

## 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、川崎病モデルマウス、および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)、矢島美彩子(ヒューマンサイエンス流動研究員、流動研究員)、山田恵理(東京バイオテクノロジー専門学校インターン)、末廣正和(帝京科学大学卒研究生)、石井千尋(実験補助員)、吉田ルシア幸子(共同研究員)、佐藤理佳(共同研究員)

### 2. 研究成果

#### 2.1 小児感染症研究室

##### 2.1.1 ヒト化マウスを用いたウイルス感染モデルの作製と応用

背景と昨年までの研究成果

移植治療やエイズなどの免疫不全状態で発生する EBV 陽性リンパ増殖性疾患 (LPD) のモデルとしては、従来 EBV 陽性リンパ芽球様細胞株 (LCL) あるいは EBV 既感染者末梢血リンパ球を移植した scid マウスが用いられてきた。しかし、この実験系では、EBV 感染後の初期過程や、免疫応答、潜伏感染状態などを含めた感染の全体像が再現されず、十分なモデルとはいえなかった。近年伊藤らにより開発された NOD/scid/ c-/- (NOG) マウスでは、ヒト造血幹細胞を移植すると、EBV の主な標的となる B 細胞をはじめ、T 細胞、NK 細胞、マクロファージ、樹状細胞などヒト免疫系の大部分が再構築される。そこで我々は、ヒト臍帯血幹細胞を移植し免疫系を再構築した NOG マウス (ヒト化マウス) に EBV を接種し、EBV 感染モデルを作製することを試みた。

平成 18 年の成果

1) NOG マウスに臍帯血由来 CD34 陽性造血幹細胞を移植すると、2 ヶ月後末梢血にヒト B 細胞が出現し 4 ヶ月後には T 細胞が出現することが確認された。2) このマウスに EBV を静脈内あるいは腹腔内接種したところ、いずれのルートにおいても感染が成立し、末梢血に EBV 感染細胞が出現した。一部のマウスでは末梢血中の EBV が検出されなかったが、脾臓・リンパ節などから EBV が検出された。3) 一部の感染マウスに latency III 型ウイルス遺伝子発現 (EBNA1+, EBNA2+, LMP1+, LMP2A+) を示す LPD 様リンパ腫が発生した。また、リンパ腫が認められないマウスにおいても、脾臓、リンパ節などから EBV が継続的に検出された。リンパ腫の発生率は移植後 3 ヶ月にウイルス接種した場合に、6 ヶ月よりも高かった。4) 感染直後に末梢血 EBV DNA 量の増加と一致してヒト CD8 陽性 T 細胞が増加した。現在、EBV 特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) の存在を検討している。以上の結果は、本感染モデルにおいてウイルス特異的免疫応答を含めた EBV 感染

の全体像が再現される可能性があることを示唆している。また移植後3ヶ月でヒトT細胞の分化が認められない時期でのEBV感染により、6ヶ月でT細胞が分化した時期と比べて高率にリンパ腫が発生したことは、T細胞の応答がこのマウスにおいてリンパ腫の発生を抑制する、すなわちヒトのEBVに対する免疫監視機構を再現している可能性を示唆する。EBV感染症の病態と発症機構の解明や、新規治療法の効果判定と作用メカニズム解析などに有用であると考えられる。現在、活性化T細胞輸注療法の効果を検討中である。今後、他の血液・免疫系細胞に感染するヒトウイルスについても、ヒト化マウスを用いて感染モデルの作製を試みる予定である。

## 2.1.2 EBV感染細胞の増殖機構解明と増殖制御法開発に関する研究

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(LPD)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、増殖阻止法の確率が新規治療法の基盤となる。

### 2.1.2.1 ヒト細胞株におけるEBV遺伝子発現系の構築とEBV遺伝子産物の機能解析

#### 研究の背景

EBVは一般にB細胞に感染し細胞増殖性疾患を引き起こすが、慢性活動性EBV感染症やEBV関連血球貪食症候群などでは、EBV感染T細胞およびNK細胞の増殖が病態に関与すると考えられている。EBV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、EBV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ことから、ヒト細胞株にEBV遺伝子産物を効果的に発現させ得るFlp-In/TRExシステムをヒト細胞株に導入し、ウイルス遺伝子産物と宿主因子との相互作用の解析を行っている。

