

200936043A

厚生労働科学研究研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

# 特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

平成 22 年 3 月

研究代表者

宮崎 義継

(国立感染症研究所)

厚生労働科学研究研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

# 特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

平成 22 年 3 月

研究代表者

宮崎 義継

(国立感染症研究所)

平成21年度 難治性疾患克服研究事業  
「特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究」班  
班員名簿

氏名	所属	職名
宮崎 義継	国立感染症研究所・生物活性物質部	部長
佐多 徹太郎	国立感染症研究所・感染病理部	部長
朝長 啓造	大阪大学微生物病研究所・ウイルス免疫分野	准教授
近藤 一博	東京慈恵会医科大学医学部・ウイルス学講座	教授
山谷 睦雄	東北大学大学院医学系研究科・先進感染症予防学講座	教授
荒川 宜親	国立感染症研究所・細菌第二部	部長
和田 昭仁	国立感染症研究所・細菌第一部	室長
渋谷 和俊	東邦大学医学部・病院病理学講座	教授
竹末 芳生	兵庫医科大学・感染制御学講座	教授
河野 茂	長崎大学大学院・感染免疫学講座	教授

## 目 次

- I. 特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究  
総括研究報告書（平成 21 年度）・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1  
研究代表者：宮崎 義継（国立感染症研究所・生物活性物質部）
- II. 分担研究報告書
1. 難治性血管炎を誘発する真菌特異的分子・・・・・・・・・・・・ 7  
研究分担者：宮崎 義継（国立感染症研究所・生物活性物質部）
2. 特定疾患におけるレトロトランスポゾン及び内在性レトロウイルスの関与 ・ 1 2  
研究分担者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部）
3. 神経変性疾患と遅発性ウイルス感染との関連性・・・・・・・・ 1 6  
研究分担者：朝長 啓造（大阪大学微生物病研究所・ウイルス免疫分野）
4. 神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明・・・・・・・・ 2 1  
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）
5. 慢性肺気腫ないし呼吸不全とウイルス感染・・・・・・・・ 2 9  
研究分担者：山谷 睦雄（東北大学大学院医学系研究科・  
先進感染症予防学寄附講座）
6. マイコプラズマ感染と特定疾患の関連性についての研究・・・・ 4 4  
研究分担者：荒川 宜親（国立感染症研究所・細菌第二部）
7. 硫化水素産生菌が炎症性腸炎に及ぼす影響に関する研究・・・・ 5 1  
研究分担者：和田 昭仁（国立感染症研究所・細菌第一部）

8. 糸状菌吸入による肺高血圧および血管構築改変の機序に関する解析・・・ 54  
研究分担者：渋谷 和俊（東邦大学医学部・病院病理学講座）

9. 潰瘍性大腸炎手術における術前1日経口抗菌薬投与による  
腸管処置に関する研究・・・ 63  
研究分担者：竹末 芳生（兵庫医科大学感染制御学）

10. IgA腎症と感染症・・・ 66  
分担研究者：河野 茂（長崎大学大学院・感染免疫学講座）

III. 研究成果に関する刊行一覧表・・・ 71

# I. 総括研究報告書

## 総括研究報告書

研究代表者 宮崎義継（国立感染症研究所 生物活性物質部）

研究要旨：難病の発症に微生物感染の関与が示唆されているもの、その関係については明らかになっていない。当研究班では、特定疾患の原因となる病原性微生物の関与、または、感染が契機となる自己免疫異常を明らかにし、難病の発症予防あるいは効果的な治療法の開発に寄与することを目的として研究を行った。難治性血管炎と真菌感染、特定疾患におけるレトロトランスポゾン及び内在性レトロウイルスの関与、神経変性疾患と遅発性ウイルス感染との関連性、神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明、慢性肺気腫ないし呼吸不全とウイルス感染、マイコプラズマ感染と特定疾患の関連、炎症性腸疾患に対する硫化水素産生菌の影響、潰瘍性大腸炎手術予後と細菌感染症、術後感染の予防糸状菌吸入による肺高血圧および血管構築改変の機序、IgA 腎症など進行性腎障害と感染症、に関する研究を行った。いくつかの特定疾患に関して病原微生物との関連性が示され、一部の疾患では治療に直結する知見がえられた。

