

## 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	中国廈門大学医学院	
	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	

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)モデルマウスの作製を試み、その病態解析を進めてきた。Balb/c マウスを用い、人工呼吸を高換気量、低換気量で 15 分～360 分継続した。一定時間の人工呼吸後、肺胞洗浄液(BALF)、動脈血を採取し、cytokines, chemokines の測定を行った。その結果、30 分以上の人工呼吸により高換気量では低換気量に比べ BALF 中の TNF- $\alpha$ 、IL-6 など proinflammatory cytokines が上昇することが確認された。血清中でも高換気量では、BALF での変化と同様に IL-1b, IL-6, KC, TNF- $\alpha$  などは経時的に増加することが示された。血清中では、IL-6、KC が 60 分以上で、IL-1 $\alpha$ 、-2、G-CSF、MCP-1 が 240 分で有意に増加していた。

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、同様の測定を行い、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、その効果についても検討した。

### 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)モデルマウスを作製を行い、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、その治療薬としての好中球エラスターゼ阻害薬の効果を検討する。

### B. 研究方法

マウス(BALB/c)を麻酔下に気管切開、動脈カニューレクションした。心電図・血圧・

気道内圧モニター下に人工呼吸を継続し（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。BALF中細胞、摘出肺の病理学的検索を行った。

TNF- $\alpha$ 、IL-6(low-does)をマウス鼻腔内に投与し、同様にBALF中の多種のサイトカイン、ケモカインを測定した。

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

BALB/cマウスを用い、心拍数、動脈血圧、気道内圧、体温のモニター下に一定時間の人工呼吸を継続することが可能となり、VILIモデルマウスとしての有用性を検討することが可能となった。

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- $\alpha$ 、IL-6、KC、IL-1 $\beta$ 、G-CSF、IFN- $\gamma$ 、MCP-1、MIP-1 $\beta$ 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- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、KCが経時的に著明に増加することが認められた。

TNF- $\alpha$ 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- $\alpha$ 、IL-13、IL-15、IL-18、KC、MIP-2の産生が増加した。

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- $\gamma$ 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- $\gamma$ 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（気道内圧）での人工呼吸の継続により、Ventilator-induced lung injury (VILI)を発症させていることが疑われた。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、従来の報告より早期から炎症の進展が起こっているものと推察された。特にIL-6、TNF- $\alpha$ が早期から増加しており、重要であると思われた。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。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. 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. 横浜市. 2008 年 6 月 13 日.
  2. 郷軍, 前原康宏, 長尾朋和, 戸高玲子, 大島正道, 小林和夫, 志賀由佳, 河内正治, 中山俊憲, 鈴木和男 ARDS 病態モデルの肺組織変化に連動するサイトカインストームの意義 / The pathological findings of Lung involved in cytokine storm from an animal model of ARDS. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 12 月 1-3 日, 2008.
  3. 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. 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

## 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** ARDS の病態解析のために、LPS を全身あるいは気管内投与した動物モデルが用いられてきた。しかし、これらのモデルは、ヒトにおける ARDS の病態を十分に反映するものではなかった。本研究では、 $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) を気管内に投与することで、肺内の natural killer T (NKT) 細胞を活性化し、24 時間後に再び LPS を気管内投与することで、肺胞浮腫、硝子膜形成を伴った致死性のヒトの病態に類似した動物モデルを作成することに成功した。このマウスでは、肺内での 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を投与することで肺の炎症軽減、死亡率の改善が観察された。さらに  $\alpha$ -GalCer の代わりに IFN- $\gamma$  を前投与あるいは LPS と同時投与、TNF- $\alpha$  と LPS を同時に気管内投与することで、肺の著明な炎症が誘導された。フローサイトメトリ解析では、肺内における IFN- $\gamma$  産生は NKT 細胞、Gr-1<sup>dull</sup>/Ly-6C<sup>+</sup>単球で認められ、TNF- $\alpha$  産生は Gr-1<sup>bright</sup>/Ly-6G<sup>+</sup>細胞（好中球）及び Gr-1<sup>dull</sup>/Ly-6C<sup>+</sup>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<sup>+</sup>細胞を除去すると、死亡率の改善、肺の炎症軽減、TNF- $\alpha$  及び IFN- $\gamma$  の産生減少が観察された。これらの結果から、肺内の NKT 細胞、Gr-1<sup>dull</sup>/Ly-6C<sup>+</sup>単球、Gr-1<sup>bright</sup>/Ly-6G<sup>+</sup>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。本研究成果から、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- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、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  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) などの糖脂質抗原を認識し、速やかに IFN- $\gamma$  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。

本研究では、NKT 細胞に着目し、ARDS の発症・増悪機序における役割について以下の点で解析を行った。1) ARDS の発症機序における NKT 細胞の関与について検討するために、 $\alpha$ -GalCer を先行投与することで NKT 細胞を活性化させ、LPS 誘発性急性肺障害に及ぼす影響を検討するとともに、致死性 ARDS マウスモデルを確立する。2)  $\alpha$ -GalCer の先行投与後、LPS 誘発性 ARDS モデルマウスの病態解析を行い、IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  などの炎症誘発性サイトカインの役割とその産生細胞について検討する。

