

- 2) Kazuo Ohnishi, Yoshimasa Takahashi, Naoko Kono, Noriko Nakajima, Fuminori Mizukoshi, Shuhei Misawa, Takuya Yamamoto, Yu-ya Mitsuki, Shu-ichi Fu, Nakami Hirayama, Masamichi Ohshima, Manabu Ato, Tsutomu Kageyama, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Kazuo Kobayashi, Shigeyuki Itamura, and Yasuko Tsunetsugu-Yokota. Newly Established Monoclonal Antibodies for Immunological Detection of H5N1 Influenza Virus. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 65, 19-27, 2012
 - 3) Sugamata, Ryuichi; Dobashi, Hideki; Nagao, Tomokazu; Yamamoto, Ki-ichi; Nakajima, Noriko; Sato, Yuko; Aratani, Yasuaki; Oshima, Masamichi; Sata, Tetsutaro; Kobayashi, Kazuo; Kawachi, Shoji; Nakayama, Toshinori; Suzuki, Kazuo. The contribution of neutrophil-derived myeloperoxidase in the early phase of fulminant acute respiratory distress syndrome induced by influenza virus infection. *Microbiology and Immunology*. 56(3),171-82,2012
 - 4) Guoli Shi, Fumihiko Yagyu, Yohko Shimizu, Kazufumi Shimizu, Masamichi Oshima, Aikichi Iwamoto, Bin Gao, Wenjun Liu, George Fu Gao, Yoshihiro Kitamura. Flow Cytometric Assay Using Two Fluorescent Proteins For the Function of the Internal Ribosome Entry Site of Hepatitis C Virus. *Cytometry Part A* 79A:653-660, 2011
 - 5) Hori J, Taniguchi H, Wang M, Oshima M, Azuma M GTR ligand-mediated local expansion of regulatory T cells contributes to immune privilege of corneal allografts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Dec;51(12):6556-65. 2010
 - 6) Lijuan Yu, Chie Aoki, Yohko Shimizu, Kazufumi Shimizu, Wei Hou, Fumihiko Yagyu, Xianzi Wen, Masamichi Oshima, Aikichi Iwamoto, Bin Gao, Wenjun Liu, George Fu Gao, Yoshihiro Kitamura. Development of a simple system for screening anti-hepatitis C virus drugs utilizing mutants capable of vigorous replication. *Journal of Virological Methods*. Nov;169(2):380-4. 2010
 - 7) Tomizawa K, Nagao T, Kusunoki R, Saiga K, Oshima M, Kobayashi K, Nakayama T, Tanokura M, Suzuki K. Reduction of MPO-ANCA epitopes in SCG/Kj mice by 15-deoxyspergualin treatment restricted by IgG2b associated with crescentic glomerulonephritis. *Rheumatology (Oxford)* 2010 Jul;49(7):1245-56
2. 学会発表
【国際会議】
- 1) Kazufumi Shimizu, Toshikatsu Shibata, Tomoko Nishikawa, Keiko Toyosawa, Yutaka Sasaki, Torahiko Tanaka, Kazumichi Kuroda, Reiko Todaka, Masamichi Oshima, Tatsuo Yamamoto. Loss-of-Function Mutation on NS1 Gene Enhances the Virulence of Influenza Virus in Mice. IUMS 2011 XV, International Congress of Virology Sapporo, 11-16 September 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2010-122480

インフルエンザ H5 亜型検出用抗体及び
検出用キット

横田恭子、大西和夫、阿戸学、高橋宣聖、
大島正道、平山中己、小林和夫、板村繁
之、曾家義博、三沢修平、西村研吾高橋
和郎

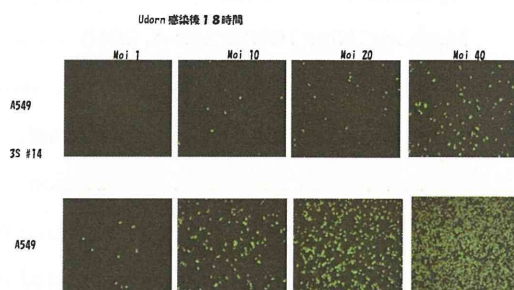
実用新案登録

なし

2. その他

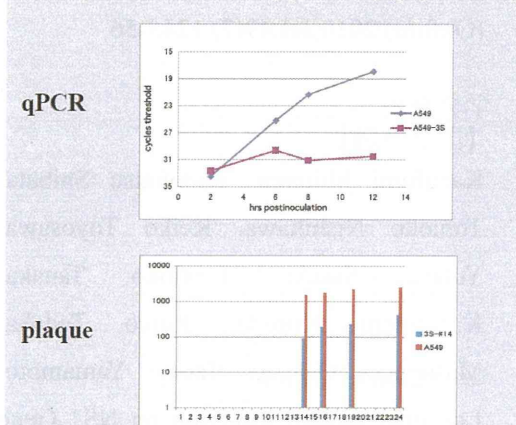
なし

(図 1)



(図 2)

Virus production on A549 or A549-3S cells



FARDS マウスモデルを用いた病態の解析と治療薬の開発

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：

これまでに我々は、Natural Killer (NK) T細胞の活性化剤である α -galactosylceramide を気管内に前投与したマウスに LPS を投与することで、急性呼吸窮迫症候群（Acute Respiratory Distress Syndrome: ARDS）に特徴的な病理所見である Diffuse Alveolar Damage (DAD) を呈するモデルマウスを作成することに成功した。本研究では、このモデルを用いることで、シベレスタットナトリウム、ガンマグロブリン製剤の高用量投与、新規マクロライド薬、I型インターフェロン、リコンビナント・トロンボモジュリン (rTM) についてその治療効果を検証し、I型インターフェロンの低容量投与、rTM 投与において有効性を明らかにした。rTM の作用機序については、肺内での regulatory T (Treg) 細胞及び抗炎症性サイトカインである IL-10、TGF- β の産生を増加させることによって治療効果を発揮する可能性が示した。さらに、LPS 投与モデルに加えて、非致死量のインフルエンザウイルス A/H1N1 を経気道感染させることによって惹起される急性肺障害の後に、肺の線維化を発症するモデルを作製することにも成功した。これは、臨床の場でもみられるインフルエンザウイルス感染による ARDS 後に発症し、その後の QOL にも大きな影響を及ぼす肺線維化の病態解析に有用と考えられ、今後さらなる検討が望まれる。

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、急速に進行する激しい ARDS (Fulminant ARDS: FARDS) を合併し死亡率が高いことが知られている (Kawachi et al. J. Infect. Dis. 200: 510-515, 2009)。また、H5N1 インフルエンザウイルス感染症では、ヒト血清中の interferon (IFN) - γ 、tumor necrosis factor (TNF) - α 、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開発するためには、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内への好中球浸潤、間質や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 (Diffuse Alveolar Damage: DAD) を認める。我々は、Natural Killer T (NKT) 細胞の活性化剤である α -galactosylceramide (α -GalCer) を気管内に投与することで感作したマウスに LPS を気管内投与することで、ARDS に特徴的な病理所見である DAD

