

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591170

研究課題名(和文)急性呼吸窮迫症候群の新しいバイオマーカー血中硫化水素イオンと重症化との関連性

研究課題名(英文)Hydrogen sulfide and reactive sulfur species regulate oxidative stress in ARDS

研究代表者

岡本 竜哉 (Okamoto, Tatsuya)

独立行政法人国立国際医療研究センター・ICU・CCU・HCU 管理室・医長

研究者番号：30419634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ARDSは予後不良の肺疾患である。インフルエンザモデルを用いて解析した結果、酸化ストレスに応じて8-ニトロcGMPが産生され、酸化ストレス応答因子を誘導し防御能を発揮することがわかった。最近、蛋白異化の過程で内因性に産生される硫化水素イオン(HS-)が8-ニトロcGMPを消去する現象を見いだした。本研究では、HS-および関連化合物の生体濃度を質量分析法にて解析した。その結果、培養細胞および感染マウスの血漿や臓器においては、HS-ではなくCysSSHやGSSHといったポリスルフィド体が産生され、これらは8-ニトロcGMPを消去し、ARDSの病態や酸化ストレス応答に関連している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Reactive persulfides and polysulfides are formed endogenously in high amounts in mammalian cells and tissues. These reactive sulfur species were biosynthesized by two major sulfurtransferases: cystathionine beta-synthase and cystathionine gamma-lyase. Quantitation of these species indicates that high concentrations of glutathione persulfide and other cysteine persulfide and polysulfide derivatives in peptides/proteins were endogenously produced and maintained in the plasma, cells, and tissues of mammals. Because they quickly react with a recently described biologically generated electrophile 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. These results indicate that persulfides are potentially important signaling/effector species, and because H<sub>2</sub>S can be generated from persulfide degradation, much of the reported biological activity associated with H<sub>2</sub>S may actually be that of persulfides. That is, H<sub>2</sub>S may act primarily as a marker for the biologically active of persulfide species.

研究分野：呼吸器内科学

 キーワード：急性呼吸窮迫症候群 8-ニトロcGMP 硫化水素イオン 生体内ポリスルフィド インフルエンザウイルス  
 ス肺炎 グルタチオン システイン 安定同位体希釈質量分析法

## 1. 研究開始当初の背景

急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) は、人工呼吸管理をはじめとする種々の治療法の進歩にもかかわらず、極めて死亡率の高い呼吸器症候群である。特に近年、新型あるいは高病原性鳥インフルエンザウイルス感染症に伴う致死的な ARDS が大きな社会問題となっており、新しい診断・治療法の開発は急務である。ARDS は、敗血症、外傷、薬剤、輸血といった種々の要因により発症するが、最も多い原因は、細菌あるいはウイルス等による感染症と考えられている。本来病原体を除去する目的で備わった自然免疫の過剰な応答が ARDS の本態であり、感染に伴って過剰に産生される活性酸素 (ROS) や一酸化窒素 (NO) による酸化ストレスが、ARDS の病態形成や重症化に重要な役割を演じていることが示唆されている。

我々はこれまで、インフルエンザウイルス感染に伴うマウス ARDS モデルを用いて ROS や NO の役割について解析を行ってきた。その結果、ROS・NO の過剰産生が宿主の細胞や肺組織を傷害することで ARDS の増悪因子として作用していることを明らかにした (PNAS 93: 2448, 1996; PNAS 100: 685, 2003)。一方我々は、ROS・NO に依存して、NO の 2 次シグナル分子である cyclic GMP (cGMP) のニトロ化体である新しい環状ヌクレオチド 8-ニトロ cGMP が、cGMP 濃度に匹敵するレベルで細胞内にて生じることを見いだした。この 8-ニトロ cGMP の特筆すべき化学的特性として、細胞内蛋白質のシステイン (Cys) 残基のチオール基と反応して、cGMP を付加する新しい蛋白質翻訳後修飾 (S-グアニル化) をもたらすことを明らかにした。抗酸化作用を発揮するヘムオキシゲナーゼ (HO)-1 等の酸化ストレス応答蛋白質は、その多くが転写因子 Nrf2 によって発現が制御されている。興味あることに、Nrf2 の抑制因子である Keap1 の S-グアニル化によって Nrf2 経路の活性化がもたらされることがわかった。すなわち、8-ニトロ cGMP は、センサー蛋白質 Keap1 の S-グアニル化を介して、酸化ストレス応答のシグナル分子として作用し、ARDS 病態に対して防御的な作用を有することが明らかとなった (Nature Chem Biol 3: 727, 2007, J Immunol 182: 3746, 2008, J Biol Chem 285: 23970, 2010)。これらの知見を踏まえ、酸化ストレス応答シグナル分子である 8-ニトロ cGMP の産生低下をもたらす病態下の生体内環境が、ARDS の重症化と密接に関係しているとの着想に至った。

