

4-2-7 母児感染研究部 (小児感染症研究室、感染防御研究室)

1. 研究概要

ヘルペスウイルスは胎児・小児期ウイルス感染症の主要病因の一つであり、日和見感染の病因としても重要である。近年我が国では、生活習慣や衛生環境の変化により、ヘルペスウイルス一般の初感染年齢が上昇し始めているが、これによる顕性感染の増加と重症化や、妊娠時初感染による胎児・新生児感染の増加など、深刻な影響が懸念される。このためヘルペスウイルス感染症は新興・再興感染症と同等の重要性を持つと考えられる。小児感染症研究室では、EB ウイルスをはじめとするヘルペスウイルスの基礎・臨床的研究を行う。またヘルペスウイルス感染症の変化の実態を明らかにするために、疫学的調査研究を準備している。

感染防御研究室では、自然免疫による生体防御機構の解明を行い、小児期特有の疾患・病態を明らかにし、成育医療に貢献する事を目的としている。特に、好中球の活性酸素生成機構 (NADPH oxidase system) の解明とその異常症である慢性肉芽腫症 (CGD) に関する研究を中心に据えている。本年度は、(a) 真菌毒素グリオトキシンによる NADPH oxidase の阻害機序および (b) 胃粘膜上皮細胞に於ける自発的活性酸素生成系の解析を進めた。

本年度の研究体制： 藤原成悦 (部長) 中村浩幸 (小児感染症研究室長、8月1日着任) 網脇祥子 (感染防御研究室長、4月1日昇任) 今留謙一 (流動研究員、4月1日着任) 五十嵐美絵 (共同研究員) 新倉路生 (共同研究員) 山下ルシア幸子 (共同研究員) 松原有美 (東京農業大学大学院博士前期) 八田太一 (早稲田大学卒研究生) 安田美穂 (東京理科大学博士前期)

2. 研究成果

2.1 小児感染症研究室

2.1.1 EB ウイルス感染細胞の増殖阻止による新規治療法開発のための基礎研究

ヘルペスウイルスの一種 EB ウイルス (EBV) は、伝染性単核症 (IM)、慢性活動性 EBV 感染症 (CAEBV)、免疫不全宿主のリンパ増殖性疾患等の病因となる。EBV 感染リンパ球の増殖がこれらの疾患の根本原因であることから、増殖阻止法の開発が新規治療法に直結すると考えられる。EBV によるリンパ球増殖は、in vitro では不死化として再現されるが、その分子機構は生理的なリンパ球活性化におけるシグナル伝達と遺伝子発現制御を巧みに利用したものとなっている。従って、不死化に関わる EBV 蛋白質や、EBV により発現が誘導され細胞増殖に必要とされる宿主シグナル伝達系の蛋白質は、増殖阻止の標的として重要である。具体的な研究プロジェクトは以下の通りである。

2.1.1.1 EBV 感染による異所性 CD40-CD40L シグナルの解析とその阻害による EBV 感染細胞の増殖制御

これまでの研究成果

CD40 は B 細胞などの抗原提示細胞に発現され、CD40 リガンド (CD40L) は主に活性化 T 細胞に発現される。B 細胞の活性化においては、抗原刺激と T 細胞からのヘルプの二つのステップが必要であるが、CD40L による CD40 の刺激は後者の中心シグナルとなり、さらに胚中心の形成、クラススイッチ、体細胞超変異、記憶 B 細胞の分化などにも必要となる。EBV 感染と CD40-CD40L シグナルの関係について、今留流動研究員らが東京医科歯科大学において行った研究により以下の点が明らかになっている。1) EBV 感染により B リンパ球に CD40L の発現が誘導される。2) CD40 と CD40L の相互作用を阻害すると、アポトーシスが亢進し、不死化の効率が著しく低下する。3) CD40L を欠損する X 連鎖高 IgM 症候群 (XHIM) 患者由来の B リンパ球は不死化の効率が著しく

低い、CD40 を刺激すると不死化効率が回復する。4) T 細胞株に EBV を感染させると CD40 の発現が誘導される。これらは、CD40-CD40L シグナルが EBV 感染リンパ球の増殖に重要な役割を果たすことを示すとともに、同シグナルの阻害による新しい EBV 関連リンパ増殖性疾患治療法の可能性を示している。

