

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19590902
 研究課題名（和文）間質性肺炎増悪因子としてのインフルエンザ感染とニトロ化ストレスの分子病態解析
 研究課題名（英文）Involvement of nitrative stress due to influenza virus infection on the pathogenesis and progression of interstitial pneumonias
 研究代表者
 岡本 竜哉（OKAMOTO TATSUYA）
 熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教
 研究者番号：30419634

研究成果の概要：マウスインフルエンザウイルス急性肺傷害モデルを用いて、一酸化窒素と活性酸素種によるニトロ化ストレスが、病態に及ぼす影響について解析を行った。その結果、ニトロ化ストレスにより、感染肺局所にて 8-ニトロ-cGMP が生じ、HO-1 をはじめとする酸化ストレス応答を制御するシグナル分子として、肺傷害や肺線維化の病態形成に参与している可能性が示唆された。今後、この知見を間質性肺炎の新たな治療戦略へ応用することが期待される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：特発性間質性肺炎、インフルエンザウイルス、ニトロ化ストレス、8-ニトロ-cGMP

1. 研究開始当初の背景

(1) 特発性間質性肺炎は、予後不良の慢性進行性呼吸器疾患で、その病因は未だ解明されておらず、有効な治療法も確立していない。特に、間質性肺炎の急性増悪は、その慢性経過中に発症する急性肺傷害で、その死亡率は 80%以上と極めて高い。急性増悪の原因もまた不明であるが、その誘因の一つに気道感染、特に、インフルエンザウイルス感染との因果関係が注目されている。我々はこれまで、マウスインフルエンザウイルス肺炎モデルの病態解析を行ない、感染に伴って産生される一酸化窒素（NO）と活性酸素種（ROS）が宿主生体にニトロ化ストレスをもたらし、その

ことが肺炎病態の形成に大きく係わっていることを明らかにした。

(2) このように、これまで NO や ROS は生体にとって有害な分子であると考えられてきたが、近年、これらの分子種は、感染病態においてむしろ積極的に産生され、酸化・ニトロ化ストレスに対する生体の防御応答におけるシグナル分子として作用することが次第に明らかとなってきた。最近我々は、NO の 2 次シグナル分子である cyclic GMP 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-ニトログアノシン 3',5'-環状 1 リン酸（8-ニトロ-cGMP）を、化学的に同定することに成功した。

2. 研究の目的

インフルエンザウイルス感染に伴うニトロ化ストレスの亢進が間質性肺炎における肺胞上皮傷害と炎症反応を増強させ、病態の発現と進展に寄与するとの仮説のもと、マウスインフルエンザウイルス肺炎モデルを用いて、種々のニトロ化ストレスのバイオマーカーを測定し、病態との関連性を明らかにする。特に我々が発見した 8-ニトロ-cGMP については、ニトロ化ストレス応答におけるシグナル分子としての活性についても解析を行う。このことにより、間質性肺炎の病態解明に向けた基盤的研究を推進し、その新たな治療戦略の開発を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 5 週齢雄の野生型 (C57BL/6) マウスと、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) 欠損マウスに、マウスに馴化したインフルエンザウイルス (A/Kumamoto/67/H2N2) をネプライザーにて吸入感染させ、経時的に肺組織、肺胞洗浄液 (BALF)、血液等を採取した。

(2) 感染マウスの BALF 中の蛋白質をプロナーゼで消化し、HPLC-電気化学検出 (ECD) 法によりニトロ化ストレスのバイオマーカーとして広く用いられている 3-ニトロチロシンの定量解析を行った。

(3) 感染マウスの肺凍結切片肺組織を、抗 3-ニトロチロシン抗体や抗 8-ニトロ-cGMP マウスモノクローナル抗体 (1G6) を用いて免疫染色を行ない、その生成と局在について、野生型と iNOS 欠損マウス間で比較・検討した。

(4) 感染マウスの肺組織ホモジネートを調製し、酸化・ニトロ化ストレス応答因子であるヘムオキシゲナーゼ (HO)-1 の発現を Western blot 法により解析した。

