

図1 (循環動態)

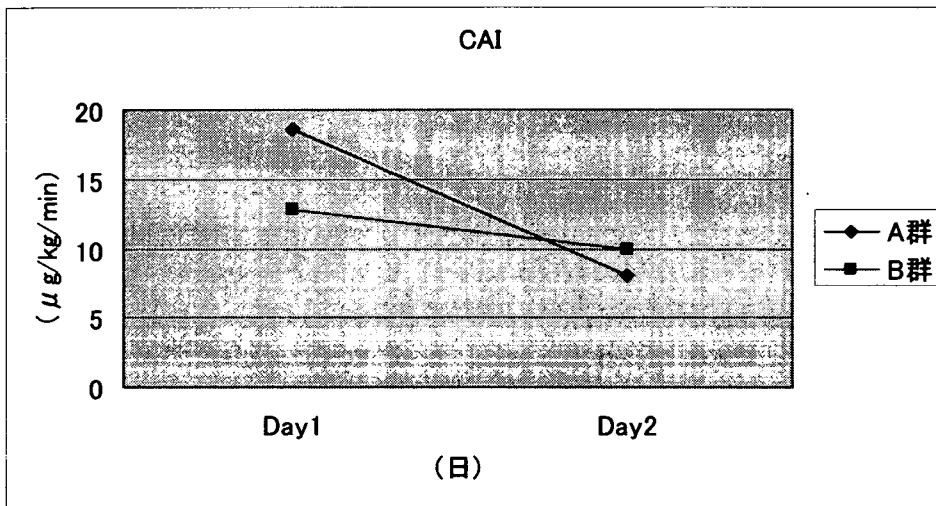
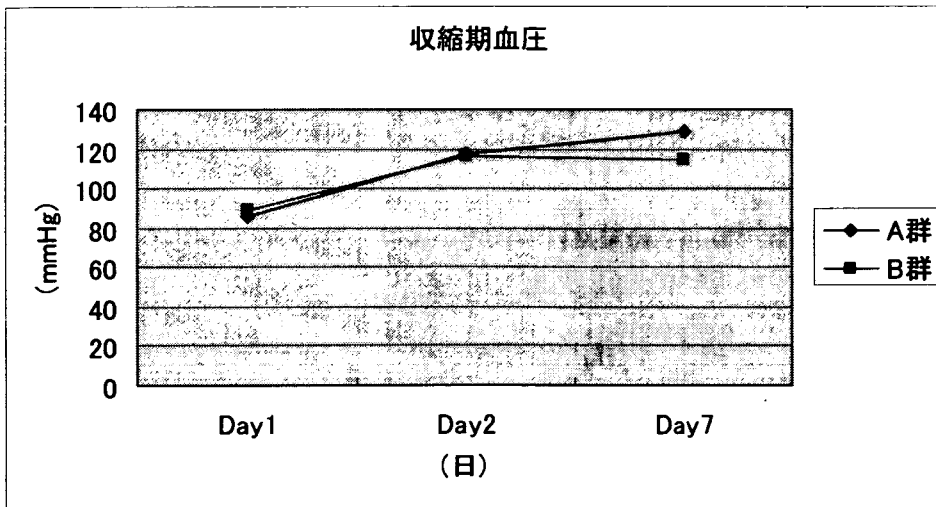


表1

	PMX-DHP あり群(A 群) n=9	PMX-DHP なし群(B 群) n=19	
施行時間 (hr)	24:35±21:20	—	
性別(男:女)	7:2	16:3	NS
年齢(yrs±SD)	64.6±8.1	65.2±10.3	NS
APACHE II score	29.1±7.1	28.3±6.9	NS

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 磯部和順、秦 美暢、杉野圭史、佐野 剛、高井雄二郎、木村一博、長谷川千花子、笹本修一、高木啓吾、本間 栄：間質性肺炎合併肺癌における治療後急性増悪の検討. 肺癌 47: 849-854, 2007
- 2) 本間 栄：NACによるIPF治療：抗酸化薬の効果と臨床試験. 分子呼吸器病 11: 10-15, 2007
- 3) 坂本 晋、本間 栄：高齢者肺線維症の特徴と維持管理. 呼吸器科 12: 515-521, 2007
- 4) 山口恵三、館田一博、中森祥隆、柴山明義、岩田 敏、松原啓太、荘司 路、本間 栄、佐野 剛、村上日奈子、濱崎雄平、田代克弥、林真一郎、永沢善三、泉 信有、仲 剛、土志田健、蝶名林直彦、内山 伸、杉浦秀子：LAMP法を用いた *Mycoplasma pneumoniae* と *Legionella spp.*による呼吸器感染症の迅速診断試薬の評価. 医学と薬学 58: 565-571, 2007
- 5) 宮本 篤、本間 栄 (分担)：気管支内視鏡検査. 呼吸器専門医テキスト (工藤翔二、中田紘一郎、永井厚志、太田 健編) p102-106. 南江堂, 東京, 2007
- 6) 本間 栄、山崎陽子、杉野圭史、佐野 剛、吉村邦彦、吾妻安良太、工藤翔二：早期特発性肺線維症に対する N-アセチルシステイン吸入療法に関する前向き多施設共同治療研究. 厚生労働科学研究「特発性肺線維症の予後改善を目指したサイクロスポリン+ステロイド療法ならびに N-アセチルシステイン吸入療法に関する臨床研究」班平成 18 年度研究報告書, p49-51, 2007
- 7) 杉野圭史、山崎陽子、菊池 直、榎本崇宏、佐野 剛、磯部和順、濱中伸介、高井雄二郎、清水邦彦、木村一博、本間 栄：特発性肺線維症に対する N-アセチルシステイン短期吸入療法の有用性に関する臨床的検討. 厚生労働科学研究「特発性肺線維症の予後改善を目指したサイクロスポリンならびに N-アセチルシステイン吸入療法に関する臨床研究」班平成 18 年度研究報告書, p52-56, 2007
- 8) 杉野圭史、蛇澤 晶、本間 栄：肉眼的再構築を含む病理学的検討を行い得た Stevens-Johnson 症候群合併閉塞性細気管支炎. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業びまん性肺疾患に関する調査研究班平成 18 年度研究報告書, p224-230, 2007
- 9) 土方美奈子、松下育美、大橋 順、徳永勝士、本間 栄、田口善夫、吾妻安良太、工藤翔二、慶長直人：びまん性汎細気管支炎の疾患感受性遺伝子研究.. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業びまん性肺疾患に関する調査研究班平成 18 年度研究報告書, p211-214, 2007

### 2. 学会発表

1. ○本間 栄：閉塞性細気管支炎症候群：オーバービュー (臨床から). 第 47 回日本呼吸器学会総会特別シンポジウム, 東京, 2007.5
2. ○本間 栄：「特発性肺線維症」治療における呼吸機能の評価法. 第 47 回日本呼吸器学会総会シンポジウム, 東京, 2007.5
3. ○菊池 直、杉野圭史、山崎陽子、榎本崇宏、佐藤大輔、佐野 剛、草野恵美子、磯部和順、濱中伸介、高井雄二郎、清水邦彦、木村一博、本間 栄、鈴木康紀、酒井 謙、長谷川千花子、渋谷和俊：びまん性肺出血と急速進行性糸球体腎炎を併発した Churg-Strauss 症候群の 1 例. 第 173 回日本呼吸器学会関東地方会, 東京, 2007.2
4. ○山崎陽子、杉野圭史、菊池 直、榎本崇宏、阪口真之、佐藤大輔、佐野 剛、草野英美子、磯部和順、濱中伸介、高井雄二郎、木村一博、福森和彦、高木啓吾、森田あや子、渋谷和俊、本間 栄：ステロイド抵抗性でシクロスポリン A の併用が有効であった多発性筋炎合併 fibrotic NSIP の 1 例. 第 174 回日本呼吸器学会関東地方会, 東京, 2007.4
5. ○宮本 篤、本間 栄、高谷久史、石田文昭、坂本 晋、川畑雅照、岸 一馬、坪井永保、藤井丈士、黒崎敦子、吉村邦彦：上葉優位型間質性肺炎の臨床病理学的検討. 第 47 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2007.5
6. ○廣田 直、秦 美暢、杉野圭史、榎本崇宏、佐藤大輔、笹尾健一郎、坪田貴也、吉原克則、本間 栄、本間 栄：ALI/ARDS に対するシベスタットナトリウム投与例における併用療法についての検討. 第 47 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2007.5
7. ○山崎陽子、杉野圭史、菊池 直、榎本崇宏、佐藤大輔、佐野 剛、草野英美子、磯部和順、濱中伸介、高井雄二郎、清水邦彦、木村一博、本間 栄：特発性肺線維症に対する NAC 吸入療法の臨床学的検討. 第 47 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2007.5
8. ○磯部和順、山崎陽子、杉野圭史、菊池 直、榎本崇宏、佐野 剛、杉野圭史、草野英美子、濱中伸介、高井雄二郎、清水邦彦、木村一博、本間 栄：間質性肺炎(IP)合併肺癌における治療後急性増悪の検討. 第 47 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2007.5
9. ○秦 美暢、杉野圭史、笹尾健一郎、濱中伸介、笹本修一、田巻一義、福森和彦、大塚 創、廣田 直、長谷川千花子、渋谷和俊、本間 栄、高木啓吾：RA 合併 UIP の肺癌術後急性増悪に対する PMX 併用分画血漿交換療法. 第 47 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2007.5
10. ○伊藤貴文、草野英美子、阪口真之、太田宏樹、後町杏子、山崎陽子、宮崎泰斗、佐藤大輔、佐野 剛、磯部和順、坂本 晋、高井雄二郎、木村一博、本間 栄、川合眞一、秦 美暢、渋谷和俊：ステロイド・シクロスポリン・ガンマグロブリン大量療法の併用が有効であった