ごく最近、単純な含硫分子である硫化水素 ( $\text{H}_2\text{S}$ ) が水溶液中で硫化水素イオン ( $\text{HS}^-$ ) となり、生理的な pH にて 8-ニトロ cGMP と反応しこれを消去する現象を発見した。硫化水素は火山ガスなどに含まれる有毒ガスとして知られているが、ヒトの生体内でも内因性に産生されることが知られている。例えば、Cys 分解の過程で cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS) や cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE) により産生され、また、腸管や口腔内では、常在菌、特に嫌気性細菌によってエネルギー代謝 (硫酸還元) の過程で多量に産生される。 $\text{HS}^-$  が、病態下においてどのような生物活性を発揮するかについてはほとんど知られておらず、また ARDS において血中の硫化水素を測定した報告は見られないのが現状である。しかしながら ARDS に至る重篤な感染病態下においては、蛋白異化亢進に伴って Cys 分解が促進され、また腎機能悪化に伴う排泄低下、あるいは感染病原体自体による産生なども相まって、血中の硫化水素イオン濃度が増加する可能性が考えられる。我々は、 $\text{HS}^-$  の上昇は、8-ニトロ cGMP を消去し、その結果、酸化ストレス応答が抑制され、ARDS 病態の重症化につながるとの仮説をたて、今回の研究計画の立案に至った。

## 2. 研究の目的

本研究課題においては、8-ニトロ cGMP の生成に影響を及ぼすと考えられる既存の各種酸化ストレスマーカーを網羅的に解析するとともに、血中  $\text{HS}^-$  濃度を高感度かつ特異的に定量分析し、ARDS の病勢や重症度との関連性について検討する。これにより ARDS の病態解明ならびに重症化の予測に向けた基盤的研究を推進し、新たな治療戦略の開発を目指すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

まずインフルエンザウイルス感染マウス ARDS モデルを用いて、8-ニトロ cGMP の生成とこれに伴う酸化ストレス応答が ARDS の病態に及ぼす影響について解析した。また、血漿中の低分子酸化ストレス修飾分子の時間的・量的な生成動態を LC-MS/MS 法や HPLC-ECD 法にて網羅的に解析し、肺局所での 8-ニトロ cGMP や S-グアニル化蛋白質の生成との関連性を解析した。また、血漿中  $\text{HS}^-$  濃度を LC-MS/MS 法にて定量分析し、前述の 8-ニトロ cGMP や低分子酸化ストレス修飾分子との相互関係を解析した。

#### 4 . 研究成果

まず、HS<sup>-</sup>およびその関連化合物を高感度・特異的に定量分析する安定同位体希釈法・質量分析法を開発した。具体的には、細胞・組織破碎液や血漿といった生体試料にチオール反応試薬である monobromobimane (MBB) を加え、遠心分離上清中に含まれる MBB と HS<sup>-</sup>のアダクトである Bis-S-bimane、Cys や GSH (還元型グルタチオン) およびそのポリスルフィド体であるシステインパースルフィド (CysSSH) やグルタチオンパースルフィド (GSSH) 等の MBB アダクト (CysS-bimane、GS-bimane、CysSS-bimane、GSS-bimane) を液体クロマトグラフィー質量分析器 (LC-MS/MS) にて測定した。それぞれの安定同位体 (Bis-[<sup>34</sup>S]-bimane など) を外部標準として添加・同時測定し定量性を確保した。その結果、生体内においては、CBS・CSE の酵素活性に依存して、食事に含まれるメチオニンから作られるシスチン (CysSSCys) を基質として、HS<sup>-</sup>ではなく CysSSH が産生されること、さらに CysSSH は、細胞質内に多量に存在する GSH と反応し GSSH へと変換されることがわかった。実際、種々の培養細胞の細胞質内および健常マウスの血漿や主要臓器中には非常に高い濃度 (GSH の 5% 程度に相当する 10-100 μM の GSSH レベル) のポリスルフィド体が存在することなどが明らかとなった。さらに in vitro の解析にて、GSSH は 8-ニトロ cGMP を消去し 8-SH-cGMP を生じることがわかった。実際、マウスの臓器内には cGMP に匹敵あるいはこれを上回る量の 8-SH-cGMP が存在しており、また細胞に炎症刺激を加えることによって 8-SH-cGMP が増加することを見いだした。インフルエンザウイルス感染マウスの解析では、肺組織破碎液中で Cys や GSH が減少するとともに CysSSH が増加し、一方血漿中の CysSSH は減少することが予備実験にてわかった。以上より、インフルエンザ肺炎の肺局所でポリスルフィド体が産生され、ARDS の病態や酸化ストレス応答に関連している可能性が示唆された。