### A. 研究目的

特定疾患と定義される疾患の多くは原因が不明である。感染が契機となり自己免疫疾患が発症したり、微生物の潜伏・持続感染、あるいはそれらの再活性化が原因となる可能性、さらには未知の病原体の関与も想定される。当研究班では臨床研究班と連携を図り、特定疾患を引き起こす病原体と発症機序を解明し、その結果として発症の予防あるいは効果的な治療法の開発に寄与することを目的とする。

### B. 研究方法

それぞれの研究目的に応じて、下記に示すように遺伝子組み換え病原体や培養細胞、動物感染モデル、臨床検体などを使用した。

- 1) 難治性血管炎を誘発する真菌特異的分子. マウス血管炎を惹起する *Candida albicans* のマンノース転移酵素遺伝子を網羅的に破壊したマンノース構造変異株を作製した。変異株のマンノプロテインを精製し、炎症性サイトカイン誘導能を測定した。また、血管炎の発症とマンノプロテインの構造の関係、変異株の病原性を解析した。（宮崎）
- 2) 特定疾患におけるレトロトランスポゾン及び内在性レトロウイルスの関与. 拡張型心筋症（DCM）を標的として、患者心筋における DCM 関連遺伝子の発現レベルを定量する目的で、各遺伝子のリアルタイム PCR の系の樹立を行った。また、Alu レトロトランスポゾンが DCM に関与する可能性を考慮し、抗レトロウイルス宿主蛋白 APOBEC3 ファミリーによる抑制メカニズムについての解析を試みた。（佐多）

3) 神経変性疾患と遅発性ウイルス感染との関連性. ボルナウイルスの中枢神経系病原性を解明することを目的に、i) 新規病原性機序と考えられる BDV mRNA の逆転写と宿主 DNA へのインテグレーションについて解析した。さらに、ii) BDV の病原性遺伝子 (P 遺伝子) をグリア細胞で発現するトランスジェニックマウス (P-Tg) 小脳におけるインスリン様成長因子結合蛋白質 3 (insulin-like growth factor: IGFBP3) ならびにインスリン様成長因子 (IGF) シグナルの異常について解析するとともに、P-Tg 病態との関連性について検討した。(朝長)

4) 神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明. うつ病患者やクローン病患者で特異的に発現が検出される HHV-6 潜伏感染特異的遺伝子タンパク SITH-1 をマウスの脳内で発現させ影響を検討した。発現には、アデノウイルスベクターと、レンチウイルスベクター、アストロサイト特異的なプロモーターである GFAP プロモーターを用い、SITH-1 遺伝子の発現量を検討した。マウスの異常行動の指標として尾懸垂テスト、Prepulse Inhibition テスト、Wheel running テストを行った。また、うつ症状を呈する患者における SITH-1 に対する抗体価を測定した。(近藤)

5) 慢性肺気腫ないし呼吸不全とウイルス感染. 昨年報告した肺気腫患者 60 名を対象とし、増悪時および 2 週間後の RS ウイルス血清抗体価、動脈血酸素飽和度、血中 IL-6 および可溶性 ICAM-1 を測定した。また、in vitro の実験系で、抗コリン薬であるチオトロピウムや HMG-CoA 還元酵素阻害薬がライノウイルス 14 型感染時にヒト気管上皮細胞に与える影響、マクロライドおよび喀痰調整薬によるシアル酸の発現抑制に関して検討した。(山谷)

6) マイコプラズマ感染と特定疾患の関連. *Mycoplasma fermentans* 生菌のウサギ経後脚膝蓋関節腔内投与によるリウマチ性疾患モデルを用いて解析するとともに、臨床診断

系が存在しない *M. fermentans* について、開発中の脂質抗原を用いた新規診断法の評価を行なうことを主な目的として、生菌投与ウサギによる所見の解析を行なった。(荒川)

7) 硫化水素産生菌が炎症性腸炎に及ぼす影響に関する研究. 炎症性腸炎、回腸囊肛門吻合術後の回腸囊炎に見られる炎症の程度と硫化水素産生菌数の関連を調べるため、サイバークリーンをもちいたリアルタイム PCR 検出系を開発した。(和田)

