

## 4-2-6 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に属しヒトに感染するウイルスは現在 8 種を数え、胎児・小児期感染症の主要病原因子をふくんでいる。また、この科のウイルスの多くは大多数の人に潜伏感染する常在ウイルスの側面を持つが、移植後などの免疫不全状態では重篤な日和見感染症を引き起こす。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と考えられるが、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。また、移植治療の普及により免疫不全宿主が増加したため、ヘルペスウイルスによる日和見感染症が重要課題となっている。小児感染症研究室では、EB ウイルスやサイトメガロウイルスなど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初感染の実態を明らかにするために、血清疫学調査を進めている。感染防御研究室は、小児の自然免疫による生体防御機構を分子細胞生物学的観点からアプローチし、小児期特有の疾患・病態を明らかにすることを目的とする。本年度は、好中球によるペロ毒素デリバリーシステムと、川崎病と冠状動脈内皮細胞に於ける活性酸素生成系の研究を行った。

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）、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）、鶴飼由美（共同研究員）、小黑清加（共同研究員）、今井由美（実験補助員）、吉田ルシア幸子（共同研究員）、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の中心となっている。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。具体的には、EBV 感染による誘導される CD40 シグナルを標的とする増殖制御を検討している。

これまでの成果

CD40 は通常 B 細胞などの抗原提示細胞に発現され、CD40 リガンド（CD40L）は活性化 T リンパ球に発現される。B 細胞の活性化には、抗原刺激と活性化 T 細胞からのヘルプの二者が必要であるが、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 細胞の分化などにおいても重要な役割を果たす。EBV 感染と CD40 シグナルの関係については、EBV 感染により B 細胞に CD40L の発現が誘導され、CD40L から CD40 へのシグナルがアポトーシスを抑制することにより、EBV による不死化に寄与することが知られていた。さらに、この数年間の当研究部における研究により、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 8 株）の全例で、CD40 と CD40L が共発現され、両者の相互作用を阻害すると、アポトーシスが增加することが示された。

平成 17 年度の成果

主に EBV 感染上皮細胞における CD40 シグナルの役割について検討した。胃がん由来ヒト上皮細胞株 3 株と、それぞれの株に実験的に EBV を持続的に感染させた亜株を RTPCR 法により解析したところ、EBV 感染亜株では 3 株ともに CD40L の発現が認められたが、未感染株はいずれも CD40L 陰性であった。CD40 の発現は EBV 感染と無関係にすべての細胞に認められた。これらの

EBV 持続感染亜株二つにおいて、CD40 と免疫グロブリンの融合蛋白質 (CD40Ig) により CD40L から CD40 へのシグナルを阻害したところ、増殖速度の低下が認められた。EBV 未感染株では増殖速度は変化しなかった。さらに、上記胃癌由来 3 細胞株に一過性に EBV を感染させたところ、感染後に CD40L 発現の誘導が RT-PCR 法により認められた。これらの結果は、上皮細胞においても EBV 感染が CD40 と CD40L の共発現状態を誘導し、両者の相互作用による CD40 シグナルが胃癌細胞の増殖を促進することを示唆する。

### 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 17 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、札幌医科大学において、新生児から成人に至る各年齢層から血清の収集を進めた。成育医療センターにおいては、総合診療部 (赤澤晃医長ら) 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、匿名化処理、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が作製された。以上のうち国立成育医療センターおよび札幌医科大学において収集された血清の一部で EBV 抗体の測定が開始された。

### 2.1.3 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

臍帯血移植患者に対するドナーリンパ球輸注療法 (DLI) を実現するために、すでに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する研究を進めて来た。これまでに、臍帯血細胞を培養して DLI に用いる活性化 T 細胞を調整するプロトコールの検討などを行ってきた。

平成 17 年度の成果

臍帯血 DLI のモデル実験系として利用するために、EBV 感染モデルマウスの作製を進めた。NOD/Shi-scid/IL-2R<sup>-/-</sup> マウス (以下 NOG マウス) にヒト臍帯血幹細胞を移植すると、ヒト由来の B 細胞、T 細胞、NK 細胞、マクロファージ、樹状細胞が分化することがすでに確かめられているが、このヒト型 NOG マウスの脾臓および骨髄より B 細胞を分離し、*in vitro* において EBV を感染させたところ EBV 陽性のリンパ芽球様細胞株が樹立された。この細胞株は、EBV 遺伝子発現、B 細胞表面抗原などの発現において、通常のヒト LCL と区別できなかった。この結果から、*in vivo* の感染も成立することが予想され、平成 18 年に感染実験が開始された。

