

平成 21年 6月 1日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19790724
 研究課題名 (和文) インフルエンザ脳症発症を誘起する感受性因子の解明を基盤にした治療法の開発
 研究課題名 (英文) Elucidation of the molecular mechanism of influenza-associated encephalopathy due to disorder of ATP generation in mitochondria
 研究代表者
 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

研究成果の概要：インフルエンザウイルスに感染した患児が、インフルエンザ脳症や多臓器不全を併発する機序について解析した。その結果、1) 小児は生体内のエネルギー産生を糖代謝ではなく脂質代謝に大きく依存しており、2) 脂質代謝に関連する遺伝子に先天性の遺伝子多型が存在する場合、特に脳・心臓等の組織でエネルギーが枯渇状態に陥ることを証明した。さらに、末梢血から患児のインフルエンザの重症度を迅速に診断可能なシステムを開発することに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：インフルエンザ・脳症・多臓器不全・ミトコンドリア・脂肪酸代謝不全・ATP

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザはウイルスが気道粘膜に感染することにより、数日の潜伏期間の後に発症する急性の呼吸器感染症であるが、呼吸器症状のみならず、発熱、頭痛、関節痛等の全身症状を伴う。また、一部のハイリスク群の患者では、呼吸器合併症による死亡率が高く、小児では、急性の脳浮腫（インフルエンザ脳症）や多臓器不全（MOF: Multiple Organ Failure）が大きな社会問題となっている。この小児期に発症するインフルエンザ脳症は、死亡率が30%、意識障害や麻痺などの

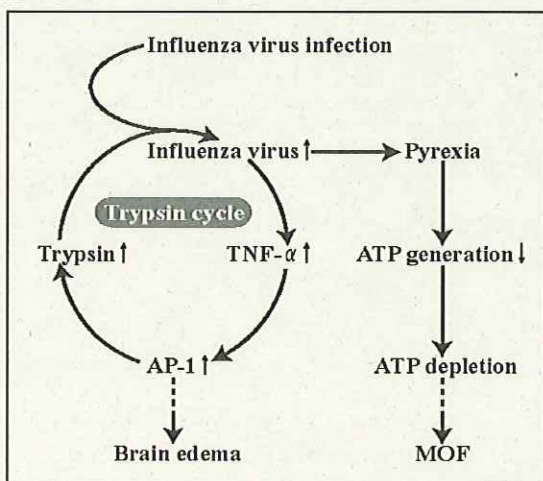
後遺症が25%と、小児の感染症の中でも特に重症化する可能性が高い危険な病気であり、日本人種に多く発病するとされている。しかし、未だに明確な治療法が開発されておらず、その発症機序の詳細についても不明な点が多いのが現状である。そこで申請者は、インフルエンザ脳症やMOFを併発する患児において、これらの病気の発症機序について詳しい解析を試みた。

2. 研究の目的

これまでに申請者らはインフルエンザ脳症

の発症機序を解明する目的で、患児の中でも特に重症化する患児の遺伝子解析を試みてきた。その結果、これら重篤な症状を来すハイリスク群の患児では共通して、高熱時にミトコンドリアのエネルギー (ATP) の障害が起こることを見出した。さらに、ラットを用いた解析から、インフルエンザ感染に伴い、本来は膵臓で分泌されるトリプシンが脳で発現誘導されている事実も示された。一般に、インフルエンザウイルスが病原性を獲得するためには、生体由来のトリプシン型プロテアーゼによるウイルス糖タンパク質 (HA: Hemagglutinin) の開列活性化が必須であり、ウイルスの感染性と増殖性獲得の決定的な因子となっている。従って、インフルエンザ感染に伴い、脳で発現誘導されるトリプシンがウイルスの感染性と増殖性獲得機構に深く関与していることが推測される。具体的には、ウイルス感染に伴い、血液中の炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-6, IL-8 等) の濃度が上昇し、転写因子 AP-1 (Activator Protein-1) を介したトリプシンの発現誘導が起こり、これがウイルスの増殖を促進するものと考えられる (下図参照)。

一方、インフルエンザ脳症の患者検体の遺伝子解析 (SNP 解析) の結果から、1) ミトコンドリア脂肪酸代謝酵素 CPT2 (Carnitine Palmitoyl Transferase 2) に温度感受性の SNP が存在していること、2) ATP 合成酵素 (Complex V: F1-ATPase) に SNP が存在することを見出した。これらの結果からミトコンドリアのエネルギー代謝系酵素の温度感受性遺伝子に SNP をもった患児が、持続性の高熱に晒されることで誘発される酵素の熱失活が原因で一時的な酵素欠乏状態に陥り、ミトコンドリアに蓄積されていたエネルギー (ATP) がある閾値以下になることにより、インフルエンザ脳症や MOF 等の重篤な症状が現れるものと推定された (下図参照)。



