

マウスインフルエンザ肺炎におけるレドックス制御蛋白チオレドキシン (TRX-1) の治療的効果

八代将登^{a*}, 塚原宏一^a, 松川昭博^b, 山田睦子^a, 藤井洋輔^a, 長岡義晴^a, 津下 充^a, 山下信子^a, 伊藤利洋^b, 山田雅夫^c, 増谷 弘^d, 淀井淳司^d, 森島恒雄^a

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 ^a小児医科学, ^b病理学 (免疫病理), ^c病原ウイルス学, ^d京都大学ウイルス研究所 生体応答学研究部門

キーワード: acute lung injury, cytokine, influenza virus, oxidative stress, thioredoxin-1

Therapeutic effects of redox-active protein thioredoxin(TRX)-1 in influenza-virus-induced pneumonia in mice

Masato Yashiro^{a*}, Hirokazu Tsukahara^a, Akihiro Matsukawa^b, Mutsuko Yamada^a, Yosuke Fujii^a, Yoshiharu Nagaoka^a, Mitsuru Tsuge^a, Nobuko Yamashita^a, Toshihiro Ito^b, Masao Yamada^c, Hiroshi Masutani^d, Junji Yodoi^{d,e}, Tsuneo Morishima^a

Departments of ^aPediatrics, ^bPathology and Experimental Medicine, ^cVirology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, ^dDepartment of Biological Responses, Institute for Virus Research, Kyoto University

はじめに

インフルエンザは全世界で小児・成人を問わず甚大な健康被害をもたらしている。抗インフルエンザ薬を病初期より使用しても重篤な肺炎を引き起こし、人工呼吸管理を含めた集中治療を要することも少なくない。また、「新型インフルエンザ」については新たな「特別対策法」が設置されるなど高病原性インフルエンザの脅威、とくに重症肺炎・ARDS に対する対策は世界的に重要な課題となっている。このような状況の中、抗

インフルエンザ薬と併用しうる新規の治療薬の開発が喫緊の課題である。本研究では、重症インフルエンザ肺炎のマウスモデルにおける炎症機転と酸化ストレス環境の評価を行うとともに、リコンビナント・ヒトチオレドキシン (rhTRX-1) のもつ抗酸化および抗炎症作用による治療効果について検討を行った。

酸化ストレスとチオレドキシン

近年重症感染症の病態悪化に酸化ストレスが関連することが明らかになっている。スーパーオキシド (O₂⁻), ヒドロキシラジカル (OH), 一酸化窒素 (NO) などの活性酸素種 (ROS) は、免疫応答の初期発動を担っている。しかし ROS はその毒性と非特異性から周囲の組織をも傷害するいわば「諸刃の刃」である¹⁾。生体内にユビキタスに存在するタンパク質であるチオレドキ

平成25年6月受理

*〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話: 086-235-7251 FAX: 086-221-4745

E-mail: yashiro@md.okayama-u.ac.jp

プロフィール



八代将登

昭和51年生まれ

平成14年3月

愛媛大学医学部医学科卒業

平成14年5月16日

岡山大学医学部附属病院 小児科 医員 (研修医)

平成15年7月1日

岩国医療センター 小児科

平成19年4月1日

興生総合病院 小児科

平成22年4月1日

岡山大学病院 小児科 医員

平成23年4月1日

日本鋼管福山病院 小児科

平成24年10月1日

岡山大学病院 小児科 助教

平成24年12月

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科終了

現在に至る

シン (TRX)-1 は多面的な機能を有している。TRX-1 の代表的な働きとしてペルオキシレドキシシンと協調して ROS を除去することにより酸化ストレスに対し細胞を保護する「抗酸化作用」がある。その他にも、アポトーシスシグナル制御キナーゼ 1 (ASK-1) を阻害することで細胞のアポトーシスを防ぐ「抗アポトーシス作用」や、好中球活性や遊走を制御することにより炎症を抑制し抗炎症効果を発揮する「抗炎症作用」などが近年注目されている^{2,3)}。

rhTRX-1 の治療的効果

まず我々はマウスの TRX-1 mRNA の局所分布について調べ、肺において最も発現が高いことを証明した (図 1)。この結果から内因性の TRX-1 は肺において重要な制御的役割を担っている可能性が示唆された。インフルエンザ A/PR8 (H1N1) はマウスに重篤な肺障害を引き起こすことが知られている。H1N1 感染日を day 0 と規定し、マウスを 2 つの群に分け、day-1 から day13 までの 48 時間ごとに PBS または rhTRX-1 を腹腔内投与し生存率を解析した。また同様の実験を行い、病理学的解析と肺組織中の H1N1 定量を感染 24, 72, 120 時間後に施行した。この結果、rhTRX-1 は H1N1 感染において肺障害を抑制し生存率を有意に改善させることが判明した。H1N1 感染後 (30 分後と 4 時間後) に rhTRX-1 投与を開始した実験において感染 30 分後群では生存率は有意に改善した⁴⁾ (図 2)。興味深いことに rhTRX-1 は肺でのインフルエンザウイルスの増殖は抑制しなかった。rhTRX-1 はどのような機序で肺障害を抑制したのだろうか。この謎を解明するために以下の実験を行った。