8) 糸状菌吸入による肺高血圧および血管構築改変の機序に関する解析. *Stachybotrys chartarum* の肺動脈病変形成に関する Rho キナーゼインヒビターの効果を検討するとともに、気管支肺胞洗浄液中におけるサイトカインおよび細胞の変化を検討した。肺動脈病変形成の原因物質を探索する目的で *S. chartarum* 菌体成分の抽出と二次代謝産物の分析を行った。また、肺動脈中・内膜肥厚を来した肺組織より RNA を抽出し、マイクロアレイを用いて本モデルにおける遺伝子発現パターンの変動を検索した。また、*Cladosporium* 属、*Penicillium* 属 *Aspergillus fumigatus* が *S. chartarum* と同様に肺動脈病変を形成するかどうか検討した。(渋谷)

9) 炎症性腸疾患に対する病原微生物の関与. 潰瘍性大腸炎 (UC) 患者の pouch 作成手術において、術前 1 日経口抗菌薬投与による手術部位感染 (SSI) 予防効果について、大腸癌手術と比較し、各々無作為化比較試験を行った。UC142 例と大腸癌 203 例を対象とした。手術巣感染 (SSI) の診断は National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS) の診断基準を用いた。(竹末)

10) IgA 腎症など進行性腎障害と感染症. 自然発症の IgA 腎症様病態を呈するヒト IgA 腎症モデルマウスである若年好発性高 IgA 血症マウス (HIGA マウス) 腎組織における微生物由来分子の検索を質量顕微鏡を用いて行った。また、IgA 腎症患者と非 IgA 腎症患者における扁桃組織の形態学的検討を行った。(河野)



#### (倫理面への配慮)

全ての研究は国立感染症研究所研究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。インフォームドコンセントは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。また、遺伝子組換え実験は当該施設の承認の後、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) 難治性血管炎を誘発する真菌特異的分子、ホスホマンナンと $\beta$ -1,2結合型マンノースを欠損していると推定される菌株由来のマンノプロテインは親株と比較して、マクロファージや樹状細胞からの炎症性サイトカインの誘導能が亢進し、血管炎の発症が高かった。一方で、 $\alpha$ -1,3結合型マンノースを欠損していると推定される菌株由来のマンノプロテインは親株と比較して、樹状細胞からのサイトカインの産生が低下していた。また、感染実験において $\alpha$ -1,3結合型マンノース欠損株では親株と比較して、病原性が低下していた。(宮崎)

2) 特定疾患におけるレトロトランスポゾン及び内在性レトロウイルスの関与、DCM患者心筋におけるDCM関連遺伝子の発現レベル定量のため、リアルタイムPCRの系の樹立した。また、全てのAPOBEC3ファミリー蛋白が抗Aluレトロ転移活性を有すること、またAPOBEC3GにおいてはそのN末が抗Alu活性を有すること、APOBEC3Gの二量体化が抗Alu活性に重要であることを明らかにした。(佐多)

3) 神経変性疾患と遅発性ウイルス感染との関連性。i) ヒト由来OL細胞、293T細胞ならびにイヌ由来MDCK細胞において、DNase感受性のBDV由来DNAが検出された。さらに、BDV DNAはmRNAを鋳型に逆転写により産生されていること、一部の

BDV特異的DNAは宿主細胞のゲノムにインテグレーションされていることを明らかにした。ii) P-Tg脳由来グリア細胞を用いた解析では、IGFBP3 mRNA発現の顕著な上昇が確認された。さらに、正常マウス由来神経初代培養にIGFBP3を添加したところ、神経細胞数の有意な減少が観察され、IGFBP3のアнтаゴニストであるインスリンをP-Tg由来神経初代培養に添加した場合、神経細胞の生存率に顕著な上昇が認められた。また、神経発達障害を伴う神経疾患患者群のマイクロアレイデータベースの解析を行った結果、多くの疾患でP-Tgと同様にインスリンに関するシグナル異常が認められた。(朝長)

