

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23256004

研究課題名(和文) デング熱、デング出血熱の新しいバイオマーカーの有用性

研究課題名(英文) Clinical Utilities of new biomarker for dengue virus infection

研究代表者

服部 俊夫 (Hattori, Toshio)

東北大学・災害科学国際研究所・教授

研究者番号：30172935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,100,000円

研究成果の概要(和文)：デングウイルス(DENV)感染者における新規バイオマーカーとしてのGalactin 9 (Gal-9)とOsteopontin (OPN)の臨床的な有用性を研究した。血漿Gal-9はDENV感染者では正常群と比べ有意に上昇し、ヒトでの報告された最高の値を示し、回復期では有意に減少した。Gal-9値はヘマトクリット値、血小板数、単球およびウイルスRNAのコピー数と相関していた。血漿OPNも9倍以上の増加を急性期で示し、回復期ではトロンビン切断型のOPNが上昇し、免疫と凝固のクロストークマーカーと思われた。故に、DENV感染における血漿Gal-9及びOPNが病態反映のマーカーである可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Matricellular proteins of galectin-9 (Gal-9) and osteopontin (OPN) were studied in plasma from 65 dengue virus (DENV) infected patients. During the critical phase, Gal-9 levels were significantly higher in DENV infected patients compared to control groups. The highest Gal-9 levels were observed in dengue hemorrhagic fever (DHF) patients (DHF: 2464pg/ml; dengue fever (DF): 1407pg/ml). In the recovery phase, Gal-9 levels significantly declined from peak levels in those patients. Gal-9 levels tracked viral load, and were associated with monocyte frequencies and hematologic variables of coagulation. Plasma levels of OPN were significantly elevated in the critical phase in both of DF and DHF as compared with healthy. During the recovery phase, OPN levels declined while thrombin cleaved OPN levels increased dramatically in both of DF and DHF patients. Thus, Gal-9 and OPN appears to track DENV inflammatory responses and it could serve as an important novel biomarker of acute DENV infection..

研究分野：感染症、血液学、ウイルス学

キーワード：デングウイルス デング熱 デング出血熱 ガレクチン-9 オステオポンチン

1. 研究開始当初の背景

温暖化に伴い我が国で増加する可能性の高い熱帯感染症であるデングウイルスが原因となるデング熱 (DF) とデング出血熱 (DHF) の発症者は世界中で毎年 5 千万から 1 億人といわれる。ネッタイシマカあるいはハマダラシマカが媒介するデングウイルスの進入によって起きる感染症で、世界中で引き起こされる。2014 年には日本でも流行している。我々は東北大学病院に入院中の急性 HIV 感染症で galectin-9 (Gal-9) が著増していることを見いだした (Tohoku J Exp Med. 2009 Aug; 218(4): 285-92)。それはその後の 2 症例でも見られ (Tohoku J Exp Med. 2012; 228(2): 157-61)、急性ウイルス感染症におけるよきマーカーとなる可能性があり、学术交流協定を結ぶマニラのサンラザロ病院での臨床研究としてデング熱患者血漿中の proinflammatory cytokine の研究を開始した。

2. 研究の目的

デング感染は症状から一過性熱性疾患の症状を呈する DF と血漿漏出と出血傾向を主症状とする DHF とある。患者は不安・興奮状態となり、発汗がみられ、四肢は冷たくなる。また、肝臓の腫脹、補体の活性化、血小板減少、血液凝固時間延長がみられる。これらの激しい炎症症状を生ずる病態はサイトカインストームと呼ばれて、過剰な免疫刺激状態が背景にあると思われる。我々はこの感染症に新しい免疫制御物質である Gal-9 が産生され、病態に関与している可能性を考えた。さらに抗デングウイルス Th1 免疫応答と相関が予測される FL-OPN も測定した。FL-OPN はトロンピンで切断され、tr-OPN が産生される。凝固・線溶系の活性化は DHF の病態解析には重要な意味を持つ可能性を考えその値も測定することにした。これらのマトリセルラー

