

令和元年5月24日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05348

研究課題名(和文) サイトカインストームを伴うインフルエンザ感染重症化機序の解明と効果的な治療戦略

研究課題名(英文) Study on the pathogenesis of severe influenza virus infection associated with cytokine storm and its effective treatment options

研究代表者

木戸 博 (KIDO, Hiroshi)

徳島大学・先端酵素学研究所(デザイン)・特任教授

研究者番号：50144978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザ感染重症化は、「インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ」サイクルと「サイトカイン 代謝不全」サイクルが共に回転した時に生じる。両サイクルの共通因子のサイトカインの中で、IL-1 が中心的役割を演じ、ミトコンドリアのエネルギー代謝を抑制して細胞機能障害と生体防御機能の低下を引き起こす。これまでの研究から、糖代謝障害修復にPDK4阻害剤が、脂質代謝修復にBezafibrateが有効であることを明らかにした。抗体産生能の低下には、免疫モデュレータ機能を有するマクロライドとR-1乳酸菌が有効であることを見出した。これら薬剤はインフルエンザ感染重症化の治療に有効であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人類は、新型インフルエンザや、高病原性鳥インフルエンザのパンデミックに備える必要がある。現在これらのウイルス病原体側の研究は進んでいるが、感染時の重症化する基礎疾患を持つヒトに対する重症化対策が遅れている。本研究では、インフルエンザ感染重症化の機序の詳細を明らかにし、その機序に基づく治療薬を具体的に提案しているところに学術的意義と社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：The pathogenesis of severe influenza virus infection is associated with “influenza cytokine protease” cycle and “cytokine metabolic disorder” cycle. Among the proinflammatory cytokines, IL-1 plays a key role in suppression of mitochondrial energy metabolism, cellular functions and immunological responses of host defense. We found that inhibitor of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in glucose metabolism and bezafibrate, stimulator of lipid metabolism, in mitochondria are effective treatment options for influenza-induced metabolic disorder in mitochondria. In addition, macrolide antibiotics and the *L. bulgaricus* OLL1073R-1 yogurt cultures have immune-stimulator functions as adjuvants and restored antibody production rates effectively. In this project, we clarified that these drugs and materials are useful treatment options for severe influenza virus infection and multiple organ failure.

研究分野：病態医科学

キーワード：感染症 細胞 インフルエンザ サイトカイン ミトコンドリア 糖代謝 脂質代謝 多臓器不全 血管内皮

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザ感染とサイトカインストームによる多臓器不全の発症機序

インフルエンザ感染の重症化による多臓器不全は、炎症性サイトカインが引き起こす生体応答と代謝破綻の結果で、感染初期を過ぎた時期は、多くの場合ウイルス増殖は減衰しているため、抗ウイルス剤は重症化治療にほとんど役立たず、サイトカインと体内代謝因子が治療標的となる。我々が世界に先駆けて明らかにしたサイトカインを中心に回転する多臓器不全の発症機序を図1に示す。ここでは、サイトカインを共通回転軸として重症化を誘導する「インフルエンザ-サイトカイン-trypsin サイクル」(Wang, 木戸等, *J. Infect. Dis.* 202;991-1001, 2010)と「代謝不全-サイトカインサイクル」(Yamane, 木戸等, *PLoS One* 9:e98032, 2014)の2サイクルが共役して細胞機能不全、中でもミトコンドリア機能不全を引き起こし、その結果生じたエネルギー代謝不全は、ATPを最も多く消費する心筋細胞(Pan, 木戸等, *Cardiovasc. Res.* 89:596-603, 2011)、神経細胞、血管内皮細胞の機能障害、アポトーシスを引き起こし、多臓器不全から死に至る過程である。サイトカインストームで各臓器プロテアーゼ群(trypsin, MMP-9)の転写が増加した結果、Trypsinは組織破壊と同時に、trypsin-PAR-1/2 (trypsin receptor)を介して、Cl⁻、K⁺の細胞外輸送チャネルの活性化による浮腫/水腫、細胞内Ca²⁺増加によるミトコンドリア膜電位の低下、NOとO₂⁻の異常増加が引き起こされる。その結果、GSK-3βは活性化され adherens junctionの崩壊と apoptosisを、細胞内Ca²⁺増加に伴うZO-1の消失は tight junctionの崩壊を引き起こし多臓器不全に至る。これまでに明らかにした以上の背景を基盤に、本研究ではサイトカインストームが病態に与える影響を、以下に示す項目について詳細に解析して、効果的、具体的な治療戦略を提案する。

