

- regulates GATA3-induced Th2 cell differentiation and Th2-dependent inflammatory responses. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 12 月 2-4 日, 2009.
19. 田口純、櫻本昌輝、松長修、常世田好司、岡田美鈴、中山俊憲、板倉光夫、橋本香保子 分泌小胞輸送複合体 exocyst complex のサブユニットである Sec8 分子の脾臓 B 細胞の分化過程における機能解析/The involvement of Sec8 molecule, a subunit of exocyst complex which supports vesicle trafficking, for activation process of B cell. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 12 月 2-4 日, 2009.
 20. Sawada, K., Taguchi, J., Ito, T., Nakayama, T., and Hashimoto, K. 樹状細胞に発現する CD69 分子の IL-17 産生細胞誘導への関与/The function of CD69 molecules on dendritic cells to induce IL-17 producing cells. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 12 月 2-4 日, 2009.
 21. Hasegawa, A., Nakayama, T., and Shirai, M. 腸炎の発症における CD69 分子の役割 /Crucial role for CD69 in the pathogenesis of experimental colitis. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 12 月 2-4 日, 2009.
 22. 岩村千秋、北島雅之、篠田健太、渡邊友紀子、平崎能郎、遠藤裕介、鈴木茜、中山俊憲 Zfp35 欠損マウスにおける Th2 細胞分化とアレルギー性気道炎症反応の亢進/Enhanced Th2 cell differentiation and allergen-induced airway inflammation in Zfp35-deficient mice. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 12 月 2-4 日, 2009.
 23. 櫻本昌輝、澤田景子、田口純、石川裕美子、山本俊一、板倉光夫、中山俊憲、橋本香保子 マクロファージ細胞株にみられる分泌輸送分子 Sec8 の貧食システムへの関与 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 9-12 日, 2009.
 24. 山下政克、桑原誠、東福寺聡一、中山俊憲 Regulation of GATA3-induced immune responses by the transcription factor Sox4. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 9-12 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
 - 2) 出願中

出願番号：PCT/US2008/078506（米国）

発明の名称：Imageable rodent model of asthma

発明者：Akihiro Hasegawa, Toshinori Nakayama, Meng Yang
 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（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

Ventilator-induced lung injury (VILI)モデルマウスの作製とその病態解析 サイトカイン、ケモカインの関与について

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 河内正治 国立国際医療センター
志賀由佳 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
荒谷康昭 横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科
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 教授)

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)モデルマウスを作製し、そのモデルマウスによる解析を進めてきた。気管切開下の人工呼吸において、高換気量と低換気量による比較をしたところ、30分以上の人工呼吸により肺胞洗浄液(BALF)中のTNF- α 、IL-6、KC、IL-1 β 、G-CSF、IFN- γ 、MCP-1、MIP-1 β など proinflammatory cytokines が高換気量では低換気量に比べ、上昇することを示してきた。血清中でも高換気量では、BALFでの変化と同様にTNF- α 、IL-1 β 、IL-6、KCが経時的に著明に増加することが認められた。

また、これらのVILIの進展に好中球が重要な役割を果たしていると考えられることから、ミエロペルオキシダーゼ欠損(MPO-KO)マウスを用い、同様の測定を行ったところ、IL-9、RANTES、IFN- γ の上昇が認められなかった。さらに、好中球エラスターゼ阻害薬としてすでに臨床応用されている、sivelestat Naを投与し効果をみたところ、IL-9、IL-10、RANTES、IFN- γ の上昇が抑制された。

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 Ventilator-induced lung injury (VILI)モデルマウスを用い、急性肺障害発症および進

行の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。また、その病態への好中球の関与について検討するため、ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスおよび治療薬としての好中球エラスターゼ阻害薬を用いその効果を調べる。

B. 研究方法

マウス(BALB/c)を麻酔下に気管切開、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人工呼吸を継続する(高換気量群、低換気量群)。一定時間(15~360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した。血液中、BALF中の多種のサイトカイン、ケモカインを測定し、その変動を検討した。摘出肺およびBALF中の病理学的検索を行った。

病態に関連すると考えられる好中球の関与について、ミエロペルオキシダーゼ欠損(MPO-KO)マウスを用い、同様の測定を行った。治療薬としての可能性を検討するため、好中球エラスターゼ阻害薬 sivelestat Naの投与を行い同様の測定を行った。

(倫理面への配慮)

マウスへの処置はいずれも十分な麻酔下で施行し、人工呼吸中も麻酔を維持した。組織の摘出は、適切な安楽死処置後に施行した。

C. 研究結果

高換気量と低換気量による比較をしたところ、30分以上の人工呼吸により肺胞洗浄液(BALF)中のTNF- α 、IL-6、KC、IL-1 β 、G-CSF、IFN- γ 、MCP-1、MIP-1 β など proinflammatory cytokines が高換気量では低換気量に比べ、上昇することを示した。血清中でも高換気量では、BALFでの変化と同様にTNF- α 、IL-1 β 、IL-6、KCが経時的に著明に増加することが認められた。

また、好中球が重要な役割を果たしていると考えられることから、MPO-KOマウスを用い、同様の測定を行ったところ、IL-9、

RANTES、IFN- γ の上昇が認められなかった。さらに、好中球エラスターゼ阻害薬としてすでに臨床応用されている、sivelestat Naを投与し効果をみたところ、IL-9、IL-10、RANTES、IFN- γ の上昇が抑制された。BALF中への好中球、マクロファージなどの炎症性細胞は高換気量群の時間経過とともに増加が認められた。

D. 考案

高換気量における人工呼吸の継続により、肺組織中には早期から炎症性サイトカインの分泌が認められ、かなり早期に炎症が発症、進行し、肺障害へと進展する可能性が示唆された。その進展には、MPO-KOマウスでの変化と好中球エラスターゼ阻害薬の効果から、好中球が重要な役割を持っていることが示唆された。しかし、それらの効果は部分的であることから、好中球エラスターゼ阻害薬の治療薬としての有用性については、結論付けることは出来なかった。

E. 結論

ARDSの発症機序を解明する端緒として、Ventilator-induced lung injury (VILI)モデルマウスを作製し、高換気量での人工呼吸により、早期から肺内での炎症が発症し、経時的に進行することが示された。また、これらのVILIの進展に好中球が重要な役割を果たしていることも示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. Yasuhiro MAEHARA, Shoji KAWACHI, Tomokazu NAGao, Zou JUN, Masamichi OSHIMA, and Kazuo SUZUKI. Cytokines and chemokines in the early phase of ventilator-induced lung injury model in mice. 2009 International Anesthesia Research Society Annual Meeting, San Diego, CA, USA, March 14-17, 2009

