

27. Hasegawa, A., Shirai, M., and Nakayama, T.: Crucial role for CD69 in the pathogenesis of colitis induced by dextran sulphate sodium. 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 12月1-3日, 2008.
28. Nakayama, T.: Regulation of memory Th1/Th2 cell survival and function by the Polycomb group and Trithorax group gene products. 徳島大学ストレス栄養科学教育研究センター 第2回国際シンポジウム, 徳島, 1月22日-23日, 2009.

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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ventilator-induced lung injury (VILI)モデルマウスにおける サイトカイン、ケモカインの関与についての研究

研究分担者 前原康宏 国立国際医療センター 麻酔科医長

研究協力者	鄒 軍	国立国際医療センター
	河内正治	国立国際医療センター
	戸高玲子	国立感染症研究所免疫部
	大島正道	国立感染症研究所免疫部
	長尾朋和	千葉大学大学院医学研究院炎症制御学
	鈴木和男	千葉大学大学院医学研究院炎症制御学

研究要旨：

ARDSの発症機序を解明する端緒として、Ventilator-induced lung injury (VILI)モデルマウスによる解析を進めてきた。これまで Balb/c マウスを用い、高換気量による30分以上の人工呼吸により肺胞洗浄液(BALF)中のIL-2,-6,-10、IFN-g、TNF- α が上昇し、60分以上の人工呼吸でIL-1 α 、G-CSF、KC、MIP-1 β が有意に増加していた。血清中では、IL-6、KCが60分以上で、IL-1 α 、-2、G-CSF、MCP-1が240分で有意に増加していた。組織学的にも60分以上の人工呼吸で炎症の伸展が認められ、240分の人工呼吸では、肺傷害が生じていることが推察された。また、TNF- α 鼻腔内に投与により、IL-6、IL-15、KC、MIP-2、MCP-1の産生が増加した。IL-6(low-does)鼻腔内に投与により、TNF- α 、IL-13、IL-15、IL-18、KC、MIP-2の産生が増加した。

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 Ventilator-induced lung injury (VILI)モデルマウスの作製を行い、病態に関わるサイトカイン、ケモカインなどの因子を解明する。

B. 研究方法

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する。心電図・血圧・気道内圧モニター下に人工呼吸を継続する（高換気量群、低換気量群）。一定時間(15~240分)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、その変動を捉

える。摘出肺の病理学的検索を行う。

関連因子としての TNF- α 、IL-6 を鼻腔内投与し、同様の検索を行う。

C. 研究結果

高換気量による 30 分以上の人工呼吸により肺胞洗浄液(BALF)中の IL-2,-6,-10、IFN-g、TNF- α が上昇し、60 分以上の人工呼吸で IL-1 α 、G-CSF、KC、MIP-1 β が有意に増加していた。血清中では、IL-6、KC が 60 分以上で、IL-1 α 、-2、G-CSF、MCP-1 が 240 分で有意に増加していた。組織学的にも 60 分以上の人工呼吸で炎症の伸展が認められ、240 分の人工呼吸では、肺傷害が生じていることが推察された。TNF- α 鼻腔内に投与により、IL-6、IL-15、KC、MIP-2、MCP-1 の産生が増加した。IL-6(low-dose)鼻腔内に投与により、TNF- α 、IL-13、IL-15、IL-18、KC、MIP-2 の産生が増加した。

D. 考案

高気道内圧での人工呼吸では、Ventilator-induced lung injury (VILI)を発症させていることが観察された。従来の報告と同様に、その病態の進行には、多数のサイトカイン、ケモカインが関与しているが、特に IL-6、TNF- α が早期から増加しており、重要であると思われた。従来の報告より、さらに早期より変化が認められていることが推察された。ARDS 病態の進行を防ぐために、早期の変化を詳細に捉えることが重要であると思われた。

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行い、人工呼吸 60 分からのサイトカインの上昇が捉えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

前原康宏、河内正治、鈴木和男、長尾朋和、戸高玲子、大島正道.: Ventilator - induced lung injury モデルマウス作製の試み. 日本麻酔科学会第 55 回学術集会, 横浜, 2008 年 6 月 13 日.

F. 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。

劇症型 ARDS の量子ドットによる microRNA 治療に向けて

研究分担者 山本健二 国立国際医療センター研究所臨床研究センター・センター長

研究協力者 星野昭芳 国立国際医療センター研究所国際臨床研究センター・流動研究員

研究要旨

現在、遺伝子治療を行なうには一般的にはレトロウイルスベクターやアデノウイルスベクター利用している。ところが、細胞増殖のコントロールがうまくできていないため現状ではその開発研究は急速に低下した。その原因は、現在不明であるがアデノアソシエイトウイルスを用いて研究が再現している。アデノアソシエイトウイルスを用いた研究は、1980年代中頃まで研究が進んでいたが、当時はレトロウイルスベクターやアデノウイルスベクターの開発の勢いに圧倒されて来た。安全性については、それら2つのウイルスより高い事が当時から判っており、近年再び開発研究が進められている。

一方薬剤伝達システムは、臓器特異的、細胞特異的、細胞内器官特異的に薬剤を伝達する事が一部可能と成っている。本研究は、この技術を利用し遺伝子伝達システムを開発する。現在まで GFP 遺伝子を量子ドットに結合し核移行シグナルを用いて細胞の核に伝達し発現させる事に成功した。

A. 研究目的

ARDS の発症は、原因不明の場合もあるが、インフルエンザなどの感染症がトリガーとなり誘導する場合は有る。本研究は鳥インフルエンザに罹患し、発病した患者が、劇症型 ARDS を発症するような場合、非常に高い致死率が高くなることをターゲットとし救命率を高める治療法の検討をする事が目的である。

