

令和 2 年 4 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15367

研究課題名(和文) インフルエンザ重症化に関与する宿主因子の探索

研究課題名(英文) Research on host factors involved in influenza pathogenesis

研究代表者

大野 円実 (Ohno, Marumi)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・博士研究員

研究者番号：50794202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスをマウスに実験感染させエネルギー代謝への影響を調べた。インスリン投与によるAktリン酸化を指標にしたインスリン感受性を評価したところ、感染マウスの肝臓はインスリン感受性の低下を示した。また、グルコース負荷試験により、感染マウスは糖利用能が低下していることが示唆された。これらの結果はインフルエンザウイルス感染によりエネルギー代謝障害が引き起こされることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスを用いた実験から、重症インフルエンザではインスリン感受性が低下し、グルコース利用能が低下していることが明らかになった。既に報告されている脂肪酸代謝の抑制と合わせて考えると、インフルエンザ患者の体内ではエネルギー産生を担う糖代謝と脂肪酸代謝の双方が抑制されていると考えられる。糖尿病や肥満がインフルエンザ重症化のリスクを高めることから、エネルギー代謝障害の改善はインフルエンザの新規治療ターゲットとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The effect of influenza virus infection on energy metabolism in the host was investigated in mice. Akt phosphorylation following insulin injections was attenuated in the livers of mice infected with influenza virus A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). Furthermore, glucose tolerance tests revealed that the influenza virus-infected mice showed higher blood glucose levels than the vehicle-inoculated control mice. These results suggest that influenza virus infection impairs insulin signaling, which regulates glucose uptake. However, increases in the hepatic expressions of fatty acid-metabolizing enzymes suggest that fatty acids accumulate in liver cells of infected mice. Collectively, our data indicate that influenza virus infection dysregulates host energy metabolism. This line of investigation provides novel insights into the pathogenesis of influenza.

研究分野：感染症

キーワード：インフルエンザ インスリン感受性 エネルギー代謝障害

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

毎年冬季に流行する季節性インフルエンザは、小児と高齢者を中心に世界中で年間およそ 50 万人を死に至らしめている。特に、小児と高齢者においてインフルエンザが重症化し、多臓器不全によって死亡したり後遺症が残るケースが問題となっている。インフルエンザウイルス感染によって引き起こされる生体応答が宿主体内で過剰な血管壁透過性亢進や血管内血液凝固を誘発し、多臓器不全をもたらすと考えられるが、その詳細は明らかではない。インフルエンザを重症化させるリスクファクターとして糖尿病が挙げられる。肥満マウスは正常マウスに比べ、インフルエンザウイルス感染によって高い死亡率を示すことから (AG Smith, 2007, *J Nutr*)、糖尿病や肥満によるエネルギー代謝障害がインフルエンザの病態を増悪させると考えられる。また、メタボリックシンドロームによって動脈硬化のリスクが上昇することからも、エネルギー代謝障害が血液凝固異常に関連することが考えられる。これらのことから、インフルエンザウイルス感染によりエネルギー代謝が引き起こされ、病原性に関与していると予想される。

### 2. 研究の目的

これまでに開発されたインフルエンザ治療薬は抗ウイルス薬であり、インフルエンザウイルスの感染・増殖を防ぐことを目的としている。そのため、感染初期に服用する必要があるが、重症化してからの治療には適さない。この問題を解決する新規インフルエンザ治療薬の開発が望まれる。したがって、インフルエンザ重症化に与る宿主因子を標的とする薬剤は、病因ウイルスの株、亜型並びに型を問わない、ユニバーサル治療薬として有望である。重症インフルエンザにおける宿主応答を解析し、重症インフルエンザの治療標的となりうる宿主因子を見つけることが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

雄性 C57L/6 マウス (8-12 週齢) にインフルエンザウイルス A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1; PPR8) 株を 500 plaque forming unit; PFU) で経鼻感染させ、以下の実験を行った。対照動物には PBS を投与した。

- (1) 感染 6 日後に血清サンプルを回収し、GC/MS によるメタボローム解析を行った。
- (2) 感染 1、3、6 日後に肝臓を回収し、リアルタイム PCR 法によりエネルギー代謝関連遺伝子の発現量を測定した。
- (3) 感染 1、3、6 日後、一晩絶食したマウスにインスリン (2 U/kg B.W.) を腹腔内投与し、15 分後に肝臓を回収した。肝臓から抽出した蛋白質を用いてウェスタンブロット法によりリン酸化 Akt 及び総 Akt を検出し、インスリンによる Akt リン酸化の程度を評価した。
- (4) 感染 6 日後、グルコース負荷試験を行った。一晩絶食したマウスにグルコース (2 g/kg B.W.) を腹腔内投与し、0、30、60、90、120 分後に血糖値を測定した。
- (5) 感染 6 日後に血清サンプルを回収し、ELISA 法によりプロトンビンプラグメント 1+2 濃度を測定した。

