

学位論文

Doctor's Thesis

一酸化窒素誘発性ニトロ化ストレスを介するウイルス肺炎の分子病態
(Molecular pathogenesis of viral pneumonia involving nitrative stress caused by nitric oxide)

岡本真一郎

Shinichiro Okamoto

指導教官

前田 浩教授

熊本大学大学院医学研究科微生物学

安藤正幸前教授

熊本大学大学院医学研究科内科学第一

2002年3月

学 位 論 文

Doctor's Thesis

論文題名 : 一酸化窒素誘発性ニトロ化ストレスを介するウイルス肺炎の分子病態
(Molecular pathogenesis of viral pneumonia involving nitrative stress caused by nitric oxide)

著 者 名 : 岡 本 真 一 郎
Shinichiro Okamoto

指導教官名 : 微生物学教授 前田 浩
内科学第一前教授 安藤 正幸

審査委員名 : 分子遺伝学担当教授 森 正敬
感染防御学担当教授 原田 信志
病理学第二担当教授 竹屋 元裕

2002年3月

要 旨

各種炎症性疾患、神経変性疾患、心血管系疾患あるいは腫瘍性疾患など、様々な疾患および疾患モデルにおいて、一酸化窒素 (NO) 産生に依存した病態発現機構が示唆されている。感染症に関しては、細菌、原虫、真菌、ウイルスならびに寄生虫感染症などほとんどの微生物感染病態において、宿主応答のひとつとして、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の発現を介した NO 産生がもたらされることが示唆されている。この感染症における NO 産生は、とくに細菌、原虫の感染においては侵入した病原微生物のクリアランスに重要な役割を果たすことが示されている。しかし、ウイルス感染においては、NO のウイルス増殖に及ぼす影響や、病態への関与に関して様々な報告がみられ、一定の見解が得られていない。

本研究ではマウスの呼吸器ウイルス感染病態において、宿主応答に伴って誘導される iNOS 遺伝子の発現と、肺内の過剰な NO 産生の結果もたらされる生体分子の酸化、ニトロ化反応のウイルスおよび宿主に及ぼす影響について、野生型マウスと iNOS 遺伝子欠損マウスとの比較実験により解析した。とくに、NO 由来の活性酸化窒素種によるニトロ化反応を介する 8-ニトログアノシンの生成を、抗 8-ニトログアノシン特異抗体を作成して解析し、その病態生理学的意義について検討した。

経鼻噴霧感染によって作成したインフルエンザウイルスおよびセンダイウイルスのマウス致死性肺炎モデルにおいて、肺炎増悪時期と一致して肺内に過剰の NO 産生が確認された。一方、肺内 NO 産生は iNOS ヘテロ欠損マウスでは約 1/4 に低下し、iNOS ホモ欠損マウスでは検出感度以下であった。しかし、肺内ウイルス増殖の経過は 3 群間で有意差を認めず、肺内で過剰産生される NO が生体内において有意な抗ウイルス活性を発揮していないことが明らかとなった。

これとは対照的に感染マウスの生存率および肺の病理組織学的変化の程度は、iNOS 欠損マウス群において、野生型マウスと比べ有意に改善した。さらに、NO に由来した活性酸化窒素種生成のバイオマーカーである 3-ニトロチロシンは、免疫組織化学および HPLC-電気化学検出法により野生型マウスの肺組織中および肺胞洗浄液中に検出され、その生成が iNOS 発現に依存性していることも確認された。このことから肺内で iNOS により過剰に産生される NO は、生体内でパーオキシナイトライドなどの活性酸化窒素

種の生成を介して、肺組織障害の増悪因子として作用することが示唆された。

さらに、活性酸化窒素種による生体内での核酸ニトロ化反応を解析するため、抗 8-ニトログアノシン特異抗体を作製し、インフルエンザウイルスおよびセンダイウイルス感染モデルにおける 8-ニトログアノシン生成を解析した。作製した抗体は 8-ニトログアニンまたは 8-ニトログアノシン対し非常に高い特異性を持つことが確認された。この抗体を用いた免疫組織化学的解析によりウイルス感染マウスの気管支、細気管支上皮に強い免疫染色が認められ、実際に、生体内において 8-ニトログアノシンが生成することが証明された。

さらに我々は、8-ニトログアノシンのユニークな生化学的特性として、NADPH-P450 レダクターゼ系からのスーパーオキシド産生を 8-ニトログアノシンが著しく増強させることを明らかにした。また、iNOS が NADPH と 8-ニトログアノシンの存在下においてスーパーオキシドを産生することも見出した。この反応は iNOS の NO 産生の基質である L-アルギニンによって有意な影響を受けず、低 μM レベルの 8-ニトログアノシン濃度においても認められた。

以上の知見より、インフルエンザウイルスおよびセンダイウイルス感染病態における iNOS 由来の NO 過剰産生が、活性酸化窒素種の生成をもたらし、生体分子のニトロ化反応を介して病態増悪に深く関与していることが明らかとなった。さらに核酸ニトロ化反応による 8-ニトログアノシンの生成が、単純な活性酸化窒素種生成のバイオマーカーではなく、生体内の酸化・ニトロ化ストレスやレドックス制御に密接に関わる機能分子として、遺伝子変異や細胞機能障害を誘発し、NO 依存性の病態発現機構において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

Abstract

Nitric oxide (NO) has been implicated for various conditions including inflammation, neurodegenerative disease, cardiovascular disease, and neoplasm. Production of NO by inducible isoform of NO synthase (iNOS) as a host defense has been observed in most types of infections caused by various pathogens such as bacteria, protozoa, fungus, and virus. This NO production plays a critical role in microbial clearance especially for bacterial or protozoal infection. However, the contribution of NO to antiviral defense and viral pathogenesis varies among virus species. The role of NO in virus infection is thus not fully understood.

In this study, I investigated the role of reactive nitrogen oxygen species (e.g., peroxynitrite) derived from NO produced by iNOS during influenza virus and Sendai virus infection in mice. I focused on biological nitration by reactive nitrogen oxygen species as a cause of cellular and tissue damage via nucleic acid damage as evidenced by 8-nitroguanosine formation *in vivo*.

In both influenza and Sendai virus infections in mice, NO overproduction was verified in wild-type C57BL/6 mice by electron spin resonance spectroscopy. NO overproduction was remarkably reduced in heterozygous iNOS-deficient and depleted in homozygous iNOS-deficient mice. No significant difference was found in virus replication among three genotypes, suggesting the lack of antiviral effect of NO *in vivo*. Histopathological changes and survival rate of mice were significantly improved in iNOS-deficient mice. Formation of 3-nitrotyrosine, a biological marker for generation of reactive nitrogen oxygen species such as peroxynitrite, was detected in lung tissues and bronchoalveolar lavage by immunohistochemistry and quantitative HPLC-electrochemical detection. This 3-nitrotyrosine formation was remarkably reduced in iNOS-deficient mice.

We developed highly specific antibody for 8-nitroguanosine and investigated nucleic acid nitration *in vivo* using this antibody. Immunohistological analysis revealed extensive 8-nitroguanosine formation especially in the cytosol of

bronchial/bronchiolar epithelial cells of virus-infected lung of wild-type mice. This is the first demonstration for the *in vivo* generation of 8-nitroguanosine.

In the present study, unique biochemical property of 8-nitroguanosine was also identified. 8-Nitroguanosine markedly stimulated superoxide generation from cytochrome P450 reductase and iNOS *in vitro*.

These findings verify that NO and reactive nitrogen species contribute to lung pathogenesis without affecting virus clearance in pneumotropic virus infection in mice, and suggest a potential role of 8-nitroguanosine formation for NO-induced nitrate stress in viral pathogenesis.

発表論文一覧

1. *Akaike, T., *Okamoto, S., Sawa, T., Yoshitake, J., Tamura, F., Ichimori, K., Miyazaki, K., Sasamoto, K., and Maeda, H. (*equally contributed).
8-Nitroguanosine formation in viral pneumonia and its implication for pathogenesis.
Proc Natl Acad Sci USA, 100: 685-690, 2003.
2. Alam, MS., Akaike, T., Okamoto, S., Kubota, T., Yoshitake, J., Sawa, T., Miyamoto, Y., Tamura, F., and Maeda, H.
Role of nitric oxide in host defense in murine salmonellosis as a function of its antibacterial and antiapoptotic activities.
Infect Immun, 70: 3130-3142, 2002.
3. 岡本真一郎, 赤池孝章.
誘導型NO合成酵素.
臨床検査 45: 991-995, 2001.
4. Yogo, K., Shimokawa, H., Funakoshi, H., Kandabashi, T., Miyata, K., Okamoto, S., Egashira, K., Huang, P., Akaike, T., and Takeshita, A.
Different vasculoprotective roles of NO synthase isoforms in vascular lesion formation in mice.
Arterioscler Thromb Vasc Biol, 20: E96-E100, 2000.
5. Akizuki, E., Akaike, T., Okamoto, S., Fujii, S., Yamaguchi, Y., Ogawa, M., and Maeda, H.
Role of nitric oxide and superoxide in acute cardiac allograft rejection in rats.
Proc Soc Exp Biol Med, 225: 151-159, 2000.
6. Kuwahara, H., Miyamoto, Y., Akaike, T., Kubota, T., Sawa, T., Okamoto, S., and Maeda, H.
Helicobacter pylori urease suppresses bactericidal activity of peroxynitrite via

carbon dioxide production.

Infect Immun, 68: 4378-4383, 2000.

7. Akaike, T., Fujii, S., Kato, A., Yoshitake, J., Miyamoto, Y., Sawa, T., Okamoto, S., Suga, M., Asakawa, M., Nagai, Y., and Maeda, H.
Viral mutation accelerated by nitric oxide production during infection *in vivo*.
FASEB J, 14: 1447-1454, 2000.

8. 赤池孝章, 岡本真一郎, 前田 浩.
インフルエンザ重症化におけるプロテアーゼとフリーラジカルの役割—宿主反応による病態修飾.
Current Therapy, 18: 77-86, 2000.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました熊本大学医学部微生物学講座 前田浩教授ならびに内科学第一講座 安藤正幸前教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究の立案・遂行および論文作成にあたり、御教示・御指導を賜りました熊本大学医学部微生物学講座 赤池孝章助教授に深く感謝の意を表します。また、御鞭撻を賜りました内科学第一講座 菅 守隆助教授に心より感謝いたします。

本研究において、御支援・御助言を賜りました、熊本大学医学部微生物学講座 芥 照夫助手、田村文雄助手、澤 智裕前助手、および宮本洋一前助手に心より感謝いたします。

抗体作製および分析システムにおいて御協力を賜りました(株)同仁化学研究所 佐々本 一美博士、宮崎公德博士、およびエイコム(株) 西野博仁氏に心より感謝いたします。

本研究に御協力を頂きました熊本大学医学部微生物学講座および内科学第一講座の諸氏に感謝の意を表します。

目 次

要 旨 (和文)	1
要 旨 (英文)	3
発表論文一覧	5
謝 辞	7
目 次	8
略号一覧	11
第 1 章 研究の背景と目的	12
第 2 章 実験方法	19
2.1 試 薬	19
2.2 細 胞	19
2.3 動 物	20
2.4 ウイルス感染モデルの作製	20
2.4.1 インフルエンザウイルス感染モデル	
2.4.2 センダイウイルス感染モデル	
2.5 電子スピン共鳴 (ESR) 法による肺内 NO の検出	21
2.6 プラークフォーミングアッセイによる肺内ウイルス定量	21
2.6.1 インフルエンザウイルス定量	
2.6.2 センダイウイルス定量	
2.7 免疫組織化学および病理組織学的検討	22
2.7.1 Periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 固定法 による組織標本作製	
2.7.2 組織形態学的検討	
2.7.3 ペルオキシダーゼ法による免疫組織化学	
2.8 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) -電気化学検出法 (ECD) による気管支肺胞洗浄 (BAL) 液蛋白中の 3-ニトロチロシン定量	23
2.8.1 HPLC-ECD による 3-ニトロチロシン定量系の作製	
2.8.2 BAL	

2.8.3	BAL 液蛋白の加水分解処理	
2.9	TUNEL 法による肺組織におけるアポトーシスの検討	2 4
2.10	抗 8-ニトログアノシン抗体の作製	2 4
2.10.1	8-ニトログアノシンの合成	
2.10.2	8-ニトログアノシン-ウシ血清アルブミン (BSA) の合成	
2.10.3	ウサギ抗 8-ニトログアノシンポリクローナル抗体の作製	
2.10.4	マウス抗 8-ニトログアノシンモノクローナル抗体の作製	
2.11	抗 8-ニトログアノシン抗体の特異性の検討	2 6
2.11.1	直接 ELISA 法	
2.11.2	間接 ELISA 法	
2.12	パーオキシナイトライトによる核酸およびヌクレオシドのニトロ化 効率の検討	2 7
2.13	スロットブロット法による細胞抽出 RNA からの 8-ニトログアノシン検出	2 7
2.14	免疫細胞化学による培養細胞中の 8-ニトログアノシン 生成の検出	2 8
2.15	免疫組織化学による 8-ニトログアノシン生成検出	2 8
2.16	ESR 法によるスーパーオキサイド (O_2^-) 生成の検出	2 9
第 3 章	実験結果	3 0
3.1	インフルエンザウイルス感染モデルにおける NO 依存的病態発現	3 0
3.1.1	マウス生存曲線	3 0
3.1.2	ESR 法による肺内 NO の検出	3 1
3.1.3	肺内ウイルス増殖	3 2
3.1.4	病理組織学的変化	3 2
3.1.5	肺内 3-ニトロチロシン生成	3 3
3.1.5.1	免疫組織化学法による検討	
3.1.5.2	HPLC-ECD による BAL 蛋白中の 3-ニトロチロシン定量	
3.1.6	TUNEL 法を用いたアポトーシスの検討	3 5
3.1.7	小括	3 6
3.2	センダイウイルス感染モデルにおける NO 依存的病態発現	3 7

3.2.1	マウス生存曲線	37
3.2.2	ESR 法による肺内 NO の検出	38
3.2.3	肺内ウイルス増殖	39
3.2.4	病理組織学的変化	39
3.2.5	免疫組織化学法による肺内 3-ニトロチロシン生成の検討	40
3.2.6	小括	41
3.3	抗 8-ニトログアノシン特異抗体を用いた生体内 8-ニトログアノシン生成の検討	42
3.3.1	ELISA 法による抗体反応性の検討	42
3.3.2	免疫プロット法による RNA 中の 8-ニトログアノシン検出	42
3.3.3	免疫細胞化学法による培養細胞中の 8-ニトログアノシン検出	44
3.3.4	免疫組織化学法による生体組織からの 8-ニトログアノシン検出	45
3.4	8-ニトログアノシンによる P450 レダクターゼおよび iNOS よりのスーパーオキシド生成促進	47
3.5	総括	48
第4章	考察	50
4.1	総論	50
4.2	NO とウイルス増殖	52
4.3	NO による病態発現機構における活性酸化窒素種生成の役割	53
第5章	結語	58
参考文献		59

略語一覧

ALP	alkaline phosphatase
BAL	bronchoalveolar lavage
BSA	bovine serum albumin
DMPO	5,5-dimethyl-1-pyrroline- <i>N</i> -oxide
DTCS	<i>N</i> -dithiocarboxy(sarcosine)
ECD	electrochemical detection
EDTA	ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
ESR	electron spin resonance
FCS	fetal calf serum
HIV	human immunodeficiency virus
HPLC	high-performance liquid chromatography
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IFN- γ	interferon gamma
LD ₅₀	50% lethal dose
L-NMMA	<i>N</i> ^ω -monomethyl-L-arginine
LPS	lipopolysaccharide
nNOS	neuronal nitric oxide synthase
NO	nitric oxide
NOS	nitric oxide synthase
PBS	10 mM phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFU	plaque-forming unit
SOD	superoxide dismutase
SPF	specific pathogen free
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labeling

第 1 章 実験の背景と目的

感染症・炎症における誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) 発現とその意義

一酸化窒素 (NO) は、生体内で産生される単純な無機ラジカル分子の一つである。1980 年代後半、Furchgott、Murad、Moncada がほぼ同時期に血管内皮由来弛緩因子の本態が NO であることを証明したのを契機に、このラジカル分子が生体内の種々の細胞や組織において、神経伝達物質、生体防御などを含めた多岐にわたる生理活性を発揮していることが明らかとなった (Furchgott and Vanhoutte, 1989; Choi, 1993; Moncada and Higgs, 1993)。

生体内において NO は、NO 合成酵素 (NO synthase, NOS) により L-アルギニンから生成される。NOS にはこれまで、神経型 NOS (neuronal NOS, nNOS; NOS1)、誘導型 NOS (inducible NOS, iNOS; NOS2) および内皮型 NOS (endothelial NOS, eNOS; NOS3) 3 つのアイソフォームが同定されている (Knowles and Moncada, 1994)。このうち nNOS と eNOS はそれぞれ主に神経細胞、血管内皮細胞の細胞膜に特異的かつ恒常的に発現しており、細胞内のカルシウム濃度に依存して NO 合成活性を発揮する (Salter et al., 1991)。このためこの 2 つは構成型 NOS (constitutive NOS, cNOS) とも呼ばれる。これに対して iNOS は、マクロファージをはじめとして、上皮細胞、血管平滑筋細胞、心筋細胞、肝細胞など様々な細胞に発現し、細胞質内に局在する。iNOS はその名前からもわかるように平常時の細胞では発現が認められず、細胞外からの様々な刺激により転写レベルで発現が誘導され (Fujisawa et al., 1995)、また、他の 2 つのアイソフォームとは異なり NO 合成は細胞内カルシウム濃度に依存しない (Yui et al., 1991; Stuehr et al., 1991)。したがって、ひとたび発現が誘導されると長時間にわたり cNOS と比較して多量の NO を放出し続ける。iNOS 発現を誘導する因子としては、細菌の細胞壁構成物質であるリポポリサッカライド (lipopolysaccharide, LPS)、炎症性サイトカインである interferon- γ (IFN- γ)、interleukin (IL) -1 β (IL-1 β)、および tumor necrosis factor- α (TNF- α) などがあり (Nussler et al., 1992; Fujisawa et al., 1995; Balligand et al., 1994)、逆に発現を抑制する因子としては IL-4、IL-10、transforming growth factor- β 等が知られている (Adler et al., 1995; Cunha et al., 1992; Billigand et al., 1994)。これらに加え、補酵素であるテトラヒドロピオプテリン、基質である L-アルギニンの合成・分解なども NO 産生調節に関与することが示唆されている (Gross and Levi, 1992; Mori and Gotoh, 2000)。

生体内における iNOS 発現はその発見当初より、主として病原微生物に対する生体防御因子としての位置付けがなされてきた (Granger et al., 1989; Nathan, 1997;

Umezawa et al., 1997; Alam et al. 2002)。実際多くの細菌、ウイルス、原虫などの感染症において、宿主の免疫応答の一つとして、iNOS 発現が誘導される。なかでも細菌、原虫の感染症では多くの疾患・感染症モデルにおいて NO が感染防御因子として重要であることが示されている。たとえば *Salmonella typhimurium* によるネズミチフス症モデルでは、NO 合成酵素阻害剤を投与することにより組織中の細菌数の増加とともに、致死率の上昇が観察され、また iNOS 欠損マウスへの感染では野生型マウスと比較して組織中の細菌数が著しく多く、致死率も有意に高かった (Umezawa et al., 1997; Alam et al. 2002)。このようなことから iNOS によって産生される多量の NO は、感染防御機構の中でも特に重要な分子として位置付けられるようになった。