抗 PL-7 抗体陽性多発性筋炎による fibrotic NSIP の 1 例. 第 175 回日本呼吸器学会関東地方会, 東京, 2007.7

11. ○磯部和順、阪口真之、石田文昭、佐藤大輔、宮崎泰斗、佐野 剛、杉野圭史、草野英美子、坂本 晋、高井雄二郎、本間 栄: 間質性肺炎に合併した肺小細胞癌の臨床的検討. 癌治療学会, 東京, 2007.

12. ○杉野圭史、太田宏樹、山崎陽子、石田文昭、佐野 剛、磯部和順、坂本 晋、高井雄二郎、本間 栄: 肺高血圧症を合併した特発性肺線維症の臨床的検討. 第 17 回日本呼吸ケア・リハビリテーション学会学術集会, 東京, 2007.11

13. ○ Sugino K, Yamazaki Y, Kikuchi N, Enomoto T, Sano G, Isobe K, Homma S: Assesment of clinical efficacy of inhaled N-acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. 2007 American Thoracic Society International Conference San Francisco USA, 2007.5

14. ○Isobe K, Sano G, Sugino K, Yamazaki Y, Kikuchi N, Enomoto T, Kusano E, Hamanaka S, Takai Y, Shimizu K, Kimura K, Homma S: The

usefulness of FDG-PET for diagnosing lung cancer associated with pulmonary fibrosis. 2007 American Thoracic Society International Conference San Francisco USA, 2007.5

15. ○Sugino K, Kaburaki K, Gocho K, Iwata M, Yamazaki Y, Ishida F, Miyazaki T, Sato D, Sakaguchi S, Sano G, Kusano E, Isobe K, Sakamoto S, Takai Y, Shibuya K, Uekusa T, Homma S: Clinicopathological characteristics of lung injury caused by radiotherapy for breast cancer. 4<sup>th</sup> International WASOG Conference Tokyo, 2007.10

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

## インフルエンザ誘導の急性肺障害機構の解析

分担研究者：鈴木和男 千葉大学大学院医学研究院 特任教授

分担研究者：大島正道 国立感染症研究所 室長

分担研究者：山本健二 国立国際医療センター国際医療臨床研究センター長

（研究協力者：長尾朋和 千葉大学大学院医学研究院 特任講師）

（研究協力者：山本紀一 国立感染症研究所 協力研究員）

**研究要旨：**鳥インフルエンザ(H5N1)によって短期間で誘発される重症の急性呼吸障害（ARDS:急性呼吸窮迫症候群）の病態解析はほとんど進んでいない。最近になって、*in vitro*、*ex vivo*でのインフルエンザウイルスたんぱくの変異と感染の関係についての解析がされてきているが、ARDSの誘発機構の解明は緒についたばかりである。本研究では、まず、マウス馴化インフルエンザウイルス PR8 株によって誘導される劇症肺炎についてサイトカインレベルを中心に検討した。また、PR8 誘発のサイトカイン誘導に関与する遺伝子についても検討した。さらに、臓器の組織切片を作成し、肺、肝臓、腎臓、脾臓に対する組織学的な影響を調べた。

### A. 研究目的

インフルエンザ(H5N1)は、ベトナムやインドネシアをはじめ、東南アジアを中心にひろがり世界の脅威になっている。インフルエンザ(H5N1)は、これまでのインフルエンザにはない病態を示し、タイをはじめとするインフルエンザ(H5N1)陽性肺炎患者で死亡した病理解剖所見から肺にはウイルスは検出できず、極度のARDSによって呼吸不全になったことが報告されている(Human Pathol, 2005)。また、ベトナムのケースでは、かなり初期段階の病態での死亡例がある(NEJM, 2005)。また、ごく最近われわれの病理解析から肺胞上皮細胞と血管内皮細胞に H5N1 ウイルスを確認している(Jpn J Infect. Dis, 2008)。

その病態から、肺でのウイルス増殖が関与して、劇症型の ARDS が誘発されたことが主な

死因となっていると推定される。これらの事実は、インフルエンザ(H5N1)感染によって病初期の急速に誘導される ARDS 進行には、季節インフルエンザとは異なり、爆発的なサイトカインストームに続く好中球・マクロファージ浸潤を類推させる。これらの現象をマウスの実験によって解明することが重要であるが、インフルエンザ H5N1 ウイルスを使用した実験は許諾されない（関係部署談）ことから、PR8 インフルエンザウイルスにて劇症型を作製し、サイトカインストームとその産生機構にかかわる因子を特定することを検討した。

本年度は、動物実験を開始するにあたり、ハノイの国立病院（国立熱帯病・感染症研究所、国立小児病院）を訪問し、臨床データを調べることに主眼を置き、そのデータをもとに、基礎的観点から劇症型 ARDS モデル動物を PR8 株

により作製することを検討するとともに、サイトカインストーム解析、サイトカイン産生細胞の解析法の確立を目的とした。

## B. 研究方法

### 1) マウスを用いた PR-8 株感染：

インフルエンザ PR-8 株 1.5LD<sub>50</sub> を鼻腔から Balb/c(8 週齢、メス)に、投与・感染させ、死亡率およびサイトカインレベルを解析した。

### 2) サイトカインレベルの解析：

感染後に採取した血漿および BALF を Triton X-100 でウイルスを不活性化し、サイトカイン・ケモカインを Bio-Plex™ Cytokine Assays (Bio-RAD, USA) により、IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, KC, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, MCP-1(MCAF), MIP-1β, TNF-α などのサイトカイン類を測定した。

### 3) 炎症関連遺伝子の mRNA レベル：

IFN-γ によって上皮細胞に誘導される DUOX2 の発現の条件をインフルエンザ PR-8 株投与直後に BALF および肺組織を固定して条件検討し、同時に、各種サイトカインの mRNA の発現条件を検討した。

### 4) 炎症時の組織傷害の検討

肺臓器の組織切片を作成し、肺、肝臓、腎臓、脾臓に対する組織学的な影響を調べた。

## C. 研究結果

本年度は、ハノイの国立3病院(国立熱帯病・感染症研究所、国立小児病院)を訪問した際の ARDS を主としたインフルエンザ患者の臨床データを調べることに主眼を置き(臨床班参照)、そのデータをもとに、劇症型 ARDS モデル動物を PR8 株により作製することを検討するとともに、サイトカイン産生細胞の解析法を検討した。

### 1) PR-8 株感染：

インフルエンザ PR-8 株の投与により、予定

のタイムコースで死亡し、投与による有効性が確認できた。本結果より、high dose による急性の反応を解析できる条件が求められた。

### 2) サイトカインレベルの解析：

感染後に採取した血漿および BALF 中のサイトカイン・ケモカインの変化は、Bio-Plex™ Cytokine Assays にて行い、IL-1β, IL-6, KC, IL-10, IL-12p70, IL-13, G-CSF, GM-CSF, MCP-1, MIP-1, TNF-α などの変動が見られたが、特徴的なサイトカインの変動は見られなかった。次年度は、感染条件などの検討により重要サイトカインを特定する。