#### 平成18年度の成果

本年は、EBVがコードするがん遺伝子LMP1のT細胞における機能解析を目的として、Flp-In/TRExシステムを導入したヒトT細胞株Jurkatにおいて、LMP1をinducibleに発現したときの細胞遺伝子の発現変化を検討した。その結果、一部のリンパ性白血病や乳がんなどの関連が示唆されているbcl-3遺伝子の発現誘導を見出した。bcl-3蛋白質は、慢性活動性EBV感染症および鼻性NK/Tリンパ腫の症例より樹立されたEBV感染T/NK細胞株において高発現が観察された。さらに、LMP1はNF- $\kappa$ B経路の活性化を介してbcl-3プロモーターを活性化すること、LMP1の細胞質内領域がbcl-3プロモーターの活性化に関与していることを見出した。これらの結果より、EBV感染細胞では、LMP1によるbcl-3の発現誘導が病態と関連する可能性が示唆された。現在、EBV感染細胞におけるbcl-3蛋白質の機能についてさらに解析を進めている。

### 2.1.2.2 CD40とCD40リガンド(CD40L)の相互作用阻害によるEBV感染細胞の増殖制御

#### 背景と昨年までの研究成果

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、アポトーシスを抑制する。これまでに、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し、EBVによる不死化に寄与すること、CAEBVや鼻性T/NK細胞リンパ腫のEBV陽性TおよびNK細胞でもCD40とCD40Lが共発現され、両者の相互作用を阻害すると、アポトーシスが増加することが、我々により示されてきた。またTおよびNK細胞におけるCD40発現は、EBV感染症と特異的に関連しているため、診断根拠となることを提唱してきた。

#### 平成18年の成果

CAEBVの5症例について、確定診断のためにEBV感染細胞の表面マーカー発現を解析した。その結果、NK細胞に感染しているものが1例、CD4陽性T細胞に感染しているものが1例、CD8陽性細胞に感染しているものが2例、CD8陽性T細胞およびCD19陽性B細胞に感染しているものが1例であった。最後の1例は再発例であり、今後、ウイルスゲノムと細胞の由来(ドナーかレシピエントか)を初発時と再発時の間で比較することにより、CAEBV発症メカニズムについて興味深いデータ

が得られると考えている。

### 2.1.3 サイトメガロウイルスに関する研究

#### 2.1.3.1 サイトメガロウイルスの実験的感染系の確立および解析

背景と昨年までの研究成果

従来、in vitro における CMV 感染実験では、Towne 株、AD169 株、Toledo 株などの実験室株がよく用いられてきたが、健常者あるいは CMV 感染症患者からの新鮮分離株を用いた実験は不十分であった。

平成 18 年の成果

実験室株として汎用されている Towne 株に加えて、健常人の尿検体より得られた新鮮分離株 C10（国立感染症研究所 井上直樹博士より供与）を用い、不死化ヒト線維芽細胞株 BJ1 を宿主とする in vitro CMV 感染系を確立した。これにより、上記 2 種類の CMV 株が BJ1 細胞において溶解感染が可能であること、溶解感染によって培養液中に放出される子孫ウイルスも BJ1 細胞に再感染が可能であることを確認した。

#### 2.1.3.2 CMV がコードする未知の遺伝子産物の同定

背景と昨年までの研究成果

CMV の遺伝子産物の機能解析には、Towne 株などの実験室株が汎用されてきた。しかし、実験室株は長期にわたって継代培養されているため、ウイルスゲノムに欠損などの変異を有していることが知られている。そのため、実験室株における欠損領域の機能解析は十分に行われておらず、未知の遺伝子産物が存在する可能性が指摘されている。このような理由から、CMV の病原性を正確に理解するためには、新鮮分離株における遺伝子産物の機能解析が重要であると考えられる。