その一方で、生体内で NO が過剰に産生されると、生体自身への傷害をもたらすことも明らかとなっている。NO は過剰に産生されると、ヘムや非ヘム鉄を有する酵素や SH 基を活性中心に有する酵素などに作用して活性を変化させたり、生体内の様々な物質と反応したりする。このような反応を介してアポトーシスなどの細胞死の誘導、核酸塩基の損傷による遺伝子変異の誘発など障害作用が発揮される (Liu and Hotchkiss, 1994; Akaike et al. 2000)。さらに、NO の傷害的な作用は、虚血再還流障害や炎症性疾患の病態との関連が示唆されている。しかし、近年では NO 分子自体の細胞傷害性は弱く、NO が酸素ラジカルなどと反応することにより生じる活性酸素種が組織障害性を発揮することが示唆されている。たとえば、NO は活性酸素の一つであるスーパーオキシド (O_2^-) と速やかに反応して、化学反応性の高いパーオキシナイトライト ($ONOO^-$; 過酸化亜硝酸イオン) を生成する (Beckman and Koppenol, 1996; Rubbo et al., 1996)。このパーオキシナイトライトは非常に強い酸化能、ニトロ化能を持ち、生体内で蛋白のニトロ化、脂質の過酸化反応の促進、電子伝達系酵素の不活化などをもたらすことがわかっており、細胞傷害やアポトーシス誘導などにより、NO の細胞傷害性の多くの部分を担っていると考えられている。また、パーオキシナイトライトは細胞外基質の改変に関わるマトリックスメタロプロテアーゼやプロスタグランジン合成系の酵素である cyclooxygenase の活性化を惹起する。これらのことから、NO およびパーオキシナイトライトの炎症のメディエーターとしての役割も重要視されている (Okamoto et al., 1997)。

以上のように、iNOS によって産生される NO は重要な感染防御因子であると同時に、ある条件下においては宿主自身を傷害するという二つの相反する側面を持っているといえる。

ウイルス感染症と iNOS/NO

多くのウイルス感染症においても、宿主応答の結果、iNOS の発現誘導がもたらされることが知られている。感染時に iNOS の発現が認められるウイルスとしては、ボルナ病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス I 型、狂犬病ウイルス、インフルエンザウイルス、センドライウイルス、コクサッキーウイルス、単純ヘルペスウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスなどが挙げられ、その発現臓器も多様性に富んでいる (Akaike et al., 2000)。

ウイルス感染における iNOS の誘導は主として IFN- γ に代表される炎症性サイトカインにより間接的にもたらされる (Karupiah et al., 1993; Akaike et al. 1998)。いくつかのウイルスでは、ウイルス複製自体やウイルスの構成蛋白が炎症性サイトカインの媒介なしに直接 iNOS を誘導することが知られている。たとえば、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) による脳炎では HIV のエンベロープ蛋白である gp41 が神経細胞やアストロサイトに iNOS 発現をもたらすことや HIV 脳症の脳組織に iNOS が発現していることも報告されている (Bukrinsky et al., 1995; Adamson et al., 1999; Hori et al.)。同様に、ヒト respiratory syncytial (RS) ウイルスもヒト肺胞上皮細胞由来の cell line である A549 細胞に直接 iNOS を誘導することが知られている (Tsutsumi et al., 1999)。

このようにウイルス感染における iNOS 誘導にはサイトカインによる間接的誘導とウイルスによる直接的な誘導の両方のメカニズムが存在する (図 1-1)。

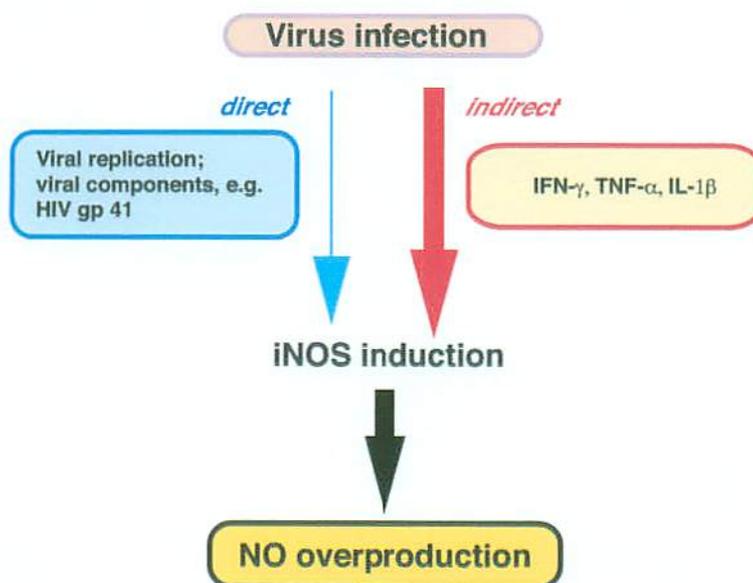


図 1-1 : ウイルス感染における iNOS 誘導メカニズム

NO は多くの細菌、原虫、真菌感染症において、その病原体クリアランスに重要な役割を果たすことが知られているが、ウイルス感染における NO の役割については不明な点

が多く残されている。一部のウイルスに対して NO が抗ウイルス作用を示すことが報告されている。典型的なものはマウスポックスウイルス、単純ヘルペスウイルス、Epstein-Barr (EB) ウイルスなどの DNA ウイルスであり、RNA ウイルスとしてはコクサッキーウイルスが報告されている (Karupiah et al., 1993; Croen, 1993; Mannick et al., 1994; Gao et al., 1999; Saura et al. 1999)。EB ウイルス再活性化は NO による初期転写活性化遺伝子の抑制を介して阻害されることが知られている (Mannick et al., 1994; Gao et al., 1999)。また、コクサッキーウイルスの複製はウイルス由来のシステインプロテアーゼが NO 依存性ニトロソ化反応を受け不活化されることによって抑制される (Saura et al. 1999)。しかしながら、ウイルスやウイルス感染細胞に対する NO の選択毒性が NO 依存性の S-ニトロソ化によってもたらされているかどうかについてはまだ議論のあるところである。実際、SH 基を含む蛋白のニトロソ化によるレドクス制御が、神経伝達系、転写、アポトーシスなどの細胞内・細胞間信号伝達系に関与していることが知られている。例えば、NO やニトロソチオールはアポトーシス誘導活性をもつ蛋白であるカスパーゼのニトロソ化あるいはニトロソ転移反応を介して強力な抗アポトーシス活性を示すことが報告されている。それゆえ NO 依存性のニトロソ化反応がウイルス複製に影響を及ぼすだけでなく、ウイルス感染・非感染に関わらず宿主細胞に非特異的なニトロソ化ストレスを引き起こしている可能性がある (Lander et al., 1997; Ogura et al. 1997; Akaike, 2000; Ikebe et al., 2000; Mannick et al. 1999)。

これら以外のウイルスに対する NO の抗ウイルス活性はまだ明らかになっていない。しかし近年では、NO はオルソミクソウイルス、パラミクソウイルス、マウスワクシニアウイルス、コロナウイルス (マウス肝炎ウイルス)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV)、マウス脳炎心筋炎ウイルス (EMCV)、tick-born encephalitis virus (TBE-V) の他、多くのウイルス種に対して有意な抗ウイルス活性を示さないことが示唆されている。

さらに重要な点は、マウスのインフルエンザウイルス肺炎モデルにおけるウイルスクリアランスは NO 合成酵素阻害剤投与により変化しなかったのに対し、その病態像が有意に改善していることである (Akaike et al., 1996)。このような現象はインフルエンザウイルス肺炎モデルの他、ラットの単純ヘルペスウイルス 1 型による脳炎モデル、EMCV による心筋炎および糖尿病モデル、フラビウイルス (Murray Valley encephalitis virus, TBE-V) による脳炎モデルにおいて認められている (Akaike et al., 1996, 2000; Kreil and Eibl, 1996; Adler et al., 1997; Karupiah et al., 1998; Fujii et al., 1999; Nishino et al., 1999; Hirasawa et al., 1999; Andrews et al., 1999)。このことから NO は多くのウイルス感染病態において、単純な抗ウイルス分子として以外の何らかの役割を果たしていることが示唆される。

活性酸化窒素種による生体内ニトロ化反応とその意義

NO は内因性のラジカル分子であるが、酸素ラジカルや脂質ラジカルと比較するとその反応性は低い。しかし生体内において NO は様々な物質と反応することにより一連の活性酸化窒素種を生成し、多彩な生物効果をもたらす (図 1-2)。

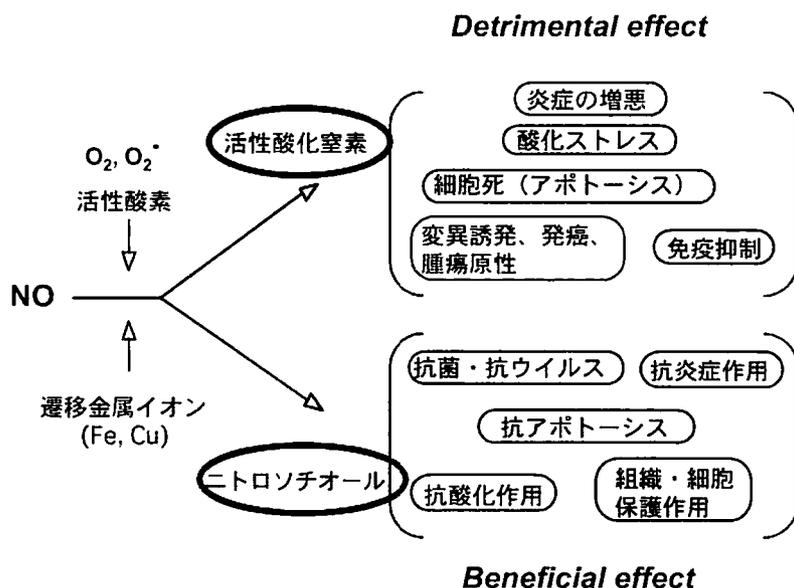


図 1 - 2 : 生体におけるNOの二面的作用

この複雑な NO の化学反応性の中で、最も重要な反応は NO と O_2^- との急速なラジカルカップリング反応を介するパーオキシナイトライト ($ONOO^-$) の生成である (Beckman et al., 1990, 1996; Rubbo et al. 1996)。この二者は 2 次反応速度定数 $6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ という速さで速やかに反応し、 O_2^- の主要な消去酵素であるスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) が存在していても優位に進行するため、NO と O_2^- が同時に存在する環境においては、パーオキシナイトライトが比較的効率よく生成されると考えられる。パーオキシナイトライトは酸素ラジカルと同様、生体に酸化ストレスをもたらすオキシダントであるが、酸化反応のみならず、各種生体分子に対して強力なニトロ化剤として作用しうる (Sawa et al., 2000; Reiter et al., 2000)。

パーオキシナイトライトによる蛋白あるいはアミノ酸のニトロ化反応においては、主に L-チロシン残基がニトロ化の標的となり、3-ニトロチロシンが生成されることが知られ

ている (図1-3)。さらに最近は、NO 由来の安定な酸化物質である亜硝酸イオン (NO_2^-) が、過酸化水素 (H_2O_2) とミエロパーオキシダーゼにより酸化され、 NO_2 に変換され、パーオキシナイトライトと同様にニトロ化反応を惹起することが指摘されている (Eiserich et al., 1998)。また、L-トリプトファンも生体内ニトロ化反応の標的となりうることが示唆されている。チロシンニトロ化反応は、化学的反応性が高く不安定であるため生体内での直接検出が困難なパーオキシナイトライトなどの活性酸化窒素種のバイオマーカーとして広く用いられる。現在まで、各種炎症性疾患、神経変性疾患、心血管系疾患あるいは腫瘍性疾患など多くの疾患および疾患モデルにおいて生体組織中の 3-ニトロチロシン生成が検出されている。

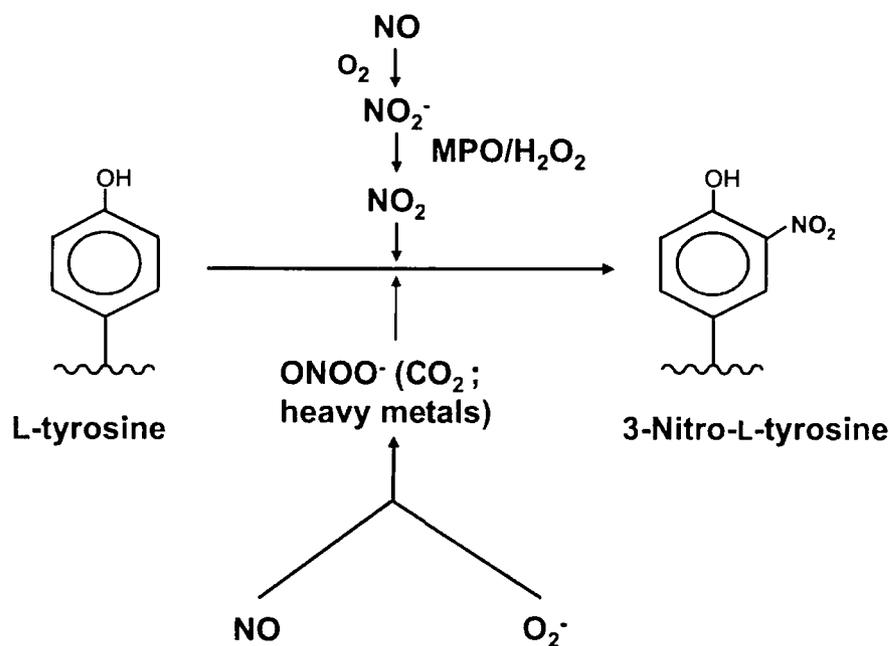


図1-3：生体内におけるニトロ化反応メカニズム
MPO：好中球ミエロペルオキシダーゼ

このように多くの疾患病態において 3-ニトロチロシンが検出されることから、チロシンニトロ化が何らかの生物効果をもたらすのではないかと指摘もある。実際、チロシンニトロ化反応がある種の蛋白の機能変化をもたらすことが示されている (Eiserich et al., 1999; Cassina et al., 2000; Zhu et al., 2000)。たとえば、Eiserich らは α チューブリン蛋白のニトロ化が細胞骨格の微小管機能障害をもたらし、細胞傷害に関与することを示している (Eiserich et al., 1999)。しかし、3-ニトロチロシンの生成がさまざまな炎症性疾患において報告され、細胞・組織傷害に関連付けられているにもかかわらず、一部の限られた蛋白の翻訳後修飾のみが示唆されているにすぎない (MacMillan-Crow et al., 1996;

Viner et al., 1999; Zhu et al., 2001)。さらに、現在までに *in vivo* においてチロシンニトロ化による病態発現の分子メカニズムを明確に示した報告はない。

一方、パーオキシナイトライトによる生体内ニトロ化反応のもうひとつの標的分子として、核酸塩基のグアニンがある。Yermilov らは *in vitro* においてパーオキシナイトライトとグアニンの反応により生成する産物が主として 8-ニトログアニンであること、さらにウシ胸腺 DNA とパーオキシナイトライトの反応で 8-ニトログアニンが生成することを報告した (Yermilov et al. 1995)。また、8-ニトログアニンは亜硝酸イオンと過酸化水素の存在下で好中球ミエロパーオキシダーゼ (MPO) を介して、あるいは大気汚染やタバコ煤煙中で光化学的に生成する peroxyacetyl nitrate などの存在下で生成することが示されている。このような知見は、8-ニトログアニンが各種活性酸化窒素種により DNA 中に生成し、パーオキシナイトライトなどニトロ化能を持つ分子による DNA 損傷の指標になりうることを示唆している。しかしながら、DNA 中の 8-ニトログアニンは不安定であり、自然に脱プリン反応を受け、パーオキシナイトライトによる更なる酸化反応により未同定の化合物へと変換される。したがって活性酸化窒素種への暴露の指標として DNA 中の 8-ニトログアニンをを用いることは必ずしも適切ではない。Masuda らはパーオキシナイトライトや他の活性酸化窒素種と反応させたウシ肝 RNA 中の 8-ニトログアノシンおよび 8-オキシグアノシンを測定し、8-ニトログアノシンは 8-ニトロデオキシグアノシンと比較してより安定に RNA 中に残存することを示した (Masuda et al., 2002)。

以上の経緯より、生体内のグアノシンニトロ化反応、またその病態への関与について解明することは大変重要な課題である。我々の研究室では、RNA ウイルスであるセンダイウイルスの肺炎モデルにおいて、NO により惹起される酸化あるいはニトロ化ストレスによりウイルス変異率が上昇することを見出し、これがウイルスの多様性や進化に関与している可能性を報告している。しかしながら、我々の知る限り、現在まで生体内の 8-ニトログアノシン生成を検出した報告は見られていない。

本研究では、マウスのウイルス性気道感染病態において誘導される、NO 過剰生成のウイルスおよび宿主に及ぼす影響について、iNOS 遺伝子欠損マウスと野生型マウスとの比較実験により検討した。また、新規の核酸ニトロ化物である 8-ニトログアノシンに対する特異抗体を作製し、*in vitro* および *in vivo* での 8-ニトログアノシン生成を細胞培養系およびマウスウイルス感染モデルを用いて解析した。さらに、8-ニトログアノシンがニトロ化ストレスの単なるバイオマーカーではなく、病態発現のメディエーターである可能性について検討した。具体的には、8-ニトログアノシンの有するユニークなレドックス活性に着目して、P450 レダクターゼおよび iNOS による 8-ニトログアノシンの活性化とスーパーオキシド産生について解析した。

第 2 章 実験方法

すべての動物実験は、熊本大学動物実験指針に基づき施行した。また、病原微生物を用いた実験は、日本細菌学会および日本ウイルス学会バイオセーフティ指針ならびに国立感染症研究所病原体等安全管理規則などに基づいて施行した。動物感染実験は、すべて熊本大学動物資源開発センター感染区域実験室内で行った。

2.1 試薬

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)、ペニシリンナトリウム、ストレプトマイシンおよび電気泳動用アガロースはライフテックオリエンタル社より購入した。ウサギ抗 iNOS ポリクローナル抗体は Santa Cruz 社 (Santa Cruz, CA, USA) より購入した。ウサギ抗 3-ニトロチロシンポリクローナル抗体は Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA) より購入した。ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ Ig 抗体はアマシャム社より購入した。アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG 抗体は Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc (West Grove, PA, USA) より購入した。ウシ血清アルブミン (BSA)、Freund の完全アジュバンドおよび不完全アジュバンドは Sigma-Ardrich Fine Chemicals (St. Louis, MO, USA) より購入した。8-Bromoguanosine は和光純薬より購入した。N-dithiocarboxy(sarcosine) (DTCS) は同仁化学より購入した。普通ブイオンは栄研化学より購入した。その他の試薬はすべて特級 (分析グレード) のものを使用した。

2.2 細胞

MDCK 細胞 (イヌ腎上皮細胞株)、CV-1 細胞 (アフリカミドリザル腎上皮細胞株)、および RAW 264 細胞 (マウスマクロファージ由来細胞株) は 37°C、5% CO₂ 存在下で、10% fetal calf serum (FCS) 添加 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (10% FCS D-MEM) で培養した。細胞の継代は以下のように行った。フラスコ底に単層培養し、その発育が飽和した細胞を 10 mM phosphate-buffered saline (PBS: pH 7.4) で洗浄後、0.05% ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) および 0.1% トリプシンを加えた PBS と室温にて 5 分間反応させることにより細胞を剥離させ、10% FCS D-MEM を加え、細胞を懸濁した。遠心分離により細胞を回収し、その 1/5 から 1/8 量の細胞を新しいフラスコに移し、培養した。すべての培養液中にはペニシリンおよびストレプトマイシンを添加した。

2.3 動物

野生型 C57BL/6J マウスは、SPF グレードのものを日本クレア株式会社より購入した。iNOS 欠損マウスは、繁殖用つがいを Jackson Laboratory より購入し、本研究室にて繁殖・維持したものを使用した。この iNOS 欠損マウスは C57BL/6J マウスをもとに、iNOS 遺伝子のカルモジュリン結合部位に相当する部分をネオマイシン耐性遺伝子で置換することにより作成されたものである (Laubach et al., 1995)。感染実験には iNOS 欠損マウスを野生型 C57BL/6J マウスと交配させて得られた iNOS ヘテロ欠損マウスをさらに交配させて得られた同胞マウスを、各個体の遺伝子型を判定した後に用いた。インフルエンザウイルス感染実験には 8 週齢、雄性マウスを、センダイウイルス感染実験には 3 週齢、雄性マウスをそれぞれ使用した。

2.4 ウイルス感染モデルの作製

マウスのウイルス肺炎モデルはウイルス懸濁液の経鼻噴霧感染により作成した。回転台付き専用感染装置内にマウスを入れ、感染直前に普通ブイヨンで希釈調製したウイルス懸濁液をガラス製ネブライザーにて 30 分間噴霧し経気道的に感染させた。