そのために本研究では、iRNA を用いウイルスノ増殖を抑制する方法を用い、劇症型 ARDS に至までに成らないよう、その原因と成る物が、患者の免疫系を自己免疫的に肺に於ける大炎症を起こす前に

沈静化する、或は根本的にそうならないよう阻止する事の手段を検討する。

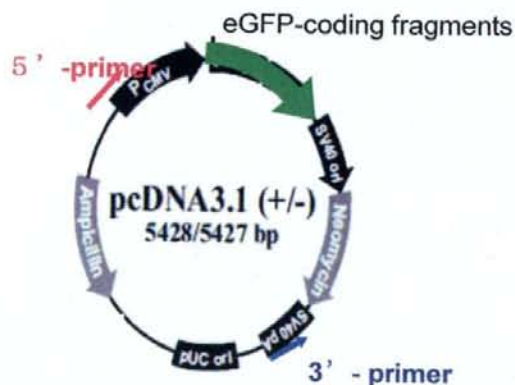
B. 研究方法

本研究に於いて、必要なものは、iRNA を運ぶキャリアーである。DNA ガンのように必要な部位にまで注射器等に必要な部位にまで到達し、その組織に必要な iRNA を打ち込む事も一つの方法である。しかしながらこの方法では深部に到達する事に問題が残りました、繰り返し行なうには適していないキャリアーである事からである。そこで我々は、ナノ粒子を用いて行なう事を計画

した。これまでに我々は、半導体ナノ粒子を用い、これに薬物を添加させ薬物キャリアーとしてマウスを使ったモデル実験に成功している。そのとき使ったモデル薬物は、抗高血圧剤であるカプトプリルである。カプトプリルは、アミノ酸であるシステインのアミノ基をメチル基に置き換えたアミノ酸誘導体とプロリンのジペプチドである。この分子を半導体ナノ粒子表面に結合させた。

遺伝子断片付加半導体ナノ粒子の作成

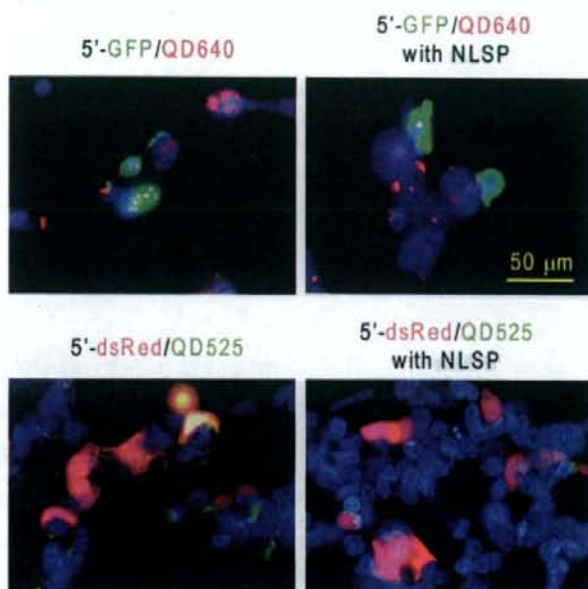
遺伝子フラグメントを半導体ナノ粒子結合させたプラスミッドを作成し遺伝子全体はポリメラーゼ連鎖反応にて核生物においても発現できる GFP 遺伝子を装着する。



C. 研究結果

遺伝子発現

培養動物細胞を用いて遺伝子フラグメント結合半導体ナノ粒子による遺伝子導入実験を行った。その結果、下図に示してある様に緑の蛍光蛋白を細胞内で発現し、その蛍光を確認する事ができた。



D. 考察

1) 達成度について: iRNAの伝達システム開発まで、半導体ナノ粒子をキャリアーとして開発することの可能性は一步前進した。今後動物を用いて伝達可能か否かを検討する必要がある、またその有効なiRNAを設計する必要背が有る。

ターゲット遺伝子としてアルベオラマクロファージの炎症に関する遺伝子を検討したい。

本研究では、それらの思索について可能性がある事を今回示すことができた。大きな計画の一部であるが、大きな成果を得たと考えている。

2) 成果の学術的・国際的・社会的意義について: 2008年5月28日、デンマークの生物製薬会社・Santaris Pharma社は、C型肝炎の

治療薬として開発されているマイクロRNA 標的薬・SPC3649 (LNA-antimiR-122) の第1 相試験の開始を発表している。国際的に見ても、iRNAによる治療は国際的に見ても大きな潮流となって多くの研究が成されている。我々の行っている研究はARDSやその他の難病に対する新しい治療法であり現在更に日進月歩で進化している。

3) 今後の展望について

本研究により遺伝子導入が効率よく行なわれるウイルスベクターを用いない方法を新しく開発することが可能と成った。

今後iRNAを結合させ細胞内に導入し、ターゲット細胞内の発現状態を制御することによりインフルエンザウイルス感染による劇症ARDSに有効な治療法の開発に向けて研究開発を行なう。

E. 結論

近年、わずか20数個の塩基が連なった「マイクロRNA」が「タンパク質合成」を調節することがわかってきた。マイクロRNAは特定のmRNAに作用して、mRNAの翻訳を抑制する。マイクロRNAは、がんの発症や記憶の形成など、極めて広範囲の高次生命現象に関わることが明らかになりつつある。

最近マイクロRNAの表現の変化を統合失調症に発見している。ノースカロライナ大学のダイアナ・パーキンス等の研究チームは、亡くなった15人の統合失調症と統合失調情緒障害(統合失調と情緒障害の両方が

