弘典, 虫本雄一, Jamiyan Purevsuren, 山口清次	成人後に診断された有機酸・脂肪酸代謝異常症の臨床的検討.	臨床神経学	53(3)	191-195	2013
山口清次	タンデムマスを用いた新生児マススクリーニングによる先天代謝異常症の早期診断.	小児科臨床	66(2)	193-198	2013
山口清次	小児科領域におけるタンデムマスとGC/MSの臨床応用: 最近の進歩.	臨床病理	61(9)	817-824	2013
Nagashima O, Ohashi R, Yoshioka Y, Inagaki A, Tajima M, Koinuma Y, Iwakami S, Iwase A, Sasaki S, Tominaga S, Takahashi K.	High prevalence of gene abnormalities in young patients with lung cancer.	J Thorac Dis	5	27-30	2013



Mori T, Tajima K, Hirama M, Sato T, Kido K, Iwakami S, Sasaki S, Iwase A, Shiomi K, Maeda M, Hino O, Takahashi T	The n-erc index is a novel monitoring and prognostic marker for advanced malignant pleural mesothelioma.	J Thorac Dis	5	145-148	2013
門屋講太郎, 吉岡 泰子, 難波由喜子, 桂 蓉子, 高 遼, 小池 建吾, 吉岡 正剛, 佐々木信一, 富永 滋, 高橋 和久.	肺膿瘍・膿胸7例における歯周病細菌PCR検査の臨床的意義の検討.	日本呼吸器学会雑誌	2	79-84	2013
南條友央太, 佐々木信一, 松野 圭, 石森絢子, 牧野文彦, 吉岡正剛, 吉岡泰子, 富永 滋, 山口哲生.	<i>Nocardia wallacei</i> が検出され、ST合剤投与で軽快した気管支拡張症の1例.	Therapeutic Research	34	759-760	2013
磯部 全, 佐々木 信一, 富永 滋, 前野 敏孝, 倉林 正彦.	喘鳴を伴わずに発症した好酸球性細気管支炎の1例.	日本呼吸器学会誌	2	607-611	2013
Takashita E, Ejima M, Miura M, Ohnishi A, Nishimura H, Odagiri T, Tashiro M.	A community cluster of influenza A(H1N1)odm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013.	Euro Surveill.	19	pii=20666	2014
Nguyen, Abe S, Sun G, Matsuoka A, Nishimura H, Ishihara M, Matsui.	Rapid screening for influenza using a multivariable logistic regression model to save labor at a clinic in Iwaki, Fukushima, Japan.	Am J Infection Control		in press	2014
Nishimura H, Sakata S, Kaga A	A new methodology for studying dynamics of aerosol particles in sneeze and cough using a digital high-vision, high-speed video system and vector analyses.	PLoS ONE	8	e80244	2013

Yamaya M, Nishimura H, Nadine LK, Ota C, Kubo H, Nagatomi R	Ambroxol inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial cells.	Arch. Pharm. Res. Arch Pharm Res.		[Epub ahead of print]	2013
Yamaya M, Nishimura H, Lusamba Nadine L, Kubo H, Nagatomi R	Tulobuterol inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial cells.	Physiological Reports	1	e00041.	2013
Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Matsuzaki Y, Hongo S, Itagaki T, Katsushima N, Ohmi A, Nishimura H, Ahiko T	Molecular epidemiology of Coxsackievirus A16 strains isolated from children in Yamagata, Japan between 1988 and 2011.	Microbiol. Immunol.	57	400-405	2013
山口育男、 青山知枝、 山本優、 木下恵子、 伊藤由美、 西村秀一	イムノクロマト法インフル エンザウイルス抗原検出キ ットBDベリターシステムFlu における機器判定の感度と その目視判定に対する優越 性の検討	日本臨床微 生物学雑誌	23	39-44	2013
中澤裕美子, 前 川貴伸, 小穴 慎二, 石黒 精, 太田さ やか, 寺嶋宙, 柏井洋文, 久保田雅也, 堤 義之, 中 澤温子, 師田 信人, 阪井裕 一	脳幹部腫瘍との鑑別に組織 生検が有用であった多発性 硬化症の11歳男児例	日本臨床免 疫学会会誌	36	175-179	2013
磯部 全, 佐々木信一, 神戸将彦, 相澤智弘, 原 健一郎, 前野敏孝	喀血を主訴とし, 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

