

## 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

ヘルペスウイルス科は、胎児・小児期ウイルス感染症の病因ウイルスを多く含んでいる。また、近年の移植治療の普及やエイズの流行により免疫不全宿主が増加したため、日和見感染因子としての重要性も高まっている。さらに近年我が国では、サイトメガロウイルス(CMV)をはじめヘルペスウイルス一般の初感染年齢の上昇が強く疑われ、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。ヘルペスウイルス感染症は、このように新興・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、胎児・小児期ウイルス感染症の病態解明と新規治療法の開発を目標とし、EBウイルス(EBV)やCMVなどヘルペスウイルスの基礎・臨床的研究を進めている。

感染防御研究室は、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。

本年度の研究体制： 藤原成悦(部長)、中村浩幸(小児感染症研究室長)、綱脇祥子(感染防御研究室長)、今留謙一(流動研究員)、五十嵐美絵(共同研究員)、新倉路生(共同研究員)、今井由美(実験補助員)、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)、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

EBVが原因となる伝染性単核症(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(LPD)などにおいては、EBV感染リンパ球の増殖が病態形成の根本因子となっている。従ってこれらの疾患の治療法開発には、EBVによるリンパ球増殖誘発のメカニズムを解析し、治療の標的となりうる分子過程を同定し、その阻害法を確立することが必要となる。リンパ球増殖の誘発に関わるウイルス蛋白質の機能解析はその第一歩である。また、EBVによるリンパ球増殖では、生理的なB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の仕組みが利用されているため、B細胞活性化の分子機構との比較研究も有力な手段となる。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CD40L-CD40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される。EBV感染とCD40L-CD40シグナルの関係について、今留らの研究により以下の点が明らかになっている(Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 7836-7840, 2003.) 1) EBV感染によりBリンパ球にCD40Lの発現が誘導される。2) CD40LとCD40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、CD40L-CD40 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。昨年度は、鼻性 T/NK 細胞リンパ腫と 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、全例で CD40L と CD40 の両者が同時に発現されていること、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、カルシウムイオノフォア A23187 によるアポトーシスが亢進することが示された。

#### 平成 16 年度の成果

CD40Ig によりアポトーシスが亢進することは、CD40 を介して細胞内に伝わるシグナルがアポトーシスを抑制することを示唆するが、もう一つの可能性として CD40L から細胞内に伝えられるシグナルが関わる可能性も否定できない。そこで、CD40Ig を作用させると同時にモノクローナル抗体により CD40 を刺激したところ、アポトーシスの亢進は回避された。これにより、CD40L ではなく CD40 がアポトーシス抑制シグナルを媒介することが明らかになった。また、Jurkat 細胞の感染実験では、EBV 感染により発現が誘導される CD40 がアポトーシス抑制シグナルを伝えることが示された。次に、実際の CAEBV 患者末梢血ウイルス感染細胞において CD40 シグナルの役割を調べた。その結果、4 例の患者全てにおいて、EBV 感染細胞に CD40L と CD40 の同時発現が認められ、2 例においては CD40Ig によるアポトーシス亢進が認められた (J. Infect. Dis., in press)。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 CD40L と CD40 の共発現状態を誘導し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 および 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 と CD40 の相互作用は、EBV 感染細胞の増殖を伴う疾患の治療の標的に成りうると思われた。

### 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、他の EBV 遺伝子や細胞遺伝子の転写を活性化する転写因子であり、EBV によるリンパ球不死化に中心的な役割を果たしている。これまでの我々の研究で、パーキットリンパ腫由来 Akata 細胞にテトラサイクリン制御発現ベクターを用いて EBNA2 遺伝子導入実験を行った結果、EBNA2 蛋白質が EBV 再活性化を誘発することが明らかとなっている (Fujiwara S et al., J. Virol. 73: 5214-5219, 1999; Fujiwara S et al., Virus Genes 23: 361-365, 2001)。