### 3) 炎症関連遺伝子の mRNA レベル：

IFN-γ によって上皮細胞に誘導される DUOX2 の発現の条件をインフルエンザ PR-8 株投与直後の BALF および肺組織を用いて条件検討し、マウス肺における発現を確認できた(図1)。他の各種サイトカインの mRNA の発現条件は解析中である。

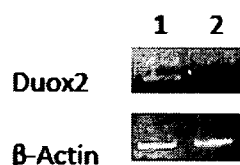


図1. インフルエンザ PR-8 株投与直後の肺組織の DUOX2 の発現。

## D. 考案

本年度は、ハノイの国立病院(国立熱帯病・感染症研究所、国立小児病院)を訪問した際の臨床データでは、インフルエンザ(H5N1)による病初期では急速に誘導される ARDS 進行によって初期段階の病態での死亡例がある。その病態から、肺でのウイルス増殖の関与が、劇症型の ARDS を誘発されたことが主な死因となっていることが推定される。この ARDS 進行には、爆発的なサイトカインストームに続く好中球・マクロファージ浸潤を類推させている。

この病態を H5N1 ウイルス感染によって解析する予定であったが、インフルエンザ H5N1 の使用は許諾されなかったため、PR8 インフルエンザにて劇症型の作製を試み、サイトカインストームとその産生機構にかかわる因子について検討した。

1) PR-8 株感染：インフルエンザ PR-8 株投与により、予定のタイムコースで死亡し、投与による有効性が確認できた。本結果より、high dose による急性の反応を解析できる条件が求められた。次年度以後の本実験が可能になった。

2) サイトカインレベルの解析：感染後に採取した血漿および BALF 中のサイトカイン・ケモカインの変化は見られたが、特徴的なサイトカインの変動は見られなかった。次年度は、感染条件などの検討により重要サイトカインを特定する。

3) 炎症関連遺伝子の mRNA レベル：IFN- $\gamma$  によって上皮細胞に誘導される DUOX2 の発現 (図2) の条件をインフルエンザ PR-8 株投与直後の BALF および肺組織を用いて条件検討し、マウス肺における発現を確認できた。

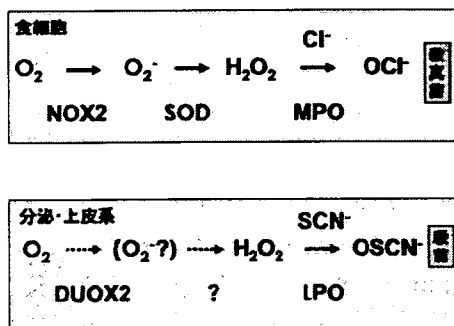


図2. 上皮細胞に誘導される DUOX2 の役割。

以上から、劇症型 ARDS のモデルの構築とその病態におけるサイトカイン発現およびそれに関連した分子の発現状態の解析条件を検討できた。次年度以後、劇症型 ARDS のモデルを用いて、発症機構に関与する分子の特定が可能となった。

## E. 結論

本年度は、ハノイの国立病院臨床データを調べることに主眼を置き、そのデータをもとに、PR8 インフルエンザ誘導の劇症型の作製を試み、サイトカインストームとその産生機構にかかわる因子を特定することを検討した。1) インフルエンザ PR-8 株の投与により、予定のタイムコースで死亡し、投与による有効性が確認できた。本結果より、high dose による急性の反応を解析できる条件が求められた。2) 感染後に採取した血漿および BALF 中のサイトカイン・ケモカインの変化は見られたが、特徴的なサイトカインの変動は見られなかった。

3) DUOX2 の発現条件をインフルエンザ PR-8 株投与直後の BALF および肺組織を用いて条件検討し、マウス肺における発現を確認できた。

以上から、劇症型 ARDS のモデルの構築とその病態におけるサイトカイン発現およびそれに関連した分子の発現状態の解析条件を検討でき、発症機構に関与する分子の特定の準備が整った。

## G. 研究発表

### 論文発表

1. H. Yasuda, N. Yoshizawa, M. Kimura, M. Shigematsu, S. Kawachi, M. Oshima, K. Yamamoto and K. Suzuki. Preparedness for the Spread of Influenza: Prohibition of Traffic, School Closure, and Vaccination of Children in the Commuter Towns of Tokyo. J. Urban Health. in press, 2008.
2. N. T. Liem, N. Nakajima, L. P. Phat, Y. Sato, H. N. Thach, P.V.Hung, L. T. San, H. Katano, T. Kumasaka, T. Oka, S. Kawachi, T. Matsushita, T. Sata, K. Kudo and K. Suzuki. H5N1-infected cells in lung with diffuse alveolar damage in exudative phase from a fatal case in Vietnam. Jpn. J. of Infectious Dis. in press, 2008.
3. K. Nakamura, K. Suzuki et al. Deoxynucleic acids from *Cryptococcus*

*neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. J. Immunol., in press, 2008.

4. K. Suzuki, et al. Analysis of risk epitopes of anti-neutrophil antibody MPO-ANCA in vasculitis in Japan population. Microbiol. Immunol. 51: 1215-1220, 2007.
5. M. Goedken, et al. Impact of two novel mutations on the structure and function of human myeloperoxidase. J. Biol. Chem. 282:27994-8003, 2007.
6. T. Nagao, et al. Up-regulation of adhesion molecule expression in glomerular endothelial cells by anti-myeloperoxidase antibody. Nephrol. Dialysis Transplant. 22: 77-87, 2007.

#### 邦文誌、著書

1. 鈴木和男、河内正治 特集「ARDSとインフルエンザ呼吸器不全の病態と発症機構」 「はじめに」 医学のあゆみ 225 巻 11 号 (2008 年 3 月 15 日号)
2. 鈴木和男 特集「ARDSとインフルエンザ呼吸器不全の病態と発症機構」 「インフルエンザによる呼吸器不全に関する Peroxidase ファミリー」 医学のあゆみ 225 巻 11 号 (2008 年 3 月 15 日号)
3. 安田英典、鈴木和男 特集「ARDSとインフルエンザ呼吸器不全の病態と発症機構」 「インフルエンザの拡大シミュレーション」 医学のあゆみ 225 巻 11 号 (2008 年 3 月 15 日号)
4. 鈴木和男 血管炎の病態と好中球 臨床検査 51 巻 1071-1080, 2007
5. 安田英典、鈴木和男 「感染症伝播のシミュレーション」 生体防御医学辞典 (鈴木和男 監修、朝倉書店) pp76-80, 2007
6. 鈴木和男 「好中球の機能調節」 生体防御医学辞典 (鈴木和男 監修、朝倉書店) 164-169, 2007

#### 学会発表

##### 国際会議

1. K. Suzuki. Molecular Events on Damage of Glomerular Endothelial Cells bound with MPO-ANCA, International Symposium on Primary Systemic Vasculitis, September 29, 2007, Tokyo
2. Kazuo Suzuki. Trace of Myeloperoxidase (MPO) in Vasculitis Development. The 2nd Asian Meeting on Synchrotron Radiation Biomedical Imaging. November 23-25, 2007, Jeju, Korea
3. Kazuo Suzuki. Current Situation of Synthetic Immunoglobulins and Their Therapeutic Approach. International Conference on Regulation of Inflammatory Diseases Vasculitis and Asthma · 2008 in Chiba · Therapeutic

Strategy for Vasculitis Based on International Collaboration Researches. January 18-19, 2008, Chiba, Japan.

4. Yosuke Kameoka, Masahiro Furutani, Kazuo Suzuki. Prevalence of variety of artificial poly-clonal gamma globulin. International Conference on Regulation of Inflammatory Diseases Vasculitis and Asthma · 2008 in Chiba · Therapeutic Strategy for Vasculitis Based on International Collaboration Researches. January 18-19, 2008, Chiba, Japan.