### 4. 研究成果

- (1) 血清メタボローム解析において (図 1)、感染マウスではほぼ全てのクエン酸回路の中間代謝物 (クエン酸、イソクエン酸、ケトグルタル酸、フマル酸、リンゴ酸) が減少しており、クエン酸回路の活性低下が示唆された。一方、ケトン体の一つである  $\beta$  ヒドロキシ酪酸は感染マウス血清で 2 倍以上に増加しており、脂肪酸からのアセチル CoA 生成の増加及びアセチル CoA からのケトン体生成が増加していることが示された。また、感染マウス血清においてパルミトレイン酸とオレイン酸の減少及びアラキドン酸とドコサヘキサエン酸の加が観察され、インフルエンザウイルス感染により脂肪酸代謝も影響を受けることが考えられた (図 2)。

図1. クエン酸回路関連代謝物の血清中相対濃度

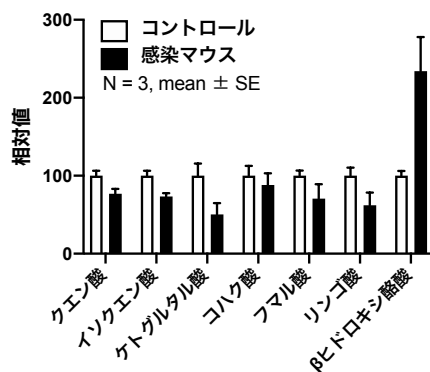
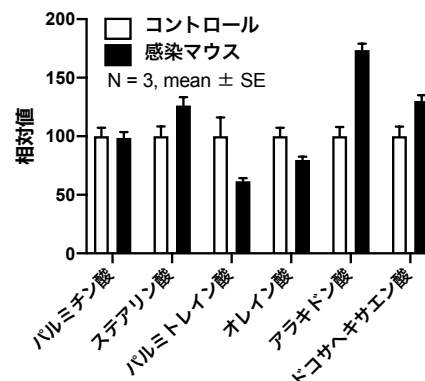


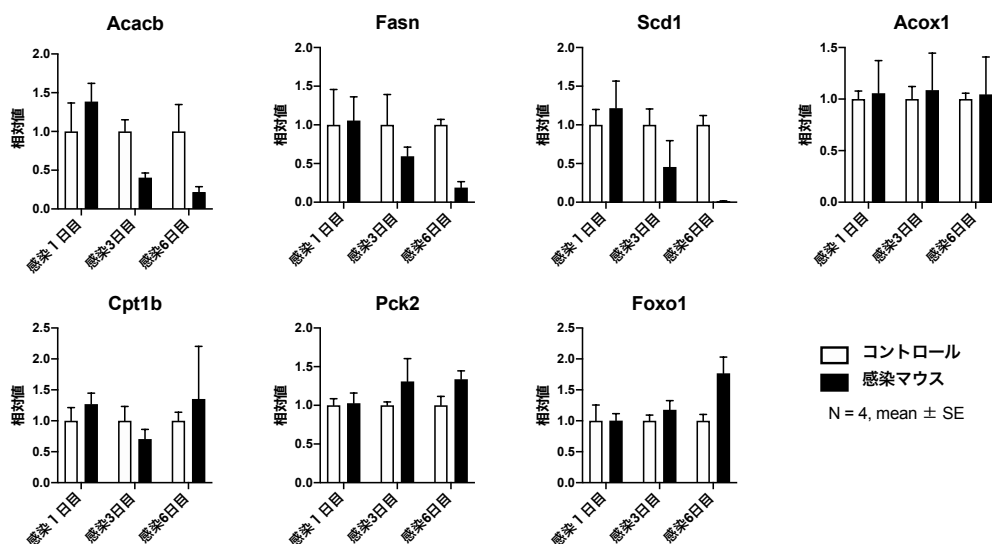
図2. 脂肪酸の血清中相対濃度



- (2) 感染マウスの肝臓においてエネルギー代謝関連遺伝子の発現量を調べたところ (図 3)、脂肪酸合成酵素である Acetyl-CoA Carboxylase Beta (Acacb)、Fatty Acid Synthase (Fasn)