2.4.1 インフルエンザウイルス感染モデル

インフルエンザウイルスはマウス馴化インフルエンザウイルス A/Kumamoto/67(H2N2)を用いた。-80°Cにて凍結保存してあるウイルス濃縮液を普通ブイヨンにより $2 \times LD_{50}$ 量に希釈して用いた。インフルエンザウイルス A/Kumamoto/67(H2N2)の C57BL6J 野生型マウス (8 週齢、雄性) に対する LD_{50} 量は 2.8×10^4 PFU/ml であった。

2.4.2 センダイウイルス感染モデル

センダイウイルス Z 株は東京大学医科学研究所加藤篤博士より提供された。本センダイウイルス株は、ウイルス cDNA を用いた reverse genetics により作製されたリコンビナントウイルスであり、これをさらに孵化鶏卵にて 2 回継代・濃縮し-80°Cにて凍結保存したものを使用直前に解凍し、普通ブイヨンにて $2 \times LD_{50}$ 量に希釈して用いた。C57BL6J マウス (3 週齢、雄性) に対する LD_{50} 量は 2.1×10^8 PFU/ml であった。

2.5 電子スピン共鳴 (ESR) 法による NO の検出

インフルエンザおよびセンダイウイルス感染マウスの肺内での NO 産生は、ジチオカーバメート鉄錯体をスピントラップ剤として用いた ESR 法により測定した。Dithiocarbamate(sarcosine) (DTCS)と FeSO_4 を混合し DTCS-Fe 錯体を作成しマウス後肢に筋肉内投与した。投与 30 分後にエーテル麻酔下にマウス肺を摘出し、直ちに石英サンプル管に入れ、液体窒素中で急速凍結させた。ESR スペクトラムは X-band ESR spectrometer (Bruker ESP 380E; Rheinstetten, Germany)を用いて、110 K にて測定した。ESR 測定条件は、microwave power 4 mW, modulation amplitude 0.5 mT で、磁場は TCNQ-Li salt ($g=2.00252$)を用いて較正した。

2.6 プラークフォーミングアッセイによる肺内ウイルス定量

2.6.1 インフルエンザウイルス定量

肺組織中のインフルエンザ力価は、MDCK 細胞を用いたプラークフォーミングアッセイにより定量した。肺組織に 2 ml の PBS 溶液を加え、ポリトロンホモジナイザー (Kinematica 社) を用いて 2000 rpm にてホモジナイズした。ホモジネートを、 $600 \times g$ にて、5 分間遠心し、その上清を孔径 0.45 μm のメンブレンフィルターで濾過し、被検液とした。

この被検液をもとに 0.2% BSA 添加 MEM を用いて 10 倍希釈系列を作成した。本アッセイに使用する MDCK 細胞は、6 穴プレート (直径 35 mm, Falcon) に 4.5×10^5 cells/well を接種し、10% FCS 加 DMEM 中で一晚培養後、PBS で 2 回洗浄したものを使用した。被検液 100 μl /well を MDCK 細胞に接種、 37°C 、1 時間インキュベートし、ウイルスを細胞に吸着させた。0.2% BSA 添加 DMEM、トリプシン加 0.5%アガロースを重層し 37°C にて 48 時間培養し、プラークを形成させた。

プラーク数の計測はモルモット赤血球吸着反応を利用して行った。重層したアガロースを慎重に剥離し、2%モルモット赤血球入り 0.2% BSA 添加 minimum essential medium (MEM) で 15 分間吸着反応させ、0.2% BSA 添加 MEM にて 2 回洗浄したのちプラーク数を計測した。計測したプラーク数をもとにして、肺内ウイルス量は次のようにして算定した。

ウイルス力価 (PFU/lung) = プラーク数 \times 希釈倍率 \times (ホモジネート総容量(ml) / 0.1ml)

2.6.2 センダイウイルス定量

肺組織中のセンダイウイルス力価は、CV-1 細胞を用いたプラークフォーミングアッセイにより定量した。肺組織からの被検液調製はおよそ 10 倍希釈系列の作成はインフルエンザウイルス感染モデルと同様 (2.6.1) に行った。

本アッセイに使用する CV-1 細胞は、6 穴プレート (直径 35 mm, Falcon) に 4.5×10^5 cells/well を接種し、10% FCS 加 DMEM 中で一晚培養後、PBS で 2 回洗浄したものを使用した。被検液 100 μ l/well を CV-1 細胞に接種、37°C、1 時間インキュベートし、ウイルスを細胞に吸着させた。0.2% BSA 添加 DMEM、トリプシン加 0.5% アガロースを重層し 48 時間培養し、プラークを形成させた。

プラーク数の計測は、インフルエンザ感染モデルの場合と同様モルモット赤血球吸着反応を利用して行い、肺内ウイルス量算定も同様の手順で行った。

2.7 免疫組織化学および病理組織学的検討

2.7.1 Periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 固定法による組織標本作製

$2 \times LD_{50}$ 量のインフルエンザウイルスあるいはセンダイウイルス感染 (7 日目) および非感染マウスをジエチルエーテルにて麻酔し、開胸後肺を摘出した。摘出肺は直ちに 2% PLP 溶液に浸け、注射筒内にて陰圧を加え伸展させた後、4°C にて 4 時間固定した。固定終了時に PBS にて 3 回洗浄し、引き続き PBS+10% ショ糖液に浸し 4 時間、さらに PBS+15% ショ糖液に浸し 4 時間処理後、OCT コンパウンドにて包埋、液体窒素にて凍結させ使用時まで -80°C にて保存した。クリオスタット (CM1800; Leica 社) を用いて 6 μ m の薄切切片を作成し、poly-L-lysine コートスライドガラス (松浪) に貼り付け一晚風乾させた後染色あるいは免疫組織化学法に用いた。

2.7.2 組織形態学的検討

ウイルス感染後の病理組織学的変化はヘマトキシリン&エオジン染色 (H-E staining) による組織染色により評価した。

2.7.3 ペルオキシダーゼ法による免疫組織化学

肺組織内の iNOS および 3-ニトロチロシンの検出にはペルオキシダーゼを用いた免疫組織化学法により解析した。風乾終了後の組織切片を PBS にて湿潤させた後、内因性ペルオキシダーゼ不活化のため 100 mM 過ヨウ素酸溶液に 10 分間反応させた。PBS にて 3 回洗浄した後 20 倍希釈ロバ正常血清にて 15 分間ブロッキングさせた。一次抗体とし

て 10 µg/ml の抗 3-ニトロチロシン抗体あるいは 2 µg/ml の抗 iNOS 抗体をのせ、4℃にて一晩静置し反応させた。PBS にて 4 回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識二次抗体を滴下し室温にて 1 時間反応させた。PBS にて 4 回洗浄し、発色液 (0.3 mg/ml diaminobenzidine, 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.009% H₂O₂) にて発色させた。ヘマトキシリンにて核染色を行い、アルコール脱水、キシレン透徹後、エンテランニュー(メルクジャパン社) にて封入した。

2.8 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) -電気化学検出法 (ECD) による気管支肺胞洗浄 (BAL) 液蛋白中の 3-ニトロチロシン定量

2.8.1 HPLC-ECD による 3-ニトロチロシン定量系の作成 (図 2-1)

HPLC (high performance liquid chromatography)-ECD (electrochemical detection) により 3-ニトロチロシンを検出・定量した。HPLC の流出系を porous carbon 電極セルおよび glassy carbon セルを直列に連結した 2 電極型 ECD 検出器 (エイコム) を用いた。移動相は 5%メタノール含有 0.1 M リン酸バッファー (pH 5.0) で、流速を 0.5 ml/min とし、分離カラムには C-18 逆相カラムである SC-5DS 3×150 mm (エイコム) を使用した。3-ニトロチロシン検出における印加電圧は、還元用の porous carbon 電極セルに対し -900 mV、glassy carbon 検出セルに対し +300 mV とした。

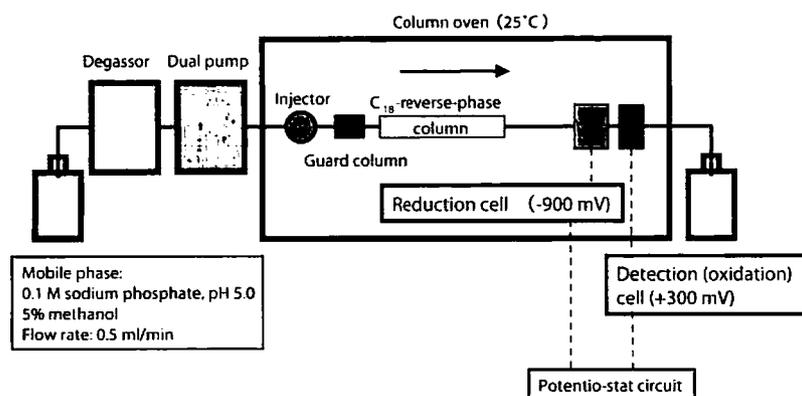


図 2 - 1 : HPLC-ECDによる3-ニトロチロシン検出システム

2.8.2 BAL

BAL (bronchoalveolar lavage, 気管支肺胞洗浄) を行うため、マウスをエーテルにて麻酔後気管切開を行い、エラストー針 (20 G) の外筒を挿入し、洗浄液の漏出防止の

ため絹糸を用いて気管とチューブを結紮した。1.6 ml の滅菌 PBS をシリンジでゆっくり注入した後、シリンジに陰圧をかけて緩徐に洗浄液を回収した。回収した洗浄液は直ちに $9,000 \times g$ にて遠心分離し、細胞成分と上清を分離した。

2.8.3 BAL 液中蛋白の加水分解処理

生体由来の低分子成分を BAL 上清から除去するため、分子量 10,000 カットオフの限外濾過フィルターを用いて遠心濃縮した。濃縮した蛋白液の蛋白濃度を Lowry 法にて定量し、その 1/10 (W/W) 量のプロナーゼ (PRONASE[®], protease from *Streptomyces griseus*, Nuclease-Free, Calbiochem, San Diego, CA, USA) を添加後、50°C にて 18 時間加水分解処理した。加水分解処理後、残存する高分子成分を除去するため分子量 10,000 カットオフの限外濾過フィルターを用いて遠心ろ過し、通過成分 (20 μ l/analysis) を HPLC 分析に用いた。

2.9 TUNEL 法による肺組織におけるアポトーシスの検討

ウイルス感染肺において誘導されるアポトーシスについて、*in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labeling (TUNEL) 法によるアポトーシス検出キット (TACS[™]; Trevigen, Inc., Gaithersburg, USA) を用いて解析した。2.7 で述べた PLP 固定肺組織より 10 μ m 厚の切片を作製した。一晚風乾した切片を PBS にて湿潤させた後、0.6% H₂O₂ 含有メタノール液にて 5 分間内因性ペルオキシダーゼ阻害を行ったのち、TUNEL 反応を行い、つづいてペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと反応、洗浄後に TACS[™] Blue Label を用いて発色 (青色) させた。対比染色としては Nuclear Fast Red (赤色) を用いた。

肺組織切片中のアポトーシス細胞を形態学的に評価するため、マウス肺組織片中 (3 断面/匹、3 匹/群) のアポトーシス様細胞数および有核細胞数を、強拡大 (400 倍) にて観察・計測し、アポトーシス様細胞/有核細胞数比により肺内アポトーシス誘導を評価した。

2.10 抗 8-ニトログアノシン抗体の作製

2.10.1 8-ニトログアノシンの合成

8-ニトログアノシンは亜硝酸イオン (NO₂⁻) による 8-ブロモグアノシンの求核置換

(Br⁻ ⇌ NO₂⁻) により合成した。8-ブロモグアノシンを無水ジメチルスルフォキシドに溶解した亜硝酸ナトリウムに添加し、70℃にて3時間反応させた。生成した8-ニトログアノシンは逆相カラムを用いた HPLC 法により分離・精製した。精製した8-ニトログアノシンは質量分析計で測定した分子量 (323 Da) および吸光スペクトラムにより同定した。この方法により8-ブロモグアノシン量からの8-ニトログアノシンの収率は10%–20%であった。

2.10.2 8-ニトログアノシン-ウシ血清アルブミン (BSA) の作製

低分子である8-ニトログアノシンに対する抗体を作製するため、担体としてBSAを用いた。8-ニトログアノシンとBSAの結合にはErlanger、Beiserらが報告した過ヨウ素酸による酸化を利用する方法に、若干変更を加えて用いた (Erlanger and Beiser, 1964)。蒸留水に溶解した8-ニトログアノシンを過ヨウ素酸ナトリウムで15分間処理することによりグアノシンのリボースを開環させた。余剰の過ヨウ素酸はエチレングリコールを用いて除去した。過ヨウ素酸処理により開環した8-ニトログアノシンを、BSAを溶解した0.5 Mリン酸バッファー (pH 7.0) に添加することにより、開環したリボース部位とBSAを結合させた。BSAと8-ニトログアノシンの共有結合を安定化させるため sodium cyanotrihydroborate により処理した。結合しなかった核酸はセファデックス G-25 を用いたカラムクロマトグラフィーにより除去した。BSAに取り込まれた8-ニトログアノシン量を測定するため生成した8-ニトログアノシン-BSAを酸加水分解し、モル吸光係数 ($\epsilon_{400} = 9.144 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) から算定した。8-ニトログアノシンの平均取り込み量はBSA 1モルあたり6.2モルであった。

2.10.3 ウサギ抗8-ニトログアノシンポリクローナル抗体の作製

ウサギ抗8-ニトログアノシン抗体を作製するため、ニュージーランド白色種ウサギ (4週齢、雄性) に8-ニトログアノシン-BSA (20 µg) と Freund の完全アジュバンドのエマルジョンを皮下注射した。その後同量の8-ニトログアノシン-BSA と Freund の不完全アジュバンドのエマルジョンをブースター接種として2週間隔で計4回施行した後に採血し、血清分離後、特異的抗8-ニトログアノシン IgG 抗体の精製を一連のアフィニティークロマトグラフィーにて行った。まず Protein A 結合セルロファインにより IgG を精製し、得られた IgG を8-ニトログアノシン結合セルロファインにてさらに精製した。さらに、不純物として存在しうる抗BSA抗体および抗グアノシン抗体を除去するため、BSA 結合セルロファインおよびグアノシン結合セルロファインを用い、これらを通した成分を抗8-ニトログアノシン抗体として用いた。

2.10.4 マウス抗 8-ニトログアノシンモノクローナル抗体の作成

BDF1 マウス（日本エスエルシー社）を、8-ニトログアノシン-BSA と Freund 完全アジュバンドとのエマルジョンを抗原量にして 50 μg /マウス腹腔内投与して免疫し、さらに 1 週間の間隔を置いて 8-ニトログアノシン-BSA と Freund 不完全アジュバンドとのエマルジョンを抗原 25 μg /マウスで腹腔内に投与して追加免疫を行った。35 日目の追加免疫を最終免疫とし、最終免疫の 3 日後にその脾臓細胞を摘出した。この摘出脾臓から細胞を取り出し、メッシュろ過した後、RPMI1640 培地に懸濁して脾臓細胞浮遊液を得た。一方、SP2/0 ミエローマ細胞を増殖させた後、10% FCS 含有 RPMI1640 培地に懸濁してミエローマ細胞浮遊液を得た。なお、ここでは生細胞率 95%以上の細胞懸濁液を用いた。脾臓細胞浮遊液およびミエローマ細胞浮遊液を調製した後、脾臓細胞の浮遊液に脾臓細胞数に対し 1/10~1/5 の細胞数でミエローマ細胞浮遊液を加え、次いでポリエチレングリコールを滴下し、混合することによって細胞融合を行った。遠心して上清を除去した後、細胞濃度が 5×10^6 /ml となるように HAT (hypoxanthine-aminopterin-thymidine) 培地を添加し、96 穴プレートにて培養し、HAT 選択を行った。

抗体のスクリーニングは、8-ニトログアノシン-BSA を用いた enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)により行った。すなわち、8-ニトログアノシン-BSA を吸着させたELISA用マイクロプレートにHAT選択した抗体産生細胞の培養上清を加え、室温下で攪拌した後 Tween 20 加 PBS で洗浄した。50 μl のペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体を各ウェルに加え、基質発色反応によって陽性株を選択した。この陽性株に関し、更に限界希釈法にてスクリーニング繰り返し、その産生抗体について競合 ELISA 法により各種核酸誘導体との反応性を検討し、8-ニトログアノシンのみと特異的に反応する抗体を産生する陽性株をクローニングした。

さらに、クローニングが完了した抗体産生細胞を BALB/c マウスの腹腔内に注射して腹水を採取し、その腹水を硫酸アンモニウムによる塩析、セファデックスによるゲル濾過により精製することによってモノクローナル抗体を得た。

2.11 抗 8-ニトログアノシン抗体の特異性の検討

2.11.1 直接 ELISA 法

96 穴プレートを 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の 8-ニトログアノシン-BSA、グアノシン-BSA あるいは BSA でコートし、一次抗体として段階希釈した精製抗体と反応させた。反応後洗浄バッファーにて 4 回洗浄し、続いてペルオキシダーゼ標識二次抗体と反応させた。抗体の反応性は 1,2-phenylenediamine dihydrochloride を基質としたペルオキシダーゼによ

る発色により測定した。

2.11.2 競合 ELISA 法

1 µg/ml の 8-ニトログアノアシン-BSA でコートした 96 穴プレートに、各種核酸誘導体 (0-500 µM) と抗体の反応液を添加し 8-ニトログアノアシン-BSA に結合した抗体量を 1,2-phenylenediamine dihydrochloride を基質としたペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体による発色により測定した。

2.11 パーオキシナイトライトによる核酸およびヌクレオシドのニトロ化効率の検討

グアノシン (0.1 mg/ml)、デオキシグアノシン (0.1 mg/ml)、DNA (calf thymus, 0.5 mg/ml)、および RNA (yeast t RNA, 0.5 mg/ml) を 100 mM リン酸バッファー (pH 7.4) 下にてパーオキシナイトライトと反応させ、10 分間インキュベートした。生成した 8-ニトログアノシンは Yormilov らの方法 (Yormilov et al. 1995) に従い、0.1 N HCl の存在下にて 100°C、30 分間酸加水分解処理後、HPLC-ECD により測定した。

2.13 スロットブロット法による細胞抽出 RNA 中の 8-ニトログアノアシン検出

パーオキシナイトライトによりニトロ化した RNA あるいは iNOS 発現細胞から抽出した RNA 中に存在する 8-ニトログアノアシンを、スロットブロット法により検討した。

細胞からの RNA 抽出には RNA extraction kit (Purescript, Genta Systems, Minneapolis, MN, USA) を使用した。被検材料としては CV-1 細胞より抽出した total RNA に 2 mM のパーオキシナイトライト (ONOO) をボーラスで 3 回加え反応させたもの、また、10 µg/ml の lipopolysaccharide (LPS) と 100 U/ml の interferon-γ (IFN-γ) により刺激 (あるいは非刺激) した RAW 264 細胞 (マウスマクロファージ由来細胞株) より抽出した RNA を用いた。尚、パーオキシナイトライトは既報に従い、quenched flow reactor を用いて亜硝酸と過酸化水素 (H₂O₂) から合成した (Akaike et al., 2000)。

抽出した RNA は 17.5%ホルムアルデヒドおよび 50%ホルムアミド入り 5 mM 酢酸ナトリウムおよび 1 mM EDTA 含有 20 mM MOPS バッファーにて変性させ、スロットブロット装置を用いて Hybond-N⁺ メンブレン (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA) に吸着させた。吸着後のメンブレンはブロックエース (大日本製薬) にて 1 時間ブロッキングした。ブロッキング終了後のメンブレンを一次抗体液 (1 µg/ml) に浸し、4°C にて一昼夜反応させた。Tween 20 加 Tris-buffered saline (TBS), pH

7.2にて3回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識二次抗体に浸し、4℃にて一昼夜反応させた。Tween 20 加 TBSにて3回洗浄後、ECL system (Amersham) を用いて発色させた。8-ニトログアノシン検出の特異性を確認するため別に調整したメンブレンを 0.5 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (亜ジチオン酸ナトリウム)、0.1 M Tris-HCl (pH 9.0)に浸して5分間反応させ、RNA中に存在する8-ニトログアノシンを8-アミノグアノシンへ還元をさせた後、抗体反応を行った。