##### 国内会議

1. 宇野賀津子、猪原登志子、藤田哲也、鈴木和男、武曾恵理「Bioplex による血漿中サイトカイン・ケモカインの解析: その有用性と問題点」炎症制御フォーラム千葉、2007 年 7 月 13-14 日、千葉
  2. 宇野賀津子、武曾恵理、尾松芳樹、八木克己、猪原登志子、三石瑤子、村上善基、小宮俊幸、鈴木和男「IFN- $\alpha$  産生能とプラズマサイトイド樹状細胞数: 健常人と癌、HCV 肝炎、MPO-ANCA 腎炎の比較」第7回高加齢学会、2007 年 7 月 20-21 日、京都
  3. 宇野賀津子、武曾恵理、尾松芳樹、八木克己、猪原登志子、三石瑤子、村上善基、小宮俊幸、谷川真理、鈴木和男、藤田哲也「健常人と各種疾患患者の末梢血のセンダイウイルス刺激 IFN- $\alpha$  産生能とプラズマサイトイド樹状細胞数との相関」第72回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2007 年 10 月 24 日、京都
  4. 宇野賀津子、武曾恵理、猪原登志子、八木克己、藤田哲也、鈴木和男「MPO-ANCA 腎炎のサイトカイン・ケモカイン動態: Bio-Plex 法による網羅的解析」第13回 MPO 研究会、10 月 26-27 日、広島
  5. 河内正治、鈴木和男「ARDS 患者における急性期 BALF 中 Cytokines 値測定」第13回 MPO 研究会、10 月 26-27 日、広島
  6. 仲村 究、宮里明子、肖 剛、八田益充、青柳哲史、位田 剣、西城 忍、岩倉洋一郎、竹田 潔、審良静男、鈴木和男、賀来満夫、川上和義「Cryptococcus neoformans 由来 DNA によるマウス骨髄由来樹状細胞の活性化機序の解析」第37回免疫学会、2007 年 11 月 20-22 日、東京・品川
  7. 宮里明子、仲村 究、Xiao Gang、鈴木和男、賀来満夫、川上和義「真菌由来 DNA による樹状細胞活性化における細胞内動態の解析: CpG-ODN との比較検討」第37回免疫学会、2007 年 11 月 20-22 日、東京・品川
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)  
特になし

## ARDS における Th1/Th2 バランスの異常

分担研究者 中山俊憲 千葉大学大学院医学研究院 教授  
(研究協力者 長谷川明洋 千葉大学大学院医学研究院 助教)

研究要旨： ナイーブ CD4T 細胞は、外来抗原の刺激により末梢リンパ組織でそれぞれ異なったリンホカインを産生する Th1 または Th2 タイプのメモリーT 細胞に分化する。Th1 細胞と Th2 細胞は互いにバランスをとりながら生体防御機構における中心的な役割を担っており、感染症やアレルギーの病態と Th1 と Th2 のバランスには密接な関係があると考えられている。CD69 分子は c-type lectin family に属する II 型の膜分子で、リンパ球の活性化の指標として広く用いられているが、機能の詳細は不明である。これまでに、アレルギー性喘息の発症における CD69 分子の重要性、抗 CD69 抗体投与による炎症の抑制効果などについて解析してきた。今後、ARDS の実験モデルを用いて抗 CD69 抗体投与による肺への炎症細胞の浸潤抑制について検討し、Th1/Th2 バランスの解析とともに急性免疫炎症細胞浸潤を抑制する至適条件の検討を行う。

### A. 研究目的

ナイーブ CD4T 細胞は、外来抗原の刺激により末梢リンパ組織でそれぞれ異なったリンホカインを産生する Th1 または Th2 タイプのメモリーT 細胞に分化する。Th1 細胞は IFN- $\gamma$  を産生して細胞内感染病原体に対する細胞性免疫に関与し、Th2 細胞は IL-4、IL-5、IL-13 など産生して細胞外感染病原体に対する液性免疫やアレルギー反応に関与する。Th1 細胞と Th2 細胞は互いにバランスをとりながら生体防御機構における中心的な役割を担っており、感染症やアレルギーの病態と Th1 と Th2 のバランスには密接な関係があると考えられている。

CD69 分子は、c-type lectin family に属する II 型の膜分子で、45kd の膜蛋白であるが、通常はホモダイマーとして存在している。T 細胞や B 細胞を刺激すると数時間以内に発現が上昇し、早期活性化マーカー

一分子としてリンパ球の活性化の指標として広く用いられている。また胸腺内で分化途中のセレクションを受けている T 細胞にも発現がみられる。コレセプターとして抗原レセプターからのシグナル伝達を増強する機能が推測されているが、詳細は不明である。リガンドは現在までのところ、同定されていない。一方、血小板には恒常的に発現しており、活性化した好中球や好酸球などにも発現がみられることから、血小板の機能発現や局所の炎症反応における役割が推測されている。樹立した CD69 ノックアウト (CD69-KO) マウスを用いて、生体内での CD69 分子の役割の解析を進めることを目的として、卵白アルブミン (OVA) を吸入させる気道炎症モデルを用いた解析を行った。



## B. 研究方法

マウスでのアレルギー性喘息モデルとして、卵白アルブミン (OVA) で免疫後、OVA を吸入させて気道炎症を誘導する系を用いた。気道炎症誘導後、肺胞洗浄を行い、浸潤細胞の種類と数と調べた。また気管支および肺の組織切片を作製し、炎症細胞の浸潤や腺分泌の程度を比較した。今年度は、抗 CD69 抗体を用いて急性の気道炎症を抑制する試みを行った。炎症の誘導前に投与、また炎症誘導の後に投与を行って、その効果を解析した。

## C. 研究結果

CD69 ノックアウトマウスでは、肺胞洗浄液中の浸潤細胞、とくに好酸球の数が有意に減少していた。細胞浸潤や気道炎症に伴う腺分泌が抑制されており、メタコリン誘導性の気道過敏症も減少していた。抗 CD69 抗体の投与でも喘息反応は抑制された。詳細な経時的解析を行ったところ、気道炎症が誘導された後でも抗 CD69 抗体の投与によって、炎症が強く抑制されることが明らかになった。

## D. 考案

アレルギー性喘息を起こした正常マウスでは、浸潤した炎症細胞上に CD69 の発現がみられ、CD69 ノックアウトマウスでは喘息が起きないことから、CD69 分子が喘息の発症に重要な役割を果たしていると考えられた。また、一度、炎症が起こった後でも、抗 CD69 抗体の投与によっても炎症細胞浸潤が抑制できることが明らかになった。これは、治療効果があるということを示唆しており、アレルギー性気道炎

症のみならず、種々の肺の炎症疾患に対して、CD69 分子を標的にしたまったく新しい治療法の開発が可能になるかもしれない。

## E. 結論

抗 CD69 抗体投与により、肺のアレルギー性炎症を抑制する治療効果が有ることが分かった。今後、ARDS の動物実験モデルを用いて、抗 CD69 抗体投与の炎症細胞の浸潤抑制効果について検討し、Th1/Th2 バランスの解析を行う。また、抗 CD69 抗体投与による急性免疫炎症細胞浸潤の抑制の至適条件を同定し、抗体治療の可能性を追求する。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Nagao, T., Matsumura, M., Mabuchi, A., Ishida-Okawara, A., Koshio, O., **Nakayama, T.**, Minamitani, H., and Suzuki, K.: Up-regulation of adhesion molecule expression in glomerular endothelial cells by anti-myeloperoxidase antibody. *Nephrol. Dial. Transplant.* 22:77-87 (2007).
2. Kaneko, T., Hosokawa, H., Yamashita, M., Wang, C. R., Hasegawa, A., Kimura, Y. M., Kitajima, M., Kimura, F., Miyazaki, M., and **Nakayama, T.**: Chromatin remodeling at the Th2 cytokine gene loci in human type 2 helper T cells. *Mol. Immunol.* 44:2249-2256 (2007).
3. Iwamura, C., and **Nakayama, T.**: Role of a-galactosylceramide-activated Va14 natural killer T cells in the regulation of allergic diseases. *Allergology International* 56:1-6 (2007).
4. Nakamatsu, M., Yamamoto, N., Hatta, M., Nakasone, C., Kinjo, T., Miyagi, K., Uezu, K., Nakamura, K., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., Iwakura, Y., Kaku, M., Fujita, J., and Kawakami, K.: Role of interferon-g in Va14<sup>+</sup> natural killer T cell-mediated host defense against *Streptococcus pneumoniae* infection in murine lungs. *Microbes and Infection* 9:364-374 (2007).
5. Kimura, Y. M., Iwamura, C., Suzuki, A., Miki, T., Hasegawa, A., Sugaya, K.,

