

July, 2005.

- 3) Ohtaki N, Kamitani W, Watanabe Y, Lee B-J, Yanai H, Ikuta K, Tomonaga K: Role of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in Borna disease virus infection: implication for viral persistence in the brain. The XIII International Congress of Virology, Sanfrancisco (CA), USA, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

### 3. 神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明

分担研究者 近藤 一博（東京慈恵会医科大学微生物学講座第一）

研究協力者 鎌田美乃里（東京慈恵会医科大学微生物学講座第一）  
河上牧夫（東京慈恵会医科大学臨床病理部）  
猿田雅之（東京慈恵会医科大学消化器肝臓内科）  
伊藤裕章（大阪大学大学院医学系研究科消化器内科）  
山西弘一（独立行政法人医薬基盤研究所）

研究要旨 我々はこれまでに、クローン病患者においてヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) の潜伏感染時に発現する蛋白質に対する異常な抗体反応が見られることを示して来た。今年度は、HHV-6 の潜伏感染関連蛋白とクローン病の発症または増悪との関係を検討するために、これらの蛋白の発現に関する観察を行った。この結果、クローン病の腸管の病変部においてこの蛋白が検出されることを見出した。これは、クローン病の発症・増悪と HHV-6 の潜伏感染との関連をさらに強く示唆するものと考えられた。

また、ヒト以外の動物にはほとんど感染しない HHV-6 の潜伏感染・再活性化を *in vivo* で研究することを可能にするために、NOD-SCID-hu マウスを用いた、新規の HHV-6 感染モデルを開発した。このモデルでは、通常のヒトにおける場合の数千倍以上の高頻度で潜伏感染細胞が存在することが確認され、HHV-6 潜伏感染の機序や生体に与える影響を、より詳細に検討することが可能になると考えられた。

#### A. 研究目的

ヒトヘルペスウイルスはこれまでに 8 種類が同定され、感染細胞の種類がことなる  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の 3 種類に分類されている。 $\beta$ -ヘルペスウイルスは、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6)、ヒトヘルペスウイルス 7 (HHV-7) からなり、マクロファージや T 細胞といった免疫細胞において増殖感染や潜伏感染することを特色とする。また、HHV-6 は脳内のグリア細胞で潜伏感染・再活性化を生じ、反復性の熱性痙攣の原因となる事が知られている。

$\beta$ -ヘルペスウイルスは多くの慢性難治性疾患患者で、ウイルスの再活性化が生じることが観察されている。しかし、このウイルスの再活性化は、疾患の結果として生じたのか、再活性化を生じることが疾患の原因や増悪因子となっているのかは、現在の技術では調べることができない。

本研究は、この問題を解決するために、以下の事柄を明らかにすることを目的としている。

i)  $\beta$ -ヘルペスウイルスの潜伏感染・再活性化に

関係するウイルス遺伝子産物を同定し、これを利用することにより、潜伏感染と再活性化を直接検査できる方法を開発する。

ii) この検査法を用いて、 $\beta$ -ヘルペスウイルスの関与が疑われる疾患と潜伏感染・再活性化の関係を再検討することにより、 $\beta$ -ヘルペスウイルスと難病との関係の疫学的証拠を確定する。  
iii) 上記の疫学的研究で得られた事実を確定するために、 $\beta$ -ヘルペスウイルス、特に  $\beta$ -ヘルペスウイルスの潜伏感染・再活性化による慢性難治性疾患の発症機序を解明して行くことを目的とする。

昨年度までに、クローン病患者において HHV-6 の活性化された潜伏感染状態である「中間状態」で発現される HHV-6 潜伏感染関連蛋白に対する抗体が検出され、健常人ではこの抗体が検出されない事を見出した。また、この中間状態を形成するもととなる HHV-6 の再活性化への誘導が、現代社会における仕事のストレス・疲労によって生じることが示された。これらの事は、クローン病患者が最近増加傾向であり、ストレスの蓄積が発症要因の一つであるとい

う事実を、HHV-6 の潜伏感染・再活性化との関係で説明できる可能性を示唆するものである。

今年度は、HHV-6 の潜伏感染・再活性化と疾患の発症との関係を検討するために、i) HHV-6 潜伏感染関連蛋白と病態との関係の解析と、ii) HHV-6 潜伏感染・再活性化の動物実験モデルの作成を行うことを主な研究目的とした。

## B. 研究方法

### 1) クローン病患者病理組織における HHV-6 潜伏感染関連蛋白発現

病巣に HHV-6 潜伏感染蛋白が存在しているかどうかは、HHV-6 潜伏感染・再活性化とクローン病の発症・増悪との関係を解明するための作業仮説を立てる上で重要である。このため、前年度までに構造の一部を明らかにした HHV-6 潜伏感染関連蛋白に対する抗体を作成し、これを用いて潜伏感染蛋白の病巣部での存在の有無を検討した。

#### i) 抗体の作成と組織染色

HHV-6 の潜伏感染状態、特に中間状態で発現する遺伝子の一部を、大腸菌発現ベクター (pET-42a) を用いて発現させた。大腸菌で発現させた蛋白質をヒスチジン tag および GSTtag を用いて精製し、ウサギに免疫することにより抗体を作成した。

組織染色は、上記抗体を 400 倍に希釈したものを 1 次抗体として用い、抗ウサギ IgG ビオチンとペルオキシダーゼ標識アビジンを用いて行なった。

#### ii) 検体

臨床検体は、東京慈恵会医科大学・倫理委員会の規定に従って採取した検体をパラフィンブロックから切片を作成したものを 2 例使用した。

### 2) HHV-6 潜伏感染・再活性化のモデル動物の作成

ウイルス感染と疾患との関係を検討する上で、感染モデル動物の作成は一般に非常に重要である。HHV-6 は非常にヒトに対する特異性が高いウイルスで、ヒト以外に感染可能な動物

はサルのみである。

我々は小動物における HHV-6 の感染、特に潜伏感染・再活性化を *in vivo* で研究することのできる感染動物モデルの作成を試みた。

#### i) モデル動物の作成

免疫不全マウスである NOD-SCID マウスに放射線を照射した後、ヒト臍帯血を尾静脈から静注し、ヒトの血液幹細胞を再構築した SCID-hu マウスを作成した。臍帯血移植 4~6 週間後、部分採血を行い、ヒト CD45 マーカー陽性細胞数を FACS 解析にて計測し、ヒト細胞の生着率を評価した。

この後、HHV-6 variant B HST 株感染ヒト T 細胞を尾静脈から静注し、SCID-hu マウス中のヒト血液細胞への HHV-6 感染を行なった。感染 6 週間後に SCID-hu マウスの末梢血、脾臓、骨髄を採取した。

感染細胞の存在の比率は、細胞を分散させた後、希釈系列を作成し、double-nested PCR 法にて HHV-6 遺伝子を検出し、Reed-Muench 法にて算出した。

ウイルス DNA コピー数は、上記の細胞から DNA を精製した後、Real-time PCR 法にて算出した。

ウイルス mRNA は、上記の細胞から RNA を精製した後、RT-PCR 法にて検出を行なった。

#### ii) モデル動物作成用の血液幹細胞の採取

SCID-hu マウス作成に使用する臍帯血は、東京慈恵会医科大学・倫理委員会の承認を得、提供者のインフォームドコンセントを得た上で採取した。

(倫理面への配慮)

インフォームドコンセントを取るに当たり、厚生労働省のガイドラインに準拠した同意書を作成し、これに患者またはこれに代わる親権者の同意を得た。全ての研究の過程は東京慈恵会医科大学・倫理委員会の承認を得たプロトコールにしたがって行われた。また、遺伝子組換え実験は東京慈恵会医科大学・遺伝子組換え実験ガイドラインに沿って行われた。

## C. 研究結果

### 1) クローン病患者病理組織における HHV-6 潜伏感染関連蛋白発現

図1に今回検討した2例のクローン病患者検体の内、代表的な染色像を示す。腸管病巣部の相当数の細胞が、HHV-6 潜伏感染関連蛋白質を発現していることが示唆された。同様の染色像は、他の病巣部や他の症例でも観察され、HHV-6 の潜伏感染関連蛋白を発現する細胞が広範囲の病巣で発現することを示唆していた。

染色された細胞は、形質細胞様の形態をしていることと、HHV-6 が形質細胞などのB細胞系の細胞に感染しないことから、形質細胞様樹状細胞である可能性が示唆された。また、染色されている細胞は、同時に行なったマクロファージ細胞表面マーカーに対する染色とは位置が一致していなかった。このことは、潜伏感染関連蛋白が発現している細胞が、通常の HHV-6 の潜伏感染・再活性化部位であるマクロファージとは異なることを示唆していた。

### 2) HHV-6 潜伏感染・再活性化のモデル動物の作成

HHV-6 を SCID-hu マウスに投与したところ、感染後 4 週間から 10 週間以上経過したマウスにおいても、HHV-6 DNA が検出された。これに対し、ヒト細胞を移植していない SCID マウスでは 2 週間以内に感染させた HHV-6 の DNA が検出感度以下となった。

HHV-6 の感染状態を検討するために骨髄と脾臓とにおける HHV-6 mRNA の発現を検討した。脾臓では HHV-6 の初期遺伝子 U79/80 や後期遺伝子 U60/66 が検出されるのに対し、骨髄ではこれらウイルス増殖の指標となる遺伝子の発現は検出されなかった。このことは、この感染モデル動物では脾臓において HHV-6 の持続的な増殖感染が、骨髄において HHV-6 の潜伏感染が成立している可能性を示すものであった。

NOD-SCID-hu マウスでは、骨髄に未分化 myeloid 系細胞が、脾臓により分化した myeloid 系細胞が存在することが知られている。また、HHV-6 が属する  $\beta$ -ヘルペスウイルスでは、幾つかの証拠から未分化細胞で潜伏感染しているウイルスが、細胞分化に伴って再活性化を生じ

