

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21249061

研究課題名（和文）高病原性鳥インフルエンザウイルスの細胞侵入、感染増悪機序を基盤とした新治療法開発

研究課題名（英文）Development of new therapeutics for a highly pathogenic influenza virus infection by inhibition of virus entry and multiplication

研究代表者

木戸 博 (KIDO HIROSHI)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授

研究者番号：50144978

研究成果の概要（和文）：高病原性鳥インフルエンザウイルスの細胞内の進入に II 型細胞膜プロテアーゼの MSPL/TMPRSS13 が関与している事を発見した。さらに TMPRSS13KO マウスにおいて、高病原性鳥インフルエンザウイルスのヘマグルチニン (HA) 切断部位の配列が (RKKR) の場合は部分抑制、(KKKR) の場合は増殖できないことを明らかにした。また感染重症化による多臓器不全には、インフルエンザウイルス-サイトカイン-プロテアーゼサイクルによる全身臓器と血管内皮の trypsin と MMP-9 の増加が関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We found that type II membrane bound serine proteases MSPL/TMPRSS13 are essential cellular factors for entry into cells of the highly pathogenic avian influenza (HPAI) viruses. To confirm the evidence, we have made TPMRSS13 KO mice and challenged the viruses to the animals. Viral multiplication of the HPAI viruses with the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence RKKR partially and the sequence KKKR was completely suppressed in the TPMRSS13 KO mice. The results indicate that MSPL/TMPRSS13 are essential for the entry of the HPAI virus. Furthermore, we found that viral infection stimulates the influenza-cytokine-protease cycle and the cycle plays an important role in the pathogenicity of multiple organ failure induced by infection.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費       | 合計         |
|--------|------------|------------|------------|
| 2009年度 | 15,100,000 | 4,530,000  | 19,630,000 |
| 2010年度 | 10,200,000 | 3,060,000  | 13,260,000 |
| 2011年度 | 10,200,000 | 3,060,000  | 13,260,000 |
|        |            |            |            |
| 総計     | 35,500,000 | 10,650,000 | 46,150,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症防疫学

キーワード：高病原性鳥インフルエンザ、プロセシングプロテアーゼ、多臓器不全、サイトカインストーム、トリプシン、MMP-9、ミトコンドリア膜電位、ATP産生

1. 研究開始当初の背景  
インフルエンザウイルスは、多くのウイルス

と異なりプロテアーゼ遺伝子を持たない。ウイルスが感染性を示すには、ウイルス膜蛋白

のヘマグルチニン(HA)が限定分解され、膜融合活性が発現されなくてはならない。そこでウイルスは宿主のプロテアーゼを借用して増殖するが、そのためプロテアーゼの存在する組織でしか増殖できない仕組みになっている。ヒトのインフルエンザHAの限定分解酵素は、1992年木戸等による tryptase Claraの発見(Kido H 等:*J. Biol. Chem.* 267, 13573-9, 1992)で明らかにされた。一方高病原性鳥インフルエンザのHA分解酵素は、これまで furin によると報告されていた。しかし高病原性鳥インフルエンザには、2種類の切断配列があり、furinはtype II (RKKR 配列)を切断するもののtype III (KKKR 配列)の切断配列は認識せず、世界の研究者はこれを切断する酵素の探索を行っていた。我々は、ヒトの肺に見出したII型膜結合型セリンプロテアーゼのMSPLとTMPRSS13が、type IIIとtype IIのHAを切断して、全ての高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染性を出現させる事を見いだした。即ち、ウイルスの出芽を阻害するneuraminidase阻害剤以外に、ウイルス細胞内侵入阻害剤のターゲット分子が同定された。

## 2. 研究の目的

なぜ個体はウイルス感染で死に至るのだろうか？多臓器不全の発症機序：インフルエンザ感染局所では激しい炎症が生じるが、個体の死はウイルスが体外へ排除された時点から始まる多臓器不全の結果である。それではなぜ多臓器不全になるのだろうか？これまでの解析から多臓器不全のきっかけは、感染局所で生じた炎症性サイトカインによるサイトカインストーム(特にIL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ )によって、全身臓器のプロテアーゼ群の転写活性が増加し、特に異所性膵trypsinとMMP-9が異常増加する結果(Le, 木戸等, *Biol. Chem.* 387, 467-75, 2006)による組織破壊と、増加したtrypsinによる細胞機能の変化(橋本、木戸等, *J. Cell Biol.*181, 1065-72, 2008)、ミトコンドリア膜電位の低下に伴うNOとO<sub>2</sub>-の異常増加、等が原因と考えられる。一方、ウイルス感染でミトコンドリア機能不全が生じるが、機能