- Yamashita, M., Ishii, S., and Nakayama, T.: Schnurri-2 controls memory Th1 and Th2 cell numbers *in vivo*. *J. Immunol.* 178:4926-4936 (2007).
6. Iwamura, C., Kimura, Y. M., Shinoda, K., Endo, Y., Hasegawa, A., Yamashita, M., and Nakayama, T.: Schnurri-2 regulates Th2-dependent airway inflammation and airway hyperresponsiveness. *Int. Immunol.* 19:755-762 (2007).
  7. Usui, T., Yamagami, S., Kishimoto, S., Seich, Y., Nakayama, T., and Amano, S.: Role of macrophage migration inhibitory factor in corneal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48:3545-3550 (2007).
  8. Masuda, K., Kakugawa, K., Nakayama, T., Minato, N., Katsura, Y., and Kawamoto, H.: T cell lineage determination precedes the initiation of *TCRb* gene rearrangement. *J. Immunol.* 179:3699-3706 (2007).
  9. Yamamoto, H., Okamoto, Y., Horiguchi, S., Kunii, N., Yonekura, S., and Nakayama, T.: Detection of natural killer T cells in the sinus mucosa from asthmatics with chronic sinusitis. *Allergy* 62:1451-1455 (2007).
  10. Morita, M., Fujino, M., Li, X-K., Kimura, H., Nakayama, T., Taniguchi, M., and Sugioka, A.: Spontaneous tolerance involving natural killer T cells after hepatic grafting in mice. *Transpl. Immunol.* 18:142-145 (2007).
  11. Kimura, Y. M., Iwamura, C., Suzuki, A., Kitajima, M., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Yamashita, M., and Nakayama, T.: Schnurri-2 controls the generation of memory Th1 and Th2 cells. *13th International congress of Immunology* pp.475-479 (2007).
  12. Yamashita, M., Onodera, A., and Nakayama, T.: Immune mechanisms of allergic airway diseases: Regulation by transcription factors. *Crit. Rev. Immunol.* 27:539-546 (2007).
  13. Uchida, T., Horiguchi, S., Tanaka, Y., Yamamoto, H., Kunii, N., Motohashi, S., Taniguchi, M., Nakayama, T., and Okamoto, Y.: Phase I study of a-galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells administration to the nasal submucosa in unresectable or recurrent head and neck cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 57:337-345 (2008).
  14. Kitajima, M., Abe, T., Miyano, K. N., Taniguchi, M., Nakayama, T., and Takaku, H.: Induction of natural killer cell-dependent antitumor immunity by the *Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus*. *Mol. Ther.* 16:261-268 (2008).
  15. Motohashi, S., and Nakayama, T.: Clinical applications of natural killer T cell-based immunotherapy for cancer. *Cancer Sci.* in press.
2. 学会発表
    1. Hashimoto, K., Suzuki, T., Sakai, R., Miyazawa, Y., Saito, R., Yamamoto, H., Nakayama, T., Miyano-Kurosaki, N., and Takaku, H.: Innate immunity activation in mouse dendritic cells infected by Baculovirus. Immunology 2007, May 18-22, Miami beach, FL, USA
    2. Motohashi, S., Kunii, N., Yamamoto, H., Okita, K., Nagato, K., Fujisawa, T., Taniguchi, M., and Nakayama, T.: A phase I/II study of aGalCer-pulsed dendritic cells in patients with advanced or recurrent non-small cell lung cancer. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2007 October 3-5, Yokohama
    3. Motohashi, S., Kunii, N., Yamamoto, H., Okita, K., Nagato, K., Taniguchi, M., and Nakayama, T.: 原発性肺癌に対するNKT細胞免疫療法/A Phase I/II study of aGalCer-pulsed dendritic cells lung cancer. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 2007年11月20-22日、品川
    4. 岩村千秋、鈴木茜、篠田健太、太刀川彩保子、中山俊憲 転写因子 Schnurri-2 によるアレルギー-気道炎症制御/Schnurri-2 regulates Th2-dependent airway inflammation and airway hyperresponsiveness. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 2007年11月20-22日、品川
    5. 斉藤諒、酒井亮、宮武克年、山本紘士、宮澤悠樹、高久洋、板倉光夫、中山俊憲、橋本香保子 脾臓 B 細胞の分化にともなう分泌小胞輸送複合分子の解析/The submit of exocyst complex molecule; Sec8 expression in activated B cell. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 2007年11月20-22日、品川
    6. Tomizawa, K., Nagao, T., Saiga, K., Oshima, M., Kobayashi, K., Nakayama, T., Suzuki, K.: MPO-ANCA 関連腎炎自然発症 SCG/Kj マウスにおける

- 15-Deoxyspergualin による MPO-ANCA およびリスクエピトープ治療成績 /Decrease of MPO-ANCA involving risk epitopes by treatment with 15-Deoxyspergualin in spontaneous MPO-ANCA-related vasculitis model SCG/Kj mouse. 第 37 回日本免疫学会 総会・学術集会 2007 年 11 月 20-22 日、品川
7. Yamamoto, H., Okamoto, Y., Horiguchi, S., Kunii, N., and Nakayama, T.:慢性副鼻腔炎の病態形成に及ぼす喘息合併の意義 -NKT 細胞とサイトカイン産生の検討から-/Detection of natural killer T cells in the sinus mucosa from asthmatics with chronic sinusitis. 第 37 回日本免疫学会 総会・学術集会 2007 年 11 月 20-22 日、品川
8. 青柳哲史、内山美寧、國島広之、八田益充、仲村究、位田剣、宮里明子、伊藤俊広、中山俊憲、賀来満夫、川上和義 23 価肺炎球菌ワクチン接種症例における自然免疫リンパ球の動態に関する検討 /Analysis of innate immune lymphocytes in patients with injection of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 2007 年 11 月 20-22 日、品川
9. Kakugawa, K., Masuda, K., Nakayama, T., and Kawamoto, H.: T cell differentiation occurs before cell cycle arrest for TCRb gene rearrangement. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 2007 年 11 月 20-22 日、品川
10. 鈴木茜、木村元子、岩村千秋、Hossain, M. B., 北島雅之、遠藤裕介、堀内周、山下政克、中山俊憲 Schnurri-2 によるメモリー-Th1/Th2 細胞形成調節 /Schnurri-2 controls memory Th1 and Th2 cell numbers *in vivo*. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 2007 年 11 月 20-22 日、品川
11. Yamashita, M., Kuwahara, M., Shinnakasu, R., Hosokawa, H., and Nakayama, T.: Bmi1 は Noxa 遺伝子の発現抑制を介してメモリー-Th 細胞の生存を維持する /Bmi1 regulates memory Th cell survival via repression of the Noxa gene. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 2007 年 11 月 20-22 日、品川
12. Hoshino, A., Nagao, T., Miura, N., Ohno, N., Nakayama, T., and Suzuki, K.: MPO-ANCA induces IL-17A production by activated neutrophils of murine systemic vasculitis. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 2007 年 11 月 20-22 日、品川
13. Hosokawa, H., Yamashita, M., Koseki, H., van Lohuizen, M., and Nakayama, T.: Regulation of Th2 cell development by Polycomb group gene bmi-1 through the stabilization of GATA3. Chromatin Structure & Function, 2007 Nov 27-30, Antigua
14. 山下政克、桑原誠、新中須亮、細川裕之、中山俊憲 Bmi1 は Noxa 遺伝子の発現調節を介してメモリー-CD4 T 細胞の生存を制御する 第 30 回日本分子生物学会年会 第 80 回日本生化学学会大会 合同大会 BMB2007 2007 年 12 月 11-15 日、横浜
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得
- 1) 出願中  
出願番号: 特願 2005-210606 号  
発明の名称: アレルギー性喘息の治療薬  
発明者: 中山俊憲、長谷川明洋  
出願日: 平成 17 年 7 月 20 日
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