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Kawamura Y, Tomida J, Morita Y, Fujii S, Okamoto T, Akaike T. Clinical and bacteriological characteristics of *Helicobacter cinaedi* infection. *J Infect Chemother* 2014; 20: 517-526. 査読有. DOI:10.1016/j.jiac.2014.06.007.
2. Kawamura Y, Okamoto T, Fujii S, Akaike T. *Helicobacter cinaedi* infections. *Clin Lab Intl* 2014; 39-42. 査読有. www.cli-online.com/index.php?id=3946.
3. Khan S, Rahman HN, Okamoto T, Matsunaga T, Fujiwara Y, Sawa T, Yoshitake J, Ono K, Ahmed KA, Rahaman MM, Oyama K, Takeya M, Ida T, Kawamura Y, Fujii S, Akaike T. Promotion of atherosclerosis by *Helicobacter cinaedi* infection that involves macrophage-driven proinflammatory responses. *Sci Rep* 2014; 4: 4680. 査読有. DOI:10.1038/srep04680.
4. Tomida J, Oumi A, Okamoto T, Morita Y, Okayama A, Misawa N, Hayashi T, Akaike T, Kawamura Y. Comparative evaluation of the agar dilution and broth microdilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Helicobacter cinaedi*. *Microbiol Immunol* 2013; 57: 353-358. 査読有. DOI:10.1111/1348-0421.12044.
5. Oyama K, Khan S, Okamoto T, Fujii S, Ono K, Matsunaga T, Yoshitake J, Sawa T, Tomida J, Kawamura Y, Akaike T. Identification of and screening for human *Helicobacter cinaedi* infections and carriers via nested PCR. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 3893-3900. 査読有. DOI:10.1128/JCM.01622-12.
6. Khan S, Okamoto T, Enomoto K, Sakashita N, Oyama K, Fujii S, Sawa T, Takeya M, Ogawa H, Yamabe H, Akaike T. Potential association of *Helicobacter cinaedi* with atrial arrhythmia and atherosclerosis. *Microbiol Immunol* 2012; 56: 145-154. 査読有. DOI:10.1111/j.1348-0421.2012.00421.x.
7. Ahmed KA, Sawa T, Ihara H, Kasamatsu S, Yoshitake J, Rahaman MM, Okamoto T, Fujii S, Akaike T. Regulation by mitochondrial superoxide and NADPH oxidase of cellular formation of nitrated cyclic GMP: potential implications for ROS signalling. *Biochem J* 2012; 441: 719-730. 査読有. DOI:10.1042/BJ20111130.

[学会発表] (計 4 件)

1. Okamoto T et al. Detection of protein-bound 3-nitrotyrosin in plasma from pediatric patient with fulminant ARDS and avian influenza virus infection. 2nd International Society for Influenza and other Respiratory

Virus Diseases Conference. 10/29/2012,  
Hanoi (Viet Nam).

2. 岡本竜哉. 小児致死的 ARDS 症例および鳥インフルエンザウイルス感染症例の血漿蛋白質 3-ニトロチロシンの解析. 第 40 回日本集中治療医学会学術集会. 2/28/2013, 長野県松本文化会館(松本市).
3. 岡本竜哉. ヘリコバクター・シネディの感染拡大と分子疫学. 第 6 回感染病態研究フロンティア. 6/29/2013, フクラシア東京ステーション(東京都).
4. 岡本竜哉. Nested PCR 法による健常者における新興感染症菌 *Helicobacter cinaedi* 感染のスクリーニング. 第 87 回日本細菌学会総会. 3/26/2014, タワーホール船橋(東京都).

〔図書〕(計 1 件)

1. Okamoto T, Zaki MH, Fujii S, Sawa T, Akaike T. Nitric oxide-mediated host immune response and microbial pathogenesis. Nitric oxide synthase inhibitors: From animal studies to clinical implications (Bahar Tunctan editor, Transworld Research Network) 2013: pp. 209-223.  
[www.trnres.com/tunctan.htm](http://www.trnres.com/tunctan.htm). 査読有.

〔産業財産権〕

- 出願状況(なし)
- 取得状況(なし)

〔その他〕なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡本竜哉 (Tatsuya Okamoto)  
国立国際医療研究センター  
ICU・CCU・HCU 管理室・医長  
研究者番号：30419634

### (2) 研究分担者

藤井重元 (Shigemoto Fujii)  
東北大学大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：00325333