

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

母児感染研究部の研究目標は、胎児・小児期感染症の病態を分子・細胞・個体レベルの各レベルで解析し、その成果を診断・治療法開発に応用することにある。主な研究対象はEBウイルス（EBV）とサイトメガロウイルス（CMV）である。成育医療においてこれらのウイルスは主に免疫不全状態の日和見感染や先天性感染症の原因として重要である。移植治療が普及したことにより、臓器の拒絶を防ぐために免疫抑制剤を投与され免疫不全状態となった患者さんが増加している。従って、日和見感染症は早急な対応を迫る重要課題となっている。また、生活習慣や衛生環境の変化により我が国では、小児期において上記のウイルスを含むヘルペスウイルス一般に感染しにくくなり、最初の感染がおきる年齢が上昇し始めている。思春期以降に初めて感染すると強い症状が出ること（EBVによる伝染性単核症など）や、妊娠時に初感染すると胎児や新生児への感染（先天性CMV感染症など）につながる人が多いので、ヘルペスウイルス感染症像が変化する可能性がある。ヘルペスウイルスは、一生の間には大多数の人が感染する極めて普通なウイルスであるため、このような感染症像の変化は社会的にも大きな影響を与えると考えられ、政策的対応の基盤となる研究成果が望まれる。具体的な研究内容としては、免疫不全状態で発症するリンパ増殖性疾患や慢性活動性EBV感染症活動性EBV感染症などのEBV関連疾患について、リンパ球増殖の分子機構解明、動物モデルを用いた発症機構解明と治療法開発、実際の移植患者におけるEBV感染動態の解析と診断・治療に対する支援を行っている。CMVについては、新鮮分離CMV株がコードする新しいウイルス蛋白質を同定した。また、先天性CMV感染症の新生児マスキングと感染児のフォローアップ体制の確立に関する研究の一環として、先天感染児のCMV特異的免疫応答と病態との関連を追及している。さらに、多能性幹細胞（iPS細胞）を用いて、発生期のヒト組織に対するCMVの障害作用の研究を最近開始した。なお、感染防御研究室は別個のプロジェクトとして、食細胞を中心とした活性酸素生成系に注目し、小児期特有の疾患・病態に関する研究を行っている。

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（臨床研究フェロー）、矢島美彩子（流動研究員）、廖華南（流動研究員）、守屋美恵（ヒューマンサイエンス流動研究員）、川野布由子（帝京科学大学大学院修士課程）、市川紗弓（東京医科歯科大学大学院修士課程）、田中久美子（帝京科学大学卒研究生）、内田友祐（東京電機大学博士前期課程）、新津美砂（東京理科大学卒研究生）、浦野 遥（帝京科学大学卒研究生）、吉田ルシア幸子（共同研究員）、紙田智子（実験補助）、中條かおり（実験補助）、立見裕子（事務補助）。

2. 研究成果

2.1 小児感染症研究室

2.1.1 移植後リンパ増殖性疾患などEBV関連疾患の治療法開発

2.1.1.1 ヒト化マウスを用いたEBV感染モデルの作成と応用

伝染性単核症をはじめ、ホジキン病などの悪性疾患、移植後のリンパ増殖性疾患、さらに慢性活動性EBV感染症など多彩な病態を引き起こすEBVには優れた感染モデル動物が存在せず、特に治療薬開発に有用な小動物モデルは極めて不十分なものであった。近年我が国で開発されたNOD/Shi-scid/IL-2 γ c $^{-/-}$ （NOG）マウスでは、ヒト化により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主要コンポーネントが再構築される。当研究部ではこのヒト化NOGマウスを用いてEBV感染モデルを作成することに成功し、以下の結果を得ている。① ヒト化NOGマウスには静脈内あるいは腹腔内のEBV接種により容易に感染が成立する。② ウイルス感染量が多い場合には、免疫不全状態で発症するヒトリンパ増殖性疾患と酷似するB細胞リンパ腫が生じる。③ EBV感染マウスにおいてEBV特異的T細胞免疫応答とIgM抗体応答が