#### 平成 16 年度の成果

本年は、EBNA2 によるリンパ球不死化・EBV 再活性化の分子機構を明らかにする目的で、野生型および変異型 EBNA2 蛋白質を種々のヒト細胞株に一過性に発現させ解析を行うための実験系を確立した。すなわち、野生型 EBNA2 および、RBP-J 結合部位・転写活性化部位・二量体化責任部位のそれぞれを欠損する変異型 EBNA2 遺伝子をヒト EF-1 プロモーターの下流に組み込んだ EBNA2 発現ベクターを構築した。同ベクターには CMV プロモーターにより発現される GFP 遺伝子も組み込まれており、フローサイトメーターにより GFP 発現を指標として EBNA2 発現細胞を選択し、EBNA2 の細胞への影響を解析することが可能となった。

### 2.1.2 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

ヘルペスウイルス初感染が実際にどの程度遅延しているかを正確に把握するために、血清疫学調査を進めた。

#### 平成 16 年度の成果

血清疫学調査を行うために、国立成育医療センター、高知大学医学部、札幌医科大学からなる共

同研究を組織した。各々の機関において倫理委員会の承認を得た上で、新生児から成人に至る各年齢層から血清の収集を開始した。

成育医療センターにおいては、総合診療部（赤澤晃医長）との共同研究により、電子カルテシステムのなかで、説明・同意から研究用採血オーダー発行、採血、匿名化处理、分離、保管、同意書の保管等の作業を効率よく進めるためのシステムの構築が開始された。

### 2.1.3 風疹流行にともなう母児感染の予防対策構築に関する研究

#### 研究の背景

わが国では、平成6年の予防接種法改正により、生後12～90か月未満児への風疹ワクチン定期予防接種が開始された。その後、風疹患者数は大幅に減少したが、局地的な小流行と稀な先天性風疹症候群（CRS）は残存していた。また近年は、患者報告数のうち年長児（10歳以上）が占める割合が増加している。平成16年には流行が拡大し、平成12年から15年まで年間1例のみであったCRSが10例に達した。また、現在の制度では届出対象とならないCRS罹患児（単独症状など）も実際には多く発生しているものと推測された。このように現在の風疹及びCRSの発生状況は、緊急の対策を必要とすると考えられた。

#### 平成16年度の成果

平成16年に厚生労働省により組織された「風疹流行にともなう母児感染の予防対策構築に関する研究班」に当研究部（藤原）が参加し、「風疹流行および先天性風疹症候群の発生抑制に関する緊急提言」をまとめ公表した。また、CRS発生の背景因子を検索し、予防策構築に役立てるべく準備を開始した。

### 2.1.4 臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化

#### 研究の背景

造血幹細胞移植の一つ臍帯血移植は、ドナーの負担と危険がないこと、HLA不適合を許容しやすいこと、コーディネート作業が不要であり必要なドナー細胞を速やかに供給しうることなど多くの長所をもつため、近年急速に普及している。しかし欠点としては、1人のドナーから得られる細胞数が骨髄移植と比較して少ないため成人への適応が限られることや、生着不全をきたしやすいことがあげられる。また、移植後の悪性腫瘍再発や感染症に対してドナーリンパ球輸注療法（DLI）を施行できないことも重大な欠点である。そこで、難治性ウイルス感染症の治療法として確立されている活性化自己T細胞輸注療法を臍帯血細胞に応用し、活性化・増幅した臍帯血T細胞を用いてDLIを施行することを目指して基礎研究を開始した。

#### 平成16年度の成果

東京医科歯科大学、株式会社リンフォテック、日本大学医学部などと共同で研究を進めた。まず、臍帯血細胞を培養してDLIに用いる活性化T細胞を調整するためのプロトコールを作成した。特に、培養に用いるIL-2の濃度の検討と固相化抗CD3抗体による刺激期間の検討などを進めた。また、臍帯血移植のモデル実験系を作製するために、免疫不全NOGマウスに臍帯血幹細胞を移植し、ヒトT細胞、B細胞、マクロファージの分化を確認した。今後このマウスにEBVなどのウイルスを感染させ、ヒトウイルス感染モデルマウスを作製し、臍帯血DLIによる治療実験を行う予定である。

