

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24249059

研究課題名(和文) 季節性・高病原性鳥インフルエンザの重症化・多臓器不全の発症機序解明と治療薬の提案

研究課題名(英文) Pathogenicity of multiple organ failure induced by seasonal and highly pathogenic avian influenza virus infection and its therapeutic options

研究代表者

木戸 博 (KIDO, Hiroshi)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・特任教授

研究者番号：50144978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,700,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザ重症化・多臓器不全の発症機序と治療薬に関して成果を挙げた。  
 1)重症化治療法では、糖代謝改善薬のPyruvate Dehydrogenase kinase 4阻害剤のdiisopropylamine dichloroacetateと、長鎖脂肪酸代謝酵素転写促進剤のBezafibrateを提案した。また血管内皮細胞のGSK-3 $\beta$ の活性化を介した $\beta$ -cateninの分解亢進が血管透過性亢進原因として解明した。2)インフルエンザ脳症の診断に、SmartAmp法を用いた熱不安定性CPTII遺伝子多型の診断法を確立した。3)重症化Alarmシグナルとして、乳酸値/ATP値の有用性を確認した。

研究成果の概要(英文)：Influenza A virus (IAV) causes significant morbidity and mortality. We have studied the viral pathogenicity and the host cellular factors involved in the pathogenicity of multiorgan failure (MOF). We proposed a new concept on the pathogenicity of MOF, the "influenza virus-cytokine-trypsin" cycle interconnected with the "metabolic disorders-cytokine". These cycles provide new treatment concepts for ATP crisis and MOF. One is diisopropylamine dichloroacetate, an inhibitor of pyruvate dehydrogenase kinase 4 for glucose metabolism and the other is bezafibrate which up-regulates long-chain fatty acid metabolism. We also identified that IAV infection induces GSK-3 $\beta$ -mediated  $\beta$ -catenin degradation in the adherens junctional complexes and induces vascular hyperpermeability. Furthermore, we established SmartAmp system for detection of thermolabile carnitine palmitoyltransferase 2 SNPs as risk factors for influenza associated encephalopathy in the infected young children.

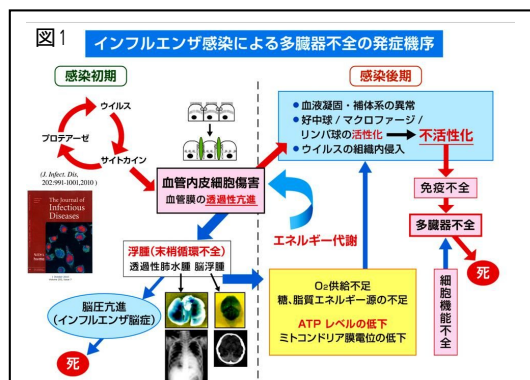
研究分野：病態医科学

キーワード：インフルエンザ 重症化機序 治療法 バイオマーカー 診断法 多臓器不全 エネルギー代謝 血管透過性亢進

1. 研究開始当初の背景

**なぜ個体はウイルス感染で死に至るのだろうか？多臓器不全の発症機序**

インフルエンザ感染による多臓器不全は、ウイルスが体外へ排除される頃から始まる生体反応の結果である。それではなぜ多臓器不全になるのだろうか？ 図1に多臓器不全の発症機序をウイルス感染と血管内皮細胞障害との関係を初めて明らかにした「インフルエンザ-サイトカイン-trypsin サイクル」説 (Wang, 木戸等, *J. Infect. Dis.* 202:991-1001, 2010) を示す。この説は血管内皮のみならずインフルエンザ心筋炎でも確認され (Pan, 木戸等, *Cardiovasc. Res.* 89:596-603, 2011)、特に Editorial で論文の重要性が紹介された。多臓器不全は、感染局所で生じた炎症性サイトカインによるサイトカインストーム (特に IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 等) で、全身臓器のプロテアーゼ群 (trypsin, MMP-9) の転写活性が増加した結果 (Le, 木戸等, *Biol. Chem.* 387, 467-75, 2006)、組織破壊と trypsin-PAR-2 経路を介した血管内皮細胞障害、増加した Trypsin による細胞機能の変化 (橋本、木戸等, *J. Cell Biol.* 181, 1065-72, 2008)、NO と O<sub>2</sub> の異常増加に伴うミトコンドリア膜電位の低下が原因と考えられる。一方、上記のサイクルは全ての感染者で大なり小なり見られる現象であるが、このサイクルの僅かな回転で内皮細胞が障害され易いヒトの体質がインフルエンザ脳症患者の遺伝子多型解析から明らかになった。ウイルス感染でミトコンドリア機能不全の切っ掛けが生じるが、特に ATP 産生量の急激な低下を起しやすい遺伝子多型として、長鎖脂肪酸代謝酵素 Carnitine