## B. 研究方法

1) マウス NKT 細胞欠損マウス (Ja18KO マウス：千葉大学院医学研究院 中山俊憲教授より供与) とともに、野生型 (WT) マウスとして C57BL/6 マウスを 6-8 週齢で使

用した。

2) ARDS モデルマウスの作成  $\alpha$ -GalCer (1 $\mu$ 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 $\mu$ g/マウス) を再度気管内投与した。実験によっては、IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  を気管内に投与した。

3) 肺の湿/乾重量比の測定  $\alpha$ -GalCer あるいは PBS を先行投与したマウスに LPS を気管内投与し、48 時間後に肺を摘出した時点で肺の湿重量とし、さらに 60°C 48 時間で乾燥させたものを乾重量としそれらの比を計算した。

4) 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。

5) 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、22G 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  $\mu$ g/mL DNase I 添加 RPMI1640/10%FCS で 37°C、60 分インキュベートした。肺組織断片を 40 $\mu$ 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°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。

6) 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- $\beta$  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°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- $\gamma$  抗体又は TNF- $\alpha$  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。

7) サイトカイン測定 肺ホモジネート中の IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  濃度を ELISA にて測定した。

8) 抗体の投与 抗 IFN- $\gamma$  抗体 (Clone : R4-6A2) 又は TNF- $\alpha$  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。

9) シベレスタットの投与 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。

10) 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。

11) 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 マウスモデルの作成  $\alpha$ -GalCer を前投与したマウスでは、LPS 投与により全例 72 時間以内に死亡したのに対して、PBS を前投与したマウスでは全例生存した。肺重量では、コントロール群に比べ  $\alpha$ -GalCer/LPS 投与群で顕著に増加していた。一方、Ja18KO マウスでは、このような違い

は認められなかった。病理学的解析では、PBS 前投与群では好中球浸潤を伴った胞隔炎を軽度認める程度であったが、 $\alpha$ -GalCer 前投与群ではこれらの反応が著明に増強された。すなわち、好中球浸潤が肺間質だけでなく肺胞腔内にも波及し、肺胞内出血が認められるとともに、ヒトの ARDS の病理所見に特徴的な硝子膜形成をエラスティカ・マッソン染色で認めることができた。このように本研究では、マウスを  $\alpha$ -GalCer で感作後 LPS を気管内投与することで、ヒトの ARDS に類似した動物モデルの作成に成功したと考えられた。

2) ARDS マウスモデルにおける炎症性サイトカインの過剰産生  $\alpha$ -GalCer を気管内投与することで、肺内で IFN- $\gamma$  が産生されるか検討した。肺内の IFN- $\gamma$  濃度は、PBS 投与群と比較すると  $\alpha$ -GalCer 投与群で約 2 倍の上昇を認めた。次に、 $\alpha$ -GalCer または PBS を前投与後、LPS を気管内投与することで IFN- $\gamma$  の増加を認めるか検討したところ、PBS 前投与群と比較し  $\alpha$ -GalCer 前投与群では約 5 倍の増加が認められた。次に、TNF- $\alpha$  について検討した。LPS 投与後 6 時間後の肺内の TNF- $\alpha$  濃度は、PBS 前投与群と比較し  $\alpha$ -GalCer 前投与群において約 4 倍の増加が認められた。これらの結果から、ARDS モデルでは、炎症応答において重要な役割を担うことが知られている IFN- $\gamma$  と TNF- $\alpha$  が肺内で過剰に産生されることが明らかになった。

3) ARDS マウスモデルにおける TNF- $\alpha$  の役割  $\alpha$ -GalCer 前感作/LPS 投与によって誘発される ARDS における TNF- $\alpha$  の役割を検討するために、抗 TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  産生が ARDS の発症・増悪に関与すると考え、 $\alpha$ -GalCer 前投与の代わりに TNF- $\alpha$  を気管内投与することで肺への影響を検討した。LPS と TNF- $\alpha$  の同時投与で、 $\alpha$ -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 TNF- $\alpha$  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- $\gamma$  の役割  $\alpha$ -GalCer 前感作/LPS 投与によって誘発される ARDS における IFN- $\gamma$  の役割を検討するために、抗 IFN- $\gamma$  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- $\gamma$  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- $\gamma$  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- $\gamma$  産生が ARDS の発症・増悪に関与すると考え、 $\alpha$ -GalCer 前投与の代わりに IFN- $\gamma$  を気管内投与することで肺への影響を検討した。IFN- $\gamma$  を前投与することで、 $\alpha$ -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- $\gamma$  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- $\gamma$  と TNF- $\alpha$  産生細胞の解析 肺内での IFN- $\gamma$  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、 $\alpha$ -GalCer 前投与群において、NKT 細胞及び NK 細胞からの IFN- $\gamma$  発現を認めた。骨髄由来の Gr-1 陽性細胞にも IFN- $\gamma$  の発現を認めるか検討したところ、Gr-1<sup>dull+</sup>細胞で IFN- $\gamma$  の発現を認めた。同様に、肺内での TNF- $\alpha$  産生細胞を解析したところ、 $\alpha$ -GalCer の前投与群において、NKT 細胞と NK 細胞いずれも TNF- $\alpha$  を発現していなかったが、Gr-1<sup>bright+</sup>