現れる精神障害)の患者の脳を、21人の亡くなった健康な人の脳と比較して、その違いを発見した。違いは高度の思考と決断をする前頭前野皮質にあり、この脳の異常が統合失調症発症に関連しているとされている。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hoshino A, Hanada S, Manabe N, Nakayama T, Yamamoto K. Immune Response Induced by Fluorescent Nanocrystal Quantum Dots in vitro and in vivo. IEEE Transactions on NanoBioscience 2008; in press.
- 2) Yamamoto S, Manabe N, Yamamoto K. High-Definition Slit Lamp Video Camera System. Ophthalmic Surgery. Lasers & Imaging 2008; in press
- 3) Hoshino A, Manabe N, Fujioka K, Hanada S, Yasuhara M, Kondo A, Yamamoto K. GFP expression by intracellular gene delivery of GFP-coding fragments using nanocrystal quantum dots. Nanotechnology 2008 Dec 10;19(49):pp1-12. Epub ahead of print, 18 November 2008
- 4) Fujioka K, Hiruoka M, Sato K, Manabe N, Miyasaka R, Hanada S, Hoshino A, Tilley RD, Manome Y, Hirakuri K, Yamamoto K. Luminescent passive-oxidized silicon quantum dots as biological staining labels and their cytotoxicity effects at high concentration. Nanotechnology 2008 Oct 15;19(41):415102. Epub ahead of print, Sep 3, 2008
- 5) Yamamoto M, Futamura Y, Fujioka K, Yamamoto K. Novel production method for plant polyphenol from livestock excrement using subcritical water. International Journal of Chemical Engineering 2008; in press.
- 6) Hoshino A, Nagao T, Nagi-Muira N, Ohno N, Yasuhara M, Yamamoto K,

Nakayama T, Suzuki K.MPO-ANCA induces IL-17 production by activated neutrophils in vitro via classical complement pathway-dependent manner. Journal of Autoimmunity 2008;31(1):79-89. Epub ahead of print, Apr 21, 2008

- H. 知的所有権の出願・取得状況
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

研究分担者 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 (RhoSwitch(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^{hs} と pAE^{pro} をコトランスフェクションしてマウス白血球ウイルスの 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-2LTR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p2LTR-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p2LTR-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ーゼ活性の制御が実現できるクローンを28クローン中7クローン選択できた。(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、Udom/72株、H5N1(ベトナム株、インドネシア株))をチャレンジし上清に回収されるウイルスをplaque assayしてウイルス抵抗性の有無を確認する予定である。

C. 研究結果

現在準備中。

D. 考案

現在準備中。

E. 結論

現在準備中。

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.13, 746-755.2006.

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 cap

sid domain block infectivity in virions containing wild-type Gag. *Virology*. Apr 10;347(2):364-71.2006

一変異ウイルスの単離と感染防御に重要な抗体エпитオプの同定、2006ウイルス学会

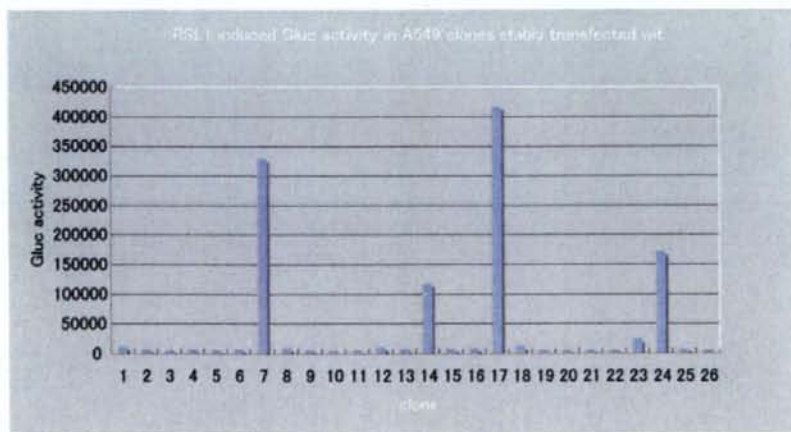
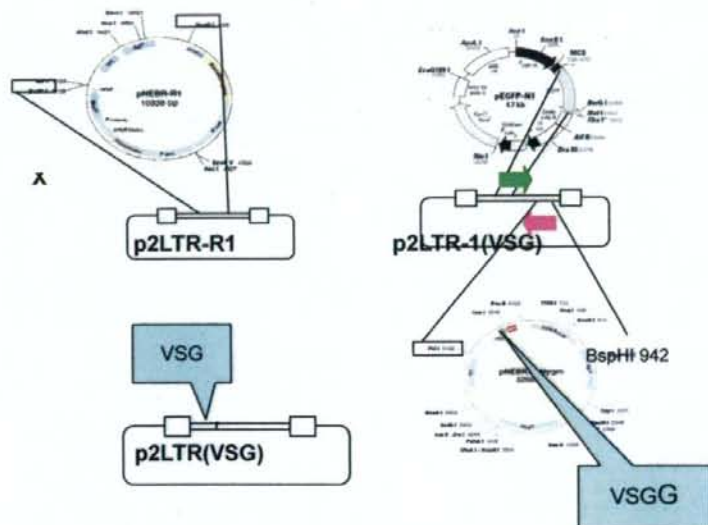
2. 学会発表

