

機関番号：16101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790992

研究課題名 (和文) インフルエンザ脳症を誘発する感受性因子の解明を基盤にした診断・治療法の開発

研究課題名 (英文) Elucidation of the molecular mechanisms 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 (和文)：インフルエンザで重症化すると脳症や多臓器不全等を引き起こすが、その詳細な機序は不明である。そこで申請者らはインフルエンザの重症化モデル (CPT2 遺伝子改変) マウスを作出し、ウイルス感染試験を実施した結果、全身性の ATP の枯渇が認められた。以上の結果から、本病態の主要因は全身性の ATP の枯渇であることが明確になった。さらに、本結果を基盤にした新規の重症度診断法と治療薬 (代謝改善薬) を開発することに成功した。

研究成果の概要 (英文)：Severe influenza including influenza-associated encephalopathy (IAE) is characterized by cytokine storm and multi-organ failure (MOF) with severe edema. However, the relationship amongst factors, such as cytokine storm, hyper-vascular permeability, and metabolic disorders, remain unclear. We generated gene targeted mouse models of the CPT2 variants, analyzed ATP levels in various organs of severe influenza, and found significant ATP depletion after virus infection. We conclude that ATP depletion in various organs elicited sudden-onset of brain edema and MOF in associated with influenza virus-cytokine-protease cycle. To address this problem, we have established a clinically applicable drugs and diagnostic assessment strategy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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 (IAE)・多臓器不全 (MOF)・ミトコンドリア・脂肪酸代謝不全・アデノシン三リン酸 (ATP)

1. 研究開始当初の背景

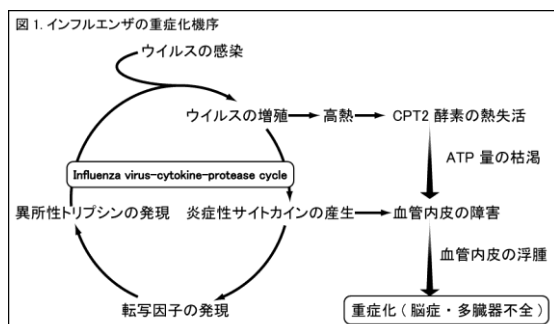
インフルエンザはウイルスが気道粘膜に感染することで、数日の潜伏期間の後に発症する急性に呼吸器感染症であるが、呼吸器症状のみならず、発熱、頭痛、関節痛等の全身症状を伴う。また高齢者や基礎疾患患者

では呼吸器合併症による致死率が高く、小児では脳症 (IAE)、多臓器不全 (MOF) が問題となっている。この小児の IAE は日本人で特に報告が多いものの、その発症機序の詳細については不明な点が多いのが現状である。そこで申請者らは IAE や MOF 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 IAE の発症機序を解明するため、IAE 患児の遺伝子多型解析を実施してきた。その結果、IAE 患児の多くで、ミトコンドリアのエネルギー (ATP) 産生に関わる遺伝子に共通の一塩基多型 (SNP) が存在することを見出している [1]。なかでも、CPT2 遺伝子の SNP (F352C, V368I 変異) の保因者は日本人で高率であり、この SNP の保因者はインフルエンザ罹患後の高熱時に CPT2 酵素が熱失活することを立証している [2]。以上の結果から IAE が日本人の小児で多い原因は、小児では成人と比較して脂肪酸代謝による ATP 産生の依存度が高いことに加えて CPT2 酵素の熱失活が起こること、これらが全身性の ATP の枯渇を引き起こし、IAE や MOF 等の症状を来すものと推定している [図 1]。この仮説を証明する目的で申請者は本研究でインフルエンザの重症化モデル (CPT2 遺伝子改変) マウスを作出し、本マウスを用いたウイルス感染試験を実施した。