を呈する動物モデルの作成に成功した (Aoyagi et al. *Int. Immunol.* 23: 97-108, 2011)。本研究では、この動物モデルを用いることで、シベレスタットナトリウム、ガンマグロブリン製剤の高用量投与、新規マクロライド薬、I型インターフェロンの治療効果について検討を行い、I型インターフェロンと rTM の有効性について明らかにした。

近年、High Mobility Group Box 1 (HMGB1) は Damage-associated Molecular Patterns (DAMPs) の一つであり、新たな炎症性メディエーターとして注目されている。HMGB1 は炎症の後期に上昇し、高値が長期間持続することより、治療標的になる可能性があるといわれている (Wang H, et al. *Science* 285:248-51, 1999)。本研究では、FARDS の病態に HMGB1 が関与する可能性について解析し、治療標的としての可能性を検討した。さらに、HMGB1 を標的とする新たな治療薬としてリコンビナント・トロンボモジュリン (rTM) の FARDS モデルヘマウスの影響について検討した。

インフルエンザでは、ウイルス感染にともなう急性肺傷害を乗り越えても、肺の線維化によりその後の QOL を落とす症例も少なくない。2009 年に起こったインフルエンザウイルス A/H1N1pdm のパンデミックの際にも、ARDS から救命できたにもかかわらず、肺の線維化をきたした症例が報告されている (*Radiol. Med.* 117: 185-200, 2012; *Eur. J. Radiol.* 79 : 447-451, 2011)。これまでの研究の多くがインフルエンザウイルスによる致死モデルを用いたものであったため、このような臨床的事例についてはその発症機序を解析することが容易ではなかった。そこで、我々は、非致死量のインフルエンザウイルス A/H1N1 (PR8 株) をマウスに経気道感染させ、ARDS が軽減した後に肺線維化をきたすモデルの作製を試みた。

B. 研究方法

1) 試薬

α -GalCer はフナコシ (東京) から購入し、DMSO (dimethyl sulfoxide) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) で溶解し、5mg/ml として、さらに PBS (phosphate-buffered saline; リン酸緩衝生理食塩水) で希釈して、終濃度は 0.4% DMSO とした。大腸菌 (O111: B4) 由来の LPS は、Sigma-Aldrich から購入した。

2) FARDS モデルマウスの作成

C57BL/6 マウス (6~8 週齢, オス, 日本クレア) 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。

3) 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・エオジン染色を行った。肺線維化の解析では、エラスチカ・マッソン染色を行った。肺組織傷害の組織学的評価として、米国胸部学会推奨の肺傷害スコアを計算した。評価項目は、好中球の肺腔内への浸潤、好中球の肺泡隔壁への浸潤、硝子膜構造、肺腔内のタンパク様デブリ、肺泡隔壁肥厚、である。ここれらを光学 400 倍で少なくとも 20 以上のランダムな視野で評価し、各項目について 0 点から 2 点の点数をつけ、定められた公式に則ってスコアを計算した。

4) 免疫組織化学解析 ニワトリ抗 HMGB1 抗体を用いて、間接二段階標識法 (indirect, two-step labeling technique) で実施した。

5) サイトカイン測定

気管支肺胞洗浄液 (BALF) または肺ホモジネート液中の各種サイトカイン濃度を ELISA にて測定した。一部の実験では Bio-Plex を用いた測定も行った。

6) シベレスタットナトリウムの投与

FARDS マウスに、シベレスタットナトリ

ウム (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、生存期間への影響について検討した。

7) 高用量ガンマグロブリンの投与

FARDS マウスに、ヒトガンマグロブリン製剤 (2g/kg) を LPS 投与の 1 日前から 1 日後まで連日腹腔内に投与し、生存期間への影響について検討した。

8) マクロライド薬の投与

FARDS マウスに、種々の濃度のクラリスロマイシンまたは新規マクロライド薬 (EM900, 北里大学北里生命科学研究所以砂塚敏明教授より供与) を LPS 投与の 1 日前から 1 日後まで連日腹腔または気管内に投与し、生存期間への影響について検討した。

9) I 型インターフェロンの投与

FARDS マウスに、各種用量のヒトインターフェロン α (huIFN α /D, ルイ・パスツール医学研究センター 宇野賀津子先生より供与) を LPS 投与の 12 時間前から 5 日後まで連日経鼻投与し、生存期間、湿乾肺重量比、BALF 及び肺ホモジネート中の IFN- γ 濃度への影響について検討した。

10) リコンビナント・トロンボモジュリン投与

リコンビナント・トロンボモジュリン (rTM) 旭化成ファーマ (千葉) から供与された。マウスに対して、rTM 3mg/kg あるいは 10mg/kg を LPS 投与の 12 時間前より、12 時間ごとに腹腔内投与した。

11) BALF と肺間質の白血球分離、肺ホモジネート上清

LPS 投与後様々な時期にマウスを犠牲死させ、開胸し、22 ゲージ静脈留置カテーテル (TERUMO、東京) を気管内に挿入して、1 ml の PBS を投与し、吸引、これを 3 回繰り返した。BALF を 4°C 450×g で 10 分間遠心し、その上清を -80°C でサイトカイン測定

用に保存した。次に肺循環を洗浄するために、PBS 3ml を右心室に注入し、肺微小血管に接着しなかった細胞を除去した。その後、肺を摘出し PBS 1.5ml の中に入れ、ホモジネートし、4°C 450×g で 10 分間遠心し、その上清をサイトカイン測定用に -80°C で保存した。細胞解析を行う際は、肺ホモジネートから Percoll による比重遠心法にて採取した白血球分画を用いた。

12) Treg 細胞の解析

FITC 標識 CD4 抗体 (clone GK1.5; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) および Pacific Blue 標識 CD25 抗体 (clone PC61; BioLegend, San Diego, CA, USA) を用いて細胞表面を染色した。その後、Foxp3 staining buffer (e-Bioscience, San Diego, CA, USA) にて細胞を固定し、PE 標識 Foxp3 抗体 (clone FJK-16S; eBioscience) または control rat IgG2a κ (clone RKT2758, Biolegend) で細胞内染色を行った。染色した細胞をフローサイトメーター (FACS Canto II, BD Biosciences) で解析し、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞を Treg 細胞とした。

13) 統計学的解析

データ解析は、マッキントッシュコンピュータで統計解析ソフト JMP Pro[®] 9.0.2 software (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) を用いて行った。データは、平均 \pm 標準誤差で表した。群間比較は、post hoc analysis を用いた分散分析 (Fisher's Protected Least Significant Difference test) で解析した。生存データは、一般化 Wilcoxon 検定で解析した。P 値 0.05 未満で統計学的有意とした。

14) 倫理面への配慮

すべての実験は、東北大学の動物実験専門委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

1) FARDS マウスモデルにおける各種治療薬の効果

ARDS の新たな治療法を探索するために、我々が開発したモデルマウスを用いることで、シベレスタットナトリウム、高用量ガンマグロブリン、新規マクロライド薬 (EM900) の治療効果について検討したが、いずれも有意な生存延長効果は認められなかった。