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

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国際臨床研究センター・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：我々は、近年腹腔マクロファージを中心に研究した結果、ケモカインレセプターとそのライガンドが腹腔マクロファージの発生に極めて重要な役目を担っていた事をつきとめた。更にまた高濃度のライガンド暴露により腹腔マクロファージ凝集しはじめ、更には腹腔膜上皮細胞を巻き込んで更に凝集し巨大な塊と成る事が認められている。本研究では、肺に於いても同様な現象が起こらないかと考え、マイクロ RNA 治療のターゲットとしての候補遺伝子を探索する可能性を検討した。本年度の研究に於いては、肺胞に存在する肺胞マクロファージについて検討し解析した。

A. 研究目的

ARDS の発症は、原因不明の場合も有るが、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 に至る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方法、手段を検討する。

その為本年は、肺胞内に存在するマクロファージがどのような刺激で巨大集塊物を形成するかを検討した。

B. 研究方法

1) 臓器特異的ケモカイン受容体の特定

法

本研究方法は、腹腔マクロファージの発に必要なケモカインレセプターを特定法と基本的には同じ方法で行なった。すなわちマウス生体組織から特定のマクロファージを分離する（詳しい方法については Hoshino et. al. を参考に）。その後ケモカインレセプターのメッセンジャー RNA をサンプルする。次にそのメッセンジャー RNA 量を、骨髓のナイーブなマクロファージに於いても解析する。特定臓器のマクロファージの特定マクロファージの RNA との量比を比べて有為であるものをリストし解析し関連ケモカインの候補を選ぶ。

解析した発現遺伝子は以下の通り。

CCL1	Scya1	I-309, TCA-3
CCL2	Scya2	MCP-1
CCL3	Scya3	MIP-1 α
CCL4	Scya4	MIP-1 β
CCL5	Scya5	RANTES

CCL6	Scya6	C10, MRP-2	CXCL5	Scyb5	ENA-78
CCL7	Scya7	MARC, MCP-3	CXCL6	Scyb6	GCP-2
CCL8	Scya8	MCP-2	CXCL7	Scyb7	NAP-2, CTAPIII, β -Ta, PEP
CCL9/CCL10	Scya9	MRP-2, CCF18,	CXCL8	Scyb8	IL-8, NAP-1, MDNCF, GCP-1
MIP-1 γ			CXCL9	Scyb9	MIG, CRG-10
CCL11	Scya11	Eotaxin	CXCL10	Scyb10	IP-10, CRG-2
CCL12	Scya12	MCP-5	CXCL11	Scyb11	I-TAC, β -R1, IP-9
CCL13	Scya13	MCP-4, NCC-1, Ck β 10	CXCL12	Scyb12	SDF-1, PBSF
CCL14	Scya14	HCC-1, MCIF, Ck β 1, NCC-2,	CXCL13	Scyb13	BCA-1, BLC
CCL			CXCL14	Scyb14	BRAK, bolekin
CCL15	Scya15	Leukotactin-1, MIP-5, HCC-2,	CXCL15	Scyb15	Lungkine, WECH
NCC-3			CXCL16	Scyb16	SRPSOX
CCL16	Scya16	LEC, NCC-4, LMC, Ck β 12	CXCL17	VCC-1	DMC, VCC-1
CCL17	Scya17	TARC, dendrokin, ABCD-2			
CCL18	Scya18	PARC, DC-CK1, AMAC-1, Ck β 7, MIP-4			
CCL19	Scya19	ELC, Exodus-3, Ck β 11			
CCL20	Scya20	LARC, Exodus-1, Ck β 4			
CCL21	Scya21	SLC, 6Ckine, Exodus-2, Ck β 9, TCA-4			
CCL22	Scya22	MDC, DC/ β -CK			
CCL23	Scya23	MPIF-1, Ck β 8, MIP-3, MPIF-1			
CCL24	Scya24	Eotaxin-2, MPIF-2, Ck β 6			
CCL25	Scya25	TECK, Ck β 15			
CCL26	Scya26	Eotaxin-3, MIP-4 α , IMAC, TSC-1			
CCL27	Scya27	CTACK, ILC, Eskine, PESKY, skinkine			
CCL28	Scya28	MEC			
CXC ケモカイン 名称	遺伝子	別名			
CXCL1	Scyb1	Gro- α , GRO1, NAP-3			
CXCL2	Scyb2	Gro- β , GRO2, MIP-2 α			
CXCL3	Scyb3	Gro- γ , GRO3, MIP-2 β			
CXCL4	Scyb4	PF-4			

C. 研究結果

今回解析したマウス肺胞マクロファージについて、研究方法にリストしたケモカインレセプターの発現量は、骨髄のナイーブなマクロファージとケモカインレセプター発現量と有為な差は見つからなかった。

D. 考察

1) 達成度について

肺臓器に関連するマクロファージとして、腹腔マクロファージ、肺間質マクロファージ、胸膜マクロファージの3つがあげられる。

今回試みた腹腔マクロファージでは有為な差は認められなかったため、肺胞特異的ケモカインレセプター、および特異的ケモカインは同定出来なかった。

2) 成果の学術的・国際的・社会的意義について：これまでに腹腔マクロファージ、破骨細胞マクロファージ、などに於けるケモカインレセプターをそれぞれの臓器特異

的ケモカインレセプターを特定出来ている。今回の結果では特定されなかった。

3) 今後の展望について：本研究では、ARDS治療に向けて有効なiRNA治療を行なう事が目的である。そのため有効な標的遺伝子を探索する必要がある。今回、肺関連ケモカインをそのターゲットにして探索していたが、肺胞マクロファージにはその臓器特異的ケモカインを探索する事が能わなかった。今後、肺間質マクロファージ、胸膜マクロファージにて同様の解析を行ない肺臓器特異的ケモカインの探索を行なうと同時にケモカインとは異なるARDSに有効な関連遺伝子を探索する。

その遺伝子を用いiRNAを設計し細胞内に導入し、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ました。マイクロRNAは、特定のmRNAに作用して、mRNAの翻訳を抑制します。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。

今回は、肺臓器に関連する3種類のマクロファージ、腹腔マクロファージ、肺間質マクロファージ、胸膜マクロファージに対して肺胞マクロファージについて解析したが、今回試みた腹腔マクロファージでは有為な差は認められなかったため、肺胞特異的ケモカインレセプター、および特異的ケ