インフルエンザ(H5N1)の死因となる急性肺障害(ARDS)の病態解析とモデル動物の作製に関する研究

## ARDS 病態モデルとしての VILI マウス作製

分担研究者 前原康宏 国立国際医療センター 麻酔科医長

**研究要旨：** インフルエンザ(H5N1)の死因となる重症 ARDS の動物モデルとして、人工呼吸誘発性肺傷害(VILI)モデルマウスを作製を試みた。マウス(BALB/c、C57BL/N)を麻酔下に気管切開、動脈カニューレーションし、モニター下に高換気量・高気道内圧で人工呼吸を継続した。高気道内圧で人工呼吸を継続したマウスでは、約 1 時間後に致死性的となった。採血、肺胞洗浄(BALF)液採取を行ない、サイトカイン測定を行った。本研究では今年度、臨床像からは VILI の発症が疑われるマウスが作成され、BALF 中のサイトカイン変動の観測から、劇症型 ARDS モデルマウスの原型はほぼ確立されたと考えられた。

### A. 研究目的

インフルエンザ(H5N1)の死因となる重症 ARDS の動物モデルとして、薬剤によらない人工呼吸誘発性肺傷害(VILI)モデルマウスを作製することが主な目的である。さらに、その生体材料の解析により重症 ARDS の病態に関わる因子を解明することを目的とした。

### B. 研究方法

マウス(BALB/c、C57BL/N)を麻酔下に気管切開、頸動脈に動脈カニューレーションし、心電図・血圧・気道内圧モニター下に高換気量・高気道内圧で人工呼吸を継続する。一定時間の人工呼吸後、採血、肺胞洗浄(BALF)液採取を行い、安楽死処置後肺組織を採取する。血液中、BALF 中の多種のサイトカインを測定し(17 種類同時測定)、その変動を捉え解析を行う。さらに摘出肺の病理学的検索を行う。

### C. 研究結果

マウス(BALB/c、C57BL/N)への安定したプレパレーション・人工呼吸が可能となった。人工呼吸中、心拍数、血圧、気道内圧モニター下に、気道内圧を 15～40cmH<sub>2</sub>O の設定で人工呼吸を 1～2 時間継続した。高気道内圧で人工呼吸を継続した動物では、約 1 時間後に致死性的となった。血清、BALF 中のサイトカインでは、IL-12、MIP-1 $\alpha$ 、TNF $\alpha$  などがコントロールマウスに比べて高値であった。

### D. 考案

高気道内圧で人工呼吸を施行したマウスでは、急激な変化で死亡に至ることが捉えられ、人工呼吸誘発性肺傷害を発症したことが疑われた。測定したサイトカインの変化については、個体数が少ないため、有意な変化とは認められなかったが、臨床での ARDS 初期像と類似した変化がみられた。今後、被験マウス数を増

加させるとともに、病理診断によっても ARDS モデルとしての VILI マウス作製の検証が必要である。

#### E. 結論

重症 ARDS の動物モデルとして、VILI モデルマウスの作製を試みた。臨床像からは VILI の発症が疑われるマウスが作成され、BALF 中のサイトカイン変動の観測から、劇症型 ARDS モデルマウスの原型はほぼ確立されたと考えられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

##### 2. 学会発表

- 1) 尾崎由佳、河内正治、前原康弘、松谷厚子、鈴木洋平、佐藤正規、鈴木和男。ARDS 患者における BALF 中 Cytokines 値測定。第 35 回日本集中治療医学会。東京都、2 月、2008。
- 2) 前原康弘、河内正治、戸高玲子、長尾和則、鈴木和男。ARDS 病態モデルとしての VILI モデルマウス。厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業 『インフルエンザ (H5N1) の死因となる劇症型 ARDS の病態解析と治療法の開発に関する研究 (H19-新興一般-005)』平成 19 年度第 2 回班会議、熊本市、1 月、2008。
- 3) 前原康弘、河内正治。ARDS 病態モデルとしての VILI マウス作成。第一回炎症制御治療フォーラム千葉、千葉市、7 月、2007。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし。

## インフルエンザウイルス感染に対する宿主側抵抗因子と

### その発現誘導の解析

分担研究者 大島正道 国立感染症研究所 室長

**研究要旨：**外部からのウイルス感染に対して宿主側ではインターフェロン、MxA, OAS, Fas など感染防御に働く宿主遺伝子が誘導され感染に対抗する。一方インフルエンザウイルスはウイルス蛋白 NS1 を発現し宿主の抵抗因子発現を抑制し細胞を自らの複製の場に改変する。気管支系の細胞株 NCI-H292 はこの戦いに勝ちインフルエンザウイルスを排除できるが肺胞系の細胞株 A549 は排除できず死滅する。ジーンチップによる解析の結果インフルエンザウイルス感受性の A549 細胞ではウイルス感染誘導遺伝子(VSG)の発現は抵抗性の NCI-H292 細胞に比べて抑制されている。細胞のウイルス抵抗性因子の誘導発現の相違が一次防御における結果の相違をもたらしていることが示唆される。VSG の誘導発現の系を作製してこのメカニズムを解析する。

#### A. 研究目的

インフルエンザウイルスは人に呼吸器系感染を起こす。生体の防御機構として IFN 系ならびに TLR 系の自然免疫機構が備わりインフルエンザウイルスを始め種々の感染に抵抗している。従って病原体が最初に接するこの気管支細胞および肺胞上皮細胞は一次防御の点で重要な位置を占めている。しかしながら呼吸器系の細胞でも気管支系の細胞と肺胞系の細胞ではウイルスに対する感受性が大きく異なっている。細胞のウイルス感染抵抗性因子をさらに解析し H5N1 インフルエンザウイルスがサイトカインストームを通して ARDS を起こすメカニズムを解明し治療法の開発につなげる。

#### B. 研究方法

・ これまでに A549 と NCI-H292 でウイルス感染誘導遺伝子の発現に数倍の差異が見られている遺伝子(VSG)が多数認められてい

る。これらウイルス抵抗性遺伝子は多くの場合細胞に対して傷害的で構成的に発現させることが困難である。従って誘導的にその遺伝子を発現させる系を作製した。昆虫細胞由来の誘導的転写システム (RheoSwitch(NEB)) をレトロウイルスベクターに組み込みアンホトロピックレトロウイルスのパッケージング細胞株 (293T 細胞に pgagpol<sup>bs</sup> と pAE <sup>puro</sup> をコトランスフェクションしてマウス白血病ウイルスの gag-pol とアンホトロピックウイルスのエンベロープを発現するパッケージング細胞 293-A を作製した。) に導入する。そこにインフルエンザウイルスをチャレンジして細胞の抵抗性の変化を GeneChip で解析する。

<レトロウイルスベクターの作製> pMo-2 LTR のマルチプルクローニングサイトに RheoSwitch Mammalian Inducible Expression System (NEB) (参考 1) のレセプターアク

チベータープラスミドpNEBR-R1のSnaBI(655)-BsiWI(8109)フラグメントをサブクローンしてレトロウイルスベクターpd2LTR-R1を作製した。同様にpNEBR-X1のPciI(3161)-BspHI(942)フラグメントとpEGFPまたはpPURをpMo-2LTRにサブクローンしてpd2LTRCMGFP-X1およびpd2LTRCMpuro-X1を作製した。さらにインターフェロン誘導遺伝子(VSG)をX1にサブクローンしてレトロウイルスベクターpd2LTRCMGFP(VSG)およびpd2LTRCMpuro(VSG)を作製した。同様にpd2LTR-R1に直接VSGを組み込んだベクターd2LTR-R1-VSGも作製した。

<シュードタイプウイルスの作製>293T-Aにpd2LTR-R1、pd2LTRCMGFP(VSG)またはpd2LTRCMpuro(VSG)あるいはd2LTR-R1-VSGをトランスフェクションしてそれぞれシュードタイプウイルスを回収する。

<シュードタイプウイルスの感染>作製したシュードタイプウイルスをヒト由来細胞株(A549, NCI-H292, huh7-it)に導入した。

<誘導遺伝子導入細胞での発現誘導>

二つのベクター(pd2LTR-R1、pd2LTRCMGFP(VSG)またはpd2LTRCMpuro(VSG))あるいはpd2LTR-R1に直接VSGを組み込んだベクターを作製した。薬剤RSL1による誘導でルシフェラーゼ活性の制御が実現できた。

(図1)

<ウイルスのチャレンジ>シュードタイプウイルスで遺伝子導入した細胞株にウイルス(インフルエンザウイルスPR8株、Udorn/72株、H5N1(ベトナム株、インドネシア株))

をそれぞれチャレンジしてウイルス抵抗性をジーンチップを用いて解析する予定である。

## C. 研究結果 , D. 考案, E. 結論

準備中

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Yasuda H, Yoshizawa N, Kimura M, Shigematsu M, Kawachi S, Oshima M, Yamamoto K, Suzuki K

Preparedness for the Spread of Influenza: Prohibition of Traffic, School Closure, and Vaccination of Children in the Commuter Towns of Tokyo In press

2) YK. Shimizu, M. Hijikata, M. Oshima, K. Shimizu, and H. Yoshikura

Detection of 5' side subgenome of hepatitis C virus terminating at

nucleotide 384 in patients' plasma and liver tissues J Viral Hepati. 2006,13, 746-755

3) Rulli SJ Jr, Muriaux D, Nagashima K, Mirro J, Oshima M, Baumann JG, Rein A.

