

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
平成 20 年度分担研究報告書

成人 T 細胞白血病発症モデルマウスへの HSV-1 感染と免疫応答

研究分担者：長谷川秀樹（国立感染症研究所、感染病理部）

研究協力者：荒尾雄二郎（岡山大学）、相内章（国立感染症研究所）

研究要旨：臓器移植や悪性腫瘍に伴った免疫低下状態においては健常な状態では問題にならない病原微生物により重篤な感染症を発症する事がある。特に健常な宿主に感染し潜伏するウイルスは、悪性腫瘍による免疫低下に伴って再活性化し致死的な感染症を起こすことがある。本研究では、成人 T 細胞白血病発症モデルマウスを使用することで、白血病発症に伴う免疫低下時に HSV-1 の再活性化をモニターし、免疫応答の変化を解析することを目的とした。その結果、HSV-1 潜伏感染状態で白血病を発症することでマウスの生存率は著しく低下し、HSV-1 に対する血清 IgG 応答が低下していることが明らかになった。

A. 研究目的

我々は、これまでに成人 T 細胞白血病 (ATLL) を発症するトランスジェニックマウスの作製に成功している。(18 年度報告済み)。このモデルマウスは、白血病細胞の増殖に伴い ATLL 発症時には免疫系が破壊され免疫低下状態になることが明らかになっている。したがって、悪性腫瘍に伴う免疫低下状態での HSV の再活性化を、より臨床像に近い形で再現できる可能性がある。今年度は、このモデルマウスを使用した HSV-1 潜伏感染状態での ATLL 発症に伴う HSV-1 の再活性化と免疫応答の変化を解析することを目的とした。

B. 研究方法

1. 動物

成人 T 細胞白血病の発症原因となる HTLV-1 の発癌関連遺伝子である tax を発現するト

ランスジェニックマウス (Tax Tg マウス) を用いた (18 年度報告済み)。白血病の自然発症までに一年以上を有するが、発症したマウスから精製した白血病細胞 (mATL 細胞) を移植することで早期に発症させることができる。すべての動物実験は国立感染症研究所実験動物委員会の承認の元に行われた。感染実験は国立感染症研究所動物管理区 biosafety level 2 (BSL2) 区域内で行われた。

2. ウイルスと細胞

単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) は Glasgow 17Syn をブランク精製法にて精製した後用いた。ブランク精製法及びウイルス価測定には Vero 細胞をもちいた。mATL 細胞は、自然発症した Tax Tg マウスの脾臓から精製したのちに、NOD-SCID マウスの腹腔内へ移植することで増殖後、再度精製し使用時まで凍結保

存した。

3. ウイルス感染と mATL 細胞の投与

一匹あたり 5×10^6 pfu の Glasgow 17Syn を経鼻ルートで感染させた。片鼻 $2 \mu\text{l}$ で両穴から感染を行った。約一ヵ月後に mATL 細胞を一匹あたり 10^6 細胞で腹腔内に接種した。その後観察を続け生存曲線を作成した。明らかに瀕死の場合は、安楽殺後に血清、鼻腔洗浄液、および病理切片作製のため各臓器を採取した。mATL 細胞接種後二ヵ月後に、観察を打ち切り全マウスに関して安楽殺を行い、サンプルを回収した。

4. 鼻腔洗浄液中 HSV-1 ウイルス価の測定

マウスから回収した鼻腔洗浄液中のウイルス価は、Vero 細胞を用いたブランクアッセイにて測定した。鼻腔洗浄液の Vero 細胞への吸着操作を一時間行い、その後寒天含有培地を重層し培養した。二日後に形成されるブランク数をカウントした。

5. HSV-1 に対する抗体応答

HSV-1 に対する鼻腔洗浄液中 IgA、および血清中 IgG 抗体応答を ELISA にて測定した。抗原として、Glasgow 17Syn を感染させた Vero 細胞を界面活性剤添加緩衝溶液で破碎したライゼートを用いた。

6. 病理組織学的解析

遺伝子挿入が確認されたマウスを経時的に病理組織学的に解析した。検体は緩衝ホルマリンにて固定した後に、パラフィンで包埋し

薄切サンプルに関して H&E 染色を行った。また、抗 HSV 抗体による免疫組織染色による感染細胞の検出も試みた。

C. 結果

1. HSV-1 経鼻感染後の白血病発症に伴うマウスの生存率

Tax Tg マウスに HSV-1 (Glasgow 17Syn 株) を 5×10^6 pfu で経鼻ルートから感染させた。潜伏感染が成立した 1 ヶ月後に、mATL 細胞を 1 匹あたり 10^6 個で腹腔内に投与しマウスの様子を観察した。実験は、mATL 細胞を投与する群 (A 群) としない群 (B 群)、おのおの 6 匹で行った。mATL 細胞投与後、約 1 ヶ月後に mATL 細胞投与群で 2 匹のマウスが死亡した (図 1)。この時、同群の 1 匹 (マウス X) の眼球周囲にヘルペス様の症状が認められたため、解剖し病理サンプルを回収すると同時に、鼻腔洗浄液と血清を採取した。また残り 3 匹中、1 匹には咽頭リンパ節の腫脹が見られ ATLL の発症が認められたため、観察を続けた。B 群においては、この時点では ATLL 発症およびヘルペス様の症状は全く認められなかった。コントロールとサンプルとし、マウス A と同一週齢の 1 匹 (マウス Y) から病理サンプル、鼻腔洗浄液および血清を採取し、残りのマウスに関しては観察を継続した。さらに 1 ヶ月後、A 群における ATLL 発症マウスの症状が重症化したため、解剖を行い病理サンプル、鼻腔洗浄液および血清を採取した。この段階で A 群のマウスはすべて ATLL を発症していたが、ヘルペス様の症状は見られなかった。また、併せて B 群の 5 匹からも各サンプルを採取したが、解剖所見

では ATLL 発症およびヘルペス様の症状は全く認められなかった。

2. HSV-1 特異的抗体応答の検討

採取した鼻腔洗浄液および血清中の HSV-1 (Glasgow 17Syn 株) 特異的な IgA、IgG の産生を ELISA 法にて、鼻腔洗浄液中のウイルス価に関して Vero 細胞を用いたブランクアッセイにより測定した。ATL 細胞投与群 (A 群)・非投与両群 (B 群) とともに、鼻腔洗浄液および血清中の IgA 産生は全く認められなかった (図 2)。インフルエンザウイルスの経鼻ルートからの感染においては、鼻腔洗浄液中に IgA が産生され感染防御に働くことが知られている。今回見られた HSV への IgA 非産生は、正常マウスである BALB/c マウスおよび C57BL/6 マウスにおいても確認された。また血清中 IgG の産生は、B 群では非常に高いのに対し、A 群では個体差が大きいものの低く抑えられていた (図 3)。これは ATLL 発症に伴う免疫系の破綻に伴うものと考えられる。感染ルートである鼻腔の洗浄液を用いたブランクアッセイでは再活性化 HSV-1 を検出することができなかった。

3. 病理切片の解析

ATL 細胞投与群 (A 群) マウス X、および非投与両群 (B 群) マウス Y に関して (図 1)、H&E 染色と抗 HSV 抗体を用いた免疫組織染色を行った。マウス X では脾臓に ATLL 特有の花弁型の核構造を持った白血病細胞の浸潤が見られたのに対し、マウス Y の脾臓は正常であった (図 4 左)。また、HSV-1 が潜伏感染する三