モカインは同定出来なかった。

今後残りの2つの細胞について検討するとともに、その他の有効な遺伝子を探索する。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujioka K, Manabe N, Nomura M, Watanabe M, Takeyama H, Hoshino A, Hanada S, Yamamoto K., Manome Y. Detection of thyroid carcinoma antigen with Quantum dots and monoclonal IgM antibody (JT-95) systems. J. Nanomater. 2010; in press
- 2) Yamamoto S, Manabe N, Yamamoto K. High-Definition Slit Lamp Video Camera System. Ophthalmic Surgery, Lasers & Imaging January/February 2010 Vol 41, No 1; in press
- 3) Shiohara A, Hanada S, Prabakar S, Fujioka K, Lim T, Yamamoto K., Northcote P, Tilley RD. Chemical Reactions On Surface Molecules Attached to Silicon Quantum Dots. J Am Chem Soc. 2010 Jan 13;132(1):248-253.
- 4) Fujioka K, Arakawa E, Kita J, Aoyama Y, Okuda T, Manome Y, Yamamoto K. Combination of Real-Value Smell and Metaphor Expression Aids Yeast Detection. PLoS ONE 4 (11), e7939, 2009.
- 5) Prabakar. S, Shiohara. A, Hanada. S, Fujioka. K, Yamamoto. K., and Tilley. RD Size Controlled Synthesis of Germanium Nanocrystals with Hydride Reducing Agents and their Biological Applications Chemistry of Materials, in press.
- 6) Sudoh K, Hirakuri K, Fujioka K, Manabe N, Yamamoto K. Nanocrystalline diamond particles dispersed by solutions Trans Mater Res Soc Jpn . 2009, 34(2)313-316
- 7) Fujioka K, Futamura Y, Shiohara T, Hoshino A, Kanaya F, Manome Y, Yamamoto K. Amino Acid Synthesis in Supercritical Carbon Dioxide with Water System. International Journal of Molecular Sciences. 2008, 9(6),

2722-2732.doi:10.3390/ijms10062722

Epub ahead of print, 15 June 2009.

- 8) 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 . 2009; Mar; 8(1):51-57. Epub ahead of print, Mar 16, 2009.
- 9) Osinski M, Jovin TM, Yamamoto K.

Introduction to the special section on colloidal quantum dots for biomedical applications.(Review) IEEE Transactions on NanoBioscience . 2009; Mar;8(1):1-3. Epub ahead of print, Mar 16, 2009.

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 (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^{bs} と pAE^{puro} 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 Rh

eoSwitch 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も作製する。

＜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)に導入する。

＜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する。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クローンを選択する。28クローン中7クローン選択できた例を示す。(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。

C. 研究結果

シュードタイプウイルスによる感染及びトランスフェクションにより RheoSwitch System R1のActivator およびReceptorをA549, NCI-H292, huh7-it 及びMDCK 細胞に遺伝子導入しbrastcidine(bsr), puromycine(pur)を選択マーカーとして薬剤選択しNCI-H292-AR 細胞及び MDCK-AR 細胞を作成した。

MDCK-AR細胞にVSGとしてMxA,PKR,IFI44,UBE2L6,NT5C3,G1P2を遺伝子導入しRheoSwitch Systemによる誘導発現細胞(MDCK-AR-MxA,MDCK-AR-PKR,MDCK-AR-IFI44,MDCK-AR-UBE2L6,MDCK-AR-NT5C3,MDCK-AR-G1P2)を作製した。Realtime PCRにより目的とした遺伝子が誘導されることを確認した。(図2)

耐性遺伝子を組み込んだ遺伝子導入MDCK-AR-VSG細胞に耐性遺伝子誘導あるいは非誘導の条件でインフルエンザウイルスUdorn株をチャレンジした。ウイルス感染後時間を追って培養上清中に放出されるウイルス感染価をplaque assayにより測定した。(RSL1による誘導は細胞毒性が無視でき、遺伝子誘導が認められる濃度で行った。)耐性遺伝子の誘導、非誘導によるウイルス産生量の相違、あるいはウイルス産生の遅れは認めなかった。

D. 考案

MDCK、A549,NCI-H292細胞は共にインフルエンザウイルス許容細胞である。しかし今回対象としたMDCK細胞はベースとなるウイルス産生レベルが最も高いため個々の耐性遺伝子の影響が十分に大きくない場合明らかになってこない可能性がもっとも考えられる。今後単独ではなく複数の抵抗性遺伝子を同時に誘導発現させ抵抗性を検討する必要があると思われる。また直接A549細胞に抵抗性遺伝子を導入し検討する必要があると考えられる。

E. 結論

- ①宿主抵抗性遺伝子を誘導発現できる培養細胞を作成した。
- ②インフルエンザ高感受性のMDCK細胞はウイルス抵抗性遺伝子(VSG)候補として上がった遺伝子(MxA,PKR,IFI44,GIP2, UBE2L6,NT5C3,TNFSF10)単独ではウイルス産生に影響をあたえなかった。

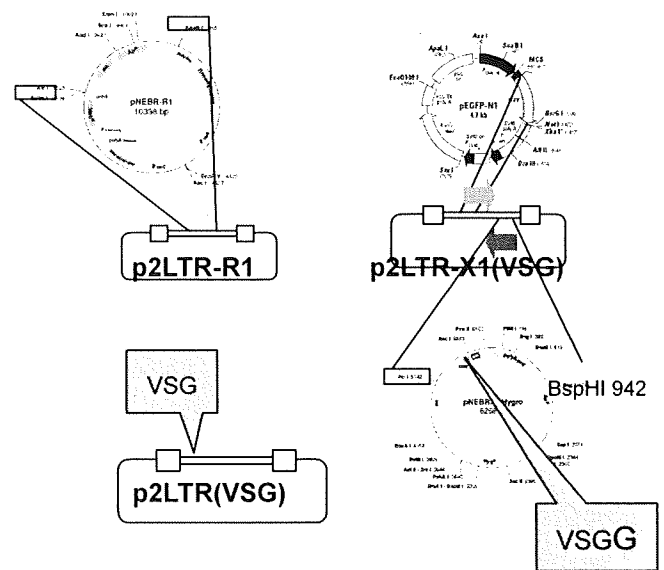
G. 研究発表

- 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 J Urban Health, 2008Jul ;85(4):619-35.
- 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

