

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670466

研究課題名(和文) インフルエンザ感染重症化バイオマーカーFlu Alarminの検索と実証研究

研究課題名(英文) Screening of Flu Alarmin biomarkers of severe influenza virus infection and their confirmation in animal model

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザ感染が重症化する患者では、エネルギー代謝破綻が直接的、間接的原因である。検索した各種バイオマーカーの中で、乳酸/ATP値が感染重症度を的確に示すことを、動物実験と臨床検体の測定から明らかにした。さらに、インフルエンザ脳症の発症リスク因子として脂肪酸代謝酵素のcarnitine palmitoyltransferase 11の熱不安定性遺伝子多型が関与していることを明らかにしてきた。このプロジェクトでは、SmartAmpを用いて30分以内にこの多型の保有者を判定できるシステムを開発した。

研究成果の概要(英文)：Influenza A virus (IAV) causes significant morbidity and mortality. We found that energy metabolic disorder is a principal cause of multiorgan failure in severe influenza virus infection. Among the analyzed biomarkers in the blood, lactate/ATP ratio is a useful and prognostic biomarker of the disease severity in animal model and clinical data. In addition, 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：病態医化学研究

キーワード：重症度 ATP 乳酸 リアルタイム・バイオマーカー エネルギー代謝 代謝障害 予後判定 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

病原性の異なるインフルエンザウイルス株(インフルエンザ(H1N1)2009、病原性に強いPR8(H1N1)株、神経向性を示す WSN(H1N1)株、高病原性鳥インフルエンザ H5N1 株、香港カゼ Aichi(H3N2)株)を用いたこれまでの動物実験から、病原性を決める2群の重要宿主因子が明らかになってきた。1群は1)自然免疫、獲得免疫系の発動に關与する生体防御シグナルで、I型インターフェロン群、他は2)炎症性サイトカインが誘発する様々な代謝応答カスケード SOS シグナルである。重症化は、上記の2つの要因によって体内代謝の破綻が進行し、細胞機能障害が極まった結果であることをこれまでに明らかにしてきた (*J. Infect. Dis.* 2010; 202:991-1001; *Cardiovasc. Res.* 2011; 89:595-603. *J. Virol.* 2012; 86:10924-10934.)以上の背景から、インフルエンザ感染重症化への SOS シグナルとしての「Flu Alarmin」を検索し、重症化への限界値 (Critical Value) を想定する。国際的には、重症化の機序の解明、特に体内代謝を背景とした解析は重要と認識されているが、研究の実施可能な機関はほとんど無い現状である。当研究室は、我が国唯一の酵素学研究拠点であると共に、国際的にも酵素学と代謝学の両方をカバーし、得意とするユニークな研究拠点で、この領域研究のパイオニアを任じており、これらを背景として本プロジェクトを実施する。

2. 研究の目的

インフルエンザは毎年流行を繰り返す、人口の5~10%が罹患するが重症化で死亡する人は通常で罹患者の0.03%以下である。重症化は、血管内皮の透過性亢進による末梢循環不全・多臓器不全を伴うウイルスと体内因子の相互作用の結果と推定される。そのため重症化に先立って生体が発信する危険信号・SOS 物質群を「Flu Alarmin」として仮称して、採取可能な患者の気道分泌液と血液を検索し、モデル動物で Alarmin と重症化の因果関係を検証し、重症度

のスコア判定を実施する。Flu Alarmin を、1)生体防御シグナル、2)代謝応答シグナル:気道粘膜上皮細胞 Alarmin、血管内皮細胞 Alarmin、臓器代謝 Alarmin に分類して検索・実証検分する。Flu Alarmin を新規バイオマーカーとして世界に先駆けて発信し、重症化バイオマーカーの標準化に貢献することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

インフルエンザに罹患した患者が出す SOS シグナルの「Flu Alarmin」の検索を(1)感染気道上皮細胞が放出する物質群、(2)血管内皮細胞とその周囲組織が放出する物質群、(3)臓器の代謝不全シグナル物質群に分けて解析する。一方、「Flu Alarmin」の重症度スコア判定は、代謝障害性の強い PR8 株、神経向性の強い WSN 株、弱毒株の Aich 株の3株を、種々のドーズ経鼻投与して、重症化の程度と上記「Flu Alarmin」と重症度との関係をスコア化して評価する。さらに、インフルエンザ脳症の発症リスク因子として脂肪酸代謝酵素の carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) の熱不安定性遺伝子多型が關与していることを明らかにしてきたことから、ベットサイドで測定可能な新規測定装置の研究開発として、SmartAmp 法を用いた迅速診断法を検討する。

4. 研究成果

(1) エネルギー代謝不全として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重症化は、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る。糖代謝では図1に示すように、インフルエンザ感染後著明な PDK4 の増加が起こり、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。感染マウスでは、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。各臓器の糖代謝不全は、血液中では Lactate の増加と血球中の ATP

レベルの低下となって現れる。そのため、糖代謝の中間代謝産物の Lactate の蓄積は糖がミトコンドリアで代謝されていない事を示し、糖代謝の最終産物である ATP と組み合わせて、Lactate/ATP 比 (ATP lactate energy risk score: ALES 値) を取ると、極めて敏感の糖のエネルギー代謝の状態を反映している事を見出した。