- 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

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・ARDSにおける 酸化ストレスバイオマーカー

研究分担者 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

一酸化窒素 (NO) と活性酸素種 (ROS) は、感染、炎症、がんといった多彩な疾病に関わっている。我々は、インフルエンザウイルス肺炎において、NO・ROSによる蛋白質チロシン残基や核酸塩基といった生体分子の酸化・ニトロ化修飾 (酸化ストレス) の感染病態に対する影響について解析を行ってきた。最近、cGMP が誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) 由来の NO によりニトロ化され、新しい環状ヌクレオチド 8-ニトロ-cGMP が生成することを見出した。そこで今回、インフルエンザウイルス肺炎における 3-ニトロチロシンと 8-ニトロ-cGMP の生成とそのバイオマーカーとしての有用性について検討した。野生型マウスにおいては、炎症細胞、気道上皮、肺胞浸出液などに強い 3-ニトロチロシンの染色像が得られた。また 8-ニトロ-cGMP に関しては、特にウイルス増殖の場である気道上皮にて特に強い陽性像が得られた。一方 iNOS 欠損マウスにおいては共に陽性所見を認めなかった。次に肺胞洗浄液中の 3-ニトロチロシンの生成を HPLC-電気化学検出器法により解析したところ、iNOS の誘導と肺炎の時間経過に一致した生成を認めた。さらに酸化ストレス応答因子であるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) の発現を Western blot にて解析したところ、8-ニトロ-cGMP の生成に依存して誘導されること、さらにその発現量は反応産物である一酸化炭素の定量にて簡便に評価できることがわかった。以上、インフルエンザウイルス感染病態において生成する 3-ニトロチロシンや、8-ニトロ-cGMP、そして一酸化炭素は、インフルエンザウイルス肺炎病態における酸化ストレスのバイオマーカーとして有用であることが示唆された。

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肺炎・ARDS モデルを用いて、一酸化窒素 (NO) と活性酸素種 (ROS) による蛋白質、核酸、脂質といった生体分子の化学修飾を介する酸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 (PNAS. 100:685-690, 2003)。

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 (Nature Chem Biol. 3:727-735, 2007)。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 3-ニトロチロシンや 8-ニトロ-cGMP の生成と、そのバイオマーカーとしての有用性について解析した。

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、肺胞洗浄液 (BALF)、血液等を採取した。
- 2) 感染マウスの BALF 中の蛋白質をブローナーゼで消化し、HPLC-電気化学検出器 (ECD) 法により 3-ニトロチロシンの定量解析を行った。
- 3) 感染マウスの肺凍結切片肺組織を、抗 3-ニトロチロシン抗体や抗 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。
- 4) 感染マウスの肺組織ホモジネートを調製し、酸化ストレス応答因子である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。
- 5) HO-1 の反応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法 (J

Immunol, in press, 2009) にて測定し、HO-1 の蛋白質量との相関性について検討した。

C. 研究結果

BALF 蛋白質中の 3-ニトロチロシンを HPLC-ECD にて解析したところ、肺炎病態に伴った増加が認められた (図 1A)。また、感染マウス肺組織を免疫染色にて解析すると、野生型マウスにおいては、炎症細胞、気道上皮、肺胞浸出液などに強い 3-ニトロチロシンの染色像が得られた。また 8-ニトロ-cGMP に関しては、特にウイルス増殖の場である気道上皮にて特に強い陽性像が得られた。(図 1A, B)。興味深いことに、ウイルス感染に伴って、肺組織中で酸化ストレス応答因子である HO-1 の発現が経時的に誘導されること、またその程度は 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の定量により HO-1 活性を評価したところ、HO-1 蛋白質の発現量と相関する傾向が得られ、一酸化炭素が酸化ストレス応答を評価する簡便なバイオマーカーとして応用が可能であることが示唆された (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 (J Immunol, in press, 2009)。

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-ニト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(Nature Chem Biol. 3:727-35, 2007)。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などの酸化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酸化ストレス応答をもたらすことを明らかにしている(投稿準備中)。

E. 結論

以上より、インフルエンザウイルス感染に伴う活性酸素とNOの過剰な産生によってもたらされる酸化ストレスは、3-ニトロチロシンや8-ニトロ-cGMPの生成、さらに、蛋白質S-グアニル化をシグナルとするHO-1蛋白質の発現と一酸化炭素の生成をもたらす(表1)、これらを定量解析することは、インフルエンザウイルス肺炎・ARDSの病態の解析における酸化ストレスのバイオマーカーとして有用であることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mohammad Hasan Zaki, Shigemoto Fujii, Tatsuya Okamoto, Sabrina Islam, Shahzada Khan, Ahmed Khandaker Ahtesham,