検出される、④ 感染量が少ない場合、マウスは発症せず不顕性持続感染状態となる。これらの結果から、当実験系は現時点で最も総合的な EBV 感染症小動物モデルであるという評価を得ている。

本年は、このモデルを EBV 感染症に対する免疫療法あるいはワクチンの開発に応用することを念頭に置き、感染マウスにおける免疫応答を詳細に解析した。

前年までの研究により、EBV 感染後のマウスにおいて EBV 特異的 T 細胞応答が誘導されること、また OKT3 抗体により感染マウスの T 細胞を除去すると感染マウスがリンパ腫により早期に死亡することなどから、ヒト化マウスにおける T 細胞免疫応答が実際に防御機構として機能することが示唆されていた。そこで本年は、特に CD8 陽性 T 細胞の役割について解析した。EBV 感染後のマウスに抗 CD8 抗体を投与して CD8 陽性 T 細胞を除去すると有意に生存期間が短縮することが示された (Logrank 法、 $p < 0.05$)。また、EBV 感染直後のリンパ球を感染マウスの脾臓から分離した CD8 陽性 T 細胞と混合して培養すると EBV によるトランスフォーメーションが抑制されることが示された。これらの結果は感染マウスの CD8 陽性 T 細胞が直接 EBV 感染細胞に作用し防御機構として働くことを示している。

2.1.1.2. 慢性活動性 EBV 感染症モデルマウスの作成

慢性活動性 EBV 感染症 (CAEBV) は、持続あるいは再発する伝染性単核症様症状と、EBV 感染 T あるいは NK 細胞の増殖を特徴とする予後不良の疾患であり、造血幹細胞移植以外に根治的治療法はない。その病態には免疫不全を示唆する所見と腫瘍性疾患を示唆する所見の両方が認められるが、発症機構は不明である。疾患動物モデルは作成されていない。CAEBV は感染細胞の違いにより CD4、CD8、 $\gamma\delta$ T、NK の 4 つのタイプに分けられる。本年度、我々は CAEBV の発症機構解明と治療薬開発への応用を目的とし、NOD/SCID/IL2Rc^{null} (NOG) マウスを用いて CAEBV 異種移植モデルの作製を行い、以下の結果を得た。① CAEBV 患者末梢血より PBMC を分離し NOG マウスへ移植すると全てのタイプで感染細胞が生着し、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳、小腸などの臓器に感染細胞が浸潤していた。② CD8、 $\gamma\delta$ T、NK タイプでは、感染細胞を含む細胞分画のみを移植しても生着しなかった。③ CD4 タイプでは CD4 細胞のみを移植した場合にも生着した。④ CD8、 $\gamma\delta$ T、NK タイプでは PBMC から CD4 細胞を除去したものを移植すると感染細胞は生着しなかった。⑤ 4 タイプ全てにおいて PBMC から感染細胞の分画を除去すると感染細胞は生着しなかった。⑥ TCR V β レパトワ解析を患者 PBMC と NOG モデル PBMC で比較したところ同一クローンの増殖が示された。⑦ サイトカインアレイと ELISA を利用してモデルマウス血漿中のサイトカインを測定したところ、患者血漿と同様に IL-8、IFN- γ 、RANTES の産生が示された。

以上の結果より、NOG マウス異種移植モデルは EBV 感染 T、NK 細胞の増殖やサイトカイン産生など CAEBV の主要な病態を再現することが示された。また、感染細胞の生着には CD4 細胞が必要であることが明らかとなった。本モデルは EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患の発症機構解明と新規治療薬の開発につながると考えられる。