palmitoyltransferase II (CPT II) の熱不安定性遺伝子多型が見つかり、重症脳症患者に集中していることが判明した。このような多型を持つ患者では、ウイルス感染による高熱時にミトコンドリアの機能障害が急速に生じ、血管内皮細胞のタイトジャンクションの崩壊が起き易い (Yao, 木戸等 *Human Mutation* 29: 718-27, 2008)。

2. 研究の目的

上記の一連の要因が多臓器不全に関与していることから、これらの因子が治療ターゲット分子と想定された。そのため治療法は、インフルエンザの感染阻止、抗サイトカイン療法、ミトコンドリア機能回復と ATP 産生増加を導く代謝改善、CPT II の転写促進による脳症及び重症化の治療法が考えられる。本プロジェクトでは、これらについて具体的な治療法の開発研究、早期重症化の診断方法の開発に取り組む。

3. 研究の方法

マウスの重症化モデル動物実験では、重症化しやすい離乳期直後の 3 週齢マウス (C57BL/6CrSlc または、BALB/c) 雌を用いて実験した。インフルエンザウイルス株によって感染重症化の程度が異なるため、重症化しやすい Influenza A/PR/8/34(H1N1) 株を用いた。

4. 研究成果

(1) 代謝不全に現れるインフルエンザ感染の重症化: インフルエンザ感染後の生体応答として各種サイトカインの誘導が感染 2-3 日目より生じ、生体防御系としての液性免疫誘導が感染 4 日目より開始されるが、代謝不全が明らかになる時期は感染 7 日目前後で、この時期から個体の死亡が開始される。マウスは感染重症化によって、全身各臓器の糖代謝、脂質代謝不全、特に Acetyl-CoA の産生に係わるエネルギー代謝不全と推定され、その標的酵素として、PDH の活性調節因子の影響が推定された。PDH 活性をリン酸化によってネガティブに調節する Pyruvate dehydrogenase 1-4 (PDK 1-4) と、脱リン酸化によって PDH 活性をポジティブに調節する、

Pyruvate Dehydrogenase phosphate phosphatase (PDP)があるが、インフルエンザ感染後 PDK4 の増加が特に著しいことが判明した(図2)。

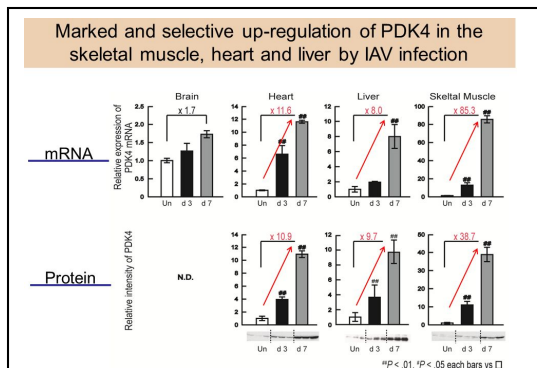


図2. インフルエンザ感染に伴う各種臓器の PDK4 の誘導効果

PDK4 は、PDH をリン酸化して PDH 活性の低下を引き起こすと同時に、ミトコンドリアでの ATP 産生の低下を引き起こす。図3に示すように、脳を除く肺、心臓、肝臓、筋肉で PDH 活性低下とほぼ平行して各臓器の ATP レベルの低下が見られた。

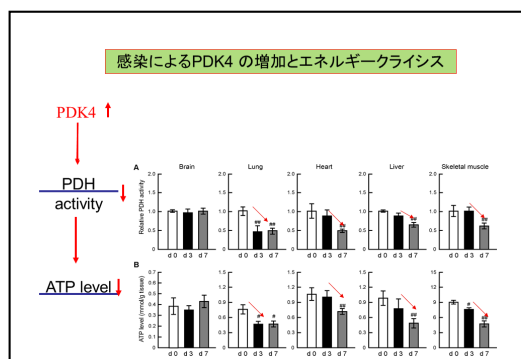


図3. PDK4 誘導に伴う各種臓器の PDH 活性と ATP レベルの低下

### (2)既存薬中に見いだされた新規 PDK4 阻害剤:

これまで PDK4 阻害剤として知られていた化合物に、副作用はあるものの古くより知られていた dichloroacetate (DCA)、その他 AZD7545、radicol 等が知られていた。我々は、従来 PDK4 阻害活性の報告の無かった diisopropylamine dichloroacetate (DADA)に DCA とほぼ同等の PDK4 阻害活性を見出した。①インフルエンザ感染重症化に対する DADA の治療効果:インフ