- Tomohiro Sawa, Takaaki Akaike. Cytoprotective function of heme oxygenase-1 induced by a nitrated cyclic nucleotide formed during murine salmonellosis. J Immunol. in press, 2009.
2. Yu Ishima, Takaaki Akaike, Ulrich Kragh-Hansen, Shuichi Hiroshima, Tomohiro Sawa, Ayaka Suenaga, Toru Maruyama, Toshiya Kai, Masaki Otagiri. S-nitrosylated human serum albumin-mediated cytoprotective activity is enhanced by fatty acid binding. J Biol Chem. 283:34966-34975, 2008.
3. Yohei Saito, Hirobumi Taguchi, Shigemoto Fujii, Tomohiro Sawa, Eriko Kida, Chizuko Kabuto, Takaaki Akaike, Hirokazu Arimoto. 8-Nitroguanosines as chemical probes of the protein S-guanylation. Chem Commun. 5984-5986, 2008.
4. Mohammad Samuel Alam, Mohammad Hasan Zaki, Tomohiro Sawa, Sabrina Islam, Ahmed Khandaker Ahtesham, Shigemoto Fujii, Tatsuya Okamoto, Takaaki Akaike. Nitric oxide produced in Peyer's patches exhibits antiapoptotic activity contributing to an antimicrobial effect in murine salmonellosis. Microbiol Immunol. 52:197-208, 2008.
5. Kazuyoshi Kaneko, Teruo Akuta, Tomohiro Sawa, Ha Won Kim, Shigemoto Fujii, Tatsuya Okamoto, Hitoshi Nakayama, Hajime Ohigashi, Akira Murakami, Takaaki Akaike. Mutagenicity of 8-nitroguanosine, a product of nitrative nucleoside modification by reactive nitrogen oxides, in mammalian cells. Cancer Lett. 262:239-247, 2008.
6. 岡本竜哉, 澤智裕, 藤井重元, 赤池孝章. 活性酸素・NOによる感染防御シグナルの新展開-Antimicrobial signaling mediated by reactive oxygen species and NO. 細胞. 41: 51-55, 2009.
7. 赤池孝章, 岡本竜哉, Mohammad Hasan Zaki, 藤井重元, 澤智裕. NOによる細胞内感染防御の新しい展開-New paradigm of host defense against intracellular pathogens by nitric oxide. Jpn J Leprosy. 78: 41-47, 2009.
8. 岡本竜哉, 赤池孝章. 肺の感染炎症病態におけるニトロ化ストレスとそのバイオマーカー. 医学のあゆみ 224:851-856, 2008.

9. 澤 智裕, 赤池孝章. 活性酸素を消去する物質 8-ニトロ-cGMP. 検査と技術. 36:678-679, 2008.
 10. 岡本竜哉, 藤井重元, 澤 智裕, 赤池孝章. 感染病態における NO・活性酸素のシグナル伝達機能:酸化ストレスとその適応応答の分子メカニズム. *Allergy From the Nose to the Lung*, 6:12-17, 2008.
 11. 澤 智裕, 赤池孝章. 一酸化窒素 (NO) とシグナル伝達. 「酸化ストレスの医学 (吉川敏一 監修)」 診断と治療社 pp. 138-146, 2008.
2. 学会発表
1. 澤 智裕, Zaki MH, 藤井重元, 岡本竜哉, 小林 聡, 山本雅之, 居原 秀, 有本博一, 赤池孝章. ニトログアノシン環状ヌクレオチドによる新しい感染防御シグナル伝達機構. 第 81 回日本細菌学会総会. 京都市, 3 月, 2008.
 2. 澤 智裕, 大島寛史, 赤池孝章. 感染・炎症におけるグアニンニトロ化と発がんへの関与. 第 8 回日本 NO 学会学術集会. 仙台市, 5 月, 2008.
 3. 澤 智裕, 藤井重元, 入江 厚, 岡本竜哉, 居原 秀, 小林 聡, 山本雅之, 赤池孝章. S-Guanylation proteomics: Keap1 修飾部位の解析. 第 8 回日本 NO 学会学術集会. 仙台市, 5 月, 2008.
 4. 岡本竜哉, 澤 智裕, 藤井重元, 赤池孝章. 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. 第 8 回日本 NO 学会学術集会. 仙台市, 5 月, 2008.
 5. 藤井重元, 澤 智裕, 岡本竜哉, 居原 秀, 小林 聡, 山本雅之, 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-グアニル化とそのシグナル伝達機構. 第 8 回日本 NO 学会学術集会. 仙台市, 5 月, 2008.
 6. 澤 智裕, 赤池孝章. NO による酸化ストレス応答の分子制御機構. 第 61 回日本酸化ストレス学会. 京都市, 6 月, 2008.
 7. 岡本竜哉, 澤 智裕, 藤井重元, 赤池孝章. ウイルス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 61 回日本酸化ストレス学会. 京都市, 6 月, 2008.
 8. 藤井重元, 澤智裕, 岡本竜哉, 居原秀, 小林聡, 山本雅之, 赤池孝章. Keap1 の S-グアニル化を介する環状ヌクレオチド 8-ニトログアノシン-3',5'-環状 1 リン酸のシグナル伝達機序. 第 61 回日本酸化ストレス学会. 京都市, 6 月, 2008.
 9. 岡本竜哉, 澤 智裕, 藤井重元, 赤池孝章. インフルエンザウイルス肺炎における酸化ストレス防御機構. 第 1 回感染病態研究フロンティア. 大阪市, 7 月, 2008.
 10. 岡本竜哉, 澤 智裕, 藤井重元, 赤池孝章. インフルエンザウイルス肺炎における活性酸素シグナル応答の分子メカニズム: Molecular mechanism of reactive oxygen species signaling in influenza virus pneumonia. 第 19 回日本生体防御学会. 札幌市, 7 月, 2008.
 11. Tomohiro SAWA, Shigemoto FUJII, Atsushi IRIE, Tatsuya OKAMOTO, Hozumi MOTOHASHI, Masayuki YAMAMOTO, Takaaki AKAIKE. Nitric oxide-dependent sulfhydryl modification of Keap1 by 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. 5th International Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic applications of NO. (Bregenz, AUSTRIA), August 28-30, 2008.
 12. Tatsuya OKAMOTO, Tomohiro SAWA, Shigemoto FUJII, Takaaki AKAIKE. Guanine nitration and host defense during influenza virus pneumonia. 5th International Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic applications of NO. (Bregenz, AUSTRIA), August 28-30, 2008.
 13. Shigemoto FUJII, Tomohiro SAWA, Tatsuya OKAMOTO, Hideshi IHARA, Hozumi MOTOHASHI, Masayuki YAMAMOTO, Takaaki AKAIKE. Physiological role of Keap1 S-guanylation by 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate formed in C6 glioma cells. 5th International Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic applications of NO. (Bregenz, AUSTRIA), August 28-30, 2008.
 14. Takaaki AKAIKE, Tomohiro SAWA. Signal transduction by 8-nitro-cGMP via its unique redox property and post-translational modification. A Joint Conference of 13th In Vivo EPR Spectroscopy and Imaging and 10th International EPR Spin Trapping/Spin Labeling. (Fukuoka, JAPAN), September 29, 2008.

