

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・個体レベルで解析し、その成果を当該分野の診断・治療法開発に応用することにある。現在の主な研究対象はEBウイルス(EBV)および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ウイルスとして重要である。近年の移植治療の普及は免疫不全宿主の増加をもたらし、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上記ウイルスを含むヘルペスウイルス一般の初感染年齢が上昇し始めており、これによる顕性感染(伝染性単核症など)の増加・重症化や、妊娠時初感染による胎児・新生児感染(先天性CMV感染症など)の増加など、重大な影響が懸念される。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遍在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、移植後リンパ増殖性疾患などのEBV関連疾患について、リンパ球増殖の分子機序解明、動物モデルを用いた発症機構解明と治療法評価、実際の移植患者での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。またCMVについては、新鮮分離CMV株がコードする未知のウイルス蛋白質の探索を行っている。さらに、先天性CMV感染症の新生児マスキリーニ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、不顕性先天感染児のCMV特異的免疫応答と病態との関連を追及する研究に着手した。なお、感染防御研究室は別個のプロジェクトとして、活性酸素生成系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)、網脇祥子(感染防御研究室長)、今留謙一(流動研究員)、矢島美彩子(エイズ予防財団リサーチレジデント)、千葉祐規乃(東京バイオテクノロジー専門学校インターン)、伊藤香織(帝京科学大学卒研究生)、川野布由子(帝京科学大学卒研究生)、石井千尋(実験補助員)、守屋美恵(ヒューマンサイエンス流動研究員)、高橋史生(ヒューマンサイエンス流動研究員)、石田浩之(東京農業大学卒研究生)、内田友祐(東京電気大学卒研究生)吉田ルシア幸子(共同研究員)。

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 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、伝染性単核球症をはじめ、ホジキン病などの悪性疾患、移植後のリンパ増殖性疾患(LPD)、さらに慢性活動性EBV感染症(CAEBV)など多彩な病態と関連する。これらの病態形成には、EBV感染細胞の異常増殖が関与しており、EBVによる細胞増殖機構の解明が治療法開発への基盤となる。EBVがコードする膜蛋白質LMP1は、がん遺伝子としての活性をもち、EBV感染細胞の増殖に主要な役割を果している。LMP1の機能解明を目的として、種々のEBV非感染ヒト細胞株におけるLMP1発現系を構築し、LMP1による細胞遺伝子の発現変化を解析した結果、LMP1によって制御される遺伝子として新たに*bcl-3*遺伝子を同定した。

本年度はJurkat T細胞株においてLMP1の誘導性発現を可能にした実験系(Flp-In/TREx Jurkat-LMP1細胞)を用いて、LMP1がinvariant chain(Ii, CD74)の発現増強に関与することを見出した。CD74は、炎症性サイトカインの一種であるMacrophage migration inhibitory factor(MIF)の受容体としても機能することが知られている。一方MIFは、種々の腫瘍細胞において高発現して

おり、腫瘍細胞の増殖に関与することが示唆されている。このことから、EBV 感染細胞の増殖において MIF-CD74 経路がどのように関与するか現在解析を進めている。

EBV 感染細胞における *bcl-3* 高発現の意義を明らかにする目的で、EBV 感染細胞に *bcl-3* siRNA を導入し、*bcl-3* 発現をノックダウンすることによる細胞増殖への影響を検討している。

2.1.1.2 ヒト化マウスを用いた EBV 感染モデルの作製と応用

EBV には優れた感染モデル動物が存在せず研究に支障を来している。免疫不全マウスにヒト造血幹細胞を移植し血液・免疫系を再構築した、いわゆるヒト化マウスは血液学・免疫学研究の強力な武器となるのみでなく、血液・免疫系を標的とするヒトウイルスの感染モデル作製の間としても有用である。近年伊藤らにより開発された 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大部分が再構築される。このため、免疫応答や潜伏感染など、*scid*、NOD/*scid* などを用いた従来の感染モデルでは再現できなかったヒト EBV 感染の基本現象を再現できる可能性が考えられた。昨年までの研究では以下の結果を得、EBV 関連 LPD のモデルとして有用であることが示唆された。