(5) HO-1 の反応産物である一酸化炭素の血中濃度をガスクロマトグラフィー法にて測定し、HO-1 の蛋白質量との相関性について検討した。

4. 研究成果

(1) BALF 蛋白質中の 3-ニトロチロシンを HPLC-ECD にて解析したところ、肺炎病態に伴った増加が認められ、また感染マウス肺組織の免疫染色にて、野生型マウスにおいては、炎症細胞、気道上皮、肺胞浸出液などに強い染色像が得られた。

(2) 8-ニトロ-cGMP に対する抗体を作成し、感染肺組織を解析したところ、感染第 7-9 病日をピークとして、肺局所に浸潤した炎症細胞および気道上皮細胞に強い免疫染色像を認めた。

(3) 8-ニトロ-cGMP が蛋白質チオール基と反応して、cGMP を付加する全く新規な翻訳後修飾 (S-グアニル化) をもたらすことを見だし、実際にインフルエンザウイルス感染肺局所でおこっていることを免疫染色法により明らかにした。

(4) 感染に伴ない肺局所で抗酸化・抗アポトーシス作用を有する HO-1 の発現が亢進しており、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った。また、第 17 病日においては広範な肺の線維化と HO-1 の持続的発現を認め、線維化形成における HO-1 の関与が示唆された。

(5) iNOS 欠損マウスの腹腔マクロファージの培養系に 8-ニトロ-cGMP を添加したところ、HO-1 の発現誘導が濃度依存的・時間依存的にもたらされた。また iNOS 欠損マウスに、気管内投与にて 8-ニトロ-cGMP を投与し、肺・肝臓・腎臓などにおける HO-1 の発現レベルを解析したところ、肺において有意な HO-1 の誘導を認めた。

(6) 以上より、ニトロ化ストレスにより生じる 8-ニトロ-cGMP は、HO-1 をはじめとする酸化ストレス応答を制御するシグナル分子として、肺傷害や肺線維化の病態形成に関与している可能性が示唆され、間質性肺炎における新たな治療戦略上の標的分子としてその応用が期待された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

1. Zaki MH, Fujii S, Okamoto T, Islam S, Khan S, Ahmed KA, Sawa T, and Akaike T. Cytoprotective function of heme oxygenase 1 induced by a nitrated cyclic nucleotide formed during murine salmonellosis. J Immunol. 182: 3746-56. 2009. (査読有)

2. 赤池孝章, 岡本竜哉, Zaki MH, 藤井重元, 澤智裕. NO による細胞内感染防御の新しい展開. 日本ハンセン病学会雑誌. 78: 41-47. 2009. (査読無)

3. 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. 細胞. 41: 51-55. 2009. (査読無)

4. Alam MS, Zaki MH, Sawa T, Islam S, Ahmed KA, Fujii S, Okamoto T, and Akaike T. Nitric oxide produced in Peyer's patches exhibits antiapoptotic activity contributing to an antimicrobial effect in murine salmonellosis. Microbiol Immunol. 52: 197-208. 2008. (査読有)

5. Kaneko K, Akuta T, Sawa T, Kim HW, Fujii S, Okamoto T, Nakayama H, Ohigashi H, Murakami A, and Akaike T. Mutagenicity of 8-nitroguanosine, a product of nitrative nucleoside modification by reactive nitrogen oxides, in mammalian cells. *Cancer Lett.* 262: 239-47. 2008. (査読有)
6. 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: 851-6. 2008. (査読無)
7. 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: 12-7. 2008. (査読無)
8. Sawa T, Zaki MH, Okamoto T, Akuta T, Tokutomi Y, Kim-Mitsuyama S, Ihara H, Kobayashi A, Yamamoto M, Fujii S, Arimoto H, and Akaike T. Protein S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Nature Chem Biol.* 3: 727-35. 2007. (査読有)
9. Zaki MH, Okamoto T, Sawa T, Fujii S, and Akaike T. Nitrative stress in respiratory inflammation caused by influenza virus infection. *Clin Exp Allergy Rev.* 7: 19-26. 2007. (査読有)
10. Akaike T, and Okamoto T. Guanine nitration in idiopathic pulmonary fibrosis and its implication for carcinogenesis. *Lung Cancer Update.* 46: 1238. 2007. (査読有)
11. 岡本竜哉, 赤池孝章. iNOS ノックアウトマウス. *分子呼吸器病.* 11: 96-103. 2007. (査読無)
12. 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: 日本臨床. 65 S2: 78-84. 2007. (査読無)