又神経節を比較したところ、マウス A では萎縮した神経細胞がみられるのに対し、マウス Y では正常であった (図 4 右)。しかしながら、マウス X および Y において HSV-1 抗原の検出はできず、HSV-1 が再活性化を検出することはできなかった。マウス X の眼球周囲においても HSV-1 抗原の検出はできなかった。

D. 考察

臓器移植及び悪性腫瘍に伴う免疫低下状態になる患者の数は移植医療および悪性腫瘍に対する医療の発達と共に今後ますます増える事が危惧される。免疫不全患者をはじめ発症に伴い免疫力が低下している患者では、再活性化による症状が重症化し、アシクロビルによる治療を繰り返す過程でウイルス性チミジンリン酸化酵素活性の欠損による薬剤耐性 HSV の出現が問題とされている。この薬剤耐性 HSV の出現メカニズムを明らかにし、予防法・治療法を開発することが求められている。今回、我々は、HSV-1 の再活性化の *in vivo* 実験モデルとして ATLL 発症 Tg マウスの利用を考えた。ATLL 発症に伴い HSV-1 特異的な IgG 抗体応答は低下することが明らかになり、最終的にマウスの生存率も低下することが示された。本研究においては HSV-1 の再活性化を明確にすることはできなかったが、今後 HSV-1 の検出法を変えることにより ATLL 発症と HSV-1 の再活性化の相関関係を明らかにできるものと考えている。また、本モデルでは発症までは正常な免疫細胞が存在することから、HSV-1 の再活性化時に低下する免疫系の細胞の同定が期待できる。

E. 結論

成人 T 細胞白血病 (ATLL) 発症モデルマウスを用いて、ATLL 発症に伴う HSV-1 の再活性化と免疫応答の変化に関する解析を行った。ATLL 発症に伴い、潜伏感染している HSV-1 に対する抗体応答が低下することが明らかになった。ATLL 発症モデルマウスの利用は、HSV-1 再活性化メカニズム解明に関して有用なツールになり得る可能性を見出した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Taguchi F, Morikawa S, Sata T. Mouse-passaged severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus leads to lethal pulmonary edema and diffuse alveolar damage in adult but not young mice. *Am J Pathol.* 2008 Jun;172(6):1625-37.
2. Kamijuku H, Nagata Y, Jiang X, Ichinohe T, Tashiro T, Mori K, Taniguchi M, Hase K, Ohno H, Shimaoka T, Yonehara S, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H*, Seino KI. Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of galactosylceramide, which can induce cross-protection against influenza

viruses *Mucosal Immunol.* 2008 May;1(3):208-18. Epub 2008 Mar 5.
*corresponding author

3. Ichinohe T, Iwasaki A, Hasegawa H. Innate sensors of influenza virus: clues to developing better intranasal vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2008 Nov;7(9):1435-45.
 4. Hasegawa H, Ichinohe T, Aina A, Tamura S, Kurata T. Development of an inactivated mucosal vaccine for H5N1 influenza virus. *Therapeutic and Clinical Risk Management* 2009 in press
 5. Takahashi Y, Hasegawa H, Hara Y, Ato M, Ninomiya A, Takagi H, Odagiri T, Sata T, Tashiro M, Kobayashi K. Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14)-inactivated vaccine requires both antibodies against hemagglutinin and neuraminidase in mice. *J Infect Dis.* in press
- ### 2. 学会発表
1. 長谷川秀樹、辻隆裕、澤洋文、佐多徹太郎 成人 T 細胞性白血病マウスモデルにおける細胞走化因子の解析 第 97 回日本病理学会総会 (2008 年 5 月金沢)
 2. 長谷川秀樹、一戸猛志、相内章、田村慎一、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎 キノコ類菌糸体抽出物を用いた経鼻粘膜ワクチンによる粘膜免疫増強作用とインフルエンザウイルスの

- 感染防御 第56回日本ウイルス学会総会 (2008年10月岡山)。
3. 相内章、一戸猛志、田村慎一、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 経鼻ワクチンにおける Dectin-1 リガンドによるアジュバント効果の亢進 第56回日本ウイルス学会総会 (2008年10月岡山)。
4. 永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、福士秀悦、西條政幸、森川茂、佐藤由子、佐多徹太郎 SARS-CoV 感染動物モデルを用いた SARS 発症機序の解明と治療法の検討第56回日本ウイルス学会総会 (2008年10月岡山)
- H. 知的財産権の出願、登録状況
- なし