1) ヒト化 NOG マウスに EBV を静脈内あるいは腹腔内接種すると効率よく感染が成立する。2) ウイルス感染量が多い場合は B 細胞 LPD を発症し、組織像、細胞表面マーカー、EBV 遺伝子発現パターンの全てにおいて、免疫不全状態で発症するヒトの LPD と一致していた。

本年度は、ウイルス特異的免疫応答やそれにもとづく不顕性潜伏感染など、EBV 感染の基本現象が本マウスモデルで再現されているかどうか検討した。また、EBV 感染症治療薬評価への応用を開始した。

2.1.1.2.1 ウイルス特異的免疫応答の証明

感染マウスにおいて、ELISPOT 法とフローサイトメトリー法により、EBV 特異的 T 細胞応答が検出された。また、EBV-VCA 抗原 (p18-BFRF3) に対する IgM 抗体が検出された。ヒト化マウスを含めた小動物の EBV 感染モデルで T 細胞応答と抗体応答の両者が再現されたのは本実験系が最初であり、免疫応答を含めた総合的な感染動態の解析や、将来的には EBV ワクチンの評価に利用可能であることが示唆された。造血幹細胞移植後まもない時期で B リンパ球のみが分化した段階で EBV を接種した場合は、より後期の T 細胞が分化した段階よりも、LPD の発症・進行ともに早いことが示された。これは、このマウスで分化する T 細胞が、EBV-LPD に対して防御作用を有する、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。

2.1.1.2.2 不顕性持続感染の成立

低ウイルス量の接種を受けたマウスは LPD を発症せず、不顕性持続感染となることが示された。この状態は健常者の EBV 潜伏感染状態を再現している可能性があり、その場合、潜伏感染成立機構の解明および、免疫不全などによるそこからの逸脱機構を解析するための優れた実験系であることが期待される。

2.1.1.2.3 ウイルス複製の検出と抗ウイルス薬の効果

EBV 感染後のマウス脾臓において EBV 複製サイクル遺伝子の発現を検出した。また、EBV の複製を阻害する抗ヘルペスウイルス薬アシクロビルの投与により、LPD の発症遅延と軽症化が示唆された。

2.1.1.3 移植患者における EBV 感染動態の解析と診断・治療への応用

小児における EBV 初感染の遅延傾向の影響で、成育医療領域では EBV 既感染ドナーから未感染レシipientへの移植により EBV 初感染となるケースが増加している。我々は、当センター病院における肝・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が、移植で初感染となるケースでは通常の移植より EBV-LPD の発症率が高いことが知られているため、移植直後から EBV 感染動態をモニタリングすることは、EBV-LPD を早期に診断し的確な治療を開始するために有益である。

本年度は、肝・腎移植合わせて 5 例が EBV 既感染ドナーから未感染レシipientへの移植であつ

た。このうち4例で移植直後にEBV DNAが末梢血から検出され初感染が明らかとなった。移植後3～4週間で末梢血EBV DNA ($\sim 1 \times 10^3$ copies/ $\square$ g DNA) が検出され、同時にCD69やHLA-DRなど活性化マーカーを発現するTリンパ球が増加した。EBV感染細胞の増殖とこれに対するT細胞の応答が示唆された。その他、当センターの肝・腎移植患者33例においてEBV感染動態のモニタリングを行い、LPDの早期診断・治療に貢献した。

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不顕性先天性CMV感染児のCMV特異的免疫応答に関する研究

わが国において増加の恐れがある先天性CMV感染症の実態を正確に把握すること、また不顕性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遅発障害に対して早期療育を可能とすること等を目的として、国立感染症研究所を中心とする先天性CMV感染マスキングのパイロット研究が開始されている。当研究部では、成育医療センター病院と研究所の連携によるスクリーニングとフォローアップの体制を構築するとともに、感染児のCMV特異的免疫応答を解析し、遅発障害発症との関連を検討する。

本年度は、テトラマーを用いたCMV特異的細胞傷害性T細胞の定量的解析を行うため、まず健常者対照を用いて実験条件の検討を開始した。

2.1.2.2 新鮮CMV分離株の性状解析と未知CMV蛋白質の同定

CMVの研究に汎用されているTowne株などの実験室株は、ウイルスゲノムに欠損を有し新鮮分離株とは異なっている。CMVの病原性を正確に理解するために新鮮分離株における機能解析が重要である。そこで、健常人の尿検体由来の新鮮分離株をヒト線維芽細胞に感染する実験系を用いて、実験室株では欠損している領域から新規転写産物を同定した。