解析は世界初であり、成果に期待した。

3. 研究の方法

私たちは、2010 年にフィリピンのマニラのサンラザロ病院に入院した 65 名の DF, DHF 患者の血液を急性期と回復期の 2 点で採取した。また患者群と比較できる健常対照 (HC) 30 人からも血漿を入手した。血漿中の Gal-9 は ELISA で定量した (GalPharma, 高松, 日本)。血漿中の full-length (FL)-OPN レベルは、2 つの異なる市販の ELISA キット (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA 及び IBL, 群馬, 日本) により定量した。trOPN の測定には市販の ELISA キット (IBL, 群馬, 日本) を使用した。

4. 研究成果

DENV 感染患者における血漿ガレクチン 9 レベルの変化

急性期では、血漿中の Gal-9 レベルは非デング熱患者及び健康人に比較して、有意に上昇していた ($P < 0.0001$, 図 1A)。血漿 Gal-9 の中央値レベルは DENV 患者で 1525、非デング熱病患者で 616、HC で 196 pg / ml であった。特に DHF 患者では 2464 pg / ml で、DF では 1407 pg / ml で疾患の重症度と関連することがわかった。4 遺伝子型における Gal-9 レベルが同程度に上昇していて、差が見られなかった (図 1B)。これらのレベルはこれまでにヒトで報告された最高の値である。回復期では、DF の 6 症例を除いて Gal-9 は大きく減少し、すべての患者で減少した (図 1C)。

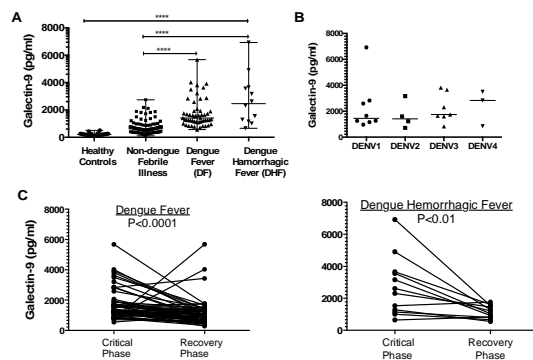


図 1. 血漿ガレクチン 9 値の変化

DENV 感染における血漿 OPN 値の変化

2つの異なる ELISA キット (IBL および R&D Systems) は認識する蛋白が異なるためにその結果の比較をした。 IBL キットによる分析では、OPN のレベルが DHF 患者 (中央値、27550 pM/ L; 9.7 倍増加) と DF 患者 (9.2 倍増加 25951 pM/ L) とともに HC (2814 pM/ L) (図 2 A) と比較して上昇していることがわかった。 R&D システムのキットも DHF (692 ng/ ml、10.1 倍の増加)、DF (540 ng/ml、7.9 倍の増加) 患者において HC (68 ng/ml) と比較して上昇していることが確認できた (図 2 B)。 FL-OPN レベルが有意に 3 群 ($P < 0.0001$) 間で異なっていることが、 IBL と R&D システムキットの両方測定値に基づいて明らかであった。ただし DHF と DF の患者の FL-OPN レベルの有意差は患者間では見られなかった。

回復期では IBL キットは DHF (907 pM/ L; $P < 0.001$) と DF (1199pM/ L; $P < 0.00001$) で急性期よりも有意に低下していた。 R&D システムのキットにより測定した FL-OPN レベルは DF 患者 (121 ng/ml、 $P < 0.0001$) 及び DHF 患者 (285 ng/ml、 $P < 0.01$) で有意に減少した。興味深いことに IBL で測定した値は正常者の 0.68 倍 (DHF)、あるいは 0.57 倍 (DF) であったのに対して R&D キットを使用した FL-OPN レベルは正常者より DHF で 4.2 倍 ($P < 0.0001$)、DF で 1.7 倍に高かった。また、急性期では DENV に感染した患者の FL-OPN レベルは IBL と R&D キットの間に関連があった。しかし、この相関は回復期に見られなかった。よって、此の結果は IBL ELISA キットでは FL-OPN のみを測定し、R&D キットでは、切断型も測定されたのがその理由だと思われる。