2.14 免疫細胞化学法による培養細胞中の8-ニトログアノシン検出

Lab-Tec ChamberにRAW 264細胞を接種し、11時間培養後、LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と IFN- γ (100 U/ml) 刺激し、または非刺激で11時間培養した。培養終了後、培養液を除去し、PBSで3回洗浄後、ザンボニ固定を行った。ザンボニ固定は原法に若干の変更を加え行った (De Martino and Zamboni, 1967)。1% BSA 含有 PBSにて1時間ブロッキングした後、一次抗体溶液としてマウス抗8-ニトログアノシンモノクローナル抗体 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を添加し、1時間反応させた。PBSで4回洗浄後、Cy3 蛍光標識抗マウス Ig 二次抗体 (Amersham) を添加し1時間反応させた。PBSにて4回洗浄後、80%グリセロールにて封入した。

2.15 免疫組織化学法によるの8-ニトログアノシンの検出

インフルエンザウイルスあるいはセンダイウイルス感染後のマウス肺内における8-ニトログアノシンの生成について、免疫組織学的に解析した。

肺組織の摘出、固定処理および薄切切片切り出しは2.7と同様に行った。

風乾終了後 PBSにて湿潤させた切片を、20倍希釈ロバ正常血清にて15分間ブロッキングさせた。一次抗体として10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗8-ニトログアノシン抗体を滴下し4℃にて一晩反応させた。反応終了後 PBSにて4回洗浄し、二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識二次抗体を滴下し室温にて1時間反応させた。反応終了後 PBSにて4回洗浄し、Vector Red Substrate Kit I for alkaline phosphatase (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA)を用いて発色させた。発色終了後ヘマトキシリンにて核染色を行い、アルコール脱水、キシレン透徹後、エンテランニューにて封入した。

抗8-ニトログアノシン特異抗体の生体組織に対する抗原特異性を検討するため以下の方法でも免疫組織化学を行った

(1) 一時抗体反応時に、反応液中に8-ニトログアノシン (1 mM)、8-オキソグアノシン (1 mM)、8-プロモグアノシン (1 mM) あるいは3-ニトロチロシン (1 mM) を添

加し、4°Cにて一晩静置した。

(2) 薄切切片を0.5 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 、0.1 M Tris HCl (pH 9.0)に浸して5分間反応させ、組織中に存在する8-ニトログアノシンを8-アミノグアノシンへ還元させたのち免疫組織化学法を行った。

2.16 ESR 法によるスーパーオキシド (O_2^-) 生成の検出

NADPH 存在下における P450 レダクターゼおよび iNOS よりのスーパーオキシド生成は 5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO)を用いた ESR (electron spin resonance) スピントラップ法により検出した。それぞれ NADPH 酸化活性、および L-アルギニンから L-シトルリンへの酸化活性が十分あることがあらかじめ確認された P450 レダクターゼおよび精製リコンビナントヒト iNOS を用い、これらに 8-ニトログアノシンを添加した際の DMPO-OOH 生成を X-band ESR spectrometer (日本電子) にて検出した。なお、今回用いた P450 レダクターゼは既報に準じてラット肝ミクロゾーム分画より精製し (Sato et al, 1992)、ヒトリコンビナント iNOS は米国 Cleaveland Clinic の D. Stuehr 教授より供与を受けた (Ichimori et al., 1999)。

第3章 実験結果

3.1 インフルエンザウイルス感染モデルにおける NO 依存的病態発現

3.1.1 マウス生存曲線

実験に用いた感染量 ($2 \times LD_{50}$) において、C57BL/6J 野生型マウスは感染後 6-7 日後より衰弱し始め、感染後第 8 日から 10 日目を中心に 90% が死亡した。これと比較して iNOS ホモ欠損マウスは最終生存率 54% と野生型マウスと比較して有意に高い生存率 ($P < 0.01$) を示した。iNOS ヘテロ欠損マウスは 45% とホモ欠損マウスには及ばないものの同様に有意に高い ($P < 0.05$) 成績を示した (図 3-1)。iNOS 遺伝子の欠損はインフルエンザウイルス感染マウスの生存に対して有利に働くことが示された。

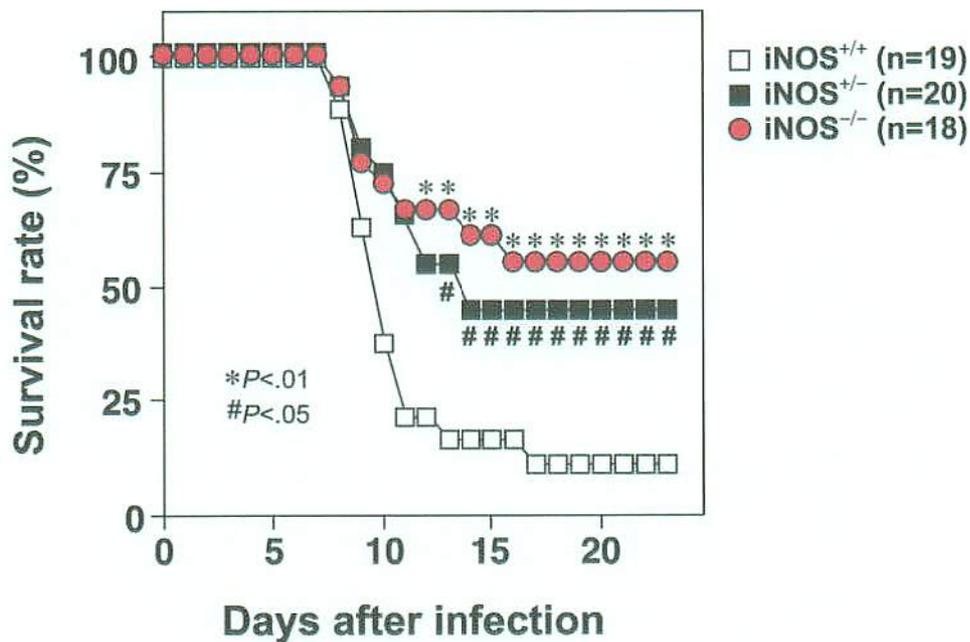


図 3-1 : インフルエンザウイルス感染後のマウス生存曲線
C57BL/6野生型、iNOSヘテロ欠損およびiNOSホモ欠損同胞マウスに $2 \times LD_{50}$ 量のインフルエンザウイルスを感染させマウス生存を観察した。
* $P < 0.01$ 、# $P < 0.05$ (vs. 野生型マウス; Fisher's exact probability test).

3.1.2 ESR 法による肺内 NO の検出

インフルエンザウイルス感染モデルにおいて iNOS による NO 産生は感染後第 4 日以降より増強し、感染後第 6 日目から 8 日目にかけて最大レベルに達する (Akaike et al., 1996, 2000)。そこで、iNOS 欠損に伴う肺内 NO 産生レベルの変動を確認するため、インフルエンザウイルス感染後第 7 日目におけるマウス肺内 NO 産生を ESR スピントラップ法により検出した (図 3-2)。野生型マウスでは DTCS-鉄錯体 NO アダクトの 3 相性のシグナルが強く検出されたのに対し、iNOS へテロ欠損マウスは信号強度が約 1/4 量と減弱しており、iNOS ホモ欠損マウスでは検出限界以下であった。このことからインフルエンザウイルス感染における NO 産生は iNOS の遺伝子型と相関することが示された。

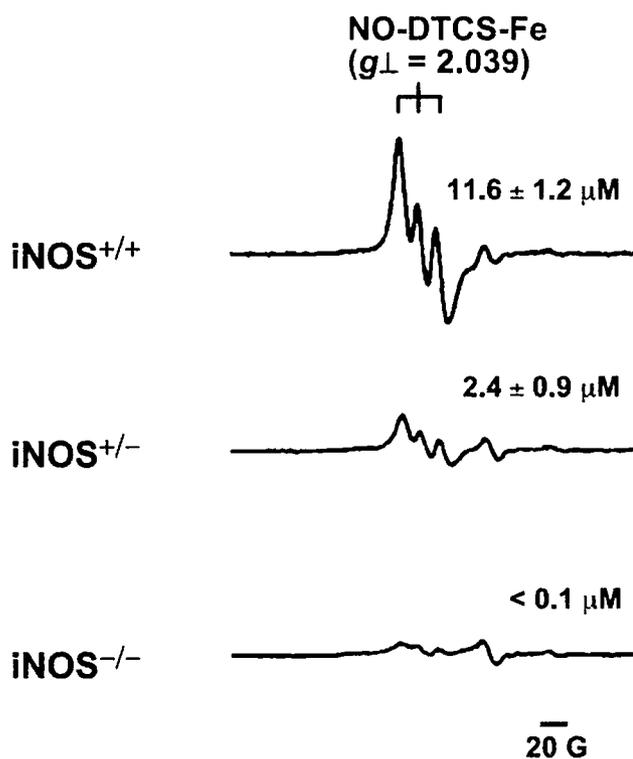


図 3 - 2 : インフルエンザウイルス感染モデルにおける、ESRスピントラップ法による肺内NO検出

インフルエンザウイルス感染後第7日目における肺内NOラジカル産生を、DTCS鉄錯体を用いたESRスピントラップ法により検出した。図中右上に、それぞれのスペクトラムで二重積分して得られたNOアダクトの生成量を示している (means \pm SE, n = 3)。

3.1.3 肺内ウイルス増殖

インフルエンザウイルス感染後の肺内ウイルス増殖に対する iNOS 遺伝子欠損の影響を解析するため、プラークアッセイ法により、肺内の感染性ウイルス量を測定した。インフルエンザウイルス増殖のピークは 3 群ともに感染後第 4 日目であり、その後は減少する経過をとった。測定したいずれのタイムポイントにおいても、野生型、ヘテロ欠損およびホモ欠損群の間にウイルス量の有意差は認めなかった (図 3-3)。

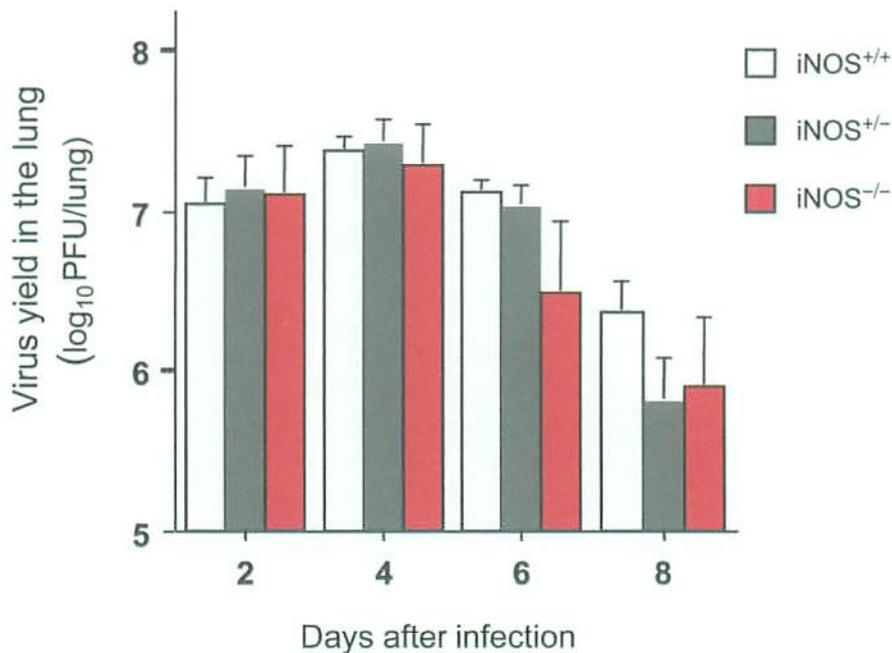


図 3-3 : インフルエンザウイルス感染モデルにおける肺内ウイルス増殖

MDCK細胞を用いたプラークフォーミングアッセイにより、インフルエンザウイルス感染後第2、4、6、および8日後における肺内の感染性ウイルス量を定量した (means ± SE, n = 3)。

3.1.4 病理組織学的変化

肉眼的および組織学的な肺炎像は感染後 4 日目頃より出現しはじめ、感染後 7 日目～8 日目にかけてピークに達する。そこで、感染後第 7 日目の肺組織の病理学的変化を H-E 染色により比較検討した。野生型マウスでは広範な炎症細胞浸潤、肺胞内滲出および肺胞構築の破壊など、いわゆる急性肺障害に相当する病理学的変化を呈していた (図 3-4 左)。これに対し、有意に高い生存率を示した iNOS 欠損マウス群では、基本的に同様の病理学的変化を示しているものの、その程度は明らかに軽減しており、生存率の改善に矛盾しない結果であった。

3.1.5 肺内 3-ニトロチロシン生成

3.1.5.1 免疫組織化学法による検討

感染後第7日のマウス肺内の3-ニトロチロシン生成を免疫組織化学により検討した。野生型マウスにおいて3-ニトロチロシンの免疫染色は主に肺胞腔内に浸潤した炎症細胞や気管支・肺胞上皮細胞および肺胞内滲出液を中心に認められた。一方、iNOSヘテロ欠損およびホモ欠損マウスにおいては肺内NO産生減少や病理像の軽減と相関して3-ニトロチロシンの染色性が低下していた。(図3-4右)

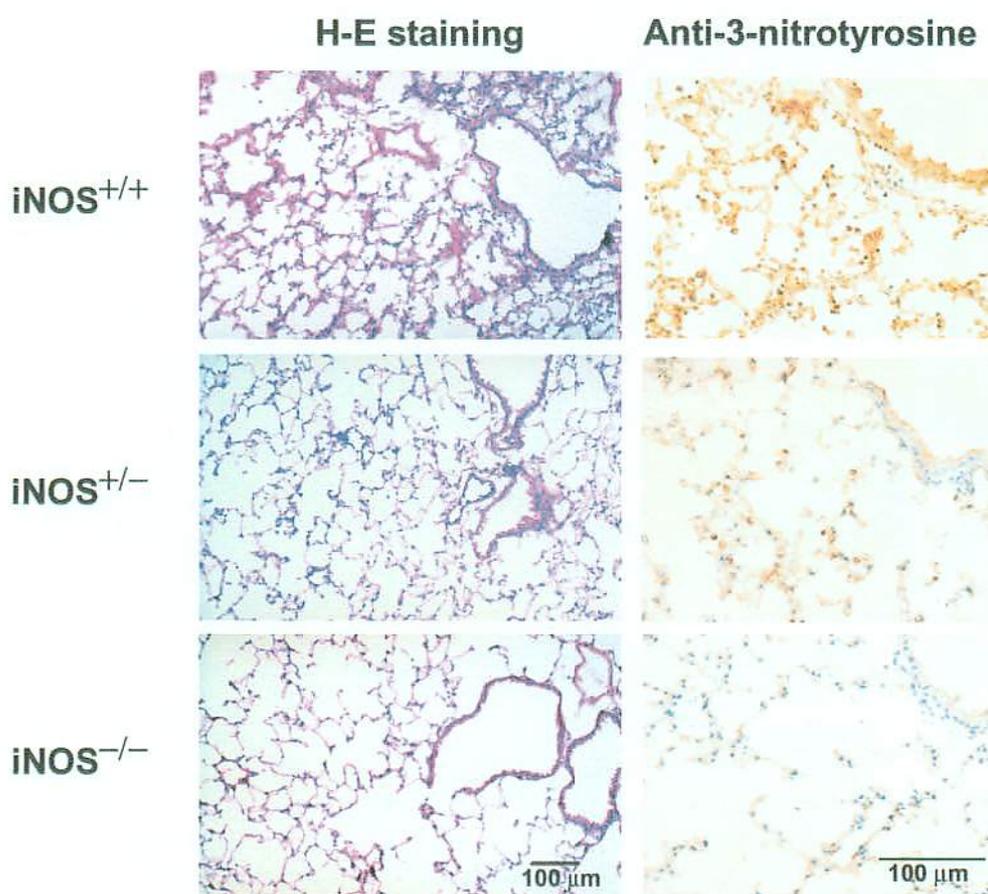


図3-4： インフルエンザウイルス感染モデルにおける肺の病理学的変化および3-ニトロチロシン生成

3.1.5.2 HPLC-ECDによるBAL蛋白中の3-ニトロチロシン定量

ウイルス感染後の肺内で生成した3-ニトロチロシンを生化学的に同定し、かつ定量的に測定するため、気管支肺胞洗浄の回収液中に含まれる蛋白成分を分離後、酵素的に加水分解処理し、含有する3-ニトロチロシンをHPLC-ECD法にて検出・定量した。測定に用いたシステムでの3-ニトロチロシンの保持時間は約14分であり、3-ニトロチロシン標準試薬を用いた検出限界は 10^{-15} Mで定量性も良好であった。さらに、還元電圧を-900 mVから-600 mVに変更することにより3-ニトロチロシンの還元作用が消失し、ピークが消失することを利用して、特異性の確認も可能であった(図3-5 A-C)。野生型マウスにおいて、気管支肺胞洗浄液蛋白中の3-ニトロチロシン量は感染後第6日より検出可能となり感染後第8日目には最大となり、感染後第10日目まで持続していた。これに対しiNOSホモ欠損マウスでは全経過を通して測定限界以下であった(図3-6)。これらの結果はESR法で得られた肺内NO産生に比例していた。尚、正常マウス20匹分の気管支肺胞洗浄液を濃縮し検討した結果、 7.6 ± 0.5 fmol/mlと超微量の3-ニトロチロシンが検出され、正常レベルでも定常的に非常に低レベルの3-ニトロチロシンが生じていることがわかった。

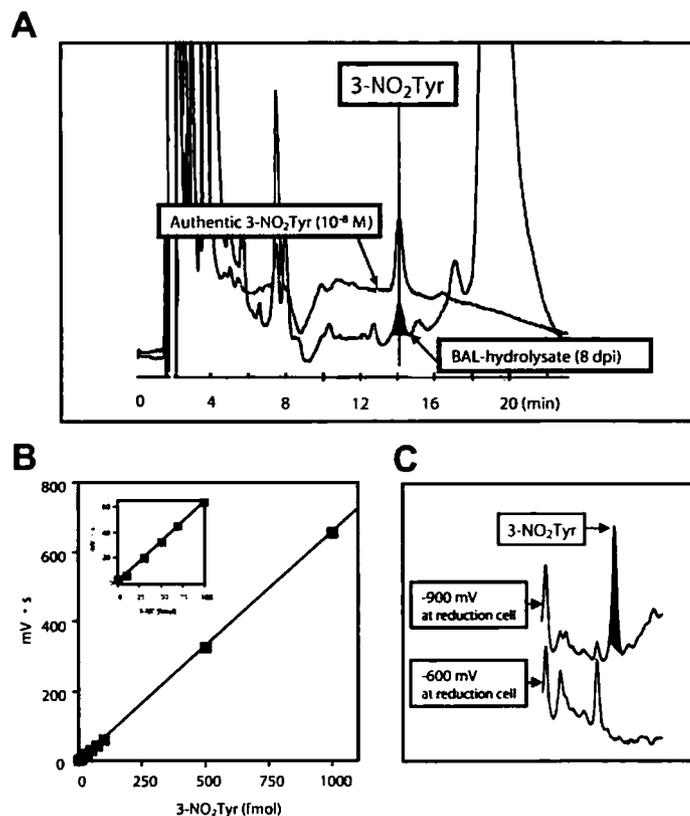


図3-5: HPLC-ECDによる3-ニトロチロシン検量線および溶出プロファイル

(A) 3-ニトロチロシン標準試薬 (10^{-8} M) および気管支肺胞洗浄液 (感染後第8日) の典型的溶出プロファイル。
(B) 3-ニトロチロシン標準試薬に対する電極反応性 (C) 還元電圧変更による3-ニトロチロシンの酸化特性の変化。
3-NO₂Tyr, 3-ニトロチロシン。

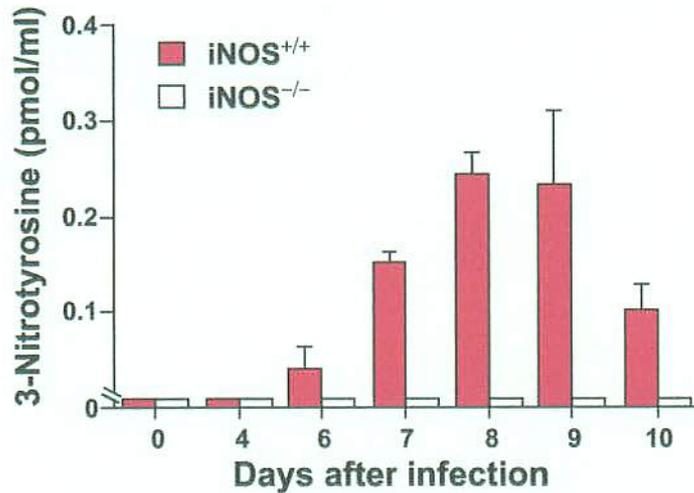


図 3-6 : インフルエンザウイルス感染マウスBAL蛋白中の3-ニトロチロシン生成
 インフルエンザウイルス感染マウスBAL蛋白中の3-ニトロチロシン生成を、HPLC-ECDにより測定した (means \pm SE, n = 3).