2) FARDS マウスモデルにおける I 型インターフェロンの治療効果

近年、抗ウイルス作用に加えて、抗炎症作用が報告されている I 型インターフェロンの治療効果について検討した。FARDS マウスへのヒト IFN- α /D または IFN- β 投与の影響について調べたところ、生存期間は、高用量の IFN- α /D あるいは IFN- β 投与ではコントロールと比べ有意差はみられなかったものの、100U のような低容量の IFN- α /D を投与したマウスでは有意な延長が観察された。

LPS 投与 3 日後の肺は、コントロール群では著明な浮腫、炎症性変化とともに血性胸水が認められたのに対して、低容量の IFN- α /D を投与したマウスでは血性胸水はみられず、炎症性変化の明らかな減弱が観察された。病理学的解析では、コントロール群で肺に著明な DAD 像が観察されたのに対して、低容量の IFN- α /D を投与したマウスでは DAD 像はみられず、炎症性変化の明らかな減弱が認められた。この結果に一致して、肺の湿乾重量比及び肺内での IFN- γ 産生は、コントロールマウスに比べ低容量の IFN- α /D を投与したマウスにおいて著明な低下が観察された。

3) FARDS マウスにおける BALF 中 HMGB1 濃度の増加

致死性 FARDS マウスにおける HMGB1 の関与を調べるために、BALF 中の HMGB1 濃度を経時的に測定した。FARDS マウス

(α -GalCer/LPS 群) の対照として、 α -GalCer/PBS 群、PBS/LPS 群、PBS/PBS 群をおき比較した。LPS 投与 0 時間後 (α -GalCer 投与 24 時間後) では、4 群間で差はなかった。LPS 投与 6 時間後では、 α -GalCer/LPS 群と α -GalCer/PBS 群で高値となり、LPS 投与 12 時間後には、 α -GalCer/PBS 群は減少したが、 α -GalCer/LPS 群では、さらに高値になり、24 時間後も高値は持続した。PBS/LPS 群は、時間経過とともに緩徐な上昇を示したが、LPS 投与 24 時間後でも α -GalCer/LPS 群には及ばなかった。軽度な肺傷害を起こす PBS/LPS 群に比べて、FARDS モデルマウス (α -GalCer/LPS) で、HMGB1 値がより早期に、かつ有意に高値であったことより、HMGB1 が FARDS の病態形成に寄与することが示唆された。

4) FARDS マウスモデルにおける HMGB1 分泌細胞

さらに、FARDS モデルマウス (α -GalCer/LPS) における HMGB1 分泌細胞を明らかにする目的で、HMGB1 が最も高値であった LPS 投与 12 時間後の肺病理標本の HMGB1 免疫組織化学解析をおこなった。 α -GalCer/LPS では、肺胞内への炎症性細胞 (好中球とマクロファージ・単球系細胞) 浸潤がみられ、これらの細胞で HMGB1 が陽性であった。一方、PBS/PBS 群では、肺胞内への炎症性細胞浸潤はみられなかった。

この結果より、FARDS において、肺胞腔内へ浸潤する炎症性細胞からの HMGB1 分泌が、HMGB1 高値につながっていることが示唆された。

5) FARDS に対する rTM の治療効果

抗凝固薬である rTM は、近年、HMGB1 の中和作用により抗炎症効果を示すことが報告されている。そこで、FARDS に対して rTM が有効であるか否かを明らかにする目的で、 α -GalCer/LPS 投与マウスに対して rTM を腹腔内投与して、生存観察を行った。

rTM 3 mg/kg 投与では、生存率改善効果がなかったが、10 mg/kg 投与により、対照の PBS 投与群に比べて、明らかに生存率が改善した。さらに、劇症型 ARDS モデルマウスの肺における炎症性変化に対する rTM の治療効果を調べるために、病理組織学的検討を行った。LPS 投与 48 時間後の肺において、炎症性細胞の肺胞隔壁および肺胞腔内への浸潤と、肺間質の肺浮腫は、対照群に比べて rTM 投与群で明らかに軽減された。肺の炎症性変化を客観的に評価するために、肺傷害スコアリングシステムを用いて、肺傷害の組織学的変化を定量したところ、図 1 に示すように、肺傷害スコアは対照群に比

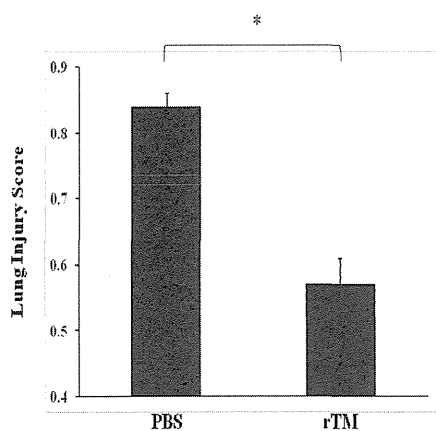


図1. rTMのFARDSマウスにおける急性肺傷害への影響

べて、rTM 投与群で明らかに低かった。以上の結果より、rTM は、 α -GalCer 感作と LPS 投与による FARDS の発症を抑制する効果を示した。

6) FARDS モデル肺での IFN- γ および TNF- α の産生に対する rTM の効果

我々のこれまでの解析により、FARDS の病態形成において、肺で産生される IFN- γ および TNF- α が重要な役割を担うサイトカ

インであることを明らかにしてきた。そこで、rTM が肺での IFN- γ および TNF- α 産生に影響を及ぼすか否かを明らかにする目的で、 α -GalCer/LPS 投与マウスに対して rTM および対照薬として PBS を投与して、6、12、24 時間後の BALF および肺ホモジネート中の IFN- γ および TNF- α 濃度を測定した。rTM 10mg/kg の投与は、LPS 投与 6、12、24 時間後すべての時間の BALF および肺ホモジネートにおいて、IFN- γ および TNF- α 産生に明らかな影響を及ぼさなかった。この結果より、rTM による劇症型 ARDS の治療効果は、IFN- γ および TNF- α 産生抑制とは異なる機序によるものであることが示唆された。

7) FARDS モデル肺における Treg 細胞に対する rTM の効果

近年、LPS 誘発肺傷害の修復過程で、Treg 細胞が関与するという報告がなされた。そこで、マウス FARDS モデルにおいても、 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ で同定される Treg 細胞が炎症の軽減に関わっているか否かを検討した。dPBS/LPS 投与マウスに比べて、 α -GalCer/LPS 投与マウスでは、Treg 細胞が減少していると仮説を立て、さらに rTM 投与により Treg 細胞がどのような影響を受けるかを検証するために実験を行った。図 2 に示すように、dPBS/LPS 投与マウスと比較して、 α -GalCer/LPS 投与マウスでは、肺内リンパ球における Treg 細胞の割合が明らかに減少していた。そして、 α -GalCer/LPS 投与マウスに対して rTM を投与すると、PBS 投与群と比較して、明らかに Treg 細胞の割合が増加した。これらの結果から、FARDS マウスに対する rTM の治療効果として、肺において減少した Treg 細胞の割合を回復さ