細胞及び Gr-1<sup>dull+</sup>細胞に TNF- $\alpha$  の発現が認められた。Gr-1<sup>bright+</sup>細胞は CD11c<sup>-</sup>、CD11b<sup>+</sup>、Ly-6C<sup>-</sup>、Ly-6G<sup>+</sup>、F4/80<sup>-</sup>、Gr-1<sup>dull+</sup>細胞は CD11c<sup>±</sup>、CD11b<sup>+</sup>、Ly-6C<sup>+</sup>、Ly-6G<sup>-</sup>、F4/80<sup>+</sup> 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  $\alpha$ -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- $\alpha$  及び IFN- $\gamma$  産生は、ラット IgG 投与群と比較し減少傾向にあり、特に TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  及び IFN- $\gamma$  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。 $\alpha$ -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- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  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

これまでの ARDS の発症機序の基礎的な検討では、LPS を全身あるいは気管内投与した実験動物が用いられてきた。これらの

モデルでは、肺の好中球による炎症性変化、炎症性サイトカイン濃度の上昇を認めるが、肺胞-毛細血管の透過性亢進による変化をほとんど認めない。また、LPS を用いた敗血症モデルでは、肺胞内に好中球をほとんど認めないことから、上皮の透過性変化を認める前、あるいは肺胞/上皮バリアの破綻する前に好中球が間質にトラップされることを示している。 $\alpha$ -GalCer でマウスを感作し、LPS を全身投与する致死的なショックモデルが報告され、このモデルでは肺に著明な炎症細胞の浸潤を認め、血清中の炎症性サイトカインの上昇を伴い致死的な経過に至ると報告されている。このように敗血症などの間接的肺傷害による ARDS モデルは知られているが、H5N1 インフルエンザウイルス感染のように気道からの直接的肺傷害に起因する ARDS の動物モデルは少ない。ヒトの H5N1 インフルエンザウイルス感染症では、血清中の IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、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、H5N1 インフルエンザ感染患者の剖検肺病理で TNF- $\alpha$  発現が著しいと報告されている。さらにヒトから分離された H5N1 インフルエンザウイルスを *in vitro* でヒトマクロファージに感染させると TNF- $\alpha$  の産生量が高いことが知られている。しかし、H5N1 インフルエンザウイルスは高病原性で高い生物学的安全レベルが必要とされ、通常の実験室で扱うことは容易でなく、H5N1 インフルエンザウイルスを用いた ARDS の発症機序の解明は困難である。今回、我々の作成した致死性の ARDS マウスでは、肺に硝子膜形成、肺胞出血、肺胞内に大量の白血球浸潤を認め、これらの所見はヒトにおいて特徴的な病理所見であるびまん性肺胞損傷 (diffuse alveolar damage: DAD) と合致するものであった。また、肺内で Th-1 関連サイトカインの IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  の濃度上昇が認められた。このことから我々の作成した ARDS マウスは、

H5N1 インフルエンザウイルスを用いることなく直接的原因による致死性 ARDS の病態解明において非常に有用な動物モデルであると考えられる。

NKT 細胞は  $\alpha$ -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- $\gamma$  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。今回の検討で  $\alpha$ -GalCer 前投与後の LPS 誘発 ARDS モデルマウスにおける病態悪化は NKT 細胞を欠損する *Ja18KO* マウスでは認めなかったことから、NKT 細胞の活性化が LPS 誘発 ARDS マウスにおいて致死的な肺傷害を引き起こすことが示唆された。種々の免疫応答における NKT 細胞からの IFN- $\gamma$  産生は、肺感染症において生体防御的に働き、さらにブレオマイシン誘発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- $\gamma$  産生の役割は十分解明されておらず、致死的な敗血症モデルにおいて IFN- $\gamma$  の関与が報告されているのみである。今回、 $\alpha$ -GalCer の気管内投与による肺内での IFN- $\gamma$  産生、および IFN- $\gamma$  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- $\alpha$  産生を伴って炎症性変化の増悪を認めた。また、 $\alpha$ -GalCer 前投与後の LPS 誘発 ARDS マウスに IFN- $\gamma$  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、 $\alpha$ -GalCer 投与による肺の IFN- $\gamma$  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- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  中和抗体を用いることで、 $\alpha$ -GalCer 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- $\alpha$  抗体投与による生存率の影響は、抗 IFN- $\gamma$  抗体を投与した群より低く、さらに抗 IFN- $\gamma$  抗体投与による肺の TNF- $\alpha$  濃度を  $\alpha$ -GalCer 前投与し LPS 投与 6 時間後で検討したが、TNF- $\alpha$  の抑制を認めなかった。全身性シュワルツマン反応で IFN- $\gamma$  が致死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- $\alpha$  産生量より IFN- $\gamma$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  を産生することが知られている。LPS を経鼻投与し、Gr-1 陽性好中球が肺胞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- $\alpha$  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<sup>high</sup>/Ly-6G<sup>+</sup> 好中球と Gr-1<sup>int</sup>/Ly-6C<sup>+</sup> 単球、Gr-1<sup>low</sup>/Ly-6C<sup>+</sup> 単球が存在し、さらに Gr-1<sup>int</sup>/