2.1.1.3 移植後免疫不全状態および慢性活動性 EBV 感染症における EBV 感染動態の解析と診断・治療のための情報提供

当研究部では、免疫不全状態で発生する EBV 関連リンパ増殖性疾患の発症予測と早期診断を目的として、当センターにおける肝・腎移植についてほぼ全例で EBV 感染動態のモニタリングを行っている。本年度は、114 症例 (延べ 974 検体) について解析を行った。また、外部医療機関の移植症例 22 症例 (73 検体) についても解析した。これらのうち 56 症例では、末梢血 EBV DNA コピー数の増加が認められたが、この結果にもとづき免疫抑制剤の減量などの処置がとられ、重篤なリンパ増殖性疾患の発症には至っていない。加えて今年度より Donor 肝臓における EBV 感染細胞の存在を検討するため、移植片を使って全症例で移植前に解析を行った。また慢性活動性 EBV 感染症および EB-VAHS が疑われる 66 症例について EBV DNA コピー数の測定と感染細胞の同定を行い、このうち 18 例について診断を確定した。Rituximab 使用前の B 細胞以外への EBV 感染の可能性のある 8 症例について感染細胞同定を行い、2 症例において CD8 陽性 T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞への EBV 感染が判明したため

Rituximab 投与を中止した

2.1.2. 先天性サイトメガロウイルス感染症対策に関する研究

2.1.2.1 新生児スクリーニングにより見出される先天性 CMV 感染児における CMV 特異的免疫応答に関する研究

先天性 CMV 感染症は、ウイルス性の先天感染症として最も頻度が高い。また、本邦における妊娠可能年齢女性の CMV 抗体保有率が近年は低下傾向にあることから、先天性 CMV 感染症の増加が危惧されている。そのため、先天性 CMV 感染症の実態を正確に把握すること、また無症候性を含めて CMV 感染児を網羅的に見出し、その後のフォローアップにより難聴などの遅発障害に対する早期療育を可能とすること等を目的として、多施設共同研究による新生児の先天性 CMV 感染スクリーニングが昨年度より開始されている。当研究部では、先天性 CMV 感染児における CMV 特異的免疫応答の性状を明らかにするとともに、難聴や精神発達遅滞などの遅発性障害発症と CMV 特異的免疫応答との関連についても検討している。

昨年に引き続いて、本年度も新生児スクリーニングによって同定された先天性 CMV 感染児由来の血液検体の供与を共同研究施設より受け、CMV 特異的免疫応答の解析を行った。

2.1.2.1.1 MHC テトラマーを用いた CMV 特異的 T 細胞の検出・定量

CMV 蛋白質 pp65 特異的 T 細胞を同定する目的で、9 症例の先天性 CMV 感染児由来の末梢血リンパ球において、MHC クラス I/CMV ペプチドを 4 量体化した MHC テトラマーを用いて末梢血リンパ球を染色した後、フローサイトメーターにより検出した。CMV 特異的 T 細胞は先天性 CMV 感染児 9 例中 7 例において同定された (CD8 陽性細胞の 0.1~0.6%)。次に、pp65 由来ペプチド抗原で末梢血リンパ球を刺激後 1 週間培養した結果、9 例中 6 例で CMV 特異的 T 細胞が増加 (0.2~1.1%)、2 例で減少した (0~0.2%)。残り 1 例においては、抗原刺激の有無にかかわらず、CMV 特異的 T 細胞は同定されなかった。対照として、健常成人における pp65 特異的 T 細胞を解析した結果、pp65 ペプチド抗原刺激前が 0.1%、刺激後には 4.5%に増加した。