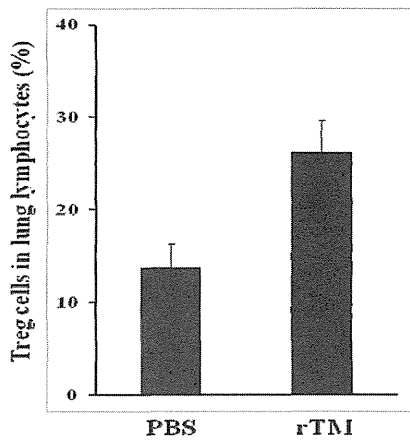


図2. rTMのTreg細胞への影響

せることが、関与している可能性が示された。

8) FARDS モデル肺での IL-10 および TGF- β の産生に対する rTM の効果

IL-10 および TGF- β は、Treg 細胞の抗炎症作用において、重要な役割を担うサイトカインであることが知られている。そこで、FARDS マウスの肺内での IL-10 および TGF- β 産生に対する rTM の影響を調べた。図3に示すように、PBS 投与と比べて、rTM 投与により、 α -GalCer/LPS 投与マウスの肺ホモジネート中 IL-10 および TGF- β 濃度が有意に上昇した。この結果より、rTM の治療効果の機序として、抗炎症性サイトカインの産生増加による可能性があることが示唆された。

9) インフルエンザウイルス感染による肺線維化モデルの作製

2009年に起こったインフルエンザウイルス A/H1N1pdm のパンデミックの際に、重症 ARDS から救命できたにもかかわらず、肺の線維化をきたして著しく QOL を落とす症例が報告されている (Radiol. Med. 117: 185-200, 2012; Eur. J. Radiol. 79: 447-451, 2011)。これまでの研究の多くがインフルエンザウイルスによる致死モデルを用いたものであったため、このような臨床的事例に

についてはその発症機序を解析することが容易ではなかった。そこで、我々は、非致死量のインフルエンザウイルス A/H1N1 (PR8 株) をマウスに経気道感染させ、ARDS が軽減した後に肺線維化をきたすモデルの作製に成功した。

10) インフルエンザウイルス感染による肺線維化モデルにおける炎症反応の解析

このモデルにおける感染後の肺内ウイルス量を M1 遺伝子のリアルタイム PCR で解析すると、7 日後をピークに増加し、その後徐々に減少することが分かった。この結果に一致して、感染 11 日~14 日後をピークに BALF 中のタンパク濃度の増加で示される浸出性変化と、病理学的に DAD の所見が観察された。この経時的な変化に一致して、BALF 中の白血球、好中球数が増加し、興味深いことに、これより遅れてリンパ球数の増加が観察された。マクロファージは早

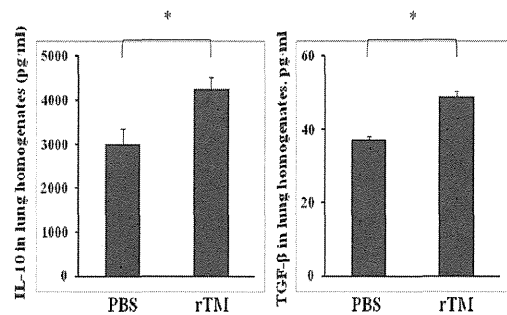


図3. rTMの抗炎症性サイトカインへの影響

期と晩期に増加し 2 相性の変化を示した。BALF 中のサイトカインの解析では、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、G-CSF、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MCP-1、RANTES、IL-10 が 1 週間をピークに増加し、その後漸減した。こうして、本モデルでは、インフルエンザウイルス感染によって急激な炎症性変化を来し、感染自体が制御された後に、肺の線維化がみられることが明らかになった。

D. 考案

高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) 感染症では急速に進行する激しい ARDS (Fulminant ARDS: FARDS) により死に至る症例が少なくないことが、本研究グループのベトナムでの研究において明らかにされた (Kawachi S et al. *J. Infect. Dis.* 200; 510-515, 2009)。FARDS の病態は不明な点が多いが、肺内でのサイトカインストームが深く関係すると考えられている。したがって、治療には抗ウイルス薬による感染のコントロールに加えて過剰なサイトカイン産生を含めた免疫反応を制御することが重要になる。このような目的でステロイド薬が投与されるが、その治療効果はあまり期待できないと考えられている。わが国では ARDS に対してシベスタットナトリウムを用いることがあるが、H5N1 感染による FARDS への効果は明らかではない。また、本研究グループによるベトナムでの研究では、高用量ガンマグロブリン治療が試みられているが、今後のさらなる検証が必要と考えられる。このように、H5N1 感染症にともなう FARDS の治療法はまだ十分に確立されているとはいえ、新たな治療薬も含めて、有効な治療法の開発が強く望まれている。

そこで本研究では、我々が開発した FARDS モデルマウスを用いて、いくつかの候補薬についてその治療効果を検証した。シベスタットナトリウム、ガンマグロブリン製剤の高用量投与、マクロライド薬については、実験によってはマウスの生存期間の有意な延長が認められる場合もあるが、いずれも再現性が示すことができず、投与条件も含めた今後の検討が必要と考えられた。

近年、抗ウイルス作用に加えて、抗炎症作用が報告されている I 型インターフェロンの治療効果について検討した。FARDS マウスへの I 型インターフェロン投与の影

響について検討を行ったところ、低容量 IFN- α /D の投与により生存期間の有意な延長が観察されるとともに、肺におけるサイトカインの過剰産生や過剰な炎症応答が抑制され、病理学的解析では DAD にまで至ることはなかった。I 型インターフェロンの抗炎症作用については、他のモデル動物においても報告がみられ始めている (Durbin JE et al. *J. Immunol.* 164: 4220-4228, 2000; Cobelens PM et al. *Crit. Care* 14: R157, 2010)。

今回の研究成果から、H5N1 による FARDS の発症に I 型インターフェロンが深く関与する可能性が予測され、今後は実際の H5N1 感染者において FARDS の有無により I 型インターフェロン産生に違いがみられないかを検討する必要があると考えられる。さらには、このような症例に I 型インターフェロンを投与することで、その抗ウイルス活性に加え、抗炎症作用による FARDS の発症予防及び治療効果が期待できるかもしれない。

HMGB1 は DAMPs の一つであり、新たな炎症性メディエーターとして注目されている。また炎症の後期に上昇し、高値が持続することより治療標的になる可能性がある (Wang H, et al. *Science* 285:248-51, 1999.)。

そこで、我々は FARDS モデルマウスにおける BALF 中の HMGB1 の動態を調べた。 α -Galcer の前投与の代わりに PBS を投与した後に、LPS を投与した群 (PBS/LPS) に比べて、FARDS モデルでは、LPS 投与 6 時間後より HMGB1 が明らかに高値となり、それは 24 時間まで持続した。一方、PBS/LPS 群では、HMGB1 は緩徐に上昇した。前述のように LPS 単独の気道内投与では、炎症は軽微であることより、HMGB1 が FARDS の高度な炎症に寄与することが示唆された。免疫組織化学的検討では、PBS 2 回投与による Sham-operated マウスでは、肺胞腔内にも間質にも炎症性細胞はみられないのに対して、FARDS モデルマウスでは、肺胞腔内