及び Stearoyl-CoA Desaturase 1 (Scd1) の遺伝子発現量は感染 6 日後のマウス肝臓において大きく減少しており (Acacb, 0.21-fold; Fasn, 0.19-fold; Scd1, 0.0073-fold)、感染マウスでは脂肪酸合成が抑制されたと考えられる。Scd1 はパルミチン酸からパルミトレイン酸への変換及びステアリン酸からオレイン酸の変換を担う酵素なので、肝臓における Scd1 発現量の減少がパルミトレイン酸及びオレイン酸の血清中相対濃度の低下を引き起こしたと予想される。一方、飢餓など糖利用が抑制されている際に発現量が上昇する Acyl-CoA Oxidase 1 (Acox1) 及び Carnitine Palmitoyltransferase 1 Beta (Cpt1b) の遺伝子発現量は肝臓では変化がなかった。これらは脂肪酸  $\beta$  酸化の律速酵素であるため、感染マウスの肝臓では脂肪酸  $\beta$  酸化の顕著な亢進は起こっていないと考えられる。また、糖新生に与る Phosphoenolpyruvate Carboxykinase 2 (Pck2) とその転写因子 Forkhead box-containing protein 0 Member 1 (Foxo1) の遺伝子発現量は感染マウスの肝臓で増加しており (Pck2, 1.3-fold; Foxo1, 1.8-fold)、糖新生が亢進する傾向にあることが示唆された。

図3. 肝臓の遺伝子発現量



- (3) インスリン投与による Akt リン酸化は、感染 1 日目では変化がなかったが、感染 3 日後及び 6 日後のマウスの肝臓では減弱していることが明らかになった (図 4)。これは、インフルエンザウイルス感染によりインスリンシグナルが抑制されることを示唆するものである。
- (4) グルコース負荷試験において、両群はグルコース投与 30 分後に血中グルコース濃度のピークを示したが、コントロールに比べて感染マウスではグルコース投与 60 分及び 90 分後の血中グルコース濃度が高かった (図 5)。これはグルコース利用能の低下を示唆する。
- (5) 感染 6 日後のマウスで血清中のプロトロンビンプラゲメント 1+2 の顕著な増加が見られた。これはインフルエンザウイルス感染による血液凝固カスケードの亢進を示すものである。

図4. インスリン投与によるAktリン酸化

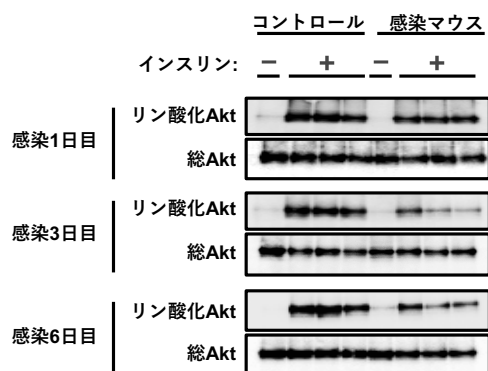
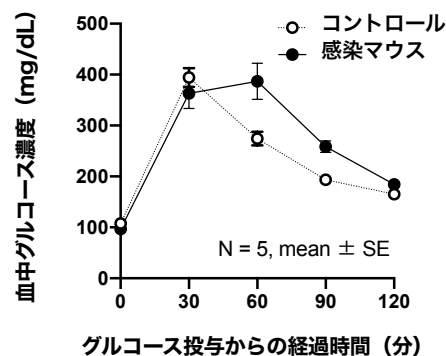


図5. グルコース負荷試験



以上の成果から、宿主のエネルギー代謝がインフルエンザウイルス感染により大きく影響を受けることが明らかになった。特に、インスリン感受性の減弱は糖利用能の低下につながると考えられる。過去の研究から、インフルエンザウイルス感染により脂肪酸  $\beta$  酸化の抑制が起こることが明らかになっており (KB Schwarz, 1991, *Hepatology*; TN Tarasenko, 2015, *Biochim Biophys Acta*)、インフルエンザウイルス感染により糖と脂肪酸双方の代謝によるエネルギー産生が阻害される可能性が考えられた。エネルギー代謝障害の改善によってインフルエンザの症状緩和及び重症化阻止が可能か否か今後検証を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大野円実
2. 発表標題 Effects of Influenza Virus Infection on Insulin Signaling and Fatty Acid Metabolism in the Host
3. 学会等名 日本ウイルス学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----