

平成25年 5月29日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791180

研究課題名（和文） インフルエンザ重症患児で認められる体内代謝破綻の修復を目指す新規治療法の開発

研究課題名（英文） New target and therapeutic approach to influenza virus-induced multiple organ failure

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マウスを作出し、ウイルス感染試験を実施した結果、全身組織のエネルギー（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組織の ATP の枯渇であることが明確になった。そこで本研究では、体内代謝をモニタリングする重症度診断法の確立、さらに体内代謝破綻の修復を目指した新規治療薬（代謝改善薬）の開発に取り組み、これに成功した。

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
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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）・サイトカイン

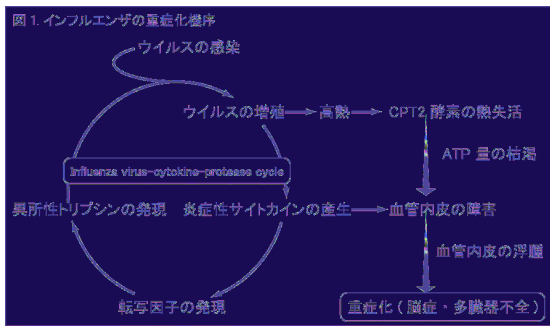
## 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスは気道粘膜上皮で感染・増殖するが、ウイルスが感染能を獲得するためには、ウイルスの膜表面に存在するヘマグルチニン（HA）が、宿主由来のプロテアーゼにより切断される必要がある。これまでに申請者らはウイルスの HA を切断する

宿主由来のプロテアーゼを多数（Trypsin, Chymotrypsin, MMP-9, Trypsin 等）報告しており、これらのプロテアーゼがウイルスの HA の切断に重要であることを報告している。この申請者らが確立した、感染初期の増悪サイクル「インフルエンザウイルス-サイトカイン-プロテアーゼサイクル」とは、ウイルス感染により炎症性細胞から産生さ

れたサイトカインが、転写因子を活性化し、これがプロテアーゼ群の発現の誘導を引き起こして、これらプロテアーゼがウイルスのHAを切断する「ウイルス増殖サイクル」である(図1)。この増悪サイクルによって、過剰産生されたサイトカインが血管内皮を障害することがウイルス感染初期の重症化の主要因である。

さらに申請者らの研究で、インフルエンザ罹患患児が特に重症化しやすい原因として、ウイルス感染後期に起こる「全身組織のエネルギー(ATP)産生障害」が重要であることが明らかとなってきた。すなわち、重症化あるいは死亡する患児の多くが、ウイルス感染の高熱時に血液中の長鎖脂肪酸が増加するCPT2(Carnitine palmitoyltransferase 2)酵素欠損症の所見を示した。これら患児は、これまでに日本人にしか報告されていないCPT2遺伝子の多型保因者であり、ミトコンドリアのATP産生が亢進されなくてはならないウイルス感染の高熱時に、長鎖脂肪酸を代謝できずにATPの産生が低下し、細胞死にまで進行する。これが最終的には、血管内皮細胞を含めた全身組織の浮腫・機能不全を引き起こすことがウイルス感染後期の重症化の主要因であると推定している(図1)。



## 2. 研究の目的

以上のようなインフルエンザ罹患患児の重症化機序を踏まえ、本研究では、現行の抗ウイルス剤(タミフル等)とは作用機序の異なる新規治療法の開発に取り組むこと、インフルエンザ重症化モデルマウスを用い、候補治療剤の有効性について評価・検証をすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 新規治療薬のスクリーニング

インフルエンザの重症化に有効な候補治療薬(30種類)のスクリーニングを行った。

本スクリーニングでは、ウイルス感染させた2種のヒト培養細胞(HUVEC, A549)を用い、一定期間(37℃, 48時間)培養後の細胞の生存率を薬理効果の指標とした。

### (2) 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(5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生理食塩水を経鼻投与した。

### (3) マウスへの候補薬の投薬試験

野生型及び遺伝子改変マウス(5週齢, 雌)への候補薬剤の投薬は、ウイルス感染の翌日から毎日(朝晩2回)経口あるいは腹腔内投薬を実施した。対象群となる非感染マウスには薬剤の代わりに0.5% CMC(メチルセルロース)を経口投薬あるいは生理食塩水を腹腔内投薬した。