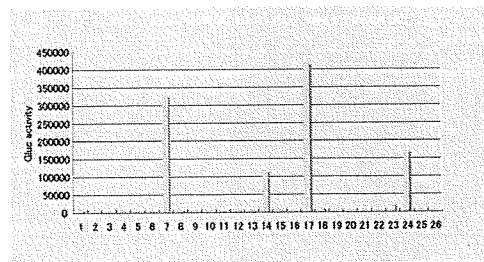
H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

- 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」

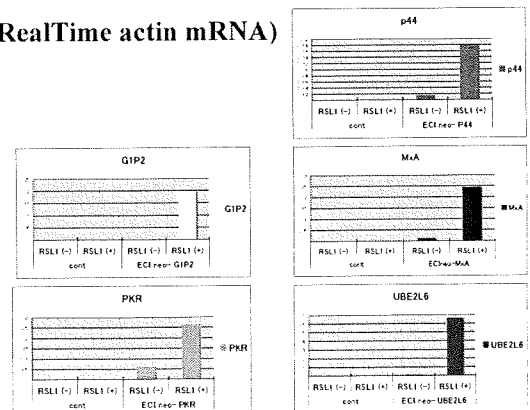


「図1」



「図2」

PCR (copy number:ratio against RealTime actin mRNA)



FARDS マウスモデルの確立とその発症病態の解析 そして新たな治療法開発に関する研究

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 本研究では、Natural Killer T (NKT) 細胞の活性化剤である α -galactosylceramide (α -GalCer) でマウスを感作し、24 時間後に再び LPS を気管内投与することで、ARDS の臨床病態に類似した動物モデルを作成することに成功した。本年度は、このモデルを用いて ARDS の詳細な発症機序の解明を目指して解析を行った。ARDS が誘発される過程で、肺内では interferon (IFN) $-\gamma$ や tumor necrosis factor (TNF) $-\alpha$ の著明な産生増加が認められるとともに、これらのサイトカインに対する中和抗体投与によって肺の炎症軽減、死亡率の改善が観察された。さらに、 α -GalCer の代わりに IFN- γ や TNF- α を投与することで、肺の著明な炎症が誘導された。フローサイトメトリー解析では、肺内における IFN- γ 産生は NKT 細胞、Gr-1^{dull}/Ly-6C⁺単球で認められ、TNF- α 産生は Gr-1^{bright}/Ly-6G⁺細胞（好中球）及び Gr-1^{dull}/Ly-6C⁺単球で検出された。さらに、抗 Gr-1 抗体を投与することで Gr-1⁺細胞を除去すると、死亡率の改善、肺の炎症軽減、TNF- α 及び IFN- γ の産生減少が観察された。これらの結果から、このモデルでは、肺内の NKT 細胞、Gr-1^{dull}/Ly-6C⁺単球、Gr-1^{bright}/Ly-6G⁺好中球が炎症性サイトカインの過剰産生を引き起こすことで、ARDS の発症病態に深く関与することが示唆された。また、現在わが国で ARDS の治療薬として用いられているシベレスタットについて、本モデルでの治療効果について検証したところ、肺内での炎症反応の軽減とともに、生存期間の延長効果が認められた。本研究結果から、今後はヒトの ARDS においても NKT 細胞を標的とした病態解析や治療法の開発が必要になるものと考えられた。

A. 研究目的

ARDS は肺の炎症と血管透過性の亢進を特徴とし、肺におけるガス交換の障害を呈する疾患で、致死率も高く、有効な治療も限られている。鳥インフルエンザ (H5N1) ウイルス感染症では、ARDS を合併し死亡率が高いことが知られている。また、H5N1 インフルエンザ感染症では、ヒト血清中の interferon (IFN) $-\gamma$ 、tumor necrosis factor (TNF) $-\alpha$ 、interleukin (IL) -6 などの炎症性サイトカインの上昇が知られている。また、種々の原因による早期 ARDS 患者の気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中で、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 の上昇を認めると報告されており、こ

れらの炎症性サイトカインが ARDS の発症機序において重要な因子であると考えられてきた。

ARDS の発症機序を解明し、より効果的な治療法を得るためには、よりヒトの病態に近い実験動物モデルの確立が望まれる。ヒトの ARDS では急性発症の呼吸不全を呈し、病理組織学的に肺胞の好中球浸潤、間質・肺胞内における凝固・繊維素の沈着、基底膜の露出を伴った肺胞上皮の傷害を認める。これまで、ARDS の動物モデルは、LPS を全身あるいは気管内に投与したものが多く用いられてきた。LPS 投与による直接的肺傷害では、肺内で大量の炎症細胞の

浸潤を認めるが、この変化は 48 時間程度しか持続せず、肺胞上皮の傷害や血漿成分の滲出もわずかししか確認できない。このように、ARDS の発症・増悪機序を理解するためには、より有用な動物モデルを確立することが重要と考えられる。

これまでに我々は、臨床的にも ARDS を発症して重篤化することで知られている肺炎球菌性肺炎のマウスモデルを確立し、その病態における Natural Killer T (NKT) 細胞の役割に関して解析を行ってきた。NKT 細胞は、自然免疫の時期に機能するリンパ球で、細胞表面に T 細胞抗原受容体と NK 細胞マーカーを発現している T 細胞の総称である。これらの細胞は、樹状細胞上の CD1d に結合した α -galactosylceramide (α -GalCer) などの糖脂質抗原を認識し、速やかに IFN- γ や IL-4 を産生することで強力な免疫調節作用を発揮する。

昨年度までの研究成果として、我々は、NKT 細胞の活性化剤である α -GalCer でマウスを感作し、24 時間後に再び LPS を気管内投与することで、ARDS の臨床病態に類似した動物モデルを作成することに成功した。そこで、本年度は、このモデルを用いることで、ARDS の発症に至る免疫機序について詳細に解析するとともに、現在臨床的に ARDS の治療薬として用いられているシベレスタットのこのモデルにおける治療効果とその作用機序について解析を実施した。

B. 研究方法

1) ARDS モデルマウスの作成 C57BL/6 マウス (6~8 週齢、オス) に、 α -GalCer (1 μ g/マウス) または対照として PBS を気管内に投与し、24 時間後に LPS (50 μ g/マウス) を再度気管内投与した。実験によっては、IFN- γ や TNF- α を気管内に投与した。