平成 18 年の成果

前述の新鮮分離株 C10 を感染させた BJ1 細胞から全 RNA を抽出し、単鎖 cDNA ライブラリーを作成した。このライブラリーを鋳型として、未知の遺伝子が存在する可能性がある領域にプライマーを設計し RT-PCR を行った。その結果、未知の転写産物が複数存在することを示す結果を得た。現在、RACE 法による全長 cDNA のクローニングを試みるとともに、未知の遺伝子産物を認識する抗体の作製を進めている。今後、未知の遺伝子産物の同定および機能解析を通して、病原性との関連を解析する予定である。

## 2.2 感染防御研究室

感染防御研究室では、小児の自然免疫による感染防御機構を分子生物学的観点からアプローチし、小児期特有の疾患・病態を明らかにして成育医療に貢献することを目標にしている。食細胞の活性酸素生成系およびその異常症である慢性肉芽腫症の解析・確定診断を行ってきた。近年、この食細胞活性酸素生成系のホモログ遺伝子が様々な組織に発見され Nox family NADPH oxidases (Nox1 ~ Nox5) と呼ばれている。この背景を踏まえ、食細胞に発現している古典的 Nox2 に関しては、病原体との攻防を明らかにすると共に、川崎病、成育医療センターで企画されている遺伝子治療の判定を行う。更に、腸管から体循環への志賀毒素の輸送に関しては腸上皮細胞の Nox1、川崎病に於ける血管炎発症に関しては血管内皮細胞の Nox4 を中心に据えてこれら小児の病態を明らかにし、新しい治療法に繋げることを目標にしている。

### 2.2.1 好中球による志賀毒素輸送機構に関する研究

腸管出血性大腸菌 (EHEC) は、小児の出血性大腸炎に於ける主要病原菌であり、先進国で多発している。EHEC は非侵襲性細菌であり、腸管粘膜に定着するが腸上皮細胞内に進入することはない。しかし、外毒素である 2 種類の Shiga toxins (Stxs : Stx1 および Stx2) を産生し、Stxs は体循環を経て標的組織に傷害を引き起こす。腎糸球体血管内皮細胞や尿管上皮細胞は、Stxs に強い親和性を示すスフィンゴ糖脂質 Gb3 を高発現しているため感受性が高く標的細胞となる。Stxs による腎障害は溶血性尿毒症 (HUS) へと重症化する傾向があり、脳症を引き起こして死に至る場合もある。従って、腸管から体循環への Stxs の移行、即ち、腸管バリアーの破壊が EHEC 感染症に於ける重症

化の決定的要因であると言える。しかし、これまで腸管から標的細胞への Stxs の輸送は解明されていない。EHEC 感染初期、腸管粘膜に好中球の浸潤が認められ、また、末梢白血球中、顆粒球（殆ど好中球）のみに結合することが報告されている。更に、最近、HUS 患児の末梢好中球に Stxs が結合している臨床例が報告された。しかし、好中球および腸上皮細胞に Stxs レセプターである Gb3 は発現しておらず、腸管から標的細胞への Stxs の輸送機構は解明されていない。標的組織である腎系球体に多くの好中球が浸潤している事実を考えると、好中球が Stxs の運搬を担う可能性は大きい。

Alexer Fluor 488 で蛍光ラベルした Stx1、Stx2 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、共に顆粒球（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。次に、好中球の Stxs 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 Stxs と反応させ、抗 Stxs 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 Stxs と反応するバンドはなく、Stx1 および Stx2 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。標的細胞の Gb3 に結合した Stxs は、逆行性輸送によりエンドソーム、ゴルジ体、小胞体を経由して細胞質へ到着し、rRNA 切断酵素として働いて細胞傷害を引き起こすことが知られている。しかし、好中球は専ら異物処理を行う食細胞であるため、リソソームは発達しているがタンパク質合成を担うゴルジ体、小胞体は未発達である。共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて好中球に於ける Stxs の細胞内動態を解析したところ、これらのオルガネラには検出されず核に集積することが判明した。最近、食細胞に於いて IL-8 を含めた炎症性ケモカインの産生に Nox2 の生成する活性酸素の役割が注目されている。更に、Stxs が腸上皮細胞から好中球走化性因子 IL-8 の産生を誘導することが報告されている。今後、「腸上皮細胞に結合した Stxs が Nox1 型 NADPH oxidase を活性化して IL-8 の産生を促し、その結果、腸内へ好中球を遊走させて腸管バリアーを破壊し、腸管内で Stxs と結合した好中球が体循環を経て標的細胞へ毒素を運搬する」との仮説を立て、研究を進める予定である。