### (4) 炎症性サイトカインの定量

炎症性サイトカイン(IL-1 $\beta$ , IL-6等)の定量は、マウスの肺から10%ホモジネート液を調製した後、ELISA法で定量した。

### (5) 血管内皮障害(膜透過性亢進)の評価

血管内皮細胞(HUVEC)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の抽出・定量は市販のキット(AMERIC-ATP kit)を用い、添付書の方法に従い、実施した。

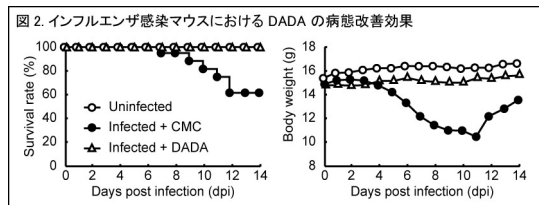
## 4. 研究成果

### (1) 新規治療薬のスクリーニング試験

インフルエンザの重症化の主要因は全身性のATPの枯渇、すなわち、ミトコンドリアの糖代謝と脂肪酸代謝の低下が主要因である。

ヒト培養細胞を用いたスクリーニング試験、マウスでの感染試験から、糖代謝の鍵酵素であるPDHC(Pyruvate dehydrogenase複合体)を不活化するリン酸化酵素であるPDK4(Pyruvate dehydrogenase kinase 4)の酵素活性阻害剤であるDADA(Diisopropylamine dichloroacetate)のマウスへの投薬が、最も高い病態改善効果を示した。すなわち、半数致死量のウイルスを感染させたマウスへの、毎朝晩のDADA(100mg/kg/day)の経口投薬により、マウスは死亡せずに体重減少も認められなくなった(図2)。

他にも、脂肪酸代謝の亢進薬 (Bezafibrate) がウイルス感染時のヒト培養細胞の ATP の枯渇を防止することを見出した (*Molecular genetics and metabolism*; 104 (3): 265-272, 2011. 参照)。しかし、転写因子阻害剤、抗サイトカイン抗体等では大幅な病態の改善効果は認められなかった。

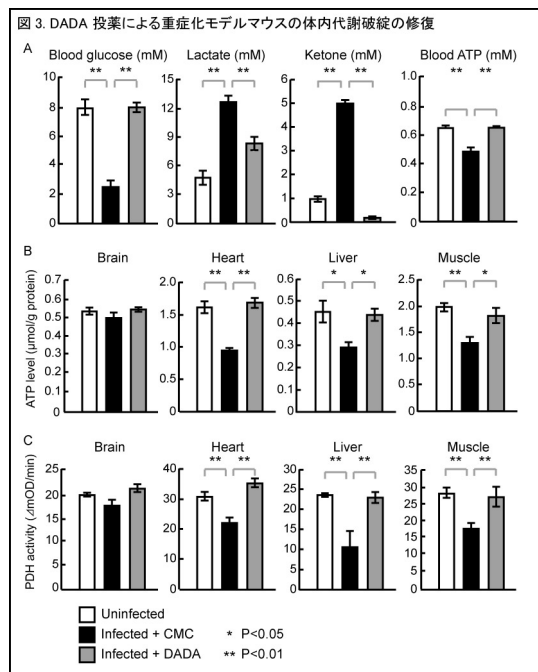


次に、DADA の薬理作用を解析するために、ウイルス感染 7 日後 (DADA 非投薬群マウスでは重症化が起こっている時期) のマウスで種々の重症化のパラメーター (血糖値、血中乳酸値等) を測定した。その結果、DADA 投薬群のマウスはウイルス感染後の血糖値低下、血中乳酸値・ケトン値の増加が認められず、ウイルス非感染群マウスとほぼ同程度の値であった (図3A)。さらに、ウイルス感染後に起こる全身性の ATP の低下についても検証するために、ウイルス感染 7 日後のマウスの組織 (脳、心臓、肝臓、筋肉、末梢血等) の ATP 量を測定した。その結果、DADA 投薬群のマウスは全身性の ATP の低下が認められず、ウイルス非感染群マウスとほぼ同程度の値であった (図3B)。さらに、上記組織を用い、糖代謝の鍵酵素である PDHC の酵素の活性を測定した結果、DADA 投薬群のマウスでは各組織における PDHC の酵素活性の低下は認められず、ウイルス非感染群マウスとほぼ同程度の値を示した (図3C)。

