

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ウイルス学講座 教授)

研究協力者 小林 伸行 (東京慈恵会医科大学精神医学講座)
鎌田 美乃里 (東京慈恵会医科大学微生物学講座第1)
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、この抗体反応の原因となる新規の HHV-6 潜伏感染遺伝子とこれにコードされる蛋白を同定し、動物実験を含む機能解析を行った。この結果、この潜伏感染蛋白を HHV-6 の潜伏感染部位である脳内グリア細胞で発現させたマウスは、躁うつ病様の行動異常を示すことが判り、この潜伏感染蛋白が、躁うつ病、うつ病などの気分障害の原因となっていることを示唆することができた。気分障害は、クローン病患者における重要な合併症であるとともに、その増悪因子でもあるので、今回の成果は、うつ病の発症機序を説明できるだけでなく、クローン病の治療や病因論に対しても重要な影響を持つものであると考えられた。

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 α 、 β 、 γ の 3 種類に分類されている。 β -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。

β -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、

i) β -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、 β -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、 β -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、 β -ヘルペスウイルス、特に β -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、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、クローン病患者に高頻度に見られる合併症である鬱症状と HHV-6 との関係を検討するために、鬱症状を示す様々な疾患の患者の HHV-6 潜伏感染蛋白に対する抗体反応を検討した。この結果、慢性疲労症候群患者で鬱症状を呈する患者の他、鬱症状のために精神科を受診している患者においても、高率に抗 HHV-6 潜伏感染蛋白抗体が陽性であることが判った。

また、HHV-6 が鬱症状を生じさせるメカニズムを検討するために、HHV-6 潜伏感染蛋白を発

現したグリア細胞(アストロサイト)細胞株化細胞の機能を検討した。この結果、HHV-6陽性グリアは、HHV-6陰性グリアに対し顕著な細胞内カルシウム濃度の上昇を示した。グリア細胞内カルシウム濃度の上昇は、鬱病の発症機構として重要視されているメカニズムである。このため、今回見出された鬱症状をもつ患者において抗HHV-6潜伏感染蛋白抗体が高率に陽性となるという現象は、クローン病患者における鬱症状の発症機序を説明できるだけでなく、その他の鬱症状および鬱病の病因論に対しても波及するものであると考えられた。

さらに、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。

本年度は、クローン病およびうつ病患者で抗体が上昇するHHV-6潜伏感染遺伝子蛋白の機能を解明し、疾患の原因であることを証明するために、この遺伝子のクローニング、in vitroにおける機能解析、動物に移入することによる疾患動物の作成と解析を行った。

また、潜伏感染そのものの解析のために、NOD-SCID-huマウスを用いたHHV-6感染モデルの解析を行い、潜伏感染細胞の種類の再検討を行った。

B. 研究方法

1) HHV-6の新規潜伏感染遺伝子とそこにコードされる蛋白の同定

我々はこれまでに、Type I、Type IIの2つのクラスの潜伏感染遺伝子を同定した。これらの遺伝子は、ウイルスの増殖のトリガーとなる前初期遺伝子のopen reading frame (ORF)をコードしている。通常は、潜伏感染特異的な遺伝子構造によってその蛋白発現が抑制されており、潜伏感染を維持しているが、再活性化刺激を受けるとその制御が解除され、再活性化を

誘導することを我々は見出していた。しかし、この潜伏感染遺伝子および前初期遺伝子蛋白は、HHV-6とうつ病やクローン病を結びつける性質を持っていないと考えられた。

そこで、今回我々はさらなる潜伏感染遺伝子の検索を行い、うつ病やクローン病で見られる抗体反応の抗原となり、病態を説明できる蛋白の同定を試みた。

2) HHV-6潜伏感染蛋白の機能解析

昨年までの研究では、HHV-6潜伏感染遺伝子のクローニングが不十分であったため、蛋白の機能が不明であり、この蛋白に対する抗体が陽性であることが疾患の原因であるのか結果であるのかが判らなかつた。本年度は、クローニングと同定ができた新規潜伏感染遺伝子と蛋白を用いて、機能解析を行った。

鬱病または鬱症状の発生の分子的なメカニズムはほとんど不明であるが、ある程度の意見の一致を見ている事実として、グリア細胞、特にアストロサイトにおけるカルシウム濃度の異常が挙げられる。従来グリア細胞は、神経細胞の支持や栄養補給に重要であると考えられて来たが、最近は多くの神経伝達物質の代謝などに影響を与え、高次の中樞神経機能の中心を担っていると考えられている。また、その調整には、カルシウム濃度の変化が極めて重要であると考えられており、鬱病などの高次中樞神経疾患では、比較的軽度のカルシウム濃度の異常でも大きな影響を持つと考えられている。

HHV-6はグリア細胞株において潜伏感染を成立させる。この潜伏感染蛋白を発現したアストロサイト細胞株U373細胞におけるカルシウム濃度の異常を検討するために、潜伏感染蛋白を発現した細胞とそうでない細胞における刺激物質Thapsigarginに対する影響を、検討した。カルシウム濃度の測定は、蛍光物質Fura2を用いて解析した。

また、この潜伏感染遺伝子蛋白が疾患の原因であることを示すために、マウスの脳内グリア細胞でこの蛋白を発現させて行動異常が生じるかどうかを検討した。マウスへの蛋白の導入には、この蛋白のORFをグリア細胞特異的なプロモーターであるGFAPプロモーター下に発現するアデノウイルスベクターを用いて、

脳内に接種することによった。

3) HHV-6 の潜伏感染機構の解析: HHV-6 感染 SCID-hu マウスを用いた HHV-6 潜伏感染細胞の同定

HHV-6 は種特異性が高く、ヒト細胞のみに感染するため良い小動物モデルがなく、HCMV、HHV-6 の潜伏感染と再活性化の機構を *in vivo* で解明するための障害となっている。我々は NOD/SCID-hu マウス中に生着しているヒト myeloid 系細胞を標的として、HHV-6 感染モデル動物を作製し、*in vivo* の感染モデル動物を作成し、HHV-6 が潜伏感染・再活性化する細胞種と分化段階を同定することを目的とした。

方法としては、NOD/SCID-hu マウス尾静脈より HHV-6 感染 T 細胞を移注し、4~6 週間後に、末梢血、骨髄、脾臓を採取した。マウスの骨髄および脾臓に生着したヒト細胞を、myeloid 系細胞の分化段階に特異的な細胞表面マーカーに対する抗体と磁気ビーズを利用して採取・分画した。分取した CD33+細胞分画と CD14+細胞分画における HHV-6 感染細胞頻度を nested-PCR 法で、感染細胞 1 個あたりのウイルスゲノムのコピー数を real-time PCR 法で検討した。ヒト CD45+細胞はフローサイトメトリーを用いて、HHV-6 mRNA 発現は RT-PCR 法で検討した。

(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・遺伝子組み換え委員会の承認の後、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) HHV-6 の新規潜伏感染遺伝子とそこにコードされる蛋白の同定

潜伏感染遺伝子検索の結果、これまでの潜伏感染遺伝子と逆向きにコードされる新規潜伏感染遺伝子を同定した。また、ここに比較

的小さい open reading frame (ORF) がコードされていることが判明した(図 4)。

また、この蛋白を抗原とする抗体検査を行うことより、これまで潜伏感染細胞を用いておこなっていた、患者の潜伏感染蛋白に対する抗体検査と同様に、健常人や臓器移植によって HHV-6 の再活性化を生じた人では潜伏感染蛋白に対する抗体がほとんど検出されないのに対し、慢性疲労症候群(CFS)患者や引きこもりとも呼ばれる小児の CFS 患者、うつ病患者、クローン病患者において抗体陽性者が存在することが判った。

2) HHV-6 潜伏感染蛋白の機能解析

HHV-6 潜伏感染によるグリア細胞株内のカルシウム濃度の変化を検討するために、HHV-6 が潜伏感染したアストロサイト細胞株 U373 細胞におけるカルシウム濃度変化の測定を行った。潜伏感染蛋白を発現した細胞とそうでない細胞において、細胞外からのカルシウム流入を促進する刺激物質 Thapsigargin による細胞内カルシウム濃度の変化を、解析した結果、潜伏感染蛋白を発現している細胞では、そうでない細胞に比べて、細胞外からのカルシウムの流入が相当量増加することが判明した(図 5)。

次に、この潜伏感染遺伝子をグリア細胞特異的なプロモーターである GFAP プロモーター下に発現するアデノウイルスベクターを用いて、マウス脳内に導入し、脳内グリア細胞で発現させた。

この結果、うつ状態の検査である尾懸垂テストにおいて、マウスが多動となり、無動時間の短縮が見られることが判った。これは、マウスの情動に異常が生じていることを示しており、この遺伝子がうつ病や躁鬱病などの感情障害の原因遺伝子となり得ることを示した(図 6)。

また、躁鬱病患者や統合失調症患者で見られる脳の抑制機能の障害の代表的検査である驚愕反応においても、脳の抑制機能の指標である pre-pulse inhibition (PPI) の値が下がっていることが判明した。このことは、HHV-6 潜伏感染遺伝子蛋白がグリア細胞で発現することにより、脳内の抑制機構が減弱し、躁鬱病と同様の状態となっていることを示すものであった。

これらの結果から、このメカニズムとして、HHV-6 の潜伏感染部位であるグリア細胞内のカルシウム濃度が異常に上昇することが示唆される。躁鬱病などの精神障害の患者で、細胞内カルシウム濃度の異常な上昇が見出されており、今回の結果は、これと良く一致するものであった。

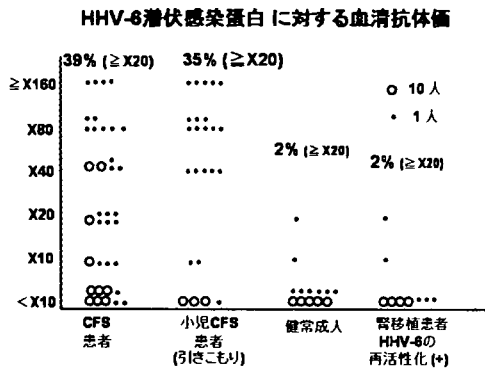


図 1: HHV-6 潜伏感染蛋白に対する抗体価
HHV-6 潜伏感染蛋白に対する抗体価を検討した。抗体価は、潜伏感染細胞に対する抗体を蛍光抗体法にて検出した。健康人や臓器移植によって HHV-6 の再活性化を生じた患者では潜伏感染蛋白に対する抗体がほとんど検出されないのに対し、慢性疲労症候群(CFS)患者や引きこもりとも呼ばれる小児の CFS 患者において抗体陽性者が存在することが判った。

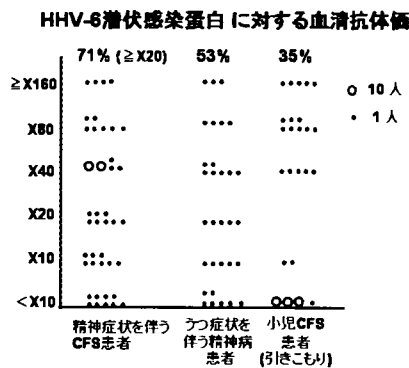


図 2: 鬱症状を呈する患者における抗体価
CFS 患者の中でも特に鬱症状を呈する患者と、精神科に受診している患者の中で鬱症状を呈する患者における抗体価を示す。ここで示す小児の CFS 患者のほとんどは、何らかの鬱症状を示している。

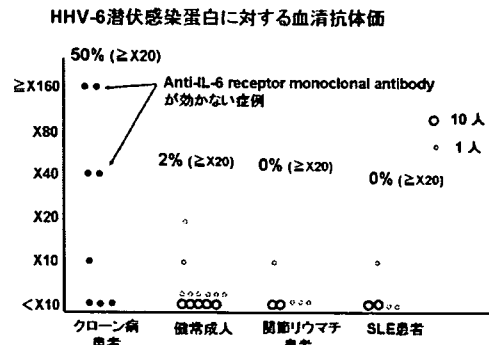


図 3: 炎症性腸疾患を呈する患者における抗体価と治療抵抗性との関係
クローン病患者における抗 HHV-6 潜伏感染蛋白抗体価と、免疫抑制療法である抗 IL-6 受容体抗体治療に対する抵抗性を検討した。この結果、抗 HHV-6 潜伏感染蛋白抗体を保有する患者では、免疫抑制治療に対する抵抗性があることが判った。また、関節リウマチや SLE などの他の自己免疫疾患の患者では、抗 HHV-6 潜伏感染蛋白抗体は検出されなかった。

HHV-6 の潜伏感染特異的遺伝子

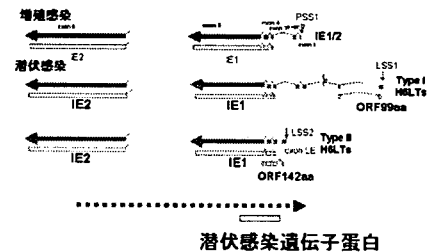


図 4: HHV-6 の新規潜伏感染遺伝子とそこにコードされる蛋白の同定
我々がこれまでに同定した Type I, Type II の 2 つのクラスの潜伏感染遺伝子と逆向きにコードされる新規潜伏感染遺伝子を同定した。また、ここに比較的小さい open reading frame (ORF) がコードされていることが判明した。

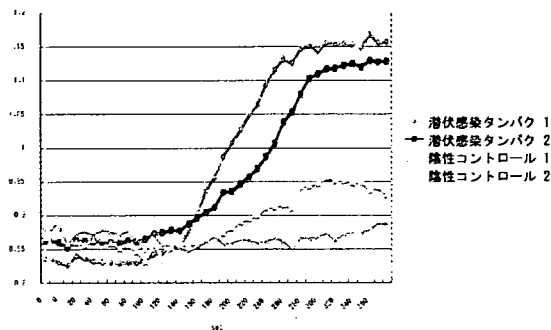


図 5: HHV-6 潜伏感染によるグリア細胞株内のカルシウム濃度の変化

アストロサイト細胞株 U373 細胞におけるカルシウム濃度変化の測定。潜伏感染蛋白を発現した細胞とそうでない細胞における刺激物質 Thapsigargin による細胞内カルシウム濃度の変化を、蛍光物質 Fura2 を用い 340nm と 380nm の 2 種類の励起光における蛍光の比率を計測することによって解析した。2 系統の潜伏感染細胞による実験結果を示す。

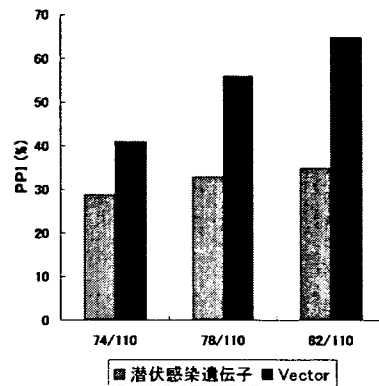


図 7: HHV-6 潜伏感染蛋白をグリア細胞で発現させたマウスの行動異常: 驚愕反応

マウスの脳の抑制機能を、その指標である pre-pulse inhibition (PPI) によって測定した。PPI の値が下がっていることは、脳の抑制経路がうまく作動していないことを示している

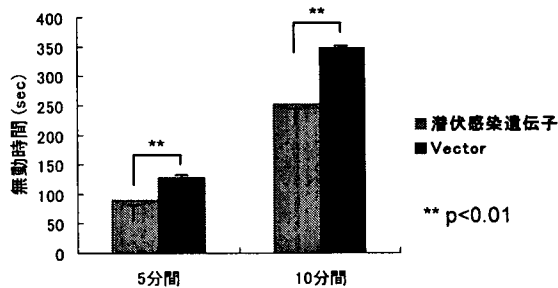


図 6: HHV-6 潜伏感染蛋白をグリア細胞で発現させたマウスの行動異常: 尾懸垂テスト

遺伝子導入したマウスを 10 分間尾懸垂させ、無動時間を測定することにより、マウスの興奮度を測定した。この結果、潜伏感染遺伝子蛋白を導入したマウスでは、アデノウイルスベクターのみを導入したマウスに比して、興奮度が高く無動時間が短縮していることが判った。

3) HHV-6 の潜伏感染機構の解析: HHV-6 感染 SCID-hu マウスを用いた HHV-6 潜伏感染細胞の同定

CD33+CD14+の monocyte progenitor は、成熟すると CD33 抗原を失って CD33-CD14+の mature な monocyte/macrophage になる。従って、CD33+細胞分画は、CD14+細胞分画より未分化な細胞を代表する。これら 2 つの細胞分画中の HHV-6 の感染頻度を PCR 法で検討したところ、HHV-6 はこれら 2 つの細胞分画のどちらにも感染し、その存在頻度に有意な差はなかった。

ほとんどの感染細胞は、1 感染細胞あたりのウイルスゲノムが 30 コピー以下であり、潜伏感染状態であると考えられたが、まれに 1 感染細胞あたり 800 コピー以上のウイルスゲノムを持つ細胞も見出され、これらの細胞分画に再活性化を生じる能力のある細胞が含まれることも示唆された。これまでに我々は、HHV-6 が分化したマクロファージで潜伏感染することを *in vitro* の系で示して来たが、今回の結果は、HHV-6 の潜伏感染が、成熟した monocyte/macrophage のみでなくより未分化な CD33+細胞分画にも成立することを示唆するものであった。

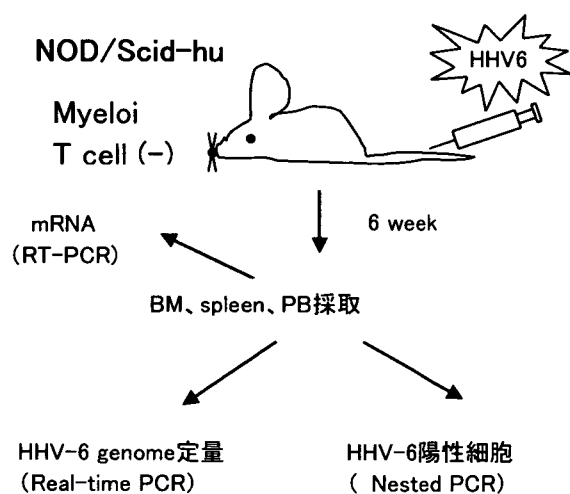


図 8: NOD-SCID マウスを用いた *in vivo* の HHV-6 潜伏感染モデルの作成と観察方法

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髓と脾臓における 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。

D. 考察

HHV-6 の潜伏感染細胞は、アストロサイトなどを中心とするグリア細胞であると考えられている。また、潜伏感染部位には偏りがあり、事故死体などにおける検討では、主として前頭葉や海馬領域に多くの HHV-6 DNA が検出される。

これまでの検討から、うつ症状を呈する患者において特異的に HHV-6 潜伏感染蛋白に対する抗体が検出され、このような患者において、潜伏感染細胞数または潜伏感染蛋白の発現の増加が生じていることを示唆してきた。

今回、このような血清抗体の抗原となる新規の潜伏感染遺伝子蛋白を同定したことにより、HHV-6 の潜伏感染がうつ病やクローン病におけるうつ症状の原因となり得るかどうかの検討が可能となった。

最近、脳の機能に関するグリア細胞の重要性が非常に注目を集めている。中でもグリア細胞におけるカルシウム濃度の変化は、神経細胞のシナプス伝達の調整に極めて重要であると考えられている。HHV-6 がフォーカス状に潜伏感染している領域には数千の神経シナプスが含まれると考えられる。このため、この領域で図 5 に示す様な、グリア細胞内へのカルシウム流入の異常な亢進が生じた場合、高次中枢神経機能異常を呈する可能性は高い。また、HHV-6 が潜伏感染している部位が、前頭葉や海馬領域であることより、HHV-6 による中枢神経機能異常は、思考や情動に関係するものであると予測できる。

今回の実験では、この蛋白をマウスの脳内グリア細胞で発現させることによって、マウスに躁鬱病様の症状を生じさせることができた。躁鬱病は、うつ病を含む感情障害の中でも、特に身体的な原因によって生じると考えられるものであるため、この結果は、HHV-6 の潜伏感染遺伝子蛋白が、身体的な気分障害の原因となることを示唆するものであると考えられた。さらに、クローン病患者で鬱症状を示した場合、免疫抑制による治療に対する抵抗性を示すことが知られている。抗 HHV-6 潜伏感染蛋白抗体を保有する患者は、免疫抑制治療に抵抗性を

示すため、少なくともクローン病における重要な合併症である鬱症状において、HHV-6 の潜伏感染遺伝子発現の増加が関係していることを示すものと考えられた。これは、これまでに報告した、クローン病の患部においてHHV-6 の潜伏感染蛋白を発現した免疫系細胞が多数観察されるという現象とも合致するものであった。

E. 結論

今回は、クローン病患者やうつ病患者で特異的に発現亢進が見られる HHV-6 潜伏感染遺伝子を同定し、動物実験を行うことにより、この遺伝子蛋白が鬱症状などの気分障害の原因として働くことを示唆することができた。

これは、クローン病の病態や治療法の解明につながるだけでなく、現在大きな社会問題となっている鬱病の原因究明や新たな予防法・治療法の開発につながるものであると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Kondo and Yamanishi K. HHV-6A, 6B, and 7: molecular basis of latency and reactivation. In: Ann Arvin et.al. editors. Human Herpesviruses. Cambridge University Press, 2007. pp. 843-849.
- 2) K. Kondo. Chronic Fatigue Syndrome and Herpesvirus Infection. In: Fatigue Science for Human Health. Springer Press, 2008. pp. 137-152.

2. 学会発表

- 1) T.Sugino, Y.Kajimoto, H. Kuratsune, Y.

Watanabe, K. Kondo. Enhancement of herpes virus 6 (HHV-6) and herpesvirus 7 (HHV-7) reactivation in saliva during the fatigue state. International Association of Chronic Fatigue Syndrome (Fort Lauderdale 2007)

- 2) 小林伸行、嶋田和也、清水昭宏、近藤一博
ヒトヘルペスウイルス(HHV)-6 潜伏感染特異的タンパクによるうつ症状の発症機序 (第 55 回日本ウイルス学会、2007 年 10 月 札幌)
- 3) 鎌田美乃里、近藤一博 HHV-6 感染 SCID-hu マウスを用いた HHV-6 潜伏感染細胞の同定(第 55 回日本ウイルス学会、2007 年 10 月 札幌)

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

「HHV-6 の潜伏感染特異的タンパク質、その検査法、それを用いた精神疾患マウスの作成、治療法開発への応用」

発明者: 近藤一博、小林伸行

2007 年 9 月 27 日 特許出願 (特 2007-250461)

2. 実用新案登録

該当なし

4. 慢性肺気腫ないし呼吸不全とウイルス感染

分担研究者 山谷 睦雄 (東北大学病院老年科 准教授)

研究協力者 吉田元樹、浅田成紀、久保裕司 (東北大学病院老年科)
中山勝敏 (東京慈恵会医科大学呼吸器内科)

研究要旨 1) 培養ヒト気管上皮細胞におけるインフルエンザウイルス感染およびRSウイルスに対する喀痰調整薬L-カルボシステインの効果を調べた。L-カルボシステインを培養ヒト気管上皮細胞に作用させると、培養液インフルエンザウイルス量およびRSウイルス量が減少した。さらに、気道炎症に關与する炎症性サイトカイン、インターロイキン(IL)-1 β やIL-8がウイルス感染後に増加し、L-カルボシステインで減少した。L-カルボシステインのインフルエンザウイルス感染抑制効果、RSウイルス感染抑制効果と気道炎症抑制効果が示唆された。2) プロトンポンプ阻害薬の慢性肺気腫における風邪罹患および呼吸不全に対する抑制効果を調査した。プロトンポンプ阻害薬は慢性肺気腫における風邪罹患回数および増悪回数を減少させた。慢性肺気腫増悪の長期管理におけるプロトンポンプ阻害薬の有用性が示唆された。

A. 研究目的

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、インフルエンザウイルス、ライノウイルスと共に、慢性肺気腫の増悪による呼吸不全の原因ウイルスである。RSウイルスは感染を抑制する医薬品が実用化されていない。RSウイルスの細胞側受容体としてRhoAが細胞融合、ウイルス進入に關係すると報告されている。昨年度までパフィロマイシンやエリスロマイシン、クラリスロマイシンなどのマクロライドのRSウイルス感染抑制作用を報告した。また、薬品が血管内皮細胞や気道上皮細胞におけるRhoA活性化抑制効果を報告した。

本研究班において、喀痰調整薬であるL-カルボシステインが風邪の主因であり、慢性肺気腫増悪を引き起こすライノウイルス感染抑制効果をこれまで報告してきた。L-カルボシステインはライノウイルス感染受容体の発現を抑制し、ライノウイルスRNA進入経路である酸性エンドゾーム機能を抑制して、気道上皮細胞におけるライノウイルス感染を抑制した。

また、L-カルボシステインが慢性肺気腫患者の風邪罹患および増悪回数を減少する効果

を有することを、私たちの施設および当研究班の多施設研究で報告した。慢性肺気腫増悪を引き起こすウイルスはライノウイルスはじめ、インフルエンザウイルス、RSウイルスなど多種が報告されている。

このような背景をもとに、今年度はL-カルボシステインのインフルエンザウイルスおよびRSウイルス感染抑制効果を、気道上皮細胞を用いて検討した。

さらに、私たちは本研究班においてこれまで、プロトンポンプ阻害薬のライノウイルス感染抑制効果および気道炎症効果を報告してきた。この気道上皮細胞における効果は、肺気腫患者の風邪罹患および呼吸不全抑制効果を有するL-カルボシステインやマクロライドと同様の作用である。そこで、今年度は慢性肺気腫患者の風邪罹患および呼吸不全に対する抑制効果を調査した。

(倫理面への配慮)

ヒト気管上皮細胞培養、およびプロトンポンプ阻害薬の慢性肺気腫における風邪罹患および呼吸不全に対する抑制効果調査は東北大学医学部倫理委員会の承認を得て行なった。

B. 研究方法

1) ヒト気管上皮細胞を試験管に培養し、A 香港型インフルエンザウイルス 10⁴ TCID₅₀ units/ml(TCID₅₀; tissue culture infective dose 50)あるいはRS ウイルス 10⁴ TCID₅₀ units/ml を感染させた。インフルエンザウイルスを感染した気道上皮細胞は、ウイルス感染後 33°C で 5% CO₂-95% room air インキュベータで静置した。RS ウイルスを感染した気道上皮細胞は、ウイルス感染後 33°C で回転培養した。ウイルス感染 3 日前から L-カルボシステイン (10 μM) をヒト気管上皮細胞に作用させた。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、インフルエンザウイルス量およびRS ウイルス量を測定した。インフルエンザウイルス量の測定は、10 倍希釈した培養液を MDCK 細胞に感染させ、50% 細胞変性効果を示す希釈倍率(TCID₅₀ units/ml)で求めた。同様に、RS ウイルス量の測定は、10 倍希釈した培養液を Hep-2 細胞に感染させ、50% 細胞変性効果を示す希釈倍率(TCID₅₀ units/ml)で求めた。また、ヒト気管上皮培養液インターロイキン-1β(IL-1β)およびIL-8 放出量を測定した。

2) 肺気腫患者 100 名をランダムに 2 群に分け、プロトンポンプ阻害薬であるランソプラゾール(30mg)を内服する群 (PPI 内服群; 平均年齢 75 歳、男性 47 名、女性 3 名) と非内服群 (コントロール群; 平均年齢 75 歳、男性 48 名、女性 2 名) に分けた。風邪罹患回数および増悪回数を 1 年間調査した。風邪罹患は Jackson らの基準、増悪は Anthonisen の基準に従って判定した。

C. 研究結果

1) A 香港型インフルエンザウイルス 10⁴ TCID₅₀ units/ml を感染させた後、ヒト気管上皮細胞の培養液中のインフルエンザ放出量は時間とともに増加した(2.9 ± 0.1 log TCID₅₀ U/ml/24h, day 1; 4.5 ± 0.3 log TCID₅₀ U/ml/24h, day 3; 5.5 ± 0.4 log TCID₅₀ U/ml/24h, day 5)。ヒト気管上皮細胞を L-カルボシステイン(10 μM) で作用させた場合、培養液培養液放出量は減少した(図 1 左)。

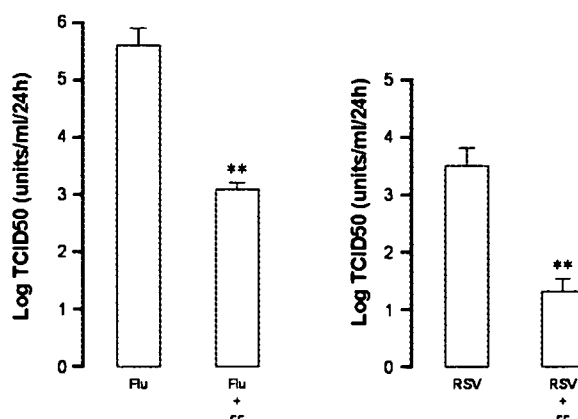


図1 L-カルボシステインの培養液インフルエンザウイルスおよびRS ウイルス放出抑制効果

ヒト気管上皮細胞培養液へのインフルエンザ放出量(Flu)(左)およびRS ウイルス放出量(RSV)(右)はL-カルボシステイン(10 μM; CC)で作用させた場合(Flu + CC および RSV + CC; 感染 5 日後)、減少する。**P<0.01: ウイルス感染に対する有意差。

同様に、ヒト気管上皮細胞を感染させた後、ヒト気管上皮細胞の培養液中のRS ウイルス放出量は時間とともに増加した(1.0 ± 0.1 log TCID₅₀ U/ml/24h, day 1; 3.2 ± 0.2 log TCID₅₀ U/ml/24h, day 3; 3.5 ± 0.4 log TCID₅₀ U/ml/24h, day 5)。上皮細胞を L-カルボシステイン(10 μM) で作用させた場合、培養液RS ウイルス培養液放出量は減少した(図 1 右)。

さらに、L-カルボシステインは、ヒト気管上皮細胞において、培養液インフルエンザウイルス培養液放出量およびRS ウイルス培養液放出量を濃度依存性に減少した(図 2)。

ウイルスを感染させる前において、L-カルボシステイン(10 μM)はヒト気管上皮細胞の培養液IL-1βおよびIL-8 放出を減少させた(図 3、4)。インフルエンザウイルス感染後 IL-1βおよびIL-8 は増加した。さらに、L-カルボシステインを処理した気道上皮細胞においてインフルエンザウイルス感染後の培養液 IL-1βおよびIL-8 増加は抑制された(図 3)。

同様に、RS ウイルス感染後、培養液 IL-1β は増加した。さらに、L-カルボシステインの処理でRS ウイルス感染後の培養液 IL-1β増加は抑制された(図 4)。

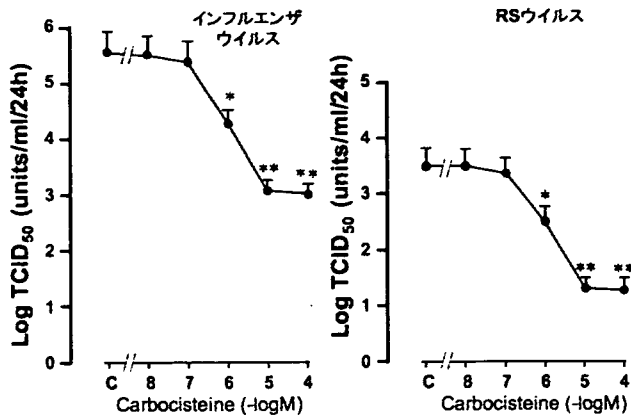


図2 L-カルボシステインの培養液インフルエンザウイルスおよびRSウイルス放出抑制効果:

濃度依存性 L-カルボシステインはヒト気管上皮細胞培養液へのインフルエンザ放出量(Flu)(左)およびRSウイルス放出量(RSV)(右)を濃度依存性に減少する(感染5日後)。*P<0.05, **P<0.01: コントロールに対する有意差

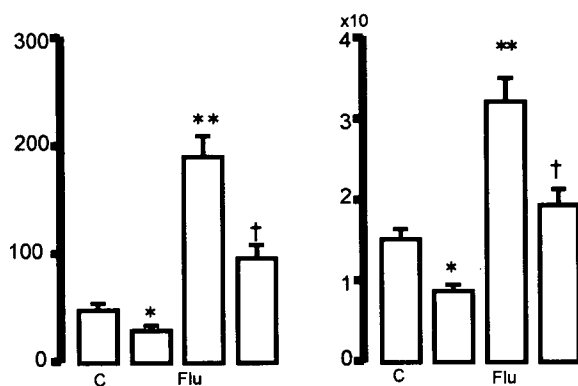


図3 L-カルボシステインのインフルエンザウイルス感染前後サイトカイン放出抑制効果

インフルエンザウイルス感染前(day 0)にヒト気管上皮細胞培養液に放出されるIL-1βおよびIL-8はL-カルボシステイン(CC, 10μM)で減少する。インフルエンザウイルス感染後 IL-1βおよびIL-8は増加する(Flu)。L-カルボシステインでインフルエンザウイルス感染後の培養液 IL-1βおよびIL-8 増加を抑制する(Flu + CC)。*P<0.05, **P<0.01: コントロールに対する有意差。+P<0.01: インフルエンザウイルス感染(Flu)に対する有意差。

2) プロトンポンプ(PPI)阻害薬の慢性肺気腫における風邪罹患および呼吸不全に対する抑制効果調査において、PPI内服群と非内服群において、喫煙歴、インフルエンザワクチン接種率、肺機能、病期に差を認めなかった。患者は抗コリン薬、β2 刺激薬、メチルキサンチンの治療を受けた。そのほか、一部患者は吸入ステロイドの治療も受けていた。PPI内服群で抗コリン薬の使用率が低下していた(36%対58%)。他の治療は両群で差を認めなかった。

風邪罹患回数はPPI内服群(1.22±0.29回/年)

では非内服群(2.04±0.43回/年)に比べて減少傾向にあった。しかし、統計学的有意差(Student t-test)を認めなかった(P=0.12)。年間に3回以上の風邪に罹患した患者数(12%対26%)も同様の結果であった(表1)。

これに対して、増悪回数はPPI内服群(0.34±0.10回/年)では非内服群(1.18±0.20回/年)に比べて減少した(P=0.003)。年間に1回以上の増悪を生じた患者数(24%対54%)も同様の結果であった(表1)。

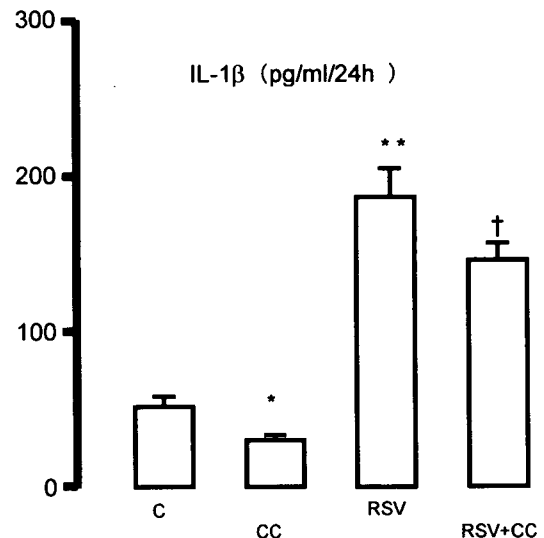


図4 L-カルボシステインのRSウイルス感染前後のサイトカイン放出抑制効果

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IL-1βはL-カルボシステイン(CC, 10μM)で減少する。RSウイルス感染後 IL-1βは増加する(RSV)。L-カルボシステインでRSウイルス感染後の培養液 IL-1β増加を抑制する(RSV + CC)。*P<0.05, **P<0.01: コントロール(C)に対する有意差。+P<0.01: RSウイルス感染(RSV)に対する有意差。

	PPI群	コントロール群	P値
風邪罹患			
平均回数、回/年	1.22±0.29	2.04±0.43	0.12
1回以上罹患した患者	26 (52%)	27(54%)	0.84
3回以上罹患した患者数	6 (12%)		
増悪			
平均回数、回/年	0.34	1.18±0.20	0.0003
1回以上生じた患者数	12 (24%)	26 (52%)	0.0039

表1プロトンポンプ(PPI)阻害薬の慢性肺気腫における風邪罹患および呼吸不全に対する抑制効果

また、多変量解析において、プロトンポンプ阻害薬は風邪罹患回数および増悪回数を減少

させた(表2)。逆に、病期の進行は風邪罹患回数および増悪回数を増加させる要因であった。

	P値	Odd比	95%CI
プロトンポンプ阻害薬使用			
風邪罹患	0.048		
増悪	0.004	0.23	0.08-0.062
病期			
	0.008	0.28	2.7-703.2
増悪			
病期III対I	0.04	3.9	1.1-14.3
病期IV対I	0.006	45.6	3.0-690.3

表2慢性肺気腫における風邪罹患および呼吸不全におよぼす影響因子

D. 考察

1) 本研究班において、喀痰調整薬(去痰薬)であるL-カルボシステインが風邪の主因であり、慢性肺気腫増悪を引き起こすライノウイルス感染を抑制する効果があることをこれまで報告してきた。L-カルボシステインはライノウイルス感染受容体の発現を抑制し、ライノウイルスRNA進入経路である酸性エンドゾーム機能を抑制して、気道上皮細胞におけるライノウイルス感染を抑制する効果を有する。また、L-カルボシステインが慢性肺気腫患者の風邪罹患および増悪回数を減少する効果を有することを、私たちの施設および当研究班の多施設研究で報告した。慢性肺気腫増悪を引き起こすウイルスはライノウイルスはじめ、インフルエンザウイルス、RSウイルスなど多種が報告されているため、今年度はインフルエンザウイルスおよびRSウイルスに対するL-カルボシステインの感染抑制効果を検討した。

インフルエンザウイルスは気道上皮細胞膜上の受容体に結合した後、細胞質の酸性エンドゾームを経由してインフルエンザウイルスRNAを細胞質内に放出し、ウイルスの複製が始まる。私たちはL-カルボシステインのライノウイルス感染抑制研究において、ライノウイルスRNA進入経路である酸性エンドゾーム機能の抑制を見出している。したがって、本研究におけるL-カルボシステインのライノウイルス感染抑制効果の機序の一つとして、インフ

ルエンザウイルスRNA進入抑制効果が考えられる。今後、感染受容体発現の抑制効果を検討する予定である。

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風邪あるいは慢性肺気腫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Isoform A of Ras-homologus (RhoA)が報告されている。活性化RhoAに関して、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する報告がなされてきた。活性化されたRhoAは細胞膜に移動してRSウイルスに結合し、RSウイルスの細胞内進入や細胞融合に関係する。これまでに、RhoAの合成ペプチドが細胞実験においてRSウイルスの感染を抑制することが報告されている。また、抗RSウイルスヒト化モノクローナル抗体(パリビスマブ、製品名シナジス)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。これまでの研究で私たちはRhoAの機能抑制が報告されているマクロライド抗生物質パフィロマイシン、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、本研究班で報告した。また、これらの薬品がRhoAの活性化を抑制していることを、血管内皮細胞および気道上皮細胞を用いて明らかにした。

L-カルボシステインがRhoAの活性化を抑制するかどうか、作用機序に関してさらに検討の予定である。

2) 風邪罹患回数はプロトンポンプ阻害薬(PPI)内服群では非内服群に比べて減少傾向にあった。しかし、統計学的有意差(Student t-test)を認めなかった。これに対して、増悪回数はPPI内服群では非内服群に比べて減少した。年間に1回以上の増悪を生じた患者数(24%対54%)も同様の結果であった。他方、

多変量解析において、プロトンポンプ阻害薬は風邪罹患回数および増悪回数を減少させた。このように、PPIの抑制効果は増悪回数減少に対して強い結果となった。風邪回数も多変量解析で有意に減少したが、抑制効果は増悪に比べて弱い結果となった。違いの理由は現時点において明確でない。胃食道逆流現象が気管支収縮や気道分泌、誤嚥による気道炎症に関与する報告がされている。肺気腫患者における胃食道逆流現象も報告されており、PPIによる風邪抑制に加えて胃食道逆流抑制の関与も肺気腫増悪抑制の機序の一つとして考えられる。

E. 結論

喀痰調整薬L-カルボシステインはヒト培養気管上皮細胞において、インフルエンザウイルスおよびRSウイルス感染を抑制する効果を有する。また、炎症性サイトカイン放出を減少させ、気道炎症を抑制する効果が示唆された。プロトンポンプ阻害薬は慢性肺気腫における風邪罹患回数および増悪回数を減少させた。慢性肺気腫の長期管理におけるプロトンポンプ阻害薬の有用性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamaya M, Sasaki T, Yasuda H, Inoue D, Suzuki T, Asada M, Yoshida M, Seki T, Iwasaki K, Nishimura H, Nakayama K: Hochu-ekki-to inhibits rhinovirus infection in human tracheal epithelial cells. *Br J Pharmacol* 150: 702-710, 2007.
- 2) Niimi K, Asano K, Shiraishi Y, Nakajima T, Wakaki M, Kagyo J, Takihara T, Suzuki Y, Fukunaga K, Shiomi T, Ogura T, Sayama K, Yamaguchi K, Natori Y, Matsumoto M, Seya T, Yamaya M, Ishizaka A: Toll-like receptor 3-mediated synthesis and release eotaxin-1/CCL11 from human bronchial smooth muscle cells stimulated with double-strand RNA. *J Immunol* 178: 489-495, 2007.

- 3) He M, Kubo H, Ishizawa K, Hegab AE, Yamamoto Y, Yamamoto H, Yamaya M: The role of the receptor for advanced glycation end-products in lung fibrosis. *Am J Physiol* 293: L1427-1436, 2007.
- 4) Inoue D, Kubo H, Watanabe M, Sasaki T, Yasuda H, Numasaki M, Sasaki H, Yamaya M. Submucosal gland cells in human lower airways produce MUC5AC protein. *Respirology*. (doi:10.1111/j.1440-1843.2007.01195.x,2008)

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許申請中

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

2. 実用新案登録

なし

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 準教授)

研究協力者 斎藤 聡 (横浜市立大学大学院分子消化管内科学 準教授)

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てきたが、現段階では自己免疫性肝炎に特異的に発現している遺伝子は、いくつかの候補は上がったものの特定するにはいたっていない。また 2006 年春に発表された新しい肝炎の原因と思われる NV-F も自己免疫性肝炎や原発性胆汁性肝硬変などとも関与は認められなかった。今回さらに網羅的手法にてウイルスの関与を検討するために、multiplex multivirus real time PCR を用いて自己免疫性肝炎や原発性胆汁性肝硬変に関与すると思われるウイルス感染の有無を検討した。

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、比較的短期間に肝硬変に進行する難治性疾患である。AIH の発症の原因として幾つか考えられているが、薬剤や特にウイルスの関与が疑われている。

これまで AIH の発症に関与するウイルス感染を同定すべく、患者肝生検組織を用いて遺伝子発現の網羅的解析手法によってウイルス遺伝子の発現の同定を試みたが成功していない。原因としては特に肝炎発症直後の症例から得られた組織が異常発現をしているウイルス遺伝子の同定に有用と考えるが、このような症例が得られないのが現状である。

一方、古典的な手法ではあるが、あるウイルスに的を絞ってその AIH との関与を検討することも行ってきた。2006 年春に発表された原因不明の肝炎患者から同定された single strand の DNA 物質である Novel Single-Stranded DNA Fragment (以下 NV-F) についても昨年検討したが、AIH や原発性胆汁性肝硬変 (Primary Biliary Cirrhosis : 以下 PBC) の患者検体から NV-F は検出されなかった。

今回は既知のウイルスと疾患との関与を検索するために、国立感染研究所の片野らが開発

した multiplex multivirus real time PCR を用いて AIH または PBC と関係があるウイルスが検出されるか否かを検討した。

B. 研究方法

臨床症状、病理所見から AIH または PBC と診断された患者のうちインフォームドコンセント得て網羅的解析を行うことの同意を得た患者の肝生検検体を使用した。今回は AIH 患者 4 名、PBC 患者 1 名につき検討した。凍結保存された検体より QIAGEN 社の DNeasy Tissue kit を用いて RNA を抽出した。これを国立感染研究所・感染病理に依頼し multiplex multivirus real time PCR を行った。この方法では既知の 104 種類のウイルスを検出するためのプライマーおよびプローブが 96 穴のプレートにセットされており一度に検出する方法である。(本報告書の佐多分担研究報告書を参照)

AIH, PBC は、それぞれ病理所見および臨床検査所見、臨床経過から診断された。患者背景を表 1 に示す。AIH 患者では抗核抗体 (ANA) 高値、IgG 高値を認めている。PBC 患者では IgG は正常範囲内であった。

C. 研究結果

今回の検討では multiplex multivirus real time PCR によって検索した 104 種類のウイルスはどの検体からも検出できなかった。内因性コントロールである β アクチン, GAPDH, $\beta 2$ ミクログロブリンはどの検体からも検出されており, 抽出された RNA は問題ないと考えられた。

D. 考察

AIH など特定疾患の発症にはウイルスのような微生物が関与している可能性があることは, これまで多くの研究で報告されてきた。例えば本邦の AIH は約 10% が C 型肝炎感染を有していることが示されている。このため AIH また同様に原因不明である PBC の発症におけるウイルスの関与が証明し最終的に発症の予防や治療につながることを目標である。

初年度に行われた AIH および C 型慢性肝炎の患者の肝生検サンプルから RNA を抽出し DNA チップを用いて網羅的遺伝子解析を行った。それぞれの疾患群の遺伝子発現を比較し有意に発現が亢進しているウイルス関連の遺伝子がないかを検討したが, 特に認めなかった。また古典的手法であったが, 2006 年に報告された原因不明の肝障害に関与している可能性が示された NV-F が, AIH や PBC の患者において認められるか否かを血清より抽出した DNA を PCR 法で検査したが, 最終的には一例も認めなかった。

今回検査方法として用いた国立感染研究所の片野らが開発した multiplex multivirus real time PCR では既知の 104 種類のウイルスを検出するために 96 穴のプレートの 1 つ 1 つに検出したいウイルスの 2 種類ずつのプライマーとプローブが塗布されているが, ここに NV-F を検出するための適当なプライマーなどを加えれば一度に NV-F の関与も検討できると思われる。いずれにせよ今回の検討では陽性を示すウイルスの検出にはいたらなかった。この原因としては①症例数が少ない, ②関与しているウイルスは今回の既知の 104 種類以外のものである, ③発症後経過がたっており原因ウイルスはすでに排除されており, 検出にいたらなかった, ④ウイルスが存在していたとしても本検査方法の感度以下であった, ⑤AIH, PBC の発症

にはウイルスの関与の可能性は少ない, などが考えられる。

今後は (I) 症例数を増やす更に検討を重ねる, (II) 発症初期の患者において検討する, 特に IgG などは高値ではないが病理所見など他の結果から AIH, PBC が疑われる症例について検討することなどが必要と考える。

E. 結論

BDV の神経変性機序を明らかにするために, BDV 感染モデル動物を用いて検討した。その結果, BDV P 蛋白質の持続的な発現が細胞傷害性を誘導し, 神経細胞変性を引き起こす可能性を見出した。また, ヒトゲノム内には BDV に類似した遺伝子が存在することを明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kubota K, Iida H, Fujisawa T, Yoneda M, Inamori M, Abe Y, Kirikoshi H, Saito S, Ohshiro H, Kakuta Y, Nakajima A Clinical factors predictive of spontaneous remission or relapse in cases of autoimmune pancreatitis. *Gastrointest Endosc.* 2007 Dec;66(6):1142-1151.
- 2) Ikeda I, Tomimoto A, Wada K, Fujisawa T, Fujita K, Yonemitsu K, Nozaki Y, Endo H, Takahashi H, Yoneda M, Inamori M, Kubota K, Saito S, Nagashima Y, Nakagama H, Nakajima A. 5-Aminosalicylic Acid Given in the Remission Stage of Colitis Suppresses Colitis-Associated Cancer in a Mouse Colitis Model. *Clin Cancer Res.* 2007 Nov 1;13(21):6527-6531.
- 3) Nakajima A, Wada K. Life style-related diseases of the digestive system: from molecular mechanisms to therapeutic strategies: preface. *J Pharmacol Sci.* 2007 Oct;105(2):127-8. Epub 2007 Oct 6.
- 4) Saito S, Heller T, Yoneda M, Takahashi H, Nakajima A, Liang JT. Lifestyle-related

- diseases of the digestive system: a new in vitro model of hepatitis C virion production: application of basic research on hepatitis C virus to clinical medicine. J Pharmacol Sci. 2007 Oct;105(2):138-44. Epub 2007 Oct 6.
- 5) Yoneda M, Endo H, Nozaki Y, Tomimoto A, Fujisawa T, Fujita K, Yoneda K, Takahashi H, Saito S, Iwasaki T, Yamamoto S, Tsutsumi S, Aburatani H, Wada K, Wada K, Sakamoto H, Nishikawa K, Sakuma S, Nakajima A, Fujimoto Y, Hotta K, Nakajima A. Life style-related diseases of the digestive system: gene expression in nonalcoholic steatohepatitis patients and treatment strategies. J Pharmacol Sci. 2007 Oct;105(2):151-6. Epub 2007 Oct 6.
- 6) Yoneda M, Saito S, Ikeda T, Fujita K, Mawatari H, Kirikoshi H, Inamori M, Nozaki Y, Akiyama T, Takahashi H, Abe Y, Kubota K, Iwasaki T, Terauchi Y, Togo S, Nakajima A. Hepatitis C virus directly associates with insulin resistance independent of the visceral fat area in nonobese and nondiabetic patients. J Viral Hepat. 2007 Sep;14(9):600-7.
- 7) Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, Iida H, Yonemitsu K, Kato S, Takahashi H, Kirikoshi H, Inamori M, Nozaki Y, Abe Y, Kubota K, Saito S, Iwasaki T, Terauchi Y, Togo S, Maeyama S, Nakajima A. High-sensitivity C-reactive protein is an independent clinical feature of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and also of the severity of fibrosis in NASH. J Gastroenterol. 2007 Jul;42(7):573-82. Epub 2007 Jul 25.
- 8) Sato T, Chiguchi G, Inamori M, Sakai H, Fujisawa N, Akiyama T, Akimoto K, Fujita K, Takahashi H, Yoneda M, Abe Y, Kubota K, Ueno N, Nakajima A. Protein-losing gastroenteropathy and gastric polyps: successful treatment by Helicobacter pylori eradication. Digestion. 2007;75(2-3):99. Epub 2007 May 18.
- H. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許取得
- ①肝炎重篤化のモニター：2006年
国内 特許 2006-299978
国際 国際出願 PCT/JP2005/01829
- ②脂肪肝炎の診断及び／又は治療における血清コリン値の有用性：2006年
国内 特許 2006-299978
国際 国際出願 PCT/JP2007/067029
- ③脂肪肝炎の診断及び／又は治療における肝臓へのコリン集積値の有用性：2007年
国内 特許 2007-42095
- ④血液中 Nitric Oxide(NO)代謝物量測定による内臓脂肪量非侵襲的測定法の発明：2007年
国内 特許 2007-107257
2. 実用新案登録
なし

患者背景

検体	疾患	年齢	HCV 抗体	HBs 抗原	EBV 抗体	CMV 抗体	ANA	AMA	IgG mg/d
1	AIH	77歳	(+)	(-)	(-)	(-)	160倍	(+)	1948
2	AIH	75歳	(-)	(-)	IgG 80倍	(-)	160倍	(-)	2400
3	PBC	54歳	(-)	(-)	N	N	80倍	(+)	1543
4	AIH	66歳	(-)	(-)	IgG 40倍	N	320倍	(+)	2760
5	AIH	70歳	(-)	(-)	N	N	320倍	(-)	4068

表 1

6. マイコプラズマ感染と特定疾患との関連性についての研究:

抗リン脂質抗体症候群における自己抗体とマイコプラズマの抗原交叉性、慢性呼吸器疾患と *Mycoplasma amphoriforme* の関連ならびにリウマチ疾患と *Mycoplasma fermentans* の関連についての検討

分担研究者 荒川 宜親 (国立感染症研究所細菌第二部 部長)

研究協力者 佐々木裕子 (国立感染症研究所・細菌第二部)

永田典代、原嶋綾子 (国立感染症研究所・感染病理部)

網 康至、須崎百合子 (国立感染症研究所・動物管理室)

山田耕二、三浦英靖、松田和洋 (エム・バイオテック株式会社)

有賀 正、川村信明、波多野典一 (北大大学院・小児科学)

佐々木次雄 (国立感染症研究所・細菌第二部)

研究要旨 ①抗リン脂質抗体症候群(APS)病態へのマイコプラズマ感染の関与を調べるため、マイコプラズマ感染者における抗リン脂質抗体価の測定を行った。健常人群との比較において、*Mycoplasma pneumoniae* 感染者群においては、抗カルジオリピン抗体価($p<0.001$)、ならびに A 社のキットを用いた測定において抗フォスファチジルセリン(PS)抗体価($p<0.05$)ならびに抗フォスファチジルセリン・プロトロンビン(PS/PT)抗体価($p<0.05$)が高値を示した。M. hominis 感染者群においては、A 社のキットを用いた測定において、抗 PS 抗体価($p<0.001$)ならびに抗 PS/PT 抗体価($p<0.001$)が高値を示した。B 社のキットを用いた測定においては、群としての有意な抗体価上昇は無かったが、調べた 9 症例中 7 例で少なくとも病期のいずれかにおいて基準値 12unit/ml を上回った。抗 PS/PT 抗体価はこれまで健常人には存在せず、APS、全身性エリテマトーデス(SLE)あるいは強皮症における陽性報告が知られている抗リン脂質抗体のひとつである。今回測定した M. hominis 感染者については、抗 PS 抗体価上昇の影響を受けて抗 PS/PT 抗体価が上昇している可能性は高いものの、産科領域患者であることから、流産などの産科領域における抗リン脂質抗体陽性例における M. hominis 診断系開発とともに、APS 病態への関与についての解析の必要性が示唆された。②新規発見種 M.amphoriforme の血清診断抗原候補蛋白の解析を行った。③関節リウマチ疾患モデルとして M. fermentans 生菌投与ウサギにおける病理学的解析を行った。本モデルウサギにおいて、個体差はあるものの、ヒトのリウマチ疾患の早期診断に有用とされる抗ガラクトース欠損 IgG 抗体価の一過性上昇が認められた。

A. 研究目的

抗リン脂質抗体症候群(APS)は、自己抗体産生が関与する血液凝固異常で、約半数が全身性エリテマトーデス(SLE)などの自己免疫疾患に合併するが、基礎疾患をもたない原発性 APS も約 40%前後を占めると推察されている。遺伝性は認めず、深部静脈血栓症や胎盤血栓によ

る流産といった血栓症状を引き起こす疾患群である。2006 年に提唱された診断基準によれば、臨床所見(動脈血栓、静脈血栓、小血管の血栓症、流産など妊娠の異常)が 1 つ以上、検査所見(抗カルジオリピン抗体、抗 $\beta 2$ 糖蛋白($\beta 2$ -GP1、別名アポリポ蛋白 H)抗体、あるいはループスアンチコアグラント)が、それぞれ定め

られた方法や期間において陽性)が1つ以上存在した場合に診断される。生体内においてリン脂質は、特異的アポリポ蛋白等と結合した状態で血中に存在するが、カルジオリピンは、その特異的結合蛋白である $\beta 2$ -GP1 と複合体を形成しており、抗 $\beta 2$ -GP1 抗体が病態に関連することが動物実験で報告されている(文献 1-3)。APS の臨床検査においては、従って、抗カルジオリピン抗体価ならびに、抗カルジオリピン・ $\beta 2$ -GP1 複合体抗体価の両方を測定する enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) が用いられる。一方、APS には検査所見でループスアンチコアグラントと称される *in vitro* において血液凝固反応を阻害し、血液凝固時間の延長をもたらす抗リン脂質抗体を有する患者も多く見られる。現在、ループスアンチコアグラントの正体として有力視されているのがリン脂質としてのフォスファチジルセリン(PS) と、その結合蛋白であるプロトロンビン(PT) に対する抗体である。抗 PS/PT 抗体価は診断基準には採用されていないが、臨床における重要な参考データの一つと言える。本研究においては、テーマ1として、マイコプラズマ感染者において稀に血液凝固異常を起こす APS 患者が報告されることから、マイコプラズマ感染の APS への関与を疑い、マイコプラズマ感染者血清中の抗リン脂質抗体価の調査を行った。今年度は、特にこれまで解析してこなかった抗 PS/PT 抗体についての解析を加えた。

マイコプラズマという寄生性の小型細菌は、100 種以上の種からなる *Mollicutes* 綱 *Mycoplasma* 属に属する。近縁の *Ureaplasma* 属のウレアプラズマもある。これらは、寄生生活に適応する中で退行進化をたどった細菌の一群で、約 0.6-1.3Mb と最小クラスのゲノムサイズを有し(共通祖先を有することが予想される枯草菌ゲノムは約 4Mb と大きい)、自前のアミノ酸や脂質合成経路の遺伝子を欠き、自らの細胞構築成分を宿主に依存している(文献 4-5)。従って外界環境では生存できないうえに、宿主域が狭い。ヒトで感染が認められる主な種は約 10 種あるが (*Mycoplasma pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *M. penetrans*, *M. amphoriforme*, *M. orale*, *M. salivarium*, *Ureaplasma urealyticum*, *U.*

parvum)、そのうち臨床で診断可能な種は *M. pneumoniae* (肺炎マイコプラズマ菌) 一種のみである。ヒトの気道や泌尿生殖器に常在している種もある一方で、非リン菌性尿道炎の起因菌 *M. genitalium* や、関節リウマチとの疫学的関連が長年にわたり報告されている *M. fermentans*、さらには、近年になってヒトから初分離され発見に至った *M. penetrans* や *M. amphoriforme* などがいる。本研究においては、テーマ2としてヒト慢性呼吸器疾患患者気道からの新規発見種 *M. amphoriforme* の検査法開発における基礎的解析を検討するとともに、テーマ3として診断・治療法開発のための *M. fermentans* 投与による関節リウマチ動物モデルの作成を試み、昨年度、生菌の1回投与で関節炎が見られたウサギにおいて、複数回投与による病変の違いについて検討した。

B. 研究方法

1) 抗リン脂質抗体症候群における自己抗体とマイコプラズマの抗原交叉性についての検討

APS 患者血清は、診断基準を満たす症例ならびに検査所見のみ陽性例も解析対象とした。マイコプラズマ感染者血清については、呼吸器症状を呈し *M. pneumoniae* 感染症と診断された症例 (45 例)、産褥熱等を呈し過去に我々の研究室にて *M. hominis* 感染を確認した症例(9 症例 15 検体)ならびに、*M. penetrans* 抗体陽性者 (3 例。うち 2 例の後天性免疫不全ウイルス Human immunodeficiency virus, HIV 抗体陽性者を含む) の保存血清を用いた。臨床検体は、医学研究倫理審査委員会において承認を受け本研究に用いた。APS 患者等血清中の抗マイコプラズマ抗体価の測定には、抗 *M. pneumoniae* 抗体価測定については感作血球凝集試験法をセロディアマイコ II (フジレビオ) を用いて行った。抗 *M. fermentans* 抗体測定については、共同研究者であるエムバイオテックより供された糖脂質を用いた ELISA 法を、抗 *M. hominis* 抗体測定については全菌体の超音波破碎物を抗原とした自前の ELISA 法を用いた。一方、マイコプラズマ感染者血清中の抗リン脂質抗体測定には、抗 CL・ $\beta 2$ -GP1 キット「ヤマサ」EIA (ヤマサ)、抗 PS/PT 抗体 IgG ELISA キット (コスミック コーポレーション)、PS/PT

ELISA kit (MBL)を用いプロトコールに従い100倍希釈血清中の抗体価を測定した。前2キットにおいては、 β 2-GPIあるいはPTの存在下、非存在下の両方の値を別個に測定し、結合蛋白非依存性抗リン脂質抗体価についても結果を記載した。統計解析には、GraphPad InStatを用い、Student-Newman-Keuls検定により解析し、健常人群との比較p値<0.05を示す群を有意とした。

ヒト β 2-GPIと抗原交叉性を有する蛋白がマイコプラズマに存在するかについての解析は、抗ヒト β 2-GPI抗体とマイコプラズマ菌体の反応性をウエスタン、ブロットイング法ならびにプロテオミクスにより解析した。マイコプラズマ全菌体の超音波破碎物をSDS-PAGEにて展開し、ニトロセルロース膜に転写させた後、膜を抗ヒトアポリポ蛋白Hポリクロナール抗体、ウサギ免疫血清(CHEMICON)と反応させた。また、SDS-PAGEにてアクリルアミドゲル内に展開させた蛋白の一部を切り出し、蛋白分解酵素にてゲル内消化を行った後、LC-MS/MS(LCQ-DECA, Thermo electron)による質量解析を行った。得られたペプチドデータからの候補蛋白の予想には、*M. penetrans*, *M. pneumoniae*, *M. genitalium* ゲノム情報に基づく候補蛋白の推定を行い、ゲノム情報が非公開の*M. hominis*, *M. fermentans*については近縁種の情報を用いた。一方、マイコプラズマ全菌体成分中の培地由来成分、特にアポリポ蛋白の解析を以下の方法で行った。すなわち、培養、洗浄後に集菌した*M. penetrans*ならびに*M. pneumoniae*の超音波破碎物をSDS-PAGEにてゲル内に泳動し、蛋白分解酵素によるゲル内消化を行って得られた全菌体成分由来ペプチドを、複数蛋白の同時解析法であるタンデムLC-MS/MS法(LC/LC-MS/MS法)により8段階のギ酸濃度にて解析した。マイコプラズマ用培地中の添加馬血清を考慮し、馬ゲノム、ならびに整備されているウシゲノム情報を用いてペプチドデータ中のアポリポ蛋白等の存在を検索した。

2) 慢性呼吸器疾患と *M. amphoriforme* の関連についての検討

昨年引き続き、血清診断法開発の基礎とな

る抗原蛋白の解析を継続した。*M. amphoriforme* 全菌体超音波破碎物を二次元電気泳動で展開した後、PVDF膜に転写し、膜を抗*M. amphoriforme*免疫マウス抗体と反応させた。抗体と反応した膜上の蛋白を蛋白分解酵素で消化後、LC-MS/MSによる質量解析を行った。*M. amphoriforme*の全ゲノム解析情報が非公開の為、近縁マイコプラズマ種ゲノム情報に基づく候補蛋白の予想を行った。

3) リウマチ疾患と *M. fermentans* の関連についての検討

動物実験については、動物実験委員会の承認を受けて本研究に使用した。ウサギ(NZ/W)体重2kgサイズに麻酔下で*M. fermentans*生菌約 10^9 CFUを投与した。複数回投与は、最初の感染後7日後ならびに21日後、合計3回行い、3羽は経気道内、3羽は経後脚膝蓋関節腔内に投与した。経時的に採血を行い、感染後35日に剖検し脳を除く主要臓器を採取し病理学的解析を行った。関節については脱灰後、前後十字靭帯の交差する部分を解析した。また、早期関節リウマチ患者における陽性率が高く、さらに疾患活動性の評価に有用と考えられている血清IgGの糖鎖付加異常にともなう抗ガラクトース欠損IgG抗体の測定をウサギモデルにおいても行った。測定には、エイテストCA・RF(三共純薬)を用いた。固相化したガラクトース欠損IgGと供試血清中の抗ガラクトース欠損IgG抗体を反応させ、ビオチン化レクチンと結合させたものを酵素標識ストレプトアビジンと基質にて発色させ吸光度を測定した。

C. 研究結果

1) 抗リン脂質抗体症候群における自己抗体とマイコプラズマの抗原交叉性についての検討

①APS患者等における抗マイコプラズマ抗体価測定

APS患者3例ならびに、検査所見でカルジオオリピン・ β 2-GPI抗体価高値で経過観察中の1例における3種のマイコプラズマに対する血中抗体の測定結果を表1に示す。3例中1例で、抗*M. hominis*抗体価陽性ならびに抗*M. pneumoniae*抗体価320倍と中程度の上昇を認めた。カルジオオリピン・ β 2-GPI抗体価高値例

においては、抗 *M. fermentans* 抗体陽性を認められた。

②マイコプラズマ感染者等における抗カルジオリピン・ β 2-GPI 抗体価測定

マイコプラズマ感染者における抗カルジオリピン・ β 2-GPI 抗体価測定結果を図 1 ならびに表 2 に示す。抗カルジオリピン抗体価は、*M. pneumoniae* 感染者において健常人より有意に高値を示した ($p < 0.001$)。 β 2-GPI 依存性抗体価については 45 例中 4 例において基準値 3.5 unit/ml を超える陽性を示したものの、群としては有意な差は無かった。最も高値を示した例では抗カルジオリピン抗体 40unit/ml、抗カルジオリピン・ β 2-GPI 抗体価 13 unit/ml であった。*M. penetrans* 抗体陽性者 2 例中 2 例において、抗カルジオリピン・ β 2-GPI 抗体価陽性を認めた。*M. hominis* 感染者においては特に高値を認めなかった。

③マイコプラズマ感染者等における抗フォスファチジルセリン・プロトロンビン抗体価測定

次に、マイコプラズマ感染者血清中の抗フォスファチジルセリン・プロトロンビン抗体価測定結果を図 2 ならびに表 2 に示す。キット A による測定において、プロトロンビン非依存性 (抗 PS 抗体) ならびに依存性 (抗 PS/PT 抗体) 双方における抗フォスファチジルセリン抗体の有意な高値が *M. pneumoniae* 感染者群 19 例 (健常人群との比較で抗 PS 抗体価 $p < 0.05$ 、抗 PS/PT 抗体価 $p < 0.05$) ならびに *M. hominis* 感染者群 15 例 (健常人群との比較で抗 PS 抗体価 $p < 0.001$ 、抗 PS/PT 抗体価 $p < 0.001$) で認められた。*M. penetrans* 抗体陽性者は 3 例と例数が少ないため Noramlity test をパスできず評価は難しいが、抗 PS 抗体価 $p < 0.001$ 、抗 PS/PT 抗体価 $p < 0.001$ を示した。各群における抗 PS 抗体価、抗 PS/PT 抗体価の平均値は、健常人が 7 unit/ml 以下であるのに対し、マイコプラズマ抗体陽性者・感染者群においては、82-400unit/ml と高値を示した。このうち、*M. hominis* 感染者 9 例については、抗 PS/PT 抗体価を産褥熱の急性期と回復期血清とで比較した (図 2-B)。No.2, No.4 および No.5 において回復期における抗 PS/PT 抗体価は急性期より高値であった。これら 3 名の患者は、抗 *M. hominis* 抗体価が上昇が回復期に見られた症例

で (図 2-E)、同血清中に PS/PT 抗体と抗 *M. hominis* 抗体の双方が認められた。

抗 PS/PT 抗体価測定について慎重を期すため、キット A で測定したのと同じ血清について PS/PT 複合体を固相化したキット B による測定も行った。図 2-C に示すとおり、キット B 測定においては、*M. pneumoniae* 感染者群、*M. hominis* 感染者群における抗 PS/PT 抗体価の有意な高値は見られなかったものの、*M. hominis* 感染者 9 例中 7 例 (78%) において病期のいずれかにおいて基準値 12unit/ml 以上を上回った (図 2-D)。

④抗 β 2-GPI 抗体と反応するマイコプラズマ菌体成分の解析

抗アポリポ蛋白 H(β 2-GPI)ウサギ血清をマイコプラズマ 5 種 (*M. penetrans*, *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. hominis* ならびに *M. fermentans*) の全菌体成分と反応させた結果、分子量の異なる複数のバンドが検出された。しかしながら、今回の解析条件においては、ニトロセルロース膜上での抗体との反応は良好なもの PVDF 膜上での反応性が弱く、プロテオミクス解析用の消化ペプチドの十分量が得られず、候補蛋白をしばりきれなかった。一方、*M. penetrans* ならびに *M. pneumoniae* 全菌体成分中の培地由来成分の解析結果、両種においてアポリポ蛋白が低スコアながら高い MS/MS ピークとして観察された。調べた *M. pneumoniae* 4 株におけるスコアは、アポリポ蛋白 A-I(APO-A1)については $X_c > 1.0$ 条件下でアミノ酸配列中の検出ペプチドの coverage は 4-23%であった。 β 2-GPI については、coverage は 5-12%と A-I よりも低く、存在の確証は得られなかった。

2) 慢性呼吸器疾患と *M. amphoriforme* の関連についての検討

M. amphoriforme 抗原蛋白の解析においては、抗 *M. amphoriforme* 抗体と反応する主要蛋白として 4-5 個程度が見いだされた。他のマイコプラズマ種との抗原交叉が明らかな DnaK を除外した 2 つの蛋白スポット (図 3 中に矢印で示す) 由来消化ペプチドは、近縁種のゲノム情報を用いた今回の検索においては、モリキューテス特異的リポ蛋白である可能性があると考え

られた。

3) リウマチ疾患と *M. fermentans* の関連についての検討

M. fermentans 生菌の3回投与ウサギにおいては、経気道内投与群においては3/3羽で肺炎像を、経後脚膝蓋関節腔内投与群においては1/3羽で顕著な関節炎像が認められた。関節炎像が見られた膝蓋関節においては(図4、最右列の3枚の写真)、滑膜上皮細胞の多層化、上皮直下の形質細胞浸潤に加え、数ヶ所においてリンパ球の集ぞく(最上段写真中に矢印で示す)が認められた。他の臓器における病変は無かった。また、抗ガラクトース欠損IgG抗体価は、*M. fermentans* 生菌1回投与群ならびに3回投与群のいずれにおいても、感染7日後から10-14日後に一過性に抗体価上昇を示す個体が存在した。1回投与群においては、5羽中2羽、3回投与群においては6羽中4羽が抗体価上昇を示した。生菌の投与ルートによる違いは無いと思われた。

D. 考察

抗リン脂質抗体陽性者の全てで血栓症の症状を呈するわけではない。ただし、注目される抗リン脂質抗体陽性者における合併症においては、脳、心臓、肺、四肢などの動静脈血栓症、習慣性流産、てんかんなどの精神神経疾患、網膜中心動静脈血栓症などの眼症状、腎障害など、内科、外科、産科、脳外科、眼科、泌尿器科など広範な臨床科に関連した症状を呈する。劇症型抗リン脂質症候群と称される全身臓器不全を伴い、経過が急激で致死的経過をたどる症例もある。臨床においては、抗リン脂質抗体陽性で血栓症既往者や、血栓症発症者、流産経験者などリスクが高い患者や産科での流産予防時に、ヘパリン等の抗血栓薬が処方される。しかしながら、血栓の発生機序が不明な現在、根本治療は存在しない。APS患者血清中の抗リン脂質抗体の中でも重要視されているのが、抗カルジオリピン抗体と抗フォスファチジルセリン抗体であり、病態形成に重要なのは、特異的結合蛋白である β 2-GPIやプロトロンビンに対する抗体であることが理解されつつある。特に、約50kDa蛋白である β 2-GPIのドメインVに存

在するカルジオリピン結合部位にあたるアミノ酸モチーフ(GDKVペプチドと称される15アミノ酸)を免疫することでマウスが抗リン脂質抗体を産生すること、その抗リン脂質抗体を接種されたマウスにおいて血管内皮細胞へのリンパ球接着が増加し、血栓が形成されるというGharavi AEらの実験(文献1-3)は、抗カルジオリピン \cdot β 2-GPI抗体価陽性症例における病態理解を助けるものである。一方で、本来ヒトの血清成分である β 2-GPIに対する自己抗体産生の機序は不明なままである。これまでも、微生物感染が抗リン脂質抗体産生と関連することを示唆する報告は出されており、特にカルジオリピンは梅毒トレポネーマの細胞成分であることから梅毒血清反応疑陽性と混同された時代もあり、細菌感染と抗カルジオリピン抗体の関連については議論されてきた。我々が調査対象としたマイコプラズマ感染症についても*M. pneumoniae*感染者において抗カルジオリピン抗体価陽性者がいることについては報告されており、今回の調査でも追認された。しかしながら、 β 2-GPI依存性については、*M. pneumoniae*感染者群で有意な抗体価上昇は認めなかった。ただし、*M. penetrans*感染者における抗カルジオリピン抗体陽性を示すAPS患者症例報告があること(文献6)、今回の少数例における解析や、 β 2-GPI抗体と反応する菌体成分の解析からは、*M. penetrans*や*M. fermentans*感染による抗カルジオリピン \cdot β 2-GPI抗体産生についての可能性を完全に否定するものではないと考えられる。 β 2-GPIのカルジオリピン結合部位にあたるアミノ酸モチーフに相同性を有する蛋白を*M. penetrans*ゲノム中で検索したところ、リポ蛋白や、hypothetical proteinの中に一部類似する配列を有する蛋白が候補にあがってくる。実験的証明が成り立つかが今後の解析の課題である。

一方で、今回の解析における抗フォスファチジルセリン \cdot プロトロンビン抗体価測定においては、調べた複数のマイコプラズマ感染者群において、血清中抗体価上昇が認められたことは、新規の事である。抗PS/PT抗体価はこれまで健康人には見られず、APS、SLEあるいは強皮症患者において抗体陽性例が認められている。今回、産科の臨床検体において臨床診断が不可能