4) 神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明。SITH-1導入マウスでは、尾懸垂テストやPrepulse Inhibitionテスト、Wheel runningテストなどの気分障害に関する検討において、異常行動を示した。SITH-1の発現量が多いとされるアデノウイルスベクターでSITH-1を発現した場合は躁うつ状態となり、SITH-1の発現量が低いと考えられるレンチウイルスベクターでSITH-1を発現した場合はうつ状態になることが示唆される結果をえた。また、うつ症状を呈する患者において、抗SITH-1抗体が効率的に検出された。(近藤)

5) 慢性肺気腫ないし呼吸不全とウイルス感染。臨床研究の結果、肺気腫増悪患者23例中4例でRSウイルス血清抗体価上昇を認めた。また、チオトロピウムおよびHMG-CoA還元酵素阻害薬は、ヒト気道上皮における感染受容体ICAM-1発現抑制を介したライノウイルス感染抑制効果、気道炎症惹起物質放出抑制効果を認めた。マクロライドおよび喀痰調整薬はインフルエンザウイルスの受容体発現抑制およびRNA進入抑制効果を有した。また、マクロライドはRSウイルス感染受容体RhoA活性化抑制を有した。(山谷)

6) マイコプラズマ感染と特定疾患の関連。

*M. fermentans* 生菌を膝蓋関節腔内投与することで、関節内リンパ球浸潤、リンパ濾胞形成や滑膜細胞の多層化を認め、ヒトの関節リウマチにおける慢性期への移行を疑わせる所見と考えた。*M. fermentans* 脂質の前投与後の生菌投与群においては、所見スコアは減少した。また、気道への生菌投与ウサギにおける肺所見を観察し、気管支周囲リンパ装置の活性化ならびに肺胞野における限局した細胞浸潤領域が多数認められた。(荒川)

7) 硫化水素産生菌が炎症性腸炎に及ぼす影響に関する研究。炎症性腸炎、回腸囊肛門吻合術後の回腸囊炎に見られる炎症の程度と硫化水素産生菌数の関連を調べるため、サイバークリーンをもちいたリアルタイム PCR 検出系を開発した。(和田)

8) 糸状菌吸入による肺高血圧および血管構築改変の機序に関する解析。*Cladosporium* 属真菌、*Aspergillus fumigatus* および *Penicillium* 属真菌の経気管的反復投与を行い、前二者では多くの菌株で *S. chartarum* と同様の肺動脈病変が形成されるものの、*Penicillium* 属菌ではこの病変が形成されないことをマウスで確認した。しかし、特定の二次代謝産物と本病変形成の直接的相関関係は見いだせなかった。*S. chartarum* の経気管的反復投与モデルで Rho キナーゼインヒビターの効果について検討を行ったところ、本病変形成が抑制された。また、本モデルにおける肺胞洗浄液中の好酸球の増加および IL-4、IL-5 の増加を認めた。(渋谷)

9) 炎症性腸疾患に対する病原微生物の関与。潰瘍性大腸炎手術では SSI 率が有意に低率(経口抗菌薬あり 4.2% vs なし 28.6%)となり、術前経口抗菌薬投与の有用性が示唆されたが、大腸癌手術では術前経口抗菌薬投与の有用性は示されなかった。(竹末)

10) IgA 腎症など進行性腎障害と感染症。IgA 腎症モデルマウスとして使用した HIGA マウスの腎組織を採取し、質量顕微鏡による検討を行った。質量分析の結果、

コントロールマウス、HIGA マウスともに腎門部血管周囲に分布のみられた分子量 905.9 の物質については、triacylglycerol と判明した。コントロールマウスと HIGA マウスにおいて質量顕微鏡にて分布に差を認めたいくつかの物質について質量分析を行ったところ、皮質周囲に分布のみられた分子量 844.6 の物質については、phosphatidylcholine と判明した。また、IgA 腎症ならびに非 IgA 腎症患者両者の扁桃においては、HE 染色にて陰窩部分に菌体と思われる部分を認めた。(河野)