TrOPN 血漿レベルは、DENV 感染の回復期に上昇した

急性期では trOPN のレベルは HC (1pM/ L) と比較して、DHF (43pM/ L) と DF (38pM/ L) 患者においてに上昇していた。しかし興

味深いことに、回復期では血漿 FL-OPN と違って trOPN の値は、DF と DHF (979 及び 1348 pM/ L) において、急性期よりも有意に高かった (図 2 C、 $P < 0.0001$ および $P < 0.0001$)。さらに、急性期では、FL- OPN と trOPN の間に相関は認められなかったが、回復期で DF 群 ($r = -0.84$ 、 $P < 0.0001$) と DHF 群 ($r = -0.73$ 、 $P < 0.05$) と IBL FL-OPN のみで強い逆相関が見られた (図 2 D)。しかし、回復期における R&D FL- OPN レベルでは trOPN と同じような相関関係は見られなかった。

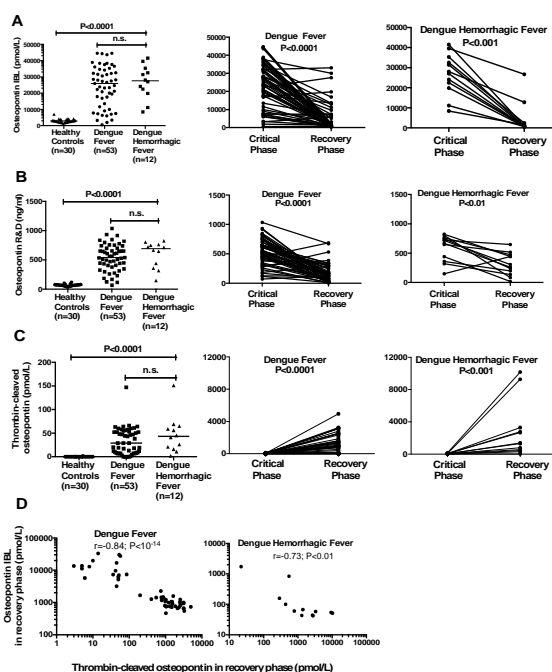


図 2 . 血漿オステオポンチン (FL-OPN) 及び トロンピン切断型オステオポンチン (trOPN) の変化

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1) マトリセルラータンパク質と感染症。化学療法の領域 : Vol31:No.2, 109-114, 2015年 2 月。芦野有悟、浩日勲、齋藤弘樹、服部俊夫。査読なし
- (2) Elevated levels of full-length and thrombin-cleaved osteopontin during acute dengue virus infection are

associated with coagulation abnormalities. [Thromb Res., 134 (2), (2014), 449-454] Chagan-Yasutan H, Lacuesta TL, Ndhlovu LC, Oguma S, Leano PS, Telan EF, Kubo T, Morita K, Uede T, Dimaano EM, Hattori T. 査読あり
doi: 10.1016/j.thromres

- (3) Galectin-9 prolongs the survival of septic mice by expanding tim-3-expressing natural killer T cells and PDCA-1+ CD11c+ macrophages.. [Crit Care, 17 (6), (2013), R284-R284] Kadowaki, T Morishita, A Niki, T Hara, J Sato, M Tani, J Miyoshi, H Yoneyama, H Masaki, T Hattori, T Matsukawa, A Hirashima, M 査読あり doi: 10.1186/cc13147
- (4) Galectin-9 plasma levels reflect adverse hematological and immunological features in acute dengue virus infection. [J Clin Virol, 58 (4), (2013), 635-640]. Chagan-Yasutan, H, Ndhlovu, L, Lacuesta, T, Kubo, T, Leano, P, Niki, T, Oguma, S, Morita, K, Chew, G, Barbour, J, Telan, E, Hirashima, M, Hattori T, Dimaano, E. 査読あり doi: 10.1016/j.jcv.2013.10.022.
- (5) Cell surface galectin-9 expressing Th cells regulate Th17 and Foxp3+ Treg development by galectin-9 secretion. [PLoS One, 7 (11), (2012), e48574-e48574] Oomizu, S, Arikawa, T, Niki, T, Kadowaki, T, Ueno, M, Nishi, N, Yamauchi, A, Hattori, T, Masaki, T, Hirashima, M,. 査読あり doi: 10.1371/journal.pone.0048574
- (6) Rapid decrease of plasma galectin-9 levels in patients with acute HIV infection after therapy. [Tohoku J Exp Med, 228 (2), (2012), 157-161] Saitoh,