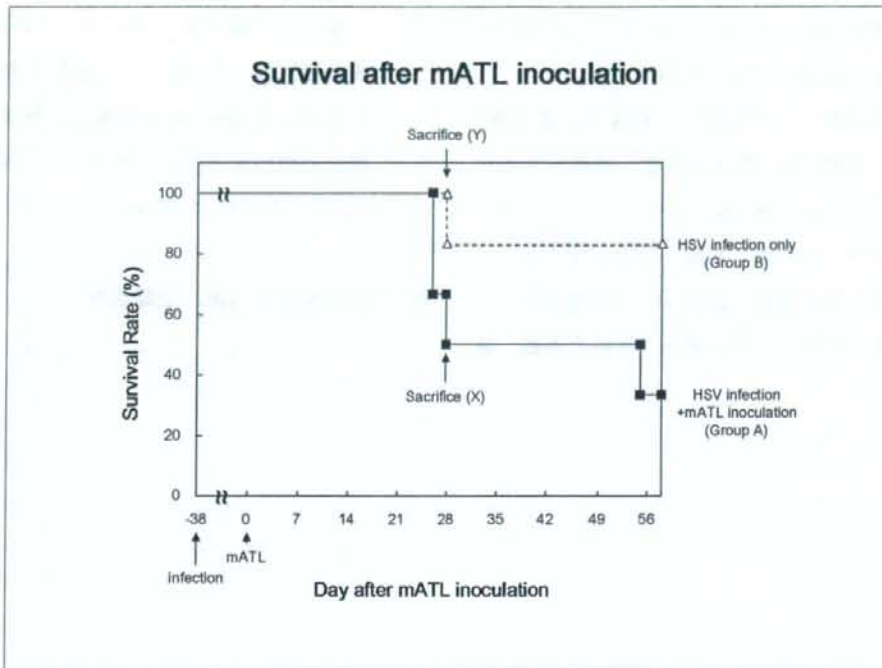


図1 HSV-1 潜伏感染において ATLL 発症に伴う生存率の変化

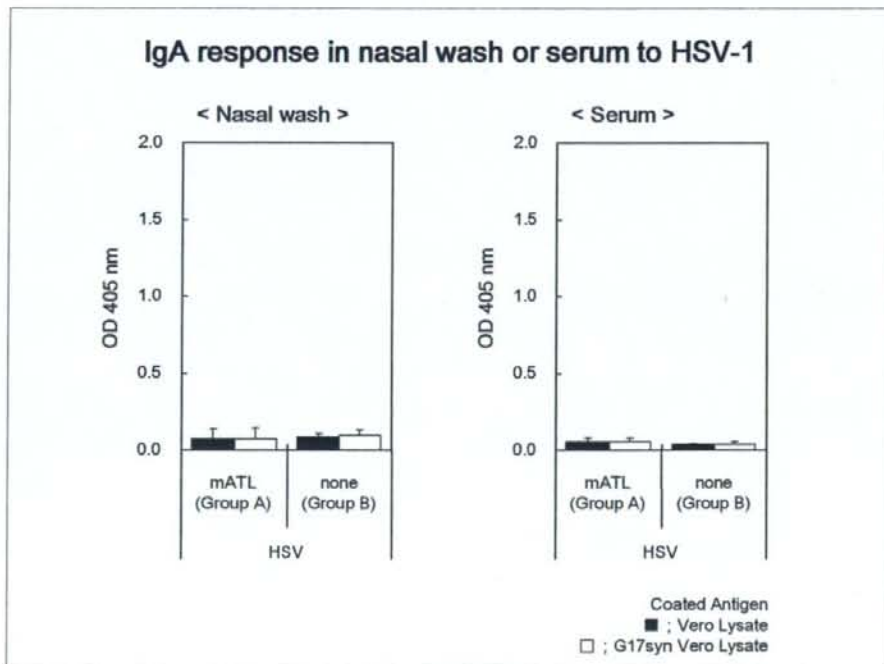


図2 HSV-1 特異的な IgA 抗体の検出

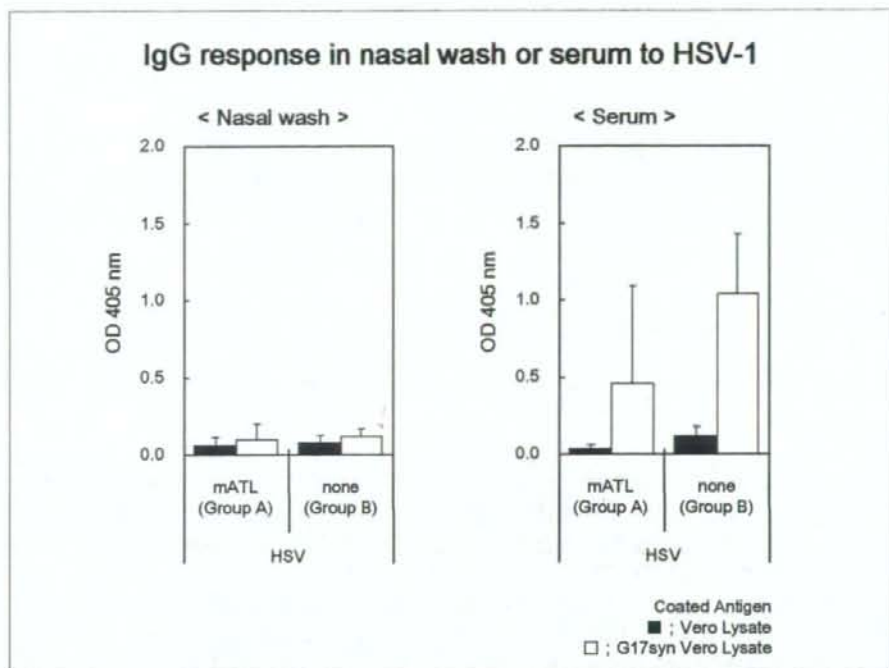


図3 HSV-1 特異的な IgG 抗体の検出

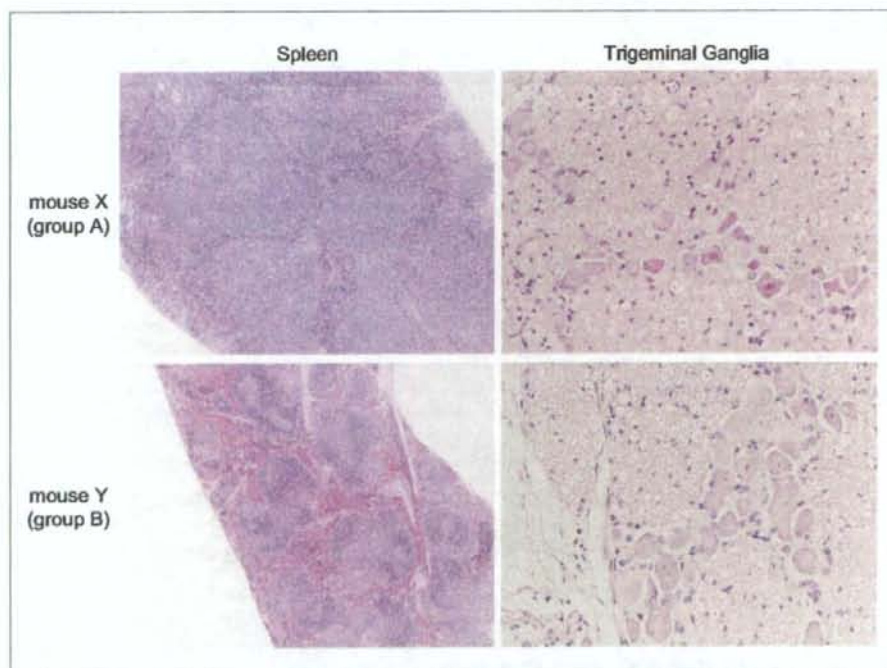


図4 脾臓 (左) および三叉神経節 (右) のH&E 染色像

臓器移植や悪性腫瘍による免疫低下状態で発生するウイルス感染症の予防と治療に関する研究:ウイルス感染症の発生機序の解明と、効果的な予防策に関する研究「ヒトヘルペスウイルス 6、7とサイトメガロウイルスの潜伏感染・再活性化による疾患の発症機序の解明と予防」

研究分担者 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 伊藤 寿記 (大阪大学大学院医学系研究科・補完代替医学講座 教授)

研究要旨:本年度は、 β -ヘルペスウイルスに属するヒトサイトメガロウイルス (HCMV) とヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) の再活性化を誘導する疲労の分子メカニズムを検討し、疲労現象の中核をなす分子である疲労因子を同定した。この分子は、これらのウイルスの再活性化や、HHV-6 の中枢神経病理性遺伝子の発現を誘導する機能を有していた。また、昨年までに報告した、HHV-6 再活性化を抑制する機能を有する補完医療薬成分が、この疲労因子を抑制することによって HHV-6 再活性化を予防していることも見出し、 β -ヘルペスウイルス再活性化抑制法の開発のための分子機構に関する知見や、再活性化抑制物質のスクリーニング法を得ることができた。

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。

特に、HCMV の免疫低下状態の患者における再活性化は、重篤な間質性肺炎や網膜炎などを生じ、時には致死性である。また、HHV-6 の再活性化は、脳炎・脳症を生じ、精神疾患様の重篤な後遺症を残すことが最近注目されている。

3 種類の β -ヘルペスウイルスは、ほぼ同時期に再活性化を生じ、共通のメカニズムによって再活性化すると考えられている。

しかし、 β -ヘルペスウイルスのみならずヘルペスウイルスの潜伏感染と再活性化のメカニズムは未だ十分に明らかにされておらず、再活性化を予防する手段も開発されていない。

本研究では、このような問題点を解決し、 β

-ヘルペスウイルス再活性化を予防する方法を開発するために、i) 再活性化の新しい診断法を開発すること、ii) 再活性化の機序の解明と再活性化促進因子の同定を行うこと、及びこれらの成果をもとに、iii) 再活性化を予防する方法を開発することを目的とする。