### 2.1.4 Flp-In/TREx システムを用いた T 細胞内 EBV 遺伝子発現系の確立

研究の背景

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・治療法を確立するためには、ウイルス遺伝子産物と宿主因子との相互作用を理解することが重要なステップと考えられる。Flp-In/TREx システムは、ヒト細胞株に効果的にウイルス遺伝子産物を発現させ、ウイルス遺伝子産物と宿主因子との相互作用を解析する上で有用なシステムとなる。EBV の標的細胞は、B リンパ球が一般的だが、慢性活動性 EBV 感染症や EBV 関連血球貪食症候群などの病態では、T リンパ球や NK 細胞が EBV の標的細胞となっていることが知られている。しかし、T リンパ球や NK 細胞に対する EBV の作用は未知な部分が多い。

平成 17 年度の成果

本年は、T リンパ球に対する EBV 遺伝子産物の作用を理解する目的で、ヒト T 細胞株 Jurkat に Flp-In/TREx システムを導入した EBV 遺伝子発現系 Flp-In/TREx Jurkat 細胞を樹立した。さ

らに、Flp-In/TREx Jurkat 細胞に LMP1 蛋白質を誘導性に発現する Flp-In/TREx Jurkat-LMP1 細胞を樹立した。この Flp-In/TREx Jurkat-LMP1 細胞を用いて、LMP1 蛋白質発現にともなって変化する細胞遺伝子群を DNA チップを用いて同定した。現在、DNA チップ解析によって同定された細胞遺伝子群の発現変化について、RT-PCR 法・ウェスタンブロット法・ルシフェラーゼアッセイ等によって解析を進めている。

## 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。一方、活性酸素生成系が様々な疾患の病態形成に関与することが報告されているが、川崎病に於ける血管炎発症との関係は不明である。最近、血管内皮細胞にも活性酸素生成系が発見され、血管炎発症の引き金になる可能性が示唆されている。そこで、血管内皮細胞に於ける活性酸素生成系の解析を行って、冠状動脈瘤発症の病理を理解したいと考えている。更に、溶血性尿毒症患児の好中球にペロ毒素が結合していることが報告されている。この好中球に結合したペロ毒素が標的細胞へ運搬され重篤化の促進要因になる可能性が考えられる。そこで、好中球に於けるペロ毒素の結合動態を解析した。

### 2.2.1 川崎病と冠状動脈内皮細胞に於ける活性酸素生成系

川崎病は未だ原因不明な乳幼児期に多い急性熱疾患であり、全身性の急性血管炎を引き起こす。患児の約 10%が冠状動脈瘤を併発し、突然死に至る場合もある。冠状動脈瘤の発症機序は解明されていないが、血管内膜傷害による冠状動脈の弱体化に起因すると考えられている。冠状動脈瘤形成に先立って、血管作動性物質 [interleukin (IL)-1 and -6, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and - $\beta$ , vascular endothelial growth factor (VEGF)等] の血中濃度の持続的な上昇が報告されている。この事実は、これらのサイトカイン・ケモカインが川崎病で認められる重篤な血管内皮傷害に関与することを示唆している。最近、非食細胞にも食細胞の活性酸素生成酵素 (NADPH oxidase) のホモログ遺伝子が続々と発見され、Nox/Duox family と命名されている。Nox family は、血管壁構築細胞(内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞)にも発現しており、川崎病患児に於いて高値を示す TNF- $\alpha$ 、VEGF 等がこれを活性化することが報告されている。従って、川崎病急性期に高値サイトカインの作用により血管内皮細胞の活性酸素生成能が亢進し、その酸化ストレスが血管内皮細胞の傷害、ひいては、血管壁全層の傷害に至り、動脈瘤を形成する可能性が考えられる。しかし、血管内皮細胞を含む血管壁構築細胞に於ける活性酸素生成系の全体像は明らかにされていない。本年度は、川崎病に於ける全身性血管炎、特に、冠状動脈瘤の発症病理を理解すべく、冠状動脈血管内皮細胞の活性酸素生成能および冠状動脈疾患の臨床マーカーである neopterin の影響を解析した。

In vitroで培養したヒト冠状動脈血管内皮細胞 (HCAEC) のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成活性をスコポレチン法で調べた。感染防御を担う食細胞は異物を認知して、あるいは、phorbol myristate acetate (PMA) 等で刺激して初めて活性酸素を生成する。興味深い事に、HCAECは、これら異物や刺激剤が存在しない条件下でも自発的に活性酸素を生成することが分かった。そして、培養開始後、HCAECのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成活性は上昇し、4日目に最大活性を示した。このH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成活性は、PMAで刺激したマクロファージより6倍高い値であった。カタラーゼの添加により、スコポレチンの蛍光減少が完全に抑制されることから、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を特異的に定量したと言える。