3.1.6 TUNEL 法を用いたアポトーシスの検討

NO 依存性細胞傷害機構のひとつとして活性酸化窒素種によるアポトーシス誘導が示唆されていることから、マウス肺内のアポトーシス誘導を *in situ* TUNEL 法により検討した。感染後第 7 日の野生型マウス肺において。肺胞上皮細胞や気管支上皮細胞、一部の浸潤した炎症細胞を中心とした強いアポトーシス様変化が認められた(図 3-7A)。肺組織中のアポトーシス様細胞数の比較により、iNOS ホモ、ヘテロ欠損群の両方で、野生型マウス群と比較しアポトーシス誘導が有意に抑制されることが示された(図 3-7B)。

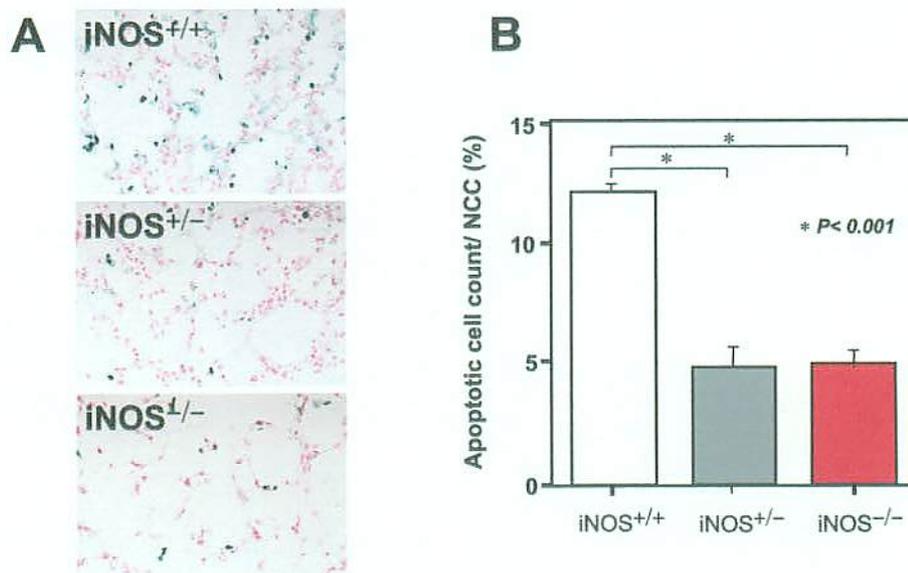


図 3-7 : インフルエンザウイルス感染マウス肺内におけるNO依存性アポトーシス誘導
 インフルエンザウイルス感染後第7日目における肺内アポトーシス誘導を *in situ* TUNEL法により検討した。(A) TUNEL染色像。アポトーシス様細胞は濃青色に染まる。(B) 有核細胞数 (NCC) に対するアポトーシス様細胞の割合はiNOS^{+/-}、iNOS^{-/-}ともに、iNOS^{+/+}マウスより有意に低く (means \pm SE, n = 3; $P < 0.001$, unpaired *t*-test) になっていた。

3.1.7 小 括

iNOS 欠損マウスを用いたインフルエンザウイルス感染モデルの病態解析では以下のことが示された。

1. ウイルス感染後の肺内 NO 産生亢進は、iNOS 発現に依存している。
2. 肺内におけるウイルス増殖は肺内 NO 産生の多寡に影響されない。
3. ウイルス肺炎病態および致死性は肺内 NO 産生に依存的である。
4. 肺内の NO 産生量に比例した 3-ニトロチロシン生成が認められた。
5. 肺内の NO 産生量に比例して肺内のアポトーシス誘導が促進される。

以上の知見より、マウスのインフルエンザウイルス感染モデルにおいて iNOS により産生される NO は、生体内において有効な抗ウイルス作用を発揮することなく、むしろ生体分子のニトロ化反応や、アポトーシス誘導を促進することにより病態増悪因子として作用していることが示唆された。

3.2 センダイウイルス感染モデルにおけるNO 依存的病態発現

3.2.1 マウス生存曲線

実験に用いた感染量 ($2 \times LD_{50}$) において、C57BL/6J 野生型マウスは感染後 6-7 日後より衰弱し始め、感染後 8-10 日後を中心に 95% が死亡した。これと比較して iNOS ホモ欠損マウスは最終生存率 44% と野生型マウスと比較して有意に高い生存率 ($P < 0.01$) を示した。iNOS ヘテロ欠損マウスは 34% とホモ欠損マウスには及ばないものの同様に有意に高い ($P < 0.05$) 成績を示した (図 3-8)。iNOS 遺伝子の欠損はセンダイウイルス感染マウスの生存に対して有利に働くことが示された。

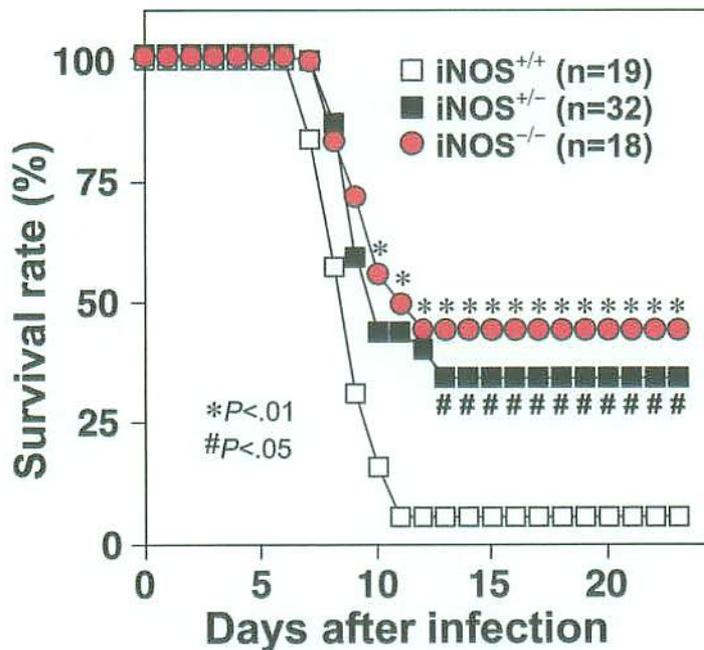


図 3-8 : センダイウイルス感染後のマウス生存曲線

C57BL/6野生型、iNOSヘテロ欠損およびiNOSホモ欠損同胞マウスに $2 \times LD_{50}$ 量のセンダイウイルスを感染させ、マウス生存を観察した。* $P < 0.01$ 、# $P < 0.05$ (vs. 野生型マウス; Fisher's exact probability test).

3.2.2 ESR 法による肺内 NO の検出

センダイウイルス感染後第7日目におけるマウス肺内 NO 産生を ESR スピントラップ法により検出した (図 3-9)。野生型マウスでは DTCS-鉄錯体 NO アダクトの 3 相性のシグナルが強く検出されたのに対し、iNOS ヘテロ欠損マウスは信号強度が約 1/4 量と減弱しており、iNOS ホモ欠損マウスでは検出限界以下であった。このことからセンダイウイルス感染においても iNOS の遺伝子型に依存した肺内 NO 産生亢進が確認された。

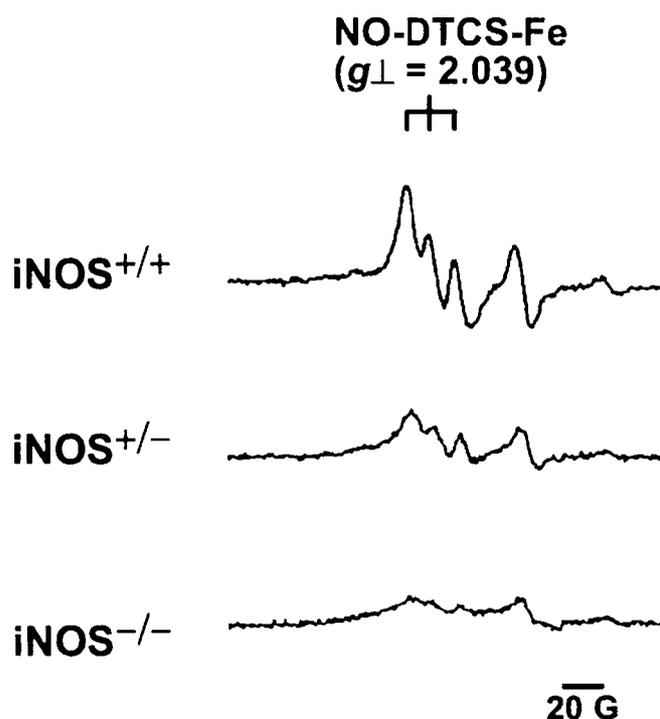


図 3 - 9 : センダイウイルス感染モデルにおける、ESRスピントラップ法による肺内NO検出

センダイウイルス感染後第7日目における肺内NO産生を、DTCS鉄錯体を用いたESRスピントラップ法により検出した。

3.2.3 肺内ウイルス増殖

センダイウイルス感染後の肺内ウイルス増殖に対する iNOS 遺伝子欠損の影響を解析するため、プラークアッセイ法により、肺内の感染性ウイルス量を測定した。センダイウイルス増殖のピークは 3 群ともに感染後第 6 日目であり、インフルエンザウイルスの増殖ピークよりやや遅れる傾向が認められた。しかし感染後第 8 日目には著明に減少しており、肺炎増悪の経過とは一致しなかった。測定したいずれのタイムポイントにおいても、野生型、ヘテロ欠損およびホモ欠損群の間にウイルス量の有意差は認めなかった (図 3-10)。

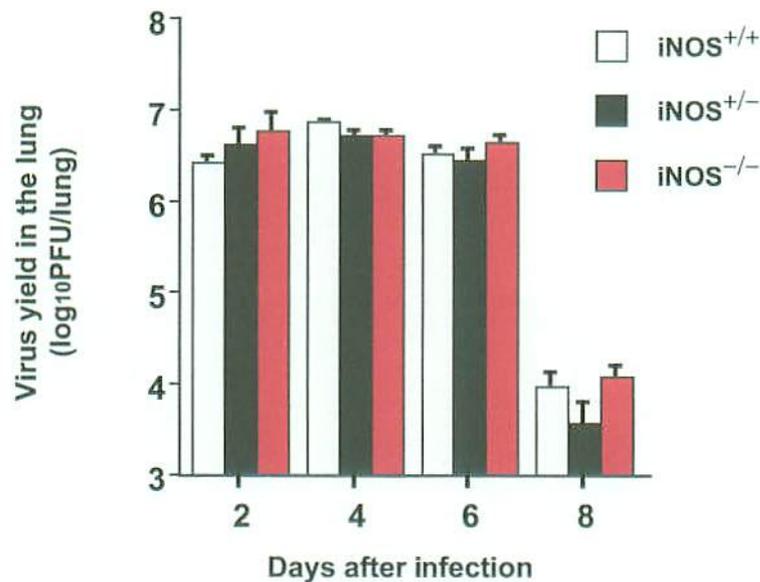


図 3-10 : センダイウイルス感染モデルにおける肺内ウイルス増殖

CV-1細胞を用いたプラークフォーミングアッセイにより、センダイウイルス感染後第2、4、6、および8日後における肺内の感染性ウイルス量を定量した (means ± SE, n = 3)。

3.2.4 病理組織学的変化

インフルエンザウイルス感染モデルと同様、肉眼的および組織学的な肺炎病巣は、感染後 4 日目頃より出現し、感染後 7 日目～8 日目にかけてピークに達する。感染後第 7 日目の肺 H-E 染色像では、野生型マウスは広範な炎症細胞浸潤、肺胞内滲出および肺胞構築の破壊など、急性肺障害に相当する病理学的変化を示していた(図 3-11 左)。インフルエンザウイルス感染と比較した場合、気管支および細気管支上皮の剥離・損傷や、細気管支周囲の単核球浸潤が強い傾向があった。これに対し、有意に高い生存率を示した iNOS 欠損マウス群では、基本的に同様の病理学的変化を示しているものの、その程度は明らかに軽減しており、生存率の改善に矛盾しない結果であった。

3.2.5 免疫組織化学法による肺内 3-ニトロチロシン生成の検討

感染後第7日のマウス肺内の3-ニトロチロシン生成を免疫組織化学法により検討した。野生型マウスにおいて3-ニトロチロシンの免疫染色は主に肺胞腔内に浸潤した炎症細胞や気管支・肺胞上皮細胞および肺胞内滲出液を中心に認められた(図3-11右)。一方、iNOSヘテロ欠損およびホモ欠損マウスにおいては肺内NO産生減少や病理像の軽減と相関して3-ニトロチロシンの染色性が低下していた。

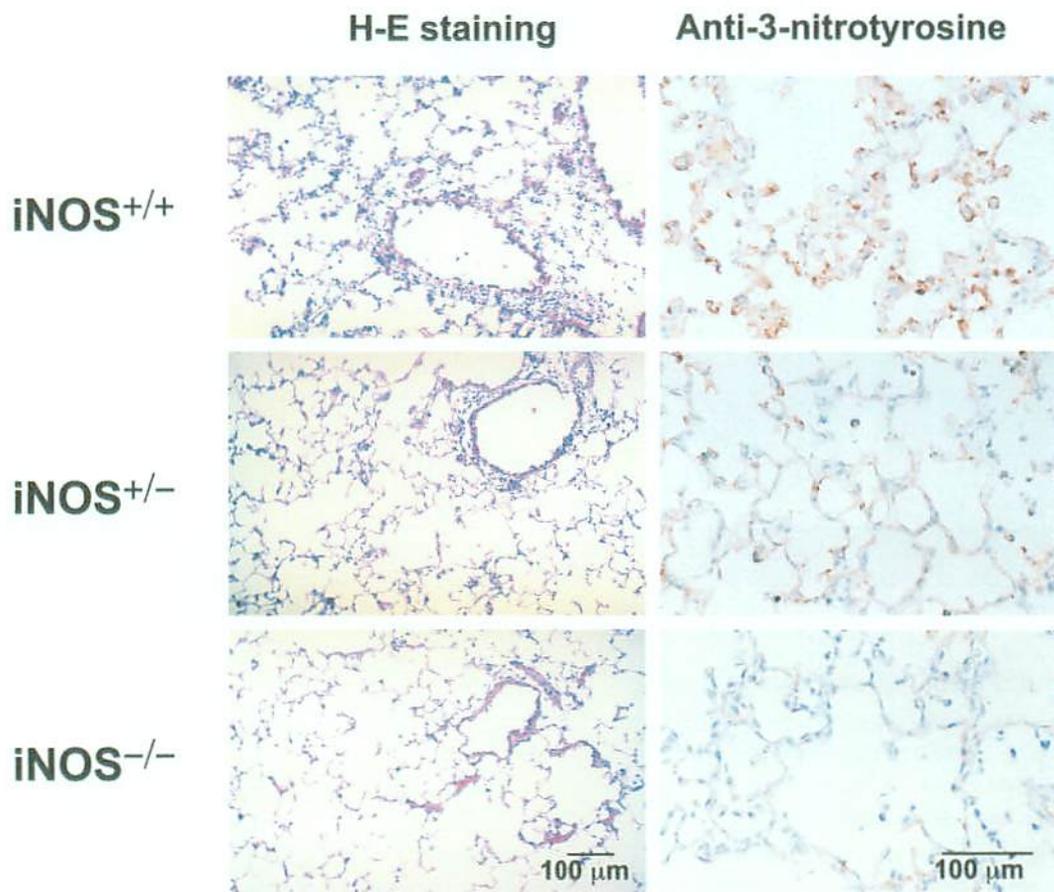


図3-11：センダイウイルス感染モデルにおける肺の病理学的変化および3-ニトロチロシン生成

3.2.6 小 括

iNOS 欠損マウスを用いたセンダイウイルス感染モデルの病態解析では以下のことが示された。

1. ウイルス感染後の肺内 NO 産生亢進は、iNOS 発現に依存する。
2. 肺内におけるウイルス増殖は肺内 NO 産生の多寡に影響されない。
3. ウイルス肺炎病態および致死性は肺内 NO 産生に依存的である。
4. 肺内の NO 産生量に比例した 3-ニトロチロシン生成が認められた。

以上の知見より、センダイウイルス感染モデルにおいても iNOS により産生される NO は、生体内において有効な抗ウイルス作用を発揮することなく、病態増悪因子として作用していることが示唆された。インフルエンザウイルスでの結果を考慮すると、この NO 依存性の病態増悪メカニズムはマウスの呼吸器ウイルス感染病態において普遍的に認められる現象である可能性が示唆された。

3.3 抗 8-ニトログアノシン特異抗体を用いた生体内 8-ニトログアノシン生成の検討

3.3.1 ELISA 法による抗体反応性の検討

直接 ELISA 法 において、ウサギ抗 8-ニトログアノシンポリクローナル抗体およびマウス抗 8-ニトログアノシンモノクローナル抗体の両者ともに 8-ニトログアノシン-BSA をコートした場合のみ抗体濃度依存性の発色が得られ、グアノシン-BSA あるいは BSA でコートした場合は発色強度の有意な上昇は認められなかった。このことから作製した抗体は 8-ニトログアノシンに特異的な構造を認識する抗体であると考えられた(図 3-12A)。

競合 ELISA 法においては 8-ニトログアニン、8-ニトログアノシンおよび 8-ニトログアノシン BSA と競合させた場合に阻害活性が認められたが、グアノシン、8-オキソグアニン、3-ニトロチロシンでは阻害活性は認められなかった。このことから得られた抗体が 8-ニトログアノシンに類似した生体内の構造物質と交差反応を示さないことが確認された(図 3-12B)。

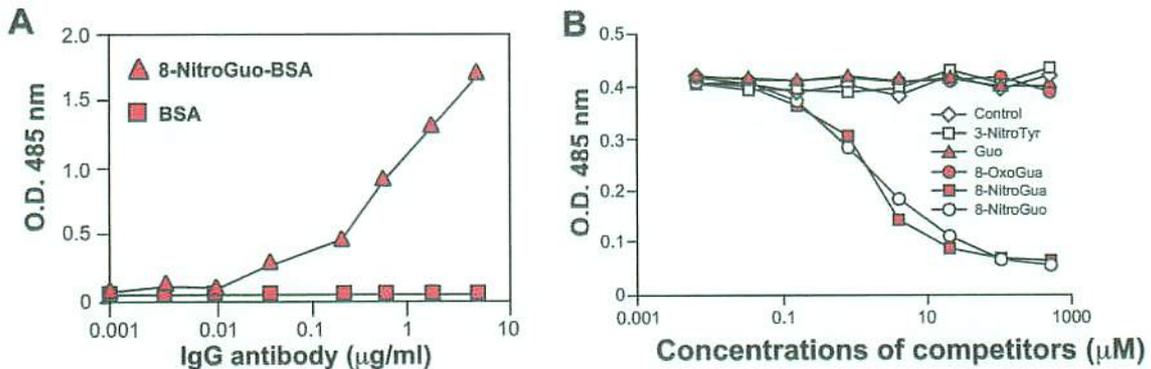


図 3-12 : ELISA法による抗8-ニトログアノシン抗体の特異性検討

- (A) 直接法ELISAによる8-ニトログアノシンに対する特異性の検討。精製した抗体は 8-ニトログアノシン-BSAと効率よく反応するが、BSAそのものとは反応しない。
 (B) 各種類似化合物による阻害性の検討。精製した抗体と8-ニトログアノシン-BSAとの反応は、8-ニトログアニンおよび8-ニトログアノシンのみにより特異的に阻害された。Guo, グアノシン; 8-NitroGuo, 8-ニトログアノシン; 8-NitroGua, 8-ニトログアニン; 8-OxoGua, 8-オキソグアニン; 3-NitroTyr, 3-ニトロチロシン; BSA, ウシ血清アルブミン。