Ly-6C<sup>+</sup> 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、 $\alpha$ -GalCer 前投与し LPS 投与後 3 時間で、好中球

(Gr-1<sup>bright</sup>/Ly-6G<sup>+</sup> 細胞) だけでなく、単球領域の Gr-1<sup>dull</sup>/Ly-6C<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup> 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- $\alpha$  を産生していることが分かった。興味深いことに、Gr-1<sup>dull</sup> 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<sup>dull</sup> 細胞は NKT 細胞と同様に IFN- $\gamma$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  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<sup>dull</sup>/Ly-6C<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>+</sup>好中球だけでなくGr-1<sup>+</sup>/Ly-6C<sup>+</sup>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<sup>+</sup>細胞を認めず、肺内で有意にTNF- $\alpha$ の産生低下、IFN- $\gamma$ の減少傾向、炎症の軽減、死亡率の改善を認めた。さらに、TNF- $\alpha$ 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、 $\alpha$ -GalCerを前投与することで増加するGr-1<sup>dull</sup><sup>+</sup>/Ly-6C<sup>+</sup>単球からのTNF- $\alpha$ 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、マウスを $\alpha$ -GalCerで前感作し、さらにLPSを気道内に投与することで、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。このマウスでは、

肺内での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<sup>+</sup>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) 川上和義 呼吸器感染症と粘膜免疫, 医学のあゆみ, 221: 891-896, 2007.
- 2) 川上和義. 肺炎球菌感染と肺内自然免疫リンパ球による感染防御, 実験医学, 25: 3157-3163, 2007.
- 3) 川上和義. NKT細胞と細菌感染, 臨床検査, 51: 1085-1089, 2007.
- 4) 川上和義. ALI/ARDSと自然免疫リンパ球, 医学のあゆみ, 224: 845-849, 2008.
- 5) 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- $\alpha$  by Gr-1<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> 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) Hatta M, Nakamatsu M, Nakasone C, Fujita J, Kaku M, Kawakami K: Regulation of neutrophil-mediated host defense to pneumococcal infection by NKT and  $\gamma\delta$ T cells. FASEB Meeting, Miami Beach, USA, May 2007.
- 2) Kawakami K:  $\gamma\delta$ T cells and infection in lung. The 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, July 2007.
- 3) 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- $\alpha$ 産生細胞の解析. 第82回日本感染症学会総会学術講演会, 松江, 4

- 月 2008.
- 4) 青柳哲史, 位田 劍, 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講演会, 神戸, 6 月 2008.
  - 5) 青柳哲史, 山本夏男, 位田 劍, 丹野大樹, 賀来満夫, 川上和義.  $\alpha$ -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, 12 月 2008.
  - 6) 川上和義. 感染症における分子パターン認識機構と自然免疫. 第 53 回日本臨床検査医学会九州地方会, 特別講演, 福岡, 2 月 2009.
  - 7) 青柳哲史, 山本夏男, 位田 劍, 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.
  - 8) 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.
  - 9) 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.
  - 10) 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.

#### H. 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

研究分担者 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、種々の感染モデルを用いて、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）について解析を行ってきた。最近、各種NO合成酵素（NOS）由来のNOにより、NOの二次メッセンジャーである cyclic GMP（cGMP）がニトロ化され、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H19,20年度は、マウスのインフルエンザウイルス肺炎モデルにおける3-ニトロチロシン（3-NT）と8-ニトロ-cGMPの生成について検討した。まず肺胞洗浄液中の3-NTの生成をHPLC-電気化学検出（ECD）法により解析したところ、誘導型NOS（iNOS）の誘導と肺炎の病勢に一致した生成を認めた。また免疫組織染色にて、野生型マウスにおいては、ウイルス増殖の場である気道上皮に強い3-NTと8-ニトロ-cGMPの陽性像を認めたが、iNOS欠損マウスにおいては認めなかった。さらに、8-ニトロ-cGMPは酸化ストレス応答シグナルとして働き、ヘムオキシゲナーゼ-1といった抗酸化分子を誘導することも明らかにした。次にH21年度は、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。