不全によるATP産生量の急激な低下に關与する遺伝子多型が見つかった。このような多型を持つ固体では(Yao, 木戸等*Human Mutation* 29: 718-27, 2008)、ウイルス感染後に血管内皮細胞のタイトジャンクションの崩壊が起きる。上記の各要因が多臓器不全抑制のターゲット分子と想定された。従って治療法は、ATP産生の増加を導く代謝的治療法、抗サイトカイン療法、抗酸化療法、抗プロテアーゼ療法の併用が考えられる。本プロジェクトでは各要因間の因果関係から、具体的な治療法の開発研究に取り組む。

(1) ウイルス侵入阻害剤の探索、開発と多剤併用療法の検討: HA プロセッシングプロテアーゼTMPRSS13/MSPL阻害剤の探索、ノイラミダーゼ阻害剤と併用の検討。ウイルス出芽を阻止するノイラミダーゼ阻害剤(タミフル、リレンザ)が、インフルエンザ感染に一般的に使用されているが、ウイルスの侵入と複製は阻害しない。これにウイルス侵入阻害剤のHA プロセッシングプロテアーゼ阻害剤が併用されると、相乗的抑制効果が期待される。本プロジェクトは、低病原性インフルエンザの切断シグナル(type I, Q/E-X-R)と、高病原性鳥インフルエンザの切断シグナル(type II, RKKR 配列とtype III, KKKR 配列)をそれぞれ認識するHA プロセッシングプロテアーゼの阻害剤を検索し、ノイラミダーゼ阻害剤との併用を検討する。type Iの解裂酵素は分泌性のトリプシン型プロテアーゼと細胞膜結合型酵素であることから、阻害剤は細胞膜上か細胞外で作用して、効果が期待される。具体的には、tryptase Clara, mini-plasmin, trypsin, TMPRSS2, HATの阻害剤をスクリーニングする。一方、高病原性鳥インフルエンザの場合、細胞内ゴルジ装置に局在するfurinと、細胞膜局在のMSPL/TMPRSS13が対象となる。前者の場合、薬剤の細胞内移行が重要となるため、今のと

ころ有効な阻害剤が見つかっていない。しかし細胞膜上の MSPL/TMPRSS13 の場合、阻害剤の血中濃度を上げる事で阻害効果が期待される。これらの阻害剤のスクリーニングはすでに始まっており、有効な阻害剤について培養細胞と動物実験モデルで効果を検証する。

(2) 多臓器不全の発症機序の解析と治療法の開発: 高病原性鳥インフルエンザは急速な多臓器不全を引き起こし、低病原性インフルエンザは小児や高齢者に多臓器不全を発症させて、個体を死に至らしめる。インフルエンザウイルスによる多臓器不全発症の機序解析から、多臓器不全の原因として、①インフルエンザウイルスサイトカインプロテアーゼ (trypsin, MMP-9) サイクルによる組織破壊、②ミトコンドリアの膜電位低下によるATP産生の低下と全身エネルギー危機の発症 (末梢血のATPレベルのモニターが可能)、③ミトコンドリア機能低下に伴う $O_2^-$ , NO産生の異常増加と、これによるミトコンドリア機能障害の増悪サイクルが関与する事、等を見出した。本研究は、①—③相互の因果関係を解析し、治療法としてサイトカインストームの抑制、プロテアーゼの転写活性化因子の阻害剤スクリーニング、エネルギー危機を回避する代謝改善法の開発、ミトコンドリア機能の改善方法を開発する。

### 3. 研究の方法

研究目的を達成するため、1) HAプロセッシングプロテアーゼの阻害剤を検索して、新規ウイルス侵入阻止剤を提案する。2) 多臓器不全抑制のターゲット分子、①サイトカイン、②感染により熱失活するエネルギー産生酵素群、③感染によって誘導されるプロテアーゼ群、を標的にした治療法を考案する。具体的には、ATP産生の増加を導く代謝的治療法、抗サイトカイン療法、抗酸化療法、抗プロテアーゼ療法の併用を検討する。