3.3.2 免疫プロット法による RNA 中の 8-ニトログアノシン検出

HPLC を用いたグアノシンニトロ化率の分析において、パーオキシナイトライト処理

により、RNA 中のグアノシンは、デオキシグアノシンや DNA と比較してより効率的にニトロ化されることが明らかとなった(図 3-13)。

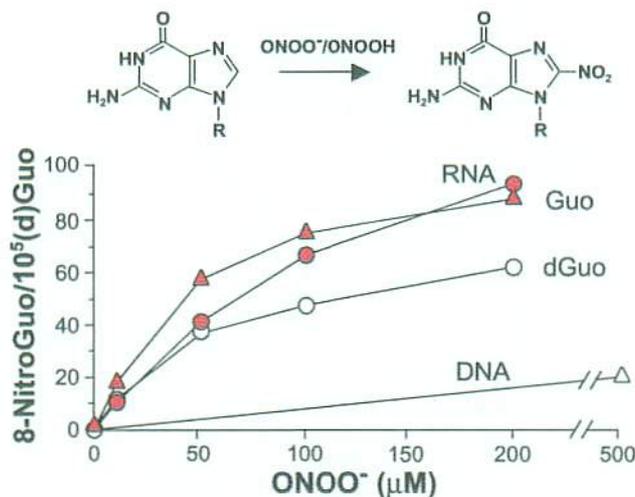


図 3-13 : パーオキシナイトライトによる核酸ニトロ化反応

グアノシン (Guo, 0.1 mg/ml)、デオキシグアノシン (dGuo, 0.1 mg/ml)、DNA (calf thymus, 0.5 mg/ml)、および RNA (yeast tRNA, 0.5 mg/ml) とパーオキシナイトライトを反応させた際のニトロ化を、HPLC-ECD により定量した。RNA 中のグアノシンはグアノシン単独とほぼ同等のニトロ化効率を示した。一方、デオキシグアノシンはグアノシンよりニトロ化効率が悪く、DNA 中ではさらにニトロ化効率が低下した。8-NitroGuo, 8-ニトログアノシン; (d)Guo, デオキシグアノシンもしくはグアノシン。

ウサギ抗 8-ニトログアノシンポリクローナル抗体は、スロットプロット法において、上述のパーオキシナイトライトによりニトロ化処理した RNA の中に存在する 8-ニトログアノシンを非常に効率よく検出した(図 3-14)。

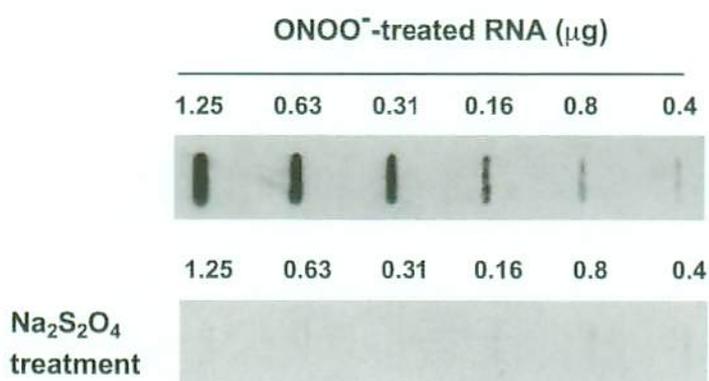


図 3-14 : スロットプロット法による RNA 中の 8-ニトログアノシンの検出

抗 8-ニトログアノシン抗体を用いたスロットプロット法により、パーオキシナイトライト処理した細胞抽出 RNA から、高感度に 8-ニトログアノシンの検出が可能であった。Na₂S₂O₄ による 8-ニトログアノシン還元試験により、反応性は完全に消失した。

この、スロットプロット法により、10 μ g/mlのLPSと100 U/mlのIFN- γ の刺激により iNOS を発現させた RAW 264 細胞より抽出した RNA から有意な 8-ニトログアノシン生成が検出された(図 3-15)。

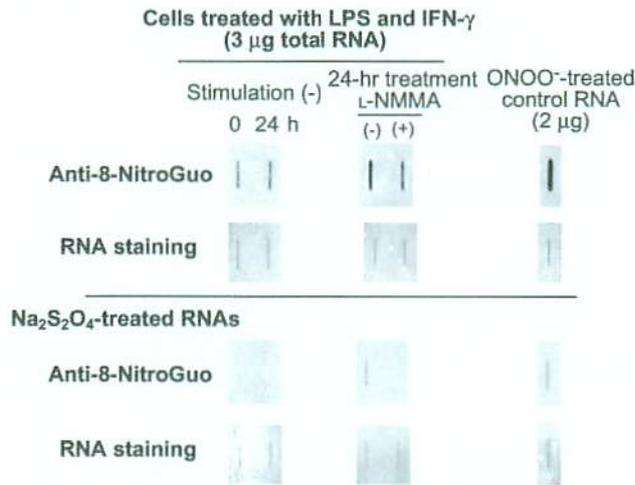


図 3 - 1 5 : 培養細胞中における内因性グアノシンニトロ化反応

LPSおよびIFN- γ で刺激した、あるいは非刺激のRAW264細胞より抽出したtotal RNA中の8-ニトログアノシン生成をスロットプロット法により解析した。RNA染色はエチジウムブロマイドとSybr Green IIにより行った。

Anti-8-NitroGuo, 抗8-ニトログアノシン抗体; L-NMMA, N^m-monomethyl-L-arginine.

3.3.3 免疫細胞化学法による培養細胞中の 8-ニトログアノシン検出

LPS (10 μ g/ml) および IFN- γ (100 U/ml) で刺激、または非刺激で24時間培養した RAW 264 細胞におけるグアノシンニトロ化を抗 8-ニトログアノシンモノクローナル抗体を用いた免疫細胞化学法にて解析した。LPS (10 μ g/ml)およびIFN- γ (100 U/ml)で刺激された RAW 264 細胞に、強い蛍光発色が認められ、非刺激細胞でもごく弱い発色が認められた。細胞内の局在としては両者ともに細胞質に瀰漫性かつ顆粒状に存在し、核内には認められなかった(図 3-16)。

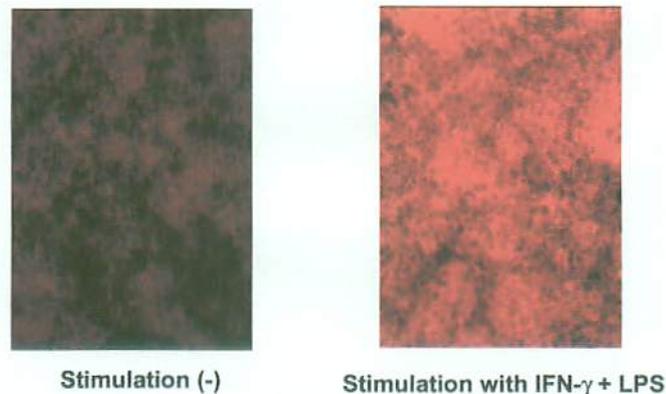


図 3 - 1 6 : 免疫細胞化学によるRAW264細胞内8-ニトログアノシン検出

LPSおよびIFN- γ で刺激、あるいは非刺激にて11時間培養後のRAW264細胞内の8-ニトログアノシン生成を免疫細胞化学により解析した。LPSおよびIFN- γ で刺激したRAW264細胞の細胞質に強い蛍光が認められ、非刺激細胞にも弱い蛍光が確認された。

3.3.4 免疫組織化学による生体組織からの 8-ニトログアノシンの検出

生体内における核酸ニトロ化物生成を解析するため、抗 8-ニトログアノシン抗体を用いた免疫組織化学法により、上述のインフルエンザウイルスおよびセンダイウイルス感染モデルにおける 8-ニトログアノシン生成を検討した。

非感染マウスおよびインフルエンザウイルス感染初期では 8-ニトログアノシンの免疫染色はほとんど見られなかったが、NO 産生亢進の時期と一致するウイルス感染後第 6 日目より、気管支および細気管支上皮に明らかな免疫染色が認められるようになり、第 8 日目には極大に達した。第 10 日目には減弱傾向にあった。マクロファージや好中球などの炎症細胞も軽度の免疫染色が認められた (図 3-17a-e)。また、インフルエンザウイルス感染 iNOS ホモ欠損マウスでは気道上皮における明らかな 8-ニトログアノシン生成は確認できなかった (図 3-17f)。センダイウイルス感染モデルにおいても同様に、野生型マウスで感染後第 8 日目をピークとする 8-ニトログアノシン生成が検出された (図 3-17g)。8 ニトログアノシンの生成プロファイルは肺内の NO 産生や 3-ニトロチロシンの産生プロファイルと関連していた。

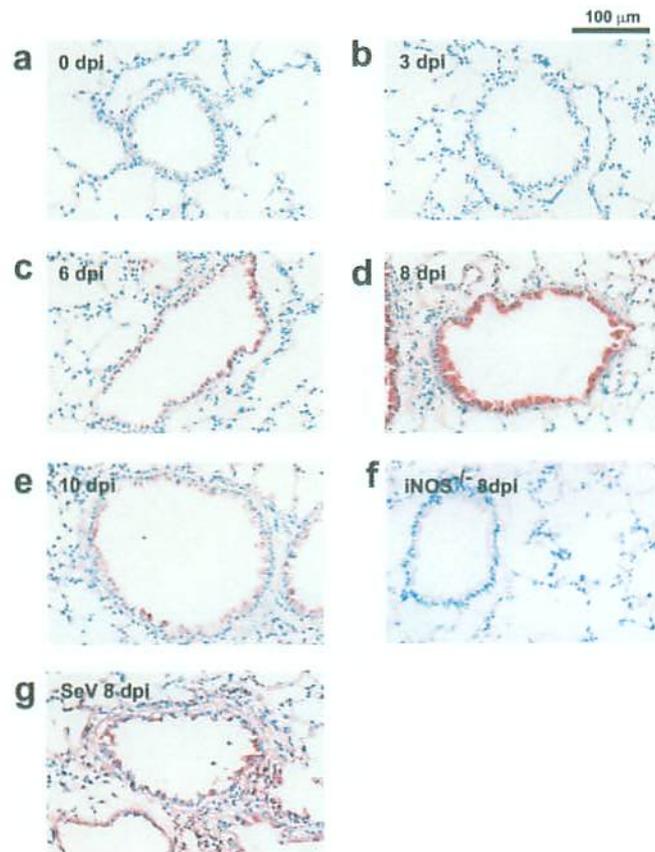


図 3-17 : ウイルス感染モデルにおける 8-ニトログアノシン生成

(a-e) インフルエンザウイルス感染野生型マウス. (f) インフルエンザウイルス感染 iNOS ホモ欠損マウス. (g) センダイウイルス感染野生型マウス.

検出された免疫染色が8-ニトログアノシンに特異的なものであることを確認するため、1 mM の 8-ニトログアノシン合成標品の存在下で吸収試験を行ったところ免疫染色は認められなくなった (図 3-18A)。また、本モデルにおけるもう一つの主要な内因性ニトロ化合物である 3-ニトロチロシン、あるいはグアノシンの誘導体である 8-オキソグアノシンや 8-プロモグアノシンの存在下では、8-ニトログアノシンの免疫染色は阻害されなかった (データ未提示)。さらに、組織切片を抗体反応前に $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ で前処理し 8-ニトログアノシンを 8-アミノグアノシンへ還元させることにより、免疫染色が認められなくなった (図 3-18B)。また、連続切片を用いた免疫組織化学法にて iNOS の発現と比較検討したところ、特に気管支上皮においては iNOS 発現細胞と 8-ニトログアノシン陽性細胞の局在がよく一致していた (図 3-18C)。共焦点レーザー顕微鏡による解析により、細気管支細胞における 8-ニトログアノシンの局在は主として細胞質であることが確認された (図 3-18D)。

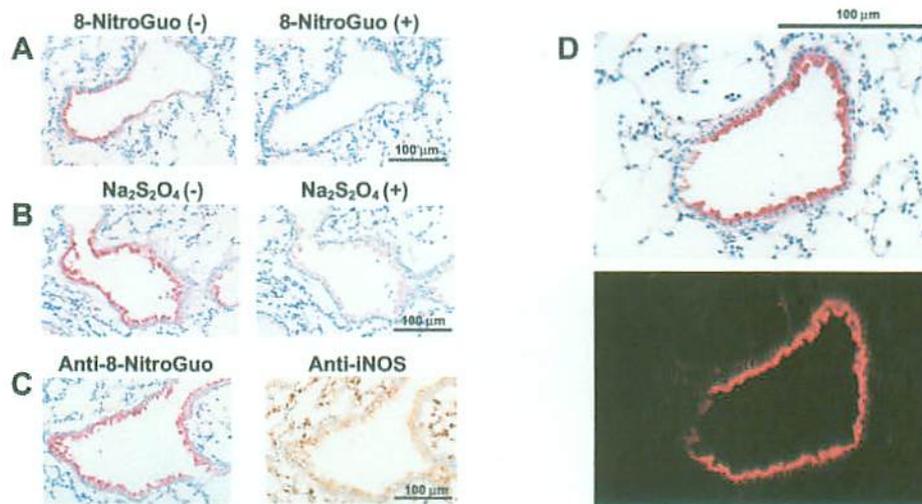


図 3 - 1 8 : 免疫組織化学における反応特異性の検討および8-ニトログアノシンの細胞内局在

インフルエンザウイルス感染モデルにおける8-ニトログアノシンの免疫染色を、連続切片を用いて、(A) 8-ニトログアノシン合成標品による抗体吸収試験、(B) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ による8-ニトログアノシン還元試験により検討した。

さらに、(C) iNOSとの局在性を比較した。また、(D) 共焦点レーザー顕微鏡による観察により8-ニトログアノシンの細胞内局在が主として細胞質であることが確認された。

8-NitroGuo, 8-ニトログアノシン; Anti-8-NitroGuo, 抗8-ニトログアノシン抗体; Anti-iNOS, 抗iNOS抗体。

3.4 8-ニトログアノシンによる P450 レダクターゼおよび iNOS よりのスーパーオキシド生成促進

NADPH-P450 レダクターゼ系に 8-ニトログアノシンを加えることにより DMPO-OOH の ESR シグナルが著しく増強した。この反応は NADPH あるいは P450 レダクターゼのいずれか一方がかけた場合は認められなかった。また 3 者が共存する系にさらに SOD を加えると DMPO-OOH のシグナルは消失した。以上のことから、8-ニトログアノシンは NADPH-P450 レダクターゼ系からのスーパーオキシド生成を著明に促進することが確認された (図 3-19A)。

さらに、iNOS が NADPH および 8-ニトログアノシンの存在下で著明なスーパーオキシド生成をもたらすことが確認された。さらにこのスーパーオキシド生成は iNOS が NO を産生する際の基質である L-アルギニンを添加した場合も有意な抑制を認めなかった。この 8-ニトログアノシンによる iNOS からのスーパーオキシド産生は低濃度 (low μM オーダー) の 8-ニトログアノシンの存在下でも確認され、濃度依存的に増強した (図 3-19B)。

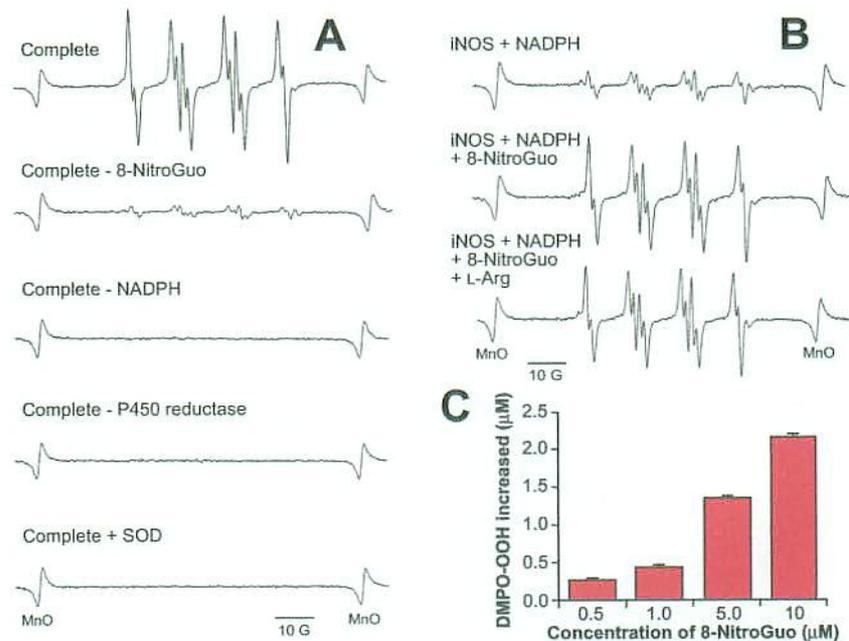


図 3-19 : 8-ニトログアノシンによる P450 レダクターゼ (A) および iNOS (B) からのスーパーオキシド産生促進

- (A) リン酸バッファー (25 mM, pH 7.4) 中に 8-ニトログアノシン (8-NitroGuo, 10 μM)、P450 レダクターゼ (0.2 μM)、NADPH (0.1 mM) および 5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO, 45 mM) を含む完全反応系 (complete) を室温にて 1 分間反応させた。DMPO-OOH アダクトの ESR シグナルは完全反応系でのみ検出された。
- (B) iNOS (0.2 μM) を 8-ニトログアノシン (10 μM)、L-arginine (L-Arg, 1 mM) の存在あるいは非存在下で NADPH (0.1 mM) と反応させ、(A) と同様に ESR で測定した。
- (C) iNOS/NADPH 反応系からの DMPO-OOH アダクト生成は 8-ニトログアノシン依存性に増強した (means \pm SD, $n = 3$)。

3.5 総括

本実験の結果を総括すると、以下のごとくまとめられる。

1. インフルエンザウイルスおよびセンダイウイルスによるマウス気道ウイルス感染モデルにおいて、iNOS の発現を伴った過剰な NO 産生が、病態増悪の要因となることが明らかとなった。
2. マウス肺内におけるインフルエンザウイルスおよびセンダイウイルスの増殖は iNOS 遺伝子欠損による NO 産生抑制の影響を受けなかった。
3. 両ウイルス感染病態において、iNOS 遺伝子欠損による NO 産生抑制は、病理学的変化の軽減、および生存率の改善をもたらした。
4. インフルエンザウイルス感染モデルにおいて、感染肺におけるアポトーシス誘導は iNOS 遺伝子欠損による NO 産生低下にともない抑制された。
5. HPLC-ECD による 3-ニトロチロシン高感度検出系を用いて、生体内のニトロ化反応のバイオマーカーである 3-ニトロチロシンの定量的評価法を確立した。この方法により、インフルエンザウイルス感染野生型マウス気管支肺胞洗浄液蛋白中の、NO 依存性 3-ニトロチロシン生成が確認された。
6. 抗 8-ニトログアノシン特異抗体の開発に成功した。
7. 抗 8-ニトログアノシン抗体による免疫組織化学によりインフルエンザウイルス感染モデルおよびセンダイウイルス感染モデルにおいて、肺内 NO 産生動態と一致した 8-ニトログアノシンの生成が検出され、生体内において核酸塩基のニトロ化反応が起こることがはじめて確認された。
8. 8-ニトログアノシンのユニークな生化学的特性として、NADPH 存在下での P450 レダクターゼおよび iNOS からのスーパーオキシド産生を著明に促進することが明らかになった。このことは、8-ニトログアノシンが単なるニトロ化のバイオマーカーではなく、病態発現の一端を担う病態生理活性因子であることを示唆している。