#### D. 考察および今後の予定

真菌が関与する可能性のある難病として、血管炎と原発性肺高血圧症との関連について研究を行った。最も頻度の高い深在性真菌症の原因菌である *C. albicans* の細胞壁表層のマノース構造が病原因子の一つと考えられる炎症誘導能および血管炎の発症に関連することが示された。今後は、マノース構造と炎症誘導の機序について免疫学的手法を用いて明らかにする。原発性肺高血圧症との関連性が示された *S. chartarum* による肺動脈病変の形成に関しては、Rho キナーゼインヒビターにより本病変形成が抑制されたことから、病変形成における RhoA/ROCK 経路の関与が示唆された。また、本モデルにおける肺胞洗浄液中の好酸球の増加および IL-4、IL-5 の増加から Th2 免疫応答の関与が示唆された。本病変形成に関わる因子について、今後さらに検討を進める。

特定疾患におけるレトロトランスポゾン・内在性レトロウイルス及び宿主自然免疫蛋白の関与について検証することを目的とし、拡張型心筋症 (DCM) を標的として、患者心筋における DCM 関連遺伝子の 8 種類について、発現レベルを定量するためのリアルタイム PCR の系の樹立を行った。今後追加する 19 遺伝子についても同様に定量系

を樹立でき次第、臨床検体を用いた解析を開始する予定である。

神経変性疾患とボルナ病ウイルス感染との関連性に関する研究では、今年度の解析から、ボルナウイルスは感染細胞ゲノムにウイルス mRNA に由来する DNA を組み込むことが示された。実際に、ヒトをはじめとする多くの哺乳動物のゲノム内にボルナウイルスの N 遺伝子と相同性を持つ遺伝子配列が存在することも明らかとなった。ウイルス感染が宿主のゲノムに新奇性を与えるという知見は、逆転写酵素を持つレトロウイルス以外では初めての発見であり、ボルナウイルスの新規病原性の機序を示唆するものであった。ボルナウイルス持続感染に伴うウイルス遺伝子の組み込みにより宿主遺伝子の改変が起こり、細胞の機能低下を誘導する可能性があり、今後は、この点について明らかにすべく、解析を継続する予定である。さらに、BDV P-Tg マウスを用いた解析から、IGFBP3 の発現異常を介したインスリン様成長因子 (IGF) のシグナル活性の混乱が神経細胞に脆弱性を引き起こすことが明らかとなった。IGF シグナル関連分子の発現異常は、実際にいくつかの神経発達異常の患者においても確かめられた。今後は、IGF シグナルの破綻をキーワードにボルナウイルス感染と神経疾患との関連性を明らかにしたいと考えている。

HHV-6 と神経疾患に関する研究では、これまで、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 SITH-1 に対する抗体が検出されることを示してきた。今回は、この SITH-1 蛋白をマウスの脳内アストロサイトで発現させ、マウスの行動異常と関連することを示した。また、疲労因子 (FF) を同定した。FF は、末梢組織細胞において疲労刺激によって活性化し、脳へ末梢組織が疲労していることを伝えるメディエーターである炎症性サイトカインを産生させる働きを持つ。今後は、FF の発現の様式や脳機能との関係、さらに疲労と HHV-6 SITH-1 の脳機能に対する影響を分子レベル

で検討することにより、ウイルスと疲労の相互作用による気分障害や難病の発症が検討したいと考えている。

呼吸不全とウイルス感染症の研究では治療可能な方法論や病態解析を検討している。今回の結果から、RS ウイルス感染は気道炎症を惹起し肺気腫を増悪させ呼吸不全をもたらすことが示唆され、臨床病態はライノウイルス感染時と類似することが明らかになった。ライノウイルス感染に関しても、HMG-CoA 還元酵素阻害薬と長時間作用型抗コリン薬であるチオトロピウムが、ヒト気道上皮における、感染受容体 ICAM-1 発現抑制を介した効果を有していることを示し、呼吸不全に対する治療応用の可能性を示した。また、マクロライドは RS ウイルス感染受容体である活性化 RhoA と ICAM-1 の抑制を介して RS ウイルス感染を抑制していることを示唆する結果を得た。そのことから、マクロライドおよびカルボシステインは、RS ウイルス感染で悪化する乳幼児喘息様細気管支炎、気管支喘息および高齢者肺気腫増悪の治療・予防にとって画期的な医薬品になると考えられる。