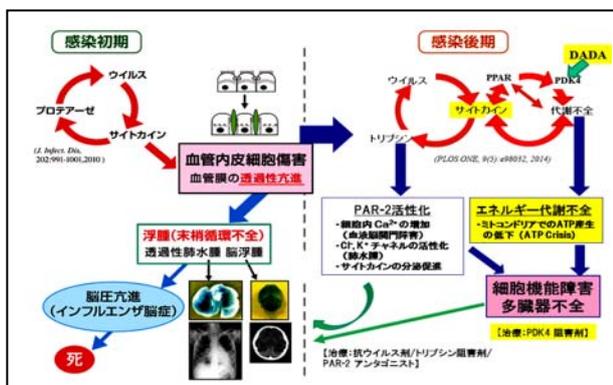


図1 インフルエンザ感染とサイトカインストームによる重症化機序

2. 研究の目的

(1) インフルエンザ感染におけるサイトカインカスケードの司令塔と治療標的の同定

インフルエンザ感染は、毎年世界人口の約 10-20%が罹患し、重症化で死に至る患者は毎年約 25-50 万人と推定される。これまでの研究から感染重症化は「インフルエンザ-サイトカイン-trypsin サイクル」と「代謝不全-サイトカインサイクル」がサイトカインを共通コア因子として回転した時に起きる細胞機能不全の結果であることが明らかになった(Kido H, *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2015; 91(8):351-368)。さらに最近の研究から、インフルエンザ感染では炎症性サイトカインの中でも IL-1β を司令塔とするサイトカイン群間のネットワークが構築されていることが明らかにされようとしている。本研究は、インフルエンザ感染重症化時のサイトカイン間ネットワークと、代謝不全ネットワークを明らかにして、治療標的分子を解明して、具体的な治療戦略を提案する。

(2) サイトカインストームによって生じた糖代謝と脂肪酸代謝破綻が導く多臓器不全の解析による治療標的酵素の同定と治療薬の検証、イムノモジュレータを用いた抗ウイルス抗体の増強効果の検証

体内代謝の中で最大比重を占める代謝がエネルギー代謝で、サイトカインストームや、脂質と糖の中間代謝産物は、このエネルギー代謝の流れに大きな影響を与えている。我々は、マウスの感染モデルのプロテオミクス解析から、糖代謝と脂質代謝が合流するミトコンドリアの Acetyl-CoA 量を左右する pyruvate dehydrogenase (PDH) kinase 4 (PDK4) がサイトカインストームで急速に増加し、PDH 活性を抑制することが、糖代謝と脂質代謝不全を誘発する可能性を明らかにした。この結果を基に、PDK4 阻害剤を既存薬と新薬開発から検索し、既存薬から diisopropylamine dichloroacetate (DADA) と VitK3 を、VitK3 誘導体から強力な PDK4 阻害剤の合成に成功し特許出願している。さらに脂肪のミトコンドリア流入量を調節する Carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) の転写促進剤の bezafibrate の有効性、活性酸素量を抑制して ATP 産生を促進する δ -ALA を明らかにしてきた。本プロジェクトでは重症化にこれ等薬物群の与える影響を検討する。さらに抗ウイルス薬の使用により低下する獲得免疫能の低下を補うイムノモデュレータの効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) インフルエンザ感染におけるサイトカインカスケードの司令塔検索と治療標的の同定

RNAi、レセプターアンタゴニスト、抗サイトカイン抗体を駆使し、サイトカインストームの司令塔を検索し治療標的を明らかにする。

(2) サイトカインストームによって生じた糖代謝と脂肪酸代謝破綻が導く多臓器不全の解析による治療標的酵素の同定と治療薬の検証、イムノモデュレータを用いた抗ウイルス抗体の増強効果の検証

これまで明らかにした薬物群を基盤に、インフルエンザ感染重症化モデルマウスを用いて、これ等薬物群の有効性と糖と脂質代謝に与える影響を検討する。さらにイムノモデュレータを用いた抗ウイルス抗体の産生増強効果の検証を実施する。