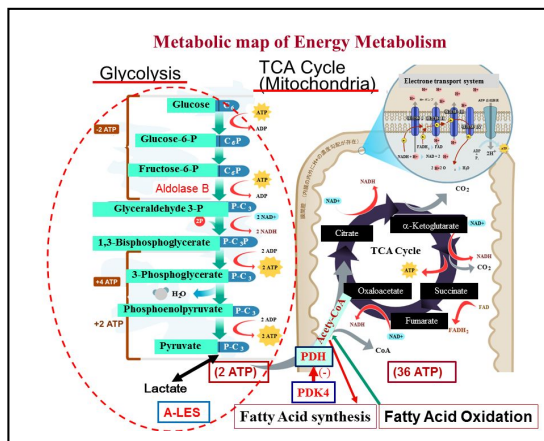


図1. 糖代謝とミトコンドリアでのエネルギー産生系

(2) Lactate/ATP 比は重症度を示すリアルタイムバイオマーカーである：血液中の Lactate/ATP 比はインフルエンザ感染以外にも各種感染症患者の重症度と予後を的確に示す。ICU 入室患者で予後が悪い代表疾患として敗血症がある。この疾患は、感染症に伴う多臓器不全を来す死亡率の高い疾患である。基礎疾患として感染症を有する患者で生存患者(17人)と死亡患者(4人)を比較したところ、敗血症患者では非敗血症患者より血液の ATP 値は低いレベルで経過した。これを ALES 値で評価すると、ALES 値は死亡患者で有意に高値であった。感染症患者での予後判定予測を従来から用いられている APACHE II スコア、ATP、A-LES で比較すると曲線下の面積は APACHE II 0.801、ATP(ヘモグロビン補正)0.279、ALES 値 0.941 で、ALES 値が最も高く、予後の予測においては従来の APACHE II スコアに比べて有意に良い値をしめした。(図2)。

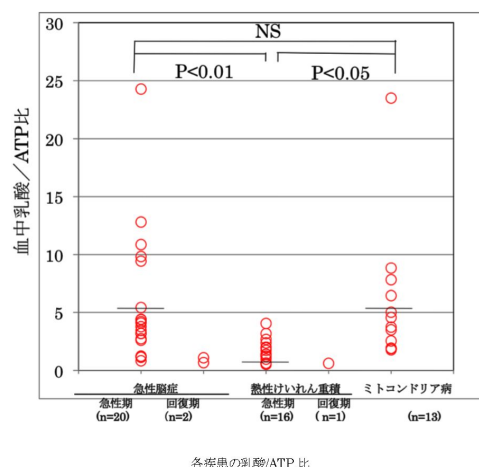


図2. 各疾患における lactate/ATP 比(ALES 値)

(3) ALES 値はインフルエンザ脳症の鑑別診断、予後予測に有用である：インフルエンザ脳症と熱性痙攣重責患者の急性期と回復期の ALES 値、及びミトコンドリア病(先天性の酵素欠損症)患者の ALES 値を示す。インフルエンザ脳症と熱性痙攣重責患者では、痙攣症状が類似しているため鑑別診断が困難であるが、この鑑別診断に ALES 値の測定が有用であることが判明した。インフルエンザ脳症患者では、下記に示す熱不安定性 CPT II SNPs によって、高熱下に後天性の CPT II 酵素欠損状態になるが、これらの患者が示す ALES 値と、先天性に酵素欠損状態であるミトコンドリア病患者の ALES 値を図3で比較している。高熱下に後天性の CPT II 酵素欠損状態になるインフルエンザ脳症患者の ALES 値のレベルは、先天性酵素欠損状態であるミトコンドリア病患者の ALES 値とほぼ同程度にまで上昇していることが判る。一方、高熱下でも熱失活する素因を持たない熱性痙攣重責患者の ALES 値は、インフルエンザ脳症を含む急性脳症患者やミトコンドリア病患者の ALES 値に比較して有意に低値を示した。

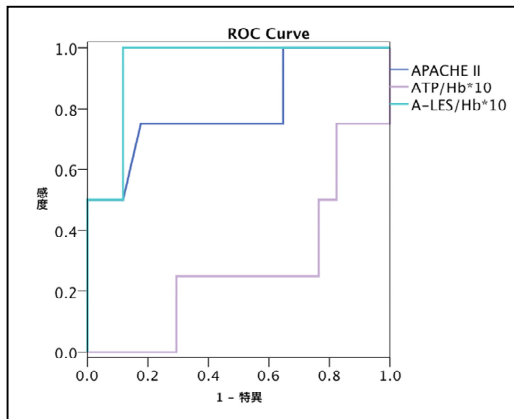


図3 . ICU に入院している感染症患者の ROC 曲線

(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、図4に示すように、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。

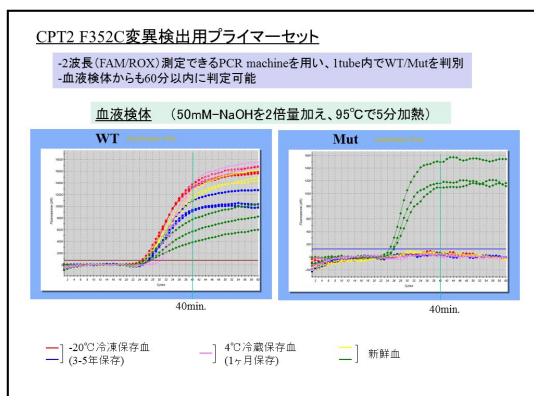


図4 . SMART AMP を用いた熱不安定性 CPT II SNPs の迅速診断システム

5 . 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計5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 β -mediated β -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

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:

10.1038/cddis.2013.550. 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

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

〔学会発表〕(計2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)」

木戸博 インフルエンザ感染の重症化とその予防と治療: 恩師と歩んだプロテアーゼの病態代謝研究。平成 26 年 11 月 14 日「徳島大学藤井節郎記念医科学センター(徳島県、徳島市)」

〔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

()