以上の知見より、マウスの気道ウイルス感染病態において、iNOSによるNO過剰産生が有効な抗ウイルス作用を発揮せず、生体分子のニトロ化反応を介して病態増悪因子として作用することが示唆された。さらに重要な知見として、今回初めてNOによる8-ニトログアノシン生成を介する病態発現、すなわち、ニトロ化ストレスの存在が明らかとなった。

第4章 考察

4.1 総論

本研究ではマウスの呼吸器ウイルス感染病態において、宿主応答のひとつとして誘導されるNO産生による病態発現と、生体分子のニトロ化反応について、野生型マウスとiNOS遺伝子欠損マウスとの比較実験により解析した。とくに、NO由来の活性酸化窒素種によるニトロ化反応による8-ニトログアノシンの生成を、抗8-ニトログアノシン特異抗体を用いてはじめて証明し、その病態生理学的意義について検討した。

経鼻噴霧感染によって作成したマウスのインフルエンザウイルスおよびセンダイウイルス感染モデルにおいて、肺内ウイルス増殖の経過を解析した。致死性肺炎モデルにおいて、肺内でのウイルス増殖のピークはインフルエンザウイルス感染モデルにおいては感染後第4日、センダイウイルス感染モデルにおいては感染後第6日であった。肺炎病態が増悪し、マウスが死亡し始める感染後第7日以降においては、両モデルともに肺内ウイルス量は減少する経過をとった。このことからウイルス肺炎病態の増悪の経過と、感染局所におけるウイルス増殖の経過は相関せず、感染肺における細胞・組織障害が、ウイルス感染そのものによる細胞変性効果だけに依存するによるものではないことが示唆された。

また、肺内でのウイルス増殖は、NO産生が約1/4に低下していたiNOSヘテロ欠損マウス、NO産生が認められなかったiNOSホモ欠損マウスにおいても野生型マウスと同様の経過をとり、有意差は認められなかった。このことはNOが生体内において有意な抗ウイルス活性を発揮していないことを示している。

両モデルにおけるウイルス感染肺の病理組織学的変化の程度は、iNOS遺伝子欠損による肺内NO産生低下に依存して軽減していた。同様に、マウスの生存率もiNOS欠損マウス群において有意差をもって高かった。肺内ウイルス増殖がNOに影響されないことを考慮すると、両ウイルス感染モデルの肺炎病態は、ウイルス感染が契機となって発症したNO依存性の急性肺障害がその本態であると考えられた。したがって、肺内でiNOSにより過剰に産生されるNOはウイルス感染病態の増悪因子として作用していると考えられる。インフルエンザウイルス感染モデルにおいて、NOS阻害剤であるL-NMMA投与によってもほぼ同様の生存率改善効果が報告されていることから(Akaike et al. 1996)、これらの効果がiNOSによるNO合成そのものに関連したものであり、iNOS遺伝子欠損に伴った宿主の二次的な変化に伴うものではないといえる。

感染症以外にもNOに依存した病態発現機構が報告されているが、NO分子自体はラジカルとしては比較的安定で、強力な細胞傷害作用は発揮しないと考えられている。最近では、NOが酸素ラジカルなどと反応して生成する活性酸化窒素種がNO依存性の組織

障害において中心的役割を果たすと理解されている (Beckman and Koppenol, 1996; Rubbo et al., 1996; Esteves et al.: 1999)。その中でも NO と酸素ラジカル直接反応して生成するパーオキシナイトライトは非常に強い酸化およびニトロ化作用を持ち、蛋白、核酸および脂質を酸化あるいはニトロ化することにより組織障害に関与するとされる。パーオキシナイトライトなどの活性酸化窒素種生成のバイオマーカーとしては、蛋白のチロシン残基のニトロ化反応がこれまで広く用いられてきた。インフルエンザウイルス・センダイウイルス感染モデルにおいて免疫組織化学により野生型マウスの肺内に 3-ニトロチロシンの免疫染色が検出され、インフルエンザウイルス感染モデルでは HPLC-ECD により生化学的および定量的に肺胞洗浄液中の 3-ニトロチロシン生成が証明された。これらは iNOS 欠損により抑制されたことから、NO 産生が高まる感染局所においてパーオキシナイトライトなどの活性酸化窒素種の生成が高まっていることが示唆される。

この様な活性酸化窒素種のバイオマーカーである 3-ニトロチロシン生成に加えて、生体を構成するもうひとつの主要な分子である核酸もニトロ化反応の標的分子となることが示唆されている。たとえば、細胞より抽出した核酸にパーオキシナイトライト処理したり、NO、O₂⁻の同時産生系である SIN-1 の存在下で培養した細胞の DNA に存在するグアニン塩基は、酸化反応よりもむしろニトロ化反応を起こし、8-ニトログアニンが生成することが報告されている (Yelmlilov et al., 1995; Spencer et al., 1996)。しかし、生体組織中の核酸が、内因性の活性酸化窒素種によりニトロ化されることを証明した報告はこれまでみられていない。そこで本研究では、新たに抗 8-ニトログアノシン特異抗体を作製し、インフルエンザウイルス・センダイウイルス感染モデルにおける 8-ニトログアノシン生成を解析した。その結果、マウスの気管支、細気管支上皮に強い免疫染色が認められ、実際に、生体内において 8-ニトログアノシンが生成することが確認された。このような核酸のニトロ化反応により、遺伝子変異が誘発されたり細胞機能障害が引き起こされ、NO 依存性の病態発現機構の主たる要因となりうることが示唆される。

さらに、グアノシンニトロ化反応について、細胞培養系を用いて検討した。本研究で開発した抗 8-ニトログアノシン特異抗体は、CV-1 細胞より抽出後にパーオキシナイトライトと反応させた total RNA 中に存在する 8-ニトログアノシンをスロットブロット法にて非常に高感度に検出可能であった。マウスマクロファージ由来の細胞系である RAW 264 細胞を、iNOS を誘導することで知られる IFN- γ および LPS で刺激あるいは非刺激下で培養し、それらより抽出した RNA を同様にスロットブロット法で検討した結果、IFN- γ および LPS で刺激後の細胞より非常に高度の 8-ニトログアノシンが検出され、さらに非刺激状態においても低いレベルの 8-ニトログアノシン生成が認められた。このことから、8-ニトログアノシン生成が NO 産生に依存して増強すること、ならびに生理的な条件下においても恒常的なグアノシンのニトロ化反応が起こっていることが示唆された。

また、8-ニトログアノシンがその化学的構造上ニトロアレンに分類され、ニトロアレンの中には特定のレダクターゼの存在下でレドックス活性をもつことから (Mason et al., 1982)、同様の活性をもつか否か検討した。その結果 NADPH-P450 レダクターゼ系からのスーパーオキシド産生を 8-ニトログアノシンが増強させることを明らかにした。さらに興味深いことに、iNOS が NADPH と 8-ニトログアノシンの存在下においてスーパーオキシドを産生することも見出した。この反応は iNOS の NO 産生の基質である L-アルギニンの影響を受けず、低 μM レベルの 8-ニトログアノシン濃度においても認められた。

このことは 8-ニトログアノシンが P450 レダクターゼ系で触媒されるレドックスサイクルと同様のメカニズムで iNOS のエレクトロンアンカップリングを促進してスーパーオキシドを生成させていることを示している (図 4-1)。従って、8-ニトログアノシンは単なる活性酸化窒素種のバイオマーカーではなく、生体内のニトロ化ストレスやレドックス制御に密接に関わる機能分子であり、NO 誘発性の組織障害や細胞機能障害に関与している可能性が示唆された。

4.2 NO とウイルス増殖

iNOS より産生される NO は、その発見当初より感染防御因子としての役割が注目されてきた、とくに細菌、原虫、寄生虫などの病原体に対して、NO が感染防御能を持つことが示されている (Nathan, 1997)。NO の抗ウイルス活性も様々なウイルスについて解析されている。1993 年 Karupiah らはマウスポックスウイルス、ワクシニアウイルス、単純ヘルペスウイルス (HSV)-1 型の培養細胞内での複製が、NO によって抑制されることをはじめて報告した (Karupiah et al., 1993)。その後いくつかのウイルスについて NO がウイルス複製に及ぼす影響についての報告みられているが、その結果はウイルス種や *in vitro*、*in vivo* といった感染系の違い、さらには感染臓器などにより異なっており、現在も一定の見解が得られていない (Akaike and Maeda, 2000; Akaike, 2001)。*in vitro* における NO によるウイルス複製の阻害については、マウスポックスウイルス、ワクシニアウイルス、単純ヘルペスウイルス、EB ウイルス、マウス肝炎ウイルス、コクサッキーウイルス、日本脳炎ウイルスなどが報告されている (Karupiah et al., 1993; Croen, 1993; Mannick et al., 1994; Lane et al., 1997; Lin et al., 1997; Gao et al., 1999; Saura et al. 1999)。

しかし、*in vivo* の感染系における NO の抗ウイルス活性については、コクサッキー B3 ウイルス心筋症モデル、マウスサイトメガロウイルスなど限られたモデルで報告されてい

るのみである (Lowenstein et al., 1996; Noda et al., 2001)。

その一方で、ウイルス増殖が NO 産生に依存しないという報告も多い。例えば、インフルエンザウイルス、センダイウイルス、フラビウイルス、ワクシニアウイルス、シンドビスウイルス、およびハンタウイルスでは、ウイルス増殖は生体内における NO 産生に影響されないことが報告されている (Akaike et al. 1996, 2000; Kreil and Eibl, 1996; van Den Broek et al., 2000; Davis et al. 2002)。

本実験では、iNOS 遺伝子の欠損により明らかな NO 産生動態の違いが認められたにもかかわらず、インフルエンザウイルスおよびセンダイウイルスの両感染モデルにおいて、感染後のウイルス増殖プロファイルに有意な変化を認めなかった。これは、NO が生体内でインフルエンザウイルスおよびセンダイウイルスに対して有効な抗ウイルス効果を発揮していないことを示している。感染防御システムでは、細胞傷害性 T 細胞や中和抗体によるウイルスクリアランス機能も存在しており、実際のウイルスクリアランスは NO 以外の免疫応答を介して行われるものと思われる。

4.3 NO による病態発現機構における活性酸化窒素種の役割

多くのウイルス感染症において宿主応答のひとつとして感染局所での NO 産生亢進が認められる (Akaike and Maeda, 2000; Akaike, 2001)。この NO 産生がウイルス増殖に与える影響については前項で考察したが、いくつかの感染病態および感染モデルにおいては NO 依存性にウイルス感染病態の増悪が認められる。たとえば、HSV ウイルス肺炎モデルにおいては NOS 阻害剤投与により一過性にウイルス増殖が亢進するのにも関わらず、肺炎自体の経過は改善することが報告されている (Adler et al., 1997)。また、同じ HSV-1 を用いたラット脳炎モデルにおいては NOS 阻害剤投与によりウイルス増殖は影響されず、病態が改善している (Fujii et al. 1999)。さらに、この様な NO 依存性の病態増悪は、今回のインフルエンザウイルスやセンダイウイルス肺炎モデルに加えて、EMCV による心筋炎および糖尿病モデル、フラビウイルス (Murray Valley encephalitis virus, TBE-V) による脳炎モデルあるいは HIV-1 による脳症において認められている (Akaike et al., 1996, 2000; Kreil and Eibl, 1996; Karupiah et al., 1998; Fujii et al., 1999; Nishino et al., 1999; Hirasawa et al., 1999; Andrews et al., 1999)。

一方、NO 産生に依存した病態発現機構はウイルス感染症のみならず、各種炎症性疾患、神経変性疾患、心血管系疾患あるいは腫瘍性疾患など多くの疾患において報告されている。しかし NO ラジカル自体は酸素ラジカルや脂質ラジカルと比較してもその化学反応性は強くなく、最近では、NO による細胞傷害は NO 分子そのものではなく、NO が酸素ラジ

カルなどと反応することにより生成する、より毒性の高い活性酸化窒素種によるものと理解されている。

生体内で生成する活性酸化窒素種の中でも細胞傷害分子として最も重要視されている分子は NO とスーパーオキシド (O_2^-) が反応して生成するパーオキシナイトライトである。NO と O_2^- よりパーオキシナイトライトを生成する反応の2次反応速度定数は $6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と非常に速いため、生体内でほぼ拡散律速で生成されうる。(Beckman and Koppenol, 1996; Rubbo, 1996) さらに、この反応速度はスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) が O_2^- を H_2O_2 へと変換する反応よりも速い。従って、生体内で NO と O_2^- が同時に生成される場においてパーオキシナイトライトが比較的効率よく産生される。実際、インフルエンザウイルス感染病態においては肺内 NO 産生が高まる時期と一致して、肺内のキサンチンオキシダーゼ活性が著明に高まり、局所で酸素ラジカルが生成されることが確認されており (Oda et al., 1989; Akaike et al., 1990)、パーオキシナイトライトが生成されやすい環境になっていると考えられる。

パーオキシナイトライトは NO と O_2^- と異なり、ラジカル分子ではないが、非常に強い化学反応性により、生体分子に対する酸化作用のみならず、蛋白のチロシン残基や核酸のグアニン塩基などに対し強いニトロ化作用を持つ。特に CO_2 が存在する条件では $ONOOCO_2^-$ アダクト形成により、よりニトロ化反応が促進される (Lyman and Hurst, 1998)。この生体内ニトロ化反応は当初パーオキシナイトライトに特異的な反応とされていたが、近年、別の反応経路として NO_2^- と H_2O_2 の存在下で好中球ミエロペルオキシダーゼ (MPO) などのペルオキシダーゼの触媒により生成する経路も報告されている (Eiserich et al. 1997)。しかし、いずれの経路も活性酸化窒素種の生成を介していることから、3-ニトロチロシンを活性酸化窒素種生成のバイオマーカーとみなすことができる。生体内 3-ニトロチロシン生成の検出には抗 3-ニトロチロシン抗体を用いた免疫(組織)化学が最も広く用いられ、これまで、炎症、神経変性疾患、心血管疾患および腫瘍など様々の疾患および疾患モデルにおける 3-ニトロチロシンの生成が報告されている。本研究においても、抗 3-ニトロチロシン抗体を用いた免疫組織化学により、インフルエンザウイルスおよびセンダイウイルス感染モデルにおいて、肺内 NO 産生に相関した肺内 3-ニトロチロシン生成が確認された。これまでの研究により、マウスインフルエンザウイルス肺炎においては、肺内 NO 産生が高まるのと並行して、感染局所でキサンチンオキシダーゼの活性が高まり、スーパーオキシドが産生されることがわかっている。またウイルス肺炎においては好中球よりむしろ単核球の浸潤が主体であり、ミエロペルオキシダーゼの関与は少ないと考えられることから、ウイルス感染肺におけるニトロ化反応はパーオキシナイトライト生成を介する経路が主体であるものと考えられる。

さらに、蛋白中のチロシン残基はリン酸化を介したシグナル伝達の中心的分子であるこ

となどから、3-ニトロチロシン生成は単純なバイオマーカーとして存在するだけでなく、チロシンニトロ化反応を介した直接的な細胞傷害メカニズムの存在が示唆されるようになった。たとえば、Eiserich らはチューブリン蛋白のニトロ化により、微小管構造が変化し、細胞の形態および機能を変化させることを報告している(Eiserich et al., 1999)。このような比較的選択的なチロシン残基のニトロ化反応が報告されているものの、チロシンニトロ化が直接、細胞毒性に関与することを証明した報告はなく、また、本研究でも用いた HPLC-ECD などの高感度な測定系で計測されるチロシンのニトロ化率がかなり低いという事実より、チロシンニトロ化反応を介した特異的な病態発現機構の存在を疑問視する見解も多い。

その一方で、活性酸素種による生体内ニトロ化反応のもうひとつの標的分子として核酸のグアニン塩基がある。活性酸素種による核酸傷害にはニトロ化反応のほかにも、酸化反応による塩基鎖の断裂やグアニン塩基の酸化によるオキソグアニンの生成なども報告されている。1995 年 Yermilov らは、パーオキシナイトライトを反応させた細胞抽出 DNA 中や、NO と O_2^- の同時産生試薬とされる SIN-1 の存在下で培養した細胞の DNA 中にニトログアニンが生成していることを報告した。しかし、DNA 中のニトログアニンは脱プリンを受け、核酸中から速やかに消失することも明らかとなり。その生理学的意義は不明のままである(Yermilov et al., 1995)。これに対し、RNA中の 8-ニトログアノシンは比較的安定であることが知られている (Masuda, 2002)。

そこで、本研究では生体内における 8-ニトログアノシンの検出を目的として、抗 8-ニトログアノシン特異抗体を作製した。作製した抗体は競合 ELISA 法により、8-ニトログアノシンと 8-ニトログアニンのみと結合し、他の核酸および核酸塩基とは交差反応性を示さなかった。この抗体はパーオキシナイトライト処理によりニトロ化されたグアノシンや iNOS を発現させた RAW 264 細胞より抽出した RNA 中に存在する 8-ニトログアノシンを非常に高感度に検出した。特記すべき点として、iNOS 誘導刺激を行っていない RAW 264 細胞より抽出した RNA においても低レベルの反応が認められた。このことから、8-ニトログアノシン生成が NO 産生に依存して増強すること、ならびに生理的な条件下においても恒常的なグアノシンのニトロ化反応が起こっていることが示唆された。

さらに本研究ではインフルエンザウイルスおよびセンダイウイルス肺炎モデルの感染肺組織中の 8-ニトログアニンまたは 8-ニトログアノシンの生成が検出された。共焦点レーザー顕微鏡による解析により、この免疫染色の局在は主として細胞質であることが確認された。このことと、DNA におけるグアニンニトロ化が脱プリン反応に伴い短時間で消失するという事実から、検出された免疫染色は主として RNA もしくはヌクレオチドプール中の 8-ニトログアノシンであると考えられた。また、抗体の反応特異性についても各種グアノシン誘導體や 3-ニトロチロシンを用いた吸収試験での結果、および 8-ニトログア

ノシンの 8-アミノグアノシンへ還元反応後の染色性消失により確認された。これまでに生体組織におけるグアノシンニトロ化反応を直接的に検出した報告はなく、本報告が生体組織におけるグアノシンニトロ化反応を免疫組織化学により検出したはじめての報告である。

また、ウイルス感染肺内の 8-ニトログアノシン免疫染色は気管支および細気管支上皮において特に強く、iNOS 発現との比較検討により、iNOS 発現細胞と 8-ニトログアノシン陽性細胞の局在がよく一致していた。さらに、8-ニトログアノシンの生成プロファイルは肺内の NO 産生や 3-ニトロチロシンの産生プロファイルと相関していた。また、iNOS 欠損マウスでは気道上皮における明らかな 8-ニトログアノシン生成は確認できなかった。このことから生体内において NO 依存的に核酸のニトロ化反応がもたらされることが明らかとなった。

最も特筆すべき点は、インフルエンザウイルスおよびセンダイウイルスを含む呼吸器ウイルスが最初に感染する場所である気管支および細気管支上皮において、8-ニトログアノシン生成が特に強く認められた点である。我々の研究室ではウイルス感染において過剰に産生された NO が RNA ウイルスの変異を加速させることを見出した (Akaike et al., 2000)。すなわち、GFP 遺伝子を挿入したリコンビナントセンダイウイルスを iNOS 欠損マウスおよび野生型マウス肺に感染させることにより、NO 産生依存してセンダイウイルスの変異が有意に高まることを報告した。センダイウイルスは主に気道上皮細胞で増殖するため、グアノシンニトロ化反応がこの NO 依存性のウイルス変異に関与している可能性がある。さらに我々の研究室では、培養細胞を用いた GFP センダイウイルス感染系において、培養液中に 8-ニトログアノシンを外部から添加することにより、ウイルスの変異率が有意に高まることを確認している (未公表データ)。

これまで、様々な細胞で認められる NO 依存性のアポトーシス誘導は NO 産生に由来する DNA 損傷を契機とした p53 誘導や poly(ADP-ribose)polymerase 活性化を介すると考えられていたが、近年、森らのグループは NO 依存性のアポトーシス誘導が p53 非依存性の細胞伝達による小胞体ストレスによって媒介されることを明らかにしている (Oyadomari et al., 2001)。彼らは少なくとも細胞内のオキソグアニン生成による DNA 損傷はマクロファージ、膵β細胞における NO 依存性アポトーシスの原因ではないと報告している。すなわちこの知見もまた、NO 依存的な細胞毒性における活性酸化窒素種生成によるグアノシンニトロ化反応の重要性を示唆するものである。