以上、感染病態において生成する3-NTや8-ニトロ-cGMPは、HPLC-ECD法を用いることで定量的かつ特異的に検出することが可能であり、インフルエンザウイルス肺炎・ARDS病態における酸化ストレスを評価する上で、臨床応用が可能であるバイオマーカー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、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。最近、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、まず、マウスのインフルエンザウイルス肺炎モデルにおける 3-ニトロチロシン (3-NT) や 8-ニトロ-cGMP の生成について免疫組織染色法や HPLC-電気化学検出 (ECD) 法を用いて解析した。次に、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、臨床パラメータや疫学データとの関連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、iNOS 欠損マウスに、インフルエンザウイルス (A/Kumamoto/67/H2N2) を吸入感染させ、経時的に肺組織、肺胞洗浄液 (BALF)、血液を採取した。
- 2) BALF 蛋白質中の 3-NT を HPLC-ECD システム (Eicom 社, HTEC-500/PEC-510) を用いて定量解析を行った。また、肺凍結切片を、抗 3-NT 抗体や抗 8-ニトロ-cGMP 抗体 (1G6) を用いて免疫染色を行ない、野生型と iNOS 欠損マウス間で比較・検討した。
- 3) 酸化ストレス応答因子であるヘムオキシゲナーゼ (HO) -1 の発現を肺組織破砕液を用いて解析し、8-ニトロ-cGMP との相関につき検討した。また、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

ラフィー法にて測定した。

- 4) 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 感染症例を含む劇症型 ARDS 症例の保存血漿 (27 例・36 検体) を現地にて入手した。血漿は、感染性ウイルス粒子を含んでいる可能性があるため、蛋白質をエタノール沈殿させることで失活させた。DTT/SDS バッファーで沈殿蛋白質を再溶解・プロナーゼ消化し、その 3-NT レベルを HPLC-ECD システムにて解析した。

## (倫理面への配慮)

動物実験に関しては、熊本大学動物実験委員会の承認を得た (承認番号 F21-243)。劇症型 ARDS 症例の解析に関しては、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

感染マウスの BALF 蛋白質中の 3-NT を HPLC-ECD にて解析したところ、肺炎病態に一致した増加が認められた。また、野生型マウス肺組織の免疫染色にて強い 3-NT の陽性像が得られ (図 1 A)、8-ニトロ-cGMP に関しては、ウイルス増殖の場である気道上皮にて強い陽性像が得られた。(図 1 B)。また、ウイルス感染に伴って、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り (図 2 A)、血中の一酸化炭素レベルにて HO-1 活性を評価し、同様の傾向を認めた (図 2 B)。

H5N1 感染症を含む小児の劇症型 ARDS 症例 (27 例・36 検体) における血漿蛋白質

中の 3-NT の解析結果を図 3 に示す。今回、非 ARDS 群として 1 検体しか測定できなかったが、そのレベルは  $0.04 \mu\text{mol/mol}$  (3-NT/tyrosine) であった。多くの ARDS 症例にて 3-NT レベルは  $1 \mu\text{mol/mol}$  以下であったが、6 検体において高いレベルの 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、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。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 4)。

#### 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 ( $\text{ONOO}^-$ ) や二酸化窒素 ( $\text{NO}_2$ ) 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 ( $\text{NO}_2^-$ ) から作られる  $\text{NO}_2$  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ている。8-ニトロ-cGMP の生成についても、各種 NOS 由来の NO や ROS が関わっていることを確認しており、現在さらに詳細な解析を進めている。

興味深いことに、この 8-ニトロ cGMP は単なるバイオマーカーではなく、大変ユニークな生物活性、すなわち、蛋白質のチオール基に cGMP を付加する新しい翻訳後修飾 (S-グアニル化) を介して、HO-1 の誘導といった酸化ストレス応答におけるシグナル機能を発揮していることがわかってきた。

一般にこのような、ニトロ化生体分子を検出するには、免疫染色法や Western blot 法、ELISA 法などが用いられるが、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。一方、本研究で用いた 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、生体試料、特に血漿中には、検出の妨げとなる低分子夾雑物が含まれており、これをいかに除去するかが感度と S/N 比を向上させるために必要となる。これまで、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みられないが、我々は血漿蛋白質をエタノールで沈殿させることや HPLC の溶出条件を最適化することで、検出を可能にした。

今回の小児の ARDS 症例の解析で、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が、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、この傾向を検証している。