### 4. 研究成果

1) 高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染性を決定する細胞膜上の新規宿主プロテアーゼMSPL/TMPRSS13を発見しその阻害剤をスクリーニングしてきた。さらに、MSPL/TMPRSS13が高病原性鳥インフルエンザの増殖に必要な宿主因子であることを確認するため、TMPRSS13のKOマウスを作成して、高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染実験を実施した。その結果TMPRSS13のKOマウスでは、ヘマグルチニン(HA)の切断部位の配列が(KKKR)のウイルスでは、ほとんど増殖しないことが判明して、これまでの研究成果の正しいことが感染実験で確かめられた。さらに RKKR 配列を認識するプロテアーゼには furin と TMPRSS13/MSPL があるため、TMPRSS13のKOマウスではRKKR 配列を持つ高病原性鳥インフルエンザウイルスでは、部分的なウイルス増殖を示すことが明らかになった。図1には、TMPRSS13 の遺伝子を持たないヒト血管内皮細胞ECV304にTMPRSS13遺伝子を過剰発現した細胞とwild type (WT)の細胞に高病原性鳥インフルエンザH5N1ウイルス (WT:RKKR型) とmutantウイルス (Mut:KKKR型) を感染させた時の各ウイルス株のHAの開裂様式(A)とウイルス増殖を感染した細胞を抗ウイルス抗体で染色した結果(B)を示す。

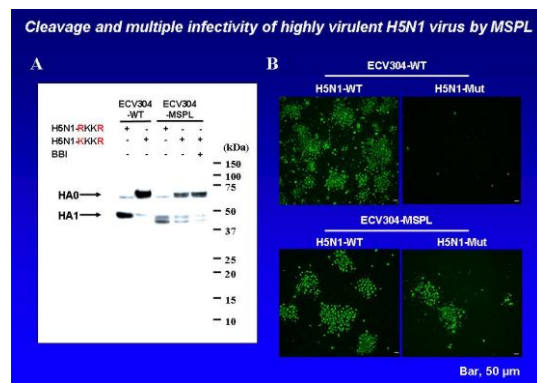


図1. HAの開裂様式と、TMPRSS13遺伝子の発現の有無によるECV304細胞でのウイルスの増殖性の検討。

上記の細胞培養系での結果を基に、TMPRSS13のKOマウスにWTウイルスとMutウイルスを感染させて、感染後6日目の肺を取り出してホモジネートした後、ウイルス量を測

定するためにMDCK細胞に各ホモジネートを添加して24時間後のウイルス増殖を抗ウイルス抗体で染色して比較検討した結果を図2に示す。KOマウスの肺では、H5N1ウイルス (WT:RKKR型) とmutantウイルス (Mut:KKKR型) は共に増殖性が悪いが、特に (Mut:KKKR型) では増殖は見られなかった。

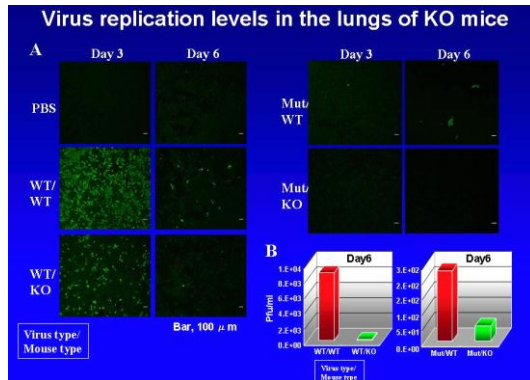


図2. TMPRSS13 KOマウスの肺内でのH5N1ウイルス (WT:RKKR型) とmutantウイルス (KKKR型) の増殖性

2) 多臓器不全の発症機序: インフルエンザ感染による多臓器不全は、感染局所で生じた炎症性サイトカインにより全身臓器の異所性膵trypsinとMMP-9が異常増加した結果、血管内皮細胞の透過性の亢進によって起きることを明らかにして、図3に示すようにインフルエンザウイルス-サイトカイン-プロテアーゼ サイクル説を提唱した。

