

## 母児感染研究部（小児感染症研究室、感染防御研究室）

母児感染研究部は胎児・小児期感染症の病態解明と新しい診断・治療法の開発を基本目標とする。臨床の現場に反映される成果を目指して、ヘルペスウイルス感染症と食細胞の殺菌能を主なテーマとして研究を進めている。

### (1) 平成 14 年度の研究体制

部長 藤原成悦（平成 15 年 1 月 1 日着任）

小児感染症研究室室長 藤原成悦兼任（公募中）

感染防御研究室研究員 綱脇祥子（平成 15 年 4 月 1 日付で室長に昇任）

共同研究員 吉田ルシア幸子、新倉路生、松原有美

（流動研究員・今留謙一、共同研究員・八田太一が平成 15 年 4 月 1 日付で加わった）

### (2) 研究内容

#### 小児感染症研究室

EB ウイルス (EBV) をはじめとするヘルペス科ウイルスに焦点を当て、基礎・臨床の両面から研究を進めている。EBV は我が国の成育医療においては、主に伝染性単核症 (IM)、慢性活動性 EBV 感染症 (CAEBV)、血球貪食症候群 (HS)、免疫不全状態のリンパ増殖性疾患 (LPD) の原因として重要である。IM と LPD の病態の根本は EBV による B リンパ球不死化にあるが、不死化に重要な働きをする EBV 蛋白質は転写因子 EBNA2 と CD40 アナログ LMP1 である (図 1 参照)。以下の研究項目(a)では EBNA2、(b)では CD40/CD40L システムの機能を解析し、不死化のメカニズムを追求している。HS や CAEBV では、EBV が感染した T あるいは NK 細胞が産生するサイトカインが病態の形成に重要な役割を果たす。項目(c)では、独自に確立した実験系を用いて、T 細胞のサイトカイン産生に対する EBV の影響を調べている。

近年、生活環境の変化により新しい病原体の出現や既存の感染症の再興が問題となっているが、ヘルペスウイルス感染症においても初感染の遅延という新しい状況が生じている。これに対処するために(d)の調査研究を計画した。また、移植医療の発展やエイズの出現により免疫不全状態の難治性ウイルス感染症が大きな問題となっているが、これに対応して(e)の研究に着手した。

#### 研究項目

##### (a) B リンパ球不死化における EBNA2 の役割の解析

発現の制御が可能なベクターを用いた遺伝子導入実験により、EBNA2 が潜伏 EBV の複製誘発や細胞死など予想外の作用を持つことが示された。これらは B 細胞抗原受容体 (BCR) の刺激による作用と共通しているため、BCR 刺激に連動する遺伝子発現調節と EBNA2 との関連が示唆される。現在、EBNA2 が制御する細胞遺伝子を DNA マイクロアレイにより探索中である。

##### (b) CD40/CD40L システムと EBV

EBV 感染により B 細胞に CD40L、T 細胞に CD40 の発現が誘導され、双方の細胞において CD40L から CD40 へのシグナルが、細胞の生存と増殖に重要な役割を果たすことが示された。B 細胞の CD40L 発現と T 細胞の CD40 発現という興味深い現象が、EBV 感染症においてどのような意義を持つかを検討している。

##### (c) EBV 感染 T 細胞のサイトカイン産生の解析

組み換え EBV 感染 MT-2 細胞は、EBV の持続感染がヒト T 細胞の遺伝子発現に与える影響を精密に調べられる唯一の実験系である。これを用いて EBV により産生が誘導されるサイトカインを DNA マイクロアレイにより探索している。