関節リウマチと *M. fermentans* の関連では、生菌投与動物モデルを作製した。膝蓋関節腔内投与ウサギの関節において、滑膜細胞の多層化、リンパ濾胞形成を顕著に認め、その関節炎所見は、*M. fermentans* 脂質抗原の前投与により軽減した。今後、本モデルを用いて、関節病変の予防・治療法評価を行う予定である。

炎症性腸疾患と感染症の関連について行った研究では、炎症性腸炎、回腸囊肛門吻合術後の回腸囊炎に見られる炎症の程度と硫化水素産生菌数の関連を調べるため、リアルタイムPCR検出系を開発した。また、潰瘍性大腸炎重症患者で pouch を作成する手術を行う症例では、術前1日経口抗菌薬投与により、手術巣感染発症が有意に低率となり、予防の有用性が示唆された。

E. 健康器危険情報  
なし

F. 研究発表

1. 論文発表. 各研究分担者の項を参照。
2. 学会発表. 各研究分担者の項を参照。

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許出願中:

- 1) 出願者: 荒川宜親、佐々木裕子、松田

和洋、他

発明名称: マイコプラズマ感染症ワクチン、  
出願番号: 特願 2009-135592 号

- 2) 出願者: 山谷睦雄、安田浩康、佐々木英忠

発明名称: ライノウイルス感染予防剤  
出願番号: 特願 2004-98995 号

2. 実用新案登録  
なし。

3. その他  
なし。

## II. 分担研究報告書

## 1. 難治性血管炎を誘発する真菌特異的分子に関する研究

研究分担者 宮崎義継 (国立感染症研究所 生物活性物質部)

研究協力者 金城雄樹、大川原明子、山越 智、梅山 隆、  
樽本憲人、大野秀明 (国立感染症研究所 生物活性物質部)  
渋谷和俊、下平佳代子 (東邦大学医学部病院病理学講座)

研究要旨 *Candida albicans*の細胞壁成分であるマンノプロテイン・ $\beta$ グルカン複合体がマウス血管炎誘発に関与することが報告されている。血管炎を誘発するマンノース構造の同定を目的として、マンノース転移酵素と想定される遺伝子の破壊株を作製した。ホスホマンナンと $\beta$ -1,2結合型マンノースを欠損していると推定される菌株由来のマンノプロテインは親株と比較して、マクロファージや樹状細胞からの炎症性サイトカインの誘導能が亢進し、マウスにおける血管炎の発症率が高ったことから、マンナンの構造と血管炎の発症に関係性があることが示唆された。一方で、 $\alpha$ -1,3結合型マンノースを欠損していると推定される菌株由来のマンノプロテインは親株と比較して、樹状細胞からの炎症性サイトカインの産生が低下していた。またマウスを用いた感染実験において、 $\alpha$ -1,3結合型マンノース欠損株では親株と比較して、病原性が低下していた。

### A. 研究目的

*Candida albicans*の細胞壁可溶成分であるマンノプロテイン・ $\beta$ グルカン複合体がマウス血管炎誘発に関与することが報告されているが、炎症惹起の原因分子は明らかになっていない。

*C. albicans*細胞壁のマンノース構造として、定常状態における表層部を $\beta$ -1,2結合型マンノースが、深層部を $\alpha$ -1,2結合型マンノースが構成すると推定される。また、 $\alpha$ -1,3結合型マンノースは表層付近に存在すると考えられている。しかし、増殖期や特殊な栄養状態では細胞壁構造が定常期と異なっており、その際に生成される特殊なマンノース構造が炎症を誘導するという仮説をたてた。

これを検証するために、定常状態と異なる

マンノース構造を材料として安定的に得るため、マンノース転移酵素の遺伝子と推定される遺伝子について網羅的に破壊株を作成した。遺伝子破壊株由来のマンノプロテインによるマクロファージや樹状細胞のサイトカイン産生や血管炎の発症率の解析及び、病原性の検討を行った。