#### E. 結論

インフルエンザウイルス感染病態において、iNOS の誘導に伴う過剰な NO の産生に依存して、3-NT や 8-ニトロ-cGMP が生成することをマウスモデルにて解析した。また H5N1 感染例を含む小児 ARDS 症例における血漿蛋白質中の 3-NT を HPLC-ECD 法を用いて検出・定量することに成功した。今後、重症肺炎・ARDS をはじめとした様々な感染・炎症病態における酸化ストレスのバイオマーカーとして、3-NT や 8-ニトロ-cGMP が臨床の場で広く応用されることが期待される。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tatsuya Okamoto, Shahzada Khan, Kohta Oyama, Shigemoto Fujii, Tomohiro Sawa, Takaaki Akaike. A new paradigm for antimicrobial host defense mediated by a nitrated cyclic nucleotide. *J Clin Biochem Nutr.* 46: 14-19, 2010.
2. Khandaker A. Ahmed, Tomohiro Sawa, Takaaki Akaike. Protein cysteine S-guanylation and electrophilic signal transduction by endogenous nitro-nucleotides. *Amino Acids.* in press, 2010.
3. Mohammad Hasan Zaki, Shigemoto Fujii, Tatsuya Okamoto, Sabrina Islam, Shahzada Khan, Khandaker A. Ahmed, Tomohiro Sawa, Takaaki Akaike. Cytoprotective function of heme oxygenase-1 induced by a nitrated cyclic nucleotide formed during murine salmonellosis. *J Immunol.* 182: 3746-56, 2009.
4. Tatsuya Okamoto, Mohammad Hasan Zaki, Shigemoto Fujii, Tomohiro Sawa, Takaaki Akaike. Nitric oxide-mediated host immune response and microbial pathogenesis. *Nitric Oxide Synthase Inhibitors: From Animal Studies to Clinical Implications* (Tunctan B. Editor) in press, 2009.
5. 藤井重元、澤智裕、赤池孝章. 8-Nitro-cGMP の発見と生理機能の解明. *化学と生物.* 48: 22-27, 2010.
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. *日本ハンセン病学会雑誌.* 78: 41-47, 2009.
8. 赤池孝章. 活性酸素のシグナル伝達機能-その生理機能の再発見と酸化ストレス研究の新展開. *実験医学増刊: 病態解明に迫る活性酸素シグナルと酸化ストレス* (谷口直之 監修) 2320-2329, 2009.
9. 澤智裕、有本博一、赤池孝章. チオール基の修飾による活性酸素のセンサー機能制御. *実験医学増刊: 病態解明に迫る活性酸素シグナルと酸化ストレス* (谷口直之 監修) 2341-2347, 2009.
10. 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.
11. Yohei Saito, Hirobumi Taguchi, Shigemoto Fujii, Tomohiro Sawa, Eriko Kida, Chizuko Kabuto, Takaaki Akaike, Hirokazu Arimoto. 8-Nitroguanosines as chemical probes of the proteinS-guanylation. *Chem Commun.* 5984-5986, 2008.
12. Mohammad Samuel Alam, Mohammad Hasan Zaki, Tomohiro Sawa, Sabrina Islam, Khandaker A. Ahmed, 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.
13. 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.
14. Jun Yoshitake, Katsuaki Kato, Daisuke Yoshioka, Yoshimi Sueishi, Tomohiro Sawa, Takaaki Akaike, Tetsuhiko Yoshimura. 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.* 18: 223-8, 2008.
15. 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.
16. 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.
17. 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.