4. 研究成果

(1) インフルエンザ感染におけるサイトカインカスケードの司令塔と治療標的の同定

インフルエンザ感染の重症化は「インフルエンザ-サイトカイン-trypsin サイクル」と「代謝不全-サイトカインサイクル」が共役回転した時に起きる細胞機能不全の結果であり、この中心となるサイトカインには、IL-1 β 、IL-6、TNF- α が挙げられる。これらのサイトカインの相互作用は良く知られているが、我々は司令塔を担うサイトカインの存在を想定して、それぞれの抗体による中和、RNAi、レセプターアンタゴニストの効果を動物レベルと細胞レベルで検討した。

治療標的を明らかにするためには動物レベルの検証は重要で、この目的を達成するために各サイトカインに対する中和抗体の効果を、上記サイクルのサイトカイン下流に位置する trypsin 発現と、さらに trypsin の下流に位置するインフルエンザウイルス量で検討した。その結果、IL-1 β の発現増加は IL-6、TNF- α の発現増加とサイトカイン相互の相乗作用を引き起こすこと、IL-1 β の発現増加は肺の trypsin の発現増加とインフルエンザの増殖促進を引き起こすが明らかとなった。抗 IL-1 β

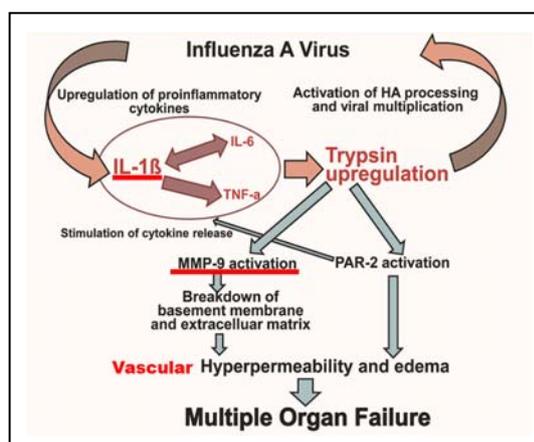


図2 インフルエンザ-サイトカイン-trypsin サイクルにおける IL-1 β の役割

抗体で中和することで、肺での IL-6、TNF- α の発現増加、trypsin の発現増加、インフルエンザの増殖、これら全ての抑制を確かめることができた。ヒト肺の培養細胞、A549 細胞を用いた実験でも上記の事実は確認された。以上から「インフルエンザ-サイトカイン-trypsin サイクル」のサイトカイン司令塔は、図 2 に示すように IL-1 β が担い、trypsin の発現増加とその下流に位置する matrix metalloprotease-9 (MMP-9) の活性化と血管基底膜の障害を導くことが

明らかとなった。図 3 には、マウスの肺にインフルエンザウイルス PR-8 を感染させた 7 日目の肺の炎症像を指標に、抗 IL-1 β 中和抗体の効果を示している。MMP-9 等による組織障害とそれに伴う炎症性細胞の浸潤程度を Hematoxylin eosin 染色で赤色に示している。感染の無い無処置群(No treatment)に対して、PR-8 の感染群では、抗 IL-1 β 中和抗体投与群 (antibody IL-1 β)、コントロール群として生理食塩水投与群 (saline)、マウス IgG 投与群

(mouse IgG) の結果を示している。全視野に対する赤色染色の占める割合 (%) を示す。有意差は Student's t-test で評価され、 $P < 0.05$ を*で示す。

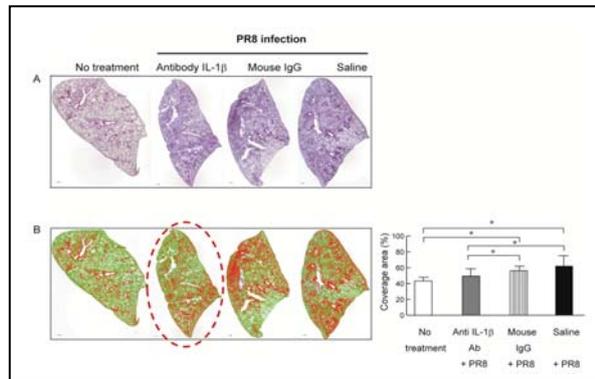


図 3 抗 IL-1 β 中和抗体投与による肺障害とそれに伴う炎症性細胞の浸潤抑制効果

(2) サイトカインストームによって生じた糖代謝と脂肪酸代謝破綻が導く多臓器不全の解析による治療標的酵素の同定と治療薬の検証、イムノモジュレータを用いた抗ウイルス抗体の増強効果の検証