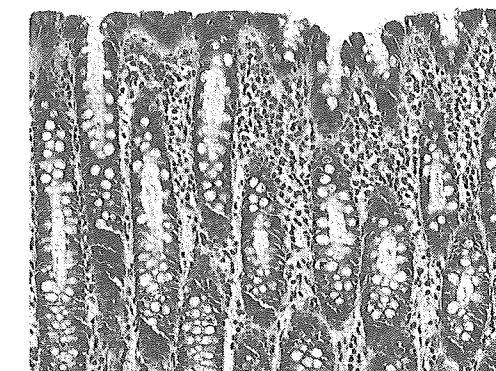
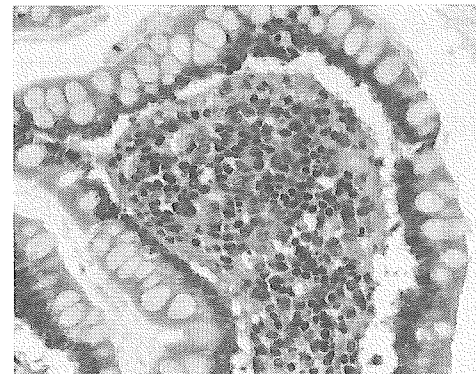
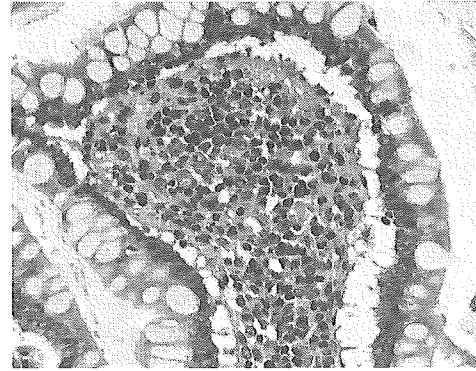
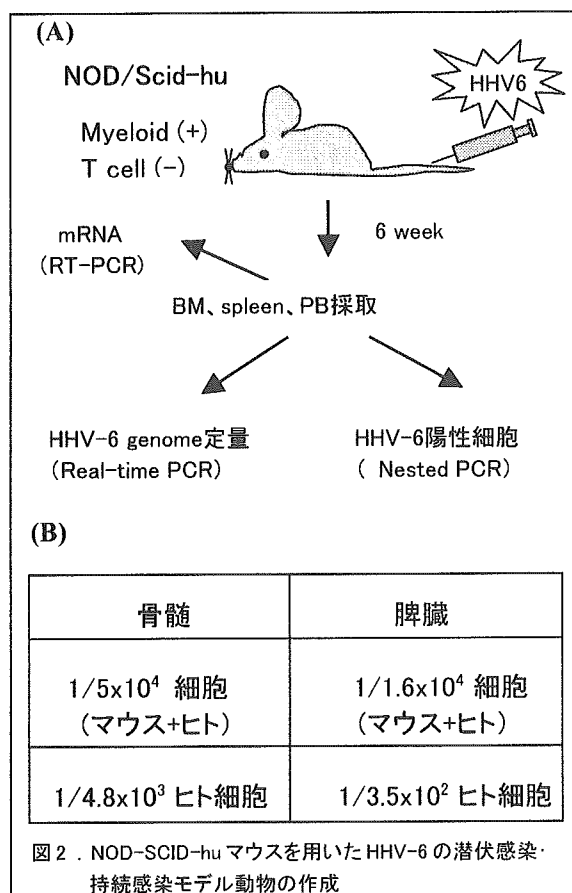


図1. HHV-6 潜伏感染関連蛋白に対する組織染色  
A は、クローン病患者組織を HHV-6 潜伏感染関連蛋白質に対する抗体で染色したもの。B は、クローン病患者組織を正常ウサギ血清で染色したもの。C は、D は、クローン病患者組織をマクロファージに対する抗体で染色したもの。正常な腸管組織を HHV-6 潜伏感染関連蛋白に対する抗体で染色したもの。茶色に発色している部分が陽性。

ると考えられており、上記の現象は、このことを証明する良い証拠となるものと考えられた。

HHV-6の感染率を検討したところ、図2Bに示される高い感染率が観察された。HHV-6はマウス細胞に感染しないため、ヒト細胞あたりに換算すると、HHV-6の感染率は、数千～数百分の1となった。通常のヒトにおけるHHV-6の潜伏感染では、ウイルス感染率は、数百万分の1程度であるため、この動物モデルは、通常のヒトに比して極めて多くの潜伏感染細胞を維持していることが示唆された。



(A) ヒト血液幹細胞が生着した SCID-hu マウスに HHV-6 感染細胞を静注し、6 週間後にマウスの骨髄と脾臓における HHV-6 感染細胞の存在率、ウイルス DNA コピー数、ウイルス遺伝子発現を検討した。

(B) マウス骨髄と脾臓における HHV-6 感染細胞の存在率を示す。それぞれ上の段は、マウスから採取した細胞における HHV-6 感染細胞の存在率を、下段は HHV-6 感染細胞の存在率を、SCID-hu マウス中のヒト細胞の生着率で補正したもの。

#### D. 考 察

昨年までに我々は、クローン病患者において HHV-6 の潜伏感染関連蛋白に対する異常な抗体の出現が見られることを示して来た。

今年度は、この異常な抗体の出現とクローン病の発症・増悪との関係を検討するために、HHV-6 潜伏感染関連蛋白の病巣部での存在を検討した。この結果、検査可能であった 2 例の検体において、潜伏感染関連蛋白が病巣部に存在することが見出された。また、潜伏感染関連蛋白が発現している細胞は、通常の HHV-6 の潜伏感染・再活性化部位であるマクロファージとは異なり、形質細胞様樹状細胞などの他の種類の細胞であることも示唆された。

潜伏感染関連蛋白の存在する細胞が通常のマクロファージと異なることと、クローン病患者において、健常人の潜伏感染では検出されない HHV-6 潜伏感染関連蛋白に対する抗体が検出されることと合わせて考えると、クローン病患者においては、HHV-6 が健常人とは異なったタイプの潜伏感染状態にある可能性が示唆される。

HHV-6 と同じヘルペスウイルス科に属するエプシュタイン・バーウイルス (EBV) では、少なくとも 4 段階の潜伏感染状態が存在しており、潜伏感染状態が健常人と異なることと、リンパ腫や慢性活動性 EBV 感染症などの EBV によって引き起こされる疾患とが対応していることが知られている。

EBV 以外のヘルペスウイルスでは、潜伏感染状態の変化と疾患との関係は明らかにされていないが、同じヘルペスウイルス科に属する HHV-6 にも疾患に関わる潜伏感染状態が存在する可能性は十分にあると考えられる。今後は、クローン病患者や潰瘍性大腸炎などの関連疾患の症例数を増やし、潜伏感染関連蛋白との関係を確定させて行こうと考えている。また、完全な潜伏感染関連蛋白の構造が未だ同定できていないので、これもできるだけすみやかに同定し、この蛋白の機能解析のみならず、抗体や抗原の測定をより簡単・確実に行なえる様にしたいと考えている。

HHV-6 の潜伏感染の機構や疾患に関わる潜伏感染状態の解析に関しては、NOD- SCID マウスを用いて HHV-6 が潜伏感染・持続感染を

生じる SCID-hu マウスを作製した。

NOD-SCID-hu マウスは、myeloid 系細胞と B 細胞の分化・増殖を維持できるが、T 細胞が存在しない事を特色とする。実際我々のモデルでも T 細胞は検出されない。

HHV-6 は主として T 細胞で増殖感染を生じるため、免疫不全動物である SCID-hu マウスに T 細胞が存在すると、増殖感染したウイルスのバックグラウンドのために、潜伏感染や再活性化といった高感度の検出が必要な状態を把握することができない。このため、NOD-SCID-hu マウスを用いた潜伏感染モデルは、潜伏感染状態の変化を捉えるために最適のシステムであると考えられる。また、このマウスでは、myeloid 系細胞の全ての分化状態の細胞が存在し、これが分化の段階に応じて骨髄と脾臓に分かれて分布している点も、細胞分化と潜伏感染状態の変化を観察する上で有利な点と考えられた。

さらに、今回作製した潜伏感染モデルでは、通常のヒトの千倍以上の高頻度で潜伏感染細胞が存在するため、潜伏感染機構や潜伏感染が細胞に与える影響の検討が効果的に行なえるものと考えられる。

これまでの研究結果から、クローン病は、HHV-6 の潜伏感染との関係が深いと考えられる。この潜伏感染モデル動物を利用することにより、HHV-6 潜伏感染の状態の変化がサイトカインの異常産生などを含めたクローン病発症機構に与える影響を検討できるものと考えている。

## E. 結 論

今回は、これまでにクローン病患者において異常な抗体の出現が見られることを示して来た HHV-6 の潜伏感染関連蛋白が、腸管の病変部において検出されることを見出した。これは、クローン病の発症・増悪と HHV-6 の異常な潜伏感染状態との関連をさらに強く示唆するものと考えられた。

また、HHV-6 の潜伏感染・再活性化を *in vivo* で研究することのできる SCID-hu マウスシステムを開発し、HHV-6 潜伏感染の生体に与える影響をより詳細に検討することを可能とした。

今後、この潜伏感染関連蛋白の同定と機能解析を行なう事により、クローン病の発症・増悪機構の解明や根本的な治療法の開発に寄与できるものと考えている。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Urashima M, Sakuma M, Terumoto S, Fuyama Y, Eto Y, Kondo K, Tanaka T: Gene expression profiles of peripheral blood and cord blood mononuclear cells altered by thymic stromal lymphopoietin. *Pediatric Research* 2005, 57:563-569.
- 2) Takemoto M, Koike M, Mori Y, Yonemoto S, Sasamoto Y, Kondo K, Uchiyama Y, Yamanishi K: Human herpesvirus 6 open reading frame U14 protein and cellular p53 interact with each other and are contained in the virion. *J Virol* 2005, 79:13037-13046.