18. 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.
  19. 赤池孝章, 澤智裕. 放射線・酸化ストレスにおける NO・活性酸素シグナル制御. 長崎医学会雑誌. 83:195-199, 2008.
  20. Mohammad Hasan Zaki, Tatsuya Okamoto, Tomohiro Sawa, Shigemoto Fujii, Takaaki Akaike. Nitrate stress in respiratory inflammation caused by influenza virus infection. Clin Exp Allergy Rev 7: 19-26, 2007.
  21. Tomohiro Sawa, Mohammad Hasan Zaki, Tatsuya Okamoto, Teruo Akuta, Yoshiko Tokutomi, Shokei Kim-Mitsuyama, Hideshi Ihara, Akira Kobayashi, Masayuki Yamamoto, Shigemoto Fujii, Hirokazu Arimoto, Takaaki Akaike. Protein S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. Nature Chem Biol 3: 727-735, 2007.
  22. Yu Ishima, Tomohiro Sawa, Ulrich Kragh-Hansen, Yoichi Miyamoto, Sadaharu Matsushita, Takaaki Akaike, Masaki Otagiri. S-Nitrosylation of human variant albumin Liprizzi (R410C) confers potent antibacterial and cytoprotective properties. J Pharmacol Exp Ther 320: 969-77, 2007.
  23. Yu Ishima, Takaaki Akaike, Ulrich Kragh-Hansen, Shuichi Hiroyama, Tomohiro Sawa, Toru Maruyama, Toshiya Kai, Masaki Otagiri. Effect of Endogenous ligands on the biological role of human serum albumin in S-nitrosylation. Biochem Biophys Res Commun 364: 790-795, 2007.
  24. 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. 日本臨床増刊号新感染症学 65 Suppl 2 Pt. 1: 78-84, 2007.
2. 学会発表
    1. Tatsuya OKAMOTO, Tomohiro SAWA, Shigemoto FUJII, Takaaki AKAIKE. Guanine nitration and host defense during influenza virus pneumonia. 8th Asia Pacific Congress of Medical Virology. (Hong Kong, CHINA), February 26-28, 2009.
    2. Khandaker A. AHMED, Tomohiro SAWA, Takaaki AKAIKE. Nitration of 3',5'-cyclic diguanylic acid, a bacterial signaling molecule. 第82回 日本細菌学会総会. 名古屋市, 3月, 2009.
    3. 澤智裕、赤池孝章. 酸化ストレスにおけるNO・活性酸素シグナル制御. 第79回日本衛生学会学術総会. 東京都, 3月, 2009.
    4. 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: unique post-translational modification of thiols dependent on nitric oxide and reactive oxygen species. 第9回日本NO学会学術集会. 静岡市, 5月, 2009.
    5. 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の生成を介した酸化ストレス応答の分子メカニズム. 第9回日本NO学会学術集会. 静岡市, 5月, 2009.
    6. 藤井重元、赤池孝章. 8-ニトログアノシン3',5'-環状1リン酸による蛋白質S-グアニル化を介する酸化ストレス適応応答の分子機構. 第9回日本NO学会学術集会. 静岡市, 5月, 2009.
    7. Khandaker A. AHMED, Tomohiro SAWA, Takaaki AKAIKE. Nitration of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate by nitric oxide and reactive oxygen species. 第9回日本NO学会学術集会. 静岡市, 5月, 2009.
    8. 小山耕太、Khandaker A. AHMED、立山美笑、澤智裕、赤池孝章. 細菌シグナル分子3',5'-cyclic diguanylic acidのニトロ化. 第9回日本NO学会学術集会. 静岡市, 5月, 2009.
    9. 赤池孝章. 活性酸素とNOによる親電子シグナル伝達. 第62回日本酸化ストレス学会学術集会. 福岡市, 6月, 2009.
    10. 澤智裕、Khandaker A. AHMED、J. BURGOYNE、岡本竜哉、藤井重元、Philip EATON、赤池孝章. S-グアニル化を介したprotein kinase Gの新規な活性化機構. 第62回日本酸化ストレス学会学術集会. 福岡市, 6月, 2009.
    11. 藤井重元、澤智裕、岡本竜哉、三浦高、岩本典子、熊谷嘉人、赤池孝章. 細胞内S-グアニル化蛋白質の同定とS-グアニル化制御機構の解明. 第62回日本酸化ストレス学会学術集会. 福岡市, 6月, 2009.
    12. 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の生成を介した酸化ストレス応答の分子メカニズム. 第20回日本生体防御学会. 東京都, 7月, 2009.
13. 藤井重元、澤智裕、岡本竜哉、居原秀、井田智章、Kit I. TONG、本橋ほづみ、山本雅之、赤池孝章. 蛋白質S-グアニル化を介する酸化ストレス適応応答の分子機序. 第6回Heme Oxygenase研究フォーラム. 京都市, 8月, 2009.
  14. 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の生成を介した酸化ストレス応答の分子メカニズム. 第46回日本ウイルス学会九州支部総会. 佐賀市, 9月, 2009.
  15. 赤池孝章. NOと活性酸素による酸化ストレス適応応答. 第82回日本生化学会大会. 神戸市, 10月, 2009.
  16. 澤智裕、Khandaker A. AHMED, Joseph R. BURGOYNE、岡本竜哉、藤井重元、Philip EATON、赤池孝章. ニトロ化環状ヌクレオチドによる蛋白質S-グアニル化を介したcGMP 依存性プロテインキナーゼの活性化機構. 第82回日本生化学会大会. 神戸市, 10月, 2009.
  17. 藤井重元、澤智裕、岡本竜哉、三浦高、岩本典子、熊谷嘉人、赤池孝章. 細胞内S-グアニル化蛋白質の同定と蛋白質S-グアニル化の生理機能の解明. 第82回日本生化学会大会. 神戸市, 10月, 2009.
  18. 小野勝彦、Khandaker A. AHMED、澤智裕、赤池孝章. 細菌シグナル分子3',5'-cyclic diguanylic acid のニトロ化. 第82回日本生化学会大会. 神戸市, 10月, 2009.
  19. Khandaker A. AHMED、澤智裕、岡本竜哉、藤井重元、赤池孝章. Chemical basis of 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate formation in cells. 第82回日本生化学会大会. 神戸市, 10月, 2009.
  20. Khandaker A. AHMED、澤智裕、岡本竜哉、藤井重元、Philip EATON、赤池孝章. A unique activating mechanism of cGMP-dependent protein kinase by a nitrated derivative of cGMP. 第25回熊本医学生物科学シンポジウム. 熊本市, 11月, 2009.
  21. Kohta OYAMA, Khandaker A. AHMED, Tomohiro SAWA, Tatsuya OKAMOTO, Shigemoto FUJII, Philip EATON, Takaaki AKAIKE. A unique activating mechanism of cGMP-dependent protein kinase by a nitrated derivative of cGMP. 5th Joint Meeting of the Societies for Free Radical Research Australasia and Japan. (Sydney, AUSTRALIA), December 1-4, 2009.
  22. 澤智裕、Mohammad Hasan ZAKI、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.
  23. 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.
  24. 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.
  25. 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.
  26. 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.
  27. 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.
  28. 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.
  29. 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.
  30. 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.
  31. 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