2) 病理組織学的検討 肺摘出後 10%フォルマリンで固定し、脱水した後パラフィンで封埋し、ヘマトキシリン・エオジン染色、

エラスティカ・マッソン染色を行った。

3) 肺内白血球分離 マウスをジエチルエーテル吸入麻酔後に脱血し、胸を開き、22 $^{\circ}$ C 静脈留置カテーテルを気管内に挿入した。その後 1ml PBS で 3 回肺胞洗浄を行い、肺胞内の細胞を除去した。次に肺循環を洗浄するため右室から 3ml PBS を注入し、肺微小血管に接着しなかった細胞を除去した。その後摘出した肺をホモジナイズし、20U/ml collagenase、1 μ g/mL DNase I 添加 RPMI1640/10%FCS で 37 $^{\circ}$ C、60 分インキュベートした。肺組織断片を 40 μ m ナイロンメッシュに通過させることで除去後、遠心分離した細胞を 40% Percoll で再懸濁し、80% Percoll の上に静かに重層した。20 $^{\circ}$ C 1600rpm で 20 分遠心分離した後、中間層を回収し、3 回洗浄後肺内白血球とした。

4) 細胞表面抗原と細胞内サイトカインの解析 細胞表面抗体として FITC 標識抗 CD11c 抗体、PE 標識抗 NK1.1 抗体 mAb、Gr-1 抗体、CD11b 抗体、F4/80 抗体、Ly-6C 抗体、Ly-6G 抗体、APC 標識抗 Gr-1 抗体、TCR- β を使用した。細胞表面を染色し 2 回洗浄した後、細胞内サイトカイン染色のため、cytofix/cytoperm (BD Biosciences) で 4 $^{\circ}$ C 20 分インキュベート後、BD perm/wash solution で 2 回洗浄した。その後 PE 標識抗 IFN- γ 抗体又は TNF- α 抗体で細胞内染色を行った。これらの細胞は、Cytomics FC500 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) で解析した。

5) サイトカイン測定 肺ホモジネート中の IFN- γ 、TNF- α 濃度を ELISA にて測定した。

6) 抗体の投与 抗 IFN- γ 抗体 (Clone : R4-6A2) 又は TNF- α 抗体 (Clone : MP6-XT2.2-11) を、LPS 投与 24 時間前、投与時 0 時間、投与後 24 時間に腹腔内投与した。さらに Gr-1 陽性細胞を除去する目的で、抗 Gr-1 抗体 (Clone : RB6-8C5) を同様に投与した。

7) シベレスタットの投与 ARDS マウスに、シベレスタット (50mg/kg) を LPS 投与の 1 日前から 2 日後まで連日腹腔内に投与し、生存期間及び BALF 中の白血球、マクロファージ、好中球数への影響について検討した。

8) 統計学的解析 得られたデータは Stat View II software (Abacus Concept, Inc, Berkeley, CA, USA) を用いて解析された。データは平均 (mean) \pm 標準偏差 (SD) で表している。各群の統計学的解析は ANOVA で多重比較検定を行った (Fisher PLSD test)。生存曲線は Wilcoxon test で解析した。 $P < 0.05$ をもって有意差ありとした。

9) 倫理面への配慮 すべての実験は、東北大学の遺伝子実験委員会及び動物実験委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1) ARDS マウスモデルにおける TNF- α の役割 α -GalCer 前感作/LPS 投与によって誘発される ARDS における TNF- α の役割を検討するために、抗 TNF- α 中和抗体を投与して生存率、病理組織変化への影響を検討した。その結果、生存率は TNF- α 抗体群で対照のラット IgG 群と比較して有意に高く、病理学的検討でも TNF- α 抗体群で炎症性変化や肺胞内出血が対照群と比較して明らかに軽度であった。

さらに、肺における TNF- α 産生が ARDS の発症・増悪に関与すると考え、 α -GalCer 前投与の代わりに TNF- α を気管内投与することで肺への影響を検討した。LPS と TNF- α の同時投与で、 α -GalCer/LPS によって誘発される病理組織学的変化と同様な所見が得られたのに対して、LPS または TNF- α の単独投与ではその変化は軽度かほとんどみられなかった。

4) ARDS マウスモデルにおける IFN- γ の役割 α -GalCer 前感作/LPS 投与によって誘発される ARDS における IFN- γ の役割を

検討するために、抗 IFN- γ 中和抗体を投与して生存率、病理組織変化への影響を検討した。その結果、生存率は IFN- γ 抗体群で対照のラット IgG 群と比較して有意に高く、病理学的検討でも IFN- γ 抗体群で炎症性変化や肺胞内出血が対照群と比較して明らかに軽度であった。

さらに、肺における IFN- γ 産生が ARDS の発症・増悪に関与すると考え、 α -GalCer 前投与の代わりに IFN- γ を気管内投与することで肺への影響を検討した。IFN- γ を前投与することで、 α -GalCer 前感作/LPS 投与によって誘発される病理組織学的変化と同様な所見が得られたのに対して、LPS または IFN- γ の単独投与ではその変化は軽度かほとんどみられなかった。

5) ARDS マウスモデルにおける IFN- γ と TNF- α 産生細胞の解析 肺内での IFN- γ 産生細胞を明らかにするために、肺ホモジネートから分離した白血球のフローサイトメトリー解析を行った。その結果、 α -GalCer 前投与群において、NKT 細胞及び NK 細胞からの IFN- γ 発現を認めた。骨髄由来の Gr-1 陽性細胞にも IFN- γ の発現を認めるか検討したところ、Gr-1^{dull+}細胞で IFN- γ の発現を認めた。同様に、肺内での TNF- α 産生細胞を解析したところ、 α -GalCer の前投与群において、NKT 細胞と NK 細胞いずれも TNF- α を発現していなかったが、Gr-1^{bright+}細胞及び Gr-1^{dull+}細胞に TNF- α の発現が認められた。Gr-1^{bright+}細胞は CD11c-、CD11b+、Ly-6C-、Ly-6G+、F4/80-、Gr-1^{dull+}細胞は CD11c \pm 、CD11b+、Ly-6C+、Ly-6G-、F4/80+ を発現していることが分かり、それぞれ好中球、単球であることが示唆された。

6) ARDS マウスモデルにおける Gr-1 陽性細胞の役割 α -GalCer 前感作/LPS 投与によって誘発される ARDS における Gr-1 陽性細胞の役割を検討するために、抗 Gr-1 抗体を投与して生存率、病理組織変化への影響を検討した。その結果、生存率は Gr-1 抗体群