特に今年度は、HHV-6 の再活性化を誘導する因子と、再活性化防止法の研究で進展があった。

B. 研究方法

1. β -ヘルペスウイルス再活性化の分子機構の解明と誘導分子およびシグナル伝達経路の同定

これまでの研究により、HHV-6 の再活性化を強く誘導する原因として、労働や抗癌剤の投与など、疲労を誘導する因子が重要であることを見出した(図 1)。

また、これまでに HHV-6 脳炎・脳症の原因となる可能性のある HHV-6 潜伏感染遺伝子タンパク Small protein encoded by the Intermediate stage Transcript of HHV-6 (SITH)-1 を見出したが、このタンパクの発現も、HHV-6 の潜伏感染から再活性化に至る過

程で発生する、中間状態で誘導されることが判った(図2)。

今年度は、この現象をもとにHHV-6やCMVの再活性化を誘導するシグナル伝達経路や分子の同定を目標とした。再活性化が疲労や抗癌剤の投与といった、ストレスに関する現象によって誘導されることから、候補となるシグナル伝達経路は、ストレス応答経路に関するものと考えられた。しかし、ストレス応答経路は、非常に種類が多いため、これをしらみ潰しに検討することは無理であった。我々はこれまでに、HHV-6とCMVが潜伏感染時に発現する遺伝子(潜伏感染遺伝子)が、前初期遺伝子IE1とIE2のopen reading frameと、その前に存在するsmall upstream open reading frame(suORF)を持つことを見出した。また、我々はHHV-6の再活性化の初期には、前初期遺伝子IE1/IE2のmRNAが発現するのではなく、潜伏感染遺伝子のIE1/IE2のORFからIE1/IE2のタンパクが合成され、ウイルス増殖が開始されることも見出した(図3)。

この知見をヒントに、この様な現象に関係する分子のmRNAの量的変化を鋭敏に測定できるReal-time PCRプライマーおよびTaqManプローブを作成した。また、疲労による分子の変化を様々な臓器で捉えるために、マウスモデルを利用し、様々な臓器における候補分子の検討を行なった。

マウスに疲労を与える方法は、2時間程度の水泳、または、ケージに薄く水を張ることによって1夜程度の睡眠不足を誘導することによって行なった(図4)。

これらはいずれも、ヒトが通常の労働において、しばしば経験する程度の疲労負荷であり、研究が動物を虐待せずに行なえるとともに、ヒトの自然な生理的状态を把握できるものと考えられた。

2. HHV-6、HCMV再活性化予防法の開発

HHV-6が疲労によって再活性化するという現象などから、HHV-6やCMVは身体ストレスによって再活性化すると考えられた。癌患者や移植患者における最大の身体ストレスは、抗癌剤の投与であると考えられる。我々は、これまでの研究において、Active Hexose Correlated Compound(AHCC)などの補完医療薬が、HHV-6再活性化を抑制することを示してきた。

今回は、これが実際に再活性化誘導因子の抑

制によって、効果を発揮しているかどうかを検討するために、AHCCと類似の働きをもつと考えられる物質をマウスに投与し、疲労付加後の疲労因子の増加に対する影響を検討した。

AHCCは、マウスに投与するのに適当な製剤が入手できなかったため、類似の機能を有すると考えられる他の補完医療薬成分を使用した。

補完医療薬成分は、マウスに事前に腹腔内投与し、疲労負荷(不眠疲労)による、疲労因子の増加に対する影響を検討した。

(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。研究に使用する血液や臍帯血は、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。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。動物実験は、東京慈恵会医科大学・実験動物委員会の承認を得て行なった。

C. 研究結果

1. β -ヘルペスウイルス再活性化の分子機構の解明と誘導分子およびシグナル伝達経路の同定

HHV-6やHCMVの再活性化を誘導するシグナル伝達経路や、誘導分子を同定するために、疲労マウスで増加するmRNAを検討した。HHV-6の潜伏感染遺伝子の活性化に関わる分子を候補として、Real-time PCR法を用いて、スクリーニングを行なった。

これまでの研究成果から、HHV-6の再活性化の初期には、前初期遺伝子IE1/IE2のmRNAが発現するのではなく、潜伏感染遺伝子のIE1/IE2のORFからIE1/IE2のタンパクが合成され、ウイルス増殖が開始される。このことからHHV-6とHCMVは、uORFのストレス応答機構を利用して、前初期遺伝子タンパクIE1/IE2を翻訳し、再活性化を生じると

考えられる。この様な情報から、無数にあるストレス応答遺伝子の中の候補分子の数を、ある程度減少させることが可能であった。

スクリーニングの結果、脳、心臓、脾臓、肝臓など、過労による疾患や、過労死の原因であることが知られている臓器中で、不眠による疲労によって mRNA 量が増加する分子(疲労因子)を同定することができた。また、この分子は、HHV-6 や HCMV の潜伏感染部位である骨髄や末梢血液中においても、疲労によって増加することが判った(図 5)。また、この分子は、不眠による疲労だけでなく、水泳による疲労によっても増加することが判った(図 6)。

この分子は、マウスだけでなく、ヒトでもその相同分子が存在する。ヒトの疲労因子を、発現ベクターにクローニングし、ハイドロダイナミック法を用いてマウスに静中し、*in vivo* の肝臓で発現させた。この結果、コントロールとして、用いた EGFP 遺伝子ではマウスの自発運動量に変化がないのに対し、疲労因子では、顕著な自発運動量の低下が見られた(図 7)。

で測定することによって再活性化を定量化し、ストレスの蓄積状態(疲労)との関係を検討した。通常労働は、残業のない勤務を、重労働は、1日平均5時間程度の残業を伴う労働を、過重労働はこれにさらに当直勤務による慢性的睡眠不足が加わる勤務状態を示す。

図 2 HHV-6 の中枢神経病原性遺伝子 SITH-1 の誘導

HHV-6 の中枢神経毒性を生じさせる潜伏感染遺伝子タンパク Small protein encoded by the Intermediate stage Transcript of HHV-6 (SITH)・1 の発現は、HHV-6 の潜伏感染から再活性化に至る過程で発生する、中間状態で誘導される

この結果、この因子は疲労の原因や疲労感の伝達に機能する分子であることが明らかとなった。また、この分子の機能から、HHV-6 や HCMV の再活性化因子としても機能することが判った。

図 1

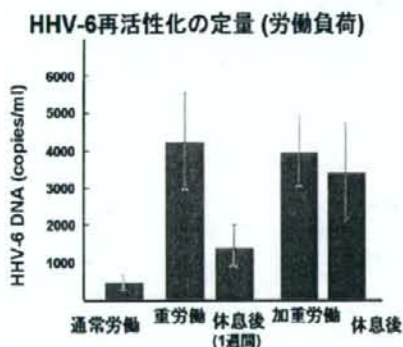


図 2



図 1 労働負荷による HHV-6 の再活性化: 唾液中の HHV-6 DNA 量を Real-time PCR 法

図 3

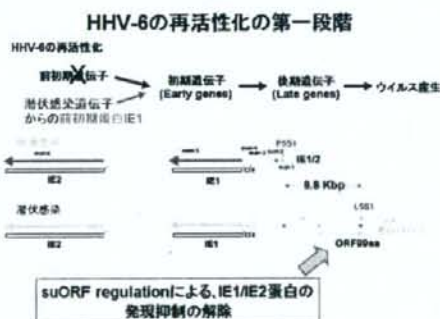
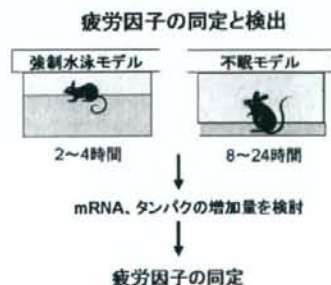


図 4



ことが判明した(図8)。このことは、補完医療薬による HHV-6 再活性化の抑制効果は、補完医療薬成分による疲労因子の抑制を介して作用している可能性が示唆された。

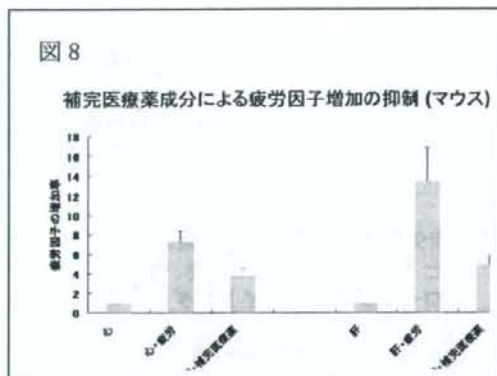


図8 補完医療薬成分による疲労因子の抑制

補完医療薬成分をマウスに事前に投与し、疲労負荷(不眠疲労)による、疲労因子の増加に対する影響を検討した。

D. 考察

今年度は、疲労因子を同定することに成功したことによって、これまで現象しか明らかにできていなかった、HHV-6などのβ-ヘルペスウイルスの再活性化が疲労刺激によって生じるという知見や、補完医療薬による HHV-6 再活性化の防止効果などの、メカニズムの解明を進めることができた。

「ヒトヘルペスウイルス6、7とサイトメガロウイルスの潜伏感染・再活性化による疾患の発症機序の解明と予防」という研究課題の解決のための研究目標は、i) 再活性化の機序の解明と再活性化促進因子の同定を行うこと、及びこれらの成果をもとに、ii) 再活性化を予防する方法を開発すること、であった。昨年までに現象面では、このいずれにおいてもある程度の結果が得られていた。今年度は、疲労因子との関係を明らかにできたことで、これまでの知見を実際に臨床応用するための基盤作りが進化したものと考えている。

また、これは、昨年見出した、HHV-6 脳症の原因と考えられる HHV-6 潜伏感染遺伝子 SITH-1 の発現にも関係する現象のため、実際

に HHV-6 再活性化による疾患を抑制する上でも有用な知見であると思われる。

今後は、疲労因子に関する研究をさらに進展させることで、β-ヘルペスウイルスの再活性化機構がさらに解明できるものと考えられる。

再活性化を予防する方法においては、これまでに、補完医療薬 AHCC によって抗癌剤による HHV-6 再活性化が抑制できることを示していた。今回、類似の補完医療薬成分が疲労因子の発現を抑制していることが見出されたことにより、補完医療薬成分が、疲労因子の抑制を介して、HHV-6 再活性化を抑制していることが示唆された。

抗癌剤投与や移植の拒絶反応など、β-ヘルペスウイルスの再活性化を誘導する因子が、どのような機構で再活性化を誘導するかは明らかでない。このため、これまで、β-ヘルペスウイルスの再活性化の誘導因子に関する報告も混沌としており、再活性化予防法の開発の大きな障害となっていた。

今回、HHV-6 再活性化のトリガーとなる疲労因子を同定できたことにより、抗癌剤投与や移植の拒絶反応など、疲労以外の再活性化因子によるβ-ヘルペスウイルス再活性化誘導と、疲労による再活性化誘導との関係を分子生物学的に明らかにする方法を得ることができた。今後は、疲労因子自体の機構解明に加えて、この様な他の因子との関連も検討する予定である。

E. 結論

今回、疲労の分子機構の中心となる疲労因子を同定したことにより、HHV-6 や HCMV の再活性化因子をさらに明らかにする基盤を得ることができた。この因子は、HHV-6 の中枢神経病原性遺伝子 SITH-1 の発現とも関係しており、病原性のさらなる解明にも寄与するものであることが判った。

さらに、疲労因子を抑制する物質をスクリーニングすることにより、これらのウイルスの再活性化を抑制できる因子の同定が可能となり、予防法の開発も進展されられるものと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. K. Kondo, N. Kobayashi, K. Shimada, H. Kuratsune, H. Matsunaga.

Identification of novel HHV-6 latent protein associated with mood disorders in CFS, depressive disorder, bipolar disorder and HHV-6 encephalopathy. International Symposium on Viruses in Chronic Fatigue Syndrome (June 22, Baltimore 2008)

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 潜伏感染中間状態特異的タンパクによる気分障害の発症機序
(第 56 回日本ウイルス学会、2008 年 10 月岡山)

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 56 回日本ウイルス学会、2008 年 10 月岡山)

4. 清水昭宏、小林伸行、近藤一博
遺伝子治療を目的としたヒトヘルペスウイルス 6 ベクターの性状解析
(第 56 回日本ウイルス学会、2008 年 10 月岡山)

5. 嶋田和也、近藤一博
スプライシング関連因子 SART3 のアンチセンスによるヒトヘルペスウイルス 6(HHV-6) ie1/ie2 mRNA の選択的スプライシングに対する影響
(第 56 回日本ウイルス学会、2008 年 10 月岡山)

3. 書籍等

1. K. Kondo. Chronic Fatigue Syndrome and Herpesvirus Infection. In: Fatigue Science for Human Health. Springer Press, 2008. pp. 137-152.

2. ガイドライン

渡辺恭良、平山佳伸、近藤一博、倉恒弘彦
日本疲労学会 抗疲労臨床評価ガイドライン (2008 年 2 月 16 日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

1. 近藤一博 (発明人)
HHV-6 再活性化を用いた疲労度評価方法およびその利用
特許番号: 2008 年 11 月 21 日 (特許第 4218842 号)

特許出願

2. 近藤一博、小林伸行 (発明人)
HHV-6 潜伏感染に関連する気分障害を治療又は予防する方法
米国出願番号 No. 61/102, 441 出願日 2008 年 10 月 3 日
3. 近藤一博、清水昭宏、高倉由光、市川雅子 (発明人)
HHV-6 再活性化検出のためのウイルス濃縮法 特願 2008-092816
出願日 2008 年 3 月 31 日
4. 近藤一博、清水昭宏、高倉由光、市川雅子 (発明人)
HHV-6 再活性化測定のためのウイルス定量法 特願 2008-093288
出願日 2008 年 3 月 31 日

EB ウイルス感染症の発生機序と治療法に関する研究

研究分担者 藤原成悦 国立成育医療センター研究所・母児感染研究部・部長

研究要旨 免疫不全状態で発生する日和見ウイルス感染症の代表的存在である EB ウイルス (EBV) 関連リンパ増殖性疾患について、ヒト化マウスを用いた疾患モデルの作製を通じて、発症機序解明と治療法開発を進めている。本年度は、このモデルにおける EBV 特異的免疫応答について解析した。EBV 抗原ペプチドを提示する MHC クラス I テトラマーによる解析では、EBV 感染マウス末梢血 CD8 陽性細胞のうち 0.1~0.7% が EBV 特異的 T 細胞であった。また、ヒトの EBV 初感染時に血中レベルが上昇する IFN- γ が感染マウスの血中でも増加していた。EBV 感染細胞と感染マウス由来 CD8 陽性細胞を混合培養する実験では、CD8 陽性細胞が感染細胞の増殖を抑制することが示唆された。これらの結果は、このモデルにおいてウイルス特異的 T 細胞免疫応答が誘導され、実際に EBV 感染に対する防御機構として働くことを示唆している。EBV 感染マウスに免疫不全を人為的に誘導し、LPD 発症の条件を詳細に解析することが可能であると考えられる。

A. 研究目的

移植治療の普及、エイズの流行、悪性腫瘍患者の増加などに伴い免疫不全宿主が増加しているため、日和見感染対策に対する行政的対応が求められている。EB ウイルス (EBV) を原因とするリンパ増殖性疾患 (LPD) はこのような日和見感染症として最も重要なものの一つである。EBV は B リンパ球を不死化し、無制限に増殖するリンパ芽球様細胞へとトランスフォームするという、極めて特徴的な能力をもつ。不死化細胞は、生体内においては通常免疫監視機構により速やかに除去されるが、免疫能が低下した場合は無制限に増殖し LPD を発症する。このように LPD の病態および発症機構の根底には EBV による細胞増殖の誘発があるため、治療法開発においては EBV による細胞増殖誘発メカニズムの解析が必須

のステップとなる。一方、CD4 陽性細胞数から見ると同じレベルの免疫不全を呈する宿主でも、EBV 関連 LPD の発症には個人差があるため、発症と免疫不全の関連についてさらに詳しく解析し、どのようなタイプの免疫不全が最も発症に結びつきやすいのかを解明することが、発症予防の観点から強く望まれるところである。

免疫不全マウスの 1 系統である NOD/Shi-*scid*/IL2R γ ^{null} (NOG) マウスにヒト臍帯血由来造血幹細胞を移植すると、T, B, NK リンパ球、マクロファージ、樹状細胞など免疫系の主要コンポーネントが分化するため、ヒト化マウスとよばれる。ヒト化マウスにはヒト B 細胞が存在するため、通常のマウスに感染しない EBV の感染モデルを作ることが可能である。私たちが作製したモデルでは、LPD に酷似するリンパ腫が発

症し、EBV 特異的 T 細胞免疫応答が誘導されるため、免疫不全の詳細と LPD 発症の関連を追及する場として最適であると考えられた。本年度は、このモデルにおける EBV 特異的免疫応答について詳細な解析を行った。

B. 研究方法

1. 臍帯血

東京臍帯血バンク分離保存施設（日本大学医学部）に提供された臍帯血のうち、血液量不足のため移植に使用できないものを利用した。

2. NOD/Shi-*scid*/IL2R γ^{null} (NOG) マウス

NOD/Shi-*scid*/IL2R γ^{null} マウス（以下 NOG マウス）は、6~8 週齢の雌マウスを実験動物中央研究所より購入し、国立感染症研究所無菌飼育室で飼育・実験を行った。

3. 臍帯血造血幹細胞の分離と移植

臍帯血から Ficoll 比重遠心法により単核細胞を分離し、MACS CD34+ アイソレーションキット（Miltenyi Biotec）あるいは Stemsep キット（ステムセルテクノロジー社）を用いて CD34 陽性造血幹細胞を分離した。 $1 \times 10^4 \sim 1.2 \times 10^5$ 個の CD34 陽性細胞を尾静脈より移植した。その後、フローサイトメトリーにより末梢血、骨髄、脾臓、胸腺などからヒト CD45、CD19、CD3 陽性細胞を検出し、それぞれヒトリンパ球、ヒト B 細胞、ヒト T 細胞分化の指標とした。

4. EBV 感染実験

Akata 細胞の培養上清を $0.45 \mu\text{m}$ フィルターを通過させたのち尾静脈内に接種した。

5. MHC テトラマーによる EBV 特異的 T 細胞の定量

5 種類の EBV 蛋白質、LMP2, EBNA3A,

EBNA3B, BRLF1, BMLF1 に由来するペプチドとヒトクラス I MHC (A*2402)の組み合わせによるテトラマーの混合物を用いて、EBV 感染マウスの T リンパ球を染色し、フローサイトメトリーにより解析した。

6. EBV 感染細胞増殖阻止試験

EBV 未感染ヒト化 NOG マウスの脾臓より分離した B リンパ球に EBV を感染させ、マイクロプレートに分注した。これらの細胞を 2 群に分け、1 群には EBV 感染マウス脾臓より分離した CD8 陽性 T 細胞を、他の群には未感染ヒト化マウスの脾臓から分離した CD8 陽性 T 細胞を混合した。8 週間培養したのち増殖を示した well の数を両群の間で比較した。すべての実験を同一の造血幹細胞サンプルによりヒト化したマウスを用いて行った。

7. サイトカイン測定

EBV 感染モデルマウス末梢血中のヒトサイトカインレベルは市販の ELISA 法キット (BIO SOURCE) を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は直接ヒトを対象とする医療行為を含まないが、ヒト臍帯血細胞を利用するため、ヘルシンキ宣言に則った倫理的配慮を必要とする。臍帯血バンクに提供された臍帯血には、血液量の不足などの理由により移植に用いられないものが一定の割合で含まれ、多くは廃棄されている。本研究はこのような臍帯血を利用するものであり、提供者およびバンク利用者に不利益は生じない。バンクへの臍帯血提供の際には、移植に使用できない場合は研究に利用する旨を説明し同意を得ている。また、臍帯血バンクより提供を受ける際には、連結不可能匿名化を行い、個人情報の保護を徹底した。

動物実験については、動物実験指針を遵守し、動物愛護の観点から十分な配慮をした。本研究は国立成育医療センター、国立感染症研究所、および東京脐帯血バンク倫理委員会の承認を得た。また、国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得た。

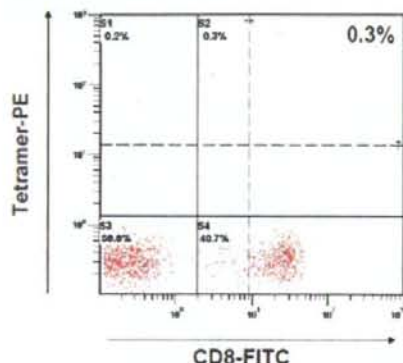


図1. EBV感染マウス末梢血中のEBV特異的T細胞。EBV蛋白質由来ペプチドを提示するヒトMHCクラスIテトラマーと抗CD8抗体による染色。

C. 研究結果

1. MHCテトラマーを用いたEBV特異的T細胞の定量

HLA A*2402をもつ造血幹細胞によりヒト化したマウスにEBVを感染させ、末梢血単核細胞を分離した。EBV蛋白質LMP2, EBNA3A, EBNA3B, BRLF1, BMLF1のそれぞれを提示するHLA A*2402テトラマーの混合物とこの単核細胞の反応性を検討した結果、ヒトCD45陽性リンパ球のうち0.1~0.3% (CD8陽性T細胞当たり0.1~0.7%)が反応性をもつことが示された(図1)。

2. EBV感染マウスのヒトサイトカイン産生

思春期以降のEBV初感染により発症する伝染性単核症(infectious mononucleosis(IM))では、末梢血中のIFN- γ をはじめとするTH1タイプのサイトカインレベルが上昇することが報告されており、このような高サイトカイン血症も病態形成に関わる可能性が考えられる。ヒト化NOGマウスを用いたEBV感染モデルが、このようなEBV初感染の病態を再現するかどうかを検討するために、EBV感染後のヒトサイトカインレベルを検討した。4TD₅₀のEBVを感染させた後、71日および107日が経過した2頭のマウスの末梢血中IFN- γ を測定したところ、未感染マウスと比較して高い値を示した(図2)。一方、IL-8とIL-10の上昇は認められなかった。

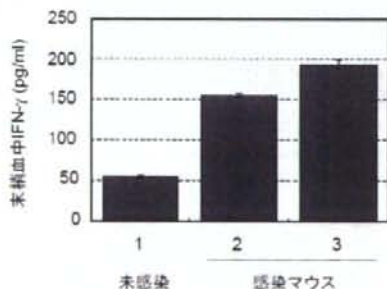


図2. EBV感染ヒト化マウスにおけるヒトIFN- γ 産生。未感染マウス1頭と感染マウス2頭の結果を示す。

3. CD8陽性T細胞によるEBV感染細胞の増殖阻止

私たちはこれまでにEBV感染マウスにおいてELISPOT法によりEBV特異的T細胞を検出し、今回はテトラマー法によりエピトープの特異性を解析したが、これらのEBV特異的T細胞が実際にEBV感染細胞に対する増殖阻害作用をもつかどうかを検

討するために、transformation regression assay を行っている。予備的な実験では、EBV 未感染のヒト化マウスから分離した末梢血単核細胞に EBV を感染させた後、EBV 感染マウスから分離した CD8 陽性細胞を混合して培養した場合、感染細胞の増殖が阻害されることが示された (図 3)。一方未感染マウスから分離した CD8 陽性細胞は増殖阻害作用を示さなかった。

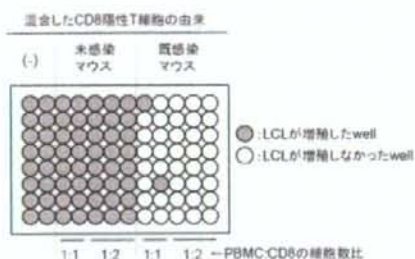


図 3. EBV 感染マウス由来 CD8 陽性 T 細胞による不死化阻害。EBV 未感染マウス由来末梢血単核細胞に EBV を感染させ、EBV 既感染あるいは未感染マウス由来 CD8 陽性 T 細胞を混合し、増殖の有無を記録した。

D. 考察

EBV 感染マウス由来の CD8 陽性 T 細胞は、EBV 感染細胞の増殖を阻害することが示唆された。また私たちが別途行っている研究では、EBV 感染マウスの T 細胞を除去すると生存期間が短縮され、LPD により早期に死亡することも分かっている。これらの結果はヒト化 NOG マウスに誘導される EBV 特異的 T 細胞応答が、実際に EBV 感染細胞に対する防御機構としての役割を果たすことを強く示唆しており、このモデルが LPD 発症につながる免疫不全の質的・量的特性を解析する場として適することを示

唆している。また、LPD に対する免疫治療の前臨床試験の場としても有用であると考えられる。

EBV 感染後の CD8 陽性細胞の顕著な増加と比較してテトラマーとの反応性を有する細胞が 0.1~0.7%と低率であった。使用したテトラマー以外の特異性を持つ T 細胞が反応の主体であった可能性があるため、今後他のテトラマーについて検討する予定である。モデルマウスでは、IFN- γ 産生などヒトの EBV 初感染の病態を再現することも示され、LPD 発症のみでなく、ヒトの EBV 感染を広範に再現する可能性がある。現在 IFN- γ 以外のサイトカイン産生についても検討している。

E. 結論

ヒト化マウスを用いた EBV 感染モデルでは、実際に感染防御機構として有効な EBV 特異的 T 細胞応答が誘導されることが示された。本モデルを用いて、免疫不全状態の日和見感染症の代表的存在である LPD の発症に直接結びつく免疫不全の特徴を解析することが可能と考えられる。また、LPD 治療薬 (法) 開発への応用も期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yajima, M., Imadome, K., Nakagawa, A., Watanabe, S., Terashima, K., Nakamura, H., Ito, M., Shimizu, N., Honda, M., Yamamoto, N., and Fujiwara, S. A new humanized mouse model of EBV infection reproducing persistent infection, lymphoproliferative disorder, and

cell-mediated and humoral immune responses. *J. Infect. Dis.* 198: 673-682, 2008.

2) Nakamura, H., Ishii, C., Suehiro, M., Iguchi, A., Kuroda, K., Shimizu, K., Shimizu, N., Imadome, K., Yajima, M., and Fujiwara, S. The Latent Membrane Protein 1 (LMP1) Encoded by Epstein-Barr Virus Induces Expression of the Putative Oncogene Bcl-3 Through Activation of the Nuclear Factor- κ B. *Virus Res.* 131: 170-179, 2008.

3) Imadome K, Shimizu N, Yajima M, Watanabe K, Nakamura H, Takeuchi H, and Fujiwara S. CD40 signaling activated by Epstein-Barr virus promotes cell survival and proliferation in gastric carcinoma-derived human epithelial cells. *Microbes Infect.* in press.

2. 学会発表

1) 新井文子、廣田理子、長尾俊景、三浦修、服部高明、渡辺睦房、富満弘之、横田隆徳、水澤英洋、今留謙一、藤原成悦. 化学療法後に運動神経優位の末梢神経障害を認めた慢性活動性EBウイルス感染症. 第18回EBウイルス感染症研究会. 2008年3月8日、東京.

2) 新井文子、廣田理子、長尾俊景、三浦修、今留謙一、藤原成悦. Capizzi療法AraC投与時に高度の発熱、心不全を合併した慢性活動性EBウイルス感染症成人例3例の臨床経過の検討. 第18回EBウイルス感染症研究会. 2008年3月8日、東京.

3) 矢島美彩子、今留謙一、中川温子、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、逸見千寿香、伊藤守、清

水則夫、山本直樹、藤原成悦. ヒト化NOGマウスモデルにおけるEBウイルス持続感

染. EBウイルス研究会. 2008年7月18日、米子.

4) 矢島美彩子、今留謙一、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、逸見千寿香、清水則夫、山本直樹、藤原成悦. ヒト化NOGマウスモデルにおけるEBウイルス持続感染. 第56回日本ウイルス学会学術集会. 2008年10月26日、岡山.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし.