[学会発表](計 20 件)

1. 岡本竜哉, 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バイオマーカー. 第 5 回呼吸器バイオマーカー研究会. 2009/03/07. 東京都.
2. Okamoto T, Sawa T, Fujii, S, and Akaike T. Guanine nitration and host defense during influenza virus pneumonia. 8th Asia Pacific Congress of Medical Virology. 2009/02/26-28. Hong Kong, China.
3. 岡本竜哉, 赤池孝章. 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. 平成 20 年度 厚生労働省インフルエンザ・ARDS 班会議. 2009/01/17. 東京都.

4. 岡本竜哉, 澤智裕, 藤井重元, 赤池孝章. インフルエンザウイルス肺炎における 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 81 回日本生化学会大会. 2008/12/09-12. 神戸市.
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病態における酸化・ニトロ化ストレスの関与. 臨床医学疫学機関連携事業第 8 回セミナー. 2008/11/21. 熊本市.
6. 藤井重元, Md. H. Zaki, 岡本竜哉, 澤智裕, 赤池孝章. サルモネラ感染病態における 8-ニトログアノシン 3',5'-環状 1リン酸を介した NO 誘導性生体防御機構. 第 61 回日本細菌学会九州支部総会. 2008/10/03-04. 熊本市.
7. 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. 2008/10/03-04. 熊本市.
8. Okamoto T, Sawa T, Fujii, S, and Akaike T. Guanine nitration and host defense during influenza virus pneumonia. 5th International Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic applications of NO 2008. 2008/08/28-30. Bregenz, Austria.
9. 岡本竜哉, 澤智裕, 藤井重元, 赤池孝章. インフルエンザウイルス肺炎における活性酸素シグナル応答の分子メカニズム. 第 19 回日本生体防御学会. 2008/07/10-12. 札幌市.
10. 岡本竜哉, 澤智裕, 藤井重元, 赤池孝章. インフルエンザウイルス肺炎における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. 2008/07/05. 豊中市.
11. 赤池孝章, 岡本竜哉. インフルエンザウイルス肺炎におけるグアニンのニトロ化と生体防御機構. 平成 20 年度厚生労働省インフルエンザ・ARDS 班会議. 2008/07/04. 東京都.
12. 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. 2008/06/19-20. 京都市.
13. 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

学会総会. 2008/05/09-10. 仙台市.

14. 赤池孝章、岡本竜哉. 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. 平成 19 年度厚生労働省インフルエンザ・ARDS 班会議. 2008/01/25-26. 熊本市.

15. 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. 2007/08/24. 京都市.

16. 岡本竜哉、Md. H. 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. 2007/07/26-28. 福岡市.

17. 岡本竜哉、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適応の分子制御戦略. 平成 19 年度厚生労働省インフルエンザ・ARDS 班会議. 2007/07/13. 千葉市.

18. 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総会. 2007/06/09-10. 名古屋市.

19. 岡本竜哉、Md. H. Zaki、澤智裕、藤井重元、赤池孝章. インフルエンザウイルス混合感染による劇症型レンサ球菌感染モデルにおける抗生物質とオセルタミビルの治療効果. 第 16 回 Lancefield レンサ球菌研究会. 2007/06/01-02. 熊本市.

20. 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 学会総会. 2007/05/17-18. 大津市.

〔その他〕

ホームページ: <http://kumadai-bisei.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 竜哉 (OKAMOTO TATSUYA)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教

研究者番号: 30419634

(2) 研究分担者

赤池 孝章 (AKAIKE TAKAAKI)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・教授

研究者番号: 20231798

伊藤 隆明 (ITOH TAKAAKI)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・教授

研究者番号: 70168392

(3) 連携研究者

なし