で対照のラット IgG 群と比較して有意に高く、病理学的検討でも Gr-1 抗体群で炎症性変化や肺胞内出血が対照群と比較して明らかに軽度であった。さらに、Gr-1 抗体投与による肺の TNF- α 及び IFN- γ 産生は、ラット IgG 投与群と比較し減少傾向にあり、特に TNF- α 産生は著明に低下していた。これらの結果から、Gr-1 陽性細胞は TNF- α 及び IFN- γ を産生し、ARDS の発症増悪過程において重要な細胞集団であることが示唆された。

7) シベレスタットによる治療効果

ARDS の新たな治療法を探索するために、我々が開発したマウスモデルを用いることで、シベレスタットの治療効果について検討を行った。 α -GalCer/LPS 投与群では全例が死亡するが、シベレスタット投与群では有意に生存期間の延長が観察された。肺内の炎症反応では、シベレスタット投与群で白血球数及び好中球数の有意な減少が認められ、その治療効果と一致する結果であった。しかしながら、TNF- α 、IFN- γ などの炎症性サイトカインは両群間で明らかな差は認められなかった。

D. 考案

NKT細胞は α -GalCerにより抗原提示細胞上の CD1d を介して活性化され、速やかに大量の IFN- γ および IL-4 の産生を認めることが知られている。また、NKT細胞は、ヒトやマウスの感染症やアレルギー性疾患において Th1 細胞、Th2 細胞の分化誘導を促進する重要な免疫調整細胞として機能している。種々の免疫応答における NKT細胞からの IFN- γ 産生は、肺感染症において生体防衛的に働き、さらにブレオマイシン誘導肺繊維症モデルでは抗繊維化効果として知られている。しかし、ARDS における肺の IFN- γ 産生の役割は十分解明されておらず、致死性敗血症モデルにおいて IFN- γ の関与が報告されているのみである。今回、

α -GalCer の気管内投与による肺内での IFN- γ 産生、および IFN- γ を直接気管内に投与することで、その後の LPS に対する反応が増強し、TNF- α 産生を伴って炎症性変化の増悪を認めた。また、 α -GalCer 前投与後の LPS 誘発 ARDS マウスに IFN- γ の中和抗体を投与することで肺傷害の軽減、死亡率の改善も認めた。これらの結果より、 α -GalCer 投与による肺の IFN- γ 産生が ARDS の発症・増悪因子の一つとなると考えられた。

ARDS の発症機序において、マクロファージ上の特異的なパターン認識受容体が刺激され、TNF- α や IL-1 β といった炎症誘発性のサイトカインが産生される。また、TNF- α の静脈投与は、動物モデルで敗血症と同等の病態を呈することが知られている。今回の検討では、肺内での過剰な TNF- α 産生が炎症細胞の集積と肺損傷に関与しており、ARDS の発症増悪因子として重要なサイトカインと考えられた。これらの検証を TNF- α 中和抗体を用いることで、 α -Gal Cer 前投与後の LPS 誘発 ARDS マウスで病理組織学的に肺の炎症の軽減と死亡率の改善を認めた。興味深いことに、抗 TNF- α 抗体投与による生存率の影響は、抗 IFN- γ 抗体を投与した群より低く、さらに抗 IFN- γ 抗体投与による肺の TNF- α 濃度を α -GalCer 前投与し LPS 投与 6 時間後で検討したが、TNF- α の抑制を認めなかった。全身性シュワルツマン反応で IFN- γ が致死性因子と知られているが、今回の検討でも LPS 誘発性 ARDS マウスにおける発症・増悪に肺の TNF- α 産生量より IFN- γ が深く関与していると考えられた。

これまでに LPS を用いた急性肺傷害の検討では、TNF- α を産生したマクロファージによって活性化された単球や好中球が、肺に集積し肺傷害を引き起こすことが知られている。また、LPS 刺激により好中球も

TNF- α を産生することが知られている。LPSを経鼻投与し、Gr-1陽性好中球が肺腔へ集積する過程を肺の血管床、間質、肺胞内の各コンポーネントで検討した報告があるが、ARDS動物モデルでTNF- α を産生した好中球を含めたGr-1陽性細胞についての検討は報告がない。抗Gr-1抗体は成熟好中球の表面抗原 (Ly-6G) とのみ結合すると考えられていたが、好中球、樹状細胞、単球、マクロファージ、リンパ球に発現しているLy-6C抗原と交差反応を起こすことが知られている。また、血中の白血球をフローサイトメトリーで検討した報告によると、Gr-1^{high}/Ly-6G⁺好中球とGr-1^{int}/Ly-6C⁺単球、Gr-1/Ly-6C⁺単球が存在し、さらにGr-1^{int}/Ly-6C⁺単球はその他CD11b、F4/80、CCR2を発現し炎症性単球/マクロファージと呼ばれている。我々の検討でも、 α -Gal Cer前投与しLPS投与後3時間で、好中球

(Gr-1^{bright}/Ly-6G⁺細胞) だけでなく、単球領域のGr-1^{dull}/Ly-6C⁺/F4/80⁺細胞が肺内に集積し、これら二つの異なったGr-1陽性細胞がTNF- α を産生していることが分かった。興味深いことに、Gr-1^{dull}細胞はBALF中に認めず、肺間質にのみ認めることから、肺胞/上皮間でトラップされていると考えられ、このことは以前報告されている敗血症モデルマウスにおいても同様であった。さらに、Gr-1^{dull}細胞はNKT細胞と同様にIFN- γ を産生していることが明らかになった。近年、様々な病態でGr-1陽性単球の役割の検討がされている。例えば、Salmonella経口感染モデルで、感染組織に好中球より有意にGr-1陽性単球が集積し、TNF- α やiNOSを産生し、感染防御機構において重要な働きをしている。心筋梗塞モデルマウス

で、Ly-6C陽性単球が高い蛋白融解活性やTNF- α を産生し、組織損傷を引き起こし、さらに組織修復過程にも傷害を与えることが知られている。さらに、全身性シュワルツマン反応を用いた敗血症モデルマウスで、TNF- α 産生 Gr-1陽性単球が肺に集積し、肺傷害の中心的な役割を果たすことが報告されている。こうして、Gr-1^{dull}/Ly-6C⁺細胞は肺の炎症組織に集積し、ARDSの発症・増悪において重要な細胞集団であると考えられた。