そこで本研究では、1) インフルエンザ脳症

や MOF 発症の主要な原因が組織・細胞内の ATP レベルの枯渇に起因すること、2) これらの結果を基盤にしてインフルエンザ脳症や MOF の効果的な予防・治療法を開発することを目的として本研究を遂行した。

3. 研究の方法

(1) 重症患児の遺伝子の SNP 解析

これまでに国立成育医療センター等の総合病院を受診した重症患児のうち、同意の得られた患児 (200 名) の末梢血から DNA を調製した。この患児から調製した DNA を用いて、ミトコンドリアの脂質代謝関連遺伝子群の SNP 解析を行った。

(2) 形質転換細胞の作製

上述の SNP 解析で日本人患児に最も多く見出された CPT2 遺伝子の SNP である F352C + V368I 変異を COS-7 細胞に導入した形質転換細胞を作出した。

(3) 組織からの ATP 抽出・測定

ヒトやマウスの組織中の ATP を高効率で抽出するため、フェノール抽出を基盤にした ATP の抽出システムを開発した。また、組織から抽出した ATP を定量するシステムも開発して、このシステムをキット化した (特許出願中)。この「ATP 抽出・測定キット」を使用して、重症患児の末梢血の ATP レベル及びマウスの組織の ATP レベルを測定した。

(4) マウスの組織中の ATP レベルの測定

脂質代謝障害モデルマウス (OCTN2 遺伝子ノックアウトマウス、CPT2 遺伝子ノックアウトマウス) を作成して、これらのマウスにインフルエンザを経鼻感染後、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、血液を摘出して、これらの組織の ATP レベルの低下を上記の「ATP 抽出・測定キット」を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) インフルエンザに感染した患児で、特にインフルエンザ脳症や MOF を来す患児では共通して 3 つの発症因子 (1. 内因性因子、2. 外因性因子、3. 代謝性因子) を併せ持つことが本研究により明らかとなった。

① 内因性因子

ミトコンドリアの脂肪酸代謝酵素である CPT2 遺伝子に特定の SNP (F352C + V368I) がある患者では、ウイルス感染による高熱時に CPT2 の酵素活性が低下して、脂質代謝能が低下することにより、細胞内のエネルギー

(ATP) の枯渇が起こることを形質転換細胞及びマウスを用いた動物感染実験により明らかにした。

② 外因性因子

インフルエンザウイルス感染によるストレスによって、他にもインフルエンザ感染後にジクロフェナクナトリウムやメフェナム酸等の解熱剤の投薬によるストレスによって、インフルエンザの病状が重症化することが示された。

③ 代謝性因子

生命活動に必要な ATP の産生経路は患児では、糖代謝経路ではなく脂質代謝経路に大きく依存して産生しており、脂質代謝酵素の活性低下によって起こる脳や心臓等の組織の ATP レベルの低下がインフルエンザ脳症発症の主要因であることが明らかになった。

(2) 申請者らは、1) ヒトやマウスの組織や血液中の ATP を迅速かつ正確に定量可能な「ATP 抽出・測定キット」を開発することに成功し、2) 多様な患者の末梢血中の ATP レベルを測定した。その結果、多くの疾患（インフルエンザ脳症、MOF、ミトコンドリア脳筋症等）患児において、その急性期に末梢血の ATP レベルが著明に減少することを見出した。すなわち、健常児あるいは回復期の患児の血中 ATP レベルは 1.4 mM 付近であるが、これが 0.7 mM 以下にまで減少すると重度の後遺症を発症し、0.4 mM 以下にまで減少すると死亡することを初めて明らかにした。本キットは、国内・国際 (PCT) 特許出願中である。この技術が全国の医療機関及び研究機関に波及することで、今後の臨床診断や基礎研究を支援する新規バイオツールとなることが期待される。

(3) 上記した 3 つの発症因子 (1. 内因性因子、2. 外因性因子、3. 代謝性因子) を標的とした安全なインフルエンザ脳症の治療薬を開発するために、脂質代謝障害モデルマウスを作出して、このマウスにインフルエンザウイルスを感染させた後、種々の治療薬の投与効果について検討した。その結果、ピルビン酸ナトリウムとジクロロ酢酸の混合薬 (DCA 治療薬) が非常に有効な治療薬であることが明らかとなってきた。この DCA 治療薬は、糖代謝の基質であるピルビン酸ナトリウムと糖代謝酵素の活性化剤であるジクロロ酢酸を基盤に調製した。この DCA 治療薬は、ミトコンドリアの糖代謝及び脂質代謝が抑制されて組織中の ATP の枯渇が引き金となる本症において、この治療薬は糖代謝による ATP 産生を亢進させて、脂肪酸代謝による ATP 産生を代替

的に補償するものである。今後は、動物実験を実施して DCA 治療薬の安全性の評価試験を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