への炎症性細胞（好中球とマクロファージ・単球系細胞）浸潤がみられ、HMGB1 染色陽性であることより、これらの細胞が HMGB1 を分泌していることがわかった。

HMGB1 が FARDS の治療標的になり得る可能性が浮かび上がったので、HMGB1 を吸着、中和、分解することによって、抗炎症効果を示すことが報告されている rTM (Maruyama et al. *J. Clin. Invest.* 115: 1267-1274, 2005, Maruyama et al. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29: 1825-1830, 2008) について検討した。FARDS マウスに rTM を投与したところ、生存率の改善と肺の炎症性変化の軽減が観察された。さらに、肺の Treg 細胞は、LPS 誘発肺傷害マウス（非致死マウス）と比較して、FARDS マウスで減少したが、rTM 投与によって Treg 細胞の増加がみられ、抗炎症性サイトカインである IL-10 と TGF- β が上昇した。

rTM は、N 末端レクチン様ドメインで HMGB1 と結合することによって、炎症反応を抑制することが知られている。Abeyama らは、紫外線照射による皮膚傷害モデルにおいて、rTM 投与により白血球の炎症局所への集積と TNF- α 産生が減少したことを報告している (Abeyama et al. *J. Clin. Invest.* 115: 1267-1274, 2005)。同様に、Nagato らは、LPS 投与誘発敗血症モデルに対して rTM を投与すると、HMGB1 を抑制することによって、血清 IL-1 β および TNF- α 濃度が減少することを示した (Nagato et al. *Crit. Care Med.* 37: 2181-2186, 2009)。これらの研究結果と同様に、本研究においても rTM は FARDS マウスの転帰を改善し、肺における炎症反応を軽減した。しかしながら、予想に反して、FARDS マウスの重度肺傷害形成に重要な役割を担う IFN- γ および TNF- α の

産生に対しては、影響を及ぼさなかった。

rTM が何故これらの炎症性サイトカインに対して影響を及ぼさないかについては、さらなる研究が必要である。

FARDS マウスにおいて、rTM が有効に作用する機序を明らかにする目的で、Treg 細胞が関与する可能性を検証した。Treg 細胞は、IL-10 および TGF- β といった抗炎症性サイトカインを分泌することによって、炎症病態における免疫反応を調整することが知られている (Bilate et al. *Ann. Rev. Immunol.* 30: 733-758, 2012)。本研究では、LPS 投与 6 時間後という非常に早い時期において、肺の Treg 細胞が劇症型 ARDS マウスにおいて、LPS 誘発肺傷害マウスと比べて、明らかに少なく、さらに rTM の投与により、FARDS マウス肺の Treg 細胞が増加した。この結果は、Treg 細胞が肺傷害の転帰に関与する可能性、つまり Treg 細胞が減少することにより FARDS が誘導され、Treg 細胞が増加することにより重度肺傷害が軽減される可能性を強く支持すると考えられる。FARDS の病態形成過程で、Treg 細胞の増減が、免疫反応の自然免疫の時期に認められたことから、この T 細胞は、ナイーブ T 細胞が抗原刺激を受けて分化する iTreg 細胞 (induced Treg cell; 誘導型制御性 T 細胞) ではなくて、nTreg (natural Treg cell; 自然発生型制御性 T 細胞) であることが示唆される (Bilate et al. *Ann. Rev. Immunol.* 30: 733-758, 2012)。今後は、FARDS の病態形成において、Treg 細胞の集積がいかんして阻害されるのか、そして活性化 NKT 細胞や Treg 細胞集積阻害はどのように関連するのかについてさらに解析していきたい。

IL-10 および TGF- β は、免疫反応および

炎症反応を制御する。これらのサイトカインは、Treg 細胞が介在する免疫反応および炎症反応の抑制に重要な役割を担っている。これらの報告と一致して、本研究においても、対照マウスと比較して rTM 投与マウスの肺で、IL-10 および TGF- β 産生が増加した。この結果より、rTM は Treg 細胞からの IL-10 および TGF- β という抗炎症性サイトカイン分泌を促進することによって、重度肺傷害に対する有効性を示す可能性が示唆された。

2009 年に起こったインフルエンザウイルス A/H1N1pdm のパンデミックの際に、重症 ARDS から救命できたにもかかわらず、肺の線維化をきたして著しく QOL を落とす症例が報告されている (Radiol. Med. 117: 185-200, 2012; Eur. J. Radiol. 79: 447-451, 2011)。これまでの研究の多くがインフルエンザウイルスによる致死モデルを用いたものであったため、このような臨床的事例についてはその発症機序を解析することが容易ではなかった。そこで、我々は、非致死量のインフルエンザウイルス A/H1N1 (PR8 株) をマウスに経気道感染させ、ARDS が軽減した後に肺線維化をきたすモデルの作製に成功した。本モデルでは、インフルエンザウイルス感染によって急激な炎症性変化を惹起し、ウイルス感染自体が制御された後に、肺の線維化がみられることが明らかになり、インフルエンザにともなう新たな臨床的課題にアプローチする上で有用なモデルと考えられるので、その発症病態を明らかにするために今後さらに解析を行っていきたい。

E. 結論

本研究では、我々が開発した致死性 FARDS モデルマウスを用いることで、I 型インターフェロン及び rTM の治療的有用性

を示すことができた。その作用機序については、まだ十分解明できていない点が多く今後の課題としたい。一方、非致死量のインフルエンザウイルス A/H1N1 を気道内感染させると、急性肺傷害の後に肺線維化を来すモデルを作製することに成功した。これは、インフルエンザによる ARDS 後の肺線維症の動物モデルとなり、その発症病態の解析に有用と考えられ、今後さらなる解析が望まれる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kudo D, Uno U, Aoyagi T, Akahori A, Ishii K, Kanno E, Maruyama R, Kushimoto S, Kaku M, Kawakami K: Low-dose interferon- α treatment improves survival and inflammatory responses in a mouse model of fulminant acute respiratory distress syndrome, Inflammation, 41319, online, 2013.
- 2) Aoyagi T, Yamamoto N, Hattal M, Tanno D, Miyazato A, Ishii K, Suzuki K, Nakayama T, Taniguchi M, Kunishima H, Hirakata Y, Kaku M, Kawakami K: Activation of pulmonary invariant NKT cells leads to exacerbation of acute lung injury caused by LPS through local production of IFN- γ and TNF- α by Gr-1+ monocytes. Int. Immunol. 23: 97-108, 2011.
- 3) 工藤大介, 久志本成樹, 川上和義: 病態生理, 第 2 章 病理・病態生理「新しい診断と治療の ABC 肺炎 改訂第 2 版」, 最新医学別冊, 最新医学社, 39-45, 2011.

2. 学会発表

【国際学会】

- 1) Kudo D, Ishii K, Kushimoto S, Kawakami K: Contributions of High-Mobility Group Box 1 in experimental fulminant acute respiratory distress syndrome. 7th International Shock Congress & 35th Annual Conference on Shock, Miami Beach, June 2012.
- 2) Aoyagi T, Yamamoto N, Tanno D, Kunishima H, Hirakata Y, Kitagawa M, Kaku M, Kawakami K: Role of Gr-1+ monocytes in the lethal acute lung injury caused by iNKT cell activation and LPS administration in mice. Workshop, 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, August 2010.