好中球およびGr-1⁺単球の組織傷害性を検討するために、抗Gr-1抗体を用いてこれらのGr-1陽性細胞を枯渇化させることで検証した。これまでに、Gr-1抗体は急性肺傷害モデルマウスを含め、多様な疾患モデルマウスにおける病態解析で用いられてきた。今回用いた抗Gr-1抗体を全身投与することで、Gr-1⁺/Ly-6G⁺好中球だけでなくGr-1⁺/Ly-6C⁺単球/マクロファージを除去することができる。今回我々が作成したARDSモデルマウスに抗Gr-1抗体を投与した結果、肺に二つの異なったGr-1⁺細胞を認めず、肺内で有意にTNF- α の産生低下、IFN- γ の減少傾向、炎症の軽減、死亡率の改善を認めた。さらに、TNF- α の産生量がLPS単独気管内投与と同程度まで低下していることを考えると、 α -GalCerを前投与することで増加するGr-1^{dull}/Ly-6C⁺単球からのTNF- α 産生がよりARDSの発症・増悪機序において重要な細胞であると考えられた。

最後に、本研究班の重要な目的の一つである H5N1 感染によって誘発される劇症型ARDS に対する新たな治療法開発のために、現在わが国で用いられているシベレスタットについて、その治療効果を本モデルで検証した。生存延長効果に関して検討したと

ころ、有意な治療効果が認められたことから、有望な治療薬の候補となり得ることが期待された。さらには、シベレスタットの投与により、肺内での好中球を中心とした炎症細胞の集積が明らかに低下したことから、作用機序の一つになっている可能性が予想された。今後は、本薬剤の作用機序をさらに明らかにしていくとともに、可能性のある他の薬剤についても治療効果とその作用機序について検証する必要があると考えられた。

E. 結論

本研究では、 α -GalCer 前感作/LPS 投与によって誘発される ARDS モデルマウスでは、肺内での IFN- γ や TNF- α のような炎症性サイトカインの著明な産生増加が認められるとともに、これらのサイトカイン産生に、近年注目されている Gr-1⁺単球が深く関与することが明らかになった。また、わが国において ARDS の治療薬として用いられているシベレスタットが本モデルにおいても有効であることが示された。本研究結果から、H5N1 感染に伴う ARDS でも同様な機序が関与している可能性が推察され、その詳細な病態、並びに新たな治療法を開発するための有用なモデルとなることが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hatta M, Yamamoto N, Miyazato A, Ishii N, Nakamura K, Inden K, Aoyagi T, Kunishima H, Hirakata Y, Suzuki K, Kaku M, Kawakami K. Early production of tumor necrosis factor- α by Gr-1⁺ CD11b⁺ mononuclear cells and its role in the host defense to pneumococcal infection in lungs. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 58: 182-192, 2010.

2. 学会発表

- 1) 青柳哲史, 山本夏男, 位田 剣, 八田益充, 國島広之, 矢野寿一, 平潟洋一, 賀来

満夫, 川上和義. LPS を用いた新規急性肺傷害 (ALI/ARDS) モデルマウスの作成とその病態の解析. 第 83 回日本感染症学会学術講演会, 東京, 4 月 2009.

- 2) 青柳哲史, 山本夏男, 國島広之, 平潟洋一, 賀来満夫, 川上和義. 新規 ALI/ARDS モデルマウスの作成と関与する細胞とサイトカインの解析. 第 49 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 6 月 2009.
- 3) 川上和義, 青柳哲史, 丹野大樹, 山本夏男, 賀来満夫. 新規マウスモデルを用いた ARDS の発症病態の解析. 第 15 回 MPO 研究会, 宇都宮, 11 月 2009.
- 4) Tanno D, Abe Y, Tanaka M, Ishii K, Aoyagi T, Yamamoto N, Kaku M, Kawakami K. Contribution of Gr-1⁺ cells to the pathogenic mechanism in a new model of systemic inflammatory response syndrome. 第 39 回日本免疫学会総会学術集会. 大阪, 12 月 2009.

1. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

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 熊本大学大学院生命科学研究部 微生物学分野 教授
研究協力者 岡本竜哉 熊本大学大学院生命科学研究部 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。我々はこれまで、マウスのインフルエンザウイルス肺炎モデルを用いて、NO・ROSによる蛋白質、核酸、脂質といった生体分子の酸化・ニトロ化修飾による酸化ストレスについて解析を行ってきた。特に、蛋白質チロシン残基や核酸塩基グアニンに着目した結果、誘導型 NO 合成酵素（iNOS）の誘導に伴う過剰な NO の産生に依存して、感染局所にて 3-ニトロチロシン（3-NT）や 8-ニトログアニン関連化合物が生成することを、免疫組織染色法や HPLC-電気化学検出（ECD）法により証明し、病態との関連性やバイオマーカーとしての有用性について報告してきた。

そこで本研究では、高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1）感染症を含む小児の劇症型 ARDS 症例における血漿蛋白質中の 3-NT の解析を試みた。2008-2009 年にベトナム・ハノイ国立小児病院にて入院加療を受けた ARDS 症例（27 例・36 検体）を対象とし解析を行ったところ、6 検体において高いレベルの血漿蛋白質 3-NT の生成を認めた。3-NT のレベルは、死亡例に比べ生存例にてより高く、また呼吸不全が重度の例に比べ軽度の例にてより高い傾向がみられた。現在、症例数をさらに増やすとともに、気道洗浄液についても解析を加え、この傾向の検証を行っている。

これまで一般に用いられてきた 3-NT の検出法は、免疫染色法や ELISA 法といった抗体を用いる方法であるが、定量性や特異性に問題があることが指摘されている。HPLC-ECD 法は、抗体に依らない定量的かつ特異的な検出法で、3-NT のバイオマーカーとしての臨床応用において、有用なツールになり得るものと期待される。

A. 研究目的

我々はこれまで、マウスのインフルエンザウイルス肺炎モデルを用いて、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酸化・ニトロ化修飾によってもたらされる機能変化（酸化ストレス）について研究を行って

きた。特に、蛋白質チロシン残基や核酸塩基グアニンの酸化・ニトロ化反応に着目し解析した結果、誘導型 NO 合成酵素（iNOS）の誘導に伴う過剰な NO の産生に依存して、感染局所において 3-ニトロチロシン（3-NT）や 8-ニトログアニン関連化合物が生成することを、免疫組織染色法や HPLC-電気化学