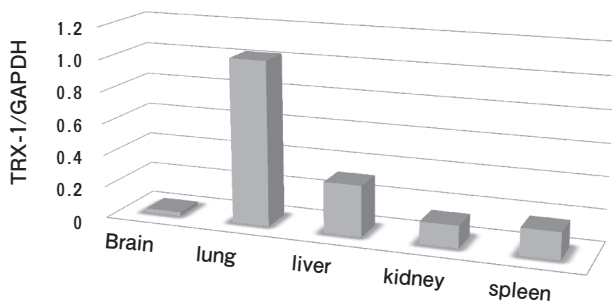


図 1 マウスにおけるチオレドキシシン mRNA の臓器別発現の比較
野生型マウスでは通常状態では肺において高発現している。P < 0.05 vs. brain, kidney, and spleen (n = 5-10)。

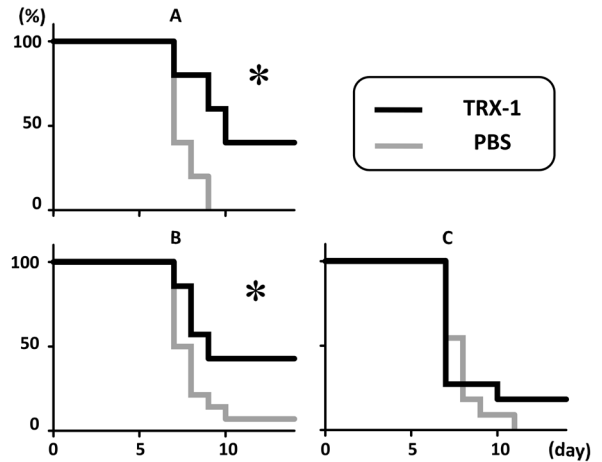


図 2 生存曲線 (rhTRX-1 の効果)
A : H1N1 感染 24 時間前より rhTRX-1 投与開始 (10 mice per group). rhTRX-1 は H1N1 感染の死亡率を有意に改善した。* p < 0.05. B : H1N1 感染 30 分後より rhTRX-1 投与開始 (14 mice per group). rhTRX-1 は H1N1 感染の死亡率を有意に改善した。* p < 0.05. C : H1N1 感染 4 時間後より rhTRX-1 投与開始 (11 mice per group). rhTRX-1 は H1N1 感染の死亡率に影響を与えなかった。(転載許可を得て文献 4 より改変して引用)

rhTRX-1 の抗炎症作用

上記と同様の実験を行い、肺洗浄検査 (BAL) と肺組織採取を行った。我々は肺洗浄液中の好中球数を測定し、H1N1 感染による好中球数の増加を rhTRX-1 が抑制することを証明した。つづいて肺洗浄液中と肺蛋白上清中の TNF- α と CXCL1 の濃度を測定した。TNF- α は代表的な炎症性サイトカインであり CXCL1 は好中球遊走に関与するケモカインである。いずれも H1N1 感染で上昇したが、rhTRX-1 投与群では両者とも有意に抑制されていた。更なる作用機序の解明のため in vitro 実験を行った。H1N1 をマウスの肺上皮細胞 (MLE-12) に直接感染させると、細胞内の TNF- α ・CXCL1 の mRNA 発現が増加した。これに対し H1N1 感染と同時に rhTRX-1 を投与するとこの効果はほとんど消失した。以上の結果から in vivo でも in vitro でも、rhTRX-1 は H1N1 感染マウスの肺においての TNF- α と CXCL1 の発現や分泌を抑制することで抗炎症作用を発揮していることが証明された⁴⁾ (図 3)。