##### (d) ヘルペスウイルス感染症の将来予測

従来日本では、乳幼児期にほとんどの人がヒトサイトメガロウイルス (HCMV) の初感染を受

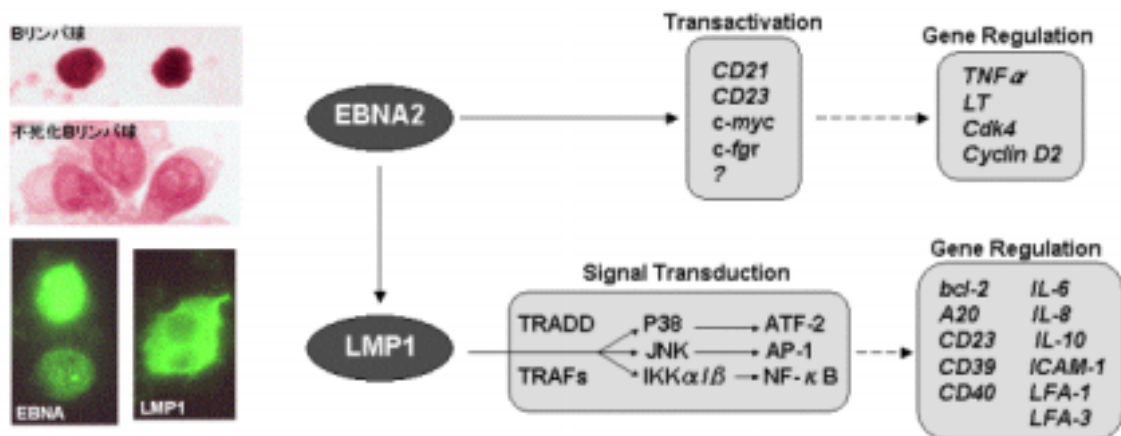


図1 Bリンパ球不死化におけるEBV蛋白質の役割

け、免疫を獲得していた。ところが最近、妊娠可能年齢女性の HCMV 抗体保有率の減少が認められるようになり、妊娠中の HCMV 初感染による胎児感染の増加が懸念されている。また、このような初感染年齢の上昇は、EBV など他のヘルペスウイルスにも共通することが示唆されている。EBV の場合はこれにより、伝染性単核症やその合併症が増加する恐れがある。このようなヒトヘルペスウイルス感染症の変化を正確に予測するために、当研究所内外の研究者と共同でヒトヘルペスウイルスの疫学調査をおこない、初感染年齢の変化の実態を詳細に解析する計画を立てた。この研究の実行により、ヘルペスウイルス感染症の将来像を確実に予想し、必要な対策をとるための基礎資料を得ることができる。

#### (e) 難治性ウイルス感染症に対する活性化T細胞輸注療法の基礎研究

活性化T細胞輸注療法は、末梢血から分離したリンパ球を抗CD3抗体とIL-2により活性化させた後に体内に戻す治療法であり、種々の難治性ウイルス感染症に対して有効である。薬剤耐性を獲得したウイルスにも効果を示す。この治療法について、東京医科歯科大学難治疾患研究所と共同で、奏功のメカニズムやプロトコールの最適化に関する研究に着手した。

### 感染防御研究室

感染防御研究室では、自然免疫を担う食細胞の活性酸素生成系を中心とした感染防御研究を行っている。病原微生物を認識し排除する免疫システムは、獲得免疫系と自然免疫系の2つに大別される。獲得免疫成立までには感染後約1週間を要するが、自然免疫は、感染現場で初動される素早い反応であり、感染防御の最前線を担っている。食細胞の活性酸素生成酵素(NADPH oxidase)は、細胞膜因子(cytochrome b558: gp91-p22複合体)とサイトゾル因子(p67, p47, p40)から成る複合酵素系であり、低分子量G蛋白質Rac2により制御されている(図2参照)。恒常的な活性酸素生成は宿主に対して毒性があり、通常、このシステムは不活性型である。しかし、病原体を認知すると、サイトゾル因子およびRac2は、直ちにcytochrome b558上で集合体を形成する。そして、活性型NADPH oxidaseが構築され、酸素を一電子還元してO<sub>2</sub>を生成し、殺菌に用いられる。食細胞が生成する活性酸素の感染防御に於ける重要性は、小児期に発症する慢性肉芽腫症(CGD: NADPH oxidase各構成因子に於ける変異症)患者が、反復感染、特に、アスペルギルス感染症に陥り致死的事であることから容易に想像できる。本年度は、(a)病原因子との係わりを中心に研究を進め、(b)社会的貢献として、CGD患者の確定診断を行った。

### (a) 病原因子による活性酸素生成系の破綻

分子生物学的手法、更に、最近は、X線結晶解析、NMR等を用いた構造生物学も展開され、活性酸素生成系の大略は明らかにされつつある。しかし、攻撃相手である病原体との係わり合いに注目した研究はあまりなされていない。一方、免疫能の低下した患者では、重篤な感染症としてアスペルギルス症が問題になっているが、その侵襲性に関しては実体は明らかでなかった。そこで、アスペルギルス侵襲性の理解を目的として、NADPH oxidase に対する病原因子の影響を検討した結果、アスペルギルスが病原因子グリオトキシンを用いて防御側である好中球 NADPH oxidase の活性化を阻害する事により、その攻撃から逃れ侵襲性を発揮する事を明らかにした。更に、顆粒球細胞内寄生細菌である *Anaplasma phagocytophilum* が、cytochrome b558 の p22 サブユニットを分解して好中球の  $O_2^-$  生成を阻害し、human granulocytic ehrlichiosis を引き起こす事を証明した。以上、“NADPH oxidase のエスケープを中心に据えた感染成立の分子基盤”と言う新しい領域の確立を目指している。

### (b) CGD 患者の確定診断

当研究室では、社会的貢献の一環として、CGD 患者の確定診断を行っている。先天性免疫不全症候群の中で最も頻度が高い CGD は、感染を繰り返して好中球増多症に陥るため、宿主側でなく病原体側に原因を求め勝ちであった。しかし、確定診断の可能性が小児科医に普及するにつれ、診断依頼件数が増えてきた。当該年度の症例は、例年通り殆ど伴性劣性遺伝型の gp91 欠損であったが、常染色体劣性型である p22 欠損が一例見つかった。また、活性酸素生成能が正常人の 20-30% あれば通常の生活を送る上で支障は無いと考えられていたが、確定診断が可能となってから 10 年近く経ち、キャリアー（母親、姉妹）の  $O_2^-$  生成能が低下して易感染性に陥り、肝膿瘍を発症する等の問題点がクローズアップされた。

図2 食細胞 NADPH oxidase