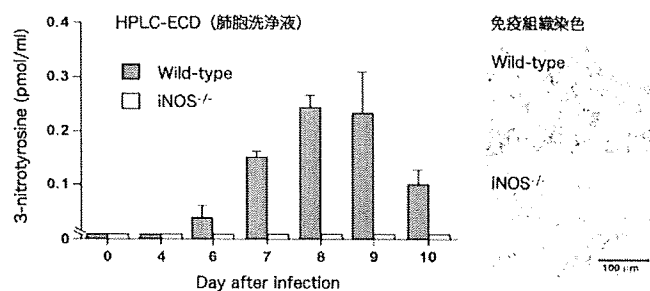
- oxygen species signaling in influenza virus pneumonia. 第19回日本生体防御学会. 札幌市, 7月, 2008.
32. Tomohiro SAWA, Shigemoto FUJII, Atsushi IRIE, Tatsuya OKAMOTO, Hozumi MOTOHASHI, Masayuki YAMAMOTO, Takaaki AKAIKE. Nitric oxide-dependent sulfhydryl modification of Keap1 by 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. 5th International Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic applications of NO. (Bregenz, AUSTRIA), August 28-30, 2008.
  33. 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.
  34. 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.
  35. 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.
  36. 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.
  37. 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.
  38. 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.
  39. 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.
  40. 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.
  41. Khandaker A. AHMED, 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.
  42. 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. 東京都, 3月, 2007.
  43. 澤智裕, Mohammad Hasan ZAKI, Sabrina ISLAM, 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. 大阪市, 3月, 2007.
  44. 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. 京都市, 4月, 2007.
  45. 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 学会学術集会. 大津市, 5月, 2007.
  46. 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. 大津市, 5月, 2007.
47. 藤井重元、澤智裕、岡本竜哉、Mohammad Hasan ZAKI、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. 大津市, 5月, 2007.
48. 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学術集会. 名古屋市, 6月, 2007.
49. 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学術集会. 名古屋市, 6月, 2007.
50. 藤井重元、澤智裕、岡本竜哉、Mohammad Hasan ZAKI、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. 名古屋市, 6月, 2007.
51. 岡本竜哉、Mohammad Hasan ZAKI、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. 福岡市, 7月, 2007.
52. 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. 京都市, 8月, 2007.
53. 澤智裕、岡本竜哉、Mohammad Hasan ZAKI、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. 横浜市, 10月, 2007.
54. Tomohiro SAWA, Takaaki AKAIKE. Nitric oxide signaling in oxidative stress and adaptive response. The 23rd Kumamoto Medical Bioscience Symposium. (Kumamoto JAPAN), November 11-12, 2007.
55. Takaaki AKAIKE, Tomohiro SAWA, Shigemoto FUJII, Tatsuya OKAMOTO, Hideshi IHARA, Hirokazu ARIMOTO. 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. 4th Joint Meeting of the Society for Free Radical Research, Australasia and Japan. (Kyoto, JAPAN), December 1-5, 2007.

#### 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

**A (3-ニトロチロシン)**



**B (8-ニトロ cGMP)**

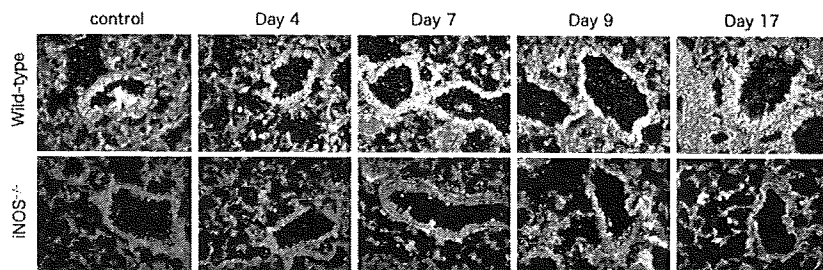
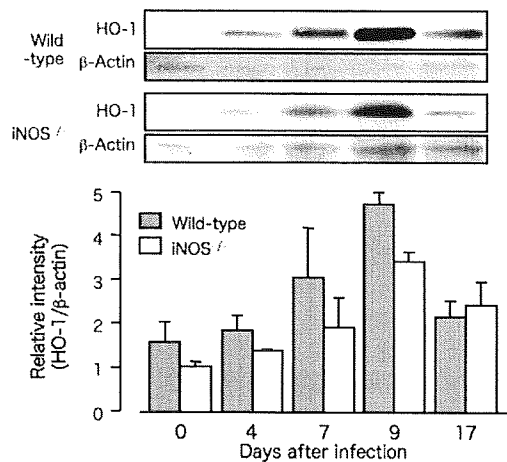


図1 インフルエンザウイルス感染マウス肺における 3-ニトロチロシンと 8-ニトロ cGMP の生成

**A (肺ホモジネート、Western blot)**



**B (ガスクロマトグラフィー)**

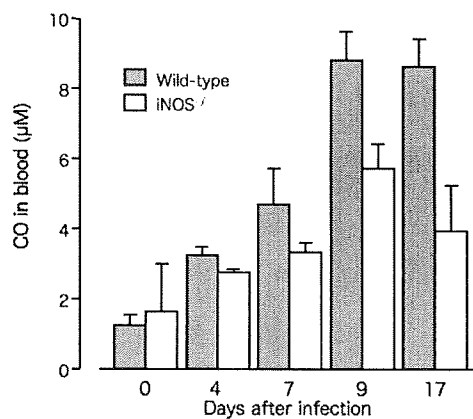


図2 インフルエンザウイルス感染マウスにおける HO-1 の誘導