以上の結果から DADA の薬理的作用機序は、ミトコンドリアの脂質代謝・糖代謝の抑制により、全身性の ATP 量の枯渇が引き金となる本症において、DADA は糖代謝による ATP の産生を亢進させ、脂質代謝の ATP 産生の低下を代替的に補償するものと推定された。

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)。現在、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実施している。



## (2) 体内代謝をモニタリングする新規重症度診断法の確立

インフルエンザで重症化した患者あるいはその他疾患患者で、本学大学院集中治療室に入室・管理された患者で、本研究への参加の同意の得られた患者から末梢血を採血後、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) 重症患者あるいは死亡した患者では、血液中の ATP 値が低値を示すことが明らかになった。

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 重症度評価法と比較し、測定する検査項目が少なく、患者の重症度を正確かつ迅速に評価することが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。また、本重症度評価法は患者の体内代謝変動をリアルタイムでモニタリングすることが可能な優れた診断法であることから、本診断法の臨床分野における有用性を国際雑誌で報告した (*PLoS One*; 8 (4): e60501, 2013. 参照)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Chida J, et al. (他 1 名, 1 番目)  
Extraction and quantification of ATP (adenosine triphosphate) in mammalian tissues and cells. *International review of cytology*; 査読有, In press.
2. Chida J, et al. (他 9 名, 1 番目)  
Blood lactate/ATP score (A-LES) as a real-time diagnostic/prognostic biomarker of patients in critical care. *PLoS One*; 査読有, 8 (4): e60501, 2013.
3. Takahashi E, *et al.* (他 8 名, 6 番目)  
Oral clarithromycin enhances airway immunoglobulin A (IgA) immunity through induction of IgA class switching recombination and B-cell-activating factor of the tumor necrosis factor family molecule on mucosal dendritic cells in mice infected with influenza A virus. *Journal of virology*; 査読有, 86 (20): 10924-10934, 2012.
4. Chida J, et al. (他 3 名, 1 番目)  
An efficient extraction method for quantitation of adenosine triphosphate in mammalian tissues and cells. *Analytica chimica acta*; 査読有, 727: 8-12, 2012.
5. Kido H, *et al.* (他 8 名, 8 番目)  
Role of host cellular proteases in the pathogenesis of influenza and influenza-induced multiple organ failure. *Biochimica et Biophysica acta*; 査読有, 1824 (1): 186-194, 2012.
6. Kubota M, *et al.* (他 12 名, 2 番目)  
Thermolabile CPT II variants and low blood ATP levels are closely related to severity of acute encephalopathy in Japanese children. *Brain and development*; 査読有, 34 (1): 20-27, 2012.
7. 木戸 博, *et al.* (他 1 名, 2 番目)  
インフルエンザ脳症の発症機序 -CPT2 遺伝子多型が解き明かす発症リスク-. *医学のあゆみ*; 査読無, 241 (1): 23-28, 2012.
8. Yao M, *et al.* (他 5 名, 4 番目)  
Bezafibrate up-regulates carnitine palmitoyltransferase 2 expression and promotes mitochondrial energy crisis dissipation in fibroblasts of patients with influenza associated encephalopathy. *Molecular genetics and metabolism*; 査読有, 104 (3): 265-272, 2011.
9. Chida J, et al. (他 4 名, 1 番目)  
Influenza virus-cytokine-protease cycle are principal mechanisms of multi-organ failure in severe influenza and therapeutic approaches. *Other Respiri Viruses*; 査読有, 5 (1): 281-286, 2011.
10. Yao M, *et al.* (他 5 名, 4 番目)  
Characterization of compound missense mutation and deletion of carnitine palmitoyltransferase 2 in a patient with adenovirus-associated encephalopathy. *The journal of medical investigation*; 査読有, 58 (3-4): 210-218, 2011.
11. 織田 順, *et al.* (他 6 名, 7 番目)  
熱中症の新しいリスクファクターとしての熱不安定性フェノタイプ症. *日本救急医学学会雑誌*; 査読無, 22 (7): 350-351, 2011.
12. 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.