【国内学会】

- 1) 工藤大介、宇野賀津子、石井恵子、久志本成樹、川上和義: マウスARDSモデルに対するインターフェロン α の抗炎症効果と治療効果. 第40回日本免疫学会学術集会, 幕張, 11月2011年. 青柳哲史、山本夏男、宮里明子、八田益
- 2) 充、國島広之、北川美穂、平潟洋一、石井恵子、賀来満夫、川上和義: 致死性急性肺傷害モデルマウスの作成と発症・増悪機序の解析. 第21回日本生体防御学会学術総会, 仙台, 7月2010年.

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

蛍光ナノ粒子解析に伴うケモカインレセプターの役割 —インフルエンザ劇症化の解析と治療法を目指して—

研究分担者 山本 健二

国立国際医療研究センター研究所

研究要旨：

当初当分担研究の目的は、本研究主任研究者である河内らの人工呼吸振動を利用した非炎症性マウス肺炎モデルにおける、マクロファージの解析を行う事を目的としていた。特に非炎症性肺炎におけるケモカインやサイトカインの変化について検討し、好中球やリンパ球と異なるマクロファージの時間的挙動について検討した。その研究によってマクロファージのケモカイン-ケモカインレセプターシステムが重要な役割を持っていると認識するようになった。その結果 CCR5 レセプター及びそのライガンドの変化が顕著に多く測定された。また CCR1 レセプター及びそのライガンドも、CCR5 に比べればその変化量は少ないが、これもやはり顕著な変化を測定された観測できた。CCR5 および CCR1 が膜タンパクであることから、何かの細胞のメンブレインに存在していると考えられる。その細胞は、何であるかについては、不明である。またインフルエンザウイルス株 PR-8 に感染させる以前から肺臓器内いたのか、あるいは、どこか他の臓器から来たのか、さらにまた、その両方が起こっているのか、については現在のところ不明である

A. 研究目的

本研究の目的は、インフルエンザ感染症における重症化のメカニズムを解明し、その結果から得られる情報を用いて、早期診断法断の開発を行ない、さらにその知見を通して有効な治療法を開発することである。

そのため新たな疾病モデルのマウスを用いて構築し、Defused Arbeola Damage (DAD) のメカニズムの解明を行なうことも本研究の目的である。

我々は、マウスにおける PR8 を用いたインフルエンザ重症化モデルを構築することを本研究の目的とした。さらに DAD により死に至るまでどのように経過をたどるかを解析することがもう一つの目的である。このモデルでは、DAD により最終的にマウスが死亡する。

B. 研究方法

マウスに感染する能力のあるインフルエンザウイルス株 PR-8 を用いて、劇症型 ARDS

モデルのマウスを用いて構築し、そのシステムを用いて、インフルエンザ感染症における重症化のメカニズムを解明するシステムを構築し、ケモカインの劇的な亢進による重症化に関する経過を観察する。さらにサンプルを RT-PCR により変化を解析する。

具体的にはインフルエンザウイルス株 PR-8 を BALB/c に感染させ時間を追って、肺組織全体を分解し、その中に存在するケモカインレセプター CC ケモカイン及びそれらのケモカインレセプター量を網羅的に測定する。

また時間軸としては、DAYS 0 から 1 日間隔で数日に渡って計測する。

C. 研究結果

(1) インフルエンザ感染期において CCR5 の急激の亢進が確認された。それは、組織病変の重症度と一致するものである。

(2) 抗ウイルス剤により、上皮細胞への障害は抑制され、ケモカイン発現の一定の抑制が確認されたが、炎症病変は確認されたままである。

D. 考察

ケモカイン受容体の異常や暴走を検証し、制御することは、各種疾患の治療において意義があると考えられる。

E. 結論

マウスによるインフルエンザの重症化のモデルを用いて、DAD によるマウスの死亡についてケモカインレセプター 1 及び 5 が疾病による死に関係があることを示せた。またケモカインレセプターのブロッカーを、コントロールすることにより、治療に結び

つけらる可能性があることも示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Hanada S, Fujioka K, Futamura Y, Manabe Y, Hoshino A, **Yamamoto K**.

Evaluation of anti-inflammatory drug-conjugated silicon quantum dots: their cytotoxicity and biological effect.

Intl. J. Mol. Sci. 2013 Jan 10;14(1):1323-34.

2. Hoshino A, Ueha S, Hanada S, Imai T, Ito M, **Yamamoto K**, Matsushima K, Yamaguchi A, Iimura T.

Roles of chemokine receptor CX3CR1 in maintaining murine bone homeostasis through the regulation of both osteoblasts and osteoclasts.

J. Cell Sci. Epub ahead of print; Dec 21, 2012

3. Fujoka K, Hanada S, Kanaya F, Hoshino A, Sato K, Yokosuka S, Takigami Y, Hirakuri K, Shiohara A, Tilley RD, Manabe N, **Yamamoto K**, Manome Y.

Toxicity test: Fluorescent silicon nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series* 2011, in press

4. Hoshino A, Hanada S, **Yamamoto K**.

Toxicity of nanocrystal quantum dots: The relevance of surface modifications.

Arch. Toxicol. 2011 Jul;85(7):707-20. *Epub ahead of print; Mar 29, 2011*

5. Yamamoto K.

The Exposure of nanoparticles for Human Body. *Journal of Society of Powder Technology of Japan*. 2011;48(1):34-38.

6, Kato S, Itoh K, Yaoi T, Tozawa T, Yoshikawa Y, Yasui H, Kanamura N, Hoshino A, Manabe N, **Yamamoto K**, Fushiki S., Organ distribution of quantum dots after intraperitoneal administration, with special reference to area-specific distribution in the brain., *Nanotechnology*. 2010 Aug 20; 21(33):335103.e-pub ahead of print; 2010 Jul 27.

7, Hoshino A, Iimura T, Ueha S, Hanada S, Maruoka Y, Mayahara M, Suzuki K, Imai T, Ito M, Manome Y, Kirino T, Yamaguchi A, Matsushima K, **Yamamoto K**. Deficiency of chemokine receptor CCR1 causes osteopenia due to impaired functions of osteoclasts and osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 2010 Sep 10; 285(37):28826-28837, e-pub ahead of print; June 22, 2010 as doi: 10.1074/jbc.M109.099424.

8, Osaki Y, Maehara Y, Sato M, Hoshino A, **Yamamoto K**, Nagao T, Suzuki K, Kawachi S. Analysis of cytokine chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluids from patients with acute respiratory distress syndrome. *Journal of the Japanese Society of Intensive Care Medicine*. 2010 Apr; 17(2):179-184.

9, 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.* Volume 2010 (2010), Article ID 937684, 7 pages doi:10.1155/2010/937684

10, Yamamoto S, Manabe N, **Yamamoto K**. High-Definition Slit Lamp Video Camera System. *Ophthalmic Surgery, Lasers & Imaging* March/April 2010; 41(2).

11, Shiohara A, Hanada S, Prabakar S, Fujioka K, Lim TH, **Yamamoto K**, Northcote PT, Tilley RD. Chemical Reactions On Surface Molecules Attached to Silicon Quantum Dots. *J Am Chem Soc.* 2010 Jan 13;132(1):248-253.