これまでに、インフルエンザ感染によるサイトカインストームで最も敏感に障害される糖代謝部位が PDK4 を介する PDH の活性低下で、PDK4 阻害剤として既存薬の DADA が有効であること、脂質代謝の CPT II が影響され易く CPT II の転写促進剤の bezafibrate が有効であることを示してきたが、これらの事実を様々な PR-8 ウイルス量の感染実験で確認を取ることができた。

一方、インフルエンザ感染では通常抗ウイルス剤を使用してウイルス増殖を抑制するが、これは感染重症化阻止効果を示すが、一方でウイルス抗原量の低下は獲得免疫能の低下とその免疫メモリーの低下を引き起こす重大な副反応のあることを、我々はこれまでに報告してきた。この問題を解決する方法として我々が注目しているのが、副反応の殆んどない免疫増強剤である。我々はこれまでに、マクロライドのクラリスロマイシンに獲得免疫能の増強効果と免疫メモリーの増強効果のあることを報告してきたが、マクロライドは抗菌剤で耐性菌の出現リスクを伴うことから、これに代わる免疫増強剤として食品として用いられている *L. bulgaricus* OLL1073R-1 yogurt cultures (YC) の効果を検証した。マウスに 35 日間 YC あるいは水 (DW) を 1 日 1 回経口投与し、投与開始から 22 日目に PR-8 ウイルスを経気道感染させた。

感染群を 2 群に分けて、1 群は抗インフルエンザ薬のタミフル (OSV) を、対照群として YC の溶

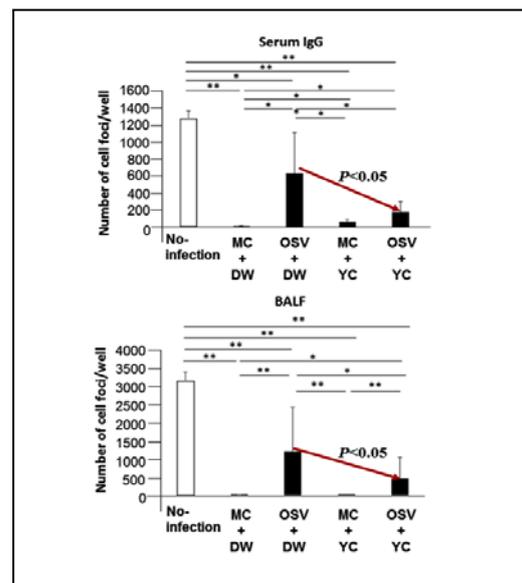


図 4 *L. bulgaricus* OLL1073R-1 によりウイルス中和活性の増強効果

解剤であるメチルセルロース(MC)を1日2回経口投与した後、36日目の血液IgG分画と、気管支肺胞洗浄液(BALF)IgAを用いて、MDCK細胞へのPR-8感染実験におけるウイルス感染抑制効果(ウイルス中和活性)を測定した結果を図4に示す。非感染マウス(No-infection)の血清IgG、BALFのIgAは、抗ウイルス抗体ができていないため、MDCK細胞が示す感染力価は高値を示すが、抗ウイルス剤の投与の無いマウス(MC+DW)では、血清IgG、BALFのIgAは共に強いウイルス感染防御能を示して、感染価は殆んど検出されていない。一方抗ウイルス剤OSVの投与群(OSV+DW)では、有意に感染防御能は低下して比較的高い感染価を示した。OSVとYCの併用群(OSV+YC)では、矢印が示すように(OSV+DW)群に比較して有意なウイルス中和活性の増強を確認できた。有意差はANOVA and Bonferroni posttestで検定され、 $P < 0.05$ を*で、 $P < 0.01$ を**で示した。以上から、感染重症化に頻繁に用いられる抗ウイルス剤の副反応としての、獲得免疫の低下作用を、食品として用いられているYCが有意に回復させることを証明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