Mutant murine leukemia virus Gag proteins lacking proline at the N-terminus of the capsid domain block infectivity in virions containing wild-type Gag. Virology. 2006 Apr 10;347(2):364-71.

### 2. 学会発表

1)C型肝炎ウイルス感染に対する宿主細胞応答の解析 第55回ウイルス学会2007年10月

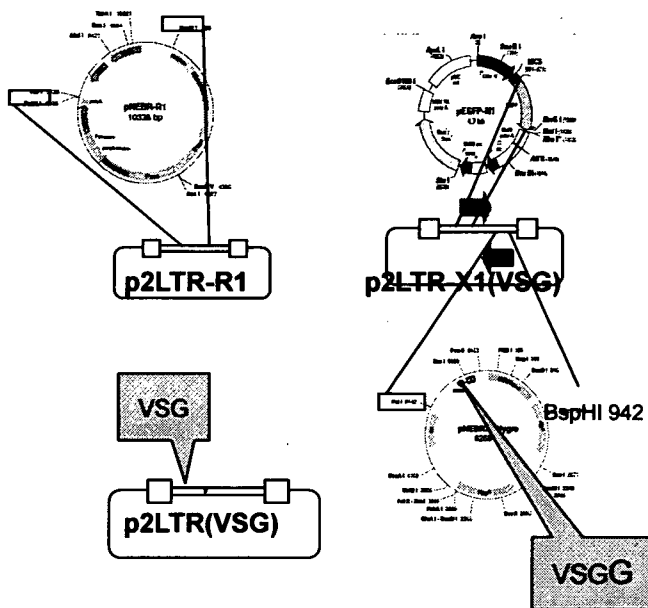
2)SARS-Co Spike に対する中和抗体エスケープ変異ウイルスの単離と感染防御に重要な抗体エピトープの同定、2006 ウイルス学

会

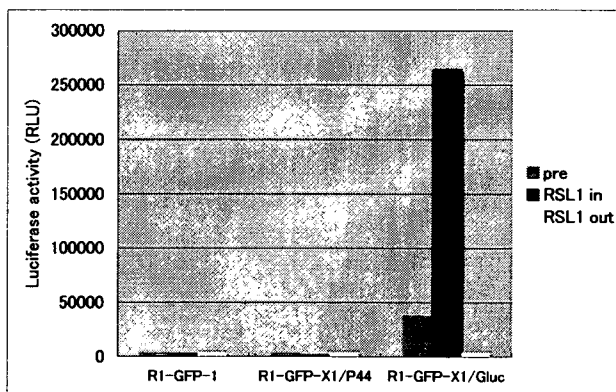
### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 該当しない
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

[参考1. レトロウイルスベクター]



(図-1)





## インフルエンザウイルス肺炎におけるニトロ化ストレスと 生体防御機構

分担研究者 赤池孝章 熊本大学大学院医学薬学研究部 微生物学分野 教授  
研究協力者 岡本竜哉 熊本大学大学院医学薬学研究部 微生物学分野 助教

**研究要旨：**我々はこれまで、マウスインフルエンザウイルス劇症肺炎モデルにおけるニトロ化ストレスについて研究を行ってきた。最近、NO の二次シグナル分子である cyclic GMP のニトロ化体である 8-ニトロ-cGMP が、NO 産生に依存して細胞内にて生成することを化学的に同定することに成功した。そこで本研究では、インフルエンザウイルス肺炎における 8-ニトロ-cGMP の生成と、その病態発現への影響について解析した。その結果、感染マウス肺組織の免疫染色にて、気道上皮細胞に強い 8-ニトロ-cGMP の陽性像を認めた。また、ウイルス感染に伴って、抗酸化・抗アポトーシス作用を有するヘムオキシゲナーゼ (HO) -1 の発現が亢進していた。さらに、培養細胞系において、8-ニトロ-cGMP の添加により、HO-1 の発現誘導がもたらされた。以上より、ニトロ化ストレスの結果生じる 8-ニトロ-cGMP は、HO-1 等のストレス応答を制御するシグナル分子として機能することにより、ウイルス肺炎病態の形成や防御に関与している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

我々はこれまで、マウスインフルエンザウイルス劇症肺炎モデルを用いて、一酸化窒素 (NO) と活性酸素種による生体分子の化学修飾を介するニトロ化ストレスについて研究を行ってきた。特に、核酸塩基のニトロ化反応に着目し解析した結果、グアニンのニトロ化産物である 8-ニトログアニン関連化合物が、ウイルス感染マウスの肺局所において NO 産生に依存して生成することを明らかにした。ごく最近、このような 8-ニトログアニン関連化合物として、NO の二次シグナル分子である cyclic GMP (cGMP) がニトロ化された全く新規な環状ヌクレオチドである 8-ニトログアニン 3',5'-環状 1リン酸(8-ニトロ-cGMP) を、種々の細胞培養系にて化学的に同定す

ることに成功した。そこで本研究では、インフルエンザウイルス肺炎における 8-ニトロ-cGMP の生成と、その病態発現への影響について解析した。

### B. 研究方法

- 1) 5 週齢雄の野生型 (C57BL/6) マウスと、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) 欠損マウスに、マウスに馴化したインフルエンザウイルス (A/Kumamoto/67/H2N2) をネブライザーにて吸入感染させ、経時的に肺組織を採取した。
- 2) 感染マウスの肺凍結切片肺組織を、抗 8-ニトロ-cGMP マウスモノクローナル抗体 (1G6) を用いて免疫染色を行ない、その生成と局在について、野生型と iNOS 欠損マウス間で比較・検討した。

3) 感染マウスの肺組織ホモジネートを調製し、ヘムオキシゲナーゼ (HO) -1 の発現を Western blot 法により解析した。HO-1 はヘムを基質として分解し、抗酸化作用を発揮するビリベルジン、鉄イオン、一酸化炭素を生じる酵素である。本研究では、HO-1 の代謝産物である一酸化炭素の血中濃度をガスクロマトグラフィーにて測定することにより HO-1 の生体内活性を評価した。

4) iNOS 欠損マウスの腹腔マクロファージ細胞の培養系に化学合成した 8-ニトロ-cGMP を添加後、経時的に HO-1 の発現・誘導を Western blot 法により解析した。

### C. 研究結果

インフルエンザウイルス感染マウス肺組織を免疫染色にて解析すると、野生型においては、iNOS 欠損マウスに比較して、より強い 8-ニトロ-cGMP の陽性像を、特にウイルス増殖の場である気道上皮細胞の細胞質において認めた。(図 1)。興味深いことに、ウイルス感染に伴って、肺組織で抗酸化・抗アポトーシス作用を有する HO-1 の発現が経時的に高まっており、その程度は iNOS 欠損マウスに比べて野生型マウスでより顕著であることが Western blot 解析より明らかとなった(図 2A)。さらに、血中の一酸化炭素レベルを定量することにより HO-1 の活性を評価したところ、同様の傾向が得られ、酵素活性を有した HO-1 が、ウイルス感染に伴って、しかも iNOS 依存的に誘導されることがわかった(図 2B)。また、in vitro にて iNOS 欠損マウスの腹腔マクロファージを培養し、8-ニトロ-cGMP を培養液中に添加したところ、HO-1 の発現誘導が濃度依存的・時間依存的にもたらされることが確認された(図 3)。