Neopterinは、各種冠状動脈疾患において必ず血中濃度が上昇するため、これら疾患の診断に於ける臨床マーカーとなっている。川崎病急性期の患児では、血中のneopterin濃度が20~50 nMとなっており、先天性心臓疾患患児の2.5~5.0倍の高値を示す。Neopterinは、活性化マクロファージ・単球が産生することが知られているが、その生理活性および冠状動脈疾患に於ける発症病理への関与は不明である。そこで、HCAECのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成活性に対するneopterinの影響を検討した。

HCAEC (day 2) を neopterin 存在下で 4 時間培養したところ、neopterin 濃度に依存して  $H_2O_2$  生成活性が亢進した。

以上、ヒト冠動脈血管内皮細胞 (HCAEC) が自発的に高い  $H_2O_2$  生成活性を示めることが明らかになった。今後、neopterin を含めて川崎病急性期に上昇する血管作動性物質の中から血管内皮細胞に高い  $H_2O_2$  生成活性を付与する因子を検索する。更に、血管内皮細胞の自発的  $H_2O_2$  生成を担う責任因子を同定してその生成機序を明らかにし、川崎病における血管炎発症および冠動脈瘤形成の発症病理を明らかにしたいと考えている。

## 2.2.2 好中球によるペロ毒素デリバリーシステム

ペロ毒素産生大腸菌 (VTEC) は、腸管粘膜に定着した後、腸管壁細胞を破壊して組織傷害をもたらす。特に、小児では溶血性尿毒症症候群 (HUS) や脳症等の重症合併症を引き起こす。ペロ毒素 (VT1、VT2) は、腸管からこれら標的組織へ運搬された後、ペロ毒素に高い親和性を示すスフィンゴ糖脂質 Gb3 (globotriaosylceramide: CD77) へ B サブユニットを介して結合し、A サブユニットが逆行性輸送によりゴルジネットワークを介して細胞質へ到達し、リボソーム RNA 切断酵素として働きタンパク質合成を阻害する。腎臓の血管内皮細胞や尿管上皮細胞は、細胞表面に多くの Gb3 を発現しているためペロ毒素に対して感受性が高い。VTEC 感染初期、腸管粘膜に好中球の浸潤が認められ、ペロ毒素 (特に VT2) が好中球増多、末梢血への遊走を亢進することが知られている。更に、HUS 患児では、好中球への VT1 および VT2 の結合も報告されている。そこで、好中球が腸管から標的組織へのペロ毒素の運搬を担うかも知れないと考えた。

好中球のペロ毒素レセプターを同定する目的で、細胞から中性糖脂質を抽出した後、薄層クロマトグラフィーで展開した。PVDF 膜に転写した後ペロ毒素と反応させ、抗ペロ毒素抗体を用いてレセプターを検出した。その結果、標的細胞のレセプターである Gb3 と異なる位置にバンドを確認した。他にペロ毒素と反応するバンドはなく、VT1 および VT2 の結合活性に差は認められなかった。質量分析法を用いてこのバンドを解析し、ある種のスフィンゴ糖脂質であることを同定した。薄層クロマトグラフィーで展開した全中性糖脂質の質量分析を行ったが、Gb3 は検出されなかった。次に、Alexer Fluor 488 で蛍光ラベルしたペロ毒素を末梢全血とインキュベートした後 FACS で解析したところ、顆粒球 (殆ど好中球) にのみ結合し、リンパ球、単球、そして、赤血球には結合しなかった。現在、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて好中球に於けるペロ毒素の細胞内動態を解析している。

## 3. 社会活動・情報発信

### 3.1 教育活動

藤原成悦	日本大学大学院医学研究科	特別講義
	東京医科歯科大学大学院 (発生・生殖学特論)	非常勤講師
網脇祥子	東京大学医科学研究所 細菌感染分野セミナー	(好中球の生化学と感染防御)

### 3.2 特別講演

藤原成悦、「EB ウイルス感染症をめぐる新しい状況と研究の進展」、第 108 回日本小児科学会学術集会教育講演、2005 年 4 月 24 日、東京。

藤原成悦、「EB ウイルス感染症について」、第 2 回東京小児感染免疫懇話会教育講演、2005 年 9 月 8 日、東京。

### 3.3 情報発信

藤原成悦	朝日新聞朝刊「医療」欄、「ヘルシスト」誌などでコメント
網脇祥子	慢性肉芽腫症の確定診断