さらに、本研究では、8-ニトログアノシンのユニークな生化学的特性として、NADPH-P450 レダクターゼ系からのスーパーオキシド産生を 8-ニトログアノシンが増強させることが明らかになった。興味深いことに、iNOS が NADPH と 8-ニトログアノシンの存在下においてスーパーオキシドを産生することも見出した。この反応は

iNOS の NO 産生の基質である L-アルギニンによって影響を受けず、低 μM レベルの 8-ニトログアノシン濃度においても認められた。このことは 8-ニトログアノシンが P450 レダクターゼ系におけるレドックスサイクルと同様のメカニズムで iNOS のエレクトロンアンカップリングを促進してスーパーオキシドを生成させていることを示している。この反応が iNOS が NO を産生する際の基質である L-アルギニンによって阻害されなかったことから、iNOS から NO が同時産生される条件では、8-ニトログアノシンより生成されたスーパーオキシドと NO が反応し、パーオキシナイトライトを生成するというサイクルの存在も考えられる(図 4-1)。このことは、8-ニトログアノシンが単なる生体内のバイオマーカーではなく、酸化・ニトロ化ストレスやレドックス制御・病態に密接に関わる機能分子であることを示唆している。

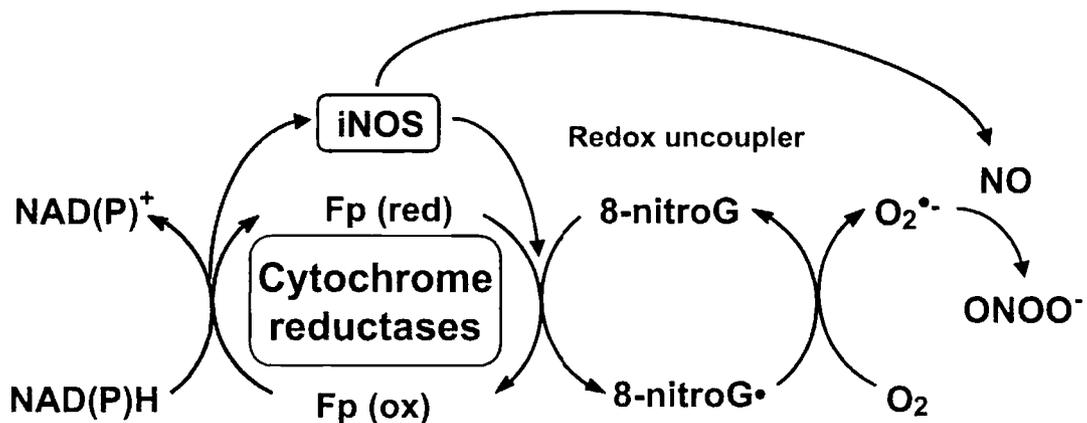


図 4 - 1 : 8-ニトログアノシンによるチトクロームP450レダクターゼおよびiNOSからのスーパーオキシド産生刺激機構 (仮説)

P450レダクターゼおよびiNOSはNADPH存在下で、8-ニトログアノシンの1電子還元により8-ニトログアノシンラジカルを生じ、これが分子状酸素をスーパーオキシドに還元させると考えられる。

さらに、iNOSが産生するNOとスーパーオキシドの反応によりパーオキシナイトライトを生成することが示唆される。

以上の知見から、8-ニトログアノシンが呼吸器ウイルス感染病態における NO 依存性の肺障害のメディエーターとして、重要な役割を演じている可能性が示唆された。今後、その他の疾患病態における生体内ニトロ化ストレスの分子病態の解明が望まれる。

第5章 結語

本研究では、iNOS 遺伝子欠損マウスを用いた解析により、インフルエンザウイルスおよびセンダイウイルス感染病態において、iNOS発現誘導に伴い肺内で過剰産生されるNOが、生体内で有効な抗ウイルス活性を発揮することなく、パーオキシナイトライトなどの活性酸化窒素種の生成を介して組織傷害因子として宿主に対して有害作用を及ぼすことが確認された。

我々が新規開発した抗8-ニトログアノシン特異抗体は、*in vitro*の実験系において抗8-ニトログアノシンを特異的かつ効率的に検出した。この抗体により、インフルエンザウイルス・センダイウイルス感染モデルにおいて、NO 産生に依存した8-ニトログアノシン生成が、マウスの気管支、細気管支上皮に強く検出され、実際、生体内においてグアノシンのニトロ化反応が起こっていることがはじめて確認された。このことから、核酸のニトロ化反応が、アポトーシス誘導など活性酸化窒素種依存性の細胞傷害作用や、ウイルス遺伝子変異に関与する可能性が示唆された。さらに、8-ニトログアノシンが NADPH 存在下でP450あるいはiNOSからのスーパーオキシド産生を強く刺激するというユニークな生化学的特性も明らかになった。

これらの知見は、生体内における核酸ニトロ化反応が、NOの病態生理活性の発現において重要な役割を果たしている可能性を示唆するものである。今後、様々な疾患・病態における、8-ニトログアノシン生成を介した病態発現、すなわち、ニトロ化ストレスの分子メカニズムの解明の進展が期待される。

参考文献

Adamson DC, Kopnisky KL, Dawson TM, Dawson VL. (1999). Mechanisms and structural determinants of HIV-1 coat protein, gp41-induced neurotoxicity. *J Neurosci*, 19, 64-71.

Adler H, Frech B, Thony M, Pfister H, Peterhans E, Jungi TW. (1995). Inducible nitric oxide synthase in cattle. Differential cytokine regulation of nitric oxide synthase in bovine and murine macrophages. *J Immunol*, 154, 4710-4718.

Adler H, Beland JL, Del-Pan NC, Kobzik L, Brewer JP, Martin TR, Rimm IJ. (1997). Suppression of herpes simplex virus type 1 (HSV-1)-induced pneumonia in mice by inhibition of inducible nitric oxide synthase (iNOS, NOS2). *J Exp Med*, 185, 1533-1540.

Akaike T, Ando M, Oda T, Doi T, Ijiri S, Araki S, Maeda H. (1990). Dependence on O_2^- generation by xanthine oxidase of pathogenesis of influenza virus infection in mice. *J Clin Invest*, 85, 739-745.

Akaike T, Noguchi Y, Ijiri S, Setoguchi K, Suga M, Zheng YM, Dietzschold B, Maeda H. (1996). Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 2448-2453.

Akaike T, Maeda H. (2000). Nitric oxide and virus infection. *Immunology*, 101, 300-308.

Akaike T, Fujii S, Kato A, Yoshitake J, Miyamoto Y, Sawa T, Okamoto S, Suga M, Asakawa M, Nagai Y, Maeda H. (2000). Viral mutation accelerated by nitric oxide production during infection in vivo. *FASEB J*, 14, 1447-1454.

Akaike T. (2000). Mechanisms of biological S-nitrosation and its measurement. *Free Radic Res*, 33, 461-469.

Akaike T. (2001). Role of free radicals in viral pathogenesis and mutation. *Rev Med Virol*, 11, 87-101.

Alam MS, Akaike T, Okamoto S, Kubota T, Yoshitake J, Sawa T, Miyamoto Y, Tamura F, Maeda H. (2002). Role of nitric oxide in host defense in murine salmonellosis as a function of its antibacterial and antiapoptotic activities. *Infect Immun*, 70, 3130-3142.

Andrews DM, Matthews VB, Sammels LM, Carrello AC, McMinn PC. (1999). The severity of murray valley encephalitis in mice is linked to neutrophil infiltration and inducible nitric oxide synthase activity in the central nervous system. *J Virol*, 73, 8781-8790.

Balligand JL, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, Pimental D, Malinski TA, Kapturczak M, Taha Z, Lowenstein CJ, Davidoff AJ, Kelly RA, et al. (1994). Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. *J Biol Chem*, 269, 27580-27588.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 1620-1624.

Beckman JS, Koppenol WH. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*, 271, C1424-C1437.

Bukrinsky MI, Nottet HS, Schmidtmayerova H, Dubrovsky L, Flanagan CR, Mullins ME, Lipton SA, Gendelman HE. (1995). Regulation of nitric oxide synthase activity in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected monocytes: implications for HIV-associated neurological disease. *J Exp Med*, 181, 735-745.

Byun J, Henderson JP, Mueller DM, Heinecke JW. (1999). 8-Nitro-2'-deoxyguanosine, a specific marker of oxidation by reactive nitrogen species, is

generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-nitrite system of activated human phagocytes. *Biochemistry*. 38, 2590-2600.

Cassina AM, Hodara R, Souza JM, Thomson L, Castro L, Ischiropoulos H, Freeman BA, Radi R. (2000). Cytochrome c nitration by peroxynitrite. *J Biol Chem*, 275, 21409-21415.

Choi DW. (1993) Nitric oxide: foe or friend to the injured brain? *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 9741-9743.

Croen KD. (1993). Evidence for antiviral effect of nitric oxide. Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication. *J Clin Invest*, 91, 2446-2452.

Cunha FQ, Moncada S, Liew FY. (1992). Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 182, 1155-1159.

Davis IC, Zajac AJ, Nolte KB, Botten J, Hjelle B, Matalon S. (2002). Elevated generation of reactive oxygen/nitrogen species in hantavirus cardiopulmonary syndrome. *J Virol*, 76, 8347-8359.

De Martino C, Zamboni L. (1967). Silver methenamine stain for electron microscopy. *J Ultrastruct Res*, 19, 273-282.

Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A. (1998). Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature*, 391, 393-397.

Eiserich JP, Estevez AG, Bamberg TV, Ye YZ, Chumley PH, Beckman JS, Freeman BA. (1999). Microtubule dysfunction by posttranslational nitrotyrosination of alpha-tubulin: a nitric oxide-dependent mechanism of cellular injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 6365-6370.

Fujii S, Akaike T, Maeda H. (1999). Role of nitric oxide in pathogenesis of herpes simplex virus encephalitis in rats. *Virology*, 256, 203-212.

Fujisawa H, Ogura T, Hokari A, Weisz A, Yamashita J, Esumi H. (1995). Inducible nitric oxide synthase in a human glioblastoma cell line. *J Neurochem*, 64, 85-91.

Furchgott RF, Vanhoutte PM. (1989). Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J*, 3, 2007-2018.

Gao X, Tajima M, Sairenji T. (1999). Nitric oxide down-regulates Epstein-Barr virus reactivation in epithelial cell lines. *Virology*, 258, 375-381.

Granger DL, Hibbs JB Jr, Perfect JR, Durack DT. (1988). Specific amino acid (L-arginine) requirement for the microbistatic activity of murine macrophages. *J Clin Invest*, 81, 1129-1136.

Gross SS, Levi R. (1992). Tetrahydrobiopterin synthesis. An absolute requirement for cytokine-induced nitric oxide generation by vascular smooth muscle. *J Biol Chem*, 267, 25722-25729.

Hori K, Burd PR, Furuke K, Kutza J, Weih KA, Clouse KA. (1999). Human immunodeficiency virus-1-infected macrophages induce inducible nitric oxide synthase and nitric oxide (NO) production in astrocytes: astrocytic NO as a possible mediator of neural damage in acquired immunodeficiency syndrome. *Blood*, 93, 1843-1850.

Hirasawa K, Jun HS, Han HS, Zhang ML, Hollenberg MD, Yoon JW. (1999). Prevention of encephalomyocarditis virus-induced diabetes in mice by inhibition of the tyrosine kinase signalling pathway and subsequent suppression of nitric oxide production in macrophages. *J Virol*, 73, 8541-8548.

Ichimori K, Stuehr DJ, Atkinson RN, King SB. (1999). Synthesis and evaluation of new sulfur-containing L-arginine-derived inhibitors of nitric oxide synthase. *J Med Chem*, 42, 1842-1848.

Ikebe N, Akaike T, Miyamoto Y, Hayashida K, Yoshitake J, Ogawa M, Maeda H. (2000). Protective effect of *S*-nitrosylated α_1 -protease inhibitor on hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther*, 295, 904-911.

Karupiah G, Xie QW, Buller RM, Nathan C, Duarte C, MacMicking JD. (1993). Inhibition of viral replication by interferon- γ -induced nitric oxide synthase. *Science*, 261, 1445-1448.

Karupiah G, Chen JH, Mahalingam S, Nathan CF, MacMicking JD. (1998). Rapid interferon γ -dependent clearance of influenza A virus and protection from consolidating pneumonitis in nitric oxide synthase 2-deficient mice. *J Exp Med*, 188, 1541-1546.

Knowles RG, Moncada S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, 298, 249-258.

Kreil TR, Eibl MM. (1996). Nitric oxide and viral infection: NO antiviral activity against a flavivirus in vitro, and evidence for contribution to pathogenesis in experimental infection in vivo. *Virology*, 219, 304-306.

Lander HM. (1997). An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J*, 11, 118-124

Lane TE, Paoletti AD, Buchmeier MJ. (1997). Disassociation between the in vitro and in vivo effects of nitric oxide on a neurotropic murine coronavirus. *J Virol*, 71, 2202-2210.

Lin JK, Chen KJ, Liu GY, Chu YR, Lin-Shiau SY. (2000). Nitration and hydroxylation of aromatic amino acid and guanine by the air pollutant peroxyacetyl nitrate. *Chem Biol Interact*, 127, 219-236.

Lin YL, Huang YL, Ma SH, Yeh CT, Chiou SY, Chen LK, Liao CL. (1997). Inhibition of Japanese encephalitis virus infection by nitric oxide: antiviral effect of

nitric oxide on RNA virus replication. *J Virol.* 71, 5227-5235.

Liu RH, Hotchkiss JH. (1995) Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. *Mutat Res*, 339, 73-89.

Lowenstein CJ, Hill SL, Lafond-Walker A, Wu J, Allen G, Landavere M, Rose NR, Herskowitz A. (1996). Nitric oxide inhibits viral replication in murine myocarditis. *J Clin Invest*, 97, 1837-1843.

MacMillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Beckman JS, Thompson JA. (1996). Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93. 11853-11858.

Mannick JB, Asano K, Izumi K, Kieff E, Stamler JS. (1994). Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell*. 79, 1137-1146.

Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ, Stamler JS. (1999) Fas-induced caspase denitrosylation. *Science*, 284, 651-654.

Mason RP. (1982). Free-radical intermediates in the metabolism of toxic chemicals. *In Free Radicals in Biology*, ed. Pryor WA. (Academic, New York), vol. 5, pp. 161-222.

Masuda M, Nishino H, Ohshima H. (2002). Formation of 8-nitroguanosine in cellular RNA as a biomarker of exposure to reactive nitrogen species. *Chem Biol Interact*, 139, 187-197.

Moncada S, Higgs A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 329, 2002-2012.

Mori M, Gotoh T. (2000). Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem Biophys Res Commun*, 275, 715-719.

Nathan C. (1997). Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest*, 100, 2417-2423.

Nishio R, Matsumori A, Shioi T, Ishida H, Sasayama S. (1999). Treatment of experimental viral myocarditis with interleukin-10. *Circulation* 100, 1102-1108.

Noda S, Tanaka K, Sawamura S, Sasaki M, Matsumoto T, Mikami K, Aiba Y, Hasegawa H, Kawabe N, Koga Y. (2001). Role of nitric oxide synthase type 2 in acute infection with murine cytomegalovirus. *J Immunol*, 166, 3533-3541.

Nussler AK, Di Silvio M, Billiar TR, Hoffman RA, Geller DA, Selby R, Madariaga J, Simmons RL. (1992). Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J Exp Med*, 176, 261-264.

Oda T, Akaike T, Hamamoto T, Suzuki F, Hirano T, Maeda H. (1989). Oxygen radicals in influenza-induced pathogenesis and treatment with pyran polymer-conjugated SOD. *Science*, 244, 974-976

Ogura T, Tatemichi M, Esumi H. (1997). Nitric oxide inhibits CPP32-like activity under redox regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 236, 365-359.

Okamoto T, Akaike T, Nagano T, Miyajima S, Suga M, Ando M, Ichimori K, Maeda H. (1997). Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*, 342, 261-274.

Oyadomari S, Takeda K, Takiguchi M, Gotoh T, Matsumoto M, Wada I, Akira S, Araki E, Mori M. (2001). Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic β cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 10845-10850.

Reiter CD, Teng RJ, Beckman JS. (2000) Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite. *J Biol Chem*. 275, 32460-

32466.

Rubbo H, Darley-Usmar V, Freeman BA. (1996). Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. *Chem Res Toxicol*, 9, 809-820.

Salter M, Knowles RG, Moncada S. (1991). Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett*, 291, 145-149.

Sato K, Akaike T, Kojima Y, Ando M, Nagao M, Maeda H. (1992). Evidence of direct generation of oxygen free radicals from heterocyclic amines by NADPH/cytochrome P-450 reductase in vitro. *Jpn J Cancer Res*. 83, 1204-1209.

Saura M, Zaragoza C, McMillan A, Quick RA, Hohenadl C, Lowenstein JM, Lowenstein CJ. (1999). An antiviral mechanism of nitric oxide: inhibition of a viral protease. *Immunity* 10, 21-28.

Sawa T, Akaike T, Maeda H. (2000). Tyrosine nitration by peroxynitrite formed from nitric oxide and superoxide generated by xanthine oxidase. *J Biol Chem*, 275, 32467-32474.

Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. (1991). Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 7773-7777.

Suzuki T, Yamada M, Kanaori K, Tajima K, Morii T, Makino K. (1999). Formation of 8-nitroguanine from 2'-deoxyguanosine by NO/O₂ system. *Nucleic Acids Symp Ser*, 42, 155-156.

Szabo C, Ohshima H. (1997). DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric Oxide*, 1, 373-385.

Tsutsumi H, Takeuchi R, Ohsaki M, Seki K, Chiba S. (1999). Respiratory syncytial virus infection of human respiratory epithelial cells enhances inducible nitric

oxide synthase gene expression. *J Leukoc Biol*, 66, 99-104.

Tucker PC, Griffin DE, Choi S, Bui N, Wesselingh S. (1966). Inhibition of nitric oxide synthesis increases mortality in Sindbis virus encephalitis. *J Virol*, 70, 3972-3977.

Tuo J, Liu L, Poulsen HE, Weimann A, Svendsen O, Loft S. (2000). Importance of guanine nitration and hydroxylation in DNA in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*, 29, 147-155.

Umezawa K, Akaike T, Fujii S, Suga M, Setoguchi K, Ozawa A, Maeda H. (1997). Induction of nitric oxide synthesis and xanthine oxidase and their roles in the antimicrobial mechanism against *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Infect Immun*, 65, 2932-2940.

van Den Broek M, Bachmann MF, Kohler G, Barner M, Escher R, Zinkernagel R, Kopf M. (2000). IL-4 and IL-10 antagonize IL-12-mediated protection against acute vaccinia virus infection with a limited role of IFN- γ and nitric oxide synthetase 2. *J Immunol*, 164, 371-378.

Viner RI, Ferrington DA, Huhmer AF, Bigelow DJ, Schoneich C. (1996). Accumulation of nitrotyrosine on the SERCA2a isoform of SR Ca-ATPase of rat skeletal muscle during aging: a peroxynitrite-mediated process? *FEBS Lett*, 379, 286-290.

Yermilov V, Rubio J, Ohshima H. (1995). Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS Lett*, 376, 207-210.

Yermilov V, Rubio J, Becchi M, Friesen MD, Pignatelli B, Ohshima H. (1995). Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxynitrite in vitro. *Carcinogenesis*, 16, 2045-2050.

Yui Y, Hattori R, Kosuga K, Eizawa H, Hiki K, Kawai C. (1991). Purification

of nitric oxide synthase from rat macrophages. *J Biol Chem*, 266, 12544-12547.

Zhu S, Basiouny KF, Crow JP, Matalon S. (2000). Carbon dioxide enhances nitration of surfactant protein A by activated alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 278, L1025-L1031.

Zhu S, Ware LB, Geiser T, Matthay MA, Matalon S. (2001). Increased levels of nitrate and surfactant protein a nitration in the pulmonary edema fluid of patients with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 163, 166-172.