Hiroki Ashino, Yugo Chagan-Yasutan, H., Niki, T., Hirashima, M., Hattori, T.
査読あり

https://www.jstage.jst.go.jp/article/tjem/228/2/228_157/article

〔学会発表〕(計 14 件)

- (1) The generation of immune-modulator lectin-galectin-9 in acute dengue virus infected patients in Philippines. H Chagan-Yasutan, T Lacuesta, S. Leano, U Siddiqi, E O.Telan, T Hattori and E. Dimaano. Asia-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012. Jan. 11-12, 2012, Kobe, Japan.
- (2) Elevated levels of circulating galectin-9, a novel immune-modulator, in acute dengue virus infection reflect disease severity. H Chagan-Yasutan, L. Ndhlovu, T Lacuesta, P S Leano, E O.Telan, T Niki, M Hirashima, E Dimaano and T Hattori. (99th Annual Meeting The American Association of Immunologist) IMMUNOLOGY 2012, May 7, Boston, USA.
- (3) Generation of N-half osteopontin in convalescent phase of dengue virus infected individuals in Philippines. H Chagan-Yasutan, T Lacuesta, L. Ndhlovu, P S Leano, U Toshimitsu, E O.Telan, E. Dimaano and T Hattori. 第41回日本免疫学会・神戸・2012.12.7
- (4) Plasma galectin-9 levels reflect disease activity in dengue virus infected patients. Hattori T, Chagan-Yasutan H, Ndhlovu L, Kubo T, Lacuesta T, Leano SA, Telan EF, Niki T, Hirashima M, Dimaano E. Gordon Research Conference of Tropical Infectious Diseases, 2013.2.10-15 USA
- (5) Generation of N-half osteopontin in convalescent phase of dengue virus

- infected individuals in Philippines. H Chagan-Yasutan, T Lacuesta, L Ndhlovu, P Leano, U Toshimitsu, E Telan, E Dimaano, T Hattori. Gordon Research Conference of Tropical Infectious Diseases, 2013.2.10-15 USA
- (6) Profiles of Pro-inflammatory and Anti-inflammatory Cytokine/ Chemokines in Acute Dengue Virus Infection. H Chagan-Yasutan, T Lacuesta, L Ndhlovu, T Kubo, P Leano, T Niki, Y Ashino, J Barbour, E. Telan, M Hirashima, E Dimaano, T Hattori. NIH-Tohoku University-JSPS International Symposium, 2013.5.9-10 Sendai.
- (7) Inflammatory Profiles of Dengue Virus Infection. H Chagan-Yasutan, T Lacuesta, L. Ndhlovu, P Leano, E.Telan, T Niki, M Hirashima, E Dimaano and T Hattori. 平成 25 年度 ・ 海外学術調査フェスタ, 2013.6.29東京
- (8) デングウイルス感染症による炎症プロファイルを用いた病態のモニタリング. 浩日勲, 服部俊夫. 第67回日本細菌学会東北支部総会. 2013 .8 .30 -31, 仙台.
- (9) デングウイルス感染症におけるオステオポンチンの解析. 浩日勲, 服部俊夫. 第一回 MatriCell フォーラム : 2013.9.7-8. 三重大学
- (10) Elevation of matricellular proteins in dengue virus infection. T Hattori, H Chagan-Yasutan, S Leano, T Lacuesta, E Telan. 6th ASEAN Congress of Tropical Medicine and Parasitology; Kuala Lumpur, Malaysia; 2014.3.5-7
- (11) デングウイルス感染症における炎症及び凝固関連マーカー研究 Chagan Yasutan H, Lacuesta TL, Ndhlovu LC, Leano PSA, Telan EFO, Dimaano EM, Hattori T. 海外学術調査フォーラム プログラム,