### 2. 学会発表

- 1) 鎌田美乃里、近藤一博：Scid-hu マウスを用いた *in vivo* HHV-6 感染モデル動物作製の試み。第 53 回日本ウイルス学会（横浜）2005.11.
- 2) 嶋田和也、近藤一博：ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) U79/80 遺伝子のエンハンサー・プロモーター解析。第 53 回日本ウイルス学会（横浜）2005.11.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## 4. 慢性肺気腫あるいは呼吸不全とウイルス感染

分担研究者 山谷 睦雄（東北大学病院老年・呼吸器内科）

研究協力者 鈴木朋子、安田浩康、浅田成紀、中山勝敏、久保裕司  
（東北大学病院老年・呼吸器内科）

研究要旨 1)  $\beta$ 2-刺激薬は慢性肺気腫の急性増悪抑制効果があり、急性増悪を引き起こすライノウイルスなどのウイルス感染抑制作用が考えられているが、これまで明らかになっていない。今回、培養ヒト気管上皮細胞におけるライノウイルス感染に対する $\beta$ 2-刺激薬である塩酸プロカテロールの抑制作用を調べた。塩酸プロカテロールを培養ヒト気管上皮細胞に作用させると、培養液ライノウイルス量が減少した。細胞接着分子 ICAM-1 が減少したことより、ライノウイルス感染受容体減少を介して、塩酸プロカテロールがライノウイルス感染抑制効果をもたらすと示唆された。また、培養液炎症性サイトカインも減少することより、塩酸プロカテロールがライノウイルス感染による気道炎症を抑制する可能性が示唆された。2) RS ウイルスも慢性肺気腫急性増悪発症に関与するが、これまで、感染を抑制する医薬品の研究は行われてこなかった。今回、培養ヒト気管上皮細胞における RS ウイルス感染に対する感染受容体 RhoA 活性化抑制薬 *N-acetyl-S-geranylgeranyl-L-cysteine* (AGGC) およびマクロライド抗生物質の抑制作用を調べた。AGGC、バフィロマイシン、エリスロマイシン、およびクラリスロマイシンを培養ヒト気管上皮細胞に作用させると、培養液 RS ウイルス量が減少した。また、培養液炎症性サイトカインも減少することより、マクロライドが RS ウイルス感染による気道炎症を抑制する可能性が示唆された。

### A. 研究目的

1) 慢性肺気腫を主体とする慢性閉塞性肺疾患 (COPD) はウイルス感染が引き金になって急性増悪し、呼吸不全をきたすことが多い。ライノウイルス、インフルエンザウイルス、RS (Respiratory syncytial) ウイルスなどが同定され、二次性の細菌感染が更に症状を悪化させる。ウイルス感染は気道上皮の剥離脱落や気道壁の浮腫を介して気道内腔を狭窄すると言われている。また、炎症性サイトカイン、ヒスタミンやキニンが気道炎症や気管支平滑筋収縮、喀痰分泌を生じて気流障害を促すと考えられている。また、ムチン合成は気道炎症で増加し、ライノウイルス感染時の増加が指摘されている。ライノウイルスは血清型が 100 種類以上もあり、有効なワクチンは開発されていない。また、感染を抑制する抗ライノウイルス薬も実用化されていない。私たちはライノウイルス感染受容体である細胞接着分子 ICAM-1 の発現抑制やライノウイルス RNA 細胞内放出の場であ

る酸性エンドゾーム減少を介したライノウイルス感染抑制薬を探求してきた。その結果、グルココルチコイドが ICAM-1 減少を介して、また、エリスロマイシン、プロトンポンプ阻害薬、および喀痰調整薬カルボシステインが ICAM-1 減少と酸性エンドゾーム減少を介してライノウイルス感染抑制効果を有すると報告してきた。COPD の治療薬として広く用いられている  $\beta$ 2-刺激薬は急性増悪抑制効果が報告されている。しかし、 $\beta$ 2-刺激薬のライノウイルス感染抑制に関する研究はこれまで行われてこなかった。 $\beta$ 2-刺激薬はこれまで major type ライノウイルス感染受容体である ICAM-1 の気道上皮細胞および線維芽細胞における発現を抑制する報告がなされている。このため、本年度はライノウイルス感染を抑制するのではないかと考え、検討した。

2) RS ウイルスは乳幼児の細気管支炎の原因ウイルスであると同時に、最近になって高齢者

の感冒症状の起因ウイルスであるとの報告がなされている。また、慢性肺気腫の急性増悪の原因ウイルスであるとの報告がなされている。RS ウイルスは感染抑制のための乳児に対する抗体が臨床場で実用化されているが、感染抑制薬がない。RS ウイルスの細胞側受容体として small GTP ase (Rho A) が細胞融合、ウイルス進入に関係すると報告されている。本年度は Rho A 機能抑制効果が報告されている、マクロライドであるバフィロマイシンを中心にマクロライドの RS ウイルス感染抑制作用を検討した。

## B. 研究方法

### 1. ライノウイルス感染実験

ヒト気管上皮細胞を試験管に培養し、ライノウイルス 14 型  $10^5$  TCID<sub>50</sub> units/ml を感染させた。ライノウイルス感染 3 日前から塩酸プロカテロール (0.1 μM) を上皮細胞に作用させた。ライノウイルス感染前、感染後 24 時間、72 時間、120 時間、および 168 時間の時点で培養液を回収し、ライノウイルス量、あるいは可溶性 ICAM-1 量およびサイトカイン量を測定した。培養液ライノウイルス量はヒト胎児線維芽細胞に対する細胞変性効果 (cytopathic effects; CPE) を生じる最大希釈倍率から求めた。可溶性 ICAM-1 量およびサイトカイン量は、それぞれ酵素免疫法 (Enzyme immunoassay; EIA) および ELISA 法にて測定した。

### 2. RS ウイルス感染実験

ヒト気管上皮細胞を試験管に培養し、RS ウイルス  $10^4$  TCID<sub>50</sub> units/ml を感染させた。RS ウイルス感染 3 日前からバフィロマイシン ( $10^{-8}$  M)、エリスロマイシン (10 μM)、クラリスロマイシン (10 μM) を上皮細胞に作用させた。RS ウイルス感染前、感染後 24 時間、72 時間および 120 時間の時点で培養液を回収し、RS ウイルス量を測定した。また、培養液サイトカイン量に対するエリスロマイシン (10 μM) の効果を測定した。さらに、血管内皮細胞における RhoA 抑制効果が報告されている *N-acetyl-S-geranylgeranyl-L-cysteine* (AGGC) (1 μM) の培養液 RS ウイルス放出量に対する効果を測定した。培養液 RS ウイルス量は Hep-II

細胞に対する細胞変性効果を生じる最大希釈倍率から求めた。サイトカイン量は ELISA 法にて測定した。

(倫理面への配慮)

ヒト気管上皮細胞培養について東北大学医学部倫理委員会の承認を得て行なった。

## C. 研究結果

### 1. 塩酸プロカテロールのライノウイルス感染抑制作用

ライノウイルス感染後 day 1 (24 時間)、day 3 (72 時間)、day 5 (120 時間) および day 7 (168 時間) における培養液ライノウイルス量が塩酸プロカテロールで明らかに減少した (図 1)。

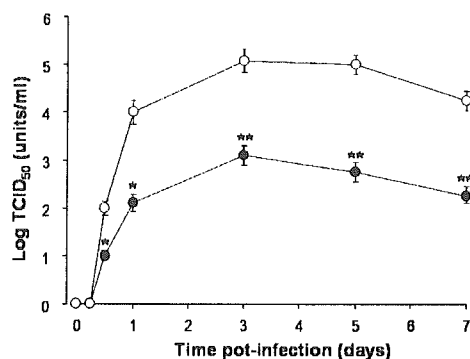


Figure 1

図1 塩酸プロカテロールのライノウイルス感染抑制効果  
ヒト気管上皮細胞培養液に放出されるライノウイルス量は時間経過で増加する。塩酸プロカテロールはライノウイルス量を減少させる。\*P<0.05, \*\*P<0.01: コントロールに対する有意差。

細胞培養液中可溶性 ICAM-1 濃度が塩酸プロカテロールの処理により、ライノウイルス感染前後で減少した (図 2)。一方で、酸性エンドゾームを蛍光顕微鏡で観察すると、塩酸プロカテロールによって時間依存性に酸性エンドゾーム数および蛍光強度は変化しなかった (データ省略)。さらに、ライノウイルスで増加する培養液中の interleukin (IL)-1β、IL-6 が減少した (図 3)。



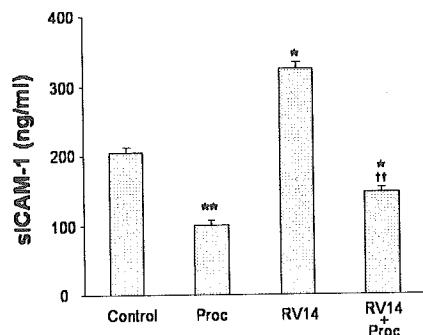


図2 塩酸プロカテロールの可溶性 ICAM-1 合成抑制効果

ライノウイルス感染前にヒト気管上皮細胞培養液に放出される可溶性 ICAM-1 (細胞接着分子)量は塩酸プロカテロールで減少する。ライノウイルス感染で培養液可溶性 ICAM-1 は増加する。塩酸プロカテロールはライノウイルス感染後の培養液可溶性 ICAM-1 増加を抑制する。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ :コントロールに対する有意差。†† $P < 0.01$ :ライノウイルス感染 (RV14) に対する有意差。Proc:塩酸プロカテロール。

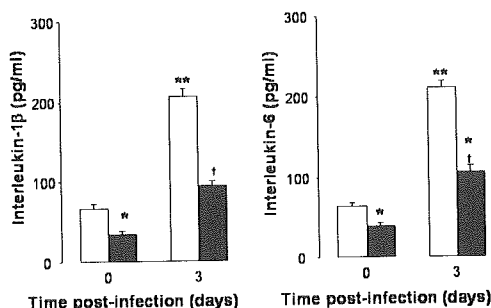


図3 塩酸プロカテロールの炎症性サイトカイン合成抑制効果

ライノウイルス感染前 (day 0) にヒト気管上皮細胞培養液に放出される炎症性サイトカイン量 (IL-1 $\beta$  および IL-6) は塩酸プロカテロール (黒バー) で減少する。ライノウイルス感染 (day 3) で IL-1 $\beta$  および IL-6 は増加する。塩酸プロカテロールはライノウイルス感染後の培養液 IL-1 $\beta$  および IL-6 増加を抑制する。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ :コントロールに対する有意差。† $P < 0.05$ :ライノウイルス感染に対する有意差。

## 2. RS ウイルス感染抑制実験

バフィロマイシンは RS ウイルス感染後 day 1 (24 時間)、day 3 (72 時間) および day 5 (120 時間) における培養液 RS ウイルス量を明らかに減少した (図 4)。エリスロマイシンおよびクラリスロマイシンは RS ウイルス感染後 day 3 (72 時間)、day 5 (120 時間) における培養液 RS ウイルス量を明らかに減少した (図 4)。

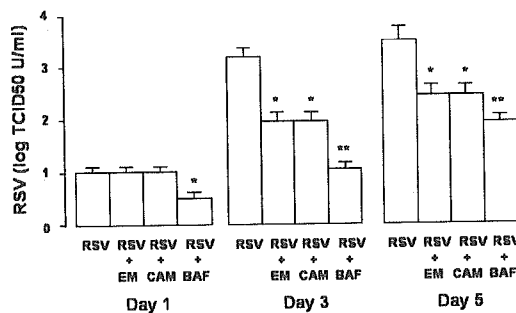


図4 マクロライドの RS ウイルス感染抑制効果

ヒト気管上皮細胞培養液に放出される RS ウイルス量は時間経過で増加する。バフィロマイシン (BAF)、エリスロマイシン (EM) およびクラリスロマイシン (CAM) は RS ウイルス量を減少させる。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ :コントロールに対する有意差。

さらに、*N-acetyl-S-geranylgeranyl-L-cysteine* (AGGC) は RS ウイルス感染後 day 1 (24 時間)、day 3 (72 時間) および day 5 (120 時間) における培養液 RS ウイルス量を明らかに減少した (図 5)。

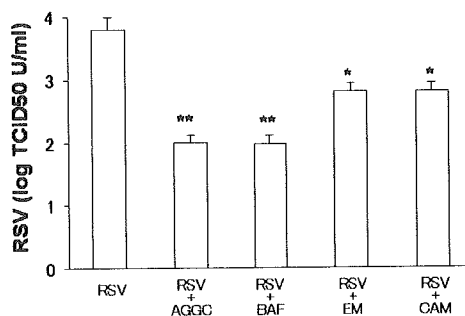


図5 マクロライドの RS ウイルス感染抑制効果

感染 5 日後において、RhoA 活性化抑制薬 AGGC はバフィロマイシン (BAF)、エリスロマイシン (EM) およびクラリスロマイシン (CAM) と同様に RS ウイルス (RSV) 培養液放出量を減少させる。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ :コントロールに対する有意差。

エリスロマイシン RS ウイルス感染前の培養液 IL-1 $\beta$  および IL-6 を減少させた (図 6)。また、RS ウイルス感染は培養液 IL-1 $\beta$  および IL-6 を増加した。エリスロマイシンは RS ウイルス感染で増加した培養液 IL-1 $\beta$  および IL-6 を減少させた (図 6)。

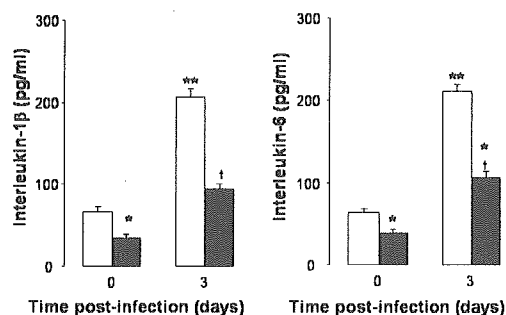


図6 マクロライドのRSウイルス感染誘発炎症性サイトカイン合成抑制効果

RSウイルス感染前(day 0)にヒト気管上皮細胞培養液に放出される炎症性サイトカイン量(IL-1βおよびIL-6)はエリスロマイシン(黒バー)で減少する。RSウイルス感染(day 0)でIL-1βおよびIL-6は増加する。エリスロマイシンはRSウイルス感染後の培養液IL-1βおよびIL-6増加を抑制する。\*P<0.05、\*\*P<0.01:コントロールに対する有意差。†P<0.05:RSウイルス感染に対する有意差。

#### D. 考察

1. ライノウイルスは風邪の主原因であり、かつ、COPDや気管支喘息の急性増悪を惹起すると広く知られているが、これまで、ライノウイルスワクチンや抗ライノウイルス薬は開発されていない。私たちはこれまで、グルココルチコイドやエリスロマイシン、プロトンポンプ阻害薬、喀痰調整薬など、いくつかの薬品がライノウイルス感染抑制効果を持つことを発表してきた。またエリスロマイシンおよび喀痰調整薬の風邪予防効果を発表した。ライノウイルスのmajor typeは細胞接着分子ICAM-1を感染受容体として気道上皮細胞に感染する。感染後、一部のライノウイルスRNAは細胞表面から細胞内に放出されるが、他のライノウイルスは細胞内の酸性エンドゾームに取り込まれて、ここでRNAを放出する。私たちはライノウイルスの感染受容体およびウイルスRNAの細胞質放出部位である酸性エンドゾームに着目し、ICAM-1の発現抑制と酸性エンドゾームをアルカリにすることでライノウイルス感染抑制効果が出ることを報告してきた。今回、私たちはCOPDの治療薬として広く用いられているβ2-刺激薬の急性増悪抑制効果に着目し、塩酸プロカテロールの抗ライノウイルス作用を期待して、ヒト気管上皮細胞初代培養細胞を用いたin vitro系で実験した。その結果、塩酸プロカテ

ロールがライノウイルス培養液放出量を抑制すること、感染受容体であるICAM-1の細胞表面発現を抑制すること、酸性エンドゾームを変化させないことが明らかとなった。これらの結果から、塩酸プロカテロールが感染受容体であるICAM-1を減少することによって、ライノウイルス感染抑制効果をもたらすことが示唆された。また、炎症性サイトカインやICAM-1の減少は、ライノウイルス感染でもたらされる気道炎症を抑制する作用を塩酸プロカテロールが有している可能性が示唆された。β2-刺激薬による気道上皮細胞あるいは血管内皮細胞におけるICAM-1あるいは炎症性サイトカインの合成抑制効果が報告されており、今回の結果と類似している。ただし、塩酸プロカテロールを含めてβ2-刺激薬がCOPDの急性増悪を引き起こす風邪を抑制するかどうか明らかになっていない。また、塩酸プロカテロール以外のβ2-刺激薬のライノウイルス感染抑制効果も不明である。ICAM-1や炎症性サイトカインの合成に関係する、転写因子NF-kappa Bに対する効果についても今後の研究課題として残っている。塩酸プロカテロールのライノウイルス感染抑制効果、炎症性サイトカインやICAM-1の減少効果はβ2-刺激薬の急性増悪抑制効果に関連しているかもしれない。

2. RSウイルスは乳幼児の急性細気管支炎の原因ウイルスとされていたが、最近になって高齢者の感冒あるいはCOPD急性増悪の原因ウイルスとしての存在が報告されるようになった。RSウイルスの感染はウイルス蛋白として接着蛋白(attachment protein: G蛋白)および細胞融合蛋白(fusion protein: F蛋白)の存在が明らかになっている。また、感染する細胞側の受容体としてヘパラン硫酸およびsmall GTPaseが報告されている。Small GTPaseはsmall GTP-binding protein RhoAとも呼ばれ、細胞骨格を制御する蛋白としての研究がこれまでなされ、呼吸器・循環器領域では血管内皮細胞の透過性に関与する報告がなされてきた。RhoAはRSウイルスの細胞内進入やRSウイルスの細胞融合に関係する。RhoAの合成ペプチドは細胞実験においてRSウイルスの感染を抑制することが報告された。抗RSウイルスヒト化

モノクローナル抗体は発売されているが、RSウイルス感染を抑制する治療薬は開発されていない。

今回の研究で私たちは RhoA の機能抑制が報告されているマクロライド抗生物質バフィロマイシン、臨床で使用されているマクロライドであるエリスロマイシンおよびクラリスロマイシンが RS ウイルス感染を抑制することを明らかにした。同様に RhoA の活性化を抑制し、血管内皮透過性を調節する AGGC の RS ウイルス感染抑制効果を明らかにした。今後、これらの薬品が培養ヒト気管上皮細胞において RhoA の活性化を抑制しているのか、さらに検討の予定である。また、他の医薬品で同様の RS ウイルス感染抑制作用がないかどうか、今後の研究課題として残っている。

#### E. 結 論

塩酸プロカテロールのライノウイルス感染抑制効果、炎症性サイトカインや ICAM-1 の減少効果が示唆された。マクロライドおよび RhoA 活性化抑制薬による RS ウイルス感染抑制効果が示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ishizawa K, Suzuki T, Yamaya M, Jia YX, Kobayashi S, Ida S, Kubo H, Sekizawa K, Sasaki H: Erythromycin increases bactericidal activity of surface liquid in human airway epithelial cells. *Am J Physiol* 2005, 289:L565-L573.
- 2) Sasaki T, Yamaya M, Yasuda H, Inoue D, Yamada M, Nishimura H, Sasaki H: A proton pump inhibitor lansoprazole inhibits rhinovirus infection in cultured human tracheal epithelial cells. *Eur J Pharm* 2005, 509:201-210.
- 3) Yasuda H, Yamaya M, Sasaki H, Inoue D, Ebihara S, Takahashi H, Nemoto M, Asada M, Sasaki H: Increased arterial carboxy-hemoglobin concentrations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J*

*Respir Crit Care Med* 2005, 171:1246-1251.

- 4) Asada M, Yamaya M, Ebihara S, Yasuda H, Tomita N, Kubo H, Sasaki H: Interleukin-1 $\beta$  gene polymorphisms associated with COPD. *Chest* 2005, 128:1072-1073.
- 5) Yasuda H, Suzuki T, Zayasu K, Ishizuka S, Kubo H, Sasaki T, Nishimura H, Sekizawa K, Yamaya M: Inflammatory and bronchospastic factors in asthma exacerbations caused by upper respiratory tract infections. *Tohoku J Exp Med* 2005, 207:109-118.
- 6) Kubo H, Nakayama K, Yanai M, Suzuki T, Yamaya M, Watanabe M, Sasaki H: Anticoagulant therapy for idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2005, 128:1475-1482.
- 7) Takahashi H, Ebihara S, Okazaki T, Asada M, Sasaki H, Yamaya M: Differential inhibition of vacular endothelial growth factor-induced tumor angiogenesis and heparanase among unfractionated heparin, dalteparin and danaparoid. *Brit J Pharmacol* 2005, 146:333-343.
- 8) Ebihara S, Okazaki T, Ebihara T, Ohru T, Yamaya M, Asada M, Yasuda H, Yamazaki M, Seki M, Toida I: Molecular differentiation of Mycobacterium Tuberculosis complex on the basis of genetic deletions. *Res Adv in Microbiology* 2005, 35-45.
- 9) Yamaya M, Shibahara S: Heme oxygenase in human diseases. In: *Heme Oxygenase in Biology and Medicine* (Otterbein LE, Zuckerbraun B, eds), pp1-40, Nova Science Publishers, Inc, New York, 2005.

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

- 1) 発明の名称：ライノウイルス感染予防剤  
出願者：山谷睦雄、安田浩康、佐々木英忠  
出願番号：特願 2004-98995 号  
(特許申請中)

## 5. 自己免疫性肝炎の発症に関する微生物の関与

分担研究者 中島 淳 (横浜市立大学大学院分子消化管内科学 助教授)

研究要旨 自己免疫性肝炎の発症に関する Virus の関与を近年急速に進歩してきた遺伝子発現の網羅的解析により同定することを行った。各症例につき約 6 万個の肝組織中の発現遺伝子のプロファイリングから自己免疫性肝炎に特異的に発現している Virus 由来の遺伝子を 6 個ほど同定することができた。今後はさらに発症初期の病変を収集し解析、Validation などを行っていく予定である

### A. 研究目的

自己免疫性肝炎 (Autoimmune Hepatitis:以下 AIH) は主として中年以降の女性に好発し、放置すると自覚症状が乏しいこともあり比較的短期間で肝硬変に至る原因不明の難治性疾患である。AIH の病態形成に何らかの Virus infection の関与がないかはこれまで特定の Virus については種々の研究がされてきたが否定的であった。

今回の研究では AIH の病態形成に何らかの Virus infection の関与がないかを患者肝臓生検組織を用い遺伝子発現の網羅的解析手法を用いて virus 遺伝子の発現の同定を試みた。

### B. 研究方法

インフォームドコンセントを得たうえで入院の上、肝臓組織の針生検を施行した。対象患者は AIH、コントロールとして C 型慢性肝炎患者の肝生検組織を用いた自己免疫性肝炎患者からの肝臓生検組織中の遺伝子発現プロファイリングを比較、自己免疫性肝炎特異的 Virus 由来の発現遺伝子のリストを作成し、自己免疫性肝炎特異的発現遺伝子のリストから診断や治療に有用なマーカー遺伝子の検索をあわせて行った。

遺伝子発現プロファイリングは肝生検組織より RNA を抽出し、Quality check の後、アフィメトリックス社 Gene Chip を用いた。

(倫理面への配慮)

平成 16 年に学内倫理委員会において承認を得たのち、十分な患者様の同意を得て検体を採取している。

### C. 研究結果

発症後 2 年～5 年の自己免疫性肝炎患者 (AIH) からの肝臓生検 5 名、慢性 C 型 10 例からの肝生検のサンプルが集められた。しかしながら自己免疫性肝炎患者からの 2 検体は RNA の質が不十分であり症例数が十分には集まらなかった。得られたサンプルからプロファイリング解析を行った。

網羅的遺伝子発現解析のデータベースから Virus 由来の遺伝子の発現の有無を Bioinformatics の手法を用いて検索した①～⑥を同定した。

- ① HTLV-1
- ② HBV (X)
- ③ HPV E6
- ④ Moloney leukemia virus
- ⑤ MMTV
- ⑥ Myeloblastosis virus

### D. 考 察

特定疾患の発症に微生物が関与していることはこれまで多くの研究者がその可能性を示唆してきているが、方法論的にそれを確認することができなかった。今回の研究では、これまで特定の微生物に狙いを定めた研究手法が主だったものであった当該領域において、近年急速に進歩してきた遺伝子発現プロファイリング技術を用いて、患者組織における 5 万個を超える遺伝子発現の網羅的解析を行い微生物の関与を調べた方法論が学術的にはこれまでの手法にないアプローチであることが特記され

る。決め手となる治療法のない本疾患に virus などの特定微生物の関与を証明できれば本疾患で苦しむ多くの患者に対する福音になるばかりか、現在社会的に深刻な医療費の抑制にもつながりその社会的意義は計り知れない。今回は症例数が少なかったが、今後症例数を増やして検討したいと考えている。また、少ない症例数ながらも可能性のある候補遺伝子が5つ同定された。ひとつでも発症に関与する遺伝子が見つかればブレークスルーとなる可能性を示唆するものである。今後はできるだけ発症初期の患者組織を収集し、解析することが重要であると考えられた。

#### E. 結論

網羅的遺伝子発現解析のデータベースから Virus 由来の遺伝子の発現の有無を Bioinformatics の手法を用いて検索した①～⑥を同定した。

- ① HTLV-1
- ② HBV (X)
- ③ HPV E6
- ④ Moloney leukemia virus
- ⑤ MMTV
- ⑥ Myeloblastosis virus

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Osawa E, Nakajima A, Fujisawa T, Kawamura YI, Toyama-Sorimachi N, Nakagama H, Dohi T: Predominant T helper type 2-inflammatory responses promote murine colon cancers. *Int J Cancer*, 2005. [Epub ahead of print]
- 2) Schaefer KL, Denevich S, Ma C, Cooley SR, Nakajima A, Wada K, Schlezinger J, Sherr D, Saubermann LJ: Intestinal antiinflammatory effects of thiazolidinedione peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands on T helper type 1 chemokine regulation include nontranscriptional control mechanisms. *Inflamm Bowel Dis* 2005, 11:244-252.
- 3) Inamori M, Togawa J, Chiguchi G, Abe Y, Kikuchi T, Muramatsu K, Kawamura H, Kobayashi N, Kirikoshi H, Shimamura T, Sakaguchi T, Takamura T, Ueno N, Nakajima A: Evaluation of the effects of anti-secretory drugs on intragastric acidity: is combined therapy with a proton pump inhibitor and an H2 receptor antagonist effective as initial treatment? *J Gastroenterol* 2005, 40:213-214.
- 4) Kubota K, Abe Y, Inamori M, Kawamura H, Kirikoshi H, Kobayashi N, Saito S, Ueno N, Nakajima A: Percutaneous transhepatic gallbladder stenting for recurrent acute acalculous cholecystitis after failed endoscopic attempt. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005, 12:286-289.
- 5) Iwasaki T, Nakajima A, Yoneda M, Yamada Y, Mukasa K, Fujita K, Fujisawa N, Wada K, Terauchi Y: Serum ferritin is associated with visceral fat area and subcutaneous fat area. *Diabetes Care* 2005, 28:2486-2491.
- 6) Lu J, Imamura K, Nomura S, Mafune K, Nakajima A, Kadowaki T, Kubota N, Terauchi Y, Ishii G, Ochiai A, Esumi H, Kaminishi M: Chemopreventive Effect of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  on Gastric Carcinogenesis in Mice. *Cancer Res* 2005, 65:4769-4774.
- 7) Inamori M, Togawa J, Iwasaki T, Ozawa Y, Kikuchi T, Muramatsu K, Chiguchi G, Matsumoto S, Kawamura H, Abe Y, Kirikoshi H, Kobayashi N, Shimamura T, Kubota K, Sakaguchi T, Saito S, Ueno N, Nakajima A: Early effects of lafutidine or rabeprazole on intragastric acidity: which drug is more suitable for on-demand use? *J Gastroenterol* 2005, 40:453-458.
- 8) Masuda T, Wada K, Nakajima A, Okura M, Kudo C, Kadowaki T, Kogo M, Kamisaki Y: Critical Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  on Anoikis and Invasion of Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005, 11:4012-4021.

- 9) Togawa J, Inamori M, Fujisawa N, Takahashi H, Yoneda M, Kawamura H, Abe Y, Kirikoshi H, Kobayashi N, Sakaguchi T, Takamura T, Nakajima A, Ueno N, Sekihara H: Efficacy of a Triple Therapy with Rabeprazole, Amoxicilin, and Faropenem as second-line Treatment after Failure of Initial Helicobacter pylori Eradication Therapy. *Hepato-Gastroenterology* 2005, 52:645-648.
- 10) Schaefer KL, Wada K, Takahashi H, Matsuhashi N, Ohnishi S, Wolfe MM, Turner JR, Nakajima A, Borkan SC, Saubermann LJ: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  inhibition Prevents Adhesion to the Extracellular Matrix and Induces Anoikis in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Cancer Res* 2005, 65:2251-2259.
- 11) Iwasaki T, Mukasa K, Yoneda M, Ito S, Yamada Y, Mori Y, Fujisawa N, Fujisawa T, Wada K, Sekihara H, Nakajima A: Marked Attenuation of Production of Collagen Type I from Cardiac Fibroblasts by Dehydroepiandrosterone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005, 288:E1222-1228.
2. 学会発表
- 1) 藤澤信隆、藤澤聡郎、中島 淳：大腸上皮細胞の増殖と癌化における Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR $\gamma$ )の役割に関する検討。パネルディスカッション 5-12. 第91回日本消化器病学会(東京)平成17年4月14日
- 2) Fujisawa T, Takahashi H, Fujisawa N, Masato Y, Fujita K, Nakajima A, Schaefer K, Saubermann LJ: Inhibition of PPAR $\gamma$  Activity Induced Apoptosis of Esophageal Carcinoma Cells. *Anaheim (CA), USA, April, 2005.*
- 3) Fujisawa T, Takahashi H, Fujisawa N, Yoneda M, Fujita K, Nakajima A, Schaefer K, Saubermann LJ: Control of PPAR $\gamma$  expression for suppression of Proliferation, Invasion and Metastasis in the gastric carcinoma. 6th International Gastric Cancer Congress, *Yokohama, Japan, May, 2005.*
- 4) Fujisawa N, Fujisawa T, Nakajima A: Peroxisome Proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) regulates cell proliferation, which is an explanation for the anti-tumorigenic properties of PPAR $\gamma$ . *Tumor and Cell Biology, Digestive Disease Week 2005, Chicago(IL), USA, May, 2005.*
- 5) Fujisawa T, Takahashi H, Fujisawa N, Yoneda M, Fujita K, Nakajima A, Schaefer K, Saubermann LJ: Suppression of PPAR $\gamma$  expression affects the proliferation and invasion in the gastric cancer cells. *Digestive Disease Week 2005, Chicago (IL), USA, May, 2005.*
- 6) Osawa E, Doi T, Nakajima A: Indction of Th2-Type Hapten-Induced Tumors. *Digestive Disease Week 2005, Chicago (IL), USA, May, 2005.*
- 7) Nagaishi T, Iijima H, Pao L, Chen D, Glickman J, Nakajima A, Neel BG, Blumberg RS: T Cell Inhibition By Ceacam1 Isoforms Expressing a Long Cytoplasmic Domain. *Digestive Disease Week 2005, Chicago (IL), USA, May, 2005.*
- 8) Takahashi H, Fujisawa T, Fujita K, Masuda T, Wada K, Schaefer K, Saubermann LJ, Nakajima A: Decreased Ppargamma Activity Mediated Inability of Cell Adhesion and Invasion in Pancreatic Carcinoma Cells. *Digestive Disease Week 2005, Chicago (IL), USA, May 17, 2005.*
- 9) 米田正人、中島 淳、前山史朗：門脈経由の一酸化窒素 (NO) によるチロシンのニトロ化 (nitrotyrosine) は NAFLD (nonalcoholic fatty liver disease) の発症進展に關与する。第47回日本消化器病学会(神戸)平成17年10月5日
- 10) 藤澤聡郎、藤澤信隆、高橋宏和、米田正人、藤田浩司、池田多聞、阿部泰伸、加藤 暁、河村晴信、稲森正彦、桐越博之、小林規俊、窪田賢輔、坂口隆、斉藤 聡、中島 淳：PPAR $\gamma$ 阻害剤による $\beta$ カテニンの発現増加を介した大腸発癌の促進。第47回日本消化器病学会(神戸)平成17年10月5日

- 11) 稲森正彦、池田多聞、藤澤聡郎、藤田浩司、高橋宏和、藤澤信隆、米田正人、河村晴信、阿部泰伸、中村ちの、中戸川満智子、加藤 暁、桐越博之、島村 健、小林規俊、窪田賢輔、斉藤 聡、坂口 隆、上野規男、中島 淳：Breath ID system を用いた連続呼気採取による胃排出能の評価—体位による変化。第 47 回日本消化器病学会(神戸)平成 17 年 10 月
- 12) 藤澤信隆、米田正人、高橋宏和、藤澤聡郎、藤田 司、池田多聞、河村晴信、稲森正彦、阿部泰伸、島村 健、桐越博之、小林規俊、窪田賢輔、坂口 隆、斉藤 聡、上野規男、中島 淳：Helicobacter pylori 陽性患者の除菌療法に関する検討。第 47 回日本消化器病学会(神戸)平成 17 年 10 月
- 13) 高橋宏和、高山哲治、中島 淳：大腸癌への新たな治療戦略としての PPAR $\gamma$ 。第 47 回日本消化器病学会(神戸)平成 17 年 10 月
- 14) 米田正人、藤田浩司、藤澤聡郎、池田多聞、藤澤信隆、高橋宏和、河村晴信、稲森正彦、阿部泰伸、小林規俊、桐越博之、窪田賢輔、斉藤 聡、上野規男、中島 淳、前山史朗、中江 大：単純性脂肪肝患者と NASH 患者の肝組織における遺伝子発現プロファイリング解析より NASH に進展するのに関与する遺伝子を同定する試み。第 47 回日本消化器病学会(神戸)平成 17 年 10 月
- 15) 窪田賢輔、中島 淳、藤澤聡郎：十二指腸乳頭部病変に対する内視鏡所見および生検病理検査の有用性。第 47 回日本消化器病学会(神戸)平成 17 年 10 月
- 16) 藤澤信隆、池田多聞、高橋宏和、藤澤聡郎、米田正人、河村晴信、稲森正彦、阿部泰伸、島村 健、桐越博之、小林規俊、窪田賢輔、坂口 隆、斉藤 聡、上野規男、中島 淳：頸部リンパ節転移巣にて脱分化を示した大腸癌の 1 例。第 47 回日本消化器病学会(神戸)平成 17 年 10 月
- 17) 飯田 洋、稲森正彦、池田多聞、藤澤聡郎、高橋宏和、藤澤信隆、米田正人、藤田浩司、阿部泰伸、河村晴信、中戸川満智子、加藤 暁、桐越博之、島村 健、小林規俊、窪田賢輔、中村ちの、斉藤 聡、上野規男、中島 淳：毛孔性紅色粧糠疹の治療中に発症した蛋白漏出性胃腸症の 1 例。第 47 回日本消化器病学会(神戸)平成 17 年 10 月
- 18) 秋本恵子、稲森正彦、池田多聞、藤澤聡郎、藤田浩司、高橋宏和、藤澤信隆、米田正人、河村晴信、阿部泰伸、中戸川満智子、加藤 暁、桐越博之、島村 健、小林規俊、窪田賢輔、中村ちの、斉藤 聡、上野規男、中島 淳：下血が発見の契機になった抗リン脂質抗体陽性若年女性の 1 例。第 47 回日本消化器病学会(神戸)平成 17 年 10 月
- 19) 藤澤聡郎、藤澤信隆、高橋宏和、米田正人、藤田浩司、池田多聞、阿部泰伸、加藤 暁、河村晴信、稲森正彦、桐越博之、小林規俊、窪田賢輔、坂口 隆、斉藤 聡、中島 淳：PPAR $\gamma$  阻害剤による胃癌の増殖、浸潤の抑制。第 47 回日本消化器病学会(神戸)平成 17 年 10 月
- 20) 米田正人、中島 淳、前山史朗：日本人の生活習慣病（内蔵型肥満症、皮下脂肪型肥満症、2 型糖尿病、高脂血症）から検討した NAFLD の疫学。第 47 回日本消化器病学会(神戸)平成 17 年 10 月
- 21) 藤田浩司、米田正人、藤澤聡郎、藤澤信隆、高橋宏和、池田多聞、河村晴信、稲森正彦、阿部泰伸、小林規俊、桐越博之、窪田賢輔、斉藤 聡、上野規男、中島 淳、前山史朗、中江 大：コリン欠乏ラットを用いたアンジオテンシン 2 受容体拮抗薬による NAFLD、NASH 進展抑制メカニズムの解析。第 47 回日本消化器病学会(神戸)平成 17 年 10 月
- 22) 藤田浩司、米田正人、藤澤聡郎、藤澤信隆、高橋宏和、池田多聞、河村晴信、稲森正彦、阿部泰伸、小林規俊、桐越博之、窪田賢輔、斉藤 聡、上野規男、中島 淳、前山史朗、中江 大：非アルコール性脂肪肝炎の治療における pioglitazone 投与の適応に関する検討。第 47 回日本消化器病学会(神戸)平成 17 年 10 月
- 23) 池田多聞、藤田浩司、藤澤聡郎、高橋宏和、藤澤信隆、米田正人、河村晴信、加藤 暁、稲森正彦、阿部泰伸、小林規俊、桐越博之、窪田賢輔、斉藤 聡、上野規男、中島 淳：C 型慢性肝炎患者での内臓脂肪と肝線維化

の関係. 第 47 回日本消化器病学会(神戸)  
平成 17 年 10 月

- 24) 小林規俊、藤田浩司、藤沢聡郎、高橋宏和、  
藤沢信隆、米田正人、阿部泰伸、稲森正彦、  
河村晴信、桐越博之、島村 健、窪田賢輔、  
坂口 隆、斉藤 聡、中島 淳、上野規男：  
FDG-PET による膵臓癌の予後予測は可能  
か? 第 47 回日本消化器病学会(神戸)平成  
17 年 10 月
- 25) 加藤 暁、上野規男、阿部泰伸、河村晴信、  
藤澤聡郎、藤田浩司、高橋宏和、藤澤信隆、  
米田正人、池田多聞、稲森正彦、桐越博之、  
小林規俊、窪田賢輔、斉藤 聡、中島 淳：  
汎血球減少を契機に発見された脾血管種  
の一例. 第 47 回日本消化器病学会(神戸)  
平成 17 年 10 月
- 26) 高橋宏和、池田多聞、藤田浩司、藤沢聡郎、  
藤沢信隆、米田正人、河村晴信、稲森正彦、  
阿部泰伸、桐越博之、小林規俊、窪田賢輔、  
坂口 隆、斉藤 聡、上野規男、中島 淳：  
膵臓癌細胞に対する PPAR $\gamma$  の作用解析.  
第 47 回日本消化器病学会(神戸)平成 17 年  
10 月
- 27) 河村晴信、上野規男、阿部泰伸、蓮尾公篤、  
藤澤聡郎、藤田浩司、高橋宏和、藤澤信隆、  
米田正人、池田多聞、稲森正彦、桐越博之、  
小林規俊、窪田賢輔、斉藤 聡、中島 淳：  
胆嚢内出血を造影超音波検査にて診断し  
得た 1 例. 第 47 回日本消化器病学会(神戸)  
平成 17 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし



## 6. *Mycoplasma amphoriforme* 遺伝子診断系の国内導入ならびに抗リン脂質抗体症候群とマイコプラズマ感染

分担研究者 荒川 宜親 (国立感染症研究所細菌第二部)

研究協力者 佐々木裕子 (感染研・細菌第二部)、  
有賀 正、川村信明、波多野典一 (北大医学研究科・生殖・発達講座)  
永田典代 (感染研・感染病理部)

研究要旨 先天性免疫不全患者における慢性呼吸器疾患の起因菌の一つである可能性が示唆される新種のマイコプラズマ アンフォリフォルム (*M. amphoriforme*) がイギリスとデンマークで分離されたことから、本菌の診断系の国内導入を行った。PCR を用いた遺伝子増幅系による診断系については、報告されたプライマーの評価を行った結果、分離菌の同定には使用可能なものの、臨床検体抽出 DNA を鋳型に用いるには、感度ならび特異性に問題があることが示唆された。現在、確立されていない血清診断法については、臨床で行われている呼吸器疾患起因菌である近縁の肺炎マイコプラズマ (*M. pneumoniae*) との抗原交差性について解析した。DnaK を含む交差抗原の存在が同定され、交差性があることが強く示唆された。導入した *M. amphoriforme* に対する遺伝子診断系を含め、慢性呼吸器疾患をもつ先天性免疫不全患者 5 名の咽頭スワブ等からの数種のマイコプラズマ遺伝子検出を行ったところ、1 名の咳を症状とする Wiskott-Aldrich 症候群患者より肺炎マイコプラズマの遺伝子が検出された。肺炎マイコプラズマと *M. amphoriforme* の鑑別診断系の開発にならび、先天性免疫不全患者におけるマイコプラズマ感染調査の必要性が示唆された。

2 番目のテーマとして、マイコプラズマ感染による原発性抗リン脂質症候群発症の可能性について検討する為、抗カルジオリピン抗体陽性者血清とマイコプラズマ菌体の反応を解析した結果、*M. penetrans* は血清と反応し、肺炎マイコプラズマは反応しなかった。反応した蛋白質のプロテオミクス解析を試みたが同定には至らなかった。カルジオリピン合成酵素遺伝子の有無と反応性に関連があった為、蛋白質以外のリン脂質の関与の可能性も考えられる。今回の予備的実験により、APS における自己抗体産生の原因となるカルジオリピン等のリン脂質と結合しているヒト血液凝固因子とマイコプラズマの分子相同性、特に抗原 mimicry についても解析を行う必要性が示唆された。

### A. 研究目的

マイコプラズマは、Firmicutes という細菌の一群の中の Mollicutes 綱 *Mycoplasma* 属に属する 100 種以上の種をさし、宿主への寄生生活に適応し進化した結果とみられる以下の特徴をもつ。すなわち、細胞壁を欠くこと、蛋白質やコレステロール合成経路を欠く一方、栄養の一部を宿主に依存していること、結果、ゲノムサイズが小さいこと、ならびに宿主の種特異性が狭いことがあげられる。ヒトから分離される種は、約 10 種あり、主として呼吸器や泌尿器から分離され、特に *Mycoplasma pneumoniae* は肺

炎を含む呼吸器疾患の、また、*M. genitalium* は、非リン菌性尿道炎の起因菌である。*Mycoplasma* 属におけるヒトからの新種発見については、1991 年にヒト後天性免疫ウイルス (HIV) 感染者の尿から *M. penetrans* が [1]、また、2003 年に先天性免疫不全者で慢性気管支炎患者の気道分泌物から *M. amphoriforme* が見つかり [2]、それぞれ、1992 年と 2005 年に同定されている [3,4]。さらに、*M. penetrans* については、1999 年に非 HIV 感染者における原発性の抗リン脂質抗体症候群 (APS) 患者の起因菌の可能性が強く示唆される症例報告がある

[5]。1999年の原発性APS症例ならびに、2003年の慢性気管支炎症例の2例において、患者から分離されたマイコプラズマ株についての感受性試験で選択された抗菌剤による治療の効果が認められることから、適切な早期診断にもとづく抗菌剤選択による治療可能例の存在が示唆されている。本研究の目的は、マイコプラズマ感染と特定疾患の関連性の検討、ならびに、関連性を調査するために必要な新たな診断系を開発、改良することにあるが、今年度は、特に2005年に同定された新種 *M. amphoriforme* の遺伝子診断系の国内導入と新たな血清診断法開発の際に必要な *M. amphoriforme* と *M. pneumoniae* の抗原交差性の解析を主目的とした。導入した遺伝子診断法を用いた国内の先天性免疫不全患者の慢性呼吸器疾患とマイコプラズマ感染の関連についての調査も開始した。さらに、原発性APSとマイコプラズマ感染との関連性、特に自己抗体産生を促す一因となりうるヒトとマイコプラズマの分子相同性、とくに抗原性 mimicry 解明を目的とし、予備的解析を始めたので、それについても重ねて報告する。

## B. 研究方法

1) *M. amphoriforme* 遺伝子診断法の国内導入  
*M. amphoriforme* のタイプ株 A39 を含むイギリスでの分離菌株ならびにデンマークでの分離株は、Dr. Jensen, J. S. (Staten Serum Institut, Denmark) より分与を受けた。イギリス株については、Dr. Webster (Royal Free Hospital, UK) の承諾を得た上で分与を受けた。培養を試みた培地は、マイコプラズマ用培地である Hayflick's medium/ agar, SP-4 medium/ agar ならびに modified Frii's medium/agar の3種類である。Modified Frii's medium/agar は、培養が最も困難な豚由来マイコプラズマの野外分離用に開発された培養組成で、通常用いる PPLO broth 粉末に Brain-Heart infusion 粉末を合わせハンクス液で希釈した液を滅菌後、馬血清 20% ならびに、新鮮酵母エキス 0.75% 等を添加した組成になっている。培養温度は 37°C、培養条件は、好気、通性嫌気ならびに CO<sub>2</sub> インキュベーター内 (CO<sub>2</sub>, 5%) の3条件で行った。培養した *M. amphoriforme* は、透過型電子顕微鏡

(scanning electromicroscopy, SEM) にて観察を行った。核酸の抽出には、培養液中のマイコプラズマを遠心 (10,000 xg, 30 min) にて集菌し、SDS ならびに Proteinase K 存在下で 37°C にて培養後、フェノールおよびクロロホルムにて精製、エタノール沈殿により回収した。Polymerase-chain reaction (PCR) 法による遺伝子増幅のプライマーとしては、16SrRNA 遺伝子配列をもとに作製、報告された *M. amphoriforme* 特異プライマー amph-F, amph-R [2]、以前に我々の研究室で開発したマイコプラズマならびに他の細菌の複数の属に相同性の高い 16SrRNA 遺伝子の領域をもとに作製した細菌 16SrRNA 遺伝子検出用ユニバーサルプライマーセット (以下、細菌ユニバーサルセット) 10F, 800R [6] と、その nested 化プライマーセットである 160F, 529R、ならびに、マイコプラズマ属の多く (*M. pneumoniae* を除く) を増幅する 16S-23SrRNA 遺伝子スペーサー領域配列をもとにしたマイコプラズマ検出キット (タカラ) を用いた。さらに、近縁種であり、主として呼吸器に感染する *M. pneumoniae* 特異的プライマーを用いて *M. amphoriforme* 遺伝子が増幅されるか否かについての検討も行った。PCR 法による増幅遺伝子の配列解析は、dye-terminator 法により行い、得られた配列結果は、報告された全ての遺伝子配列情報データベースに対して BLAST 検索による相同性比較を行いスコア化された結果から最も高い相同性を有する遺伝子を判定した。

## 2) 慢性呼吸器症状を呈する先天性免疫不全患者におけるマイコプラズマ感染の調査

先天性免疫不全患者の臨床検体は、国立感染症研究所ならびに共同研究施設である北海道大学における医学倫理委員会の承認を受けて、共同研究者である有賀 正医師による指導の下にインフォームド、コンセントを得て患者さんよりご提供いただいた。Wiskott-Aldrich 症候群、低ガンマグロブリン症を含む5名の患者由来咽頭スワブ4検体ならびに痰1検体から QIAamp Micro DNA 抽出キット (キアゲン) にて抽出、精製した DNA を鋳型に PCR を行った。用いたプライマーは、上記の通りである。咽頭スワブあるいは痰からのマイコプラズマ分離

培養は、寒天平板でのマイコプラズマ用コロニーの観察ならびに、出現コロニーを植えついだ液体培地における菌の発育による pH 変化を示す色調変化を指標とした。

### 3) *M. amphoriforme* と *M. pneumoniae* の抗原交差性の解析

マイコプラズマ全菌体成分の SDS-PAGE ならびに PVDF 膜への転写は、常套に従って行い、ペルオキシダーゼ標識二次抗体と反応後、基質による発色により可視化した。抗 *M. pneumoniae* 全菌体ウサギ血清、*M. pneumoniae* の主要付着蛋白 P1 の一部に対する大腸菌で作製したリコンビナント抗原 rP1-8 に対するマウス免疫血清、*M. pneumoniae* のマイナーな付着蛋白 P30 に対するモノクローナル抗体 (MoAb) は、我々の研究室で作製したものを用いた (協力、佐々木次雄、見理 剛、新谷三春)。PVDF 膜上で反応した蛋白質は、プロテオミクスを用いて同定を試みた。すなわち、蛋白質の転写された PVDF 膜のブロッキングには、非蛋白性のポリビニール、ピロリドンを用いた。可視化された反応蛋白質のバンドは、切り取り、膜上にて還元、アルキル化処理の後、トリプシン消化を施し、反応液中に存在するペプチドについて、LC-MS (LCQ-DECA XP, Thermo electron) にて質量解析を行い、MS/MS 解析により得られたピークの生データを、細菌ゲノム配列情報、特にマイコプラズマにおける全ゲノム解析終了菌種の配列情報由来の予想アミノ酸配列データベースと照合し、スコア化された情報をもとに蛋白質の同定を試みた。

### 4) 抗カリジオリピン抗体陽性者血清に反応するマイコプラズマ菌体成分の解析例

カリジオリピン抗体陽性者血清は、以下の市販の血清を用いた。Human Autoantibody positive sera (The binding site Ltd. UK) measured by ELISA-anticardiolipin IgG kit/ IgGAM kit, Human Cardiolipin (IgG and IgM) positive, Titer>144 GPL U/ml ならびに陰性対照として、Human negative control sera (両血清とも The binding site Ltd. UK) を用いた。上記のプロテオミクスによる解析法と同様の手法で、SDS-PAGE で展開したマイコプラズマ数種の全菌体抗原を

PVDF 膜に転写し、100 倍に希釈した血清と反応させ、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体と反応後、基質と反応させて可視化した。LC-MS による解析を行い、我々が以前に報告した *M. penetrans* HF-2 株の全ゲノム配列情報 [7] をもとにした予想アミノ酸配列データベースにて検索を行った。

## C. 研究結果

### 1) *M. amphoriforme* 遺伝子診断法の国内導入

液体培地における *M. amphoriforme* 増殖に伴う pH 変化による色調変化ならびに寒天平板上のコロニー観察が可能であったのは、modified Frier's medium/agar における CO<sub>2</sub> 存在下での培養のみであった (図 1A)。マイコプラズマの寒天平板上のコロニーは、目玉焼状になることが多いが、*M. pneumoniae*、*M. genitalium* は、目玉焼の黄身部分にあたる中心部に比べて白身部分にあたる周辺部が小さい形状を示すことが多く、また培養条件によっては、全体に均一で目玉焼状を示さないこともある。今回の培養条件における *M. amphoriforme* のコロニーも、全体に均一であった。文献上、培養が可能である Hayflick's 培地ならびに SP-4 培地での生育は見られなかった。Hayflick's 培地、SP-4 培地ならびに modified Frier's 培地における *M. pneumoniae* 生育状況の比較観察においても、modified Frier's 培地での生育が最も速かったこと、Hayflick's 培地で培養速度の遅い *M. genitalium* の生育 (1 週間以上かかる) も modified Frier's 培地では数日で増殖に伴う pH 変化による色調変化を認めたことから (データ示さず)、modified Frier's 培地は、*M. amphoriforme*、*M. pneumoniae* ならびに *M. genitalium* の培養に最適であり、特に、*M. amphoriforme* の培養に必須であると考えられた。SEM による観察では、*M. amphoriforme* が属するマイコプラズマ属の中の一群である Pneumoniae グループの種に見られる、宿主細胞への付着器官 (tip 構造) が観察された (図 1B, C)。*M. pneumoniae* の全体に細長い針のような形状に比べると (図示さず)、*M. amphoriforme* の形状は、body の部分が大きく、丸くふくらんでいた。

遺伝子診断法についての検討結果を以下にのべる。

a) *M. amphoriforme* 特異的 PCR プライマーセット amph-F, amph-R を用いて *M. amphoriforme* 遺伝子を鋳型に増幅した約 700bps の増幅遺伝子の配列解析の結果は、*M. amphoriforme* 16SrRNA 遺伝子に最も相同性が高く、目的の遺伝子を増幅していた。

b) *M. amphoriforme* 遺伝子を鋳型にした際、近縁の *M. pneumoniae* の 16SrRNA 遺伝子を増幅する Mpn-1F, Mpn-1R プライマーセットにより増幅される遺伝子は無かった。ただし、*M. pneumoniae* の主要付着蛋白 P1 をコードする *pl* 遺伝子配列をもとにした ADH4F、2N2C プライマーセットならびに ADH4F、N1 プライマーセットによって、各々約 550bps (*M. pneumoniae* を鋳型にすると 557bps) および 2 本のバンド約 400 と約 1.5kbps (*M. pneumoniae* を鋳型にすると 343bps) が増幅された。それら増幅遺伝子の配列解析の結果は、*recA* 遺伝子が最も相同性が高かった。

c) *M. amphoriforme* 遺伝子を鋳型に、細菌ユニバーサルセット 10F, 800R で増幅した、約 800bps の増幅遺伝子の配列解析の結果は、*M. amphoriforme* の 16SrRNA 遺伝子との相同性が最も高かったことから、細菌ユニバーサルセットの使用も可能であることが示唆された。

## 2) 慢性呼吸器症状を呈する先天性免疫不全患者におけるマイコプラズマ感染の調査

表 1 に 5 名の臨床検体からのマイコプラズマ遺伝子検出結果を示す。*M. amphoriforme* の遺伝子は、amph-F, amph-R を用いた PCR では検出されなかった。また、amph-F, amph-R は、臨床検体抽出 DNA 中の約 1kbps, 800bps ならびに 400bps の遺伝子を増幅した。*M. amphoriforme* 遺伝子の陽性対照においては、572bps の遺伝子のみが増幅されることより、非特異的増殖であると考えられた(図 2A)。一方、*M. pneumoniae* の遺伝子が、1 例の咳を症状とする Wiskott-Aldrich 症候群患者の咽頭スワブより検出された。*M. pneumoniae* に対する PCR プライマーセットは、nested 化されている上、今回の臨床検体を鋳型にした解析においても非特異的な遺伝子増幅は見られなかった(図 2B)。さらに、Genus *Mycoplasma* に対する PCR プライマーセットによる遺伝子増幅において、2 名

の副鼻腔炎を症状とする高 IgM 症候群患者より、マイコプラズマ遺伝子が検出された。この 2 名の咽頭スワブ検体からは、マイコプラズマの培養によっても菌株が分離され、寒天平板上でのコロニー観察も行えたが(図 3)、中心部が小さく、周辺部が大きいコロニーの形態から、周辺部が小さい *M. pneumoniae* ならびに *M. amphoriforme* 以外の種であると予想された。

## 3) *M. amphoriforme* と *M. pneumoniae* の抗原交差性の解析

*M. pneumoniae*, *M. penetrans* ならびに *M. amphoriforme* の全菌体抗原を SDS-PAGE にて展開後、ウエスタンブロッティング法ならびにプロテオミクスにて解析した結果は以下の通りである。a) 抗 *M. pneumoniae* 全菌ウサギ血清は、*M. amphoriforme* の DnaK をはじめ複数の蛋白質と反応した。*M. pneumoniae* においては、主要付着蛋白 P1 (約 190 kDa) と反応したが、*M. amphoriforme* において、200kDa 付近に抗体に反応するバンドは無かった。b) 抗 *M. pneumoniae*-マイナー付着蛋白 P30 に対する MoAb には、*M. amphoriforme* の 7 本のバンドが反応し、そのうちの 2 つのバンドは、分子量 200kDa 以上の高分子であることから House keeping 遺伝子以外の特異的蛋白質であることが予想された。しかしながら、*M. amphoriforme* の全ゲノム配列が解析されていないことから、プロテオミクスにより予想されたアミノ酸配列についての他種マイコプラズマデータベースを用いた検索では低いスコアしか得られず同定できなかった。c) *M. pneumoniae* の主要付着蛋白 P1 のリコンビナント蛋白に対するマウス免疫血清は、*M. amphoriforme* と反応しなかった。

## 4) 抗カリジオリピン抗体陽性者血清に反応するマイコプラズマ菌体成分の解析例

上述した 3 と同様の方法で、*M. pneumoniae*, *M. penetrans* ならびに *M. amphoriforme* の全菌体抗原を SDS-PAGE にて展開後、市販抗カリジオリピン抗体陽性者血清との反応をウエスタンブロッティング法で解析したところ、*M. penetrans* のみで約 20-30 kDa 付近の複数のバンドに反応した。再現性を見るための繰り返し実