rhTRX-1 の抗酸化作用

上記と同様に、DNA の酸化障害マーカーである 8-OHdG の病理学的解析と、血清中の酸化障害マーカー一定量を施行した。H1N1 感染マウスでは、肺において

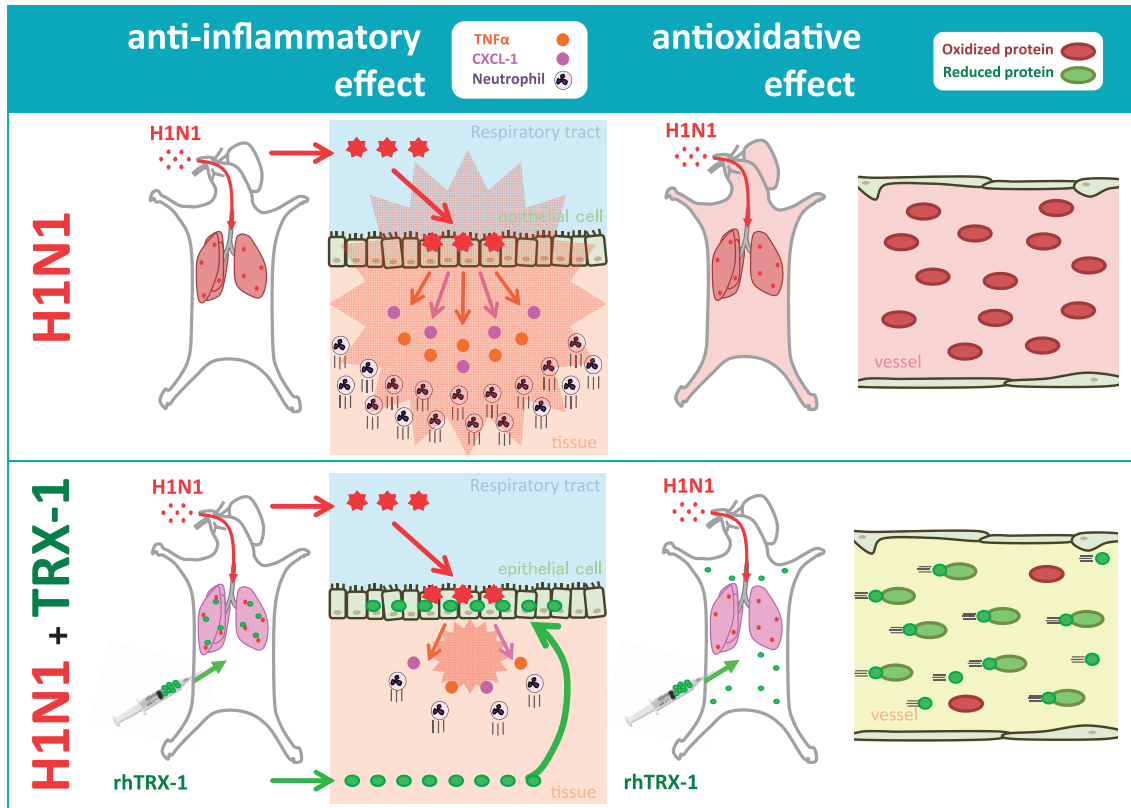


図3 リコンビナントヒトチオレドキシンの作用機序

マウスインフルエンザ肺炎に対する rhTRX-1 の作用機序として以下に述べる抗炎症作用と抗酸化作用が推察される。抗炎症作用：経気道的に接種された H1N1 は肺上皮細胞に感染する。感染細胞は TNF α と CXCL1 を産生する。その結果、感染局所に遊走された好中球が強い炎症反応を引き起こし、肺組織障害に至る（左上）。腹腔内投与された rhTRX-1 は感染局所（肺）に到達する。rhTRX-1 存在下では H1N1 感染細胞による TNF α と CXCL1 の産生は抑制される。その結果、感染局所への好中球の遊走は抑制され、炎症は軽減される（左下）。抗酸化作用：H1N1 感染により局所の炎症が進行すると、局所と全身の酸化障害が進行し、血液中の活性酸素種（ROS）が増加する（右上）。腹腔内投与された rhTRX-1 は全身に到達する。rhTRX-1 は自らの抗酸化作用によって酸化物質を還元型に変換することで ROS を減少させる（右下）。

8-OHdG が形成され、血清中のヒドロペルオキシド濃度が上昇した。rhTRX-1 を投与すると両者ともに抑制された。これらの結果から、酸化ストレス亢進が H1N1 由来肺炎の炎症過程を促進すること、rhTRX-1 の強力な抗酸化活性が細胞・組織保護に関与していることが考えられた⁴⁾ (図3)。

肺障害とチオレドキシソ

血清中の TRX-1 濃度は、敗血症・ウイルス感染症・自己免疫疾患・虚血再灌流障害・急性肺傷害といった酸化ストレスや炎症が関与する疾患で上昇し、特に疾患活動性に相関することが立証されている。ヒト TRX-1 を高発現させたトランスジェニックマウスでは、虚血性脳障害・アドリマイシン誘導性心筋障害・虚血再灌流心筋障害・セルレイン誘導性肺炎など