東京 2014年06月28日

- (12) ELEVATION OF MATRICELLULAR PROTEINS IN DENGUE VIRUS INFECTION. H Chagan-Yasutan, S Leano, T Lacuesta, E Telan, T Hattori. 10th China-Japan International Conference of Virology, Harbin Aug.25-28, 2014.
- (13) Dramatic increases of matricellular proteins in plasma of dengue virus infection. Haorile Chagan-Yasutan, Toshio Hattori. 第76回日本血液学会学術集会, 大阪, 2014.11.1
- (14) Increase of thrombin-cleaved form of OPN in recovery phase of dengue virus infection. T Hattori, T Lacuesta, S Leano, E Dimmano, E Telan, H Chagan-Yasutan. Joint International Tropical Medicine Meeting 2014, Bangkok, タイ Dec.4, 2014.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計2件)

- (1)名称 : ジクチオピロン誘導体又はジヒドロジクチオピロン誘導体を有効成分とするオステオポンチン産生阻害剤
発明者 : 菊地晴久 大島吉輝 服部俊夫 久保原禅 山田修 周張菁 松下芳久 喜田進也
権利者 : 国立大学法人東北大学 国立大学法人群馬大学 扶桑薬品工業株式会社

種類 : 特許

番号 : PCT/JP2013/06943

出願年月日 : 2013 年 3 月 8 日

国内外の別 : 国際出願 (PCT) 指定国 : 日本、アメリカ、欧州、中国、韓国、カナダ、オーストラリア

(2)名称 : アミド誘導体

発明者 : 菊地晴久 大島吉輝 服部俊夫 久保原禅 山田修 周張菁 松下芳久 喜

田進也

権利者：国立大学法人東北大学 国立大学
法人群馬大学 扶桑薬品工業株式会社

種類：特許

番号：PCT/JP2015/055873

出願年月日：2015年2月27日

国内外の別：国際出願（PCT）

取得状況（計1件）

名称：ジクチオピロン誘導体又はジヒドロ
ジクチオピロン誘導体を有効成分とするオ
ステオポンチン産生阻害剤

発明者：菊地晴久 大島吉輝 服部俊夫
久保原禅 山田修 周張菁 松下芳久 喜
田進也

権利者：国立大学法人東北大学 国立大学
法人群馬大学 扶桑薬品工業株式会社

種類：特許

番号：特許第5716140号

出願年月日：2013年3月8日

取得年月日：2015年3月20日

国内外の別：国内（出願状況 1. PCT/
JP2013/06943 の日本移行分）

〔その他〕

ホームページ

<http://www.irides-drid.med.tohoku.ac.jp/research.html>

論文プレスリリース

http://www.tohoku.ac.jp/japanese/newimg/pressing/tohokuuniv-press_20131030_01.pdf

http://www.tohoku.ac.jp/japanese/newimg/pressing/tohokuuniv-press_20140519_02.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 俊夫 (Hattori, Toshio)
東北大学・災害科学国際研究所・教授
研究者番号：30172935

(2) 研究分担者

仁木 敏朗 (Niki, Toshiro)
香川大学・医学部・助教
研究者番号：40558508

平島 光臣 (Hirashima, Mitsuomi)

香川大学・医学部・教授
研究者番号：70109700

C.-Y. HAORILE (Chagan-Yasutan, Haorile)

東北大学・災害科学国際研究所・助教
研究者番号：50624821

久保 亨 (Kubo, Toru)

長崎大学・熱帯医学研究所・研究員
研究者番号：50444873