平成 15 年の成果

本年は、鼻腔 T/NK リンパ腫と CAEBV 患者より樹立された EBV 陽性 T および NK 細胞株 (計 10 株) を調べたところ、全例で CD40 と CD40L の同時発現が認められた。また、CD40 と IgG・Fc 部分の融合蛋白質 (CD40・Ig) により両者の相互作用を阻害すると、A23187 によるアポトーシスが亢進することが示された。従来、T 細胞や NK 細胞への実験的な EBV 感染は極めて困難であり、T/NK リンパ増殖性疾患における EBV の役割は不明であった。今回の結果は、EBV が CD40 および CD40L の発現誘導を通じてアポトーシスを抑制することにより、リンパ球増殖に関わることを示唆するものである。またこの結果は、B 細胞のみでなく T/NK 細胞においても CD40 への刺激が細胞の生存を促進することを初めて示すものである。

CD40L および CD40 発現の誘導に関わる EBV 遺伝子の同定を目的として、遺伝子導入実験を行った。これまでに EBNA1、EBNA2、LMP1、EBER の各遺伝子をヒト B 細胞株 Ramos および T 細胞株 Jurkat に導入し安定的に発現させた。現在、これらの細胞における CD40 および CD40L の発現を検討している。

EBV 感染細胞では、CD40 と CD40L が同時発現されるため、両者の相互作用機構の解明は、その効果的な阻害法の確立のために重要なステップとなる。国立成育医療センター研究所発生・分化研究部との共同研究により、共焦点レーザー顕微鏡による観察などを通じてこの相互作用の機構を解析する計画である。

2.1.1.2 EBV 蛋白質 EBNA2 の機能解析

これまでの研究成果

EBV 蛋白質 EBNA2 は、リンパ球不死化に必須であり、多くの EBV 遺伝子と細胞遺伝子の転写を活性化する転写因子である。不死化においては、この EBNA2 と LMP1 の二つの EBV 蛋白質が中心的な役割を果たすことが知られている。我々はテトラサイクリン制御発現ベクターによる EBNA2 遺伝子導入実験により、EBNA2 がパーキットリンパ腫細胞 (BL) において EBV 複製を誘発することを示した (Fujiwara S et al., J. Virol. 73: 5214-5219, 1999; Fujiwara S et al., Virus Genes 23:361-365, 2001)。また、BL 細胞株などにおいて、EBNA2 が免疫グロブリン (Ig) 遺伝子の発現抑制、細胞増殖抑制、細胞死誘発などの作用を持つことが同じ実験系により明らかになった。EBNA2 のこれらの作用は一見すると不死化とは相容れないが、EBV 複製誘発、Ig 発現抑制、細胞増殖抑制、細胞死のいずれもが、同じ BL 細胞において B 細胞抗原レセプターを刺激した場合にも認められることから、EBNA2 の機能が、BCR 下流のシグナル伝達・遺伝子制御経路のいずれかのステップを模倣するものであることが強く示唆された。

平成 15 年の成果

本年はマイクロアレイを用いて EBNA2 発現の有無による細胞遺伝子発現の違いを検討したところ、幾つかのアポトーシス関連遺伝子が EBNA2 により直接あるいは間接的に誘導されることが示唆された。しかし、より網羅的な解析を厳密な誘導発現システムで行う必要があると判断し、EBNA2 遺伝子を後述する Flp-In/TREx システムに組み込み、ヒト B 細胞株 BJAB への導入を進めている。

本研究から派生するテーマとして、EBV により不死化された細胞が産生するヒトモノクローナル抗体が認識する新規糖脂質に関して日本大学医学部などと共同研究を行った。その結果、当該糖脂質が HL60 細胞の顆粒球への分化においてシグナル伝達に重要な役割を果たすことが示された。

(Nagatsuka Y et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 7454-7459, 2003)