2.1.2.1.2 CMV 抗原刺激による IFN- γ 産生 T 細胞の検出

CMV 特異的 T 細胞の CMV 抗原に対する応答性を明らかにする目的で、10 症例の先天性 CMV 感染児の末梢血リンパ球を CMV 蛋白質 pp65 または IE1 由来のペプチド抗原で刺激した後、CD8 あるいは CD4 陽性 T 細胞における IFN- γ 産生能をフローサイトメーターで解析した。pp65 ペプチド抗原で刺激した場合、末梢血リンパ球中に IFN- γ を産生する CD8 陽性細胞は 0~0.5%の割合で同定され、IFN- γ を産生する CD4 陽性細胞は 0~0.4%で同定された。健常成人では、CD8 陽性細胞の 1.2%、CD4 陽性細胞の 0.5%が IFN- γ を産生していた。一方、IE1 ペプチド抗原で刺激した場合、IFN- γ を産生する CD8 陽性細胞は 0~0.5%で同定され、IFN- γ を産生する CD4 陽性細胞は 0~0.5%で同定された。健常成人では、CD8 陽性細胞の 4.5%、CD4 陽性細胞の 0.1%が IFN- γ を産生していた。

上記 a) b) の結果は、先天性 CMV 感染児においても機能を有する CMV 特異的免疫細胞が存在する可能性を示唆するとともに、CMV 特異的 T 細胞の CMV 抗原刺激に対する応答性は、健常成人と比較すると低いレベルにある可能性を示唆している。

現在、先天性 CMV 感染児の CMV 免疫応答の特徴をさらに明らかにするために、後天性 CMV 感染児における CMV 特異的な免疫応答の解析を開始したところであり、今後は先天性および後天性 CMV 感染児における免疫応答の差異についても解析を進める予定である。

2.1.2.2 CMV がコードする新規遺伝子産物の同定と解析

CMV による病原性発現機構の解明と、新規診断・治療法の開発につながる標的分子の同定を目的として、CMV がコードする新規ウイルス遺伝子産物の同定と機能解析を進めている。CMV 遺伝子産物の機能解析には、従来 AD169 株などの実験室株が汎用されてきた。しかし、AD169 は長期間の継代にともない、ウイルスゲノムに欠失などの変異が生じていることが知られている。今回、AD169 株では欠失しているゲノム領域より新規の CMV 転写産物 (UL136) を同定した。UL136 がコードすると推定される蛋白質のアミノ酸配列をデータベースを用いて解析した結果、一回膜貫通型膜蛋白質の

可能性が示唆された。そこで、UL136 蛋白質の C 末端側アミノ酸配列の一部を抗原として認識する、ウサギ由来のポリクローナル抗体を作製した。抗 UL136 抗体を用いたウェスタンブロット法により、CMV 感染ヒト線維芽細胞において発現する UL136 蛋白質を認識した。現在、ヒト線維芽細胞および神経細胞株において、CMV 感染後の UL136 蛋白質の発現様式を解析するとともに、CMV 感染細胞における UL136 蛋白質の局在を免疫染色法により解析中である。さらに、UL136 蛋白質の機能についても今後解析を進める予定である。

2.1.3. 医療機関における感染症伝播に関する研究

医療機関における感染症伝播（院内感染）の防止は、国民に安全で質の高い医療を提供するために極めて重要な課題であるが、院内感染の原因となる医療行動の有効な制御法の確立、あるいは感染症伝播防止策の定着を推進するための効果的な方策の確立は十分になされていない。

院内感染の原因となる行動・職場環境などの同定および伝播形式の解明は、院内感染を制御する上で重要である。特に、医療従事者の手指を介する接触感染によって伝播する微生物については、手洗いなどの手指衛生活動が最も重要で効果的な伝播防止策と言える。そこで、医療現場において手指衛生活動の定着化を推進する上での課題と改善策について考察し、院内における手洗い週間時に、手指衛生の遵守率向上と定着化に向けての情報発信を行った。また、「院内感染防止手順—すぐ実践できる—（第2版）」（メジカルフレンド社）の改定作業に従事し、院内感染対策の情報についてとりまとめた。さらに、院内感染対策上重要なウイルスのゲノム解析を行うための基盤を確立するために、培養細胞を用いた実験的ウイルス感染系の確立およびウイルス核酸の抽出・増幅法についての基礎実験を行った。