15. 岡本竜哉、澤 智裕、藤井重元、赤池孝章. 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、酸化ストレス応答の分子メカニズム. 第 45 回日本ウイルス学会九州支部総会. 熊本市, 10 月, 2008.
16. Tomohiro SAWA, ShigemotoFUJII, Atsushi IRIE, Tatsuya OKAMOTO, Akira KOBAYASHI, Masayuki YAMAMOTO, Takaaki AKAIKE. NO dependent modification of Keap1 thiol by nitrated nucleotide, 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. 第 67 回日本癌学会総会. 名古屋市, 10 月, 2008.
17. 澤 智裕、藤井重元、入江 厚、岡本竜哉、居原 秀、本橋ほづみ、山本雅之、赤池孝章. S-Guanylation proteomics: NO と活性酸素に依存したユニークなチオール基翻訳後修飾. 第 81 回日本生化学会大会. 神戸市, 12 月, 2008.
18. 岡本竜哉、澤 智裕、藤井重元、赤池孝章. インフルエンザウイルス肺炎における 8-ニトロ-cGMP の生成と酸化ストレス応答の分子メカニズム: Molecular mechanism of oxidative stress responses mediated by 8-nitro-cGMP formed in influenza virus pneumonia. 第 81 回日本生化学会大会. 神戸市, 12 月, 2008.
19. 藤井重元、澤 智裕、岡本竜哉、居原 秀、本橋ほづみ、山本雅之、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-グアニル化とその酸化ストレス応答における役割. 第 81 回日本生化学会大会. 神戸市, 12 月, 2008.
20. Ahmed Khandaker AHTEHAM, Tomohiro SAWA, Takaaki AKAIKE. Nitration of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate by nitric oxide and reactive oxygen species. 第 81 回日本生化学会大会. 神戸市, 12 月, 2008.
- 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-チオー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

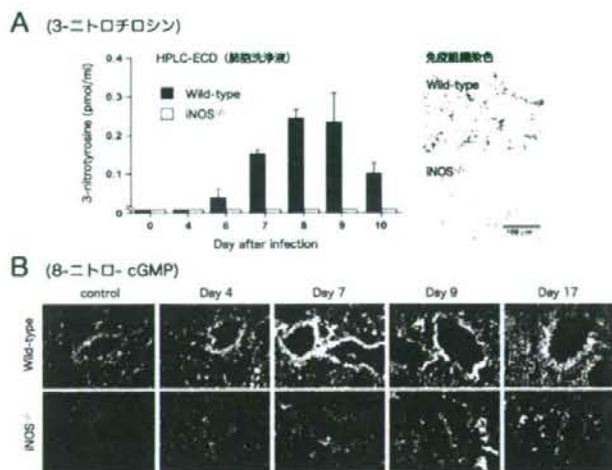


図1 インフルエンザウイルス感染マウス肺における 3-ニトロチロシンと 8-ニトロ-cGMP の生成

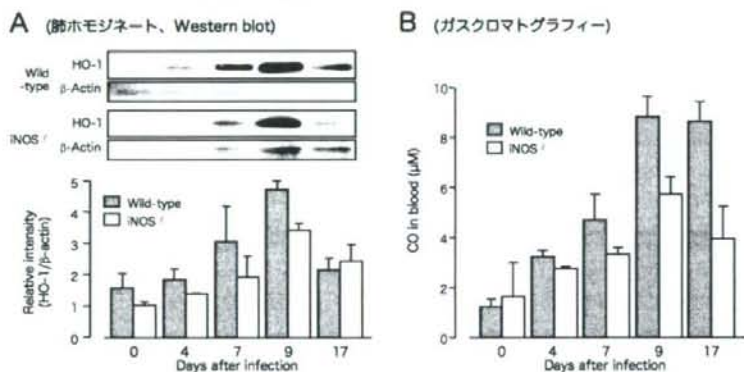


図2 インフルエンザウイルス感染マウスにおける HO-1 の誘導

表1 モデル動物およびヒトの ARDS 病態解析に応用可能な酸化ストレスバイオマーカー

	3-ニトロチロシン	8-ニトログアニシン	8-ニトロ-cGMP	S-グラニル化蛋白質	酸化ストレス
化学式					CO
検体	血液、尿、 肺洗浄液、尿 など	尿 (血液や肺洗浄液 などでも可)	血液、尿、肺洗浄液 などでも可 (検出中)	血液、尿、肺洗浄液 などでも可 (検出中)	血液 呼吸も可 (ヒト)
検出法	ECD-HPLC	免疫アフィニティー ECD-HPLC (8-ニトログアニシンとして)	免疫アフィニティー ECD-HPLC LC-MS/MS	免疫アフィニティー ECD-HPLC LC-MS/MS	ガスクロマト グラフイ (CO-Hb から NO を用いて CO を遊離)
特徴	ONOO ⁻ , NO ₂ ⁻ による チロシンニトロ化 量が少ない 非特異的な生成	cell culture: RAW264, HepG2, 3T3-L1, マウス 腹腔マクロファージなどで検出 In vivo: インフルエンザ肺炎マウスモデル, サ ルモネラ感染マウスモデル, 持原性肺臓腫瘍組 織, 肺がん組織などで検出		蛋白質やペプチド, グル タミン酸などの Cys 残基 の SH 基に 8-ニトロ-cGMP が結合したものを	感染・炎症 にて誘導さ れる HO-1 の 産物