に抵抗性を示す。さらに重要なことに、このマウスでは様々な肺障害（炎症性サイトカイン由来、ブレオマイシン由来、ディーゼル排気微粒子（DEP）由来、タバコ煙由来）やインフルエンザウイルス関連肺炎に対しても抵抗性を示している。疾患モデル動物を用いた rhTRX-1 の有効性が複数報告されており、様々な肺傷害（炎症性サイトカイン由来、ブレオマイシン由来、タバコ煙由来、卵アルブミンによる気道過敏性や炎症由来、LPS 由来）においても効果が立証されている。これらの結果は、rhTRX-1 が動物における酸化ストレス関連・炎症関連の肺障害に対し強力な保護的作用を有することを示している。

インフルエンザウイルス感染により毎年多くの重症肺炎が併発し、重篤な場合は死に至る。インフルエンザウイルスは細胞病理学的に感染した細胞を死に至ら

しめるとともに、感染に対する過剰な免疫応答により、さらなる肺障害や非常に強い全身症状をも引き起こす。将来の重大なパンデミックの可能性も常に懸念されており、インフルエンザに対し新たな治療的戦略を同定することは極めて重要である。

今回我々はマウスのインフルエンザ急性肺傷害において、rhTRX-1投与が有効であることを初めて証明した。マウスインフルエンザ肺炎は組織学的には強い炎症細胞浸潤（主に好中球）を認めている。活性化した好中球・マクロファージ・気道上皮細胞は大量の生物活性物質（サイトカイン／ケモカイン、ROS、組織分解性酵素）を放出し急性肺炎疾患を誘導する。炎症細胞による酸化障害は血管内皮細胞を標的にし、肺浮腫や肺出血に至らしめる。今回の結果から、rhTRX-1投与は抗酸化作用と抗炎症作用を通してマウスのインフルエンザウイルス（H1N1）肺炎による致死的な障害を改善すると考えられた。

おわりに

今回 rhTRX-1の強力な抗酸化および抗炎症作用が、マウスの重症インフルエンザ肺炎の進行を抑制し、生存率を向上させることが示された。現在インフルエンザ肺炎を始めとする重症インフルエンザに対して、「抗インフルエンザウイルス薬」、「抗サイトカイン・アポトーシス療法」、「レドックス制御」を3本の柱とする治療戦略が掲げられている（図4）。rhTRX-1はこの「抗サイトカイン」、「レドックス制御」に重要な役割を担っており、本研究では効果的治療を確立するための基礎データを得ることができた。rhTRX-1の臨床応用に向けて、今後も基礎研究を続ける予定である。

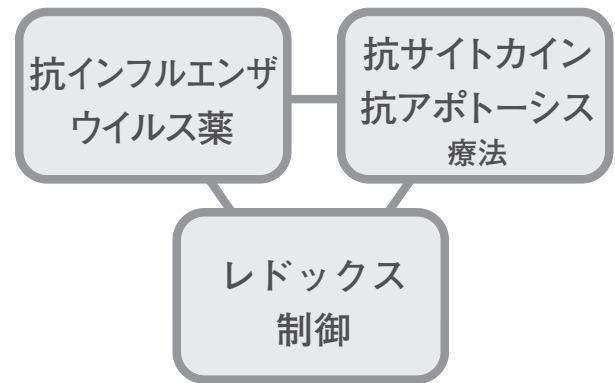


図4 重症インフルエンザの治療戦略
インフルエンザ肺炎を始めとする重症インフルエンザに対して、「抗インフルエンザウイルス薬」、「抗サイトカイン・アポトーシス療法」、「レドックス制御」を3本の柱とする治療戦略が掲げられている。rhTRX1はこの中の「抗サイトカイン療法」と「レドックス制御」に重要な役割を担っている。

文 献

- 1) Tsukahara H: Biomarkers for oxidative stress: Clinical application in pediatric medicine. *Curr Med Chem* (2007) 14, 339-351.
- 2) Nakamura H, Hoshino Y, Okuyama H, Matsuo Y, Yodoi J: Thioredoxin 1 delivery as new therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* (2009) 61, 303-309.
- 3) Nakamura H, Herzenberg LA, Bai J, Araya S, Kondo N, Nishinaka Y, Herzenberg LA, Yodoi J: Circulating thioredoxin suppresses lipopolysaccharide-induced neutrophil chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci USA* (2001) 98, 15143-15148.
- 4) Yashiro M, Tsukahara H, Matsukawa A, Yamada M, Fujii Y, Nagaoka Y, Tsuge M, Yamashita N, Ito T, Masutani H, Yamada M, Yodoi J, et al.: Redox-active protein thioredoxin-1 administration ameliorates influenza A virus (H1N1)-induced acute lung injury in mice. *Crit Care Med*. (2013) 41, 171-181.