ルエンザ感染と同時に DADA を1日2回、1日量 50 mg/kg 投与して感染後7日目の各臓器での PDH 活性と ATP レベルを測定した。DADA 投与群では、生理食塩水投与の感染群に比べて、PDH 活性と ATP レベルは非感染群のレベルにまで回復していた(図4)。なお脳では、PDH 活性、ATP レベルに DADA は影響しなかった。

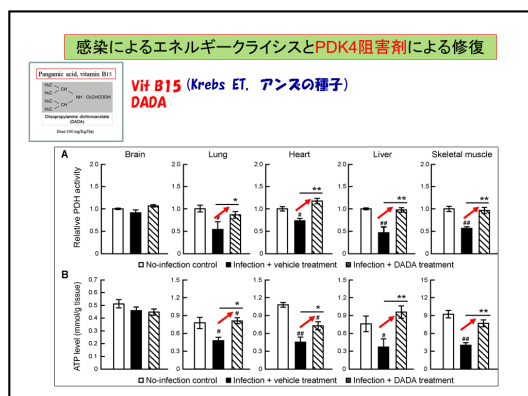


図4. PDK4 阻害剤の DADA による各種臓器の PDH 活性と ATP レベルの回復

②DADA のサイトカインストーム抑制効果: DADA の投与に伴う肺内の各種サイトカインの変動を調査した。感染2日目の TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\alpha$  はインフルエンザ感染で著明な誘導を引き起こして、サイトカインストーム状態であることが判る。一方 DADA の投与群では各種サイトカインの誘導は抑制されていた。

③DADA によるインフルエンザ サイトカイン プロテアーゼサイクルの抑制効果:初感染部位の肺の2日目、心臓、肝臓、筋肉では感染4日目で, trypsin が誘導され、ピークに至る。この条件下で, trypsin 誘導への DADA の効果を検証した。脳を除くいずれの臓器の trypsin mRNA 量も DADA の投与で有意に減少した。さらに、サイトカインとプロテアーゼレベルが低下した結果、インフルエンザウイルスの増殖抑制が明確となった。

(3) DADA の生存率改善効果:DADA の PDK4 抑制効果が生存率の改善にどのように影響するかを検証した。図5に示すように、マウスが感染

後10日目までに全例死亡する 120 pfu の致死量のウイルス感染でも、DADA の投与により半数のマウスが生存した。さらに半数致死量の 20 倍量、致死量 120 PFU の 10 倍量の高濃度ウイルス(1200 PFU)を経鼻感染させて DADA の効果を検討した。この過酷な感染条件でも DADA 単独で生存率 50%が得られた。またこの条件でヒト治療量のタミフル (10 mg/kg/day) はマウスに対して生存率 70%を示したが、タミフルの量を増やしてもさらなる効果は期待できなかった。この条件下で、タミフルと DADA を併用するとマウスの生存率は 100%を達成した。

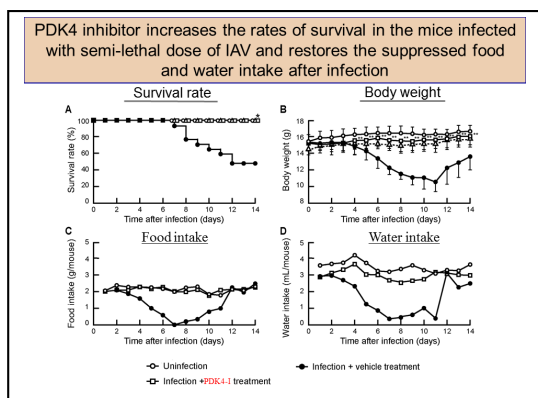


図5 . DADA によるインフルエンザ感染マウス生存率の改善効果

(4)CPT II SNP の迅速診断: CPT II の熱不安定性に係わる因子は、F352C であることから、F352C (heterozygous)、F352C (homozygous)と WT を迅速に外来で判定する方法の開発を検討した。これまでに理化学研究所では、全血を用いて DNA の抽出操作なしに 30-40 分以内に遺伝子増幅する SMART AMP システムを開発している。そこで本プロジェクトではこの迅速性と簡易性に注目して、F352C の遺伝子解析を SMART AMP システムで検討した。その結果、F352C と F352 の homozygous と heterozygous を 30-40 分以内に解析が可能であることが確認された。