本年度は、新規転写産物がコードすると予想されるアミノ酸配列に基づいて作成した抗原ペプチドを用いて、ウサギに免疫し抗体を作製した。この抗体が新規転写産物がコードする蛋白質を認識することをウェスタンブロット法により確認した。

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は極めて重要な課題である。また、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)など新興再興感染症の出現も、院内感染対策上大きな脅威となっている。さらに院内感染の防止は、医療経済学的観点からは不必要な医療費の抑制につながるという経済的効果が期待される。本研究の目的は、医療現場における院内感染のハイリスクポイントを同定し、そのリスク管理体制を確立することにより、国民に安全で質の高い医療を提供することである。

2.1.3.1 研究所・病院間の協力体制の構築

当センターにおいても他施設同様、新生児集中治療室(NICU)、小児集中治療室(PICU)など院内感染対策上重要な部署が存在する。また、新生児期、小児期に多くみられるウイルス感染症などの院内感染リスクもかかえている。当該研究を遂行し、医療現場に即した適切な院内感染防止対策を講じるためには、研究所・病院間の協力体制を構築し、院内感染対策の現状および課題を把握することが不可欠と考えられる。そのため、当センターにおける感染対策委員会(ICC)および感染対策チーム(ICT)と連携し、サーベイランス活動への提言を行っている。

2.1.3.2 院内感染に関連する行動分析

院内感染の原因となる行動・デバイス・職場環境などの同定および伝播形式の解明は、院内感染を適切な方法で抑止する上で重要である。例えばMRSAは、主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。そのため、手指衛生(手洗いなど)が最も重要で有効な感染伝播の防止策と言える。そこで、共同研究者とともに病棟の環境チェック、手洗いなどの手技の実施状況を観察するとともに、NICUスタッフからの聞き取り、意見交換などを行った。

2.1.3.3 分子疫学的解析

院内感染の伝播形式を明らかにする上で、感染性微生物のゲノム情報を用いた分子疫学的解析は有効なアプローチと言える。MRSA、Respiratory syncytial virus (RSV) など院内感染対策上重要な感染性微生物については、当研究室において分子疫学的解析を可能にするための準備を開始した。現在、RSV については in vitro 感染系の確立、ウイルスゲノム配列のクローニングおよび塩基配列の決定を行うための基礎実験を行っている。

2.1.3.4 院内感染対策の情報発信

最新のエビデンスに基づく院内感染対策の情報をわかりやすく発信するために、「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）の改定作業に参加している。

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。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

好中球の O_2^- -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り、殺菌に用いられる。最近、好中球以外にも、循環器系、神経系、消化器系、呼吸器系など多くの組織で活性酸素生成酵素 Nox (NADPH oxidase) が発見され、Nox family (Nox1~Nox5) を形成することが明らかになった。活性酸素は諸刃の剣であり、NOS (nitric oxide synthase) を含めて病態形成に関与する可能性が指摘されている。一方、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が、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ている。冠動脈瘤の形成に先立って炎症性サイトカイン (IL-1、TNF- α 等) の血中濃度が持続的に上昇することが報告されている。Nox は血管壁構築細胞 (血管内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞) にも発現しており、川崎病急性期に高値 TNF- α 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を引き起こす可能性が考えられる。