2.1.2 ヘルペスウイルス感染症の現状分析

初感染遅延によるヘルペスウイルス感染症の変化の実態を把握するために血清疫学・臨床疫学的調査研究を準備した。以下の項目について、平成 16 年度に開始する予定である。

- 1) 血清疫学によるヘルペスウイルス初感染遅延の実態把握
- 2) 初感染の遅延によるヘルペスウイルス感染症病態像の変化の解析

2.1.3 ヘルペスウイルスによる免疫回避機構に関する研究

ウイルスの感染から増殖に至るまでに必要な機能の多くは、ウイルスと宿主の相互作用の上に成立している。そのため、ウイルス因子と宿主因子の相互作用は、ウイルスの宿主トロピズム、体内における感染動態、病原性発現に重要な要因となる。また、個人間での病原性発現の差異は、ウイルス側と宿主側との要因が複雑に絡み合って発揮されるものと考えられる。その観点から、我々は EBV と宿主の相互作用を分子、細胞、組織、個体レベルで理解し、EBV 関連病態の分子機構の解明および新たな診断・治療法の標的分子の同定を目指している。

ヘルペスウイルスは全て一度感染すると生涯にわたり潜伏感染する。免疫能が抑制されると、ウイルスが再活性化され日和見感染症を引き起こす。従って、日和見感染症の予防・治療には、潜伏感染の機構と宿主側の免疫応答機構の理解が必要である。潜伏感染を可能とするため、ヘルペスウイルスは宿主の免疫応答を回避する様々な機構を進化させて来たが、当研究室ではインターフェロンの抗ウイルス作用や細胞増殖抑制作用を回避する分子機構に注目して研究を行っている。実験計画は以下の 2 項目に分けられ、まず 1) に着手した。

- 1) 宿主免疫回避に関わる EBV 遺伝子の同定
- 2) EBV による免疫回避の分子機構の解析

2.1.3.1 宿主免疫応答の回避に関わる EBV 遺伝子の同定

インターフェロン反応性を示す特徴的な配列 GAS (IFN- γ -activated sequence) および ISRE (IFN-stimulated response element) を含むプロモーターの活性化を指標としたルシフェラーゼアッセイによって、種々の EBV 遺伝子をスクリーニングし、抗インターフェロン活性を示す候補遺伝子の同定を行っている。

2.1.3.2 EBV による免疫回避の分子機構の解析

上記(1)において同定した EBV 蛋白質について、細胞蛋白質との相互作用および細胞遺伝子発現への影響を解析する。具体的には、当該遺伝子を Flp-In/TREx システムを用いて宿主細胞に発現させ、ウイルス蛋白質に会合する細胞蛋白質群を質量分析法を用いて網羅的に同定する。また、当該遺伝子発現に伴って変動する細胞遺伝子群を DNA チップ(マイクロアレイ)を用いて同定する。

2.2 感染防御研究室

2.2.1 真菌毒素グリオトキシンによる好中球活性酸素生成系の破綻とアスペルギルス侵襲性

当研究室では、アスペルギルス侵襲性の理解を目的として病原因子の活性酸素生成系に対する影響を解析している。アスペルギルスが産生する病原因子をスクリーニングし、グリオトキシンが好中球の活性酸素生成を著しく阻害することを明らかにした(BBRC 268: 716, 2000)。更に、真菌症、特に、深在性真菌症に対する宿主のエフェクター細胞は好中球であり、アスペルギルスの殺菌に活性酸素が必須であることは、CGD がハイリスク患者であることから明白である。従って、グリオトキシンによる好中球 NADPH oxidase の阻害は、アスペルギルスの侵襲性発揮にとって最も効果的な方法である。

本年度は、病原因子グリオトキシンが、NADPH oxidase の活性化に於いて中心的役割を担う p47 のリン酸化、それに伴う p47 の細胞骨格への取り込み、サイトゾル因子の細胞膜への移行を阻害する事実を見出した。Rac2 の細胞膜移行は阻害されなかった。従って、p47 のリン酸化ステップがグリオトキシンの主要な標的部位であると考えられた。そこで、protein kinase C (PKC) 依存 p47 リン酸化に対するグリオトキシンの影響を解析した。