[学会発表] (計 10 件)

### ・国際会議

1. Chida J, et al. (他 4 名, 1 番目)  
Up-regulations of ectopic trypsins and MMP-9 by influenza virus infection triggers MOF and therapeutic approaches. *7th International of proteolysis society*; Hilton San Diego Resort and Spa (米国), 10, 18, 2011.
2. Takahashi E, *et al.* (他 4 名, 4 番目)  
Trypsin knock down and trypsin inhibitor administration suppressed influenza viral replication and virus-induced myocarditis in the hearts and cardiomyoblast cells. *7th International of proteolysis society*; Hilton San Diego Resort and Spa (米国), 10, 18, 2011.
3. Yamane K, *et al.* (他 2 名, 2 番目)  
New option for the treatment of influenza virus-induced multiple organ failure (MOF): Effect of dichloroacetic acid derivative on mitochondrial energy crisis. 5th Biennial meeting of society for free radical research-asia, 8th Conference of asian society for mitochondrial research and medicine, 11th Conference of japanese society of mitochondrial research and medicine; 鹿児島市民文化ホール (鹿児島県), 9, 3, 2011.
4. Chida J, et al. (他 5 名, 1 番目)  
Influenza virus-cytokine-protease cycle and mitochondrial ATP depletion are

principal risk factors of multi-organ failure (MOF) and influenza-associated encephalopathy of patients with severe influenza. *International union of microbiological societies 2011 congress*; 札幌コンベンションセンター (北海道), 10, 13, 2011.

5. Kido H, *et al.* (他 4 名, 3 番目)  
Pathogenesis and possible treatment targets of multiple organ failure in high-risk patients with severe influenza and animal models. *International union of microbiological societies 2011 congress*; 札幌コンベンションセンター (北海道), 10, 13, 2011.

・国内学会

6. 山根 一彦, *et al.* (他 6 名, 2 番目)  
New target and therapeutic approach to influenza virus induced multiple organ failure: effects of diisopropylamine dichloroacetate on energy crisis rescue. 第 85 回 日本生化学会大会; 福岡国際会議場/マリンメッセ福岡 (福岡県), 12, 15, 2012.
7. 小野寺 睦雄, *et al.* (他 5 名, 3 番目)  
ICU 入室患者における末梢血アデノシン三リン酸と転帰との関係. 第 39 回 日本集中治療医学会学術集会; 幕張メッセ (千葉県), 2, 28, 2012.
8. 千田 淳司, *et al.* (他 5 名, 1 番目)  
Principal mechanisms of multi-organ failure in severe influenza and therapeutic approaches. 第 84 回 日本生化学会大会; 国立京都国際会館 (京都府), 9, 23, 2011.
9. 山根 一彦, *et al.* (他 5 名, 2 番目)  
インフルエンザ感染による重症化と多臓器不全の新治療法の開発: ジクロロ酢酸誘導体による糖代謝改善を基盤としたエネルギー枯渇の回避. 第 84 回 日本生化学会大会; 国立京都国際会館 (京都府), 9, 23, 2011.
10. 小野 理恵, *et al.* (他 5 名, 5 番目)  
重症患者における乳酸値/ATP 比 (A-LES) の有用性. 第 58 回 日本麻酔科学会; 神戸ポートピアホテル/神戸国際展示場 (兵庫県), 5, 20, 2011.

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称: インフルエンザの治療剤または予防剤  
発明者: 木戸 博, 千田 淳司, 埴 雅明, 山本 善一, 井 紀孝, 角田 健司  
権利者: 国立大学法人徳島大学, 第一三共ヘルスケア株式会社

種類: 特許権

番号: PCT/JP2011/067321

出願年月日: 2011/7/28

国内外の別: 国外 (PCT 出願)

名称: 病気の重症度の検査方法

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)

名称: 動物組織からのヌクレオチドの抽出法

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

出願年月日: 2008/1/8

国内外の別: 国外 (PCT 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