一方、上述の重症化機序とは別に申請者は、インフルエンザ罹患後に血液中で一過的に上昇する炎症性サイトカインが、血管内皮の障害や異所性トリプシンの過剰産生を引き起こすことを明らかにしており、この異所性トリプシンがインフルエンザウイルスの感染能をさらに活性化する増悪サイクル (Influenza virus-cytokine-protease cycle, [図 1]) の存在を推定している [3]。従って申請者は本研究で本増悪サイクルの存在を明確にするとともに、本増悪サイクルを基盤にしたインフルエンザの重症度診断法・新規治療法を開発することが本研究の主目的である。



3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変・遺伝子欠損マウスの作出

CPT2 (Carnitine palmitoyltransferase 2) 遺伝子に SNP (F352C, V368I 変異) を導入したマウスの作出はユニテック株式会社に受託した。他にも、異所性トリプシン

(PRSS-1, PRSS-2) の遺伝子欠損マウスをクラボウ株式会社に受託して作出した。

(2) CPT2 の酵素活性の測定

野生型 (C57BL/6) 及び CPT2 遺伝子改変マウスの各組織を摘出後に、抽出緩衝液中で各組織を破碎した。この組織破碎液を用いて前述した方法 [2] と同様の方法で CPT2 の酵素活性の測定を実施した。これと同時に、組織破碎液のタンパク質定量を行い、CPT2 酵素活性をタンパク質濃度で補正した。

(3) マウスへのウイルス感染試験

野生型及び遺伝子改変マウス (3 週齢, 雌) にケタラル麻酔を施行後、ウイルス液 (Influenza A/PR/8/34 株) を経鼻感染した。対象の非感染群のマウスには、ウイルス液の代わりに PBS を経鼻投与した。

(4) 炎症性サイトカインの定量

炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6 等) の定量は、マウスから血清を調製後、ELISA 法 (BD Biosciences 社) で定量した。

(5) 血管内皮の障害 (膜透過性) の評価

前述の方法 [4] に従って、評価を行った。すなわち、血管内皮細胞を単層培養した後、FITC で標識したデキストランを培養液に加えて、デキストランの透過性を評価した。

(6) マウスの各種組織の ATP の抽出・定量

マウスの組織中の ATP を高い効率で抽出する目的で、フェノール・クロロホルム抽出を基盤にした ATP 抽出システムを開発した。さらに本システムをキット (XL-ATP kit: 特許出願中) として市販化した。このキットを使用し、マウスから摘出した組織及び血液中の ATP 量を測定した。

(7) マウスへの候補薬の投薬試験

マウスへの各薬剤 (各種抗体, Bezafibrate, DCA 剤, DADA) の投薬は、ウイルス感染後の翌日から毎日 (朝晩 2 回) 経口投薬をした。対象となる非感染群のマウスには薬剤の代わりに 0.5% CMC (メチルセルロース 400) を経口投薬あるいは生理食塩水を腹腔内投薬した。

(8) 患児の血清アシルカルニチンの定量

患者の同意のもとで鳥取大学新生児治療部 (NICU) に依頼し、新生児タンデムマス・スクリーニングを用いた解析により定量を行った。

(9) 患者の末梢血中の ATP・乳酸値の測定

徳島大学集中治療室 (ICU) に入室された患者で、本研究への同意の得られた患児の

血液を採血後、上述の XL-ATP kit を用いて ATP を定量した。また、患者の血中乳酸値の測定は血液ガス自動分析装置を使用した。

[参考文献]

- [1] FEBS Lett. 579 (10): 2040-2044, 2005.
- [2] Human Mut. 29 (5): 718-727, 2008.
- [3] Biol Chem. 387 (4): 467-475, 2006.
- [4] J Neuroviol. 14: 186-195, 2008.