- 1) 千田淳司, Yao D, 山口美代子, 木戸博. インフルエンザの重症化をめぐって - インフルエンザ脳症発症の機序の解明 - Antibiotics and Chemotherapy; 査読無, In press.
- 2) Suzuki S, Sawabuchi T, Iwase K, Mizuno D, Togari H, Watanabe I, Chida J, Kido H. Combination therapy with oseltamivir and macrolide in pediatric influenza for augmentation of mucosal sIgA response. European Respiratory Journal; 査読有, In press.
- 3) Chida J, Tanaka M, Maeda Y. A new method for precisely determining the functions of individual mitochondrial genes. BMC Genetics; 査読有, On line (<http://www.biomedcentral.com/1471-2156/9/25>), 2008.
- 4) Yao D, Mizuguchi M, Yamaguchi M, Yamada H, Chida J, Shikata K, Kido H. Thermal instability of compound variants of CPT II (carnitine palmitoyl-transferase II) and impairment mitochondrial fuel utilization in influenza-associated encephalopathy. Human Mutation; 査読有, 29 (5): 718-727, 2008.
- 5) 木戸博, 水野大, 武井恒知, 西野真紀, 千田淳司, Youssouf Cisse. インフルエンザ経鼻ワクチン - 肺サーファクタントと粘膜免疫 - Pediatrics of Japan; 査読無, 48 (12): 1837-1844, 2007.
- 6) Kido H, Yao D, Le Trong Q, Tsukane M, Chida J. Analysis of SNPs and enzymatic disorder in the patients of influenza-associated encephalopathy: disorder of fatty acid metabolism in mitochondria induced by high fever. Nippon Rinsho; 査読無, 64: 1879-1886, 2007.

〔学会発表〕 (計 11 件)

- 1) Chida J, Arase Y, Kido H. Molecular pathogenesis and multiplicity of influenza virus A/WSN/33 in plasminogen deficient mice. 第 81 回日本生化学会大会, 2008/12/10, 神戸.
- 2) Onishi U, Chida J, Cisse Y, Kido H. Molecular mechanism of the decrease in ATP levels by influenza virus

- infection. 第 81 回日本生化学会大会, 2008/12/10, 神戸.
- 3) Yao M, Yao D, Yamaguchi M, Chida J, Kido H. Effect of bezafibrate on mitochondrial energy crisis in the fibroblasts of severe influenza-associated encephalopathy patients. 第 81 回日本生化学会大会, 2008/12/10, 神戸.
 - 4) 千田淳司. インフルエンザ脳症のリスク診断を可能にする DNA チップの開発と患者の重症度をモニターする末梢血 ATP 測定システムの開発. 第 9 回次世代医療システム産業化フォーラム (招聘講演), 2008/12/03, 大阪.
 - 5) 千田淳司, Talukder S R, 奥村裕司, 木戸博. インフルエンザウイルス感染後に発現誘導されるトリプシン遺伝子群の転写制御ネットワーク. 第 13 回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会, 2008/08/22, 大阪.
 - 6) 荒瀬裕己, 千田淳司, 榎本匡志, 木戸博. インフルエンザウイルスの活性化・増殖仮説のプラスミノージェン KO マウスを用いた検証. 第 13 回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会, 2008/08/22, 大阪.
 - 7) 千田淳司, Yao D, Wang S, 山口美代子, 木戸博. インフルエンザ脳症発症の分子機序の解明. 第 15 回マクロライド新作用研究会 (招聘講演), 2008/07/23, 東京.
 - 8) Chida J, Enomoto T, Onishi U, Nasreen M, Kido H. Down-regulation of mitochondrial related genes by influenza virus infection and pathological role of them in multi-organ failure after influenza virus infection. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会, 2007/12/12, 横浜.
 - 9) Enomoto T, Yamada H, Chida J, Wang S, Kido H. Mechanism of augmentation of symptomatic severity of influenza virus infection by antipyretic, diclophenac. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会, 2007/12/12, 横浜.
 - 10) Chida J. Up-regulations of ectopic pancreatic trypsin mRNAs by influenza virus infection and pathological role of them in multi-organ failure after virus infection. 5th International Proteolysis Society, 2007/10/15, ギリシャ.
 - 11) 千田淳司, 榎本匡志, 山口美代子, 岡田清考, 木戸博. プラスミノージェン欠損マウスを用いたインフルエンザウイルスの

増殖機構の解析. 第 12 回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会, 2007/06/22, 大阪.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: スクレオチド (ATP) の抽出法
発明者: 木戸博, 千田淳司
権利者: 国立大学法人徳島大学
種類: 特許権
番号: PCT/JP2009/51364 (JP 2008/017863)
出願年月日: 2008/01/28
国内外の別: 国外 (PCT 出願), 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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