### 2.1.5 Flp-In/TRExシステムを用いた細胞内ウイルス遺伝子発現系の確立

#### 研究の背景

ウイルス因子と宿主因子の相互作用を理解することは、ウイルスの生活環や病原性発現機構を理解し、新たな診断・治療法を確立する上で極めて重要なステップと考えられる。Flp-In/TRExシステムを導入した細胞内ウイルス遺伝子発現系は、宿主細胞内にウイルス遺伝子を効率よく発現させ、各ウイルス遺伝子産物間の比較解析を正確に行うことを可能にするため、ウイルス因子と宿主因子

の相互作用を解析する上で、有用なシステムとなる。

平成 16 年度の成果

本年は、細胞レベルでウイルス因子と宿主因子の相互作用を理解する目的で、ヒト B 細胞株 BJAB に Flp-In/TREx システムを導入した細胞内発現系を構築した。さらに、EBV による細胞不死化の分子機構を解明する目的で、不死化に重要な役割を果す EBNA2, LMP1, LMP2A をこの発現系に導入した。現在、各 EBV 遺伝子の Doxycycline による発現誘導の確認を行うとともに、EBV 遺伝子発現による細胞遺伝子発現への影響を解析している。

## 2.1.6 ヘルペスウイルスによる免疫回避機構に関する研究

研究の背景

EBV は他のヘルペスウイルス同様、一度感染すると終生にわたり持続感染し、宿主の免疫能の低下にともないウイルスの再活性化や感染細胞の異常増殖など所謂日和見感染症を引き起こす。従って、日和見感染症の予防・治療法を確立するためには、EBV の持続感染機構および宿主の免疫応答機構の理解が重要である。ヘルペスウイルスは、持続感染を可能にするために宿主の免疫応答を回避する種々の機構を備えていることが次第に明らかになってきているが、EBV における宿主免疫回避機構は殆ど解明されていない。そこで、当研究室では、EBV の抗インターフェロン作用の分子機構に注目し研究を行っている。

平成 16 年度の成果

細胞の不死化に重要な EBV 蛋白質を発現するプラスミドベクターを細胞に導入し、インターフェロン反応性を示す特徴的な配列 GAS(IFN- $\gamma$ -activated sequence)および ISRE(IFN-stimulated response element)を含むプロモーターの活性に影響を及ぼす EBV 蛋白質をルシフェラーゼアッセイによって探索した。これまでに、一つの EBV 遺伝子を候補として見出した。現在、このウイルス蛋白質を上記の Flp-In/TREx システムを用いて、BJAB 細胞へ導入した細胞株を樹立している。

## 2.2 感染防御研究室

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ことを目的としている。特に、好中球の活性酸素生成機構(NADPH oxidase system)の解析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。NADPH oxidase は、細胞膜因子(cytochrome *b558* の 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、Rac2 に制御されている。この数年、真菌毒素グリオトキシンによる NADPH oxidase の阻害機序を解析しているが、本年度は、*in vitro* 再構成系を用いて、グリオトキシンの NADPH oxidase 各構成因子に対する直接毒性を検討した。

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

分子生物学的手法、更に、最近では、X 線結晶解析、NMR 等を用いた構造生物学も展開され、活性酸素生成機構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実体は明らかでない。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る。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、病原因子による好中球 NADPH oxidase の阻害は、アスペルギルスの宿主エスケープにとって最も効果的な方法であると言える。

アスペルギルス侵襲性の理解を目的として、アスペルギルス病原因子の活性酸素生成系に対する影響を解析した。その第一報として、病原因子グリオトキシンが好中球の活性酸素生成を阻害することを細胞レベルで明らかにした(BBRC 268: 716-723, 2000)。他のアスペルギルス由来病原因子(フ

マギリン、ヘルポリック酸など)は、高濃度でも阻害活性を示さなかった。細胞レベルでの阻害は、グリオトキシンが細胞刺激に伴う細胞骨格系の再編成を阻止することにより、細胞膜上に於ける protein kinase C と p47 の会合が阻止され、p47 のリン酸化が阻害されることにより惹起されることが明らかになった (Infect Immun 72: 3373-3382, 2004)。

本年度は、in vitro再構成系を用いて、グリオトキシンがNADPH oxidaseの各構成因子に直接毒性を示すか検討した。未刺激好中球から調整した細胞膜とサイトゾルをアラキドン酸やミリスチン酸などの両親媒性物質存在下でインキュベートすると、NADPH oxidaseはin vitroでも活性化されO<sub>2</sub>を生成する。まず、グリオトキシン処理・未処理好中球から得た細胞膜およびサイトゾルを組み合わせる再構成実験を行った所、処理膜はコントロールの未処理膜に比べて60%のO<sub>2</sub>生成活性しか示さなかった。これに反し、グリオトキシン処理好中球のサイトゾルは、未処理好中球のサイトゾルとほぼ同じO<sub>2</sub>生成活性を保持していた。従って、グリオトキシンは、細胞膜因子であるcytochrome b558 を標的とする可能性が示唆された。

部分精製したcytochrome b558 と組み換えサイトゾル因子を用いて再構成した場合も、グリオトキシンは直接毒性を示し、IC<sub>50</sub>は3.3 μMであった。しかし、一旦活性化されたNADPH oxidaseの触媒活性は阻害しなかった。Cytochrome b558 および各組み換えサイトゾル因子を単独でグリオトキシン処理した後、未処理の因子と組み合わせて再構成実験を行った所、cytochrome b558 のみが阻害され、殆どの活性が失われていた。従って、グリオトキシンは、サイトゾル因子ではなく、cytochrome b558 に直接毒性を示すことが明らかになった。

未刺激好中球のp47 は、自身のSH3 region と autoinhibitory region 間で分子内結合をしているため不活性型である。ミリスチン酸などの両親媒性物質はこの分子内結合を開裂させ、cytochrome b558 および p67 との結合を促し、in vitro でNADPH oxidase を活性化させる。そこで、in vitro で再構成を行った後、抗 p47 抗体を用いて免疫沈降を行った。P67 および cytochrome b558 はミリスチン酸刺激に依存してp47 と共沈したが、グリオトキシンはこれらの会合を阻害しなかった。更に、グリオトキシンは、cytochrome b558 の酸化還元スペクトルにも影響を与えず、ヘムは破壊されていなかった。

グリオトキシンは毒性の強い epipolythiodioxopiperazine 環を持つことに特徴があり、vicinal SH 基と反応して阻害活性を示すことが知られている。NADPH oxidase の酸化還元中心である cytochrome b558 の gp91 サブユニットには二ヶ所の vicinal SH 基が存在する。一つはサイトゾル側のヘム結合部位に近い cys85-86、もう一つは FAD と NADPH 結合部位の間に存在する cys369-cys371 である。グリオトキシンは、片方あるいは両方の vicinal SH 基と反応して gp91 の電子伝達反応を阻害し、侵襲性を発揮すると考えられる。Cytochrome b558 の p22 サブユニットには、vicinal SH 基は存在しない (Infect Immun, in press)。

### 3. 社会活動・情報発信

#### 3.1 教育活動

藤原成悦 日本大学医学部兼任講師 ウイルス学

#### 3.2 情報発信

「風疹流行および先天性風疹症候群の発生抑制に関する緊急提言」

「風疹流行にともなう母児感染の予防対策構築に関する研究班」藤原成悦