4. 研究成果

本研究で実施した IAE 患児検体の解析と、本研究で作出した種々の遺伝子改変/遺伝子欠損マウスを用いた分子生物学的解析から、インフルエンザの重症化には以下に挙げる 2 つの感受性因子の存在が重要であると判断した。

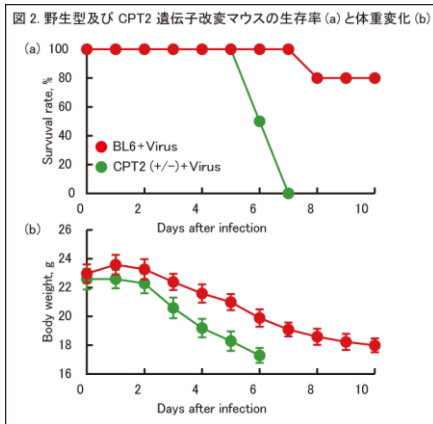
(1) 共通因子

インフルエンザ罹患後に、一過的に起こるサイトカイン (IL-1 β , IL-6 等) の産生が血管内皮障害・異所性トリプシン (PRSS-1, PRSS-2) の過剰産生を誘発し、これら異所性トリプシンがウイルスの増殖を活性化する 増悪サイクル (Influenza virus-cytokine-protease cycle, [図 1]) の存在を明確にした [雑誌論文 2-7]。すなわち、マウスを用いたウイルス感染試験によって、ウイルス感染後の初期に異所性トリプシンの発現が肺、脳、心臓で認められ、これらの組織を構成する血管内皮のタイトジャンクションの崩壊と血管膜透過性の亢進が起こることが実証された。これらの血管内皮細胞の障害は末梢循環不全を引き起こすだけでなく、血液凝固、補体系・好中球・マクロファージ等の活性化、リンパ球の活性化及び不活性化のきっかけを作ることが確認された。これらが総合的に作用した結果が MOF であるものと推定している。上述した生体応答は程度の差こそあるものの、インフルエンザ罹患患者の誰にでも共通して起こる事象であることから、特定の日本人や小児で重症化しやすい原因とは言えない。

(2) 特定因子

ミトコンドリアの脂肪酸代謝系酵素である CPT2 遺伝子上に特定の多型を保有する患児では、インフルエンザの高熱時に本酵素の酵素活性の低下、すなわち全身性の ATP の枯渇に陥り、エネルギー需要量の多い組織 (脳・心臓) では機能不全に陥りやすいことを患者検体での解析あるいはマウスの感染試験により実証した [雑誌論文 1, 3, 10]。さらに、本研究で CPT2 遺伝子改変マウスを

作出し、実際にインフルエンザの感染試験を試みた結果、本遺伝子改変マウスは野生型マウスと比較してウイルス感染後の早期に全滅し死亡率が高いこと、さらに体重減少が著しいことが確認された [図 2]。従って、IAE が日本人の小児で多い原因は、小児では成人と比較して脂肪酸代謝による ATP 産生の依存度が高いことに加えて CPT2 酵素の熱失活が起こることで、これらが全身性の ATP の枯渇を引き起こし、IAE や MOF 等の症状を来すことが明確になった。



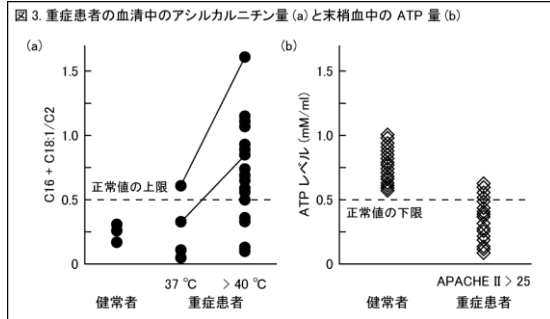
以上の結果を基盤にした効果的な診断法・治療法の開発を試みた。

(3) 診断法の開発

インフルエンザで重症化した患者あるいは IAE 患者で、徳島大学集中治療室 (ICU) に入室・管理された患児で、本研究への参加の同意の得られた患者の末梢血を採血した後、末梢血中の ATP 量を測定した。その結果、健常者と比較して、(APACHE II 重症度評価スコアが 25 点以上) の重症患児あるいは IAE 患児患者では、血液中の ATP 値が低値を示すことが明らかになった [図 3 (b)]。以前の申請者らは、インフルエンザ罹患患児で重症化する CPT2 遺伝子の多型保有者は、インフルエンザ罹患後の高熱時に脂肪酸の代謝能が低下するために血液中に遊離型の長鎖脂肪酸 (アシルカルニチン) 量が蓄積することを報告した [図 3 (1)]。従って、重症度診断・評価法としてはインフルエンザ罹患患児の血液中の 1) アシルカルニチンの定量、2) ATP 量の測定が有用である。しかし、アシルカルニチンの定量には全国の医療機関で数台しか配備されていない機器 (タンデムマス) が必要であることから、ATP の測定が重症度診断法としては有望と考えられる。