(5)Flu Alarmin の検討: Flu Alarmin として Lactate/ATP 比が有用であることがマウスの実験系で確認された。

以上の結果から、図 6 に示すように、インフ

ルエンザ感染の重症化は、エネルギー代謝不全を原因とする代謝不全状態で、代謝不全の改善により治療できることが判明した。

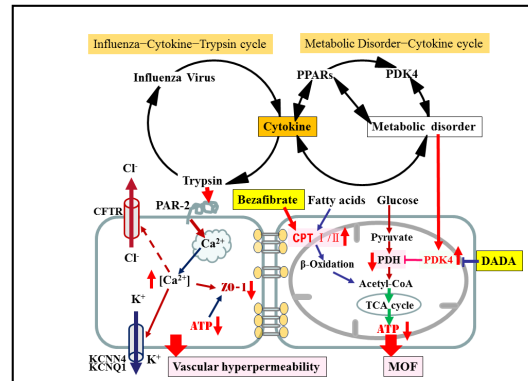


図 6 . 感染重症化のカスケードを構成する “インフルエンザ-サイトカイン-プロテアーゼ” サイクルに共役した “サイトカイン-代謝不全” サイクル

### (6)急性脳症における血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクションの崩壊機序:インフルエンザ

に感染させたヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)で VE カドヘリンと複合体を形成する カテニンが著明に減少することで、Tight junction 以外にアドヘレンスジャンクションが崩壊することが、多臓器不全に伴う血管内皮細胞の透過性の亢進の原因になっていることが明らかとなった。その機序として、IAV 感染によって GSK-3 が活性化され、その結果 カテニンのプロテアソームによる分解が亢進され、最終的に VE カドヘリン-カテニンの結合崩壊が起きる一連の機序が明らかになった。以上のことから、IAV 感染による多臓器不全の治療薬として、GSK-3 の阻害剤が新たな創薬ターゲットになり得ると推定された。

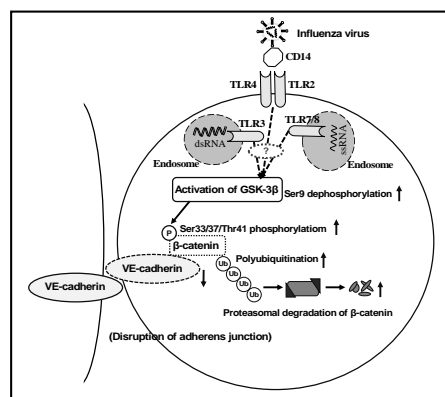


図 7 . IAV 感染による血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクションの崩壊機序

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 25 件 )

Min Yao, Min Cai, Dengfu Yao, Xi Xu, Rongrong Yang, Yuting Li, Yuanyuan Zhang, Hiroshi Kido, Dengbing Yao. Abbreviated half-lives and impaired fuel utilization in carnitine palmitoyltransferase II variant fibroblasts. *PLoS ONE*, 2015; 10(3), e0119936. DOI: 10.1371/journal.pone.0119936. 査読有

Mineyoshi Hiyoshi, Irene L Indalao, Mihiro Yana, Kazuhiko Yamane, Etsuhisa Takahashi, Hiroshi Kido. Influenza A virus infection of vascular endothelial cells induces GSK-3 $\beta$ -mediated  $\beta$ -catenin degradation in adherens junctions, with a resultant increase in membrane permeability. *Arch Virol* 2015; 160: 225-234. DOI: 10.1007/s00705-014-2270-5. 査読有

Hai-Yan Pan, Hua-Mei Sun, Lu-Jing Xue, Min Pan, Yi-Ping Wang, Hiroshi Kido, Jian-Hua Zhu. Ectopic trypsin in the myocardium promotes dilated cardiomyopathy after influenza A virus infection. *Am J Physiol Circ Physiol* 2014; 307: H922-H932. DOI: 10.1152/ajpheart.00076.2014. 査読有

Yamane K, Indalao IL, Yamamoto Y, Hanawa M, Kido H. Diisopropylamine dichloroacetate, a novel pyruvate dehydrogenase kinase 4 inhibitor, as a potential therapeutic agent for multiorgan failure in severe influenza. *PLoS ONE*, 2014; 9(5): e98032. DOI: 10.1371/journal.pone.0098032. 査読有

Chida J, Kido H. Extraction and quantification of adenosine triphosphate in mammalian tissues and cells. *Methods Mol Biol*, 2014; 1098(1): 21-32. DOI: 10.1007/978-1-62703-718-1\_2. 査読有

Shinohara W, Takahashi E, Sawabuchi T,

Arai M, Hirotsu N, Kido H.