2. 学会発表

「ケモカイン異常に関連する循環器疾患について」、第18回MPO研究会、2013年11月16日、17日、京都。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特願 2012-085215, 発明の名称; 骨減少症又は骨粗鬆症の予測またはモニタリングの方法, 出願日; 平成24年4月4日, 発明者; 山本健二ほか。

鳥インフルエンザウイルス感染症例の血漿蛋白質中の 3-ニトロチロシンの解析 と新規酸化ストレスバイオマーカーの探索

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 国立国際医療研究センター病院 集中治療室・医長

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による生体分子の酸化・ニトロ化修飾について解析を行ない、感染肺局所にて3-ニトロチロシン（3-NT）や8-ニトロ-cGMPが生成することや病態との関連性について報告してきた。そこでH22, H23年度の研究では、高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1）および新型インフルエンザウイルス（AH1pdm 2009）感染症を含む小児の致死性ARDS症例における血漿蛋白質中の3-NTレベルをHPLC-ECD法を用いて解析した。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（47症例）と非ARDS症例（25症例）を対象とし解析したところ、ARDS症例において有意に高い血漿蛋白質3-NTの生成を認めた。インフルエンザウイルス感染ARDS例（7症例）は非感染ARDS例（40症例）に比べ、3-NTレベルがより増加する傾向が見られ（オッズ比2.26）、死亡するリスクも高かった（オッズ比5.83）。3-NTレベルは肺胞上皮修復のマーカーであるKL-6や酸素化の指標であるP/F比と正の相関を認め、3-NTの生成はARDS後の肺の修復を反映している可能性が示唆された。またH24年度の研究では、酸化ストレス応答を制御する新規因子として、チオール化合物に硫黄原子が付加したポリスルフィド（R-S-S_(n)H）に注目し、質量分析法を用いたポリスルフィドの高感度定量システムを確立した。マウスのインフルエンザ肺炎モデルでは、肺炎の進展に伴って、肺ホモジネートおよび血漿中の各種ポリスルフィドの減少が観察された。以上より、3-NTやポリスルフィドは、重症肺炎・ARDS病態における酸化ストレスのバイオマーカーとしての有用性が示唆され、臨床応用が期待される。

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（IFV）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-cGMP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、組織破碎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。

また、今回、酸化ストレス応答を制御する新規因子として硫黄含有化合物であるポリスルフィドに注目した。ポリスルフィドはチオール化合物に硫黄原子が付加した構造 (R-S-S_(n)H) を有している。我々は最近、8-ニトロ-cGMP による酸ストレス応答シグナルの制御機構を探索する中で、ポリスルフィドが 8-ニトロ-cGMP と反応することにより、酸化ストレス応答を制御していることを見出した。そこで本研究では、生体内ポリスルフィドの定量システムを開発し、ポリスルフィドの生体内生成メカニズムを解析するとともに、インフルエンザウイル

ス肺炎の酸化ストレスのバイオマーカーとしてポリスルフィドの有用性について検討した。

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 症例の前向き症例集積検討で得られた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。
- 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 20 μ l を逆相カラム (SC-500DS) 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 (-800 mV) で 3-アミノチロシンへと還元され、酸化セル (200 mV) で電気信号へと変換される。
- 6) 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 (20 fmol) であった。
7) 生体内に存在する各種低分子チオール化合物 (システイン、ホモシステイン、グルタチオンなど) のポリスルフィドの安定同位体標識体を合成し、HPLC-タンデム質量分析 (MS/MS) を用いた各種ポリスルフィドの定量法を確立した。ddY マウスにインフルエンザウイルス (H2N2 Kumamoto 株、2 LD₅₀ 量) を経鼻感染させ、感染 5 日後および 7 日後に肺組織と血漿を採取した。肺ホモジネートおよび血漿中の各種ポリスルフィドレベルを上述の HPLC-MS/MS 法により測定した。

(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

1) 3-NT についての研究対象とした症例 (72 症例) のうち、IFV 感染を伴わない ARDS 群 (Non IFV-ARDS 群) は 40 症例、IFV 感染を伴う ARDS 群 (IFV-ARDS 群) は 7 症例であった。また非 ARDS 群 (Non-ARDS 群) 25 症例を対照群とした。

IFV-ARDS 群の 3-NT/Tyr レベルの中央値は 0.350 $\mu\text{mol/mol}$ (interquartile range [IQR], 0.182-1.675) と、Non-ARDS 群の 0.210 $\mu\text{mol/mol}$ (0.122-0.278) に比べ、有意に高かった ($p = 0.046$)。一方、Non IFV-ARDS 群の 3-NT/Tyr レベルは 0.270 $\mu\text{mol/mol}$ (IQR, 0.125-0.640) と、Non-ARDS 群に比べ、やはり有意に高い傾向がみられた ($p = 0.039$)。3-NT/Tyr レベルが全体中央値 0.3 $\mu\text{mol/mol}$ より高い値となる危険度が対照群に比べどの程度高いかをロジスティック回帰分析にて求めたところ、Non IFV-ARDS 群でオッズ比 3.17 (1.05-9.59) であるのに対し、IFV-ARDS 群ではオッズ比 4.42 (0.73-24.44)

とより高い傾向が見られた。さらに、IFV-ARDS 群と Non IFV-ARDS 群の 3-NT/Tyr レベルには有意差を認めなかったものの、全体の平均値である 0.6 $\mu\text{mol/mol}$ より高い値をとる危険度をロジスティック回帰分析にて求めると、オッズ比 2.26 (0.43-11.82) と IFV-ARDS 群の方が高かった。また、死亡リスクも、オッズ比 5.83 (0.99-34.38) と IFV-ARDS 群の方が高く、Kaplan-Mayer 生存曲線でも明らかに Non IFV-ARDS 群に比べ予後不良であった。

以上、3-NT レベルの増加が ARDS、特に予後不良な IFV 感染群でより高い傾向がみられることから、病勢や予後と 3-NT との関連性についてさらに詳細に検討した。その結果、3-NT のレベルは、死亡例に比べ生存例にてより高く、生存曲線も 3-NT 高値例のほうが低値例に比べよりよい傾向が見られた。3-NT レベルと発症から採血までの日数との関係を調べてみたところ、ARDS の発症後 14 日目ごろをピークとして増加する群と増加しない群に分けられ、増加する群では増加しない群に比べ死亡率が低かった (23.0 vs 41.2%)。3-NT レベルと肺胞上皮修復のマーカーである KL-6 や酸素化の指標である PaO₂/FiO₂ (P/F) 比との関連を調べたところ、どちらも正の相関を認め、3-NT レベルが ARDS に伴う肺の修復に関連している可能性が示唆された。

2) HPLC-MS/MS 法による生体内ポリスルフィドの定量により、マウス臓器中では、様々なレベル (nM から μM) で各種ポリスルフィドが生成しており、特にグルタチオンポリスルフィドは 100 μM を超える高い濃度で存在することが示された。また、マウスおよびヒトの血漿中でも各種ポリスルフィドが検出され、定量が可能なことが分かった。インフルエンザウイルス肺炎モデルマウスでは、非感染コントロールマウスに比べ、肺ホモジネートおよび血漿中の各種ポリスルフィドが低下する傾向が見られ