急性肺障害マウスモデルにおける 自然免疫細胞の動態とその役割の解明に関する研究

研究分担者 川上和義 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：

ARDS モデルとして従来から LPS 誘発マウス肺炎モデルが用いられてきたが、これは一時的な肺の炎症性病変を呈するとどまり、劇症型 ARDS (FARDS) でみられるような激的な肺の炎症を来すことはない。本研究では、FARDS により近い動物モデルを作成する目的で、LPS の投与前に NKT 細胞の活性化剤である α -galactosylceramide を気管内投与することで、激しい肺の炎症性変化とともに、2 日の経過で急激に死亡するマウスモデルの作成に成功した。病理学的には肺胞腔内の強い炎症細胞浸潤と一部硝子膜形成もみられ、肺内では TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12、IL-17、IFN- γ 、KC、MCP-1 などのサイトカイン、ケモカイン産生が著明に亢進していたことから FARDS のよい動物モデルになると考えられた。このモデルに抗 TNF- α 中和抗体を投与すると、肺の炎症性変化が消失し、全てのマウスが生存することから、本サイトカインが極めて重要な役割を担うものと考えられた。フローサイトメトリーによる解析では、Gr-1 陽性細胞が TNF- α を発現しており、抗 Gr-1 抗体の投与によって炎症性変化の減弱がみられた。一方、LPS の代わりに H1N1 インフルエンザウイルスの加熱死菌を用いて同様な解析を行ったところ、FARDS は誘導できなかった。

これらの結果から、FARDS の発症に Gr-1 陽性細胞から産生される TNF- α が重要な役割を担っている可能性が考えられ、またウイルス死菌を用いた検討から FARDS の発症にウイルスの増殖が重要なことが推察された。

A. 研究目的

急性肺障害 (ALI/ARDS) は、先行する各種基礎疾患にともない急速に進行する肺胞傷害であり、浮腫・硝子膜形成、器質性変化、線維化の経過をたどる。その原因となる病態は直接損傷と間接損傷に分けられ、直接損傷では重症肺炎と胃内容物の誤飲が重要でありインフルエンザ (H5N1) はこちらに分類される。その発症には、各種免疫細胞や TNF- α のような炎症性サイトカインなど免疫病態が深く関わっているが、その

詳細は十分には理解されていない。その理由の一つとして、よい動物モデルが存在しないことがあげられる。これまでの研究では、リポポリサッカライド (LPS) の経気道または全身投与によるモデルが多く用いられているが、ALI まででは起こるが、なかなか典型的な ARDS にまでは進展しない。

これまで我々は、臨床的にも ARDS を発症して重篤化することが知られている肺炎球菌性肺炎のマウスモデルを確立し、その発症病態における natural killer (NK) T 細胞

や $\gamma\delta T$ 細胞といった自然免疫リンパ球や好中球マーカーである Gr-1 を発現した単球様細胞の役割について解析を行ってきた。

今年度は、LPS 気道投与モデルにおいて NKT 細胞の特異的刺激物質である α -galactosylceramide (α -GalCer) を先行投与することで FARDS モデルを作製するとともに、その発症病態における TNF- α の役割について解析を行った。さらには、LPS の代わりに H1N1 インフルエンザウイルスの加熱死菌を用いることで、より H5N1 による FARDS に近いモデルの作製も試みた。

B. 研究方法

1) マウスの気管内に LPS (大腸菌由来)、H1N1 インフルエンザウイルス (PR8) 加熱死菌を接種することで急性肺障害モデルを作製した。

2) FARDS モデルを作製するために、LPS を気管内投与する 24 時間前に α -GalCer を投与し、コントロールとして α -GalCer の代わりに PBS を投与したグループと比較検討した。

3) α -GalCer/LPS による急性肺傷害における各種炎症性サイトカインの産生動態を調べるために、BioPlex ELISA キットを用いて気管支肺胞洗浄液 (BALF)、肺ホモジネート中の 23 種類のサイトカイン、ケモカインについて経時的に測定した。また、TNF- α 、IFN- γ については、通常の ELISA キットを用いて測定した。

4) 肺内で増加する炎症細胞について調べるために、BALF あるいは肺ホモジネート中の白血球を各種抗体で染色後、フローサイトメトリーにて解析を行った。また、細胞内に発現する TNF- α や IFN- γ について

も抗体で染色し同様に解析した。

5) TNF- α や Gr-1 陽性細胞の役割を解析するために、それぞれに対する抗体を投与しその影響について検討した。

C. 研究結果

1) 気道内に LPS を投与するだけでは、肺胞隔壁の肥厚など軽度の炎症反応はみられるものの、一過性的な変化にとどまった。しかし、LPS の 24 時間前に α -GalCer を先行投与したところ、肺胞腔内への好中球を主体とする炎症細胞の著明な浸潤や硝子膜形成、肺胞出血を伴う激しい炎症性変化が出現し、2 日の経過で全例の死亡が観察された。