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育成医療に貢献することを目指している。感染防御を担う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・確定診断を行って来た。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) を形成することが明らかになった。この背景を踏まえ、Nox (NADPH oxidase) の関与する小児の病態を明らかにして新しい治療法に繋げることを目指している。

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

川崎病は乳幼児に好発する原因不明の急性熱疾患であり、全身性の難治性血管炎を発症する。患児の約 10% が冠動脈瘤を併発し、小児に於ける後天的心疾患の第一位を占めている。川崎病急性期、冠動脈瘤の形成に先立って炎症性サイトカイン TNF- α の血中濃度が持続的に上昇する。冠動脈瘤の発症機序は未だ解明されていないが、血管内膜傷害による冠動脈の弱体化、特に、好中球に多く含まれるエラスターゼによる内弾性版の切断が決定的である。最近、*Lactobacillus casei* の細胞壁抽出物 (LCWE) をマウス腹腔に投与した川崎病モデルマウスを用いて、冠動脈瘤の形成に至る過程で TNF- α が決定的な役割を果たすことが報告された。更に、最も信頼され普及している IVIG 療法に耐性を示して冠動脈瘤を形成する患児に、TNF- α の中和抗体 (infliximab) を投与すると症状の改善が認められ、数週間で冠動脈瘤が消退することが報告されている。

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明らかにされているが、川崎病に於ける血管炎発症との関係は明らかにされていない。好中球に発現している活性酸素生成酵素 Nox2 型 NADPH oxidase は、生体組織中最大の酸素ラジカル発生源である。更に、プロトタイプである Nox2 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) を形成することが明らかになっている。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、血管炎発症の引き金となる血管内皮細胞および基底膜の乱れ・破壊に関与する可能性が考えられる。更に、冠動脈瘤の病変部位に好中球の顕著な浸潤が認められ、好中球由来の活性酸素がその血管外遊出に関与すると報告されている。従って、血管内皮細胞の活性酸素生成系および好中球の血管外遊出に対する活性酸素・TNF- α の影響を解析することは、川崎病の発症機

序を理解する上で重要である。

昨年度までに、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）が食細胞と異なり自発的に活性酸素を生成し、TNF- α がその生成活性を亢進することを明らかにした。その責任酵素として、酸化還元中心 Nox4 の発現が最大であり、5 つの splicing variants（Nox4A～Nox4E）中、Nox4A および Nox4B のみが発現している事を報告した（Yoshida LS, Int Immunopharmacol 2008）。一方、TNF- α は好中球の活性酸素生成能を亢進することが知られており、TNF- α により亢進した好中球（Nox2）由来の活性酸素が血管内皮細胞上に ICAM-1 接着分子の発現を促して好中球の血管外遊出を促進し、延いては冠動脈瘤の形成に寄与すると報告されている。しかし、Nox に対する阻害剤や還元剤を用いた間接実験で直接的な証明はない。そこで、*Lactobacillus casei* から LCWE を精製し、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製し、Nox2-KO マウスに適用して解析した。その結果、好中球の血管外遊出の鍵を握る心臓での ICAM-1 発現は、TNF- α 単独で充分であり、好中球由来の活性酸素は関与しないことが明らかになった。