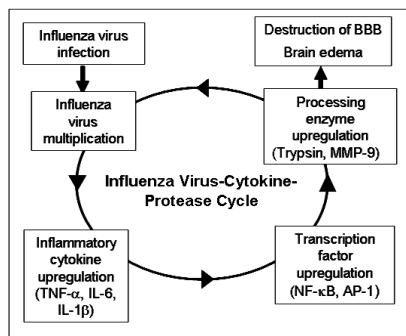


図3. インフルエンザウイルス-サイトカイン-プロテアーゼ サイクル

このサイクル説を証明するために、インフルエンザ心筋炎をモデルにして検討が行われ

た。このサイクルによって誘導されるtrypsinをRNAiで発現抑制することでサイクルの回転が抑制され、その結果ウイルス増殖が抑制されることを図4に示している。

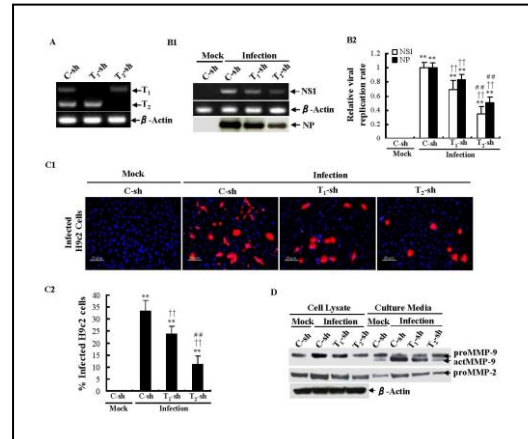


図4 trypsinノックダウンによる心筋細胞でのインフルエンザウイルスの増殖抑制

さらに、インフルエンザウイルス-サイトカイン-ミトコンドリア機能不全の起きる機序として、エネルギー代謝にかかわる酵素とその転写因子の同定を行った。その結果、糖代謝経路の中で、pyruvate dehydrogenaseの活性低下が、糖代謝と脂肪代謝の切り替えに関与し、さらにその上流の転写因子のPGC1αがこれらの酵素活性の変動に関与していることが明らかになった。以上から、細胞侵入、感染増悪機序の治療には、ウイルス増殖抑制剤、抗サイトカイン療法、抗プロテアーゼ療法、エネルギー代謝の治療薬が有効であることが明らかとなった。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計45件)

- ① Fujimoto C, Takeda N, Kido H., et al. Induction and maintenance of anti-influenza antigen-specific nasal secretory IgA levels and serum IgG levels after influenza infection in adult. *Influenza Other Respi Viruses* 査読有、2012, doi: 10.1111/j.1750-2659.2011.00330.x
- ② 木戸博、千田淳司、インフルエンザ脳症の発症機序—CPT2 遺伝子多型が解き明かす発症リスク、*医学のあゆみ*、査読無、241(1), 2012, pp.23-28.
- ③ Yao M, Yao D, Kido H., et al. Bezafibrate upregulates carnitine