た。ポリスルフィドの低下は、重篤な肺炎へと進行する感染後7日目で顕著であり、ARDSによる酸化ストレスとポリスルフィドの低下との関連性が示唆された。

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(NO₂)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(NO₂⁻)から作られるNO₂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NO₂⁻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。

本研究で、3-NTが増加する症例は、増加しない例に比べ予後がよく、ARDS後の肺の修復が良好に行われていることを反映しているためと考えられた。このことは、3-NTの増加をもたらす活性酸素種やNOが、肺の修復シグナルの一端を担っている可能性を示唆しており、現在症例数を増やし、この傾向の検証を行っているところである。さらに、液体クロマトグラフィー質量分析機と安定同位体希釈法を用いたより精度の高い3-NTの定量法の開発に着手した。この

方法が実現すれば、6-ニトロトリプトファンや脂質過酸化物の蛋白質アダクトといった別の修飾物質の測定にも応用でき、より幅広い酸化ストレスの評価が可能となることが期待される。

8-ニトロ-cGMPは、生体内においてROS・NOに依存して生成し、蛋白質S-グアニル化を介して酸化ストレス応答に重要な役割を果たしている。最近我々は、ポリスルフィドが、8-ニトロ-cGMPと反応することにより、酸化ストレスにおけるシグナル活性を制御していることを見出した。今回、安定同位体希釈法とHPLC-MS/MSを用いた各種ポリスルフィドの定量的解析システムを確立した。この定量法により、マウスやヒトの臓器ホモジネートや血漿試料中に各種ポリスルフィドが様々なレベルで存在することが明らかとなった。これは、生体内ポリスルフィドの生成を定量的に明らかにした世界で初めての成果と思われる。さらに、インフルエンザ肺炎モデルマウスにおいて生体内ポリスルフィドの低下が観察され、肺炎病態との関連が示唆された。このことは、肺炎に伴う酸化ストレスがポリスルフィドの低下に関与していることを示唆しており、8-ニトロ-cGMPシグナル制御と肺炎病態の進展との関連が考えられる。今後、ポリスルフィドによる8-ニトロ-cGMPによる酸化ストレス応答シグナルの制御機構をさらに詳細に解析することにより、ARDS発症メカニズムの解明がさらに進むことが期待される。また、我々は、8-ニトロ-cGMPによる酸化ストレス応答シグナルの制御因子としてポリスルフィドに注目してきたが、今回の定量的解析結果から、実はポリスルフィドが生体内の主要な抗酸化システムとして機能していることが示唆された。ポリスルフィドは血漿試料を用いて定量することが可能であり、ARDS病態とポリスルフィドの関連性についてさらに詳細に解析を進めることにより、インフル

エンザ肺炎における酸化ストレスのバイオマーカーとしてのポリスルフィドの有用性が明らかになってくるものと考えられる。

E. 結論

H5N1 感染症例を含む致死的 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とにより、検出・定量することに成功した。また、酸化ストレス応答の制御に関わる生体内ポリスルフィドの高感度定量法を確立した。今後、重症肺炎・ARDS をはじめとした様々な感染・炎症病態において、酸化ストレスのバイオマーカーとして 3-NT やポリスルフィドが臨床応用されることが期待される。

F. 健康危険情報：特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shigemoto Fujii and Takaaki Akaike. Redox signaling by 8-nitro-cyclic guanosine monophosphate: nitric oxide- and reactive oxygen species-derived electrophilic messenger. *Antioxid Redox Signal.* in press, 2013.
- 2) Md. Mizanur Rahaman, Tomohiro Sawa, Ahmed Khandaker Ahtesham, Shahzada Khan, Hirofumi Inoue, Atsuh Irie, Shigemoto Fujii, and Takaaki Akaike. S-Guanylation proteomics for redox-based mitochondrial signaling. *Antioxid Redox Signal.* in press, 2013.
- 3) Takahiro Joudoi, Yudai Shichiri, Nobuto Kamizono, Takaaki Akaike, Tomohiro Sawa, Jun Yoshitake, Naotaka Yamada, and Sumio Iwai. Nitrated cyclic GMP modulate guard cell signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* in press, 2013.
- 4) Takaaki Akaike, Motohiro Nishida, and Shigemoto Fujii. Regulation of redox signalling by an electrophilic cyclic nucleotide. *J Biochem.* 153: 131-138, 2013.
- 5) Yuki Kurauchi, Akinori Hisatsune,

- Yoichiro Isohama, Tomohiro Sawa, Takaaki Akaike, and Hiroshi Katsuki. Nitric oxide/soluble guanylyl cyclase signaling mediates depolarization-induced protection of rat mesencephalic dopaminergic neurons from MPP(+) cytotoxicity. *Neuroscience.* 231:206-215, 2013.
- 6) Kaori Watanabe, Yu Ishima, Takaaki Akaike, Tomohiro Sawa, Teruo Kuroda, Wakano Ogawa, Hiroshi Watanabe, Ayaka Suenaga, Toshiya Kai, Masaki Otagiri, and Toru Maruyana. S-nitrosated α -1-acid glycoprotein kills drug-resistant bacteria and aids survival in sepsis. *FASEB J.* 27:391-398, 2013.
 - 7) Kohta Oyama, Shahzada Khan, Tatsuya Okamoto, Shigemoto Fujii, Katsuhiko Ono, Tetsuro Matsunaga, Jun Yoshitake, Tomohiro Sawa, Junko, Tomida, Yoshiaki Kawamura, and Takaaki Akaike. Identification of and screening for human *Helicobacter cinaedi* infections and carriers via nested PCR *J Clin Microbiol.* 50: 3893-3900, 2012.
 - 8) Yohei Saito, Tomohiro Sawa, Jun Yoshitake, Chisato Ito, Shigemoto Fujii, Takaaki Akaike, and Hirokazu Arimoto. Nitric oxide promotes recycling of 8-nitro-cGMP, a cytoprotective mediator, into intact cGMP in cells. *Mol Biosyst.* 8: 2909-2915, 2012.
 - 9) Motohiro Nishida, Tomohiro Sawa, Naoyuki Kitajima, Katsuhiko Ono, Hirofumi Inoue, Hideshi Ihara, Hozumi Motohashi, Masayuki Yamamoto, Makoto Suematsu, Hitoshi Kurose, Albert van der Vliet, Bruce A Freeman, Takahiro Shibata, Koji Uchida, Yoshito Kumagai, and Takaaki Akaike. Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. *Nat Chem Biol.* 8: 714-724, 2012.
 - 10) Shang Guoguo, Takaaki Akaike, Jiang Tao, Chen Qi, Zhang Nong, and Li Hui. HGF-mediated inhibition of oxidative stress by 8-nitro-cGMP in high glucose-treated rat mesangial cells. *Free Radic Res.* 46: 1238-1248, 2012.
 - 11) Yoshifumi Sato, Mitsutoki Hatta, Md. Fazlul Karim, Tomohiro Sawa, Fan-Yan Wei, Shoki Sato, Mark A. Magnuson,