2) α -GalCer を先行投与したグループでは、LPS の単独投与群と比較して、肺内での顕著な TNF- α 及び IFN- γ 産生が観察された。同時に IL-1 β 、IL-6、IL-12、IL-17、MCP-1、KC など多くの炎症性サイトカイン、ケモカインの経時的な産生が認められた。

3) 抗 TNF- α 中和抗体を投与すると、 α -GalCer/LPS による FARDS の発症が完全に消失し、マウスも全例生存した。一方、コントロール rat IgG 投与ではそのような効果は全く観察されなかった。

4) α -GalCer の先行投与によって肺内に Gr-1 陽性細胞の出現が観察され、これらの細胞内に TNF- α の明確な発現が観察された。Gr-1 陽性細胞は bright+、dull+ に分けられるが、TNF- α の発現は特に dull+ 細胞に明瞭に認められた。

5) 抗 Gr-1 抗体を投与すると、肺内からほぼ完全に Gr-1 陽性細胞が消失するとともに、TNF- α 産生がほぼ消失し、肺内の炎症反応の軽減、死亡率の低下が観察された。

6) LPS の代わりに H1N1 インフルエンザウイルス死菌を投与したところ、 α -GalCer の先行投与にも関わらず肺の炎症反応の増強は認められなかった。

D. 考案

LPS の気道内投与モデルは、H5N1 の場合と同様に直接損傷による急性肺障害と考えられ、その発症機序の解明に有用である。今回の研究によって、LPS モデルにおいても肺炎球菌モデルと同様な結果が得られたことから、これらの知見は直接損傷による ALI/ARDS に共通の現象である可能性が考えられ、H5N1 による ALI/ARDS の発症にも関与している可能性が推察される。

これまでの多くの研究では ALI/ARDS モデルとして LPS の静脈投与あるいは気管内投与が行われてきた。しかし、肺内に炎症反応が誘導されるものの一過性であり、組織学的にも ARDS とは言い難いものであった。ARDS は臨床的に重篤化することが多く、治療が困難な状況にあるため、より有効な治療法の開発が強く望まれている。そのためにも、より適切な動物モデルの開発が重要である。今回の研究で、LPS の気管内投与に先行して NKT 細胞の活性化剤を投与することで、これまで観察されることがなかった激しい炎症性変化が肺内に惹起され、同時に著明な炎症性サイトカイン・ケモカイン産生が認められ、致死的な経過を呈したことから、より ARDS に近いモデルの作成に成功したと考えている。近年、中国のグループから H5N1 感染によってマウスの肺内に激しい炎症変化を誘導できたと報告されたが (Am. J. Respir. Crit. Care Med. 174: 1011-1017, 2006)、我々のモデルで

見られた肺の肉眼的、組織学的変化はこれと極めて類似するものであった。

ARDS のメディエーターとして多くのものが報告されているが、その中で TNF- α は重要なサイトカインとして位置づけられている。H5N1 による肺炎で死亡した患者の剖検肺の免疫組織化学的検討でも、TNF- α の著明な発現が報告されている (Lancet 363: 617-619, 2004)。これらの報告と一致して、今回の研究でも、TNF- α が極めて重要なサイトカインであることが明らかとなり、中和抗体の投与によって FARDS の発症が完全に阻止されるほどであった。また、TNF- α の産生細胞として、Gr-1 陽性細胞の存在も明らかにし、この細胞の役割についても今後の展開が大いに期待されるであろう。

一方、H5N1 感染による FARDS の病態を解明するためには、ウイルスを用いたモデルの作成が望まれるが、現時点では安全上の問題からその実施は困難な状況である。したがって、今回は H1N1 死菌を用いてパイロット的に解析を行ったが、LPS とは異なり α -GalCer の先行投与によっても FARDS の誘導には成功しておらず、このことから生きたウイルスの肺内での増殖が重要な可能性が推察される。今後は H1N1 の生菌を用いた同様な解析を行うことによって、この点についてアプローチしていく予定である。

本年度の研究によって、FARDS の発症病態に NKT 細胞の活性化が深く関与していることが推察されるが、H5N1 による FARDS やヒトにおいてもそうなのか今後の詳細な解析が必要である。また、今回の解析から TNF- α が重要なメディエーター

として浮かび上がってきたため、本サイトカインをターゲットとした治療法の可能性が考えられ、今後はその開発を目指して、これまでに TNF- α の作用を抑制することが知られている薬剤についてこのモデルを用いた有用性及びその作用機序について詳細な検討を行っていきたい。

E. 結論

本年度の研究によって FARDS の動物モデルの作成に成功した。FARDS の発症に、NKT 細胞の活性化が深く関与するとともに、Gr-1 陽性細胞から産生される TNF- α が重要な役割を担う可能性が予想された。

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

- 1) 八田益充、仲村 究、位田 剣、青柳哲史、宮里明子、山本夏男、賀来満夫、川上和義: 肺炎球菌感染初期防御における TNF- α 産生細胞の解析、第 82 回感染症学会総会学術集会、島根、2008 年 4 月。
- 2) 青柳哲史、位田 剣、八田益充、宮里明子、山本夏男、賀来満夫、川上和義: LPS 投与マウス急性肺障害モデルにおける Gr-1 陽性細胞の意義、第 48 回日本呼吸器学会学術集会、神戸、2008 年 6 月。
- 3) 青柳哲史、山本夏男、位田 剣、丹野大樹、賀来満夫、川上和義: α -GalCer-priming LPS 誘導 ALI/ARDS モデルにおけるサイトカインと Gr-1 陽性細胞の解析、第 38 回日本免疫学会総会

学術集会、京都、2008 年 12 月。

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