これに関連して、申請者は血液中の ATP の測定値 (mM) を血中乳酸値 (mM) で割った値 (A-LES: ATP-Lactate Energy Score) が多様な患者の重症度を評価する方法として非常に優れていることを見出し、国内・国外

(PCT) 特許を出願中である。本重症度評価法はこれまで集中治療の現場で広く使用されていた APACHE II 重症度評価と比較して、測定検査項目が少なく、患者の重症度を正確かつ迅速に評価可能であることから、本重症度評価法は全国の医療機関に広く波及する可能性が高いと考えている。



(4) 治療法の開発

最後に本研究では、抗ウイルス剤（オセルタミビル・リレンザ）とは作用機序の異なるインフルエンザの重症化の治療薬の開発を実施した。実際に、マウスを用いたウイルス感染試験で評価した治療法は、1) 炎症性サイトカイン抗体（抗 IL-1 β 抗体、抗 IL-6 抗体等）を用いた抗体療法、2) 脂肪酸代謝の活性化剤（Bezafibrate 系薬剤）の投薬療法、そして 3) 糖代謝の活性化剤（DCA: ジクロロ酢酸）の投与療法である。その結果、DCA を経口投与したマウスでは、劇的な病態改善効果が認められた。すなわちウイルスを半数致死 (LD50) 量で感染させたマウスに、毎朝晩 DCA (100mg/kg マウス) を経口投薬することで、マウスは死亡せずに体重減少もほとんど認められなくなった。さらに、ウイルス感染による全身組織の ATP 量の枯渇についても大幅な改善が確認された。本剤の薬理的作用機序は、ミトコンドリアの脂肪酸代謝及び糖代謝が抑制されて全身組織の ATP の枯渇が引き金となる本症において、DCA は糖代謝による ATP 産生を亢進させ、脂肪酸代謝による ATP 産生の低下を代替的に補償するものであることが明らかになってきた。さらに最近、DCA と類似の二量体型誘導体 (DADA) にも DCA と同等以上の病態改善効果が認められており、この DADA はインフルエンザ等のウイルス性の感染症あるいは敗血症等の細菌性の感染症の代謝改善薬として、他にも ATP の枯渇が引き金となる疾患（ミトコンドリア脳筋症、糖尿病等）の病態改善薬として有用であるものと考えている（本剤は、第一三共株式会社と共同で特許出願中）。今後は、DADA と抗ウイルス剤の併用投与試験をマウスで行うことで、両薬剤の併用による相乗効果が期待されることから、その有無について評価をする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 10 件)