### D. 考案

グアニン塩基は、核内の遺伝子のみでなく細胞質のヌクレオチドプールにも存在しており、エネルギー代謝やシグナル伝達を担っているため、そのニトロ化は幅広い生命現象に影響をおよぼしている可能性がある。我々は、8-ニログアニン関連化合物として発見した 8-ニトロ-cGMP の生物活性を解析する過程で、本物質が、蛋白質のチオール基に対して非常に高い反応性を示し、cGMP 付加体を形成することを質量分析ならびに NMR 解析により証明した。我々は、この全く新しい蛋白質翻訳後修飾を S-グアニル化 (protein S-guanylation) と名付け、その標的蛋白質の網羅的解析を進めている。HO-1 などのストレス応答遺伝子の発現は、転写因子 Nrf2 とその調節因子 Keap-1 により制御されている。我々は、Keap1 が S-グアニル化を受けることで Nrf2 経路が活性化され、HO-1 の誘導を始めとするストレス応答反応をもたらすことを明らかにしている(未発表データ)。

### E. 結論

8-ニトロ-cGMP をはじめとする 8-ニログアニン誘導体は、インフルエンザ感染宿主におけるニトロ化ストレスのバイオマーカーとして応用できることが示された。さらに重要なことに、8-ニトロ-cGMP は HO-1 誘導をはじめとする様々なストレス応答を制御するシグナル分子として機能することにより、ウイルス肺炎病態の形成や防御に関与している可能性が示唆された。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Sawa T, Zaki MH, Okamoto T, Akuta T, Tokutomi Y, Kim-Mitsuyama S, Ihara H, Kobayashi A, Yamamoto M, Fujii S, Arimoto H, and Akaike T. Protein

- S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Nature Chem Biol*, 3:727-735 (2007).
2. Zaki MH, Okamoto T, Sawa T, Fujii S, and Akaike T. Nitrate stress in respiratory inflammation caused by influenza virus infection. *Clin Exp Allergy Rev*, 7:19-26 (2007).
  3. Ishima Y, Sawa T, Kragh-Hansen U, Miyamoto Y, Matsushita S, Akaike T and Otagiri M. S-Nitrosylation of human variant albumin Liprizzi (R410C) confers potent antibacterial and cytoprotective properties. *J Pharmacol Exp Ther*, 320: 969-977 (2007).
  4. Ishima Y, Akaike T, Kragh-Hansen U, Hiroyama S, Sawa T, Maruyama T, Kai T, and Otagiri M. Effects of endogenous ligands on the biological role of human serum albumin in S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun*, 364: 790-795 (2007).
  5. Yoshitake J, Kato K, Yoshioka D, Sueishi Y, Sawa T, Akaike T, and Yoshimura T. Suppression of NO production and 8-nitroguanosine formation by phenol-containing endocrine-disrupting chemicals in LPS-stimulated macrophages: Involvement of estrogen receptor-dependent or -independent pathways. *Nitric Oxide*, in press.
  6. Kaneko K, Akuta T, Sawa T, Kim HW, Fujii S, Okamoto T, Nakayama H, Ohigashi H, Murakami A, and Akaike T. Mutagenicity of 8-nitroguanosine, a product of nitrate nucleoside modification by reactive nitrogen oxides, in mammalian cells. *Cancer Lett*, doi:10.1016/j.canlet.2007.12.007, in press.
  7. Alam MS, Zaki MH, Sawa T, Islam S, Ahmed KA, Fujii S, Okamoto T, and Akaike T. Nitric oxide produced in Peyer's patches exhibits antiapoptotic activity contributing to an antimicrobial effect in murine salmonellosis. *Microbiol Immunol*, in press.
  8. 岡本竜哉、藤井重元、澤 智裕、赤池孝章 NO による病原体遺伝子変異と感染制御異常: NO-induced mutagenesis for microbial pathogen and host defense suppression. 日本臨床, 65 Suppl 2 Pt. 1:78-84 (2007).
2. 学会発表
1. Sawa T, and Akaike T. Nitric oxide signaling in oxidative stress and adaptive response. The 23<sup>rd</sup> Kumamoto Medical Bioscience Symposium (2007.11. Kumamoto, Japan).
  2. Akaike T, Sawa T, Fujii S, Okamoto T, Ihara H, and Arimoto H. A new second messenger, 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate involved in NO-induced signal transduction via a unique post-translational modification, protein S-guanylation. 4<sup>th</sup> Joint Meeting of the Society for Free Radical Research, Australasia and Japan (2007.12. Kyoto, Japan).
  3. 岡本竜哉、澤 智裕、藤井重元、寺崎泰弘、大島寛史、赤池孝章: 一酸化窒素による損傷塩基 8-ニトログアニンの生体内生成とその HPLC-電気化学法による検出。第3回呼吸器バイオマーカー研究会 (2007年3月、東京)
  4. 澤 智裕、Zaki MH、Islam S、岡本竜哉、藤井重元、赤池孝章: サルモネラ感染防御における NO の新しいシグナル伝達機構の解明。第80回日本細菌学会総会 (2007年3月、大阪)
  5. 澤 智裕、赤池孝章: 炎症発がん和酸素ストレス適応応答の分子制御機構。第31回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 (2007年4月、京都)
  6. 岡本竜哉、澤 智裕、藤井重元、寺崎泰弘、大島寛史、赤池孝章: 一酸化窒素による修飾塩基 8-ニトログアニン誘導体の生体内生成とその免疫組織化学法および HPLC-電気化学法による検出。第7回日本 NO 学会総会 (2007年5月、大津)
  7. 澤 智裕、藤井重元、岡本竜哉、有本博一、赤池孝章: 新規環状ヌクレオチド 8-ニトログアノシン-3',5'-サイクリック環状1リン酸の生成とそのチオール基への付加体形成反応 (S-guanylation) の解析。第7回日本 NO 学会学術集会 (2007年5月、大津)
  8. 藤井重元、澤 智裕、岡本竜哉、Zaki MH、赤池孝章: 転写制御因子 Keap1 の S-グアニル化を介した新規環状ヌクレオチド 8-ニトログアノシン-3',5'-環状1リン酸による細胞保護作用。第7回日本 NO 学会学術集会 (2007年5月、大津)
  9. 岡本竜哉、澤 智裕、藤井重元、大島寛史、赤池孝章: 慢性炎症におけるニトロ化ストレスの評価: 修飾塩基 8-ニトログアニン誘導体の生体内生成とその検出法の確立。第29回日本フリーラジカル学会総会 (2007年6月、名古屋)
  10. 澤 智裕、藤井重元、岡本竜哉、有本博一、赤池孝章: 新規環状ヌクレオチド 8-nitroguanosine-3',5'-cyclic monophosphate によるチオール基への付加体形成反応 (S-guanylation) の解析。

第 29 回日本フリーラジカル学会総会  
(2007 年 6 月、名古屋)

11. 藤井重元、澤 智裕、岡本竜哉、Zaki MH、赤池孝章：新規環状ヌクレオチド 8-ニトログアノシン-3',5'-環状 1 リン酸による転写制御因子 Keap1 の S-グアニル化とその生理作用。第 29 回日本フリーラジカル学会学術集会 (2007 年 6 月、名古屋)
12. 岡本竜哉、Zaki MH、澤 智裕、藤井重元、赤池孝章：細菌感染病態におけるニトロ化シグナルを介した新しい生体防御機構。第 18 回日本生体防御学会 (2007 年 7 月、福岡)
13. 岡本竜哉、澤 智裕、藤井重元、赤池孝章：NO による新しい蛋白質翻訳後修飾-Protein S-guanylation- を介する heme oxygenase-1 の誘導機構。第 4 回 Heme Oxygenase 研究フォーラム (2007 年 8 月、京都)
14. 澤 智裕、岡本竜哉、Zaki MH、藤井重元、山本雅之、赤池孝章：NO に依存した 8-ニトログアノシン-3',5'-環状 1 リン酸の生成を介した抗アポトーシスシグナル。第 66 回日本癌学会学術総会 (2007 年 10 月、横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

1) 出願中

出願番号：特願 2007-252877

発明の名称：SH 基修飾剤

発明者：赤池孝章、有本博一、澤 智裕

出願日：平成 19 年 9 月 28 日

2) 出願中

出願番号：特願 2007-015728

発明の名称：抗 8-チオアルコキシグアノシン-3',5'-サイクリック 1 リン酸抗体

発明者：赤池孝章、澤 智裕

出願日：平成 19 年 1 月 26 日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし