

984-993, 2006

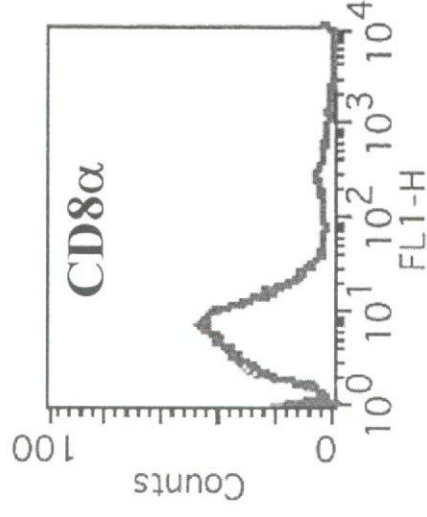
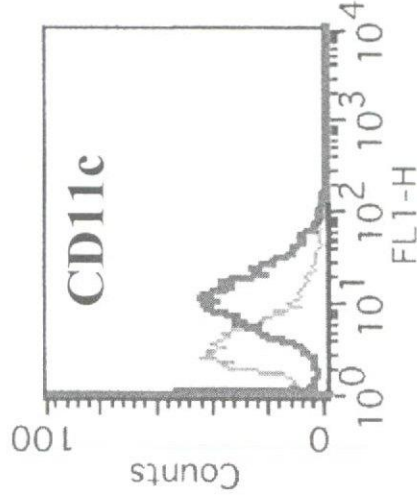
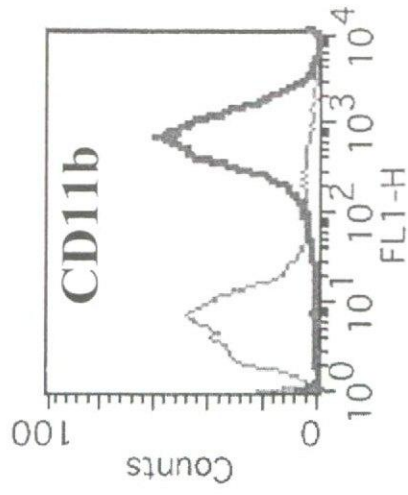
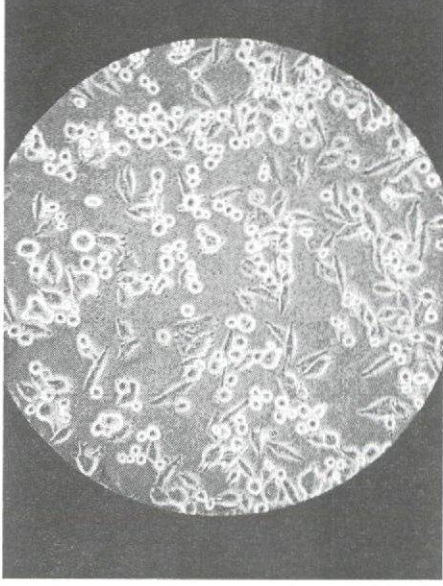
- 2) Minoura-Etoh J., K. Gotoh, R. Sato, M. Ogata, N. Kaku, T. Fujioka, A. Nishizono: *Helicobacter pylori* associated oxidant monochloramine induces reactivation of Epstein-Barr virus(EBV)in gastric epithelial cells latently infected with EBV. Journal of Medical Microbiology 55, 905-911. 2006
- 3) Pakamatz K., Y. Shoji , S. Ubol , C. Mitmoonpitak, H. Wilde, A. Nishizono, I. Kurane, K. Morimoto : Genetic analysis of dog rabies viruses circulating in Bangkok. Infection Genetics and Evolution 6, 235-240, 2006
- 4) Yamagata J, Ahmed K, Pakamatz K. Y. Mannen K, Xuyen D. K, Loi H. H, Dung N.V, A. Nishizono, : Molecular epidemiology of rabies in Vietnam. Microbiology and Immunology (in submission)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

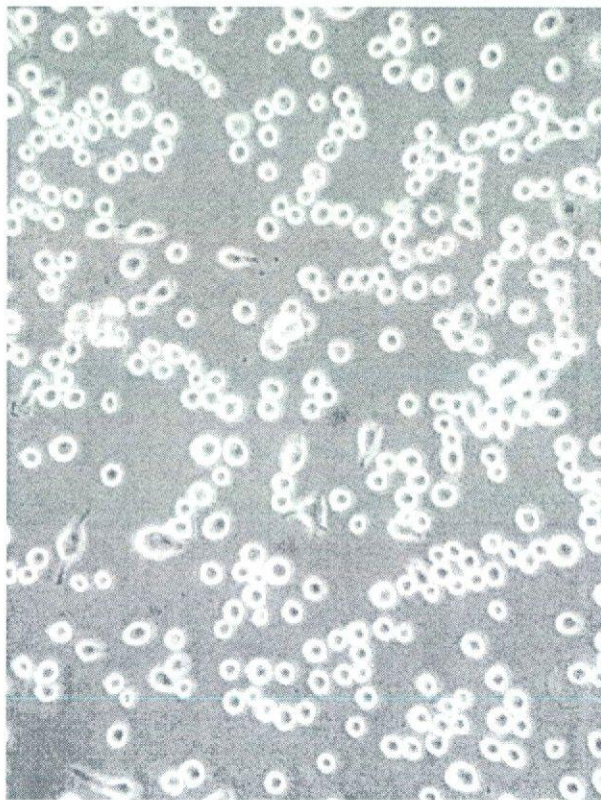
なし



**図1 JAWSIIの形態 (400x) と細胞表面マーカー**

一部はプラスチック底面に固着しpolygonalな形態を呈し、一部は浮遊している。細胞表面に表示されるマーカーはCD11b, CD11c陽性、CD8a陰性を示す。

(A)



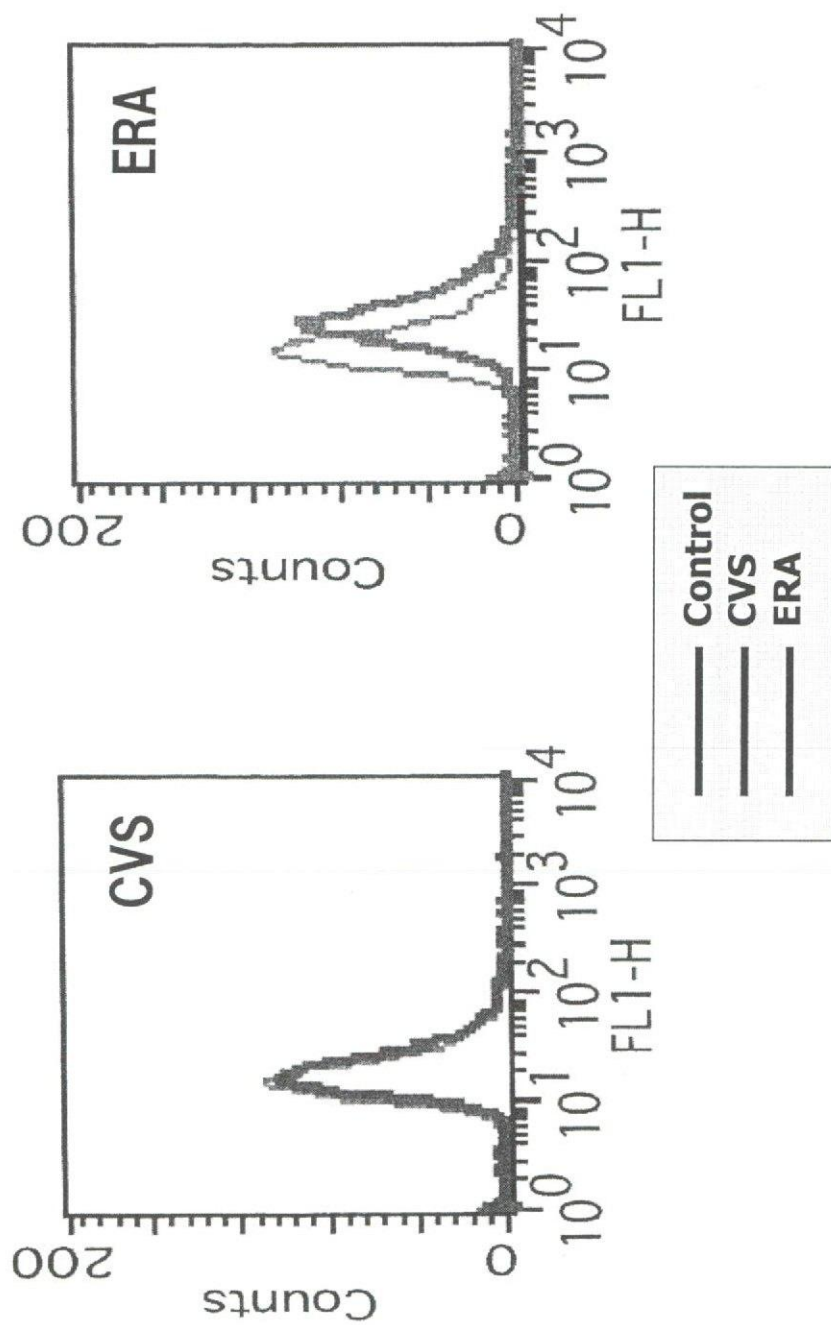
(B)



**図2 CVS 接種後72時間のJAWSII (A)とERA接種72時間後のJAWSII (B)**

ERAを接種したJAWSII細胞はより強い樹状化とフラスコ底面への固着化をしめす

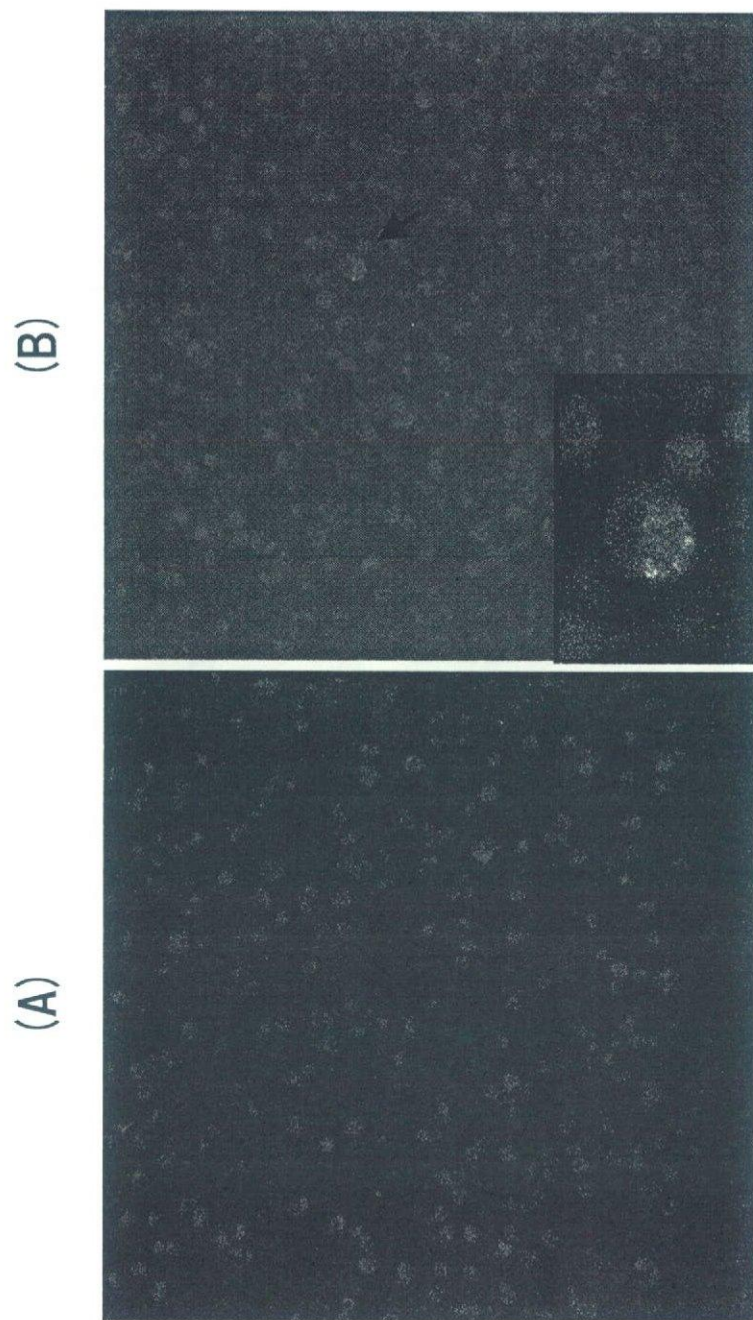




**図3 CVS, ERA接種後のJAWSII細胞内N蛋白の発現**

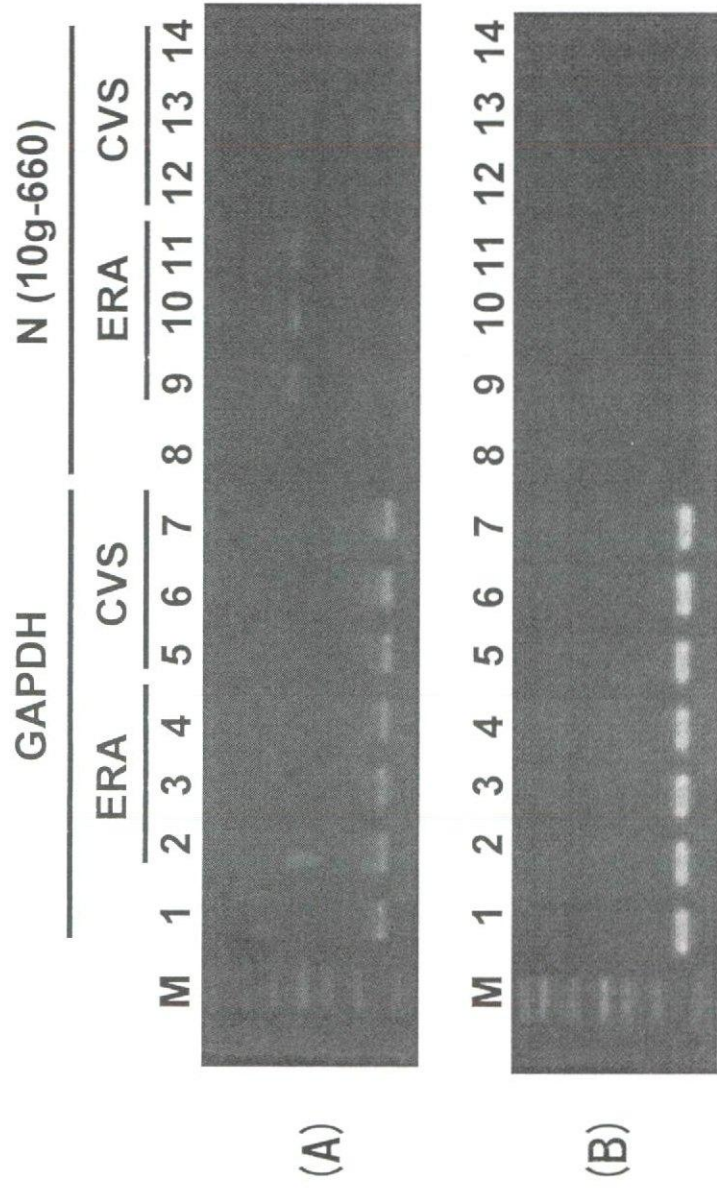
RVをmoi=5でJAWSIIIに感染、72時間後細胞を固定、浸透処理後に抗Nモノクローナル

抗体にて染色、FACScanにて計測。



**図4 CVS, ERA接種後のJAWSII細胞内N蛋白の発現**

RVをmoi=5でJAWSIIに接種、72時間後細胞を固定、浸透処理後に抗Nモノクローナル抗体にて染色、共焦点レーザー顕微鏡にて観察。CVA (A), ERA (B)、枠内はN蛋白陽性細胞の拡大像 (x400)



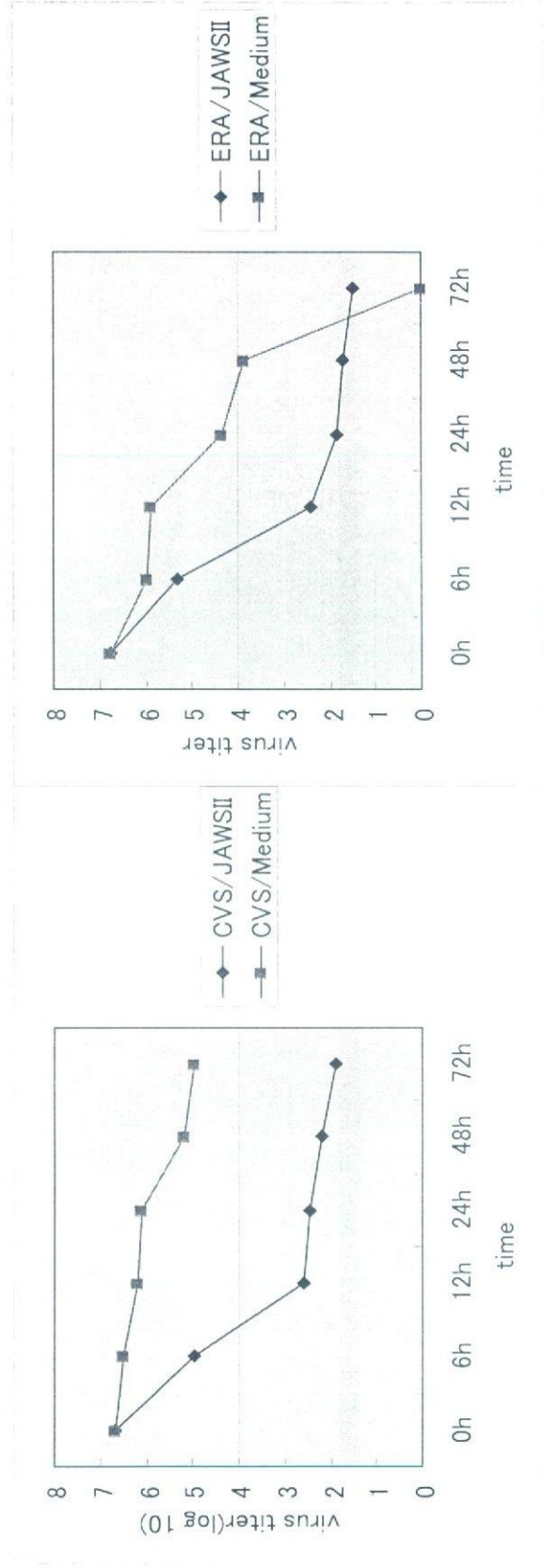
(A)

(B)

図5 ERA, CVS 接種後のJAWSII細胞のウィルス特異的mRNAの確認

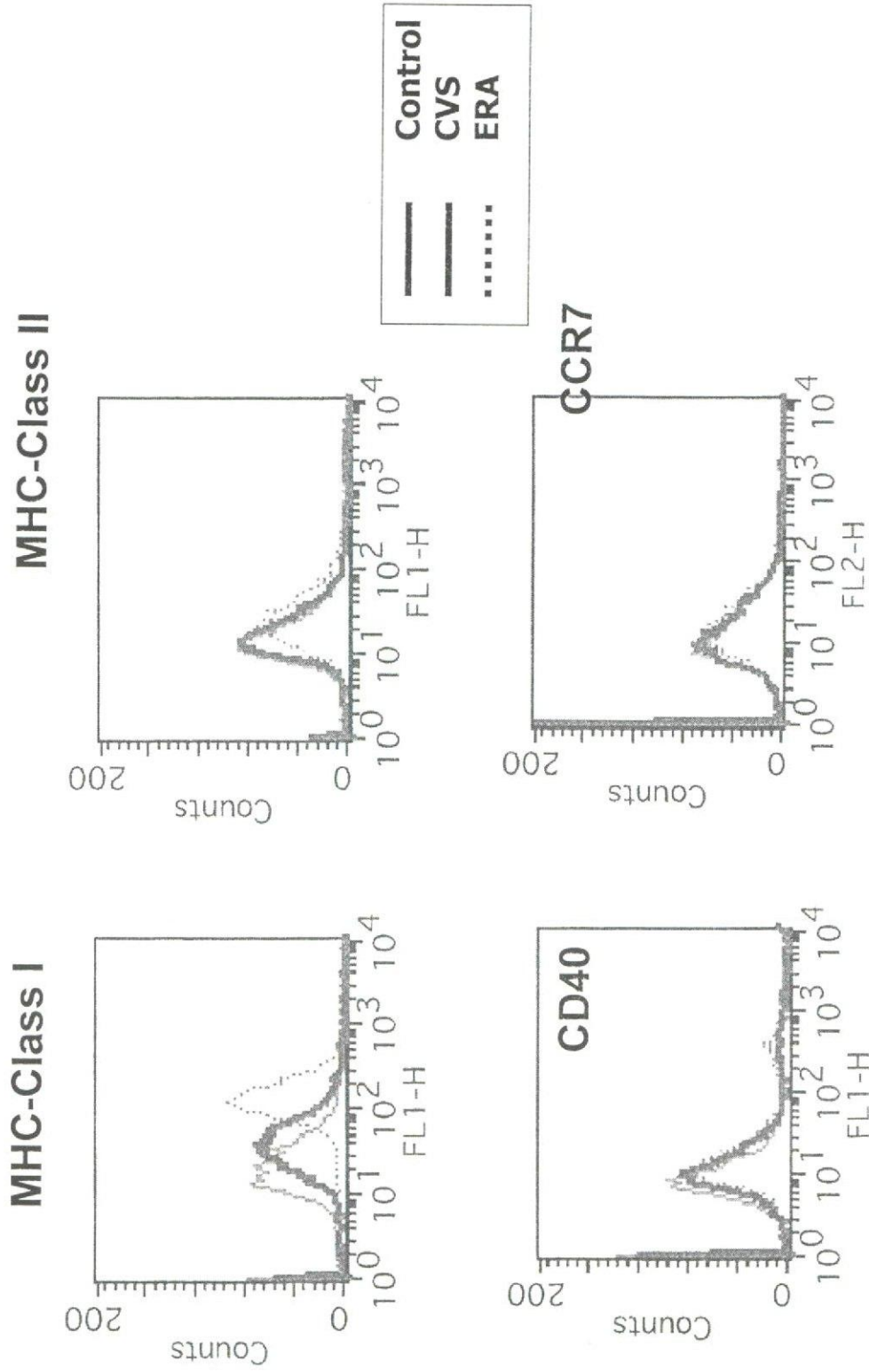
N gene特異的プライマー (A) とoligo (dT) プライマーを用いて逆転写後、RV N遺伝子領域の660塩基長をPCRにて増幅、48時間後 (lane 2, 5, 9, 12), 72時間後 (lane 3, 6, 10, 13), 120時間後 (lane 4, 7, 11, 14)。Lane 1, 8は細胞のみのコントロール。ERA接種 JAWSII細胞ではウィルス特異的mRNAが検出されたが、CVS接種JAWSII細胞では検出されない。





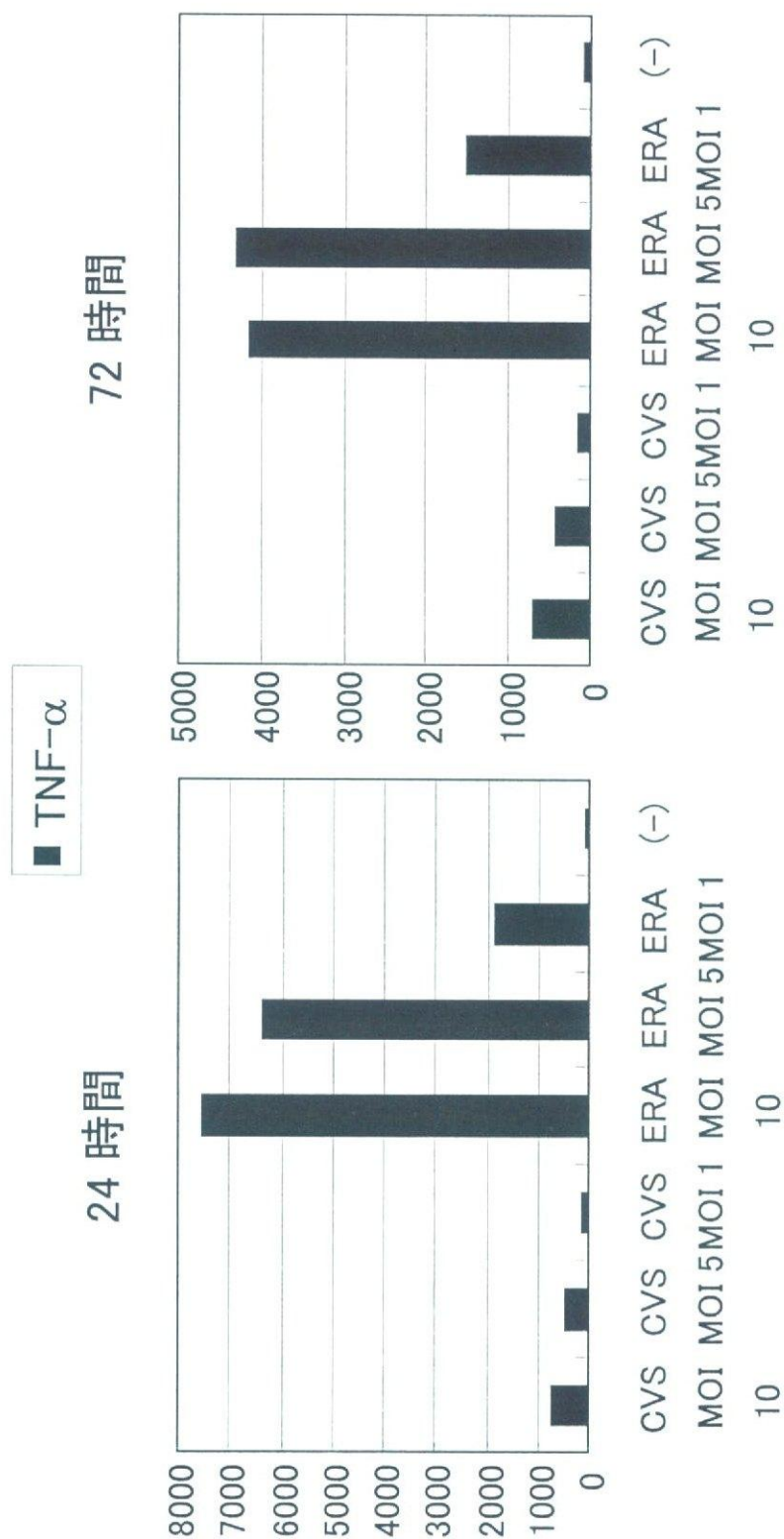
**図6 CVS, ERA 接種後のJAWSII培養上清中のウイルス量の経時的推移**

RVをmoi=5でJAWSIIに感染後、経時的に培養上清を採取しMNA細胞を用いて感染価を定量



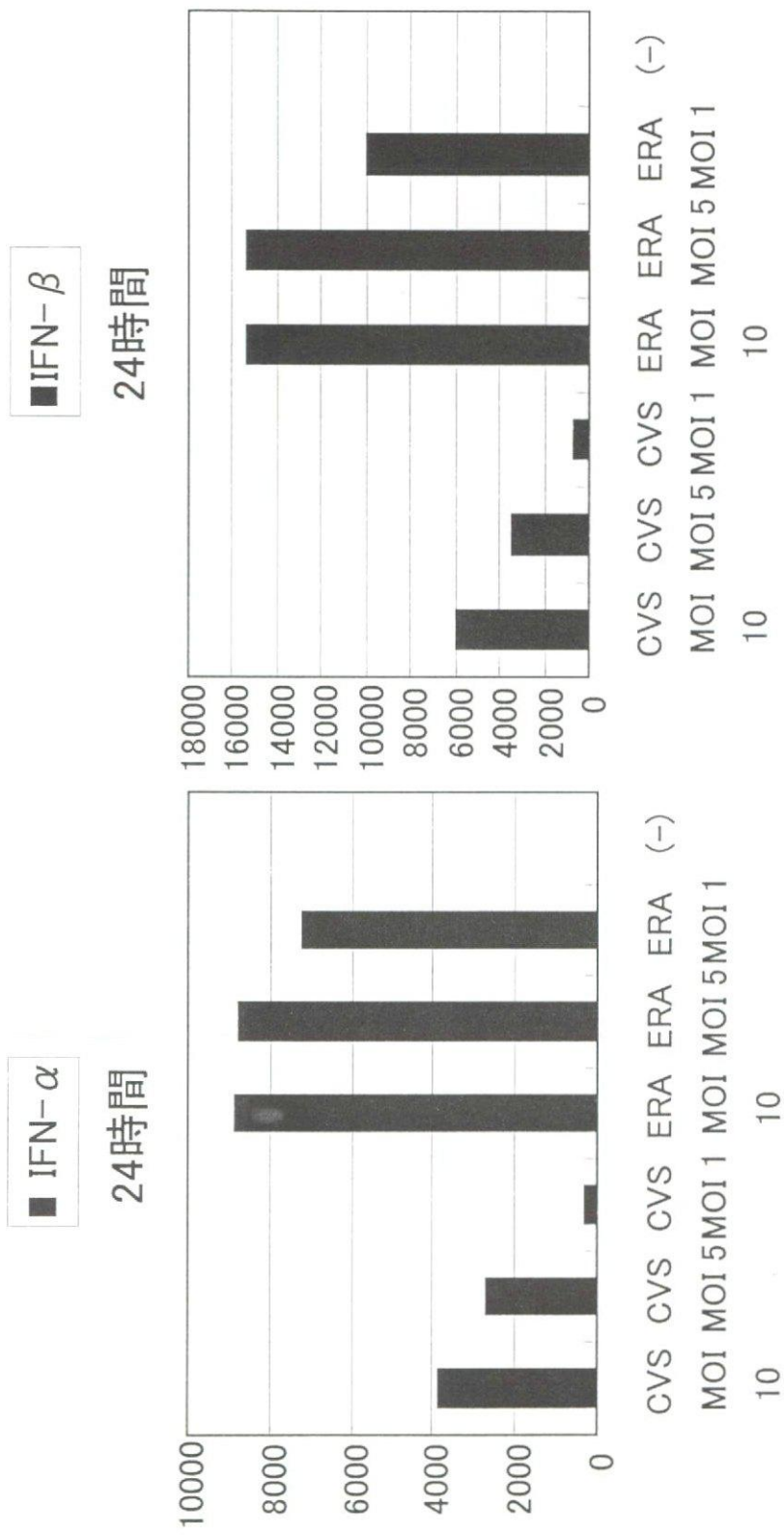
457  
**図7 CVS, ERA 接種後のJAWSII細胞表面分子の検出**  
 RVをmoi=5でJAWSIIに感染、72時間後細胞を固定しMHC-class I, class II, CD40, CCR7  
 で染色、FACScanにて計測。





**図8 CVS, ERA 接種後のJAWSII培養上清中のTNF-α産生量 (pg/ml)**

RVをmoi=10, 5, 1でJAWSIIIに感染、24, 72時間後培養上清中のTNF-α量をELISAにて測定



**図9 CVS, ERA 接種後のJAWSII培養上清中のIFN-α, IFN-β産生量 (pg/ml)**  
RVをmoi=10, 5, 1でJAWSIIに接種、24時間後培養上清中のIFN-α, IFN-β量をELISAにて測定

## PGI<sub>2</sub> 合成酵素のプロモーター領域の遺伝子多型は RSV 感染重症化に 関連する（ワクチン開発のための基礎的研究）

分担研究者：錫谷 達夫（福島県立医科大学 微生物学講座）

協力研究者：橋本 浩一（福島県立医科大学 微生物学講座）

### 研究要旨

Respiratory Syncytial ウイルス(RSV)はパラミクソウイルス科ニューモウイルス属のウイルスで乳幼児における下気道炎による急性呼吸不全の病因の1つである。1歳までに80%、3歳までに100%の児が感染し、健常児でも一部の児では入院加療が必要となる。健常乳幼児の個々におけるRSV感染症重症化の病態は不明である。我々はProstaglandin I<sub>2</sub>のRSV感染症における症状軽減効果をRSV感染マウスモデルで明らかにした。一方、PGI<sub>2</sub>合成酵素(PGIS)のプロモーター領域内に、転写因子認識配列の繰り返し回数(VNTR: variable number of tandem repeat)の遺伝子多型がある。本研究ではPGISのVNTRの遺伝子多型と入院患児におけるRSV感染症の重症度を検討した。既往歴がなく、RSV感染症に伴う下気道炎で入院した月齢0~12ヶ月の乳幼児81人と健康成人98人の全血よりDNAを精製しVNTRを解析した。月齢12ヶ月未満の健常乳幼児において、RSV感染時の体内でのPGI<sub>2</sub>の産生量がRSV感染症の重症度に関与することが示された。

#### A. 研究目的

パラミクソウイルス科ニューモウイルス属のRespiratory Syncytial ウイルス(RSV)は乳幼児における下気道炎による急性呼吸不全の病因の1つである。また、RSV感染は臓器移植医療における成功率、慢性呼吸器疾患患者、年輩者の感染性急性呼吸不全の予後にも深く関連している。WHOの2003年の死亡率の推計では、RSV感染による死亡は、感染症においてヒト免疫不全ウイルス、B型肝炎ウイルス/C型肝炎ウイルス、麻疹ウイルスに次ぐ4番目である。1960年代、米国にてホルマリン不活化RSV

ワクチンによる治験が施行され、結果はRSV初感染時の入院率が接種群で80%(2児死亡)、非接種群で2%と散々たるものであった。その後の研究で、RSVのエンベロープ蛋白のG蛋白によるTH<sub>2</sub>型への免疫誘導が、ホルマリン不活化RSVワクチン接種後の病態に深く関与し、さらに、ホルマリン処理により生成されるカルボニル化蛋白がTH<sub>2</sub>型へ免疫誘導することが明らかにされた。しかし、現在まで有用な薬剤、ワクチンは未だ開発されておらず、RSV特有の感染病理が更に解明されなければならない。この解明のためにはRSVのウイルス



学的特性、一方で宿主因子の影響についても検討しなければならない。

現在まで、宿主因子として宿主の遺伝子多型が検討され、免疫グロブリン G2 重鎖、肺サーファクタント A(SP-A)、SP-D、IL-4、IL-4 受容体、IL-6、IL-8、IL-9、IL-10、IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 1 などについて、それぞれの遺伝子多型と RSV 重症化との関連が報告されている。

最近、我々は Prostaglandin I<sub>2</sub>(PGI<sub>2</sub>)の RSV 感染症における症状軽減効果を RSV 感染マウスモデルで明らかにした。さらに、アレルギー炎症動物モデルで PGI<sub>2</sub> が免疫系への影響を示唆する論文もある。PGI<sub>2</sub> は細胞膜リン脂質を由来とするアラキドン代謝物の 1 つであり、中途産生物の PGH<sub>2</sub> から合成酵素(PGIS)により合成される。PGI<sub>2</sub> は多くは血管内皮細胞より分泌され、その G 蛋白結合型受容体に結合し抑制型 G 蛋白(G<sub>s</sub>)を介し細胞内の c-AMP 濃度を上昇させ、血小板凝集抑制、血管平滑筋の弛緩、血管内皮細胞の保護、抗炎症作用に関与している。PGIS は生体内では卵巣、心臓、骨格筋、肺、前立腺など多くの臓器で発現している。PGIS 遺伝子のプロモーター領域には転写因子(Sp1, AP-2)が結合する、9 塩基(CCAGCCCCG)の繰り返し配列(VNTR: Variable Number of Tandem Repeats)が存在し、VNTR には 3 回～7 回の遺伝子多型がある。VNTR の数が多いほど PGI<sub>2</sub> 合成酵素の活性が高く、VNTR の数と高血圧、脳梗塞、そして大腸癌の発症についての関連を示唆する論文がある。

以上のことより、我々は「健常乳幼児、各個人による RSV 重症化の違いは、PGI<sub>2</sub> 合成酵素プロモーター領域における、転写

因子結合塩基配列の繰り返し回数(VNTR)の遺伝子多型による。」と仮説をたて、PGIS の遺伝多型と重症化について検討した。

## B. 研究方法

### 1. 対象

既往歴がなく、RSV 感染症に伴う下気道炎で入院した月齢 0～12 ヶ月の乳幼児 81 人と健康成人 98 人の全血より DNA を精製し VNTR を解析した。また、体内での PGI<sub>2</sub> 産生を検討するために、入院時に尿を採取し、さらに対象として乳児検診で受診した月齢 12 ヶ月未満の児より 20 人の協力が得られ尿を収集した。

一方、以下の疾患の既往のある患児に関しては除外対象とした。先天性心疾患、呼吸器系疾患、出生週数 36 週未満、何らかの免疫不全症、IgA 欠損症、腎不全、60 日以内の血液製剤投与、下気道炎とは関連のない無呼吸。

また、本研究は学内倫理委員会での承認の後、本人、あるいは保護者の承諾を得て検体を解析した。

RSV 感染症の症状はRodriguez らの方法 (Pediatrics 100 (6) 1997) を用い評価した。この方法は、呼吸状態の理学所見による下気道の理学所見スコアと、さらに呼吸数、酸素飽和度を考慮した RSV 重症度スコアを求めることができ、点数が高いほど、症状が強いことを示す。

### 2. PGIS 遺伝子型の同定

各全血サンプルより DNA blood Mini Kit (Qiagen)を用い DNA を精製し、PGIS の VNTR を含むプロモーター領域を PCR にて増幅し、PCR 産物のサイズを

GeneScan (Applied Biosystems)を用いて解析した。実際の PCR 産物のサイズは 3 repeats は 279bp、7 repeats は 315bp となった。PCR 反応は LA Taq DNA ポリメラーゼ(TaKaRa)を用い、温度と時間、サイクル数は次の通りである。96°C3 分、98.6°C1 分、68°C90 秒の後、98.6°C25 秒、68°C90 秒を 25 サイクル、最後に伸長反応 72°C10 分。プライマーは、Forward:5'-6FAM-ACATTTTCCCCCAGG CCTGAGCTG-3'、Reverse:5'-GGCTCAGTAGCAGCAGCA GCAACAGT-3' の ABI PRISM 蛍光プライマー(Applied Biosystems)を用いた。

### 3. PGI<sub>2</sub>、TXA<sub>2</sub> 尿中代謝物測定

PGI<sub>2</sub> 代謝物の 2,3- dinor- 6- keto-PGF<sub>1</sub>αと TXA<sub>2</sub> 代謝物の TXB<sub>2</sub> の尿中濃度を ELISA キット(R&D)を用いて測定した。尿中代謝物濃度の標準化のために尿中クレアチニンの濃度も測定した(Exocell Inc.)。

### 4. 統計学的検討

それぞれのデータは平均±標準偏差で表した。遺伝子型の分布の検討はχ<sup>2</sup> 検定を用い、その他、多群間の比較は Kruskal Wallis 検定の後、Mann-Whitney 検定で検討し、p<0.05 の場合、有意差ありと判定した。

## C. 研究結果

### 1. 母集団内の男女差

RSV 感染症は男児であることが重症化の危険因子となる。本研究での母集団について、月齢、有病期間(症状出現時から退

院までの日数)、下気道の理学所見スコア、RSV 重症度スコアについて男女差について検討した(表 1)。何れも統計学的に有意差は認められず、本研究は男児(39 人)、女児(42 人)の計 81 人で以後の解析を進めた。

### 2. PGI<sub>2</sub> プロモーター領域の遺伝子型分布

RSV 感染児(81 人)と成人コントロール(98 人)において PGI<sub>2</sub> プロモーター領域の VNTR の遺伝子型の分布に差は認められなかった(χ<sup>2</sup> 検定)(表 2, 図 1)。つまり、特定の遺伝子型を持つ小児が RSV 感染により入院しているのではないということの意味する。

### 3. 入院時の PGI<sub>2</sub> 尿中代謝物濃度

入院時の PGI<sub>2</sub> 尿中代謝物濃度は VNTR 遺伝子型の 7/6 型、6/6 型、6/4 型、5/4 型はそれぞれ 43.3±28.4ng/mg Crea、22.3±22.0ng/mg Crea、17.2±14.6ng/mg Crea、5.3±2.6ng/mg Crea と VNTR の repeat の数が多い遺伝子多型の組み合わせほど、PGI<sub>2</sub> 尿中代謝物濃度が高い傾向にあった。特に 7/6 型は 6/6 型、6/4 型に比べ高値であった(p<0.05)。また健康乳幼児 20 人での平均は 5.8±5.0 ng/mg Crea であったのに対し、7/6 型(p<0.05)、6/6 型(p<0.01)、6/4 型(p=0.01)の RSV 感染入院患児は何れも高値を示した(図 2)。以上のことより、RSV 感染により PGI<sub>2</sub> が体内で産生され、さらにその産生量は VNTR 遺伝子型に関連し、VNTR の repeat の数が多い遺伝子多型の組み合わせほど、PGI<sub>2</sub> 尿中代謝物濃度が高いことが示された。



#### 4. PGIS の遺伝子型と RSV 感染による症状の関連

月齢、有病期間において PGIS の遺伝子型の群間に有意差は認められなかったが、下気道の理学所見スコアでは 7/6 型が 6/5 型( $p<0.05$ )、6/4 型( $p<0.05$ )、5/4 型( $p=0.07$ ) に比べスコアが低値で、また、RSV 重症度スコアでも 7/6 型は 6/5 型( $p<0.05$ )、6/4 型( $p=0.08$ ) に比べスコアが低値を示した (図 3)。つまり、VNTR の repeat の数が多い遺伝子多型の組み合わせほど軽症であった。

#### 5. それぞれの因子との相関

PGI<sub>2</sub> 尿中代謝物濃度と下気道の理学所見スコア( $r=0.293$ ,  $p=0.014$ )、RSV 重症度スコア( $r=0.296$ ,  $p=0.013$ )はそれぞれ負の相関を示した。PGI<sub>2</sub> 尿中代謝物濃度と PGIS の VNTR の repeat 数は正の相関を示した( $r=0.302$ ,  $p=0.011$ )。さらに下気道の理学所見スコアと PGIS の VNTR の repeat 数は負の相関を示した( $r=0.321$ ,  $p=0.007$ ) (図 4)。つまり、RSV 感染時に体内で PGI<sub>2</sub> の産生が多い児ほど軽症で、生体内での PGI<sub>2</sub> の産生量は PGIS プロモーター領域の遺伝子多型に関連することを意味する。

#### D. 考察

本研究により、「月齢 12 ヶ月未満の健常乳幼児において、PGI<sub>2</sub> 合成酵素の特定の遺伝子型を持った児のみが RSV 感染症で入院するのではない。しかし、入院が必要な児においては、RSV 感染時の体内での PGI<sub>2</sub> の産生量が RSV

感染症の重症度に関連し、PGI<sub>2</sub> の産生は PGI<sub>2</sub> 合成酵素の VNTR の遺伝子多型に関連する。」ことが示された。

RSV 感染により肺内から産生される様々なサイトカインは COX-2 を誘導する。更に COX-2 の発現によりプロスタグランジンやトロンボキサンが誘導産生され、局所での炎症の進展に関連する。動物での報告ではマウスへのワクシニアウイルス感染において、PGI<sub>2</sub> 投与で死亡率が改善し (Zavagno G. et al. J.Gen.Virol. 1987)、Bluetongue Virus を原因とする羊や牛の出血性肺炎での症状が、羊が牛に比べ重症化する理由として、羊では肺血管内皮での PGI<sub>2</sub> 産生が低値であるために重症化すると結論付けられている (DeMaula et al. J.Gen.Virol. 2001)。さらに、我々は PGI<sub>2</sub> 合成酵素過剰発現マウスでは RSV 感染による肺の浮腫が対象群に比べて軽度であり、一方、PGI<sub>2</sub> 受容体欠損マウスでは RSV 感染による肺の浮腫が対象群に比べて重度であることを報告している。ごく最近、我々のグループは PGI<sub>2</sub> のアナログを用いた実験で、骨髄由来の樹状細胞において PGI<sub>2</sub> のアナログは抗原提示能を抑制し、さらに樹状細胞の分化を抑制することを明らかにした (Zhou et al. J Immunol. 15; 178 (2): 702-10. 2007)。以上のことから、RSV 感染時に誘導産生されてくる PGI<sub>2</sub> が免疫系を修飾し最終的に抗炎症的に働き、一方で血管内皮細胞の保護や血小板凝集抑制により炎症局所での循環を保ち、肺浮腫への進展を防止すると考えられる。従って、ヒトで



も RSV 感染後に誘導されてくる PGI<sub>2</sub> の多寡が RSV による肺炎、気管支炎の病態にも深く関与することが予想される。さらに本研究でも、PGIS プロモーター領域の VNTR の repeat の数が多い遺伝子多型の組み合わせを持つ児ほど、RSV 感染時の体内での PGI<sub>2</sub> の産生量が多く、一方で症状は軽度であった。このことはこれまでの動物実験や細胞レベルでの知見からも矛盾しない結果である。

RSV ワクチンを開発する際、特に小児を対象とした場合、接種対象は新生児、あるいは乳幼児である。新生児、乳幼児の免疫学的な特徴として免疫反応が年長児に比べ弱く、また母親からの移行抗体が児の体内に存在していることが挙げられる。そのため、ワクチンの安全性と強い免疫原性が特に重要である。これまでサブユニットワクチン、ペプチドワクチン、弱毒生ワクチンが検討されてきたが、サブユニットワクチン、ペプチドワクチンはそれぞれ免疫原性、安全性の面の問題を解決しなければならない。弱毒生ワクチンについては弱毒化のコントロールが困難であったが、近年、リバーシジェネティクスの方法で弱毒生ワクチンの作製がより確実になりつつある。しかし、再感染を繰り返す RSV のウイルス特性や、乳児期の免疫系の特性に起因すると考えられる RSV 感染後に産生される中和活性の低い免疫グロブリンの問題などがワクチン不全をもたらすことも予想される。さらに、感染により産生され、抗原提示能への抑制効果

を示す PGI<sub>2</sub> がいかに免疫獲得能に影響するのかについても検討しなければならない。従って、有効なワクチン開発のためには RSV のウイルス学的特性、一方で宿主因子の影響についても検討し、RSV の感染病理を更に解明し、理解が必要である。

## E. 結語

PGIS の遺伝子多型と RSV 感染症の重症度との関連について検討した。本研究で月齢 12 ヶ月未満の健常乳幼児において、PGI<sub>2</sub> 合成酵素の特定の遺伝子型を持った児のみが RSV 感染症で入院するのではない。しかし、入院が必要な児においては、RSV 感染時の体内での PGI<sub>2</sub> の産生量が RSV 感染症の重症度に関連し、PGI<sub>2</sub> の産生は PGI<sub>2</sub> 合成酵素の VNTR の遺伝子多型に関連することが示された。

## F. 健康危機管理情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Zhou W, Hashimoto K, Moore ML, Elias JA, Zhu Z, Durbin J, Colasurdo G, Rutigliano JA, Chiappetta CL, Goleniewska K, O'Neal JF, Graham BS, and Peebles RS. IL-13 is associated with reduced illness and replication in primary respiratory syncytial virus infection in the mouse. *Microbes Infect.* 8(14-15):2880-9, 2006.

## 2. 学会発表

- 1) 橋本浩一、細矢光亮、片寄雅彦、佐久間弘子、坂田宏、鈴木仁 RSV 感染症入院患児における PGI<sub>2</sub> 合成酵素の遺伝子多型の検討 第 109 回日本小児科学会学術集会 金沢 2006 年 4 月 21-23 日
- 2) 橋本浩一、森修一、細矢光亮、錫谷達夫 RSV に対する siRNA の in vitro、in vivo における検討 第 16 回抗ウイルス化学療法研究会 福島市 2006 年 5 月 26-27 日
- 3) 隅越誠、橋本浩一、細矢光亮、佐久間弘子、錫谷達夫、鈴木仁 ヒトインフルエンザウイルスのヒト血管内皮細胞への感染とアポトーシス誘導 第 47 回日本臨床ウイルス学会 東京 2006 年 6 月 3-4 日
- 4) 橋本浩一、森修一、細矢光亮、錫谷達夫 RSV ゲノムに対する siRNA の in vitro、in vivo における検討 第 38 回小児感染症学会 高知 2006 年 10 月 10-11 日
- 5) 橋本浩一、細矢光亮、錫谷達夫 RSV 感染症入院患児における PGI<sub>2</sub> 合成酵素の遺伝子多型の検討 第 60 回日本細菌学会東北支部会総会 福島市 2006 年 8 月 24-25 日
- 6) 橋本浩一、細矢光亮、石橋啓、金子久俊、錫谷達夫 PGI<sub>2</sub> 合成酵素の遺伝子

多型と RSV 感染重症化との関連 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 名古屋 2006 年 11 月 19-21 日

- 7) 橋本浩一 ウイルス感染と気管支喘息—最近の知見 第 18 回日本アレルギー学会春季臨床大会 教育セミナー 東京 2006 年 5 月 31 日

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

表1. RSV 感染患児における男女差

	Male (n=39)	Female (n=42)	p-value
Age (mo)			
mean $\pm$ SD	5.6 $\pm$ 3.1	6.6 $\pm$ 3.3	0.162
illness days			
mean $\pm$ SD	8.9 $\pm$ 2.0	8.2 $\pm$ 2.1	0.176
下気道の理学所見スコア			
mean $\pm$ SD	3.47 $\pm$ 0.73	3.47 $\pm$ 0.85	0.942
RSV重症度スコア			
mean $\pm$ SD	1.94 $\pm$ 0.60	2.02 $\pm$ 0.56	0.507

illness days: days from beginning symptom until discharge of a hospital



表2. RSV感染により入院した月齢0~12ヶ月の小児におけるPGI<sub>2</sub>合成酵素の遺伝子型分布

Cases

genotype	7/6	7/5	7/4	6/6	6/5	6/4	6/3	5/4	total
male	3	0	0	27	1	7	0	1	39
female	3	0	1	31	0	6	0	1	42
total	6	0	1	58	1	13	0	2	81
control	9	2	0	65	7	14	1	0	98

Frequency (%)

genotype	7/6	7/5	7/4	6/6	6/5	6/4	6/3	5/4
RSV infants	7.4	0.0	1.2	71.6	1.2	16.0	0.0	2.5
control	9.2	2.0	0.0	66.3	7.1	14.3	1.0	0.0

図1. PGI<sub>2</sub>合成酵素の遺伝子型分布

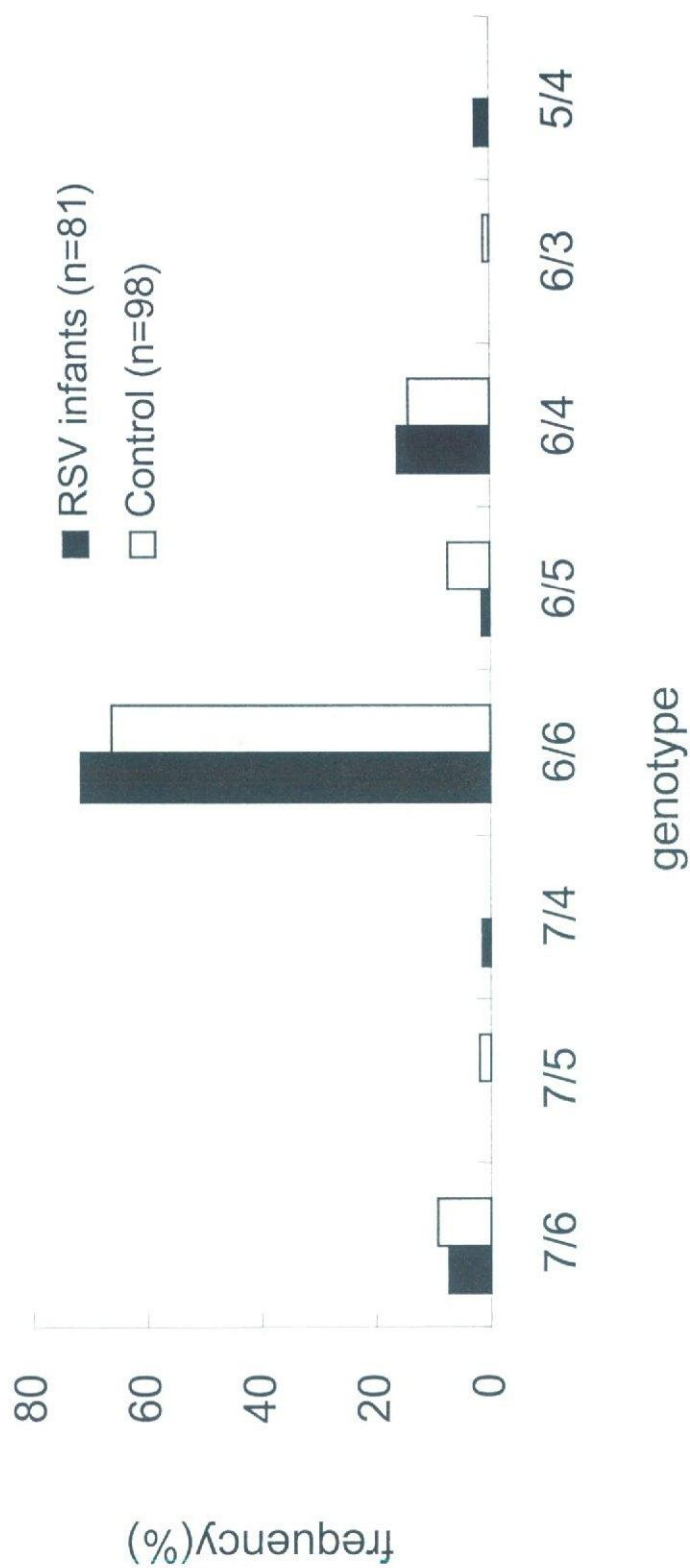
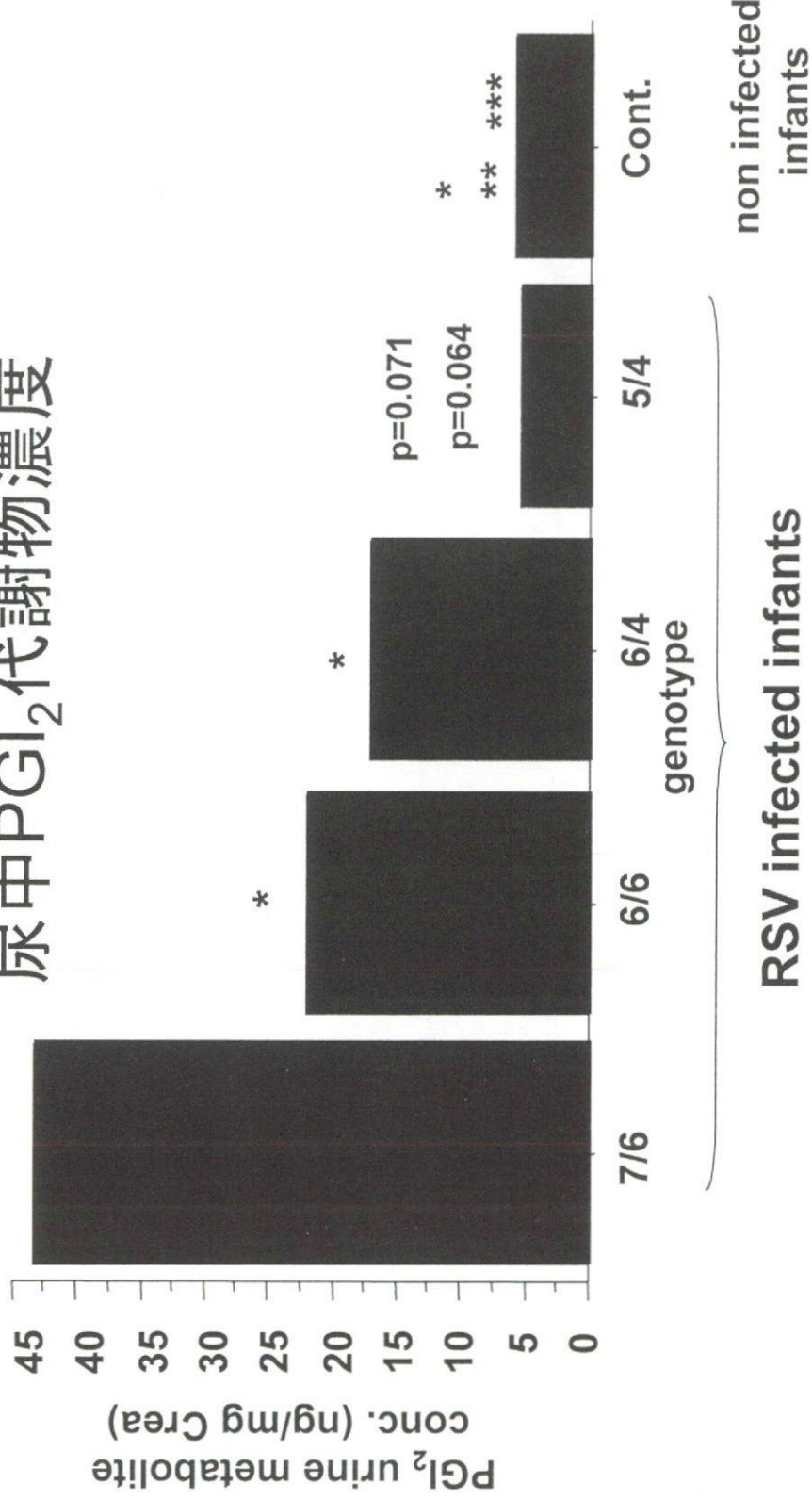


図2. RSV感染患児の入院時における  
尿中PGI<sub>2</sub>代謝物濃度



\* , p<0.05 compared to the group of 7/6  
 \*\* , p<0.01 compared to the group of 6/6  
 \*\*\* , p=0.01 compared to the group of 6/4