検出 (ECD) 法により証明し、病態との関連性やバイオマーカーとしての有用性について報告してきた。

これまで、ヒトや動物の様々な感染・炎症性病態において、病巣局所にて 3-NT が生成することが、免疫染色法や ELISA 法などを用いて数多く報告されているが、このような抗体を用いる解析法は、定量性や特異性に問題があることがしばしば指摘されている。また、多くの報告において、組織破砕液や気管支肺胞洗浄液といった生体試料が解析の対象となっているが、ヒトにおいては侵襲が大きく、特に重症例では試料を得ることが困難である。この点、血液は比較的非侵襲的に得られる生体試料で、多くの症例で採取することが可能だが、血漿を用いて 3-NT を検出し得た報告は極めて限られているのが現状である。それは、元々のレベルが低いことに加え、血漿中に含まれる様々な夾雑物が S/N 比を低下させることが原因と考えられ、3-NT のバイオマーカーとしての臨床応用において大きな障壁となっている。

そこで本研究においては、血漿蛋白質の処理法を工夫することや HPLC の溶出条件を最適化することにより高感度で S/N 比の高い HPLC-ECD 測定系を構築し、劇症型 ARDS 症例における血漿蛋白質中の 3-NT の定量的な解析を試みた。

B. 研究方法

1) 2008-2009 年にベトナム・ハノイ国立小児病院にて入院加療を受けた、H5N1 感染症例を含む ARDS 症例の保存血漿を対象とし、以下の方法で 3-NT を測定し、臨床パラメーターや疫学データとの関連性を解析した。

2) 血漿 (100 μ l) に酢酸バッファー (0.1 M, pH 7.2) 400 μ l と氷冷したエタノール 500 μ l を加え、蛋白質を沈殿させた。遠心 (10000 rpm, 10 min) した後、5 : 8 酢酸バッファー・エタノール溶液 (1 ml) にて沈殿を洗浄後乾燥させ、血漿蛋白質試料を得た。

3) 持ち帰った血漿蛋白質試料に 10 mM DTT、1% SDS 添加酢酸バッファー 400 μ l を加え、50°C 24h 振とうし再溶解させた。

4) 再溶解液 200 μ l にプロナーゼ (50 μ g) を加え、50°C 24h 振とうし、蛋白質を消化、さらに未消化物を限外濾過 (3 kDa cut-off) にて除去した (図 1 A)。

5) 3-NT 濃度を HPLC-ECD システム (Eicom 社, HTEC-500/PEC-510) にて解析した。上記試料 40 μ l を逆相カラム (SC-50ODS) にて分離した。移動相は 200 mM リン酸バッファー、2% アセトニトリル、5 μ g/ml EDTA (pH 2.9) を用い、流速は 400 μ l/min とした。移動相を酸性にすることで、3-NT の溶出時間を遅らせ、S/N 比を改善させた。カラムにて分離された 3-NT は、還元セル (-700 mV) で 3-アミノチロシンへと還元され、酸化セル (150 mV) で電気信号へと変換される (図 1 A)。

6) 3-NT のピークと同定する基準は、①標準 3-NT と同じ時間に溶出すること、②サンプルに一定濃度 (6 nM) の標準 3-NT を混入することで大きくなること、③還元電圧を -500mV にすることで消失すること、の 3 条件をみたすものとした (図 1 B)。

7) 3-NT の濃度は、ECD の下流に接続された UV 検出器にて測定したチロシン濃度にて補正した (3-NT/tyrosin, μ mol/mol)。なお、3-NT の標準曲線は広い範囲で直線性を示し、検出限界は 1 nM (50 fmol) であった (図

1 C)。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立国際医療センター倫理委員会の審査を得た (2007年9月28日承認)。

C. 研究結果

研究対象とした ARDS 症例 (27 例・36 検体) の臨床データを表 1 に示す。H5N1 感染に伴う ARDS 症例は、2 例・4 検体であった。図 2 A に 3-NT の増加を認めた症例 (検体番号 20) の溶出プロフィールの例を示す。標準化合物と同じ時間に溶出し、還元電圧を -500 mV にすることで消失することから 3-NT と同定した。全検体の 3-NT の測定結果を図 2 B と図 2 C に示す。今回、コントロール群 (非 ARDS 群) を 1 検体しか設定できなかったがそのレベルは 0.04 $\mu\text{mol/mol}$ であった。多くの ARDS 症例にて 3-NT のレベルは 1 $\mu\text{mol/mol}$ 以下であったが、今後、コントロール群を増やすことで正常範囲を設定し、今回の測定値を評価していく予定である。なお、6 検体において 1 $\mu\text{mol/mol}$ 以上の高いレベルの 3-NT が検出され、その中には、H5N1 例も含まれていた。病勢や予後との関連性を検討すると、3-NT のレベルは、死亡例に比べ生存例にてより高く (図 3 A)、呼吸不全の程度が軽度の例により高い傾向が認められた (図 3 B)。また ARDS のみの症例の方が多臓器不全の症例よりも高い傾向が見られた (図 3 C)。

D. 考案

3-NT は、NO と ROS の反応によって生じるパーオキシナイトライト (ONOO^-) や二酸化窒素 (NO_2) などの活性酸化窒素種、

あるいは、好中球ミエロペルオキシターゼによって亜硝酸イオン (NO_2^-) から作られる NO_2 によって、蛋白質のチロシン残基がニトロ化されることによって生じるものと考えられ、ARDS を始めとする多くの感染・炎症病態において、酸化ストレスのバイオマーカーとして用いられている。

HPLC-ECD 法は、抗体に依存しない定量的かつ特異的な検出法であるが、これまで動物実験では報告があるものの、ヒトの血漿蛋白質中の 3-NT の検出に成功した報告はほとんどない。今回、血漿蛋白質をいったんエタノール沈殿させたが、これにより、血漿中に含まれる可能性のある感染性ウイルス粒子を完全に不活化することができ、安全に輸送することが可能となった。また同時に HPLC-ECD 解析の妨げとなる低分子夾雑物や artificial な 3-NT 生成の原因となる NO_2^- を除去することができ、高感度かつ S/N 比に優れた 3-NT の定量が可能となった。

今回の結果で、6 検体にて高いレベルの 3-NT を検出したが、予後や病勢とむしろ逆相関する傾向が見られた。現在、症例数を増やすとともに、気道洗浄液についても解析を加え、この傾向の検証を行っているところである。今後さらに、プロテオミクスの手法を用いて、どのような蛋白質がニトロ化の標的となっているかを同定することにより、3-NT 生成が ARDS 病態に及ぼす影響についてさらに深く理解することが可能となるであろう。

E. 結論

H5N1 感染症例を含む劇症型 ARDS 症例における血漿蛋白質中の 3-NT を、エタノール沈殿法と HPLC-ECD 法を組み合わせるこ