带状疱疹後神経痛の発症機序の解析とその治療法の開発

研究分担者 白木公康 富山大学医学薬学研究部ウイルス学教授

研究要旨：移植患者では、免疫不全状況のため带状疱疹を発症しやすく、その合併症として、带状疱疹後神経痛が知られている。带状疱疹後神経痛の発症機序は明らかではない。带状疱疹の経過中に痛覚過敏を生じるが、その痛覚過敏は同様な病変を生じる単純ヘルペスウイルスとは対照的で、带状疱疹特有とされる。このように带状疱疹に特徴的な带状疱疹関連神経痛や带状疱疹後神経痛の発症について検討した。带状疱疹患者では、带状疱疹経過中から水痘ウイルスに対する強い抗体産生が行われることから、水痘ウイルスに対する免疫応答が痛覚過敏を生ずる可能性を検討した。この研究では、前初期抗原 IE62 に対する免疫応答に注目した。IE62 に対するモノクローナル抗体が、痛覚にかかわる脳由来栄養因子（BDNF）と免疫交差し、その生理活性を増強し、末梢神経損傷マウスで、痛覚過敏を生じることが確認された。

A. 研究目的

移植患者では、免疫不全状況のため带状疱疹を発症しやすく、その合併症として、带状疱疹後神経痛が知られている。単純ヘルペスウイルス感染によって同様な皮膚病変を生ずるが、带状疱疹のような疼痛は生じない。したがって、水痘带状疱疹ウイルスの病原性に特異的であることと、带状疱疹の再活性化と発症時期の関係から、疼痛発症に免疫学的機所を想定して、その免疫応答に注目して検討した。带状疱疹経過中に疼痛が始まる带状疱疹関連神経痛や带状疱疹回復後も疼痛が持続する带状疱疹後神経痛となり、種々なレベルの疼痛が持続する。水痘ウイルス IE62 は、感染の際には感染細胞の核内で主要転写調節因子であり、潜伏感染細胞では細胞質内に存在する。本研究では、特に、IE62 に対する免疫応答と疼痛発症に BDNF の活性化が関連しているという興味ある結果が得られた。

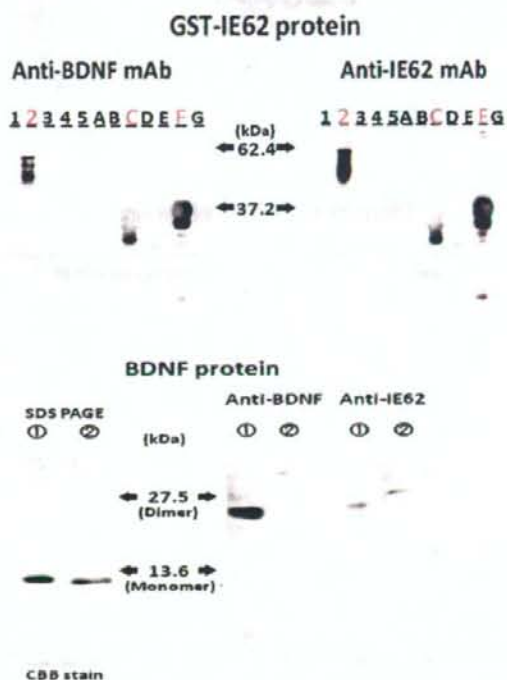
B. 材料と方法

GST-IE62 の融合蛋白を作成し、その部分蛋白に対するモノクローナル抗体（mAb）を作成した。IE62 と BDNF に対する mAb により、免疫学的交差性を水痘感染細胞の蛍光抗体法とウエスタンブロット法で確認した。抗 IE62 抗体の BDNF と免疫交差する抗体の BDNF の生理活性に対する影響は、ラット胎児神経細胞とマウス後根神経培養細胞を用いて検討した。痛覚過敏は、マウスの坐骨神経の

神経損傷痛覚モデルで痛覚過敏を検討した。

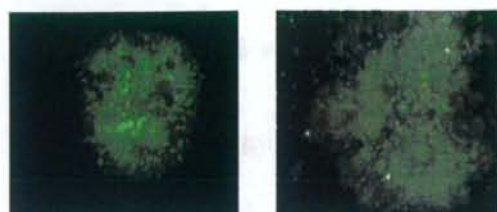
C. 結果

IE62 と BDNF 2 量体は、IE62 と BDNF の mAb でウエスタンブロット法と感染細胞に対する蛍光抗体で免疫交差が以下に示すように確認した。

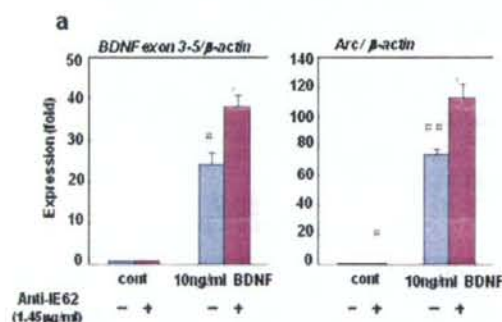


Anti-IE62 mAb

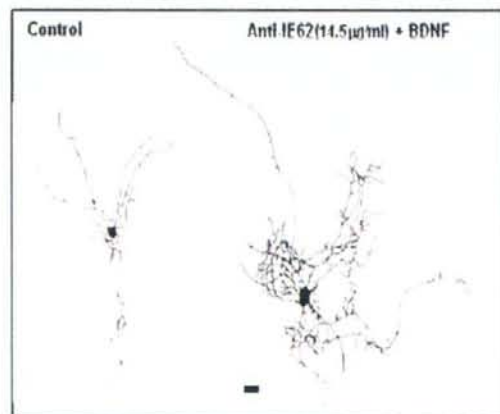
Anti-BDNF mAb



次に、この免疫交差が、BDNF の生理活性にどのような影響を与えるかについて培養神経細胞を用いて解析した。この部位の抗 IE62 mAb は BDNF 活性を阻害するのではなく、BDNF の活性を高め、神経細胞の BDNF と arc の転写を促進し、神経細胞突起の進展・分岐点増加を促進した。



Effects on dendritic development

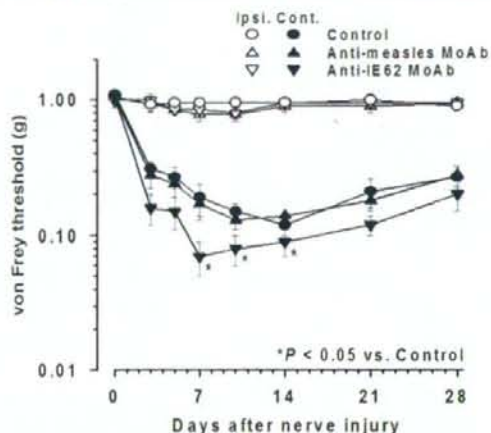


以上のように、抗 IE62mAb が、BDNF の生

理活性を有意に増強することが、培養神経細胞の遺伝子発現と神経突起の成長により確認された。

培養神経細胞の BDNF の活性を抗 IE62mAb が増強するが、そのレセプター TrkB を介する反応を K252a が阻害することから、抗 IE62 mAb の増強作用は、BDNF-TrkB を介することが確認された。

マウス末梢神経損傷モデルにおける抗 IE62 抗体による痛覚閾値の低下



つぎに、抗 IE62mAb を神経損傷マウスモデルの髄腔内投与により損傷側の痛覚を有意に痛覚過敏を生じさせた。また、IE62 の交差する部分で免疫したマウスの神経損傷によっても、損傷側の痛覚過敏を生じた。非損傷側は痛覚閾値に変動を認めなかった。神経損傷を起こした際に、培養神経細胞で確認されたように、抗 IE62 抗体が BDNF 活性を高めて、痛覚過敏 (allodynia) を生じていた。

D. 考察

この IE62 のエピトープは、これ以外に数カ所確認しているが、このエピトープに対する抗体が、帯状疱疹時に損傷を受けた神経・神経細胞に BDNF が働き痛覚過敏を生ずることが動物モデルで確認できた。以上のことから、帯状疱疹患者では、HSV と異なり、抗 IE62 抗体を産生することにより、水痘ウイルスに対する免疫応答が痛覚過敏を生じることが確認された。

E. 結論

免疫抑制患者に出現する帯状疱疹の合併症である帯状疱疹後神経痛に、水痘ウイルス IE62 に対する免疫応答が遊郭過敏を生じ、その病態の一因となる可能性を見出した。