Immunomodulator clarithromycin enhances mucosal and systemic immune responses and reduces re-infection rate in pediatric patients with influenza treated with antiviral neuraminidase inhibitors: A retrospective analysis. *PLoS ONE*, 2013; 8(7), e70060. DOI: 10.1371/journal.pone.0070060. 査読有

Shoji M, Takahashi E, Hatakeyama D, Iwai Y, Morita Y, Shirayama R, Echigo N, Kido H, Nakamura S, Mashino T, Okutani T, Kuzuhara T. Anti-Influenza Activity of C60 Fullerene Derivatives, *PLoS ONE*, 2013; 8(6): e66337. DOI: 10.1371/annotation/3e6e3fb0-e52f-4a6d-8ea2-34de4147b64f. 査読有

Chida J, Ono R, Yamane K, Hiyoshi M, Nishimura M, Onodera M, Nakataki E, Matushita M, Kido H. Blood Lactate/ATP Ratio, as an Alarm Index and Real-Time Biomarker in Critical Illness. *PLoS ONE*, 2013; 8(4), e60561. DOI: 10.1371/journal.pone.0060561. 査読有

Kimoto T, Mizuno D, Takei T, Kunimi T, Ono S, Sakai S, Kido H. Intranasal influenza vaccination using a new synthetic mucosal adjuvant SF-10 -Induction of potent local and systemic immunity with balanced Th1 and Th2 responses. *Influenza and Other Resp. Viruses*, 2013; 7(6): 1218-1226. doi:10.1111/irv.12124. DOI: 10.1111/irv.12124. 査読有

Takahashi E, Kataoka K, Indalao IL, Konoha K, Fujii K, Chida J, Mizuno D, Fijihashi K, Kido H. 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. *J. Virol.* 86(20):10924-10934, 2012. DOI: 10.1128/JVI.01207-12. 査読有

Kubota M, Chida J, Hoshino H, Kashii H, Ozawa H, Koide A, Hoshino A, Koyama A, Mizuno Y, Yamaguchi M, Yao D, Yao M, Kido H. Thermolabile CPT II variants and low blood ATP levels are closely related to severity of acute encephalopathy in Japanese children. *Brain Dev* 34(1):20-27, 2012. DOI: 10.1016/j.braindev.2010.12.012. 査読有

Fujimoto C, Takeda N, Matsunaga A, Sawada A, Tanaka T, Kimoto T, Shinahara W, Sawabuchi T, Yamaguchi M, Hayama M, Yanagawa H, Yano M, Kido H. Induction and maintenance of anti-influenza antigen-specific nasal secretory IgA levels and serum IgG levels after influenza infection in adults. *Influenza Other Respi Viruses* 6(6):396-403, 2012. DOI: 10.1111/j.1750-2659.2011.00330.x. 査読有

〔学会発表〕(計 18 件)

Indalao IL, Yanmane K, Kido H. PDK4 inhibitor suppresses cytokine storm and multiple organ failure induced by lethal doses of influenza A virus infection through restoration of energy metabolic disorder. 第 87 回日本生化学会大会。平成 26 年 10 月 15 日 10 月 18 日「京都国際会議場(京都府、京都市)」

Indalao IL, Yanmane K, Kido H. インフルエンザウイルスの体内複製を増強する trypsin の臓器内発現量は「代謝障害 サイトカイン」サイクルの調節下にある:PDK4 阻害剤の有効性 第 19 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会。平成 26 年 8 月 8 日 8 月 9

日「千里ライフサイエンスセンター(大阪府、豊中市)」

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木戸 博 (KIDO Hiroshi)  
徳島大学・疾患酵素学研究センター・特任教授  
研究者番号：50144978

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

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：10437651

水野 大 (MIZUNO Dai)  
徳島大学・疾患酵素学研究センター・助教  
研究者番号：70380061