### 2.2.2 川崎病の冠動脈瘤発症に於ける Nox family NADPH oxidases の動態解析

川崎病は全身性の難治性血管炎を発症し、冠動脈瘤を併発する小児特有の急性熱疾患である。1967 年に報告されて以来、未だ病因は特定されていない。しかし、何らかの感染因子が引き金となり、その発症に患児の遺伝的素因が関与するかも知れないと考えられる様になった。冠動脈瘤の形成に先立って血管作動性物質（IL-1、IL-6、endothelin-1、TNF-、VEGF 等）の血中濃度の持続的な上昇が報告されている。一方、活性酸素が様々な疾患の病態形成に関与することが示唆されているが、川崎病に於ける血管炎発症との関係は不明である。最近、食細胞以外にも多くの組織に活性酸素生成酵素 Nox (Nox: NADPH oxidase) が発現していることが明らかになった。Nox 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、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。

今年度は、川崎病に於ける血管炎の発症病理を理解すべく、瘤の発生頻度が最も高いヒト冠動脈血管内皮細胞（HCAEC）に於ける Nox の動態解析を行った。興味深い事に、HCAEC は、食細胞と異なり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 で刺激した活性化マクロファージより 6 倍高い値であった。次に、冠動脈疾患の臨床マーカーである neopterin の影響を解析した。川崎病急性期の患児では、血中の neopterin 濃度が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動脈疾患に於ける発症病理との関係は不明である。そこで、neopterin 存在下で HCAEC を培養したところ、4 時間で H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成活性が亢進した。更に、川崎病急性期に上昇する TNF- $\alpha$  がその H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成活性を上昇させることも分かった。次に、HCAEC に於ける活性酸素生成系を明らかにすべく、各種

Noxを解析したところ、Nox4の発現が最大であり、他にNox1、Nox2の発現も認められた。現在、これらNoxの活性調節因子であるNOXA1、NOXO1、p67、p47、p40、Racの発現を含め、川崎病急性期に上昇するサイトカインによりどのNox系が変動するか解析している。

### 2.2.3 川崎病モデルマウスの作製

好中球のNox2は、生体組織中最大の酸素ラジカル発生源である。冠動脈瘤の組織学的解析から病変部位に好中球の顕著な浸潤が他の炎症細胞に先行することが報告されている。活性化された好中球は顆粒内プロテアーゼだけでなく大量の活性酸素を放出するため、冠動脈病変に至るまでの組織傷害に大きく影響すると考えられる。更に、病態が進行すると、内弾性板や中膜平滑筋層などの動脈構築組織が弱体化し、冠動脈瘤が形成されることが指摘されている。この冠動脈瘤の破裂は、好中球に多く含まれるエラスターゼによるエラスチンの切断が決定的である。従って、冠動脈瘤の形成には、急性期の炎症性サイトカイン、好中球由来の活性酸素およびプロテアーゼが深く関わり合っていると考えられるが、その詳細は明らかにされていない。そこで、現在、*Lactobacillus*の細胞壁抽出物を精製して、冠動脈瘤を含めた川崎病の全身性血管炎を再現できるモデルマウスを作成中である。そして、Nox2欠損マウスを用いて好中球由来の活性酸素(Nox2)が川崎病の発症に関与しているか決着をつける予定である。更に、循環器系疾患に臨床応用されてるラジカル消去剤エダラボンなどの治療効果を検討し、抗フリーラジカル療法を目指す。

## 3. 社会活動・情報発信

### 3.1 教育活動

網脇祥子．北里大学薬学部 衛生化学特論（活性酸素研究の最前線）

今留謙一．東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科講義（ヘルペスウイルス感染と免疫機構）

### 3.2 特別講演

藤原成悦．「EBウイルスとリンパ球の増殖」．第16回EBウイルス感染症研究会特別講演．2006年5月27日、東京．

中村 浩幸．腫瘍関連ヘルペスウイルスの病原性発現機構．第88回小児血液腫瘍懇話会招待講演，東京，3月17日，2006．