- palmitoyltransferase II expression and promotes mitochondrial energy crisis dissipation in fibroblasts of patients with influenza-associated encephalopathy. *Mol Genet Metab.* 査読有、104(3), 2011, 265-272.
- ④ Kido H, Okumura Y, Takahashi E., et al. Role of host cellular proteases in the pathogenesis of influenza and influenza-induced multiple organ failure. *Biochim Biophys Acta* 査読有、1824(1) 2011, 186-194. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.07.001
- ⑤ Pan HY, Yamada H, Kido H, et al., Upregulation of ectopic trypsins in the myocardium by influenza A virus infection triggers acute myocarditis. *Casrdiovasc Res* 査読有、89(3) 2011, 595-603.
- ⑥ 木戸博、奥村裕司、他、インフルエンザ感染の重症化をもたらすウイルスと宿主の相互関連、査読無、呼吸と循環 59(10), 2011, pp.973-981.
- ⑦ 木戸博、千田淳司、山根一彦、インフルエンザウイルス感染症の重症化メカニズムと治療戦略、査読無、呼吸器病 15(1), 2011, pp.37-39.
- ⑧ Wang S, Le TQ, Kido H, et al., Influenza virus-cytokine-protease cycle in the pathogenesis of vascular hyperpermeability in severe influenza. *J Infect Dis* 査読有、202(7) 2010, 991-1001.
- ⑨ Takahashi E, Kataoka K, Kido H, et al., Attenuation of inducible respiratory immune responses by oseltamivir treatment in mice infected with influenza A virus. *Microbes Infect* 査読有、12(10) 2010, 778-783.
- ⑩ Okumura Y, Takahashi E, Kido H. et al., Novel type II transmembrane serine proteases, MSPL and TMRSS13, proteolytically activate membrane fusion activity of hemagglutinin of highly pathogenic avian influenza viruses and induce their multicycle replication. *J Virol* 査読有、84(10) 2010, 5089-5096.
- ⑪ 木戸博、千田淳司、他、遺伝子多型が解き明かすインフルエンザ脳症と多臓器不全、査読無、実験医学 28(18), 2010, pp.2927-2933.
- ⑫ 木戸博、千田淳司、他、インフルエンザ感染の重症化、多臓器不全の発症メカニズム、査読無、日本臨床 68(8), 2010, pp.1565-1573.
- ⑬ 木戸博、千田淳司、Cisse Y, 他、インフルエンザ脳症の発症原因—ミトコンドリア脂肪酸代謝障害と血管内皮細胞の膜透過性の亢進—、査読無、最新医学 65(1), 2010, pp.52-60.
- ⑭ 木戸博、水野大、武井恒知、経鼻ワクチンの開発状況、査読無、インフルエンザ 11(2), 2010, pp.184-190.
- ⑮ 木戸博、千田淳司、インフルエンザ感染の重症化機序、査読有、神経感染症 15(1), 2010, pp.66-73.
- ⑯ 木戸博、水野大、木本貴士、粘膜免疫機能とインフルエンザ感染、査読無、小児内科 42(9), 2010, pp.1541-1545.
- ⑰ Kam YW, Okumura Y, Kido H, et al., Cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein by airway proteases enhances virus entry into human bronchial epithelial cells in vitro. *PLoS One* 査読有、4(11) 2009, e7870.
- ⑱ Sawabuchi T, Suzuki S, Kido H, et al., Boost of mucosal secretory immunoglobulin A response by clarithromycin in paediatric influenza. *Respirology* 査読有、14(8) 2009, 1173-1179.
- ⑲ Kido H, Okumura Y, Takahashi E, et al., Host envelope glycoprotein processing proteases are indispensable for entry into human cells by seasonal and highly pathogenic avian influenza viruses. *J Mol Genet Med* 査読有、3(1) 2009, 176-175.
- ⑳ 木戸博、酵素学からみえてくるインフルエンザ感染とインフルエンザ脳症、査読無、インフルエンザ 10(2), 2009, pp.101-103.
- [学会発表] (計 11 件)
- ① Kido H. Potent mucosal antigen delivery vehicle SF-10, mimicking pulmonary surfactant, for nasal influenza vaccination: safety and efficacy. International Conference & Exhibition on Vaccines & Vaccination. November 22-24, 2011, Philadelphia, USA.
- ② Kido H. Attenuation of respiratory immune responses by antiviral neuraminidase inhibitor treatment and boost of mucosal immunoglobulin A response by administration of immunomodulator Clarithromycin in pediatric influenza. Options for the Control of Influenza VII. September 7, 2011. Hong Kong, China.
- ③ Kido H. Immune responses to nasal vaccination of HA Vaccine with new

mucosal adjuvants, pulmonary surfactant medicine Surfacten and its synthetic compound in mice and mini-pigs. Influenza vaccine for the world. May 29, 2009. Canne, France

研究者番号：70380061

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木戸 博 (KIDO HIROSHI)  
徳島大学・疾患酵素学研究センター・  
教授  
研究者番号：501444978

### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

### (3) 連携研究者

千田 淳司 (CHIDA JUNJI)  
徳島大学・疾患酵素学研究センター・  
助教  
研究者番号：20437651  
ユースフ シセ (YOUSSOUF CISSE)  
徳島大学・疾患酵素学研究センター・研  
究員  
研究者番号：80437649  
(H21, H22 連携研究者→H23 研究協力者)  
水野 大 (MIZUNO DAI)  
徳島大学・疾患酵素学研究センター・  
助教