1. Kubota M, *et al.* (他 12 名, 2 番目) Thermolabile CPT II variants and low ATP levels are closely related to severity of acute encephalopathy children. *Brain Development*; 査読有, In press.
2. Chida J, *et al.* (他 3 名, 1 番目) Influenza virus-cytokine-protease cycle are principal mechanisms of multi-organ failure in severe influenza and therapeutic approaches. *Influenza and Other Respiratory Viruses*; 査読有, In press.
3. Pan H, *et al.* (他 6 名, 2 番目) Up-regulation of ectopic trypsin in myocardium by influenza A virus infection triggers acute myocarditis. *Cardiovascular Research*; 査読有, 89 (3): 595-603, 2011.
4. Wang S, *et al.* (他 7 名, 4 番目) Influenza virus-cytokine-protease cycle in the pathogenesis of vascular hyper permeability in severe influenza. *The Journal of Infectious Disease*; 査読有, 202 (7): 991-1001, 2011.
5. Kido H, *et al.* (他 3 名, 2 番目) Mechanisms of multi-organ failure in severe influenza. *Nippon Rinsho*; 査読無, 68 (8): 1565-1573, 2010.
6. Wang S, *et al.* (他 6 名, 3 番目) Mechanisms of matrix metalloprotease-9 up-regulation and tissue destruction in various organs in influenza A virus infection. *The Journal of Medical Investigation*; 査読有, 57 (1-2): 26-34, 2010.
7. 木戸 博, *et al.* (他 4 名, 3 番目) 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-. *最新医学*; 査読無, 65 (1): 52-60, 2010.
8. Kido H, *et al.* (他 7 名, 6 番目) Host envelope glycoprotein processing proteases are indispensable for entry into human cells by seasonal and highly pathogenic avian influenza viruses. *Journal of Molecular Pathogenic and Genetic Medicine*; 査読有, 3 (1): 167-175, 2009.
9. Sawabuchi T, *et al.* (他 8 名, 8 番目) Boost of mucosal secretory IgA response by clarithromycin (CAM) in paediatric influenza. *Respirology*; 査読有, 14 (8): 1173-1179, 2009.
10. Chida J, *et al.* (他 4 名, 1 番目)

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, 23: 101-109, 2009.

[学会発表] (計 10 件)

1. Yao M, *et al.* Effect of Bezafibrate on mitochondrial energy crisis in the fibroblast of severe influenza-associated encephalopathy patients. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学学会大会合同大会, 2010/12/10, 神戸.
2. Chida J, *et al.* Pathogenesis of impaired systemic energy metabolism by severe influenza virus infection -Analysis using mouse models of defect in mitochondrial β -oxidation of long fatty acids-. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学学会大会合同大会, 2010/12/9, 神戸.
3. Kido H, *et al.* Influenza virus-cytokine-protease cycle in the pathogenesis of vascular hyper-permeability in severe influenza and its possible treatment. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学学会大会合同大会, 2010/12/8, 神戸.
4. 千田 淳司. インフルエンザ脳症の発症メカニズムの酵素学的な解析 -ウイルス罹患後に高熱で誘発されるミトコンドリア長鎖脂肪酸代謝障害-. 温熱生理研究会 (招聘講演), 2010/9/10, 名古屋.
5. Chida J. Influenza virus-cytokine-protease cycle and mitochondrial ATP depletion are the principal mechanisms of multi-organ failure in severe influenza and therapeutic approaches. Options for Control of Influenza VII, 2010/9/4, 香港.
6. Pan H, *et al.* Up-regulation of ectopic trypsin in myocardium triggers acute myocarditis in severe influenza. 第 15 回日本病態プロテアーゼ学会, 2010/8/21, 大阪.
7. Chida J, *et al.* Pathogenesis of mitochondrial ATP depletion of mice caused by influenza virus and therapeutic approach for them using DCA drug. 第 82 回日本生化学学会大会, 2009/10/23, 神戸.
8. Wang S, *et al.* Influenza-cytokine-protease cycle in the pathogenesis of cytokine storm in severe influenza. 第 82 回日本生化学学会大会, 2009/10/23, 神戸.
9. Yao M, *et al.* Effect of Bezafibrate on mitochondrial energy crisis in the

fibroblasts of severe influenza-associated encephalopathy patients. 第 82 回日本生化学学会大会, 2009/10/23, 神戸.

10. Kido H, *et al.* Host cellular factors and their mechanisms of influenza aggravation, and recent data for the prevention at mucosal surface. 第 82 回日本生化学学会大会, 2009/10/22, 神戸.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 病気の重症度の検査法
発明者: 木戸博, 西村匡司, 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/JP2010/125354
出願年月日: 2010/10/4
国内外の別: 国外 (PCT 出願)

他 1 件 (企業との共同研究で国内出願)

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 協力研究者

なし