本年度は、先ず、心臓全体ではなく血管内皮細胞に於ける ICAM-1 発現を特異的に解析するため、マウス血管内皮由来細胞株（UV φ 2）を用いて好中球由来活性酸素の影響を解析した。RT-PCR および real time RT-PCR を用いて解析した結果、UV φ 2 細胞には、4 つの酸化還元中心（Nox1、Nox2、Nox3、Nox4）が発現していたが、Nox4 の発現が最大であり、他の Nox 発現は極僅かであった。各 Nox に対する抗体を用いて確認したところ、Nox4 のみが検出できた。UV φ 2 細胞に TNF- α を添加すると 1 時間後から ICAM-1 mRNA の発現が上昇した。この系に野生型マウスから調整した好中球を添加すると相加的に ICAM-1 mRNA の発現が亢進したが、Nox2-KO マウス由来好中球でも同程度に亢進した。更に、試薬 H₂O₂ を添加すると、TNF- α 依存 ICAM-1 mRNA 発現は阻害された。従って、川崎病モデルマウスを用いた結果と同様に、好中球由来の活性酸素は血管内皮細胞の ICAM-1 産生には無関係であることが判明した。興味深いことに、TNF- α 非存在下、好中球単独でも 100 U/ml の TNF- α に匹敵する ICAM-1 mRNA の発現が認められた。その発現量は Nox2-KO マウス由来好中球でも野生型由来好中球と同レベルであった。インサートウエルを用いて TNF- α 非存在下で両細胞を培養したところ、ICAM-1 mRNA の発現上昇は認められなかった。以上の結果より、好中球が血管内皮細胞に接触すると ICAM-1 発現のシグナルが入るが、TNF- α 自身が血管内皮細胞での ICAM-1 発現を促すことにより更に両細胞の CD11b/CD18 を介した接着が増強され、好中球の血管外遊出が促進される事が明らかになった。

UV φ 2 細胞は Nox4 を高発現しており、TNF- α が Nox4 由来の活性酸素を介して ICAM-1 発現を亢進する可能性が残っている。そこで、Nox 阻害剤である DPI で UV φ 2 細胞を処理したところ、TNF- α 依存の ICAM-1 mRNA 発現が阻害され、ICAM-1 発現に対する Nox4 の関与が示唆された。そこで、UV φ 2 細胞からの活性酸素生成を測定したが、HCAEC 細胞と異なり検出できなかった。生成活性が低く検出できなかった可能性も残っているが、H₂O₂ 消去剤: catalase を添加しても ICAM-1 mRNA の発現は阻害されなかった。更に、UV φ 2 細胞では、mRNA および蛋白質レベル共に p22 サブユニットが発現していなかった。Nox2 の活性酸素生成には p22 サブユニットの存在が必須であり、Nox4 の活性酸素生成にも p22 が必要であると考えられる。従って、UV φ 2 細胞では Nox4 由来の活性酸素は生成されておらず、DPI による ICAM-1 mRNA の発現阻害は非特異的であり、Nox を介さないシグナルカスケードを介して ICAM-1 が産生される可能性が示された。ミトコンドリア電子伝達系の阻害剤である rotenone は TNF- α 依存の ICAM-1 mRNA 発現を阻害し、ミトコンドリア由来の活性酸素も候補の一つと考えられる。

次に、ヒト冠動脈血管内皮細胞（HCAEC）に於ける Nox4A と Nox4B の細胞内局在について検討した。以前 TNF- α が HCAEC の活性酸素生成活性を亢進することを報告したが、この亢進した酸化ストレスによる細胞成分や tight-junction を構築する構造蛋白質の酸化が進行し、血管内皮細胞の傷害、延いては血管壁全層の傷害に至り、動脈瘤形成の一因になる。以前、生化学的手法を

用いて HCAEC に高発現している Nox4A が p22 サブユニットと共に膜画分に、Nox4B が単独で核画分に局在する結果を得たが、どちらの Nox が実際に活性酸素生成を担っているか証拠がなかった。そこで、細胞内での局在を可視化するためプラスミド GFP-Nox4A および GFP-Nox4B を構築し COS7 細胞、HEK293 細胞で発現させた。現在、p22 との関連を含めて、これら Nox4A および Nox4B の細胞内局在と蛋白質発現、更に、細胞内での活性酸素発生部位を解析している。

3. 社会活動・情報発信

3.1 教育活動

藤原成悦．東京農業大学大学院食品栄養学客員教授

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）

今留謙一、藤原成悦．東京医科歯科大学保健衛生学科インターンシップ受け入れ