- ①Kimoto T, Kim H, Sakai S, Takahashi E, Kido H. Oral vaccination with influenza hemagglutinin combined with human pulmonary surfactant-mimicking synthetic adjuvant SF-10 induces efficient local and systemic immunity compared with nasal and subcutaneous vaccination and provides protective immunity in mice. *Vaccine*. 2019, 37, 612-622. doi:10.1016/j.vaccine.2018.12.002 査読有
- ②Hayashi H, Kubo Y, Izumida M, Takahashi E, Kido H, Sato K, Yamaya M, Nishimura H, Nakayama K, Matsuyama T. Enterokinase enhances influenza A virus infection by activating trypsinogen in human cell lines. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018, 8, 91. doi: 10.3389/fcimb.2018.00091 査読有
- ③Chida J, Hara H, Yano M, Uchiyama K, Das NR, Takahashi E, Miyata H, Tomioka Y, Ito T, Kido H, Sakaguchi S. Prion protein protects mice from lethal infection with influenza A viruses. *PLoS Pathog*. 2018, 14, e1007049. doi:10.1371/journal.ppat.1007049 査読有
- ④Kim H, Kimoto T, Sakai S, Takahashi E, Kido H. Adjuvanting influenza hemagglutinin vaccine with A human pulmonary surfactant-mimicking synthetic compound SF-10 induces local and systemic cell-mediated immunity in mice. *PLoS One* 2018, 13(1):e0191133, doi:10.1371/journal.pone.0191133 査読有
- ⑤Takahashi E, Indalao IL, Sawabuchi T, Mizuno K, Sakai S, Kimoto T, Kim H, Kido H. Clarithromycin suppresses induction of monocyte chemoattractant protein-1 and matrix metalloproteinase-9 and improves pathological changes in the lungs and heart of mice infected with influenza A virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2018, 56: 6-13, doi:10.1016/j.cimid.2017.11.002 査読有
- ⑥Shoji M, Woo SY, Masuda A, Win NN, Ngwe H, Takahashi E, Kido H, Morita H, Ito T, Kuzuhara T. Anti-influenza virus activity of extracts from stems of *Jatropha multifida* collected in Myanmar. *BMC Complement Altern Med* 2017, 17(1):96, doi:10.1186/s12906-017-1612-8 査読有
- ⑦Indalao IL, Sawabuchi T, Takahashi E, Kido H. IL-1 β is a key cytokine which induces trypsin upregulation in influenza virus-cytokine-trypsin cycle. *Arch Virol* 2017. 162(1): 201-211, doi: 10.1007/s00705-016-3093-3 査読有
- ⑧Shima A, Yasuno T, Yamada K, Yamaguchi M, Kohno R, Yamaguchi S, Kido H, Fukuda H. First Japanese case of carnitine palmitoyltransferase II deficiency with the homozygous point mutation S113L. *Intern Med* 2016, 55(18):2659-2661, doi:10.2169/internalmedicine.55.6288 査読有
- ⑨Kido H, Indalao IL, Kim H, Kimoto T, Sakai S, Takahashi E. Energy metabolic disorder is a major risk

factor in severe influenza virus infection. Proposals for new therapeutic options based on animal model experiments. *Respir Investg* 2016, 54(5): 312-319, doi:10.1016/j.resinv.2016.02.007 査読有

〔学会発表〕 国際学会 (計 2 件)

- ① Kido H. The interplay between inflammation and FAOD in the pathogenesis of infection associated encephalopathy. INFORM2018, September 2-3, 2018, Divani Caravel Hotel, Athens Greece.
- ② Indalao IL, Sawabuchi T, Takahashi E, Kido H. IL-1 β signaling induces trypsin upregulation in influenza virus–cytokine–trypsin cycle in multiple organ failure by infection. Option IX August 24-28, 2016. Sheraton Grand Chicago, Chicago, USA.

〔図書〕 (計 1 件)

- ① Kido H. The role of secreted serine proteases of the host in influenza viral pathogenesis. Activation of viruses by host proteases. (Eds: E. Böttcher-Frieberts Häuser, W. Garten, HD Klenk) 2018, pp 153-151, Springer

〔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：
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：
国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：高橋 悦久
ローマ字氏名：TAKAHASHI, Etsuhisa
所属研究機関名：徳島大学
部局名：先端酵素学研究所 (デザイン)
職名：特任助教
研究者番号 (8 桁)：10380065

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：澤淵 貴子
ローマ字氏名：SAWAFUCHI, Takako

研究協力者氏名：Indalao IL
ローマ字氏名：INDALAO, IL

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。