好中球には、5つのPKCアイソフォーム(, I, II, ,)が発現されているが、p47は主にPKC IIによってリン酸化される。更に、p47は、そのC末端を介してPKC IIおよびアクチンと会合する事が知られている。そこで、リコンビナントp47を作製し、PKC II依存p47リン酸化に対するグリオトキシンの影響を解析した。しかし、予想と異なり、グリオトキシンは、PKC II依存p47リン酸化を阻害しなかった。未刺激好中球では、PKC IIは専らサイトゾルに存在し、細胞刺激に伴って細胞膜へ移行する。グリオトキシンは、この細胞刺激に伴うPKC IIの細胞膜への移行を阻害した。従って、グリオトキシんに暴露された好中球では、細胞膜上でp47とPKC IIの会合が起こらないため、p47のリン酸化が阻害される事が明らかになった(*Infect Immun* 72: 3373, 2004)。NADPH oxidase と細胞骨格系は極めて密接な関係にあり、全てのO₂-生成活性は細胞骨格画分に回収される。この事実は、PKC IIおよびサイトゾル因子が細胞骨格系に依存して細胞膜へ移行し、活性型NADPH oxidase が構築される事を示している。従って、アクチンを含めた細胞骨格構成因子がグリオトキシンの標的分子である可能性が考えられる。

2.2.2 胃粘膜上皮細胞に於ける自発的活性酸素生成系の解明

ヒトゲノム計画の終了と共に、プロトタイプである好中球NADPH oxidase の酸化還元中心、gp91、のホモログ遺伝子が非食細胞にも発見され、Nox/Duox family と命名されている。我々は、胃粘膜上皮細胞に存在する活性酸素生成系の解析をこの数年行ってきた。モルモット胃粘膜上皮細胞はNox1遺伝子を発現し、興味深い事に自発的に活性酸素を生成した。この微弱な活性酸素は、過酷なストレスに曝されている胃および腸管上皮細胞の著しいターンオーバー、即ち、細胞増殖への関与が示唆されている。更に、感染によるこの自発的活性酸素生成の増強はDNAを損傷し、潰瘍・発ガンの誘発要因となる可能性が示唆されている。

恒常的な活性酸素生成は生体に対して毒性があり、通常食細胞のNADPH oxidase は不活性型であり、細胞刺激後、サイトゾル因子がcytochrome b558上で集合体を形成して初めて活性化される。これに反し、胃粘膜上皮細胞の自発生成にはNox1のみで十分であり、サイトゾル因子(p67、p47)の関与はないと考えられていた。しかし、我々は、モルモット胃粘膜上皮細胞に、抗p67抗体と反応するバンドを見出した。そこで、胃粘膜上皮細胞と同じ内胚葉性であり、最初にNox1が発見されたCaco-2細胞株を用いてクローニングを行い、p67は発現しているがp47は発現していない事を報告した(*BBRC* 296: 1322, 2002)。

本年度は、モルモット胃粘膜上皮細胞から得た細胞膜(Nox1)およびサイトゾル因子から成るin vitro再構成実験を行い、リコンビナントp47を添加した場合のみO₂-が生成されることを確認した。さらに、動力学的解析を行い、Nox1の基質NADPHに対するKm値がgp91と同じであることを証明した(*Biol Parm Bull* 27: 147, 2004)。しかし、自発生成は再現できなかった。未刺激好中球のp47は、自身のSH3 regionとautoinhibitory region (AIR)間で分子内結合をしているため不活性型である。細菌を認知するとAIR近傍のproline-rich regionに存在する8個のセリン残基がリン酸化されてこの分子内結合が切れ、新たにp22、p67と分子間結合が形成されて活性化される。我々は発見することができなかったが、マウス genome data base を用いてこのAIRが存在しないp41ホモログが発見された。多分、胃粘膜上皮細胞でもこのAIRが存在しないためSH3が恒常的に露出して活性型NADPH oxidaseを構築し、自発的に活性酸素を生成していると考えられる。実際、徳島大学との共同研究により、大腸粘膜上皮細胞にp41が存在する事が明らかになった(*J Immunol* 172: 3051, 2004)。