昨年度は、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) の培養系を確立し、その活性酸素生成活性を調べた。そして、HCAEC が食細胞と異なり自発的に活性酸素を生成し、川崎病急性期に血中濃度が上昇する TNF- α がその生成活性を亢進することを明らかにした。本年度は、HCAEC に於ける活性酸素生成の責任酵素として、酸化還元中心である各種 Nox および調節因子の発現を mRNA レベル (RT-PCR) および蛋白質レベルで解析した。その結果、Nox4 の発現が最大であり、5 つの splicing variants (Nox4A~Nox4E) 中、Nox4A および Nox4B が蛋白質レベルでも確認された。興味深い事に、Nox4A は酸化還元中心を構成する p22 サブユニットと共に膜画分に局在し、Nox4B は単独で核画分に局在していた。食細胞 Nox2 型 NADPH oxidase の全構成因子 (Nox2、p22、p67、p47) の発現も僅かに蛋白質レベルで確認された。Nox2 は p22 サブユニットと共に膜画分に存在し、核画分には存在しなかった。Nox1 およびその活性調節因子 (NOXA1)、更に、Rac1/Rac2 は mRNA レベルで確認された。NOXO1 の mRNA は殆ど発現していなかった。この様に、HCAEC には 3 つの酸化還元中心 (Nox1、Nox2、Nox4) が発現しているが、蛋白質レベルの発現が確認された Nox2 と Nox4、特に p22 サブユニットと複合体を形成している Nox4A が主に HCAEC の活性酸素生成を担っていると考えられる。食細胞には Nox2 型 NADPH oxidase しか発現していないが、HCAEC では数種の酸化還元中心、活性調節因子が発現しており、これらがどのような組み合わせで機能しているか今後の問題である。これら Nox および調節因子に対する TNF- α の影響を解析したが、mRNA レベルと蛋白質レベルでの結果が必ずしも一致しない分子があり、real-time PCR を用いる等より詳細な解析が必要である。何れにしても、HCAEC に於いて各種 Nox family NADPH

oxidases の全体像、異なる細胞内分布が明らかになった。自発的な活性酸素生成は血管内皮細胞の増殖に必要である。しかし、この自発的な活性酸素生成が川崎病急性期に上昇するサイトカイン（特に TNF- α ）により賦活化されて、その酸化ストレスによって細胞成分や tight-junction を構築する構造蛋白質の酸化が進行して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。

2.2.2 川崎病モデルマウスを用いた解析

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。昨年、*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。TNF- α は、血管内皮細胞 (Nox4) や好中球 (Nox2) の活性酸素生成系を活性化して重篤な血管傷害を引き起こす可能性が考えられる。本プロジェクトでは、Nox2 欠損マウスを用いて食細胞 (好中球) 由来の活性酸素が川崎病の発症に関与しているか明らかにし、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している。

昨年度、*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の作製を開始した。しかし、活性のある LCWE 調整法の確立に時間を費やした。本年度は、精製した LCWE を 5 週令のマウスに腹腔内投与し、経時的に脾臓に於ける TNF- α の発現を real-time PCR で解析した。その結果、4 時間後、LCWE 投与野生型マウス群では TNF- α の発現が非投与群に比べ有意 (~6 倍) に上昇したが、Nox2 欠損マウスでは TNF- α の上昇は僅かであった。脾臓に於ける LCWE 依存の TNF- α 上昇は一過性であり、24 時間後には非投与群のレベルにまで低下した。現在、LCWE 投与後、経時的に冠動脈の組織化学的解析を行って好中球の浸潤、エラスチンの形態を調べ、TNF- α の結果と相関するか解析している。興味深いことに、LCWE 投与 24 時間後、心臓に於ける intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 の発現を調べたところ、野生型マウスでは LCWE 非投与群に比べて 4 倍上昇したが、Nox2 欠損マウスでは有意に低かった。ICAM-1 は血管内皮細胞表面に発現している接着分子であり、好中球表面の CD11b/CD18 を認識する。従って、好中球の生成する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、好中球の血管外への遊走を促進すると考えられる。更に、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いる。従って、冠動脈瘤の形成には、好中球の生成する活性酸素が重要な鍵を握っていると考えられ、TNF- α がその生成能を亢進させ、ICAM-1 の発現へと繋がり、エラスチン切断と言う構図が想定できる。一方、マクロファージは TNF- α 産生細胞として知られており、最近、食細胞の炎症性ケモカインの産生に対する活性酸素 (Nox2 型 NADPH oxidase) の関与が注目されている。従って、冠動脈瘤の形成に至る過程には、2 つの重要なステップが考えられる。つまり、1) LCWE 投与によるマクロファージからの TNF- α 産生と 2) 血中 TNF- α による好中球および血管内皮細胞の活性酸素生成能の亢進に起因する血管傷害である。今後、これらのステップに於ける活性酸素の関与について解析し、血管炎発症との関連を明らかにする予定である。

3. 社会活動・情報発信

3.1 教育活動

綱脇祥子. 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 ウイルス感染症：病態に関する考察と治療法開発に向けての基盤研究」
2007 年 1 月 30 日、埼玉県立小児医療センター.