### B. 研究方法

1. *C. albicans*のマンノース転移酵素候補遺伝子：*Saccharomyces cerevisiae*においてmannosyl-transferase活性が確認されている遺伝子に相同性を有する*C. albicans*遺伝子をデータベースから検索した。
2. *C. albicans*遺伝子の破壊：*C. albicans*

CAUR4000 株 (*Δura3, Δarg4*) を用いて、それぞれの標的遺伝子 ORF の上流領域と下流領域を増幅しマーカー遺伝子に ligation した DNA 断片により形質転換に使用した。URA3 マーカーを用いて一方の相同染色体部位を破壊した後に、同様な手順で ARG4 マーカーにより他の locus を破壊し欠損株を得た。

3. *C. albicans* 遺伝子相補株の作製：遺伝子破壊株 ( $\Delta$ -URA3/ $\Delta$ -ARG4) より URA3 マーカーを脱落させて、5-FOA でウリジン要求性株を選択した。遺伝子全長および URA3 マーカーを含む DNA 断片を PCR で増幅し、ウリジン要求性株 ( $\Delta$ / $\Delta$ -ARG4) を宿主として形質転換を行い、遺伝子相補株 ( $\Delta$ -ARG4/+URA3) を作製した。また、URA3 マーカーだけを増幅した DNA 断片を並行して形質転換を行い ( $\Delta$ -ARG4/ $\Delta$ -URA3)、比較対象株として用いた。

4. マンノプロテイン精製：*C. albicans* 親株あるいは変異株をウリジン添加 YPD 培地、30℃で一晩、前培養し、本培養 48 時間後に遠心して集菌した。生理食塩水、水で順次洗った後、125℃、90 分オートクレーブを 2 回行い菌体成分を抽出した。抽出液を 3 倍量のメタノールに滴下・混和し、一晩攪拌した。生成した沈殿を水に溶かし、透析を行って低分子物質を除去した後、SpeedVac にて乾燥し冷蔵保存した。

5. サイトカイン誘導能：マウス腹腔マクロファージ、骨髄由来樹状細胞またはヒトモノサイトを各々の変異株由来マンノプロテインにより刺激し、培養液中のサイトカイン量を 24 時間後に測定した。

6. 血管炎：親株または CAMN1105 のマンノプロテインを 5 日連日投与し、4 週後に心臓と大動脈を摘出し、病理学的検討を行った。

7. 病原性（感染実験）：親株または CAMN1007 をマウスに静脈感染させ、生存期間を調べた。また、感染 3 日後の腎臓の臓器内菌数を測定した。

(倫理面への配慮)動物実験にあたっては、国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得て、動物愛護の指針にもとづいて行った。

### C. 研究結果

#### 1. マンノース転移酵素候補遺伝子破壊と相補株の作成：

昨年報告したように、CAUR4000あるいはMNN41217を親株として遺伝子破壊を行った。MNN41217から候補遺伝子を破壊した株としてCAMN1101～CAMN1105をえた。CAUR4000からマンノース転移酵素をコードすると推定される遺伝子を破壊し、CAMN1001～CAMN1014をえた。また、CAMN1007株の遺伝子相補株CAMN1201株と比較対象株CAMN1202株を作製した（表1）。

表1 本研究で作製した遺伝子破壊株と遺伝子相補株（本報告書と関係する株のみ記載）

株番号	特徴
CAUR4000	wild type (WT)
CAUR6000	wild type (WT)
MNN41217	phosphomannann の欠損と推定
CAMN1105	phosphomannann, $\beta$ 1,2 の欠損と推定
CAMN1007	$\alpha$ 1,3 mannose の欠損と推定
CAMN1201	CAMN1007 の遺伝子相補株
CAMN1202	CAMN1007 の比較対象株

#### 2. $\beta$ 1,2結合型マンノースの有無とサイトカイン産生：

$\beta$  1,2結合型マンノースとホスホマンナン欠損と推定されるCAMN1105のマンノプロテインは、親株 (WT) やホスホマンナン欠損株と比較して、マウスマクロファージ及びヒトモノサイトからのIL-6誘導能が高い傾向を認めた (図1, 2)。同様に、マウス樹状細胞からの IL-12p40誘導能が高い傾向を認めた (図3)。

図1 マウスマクロファージのIL-6産生

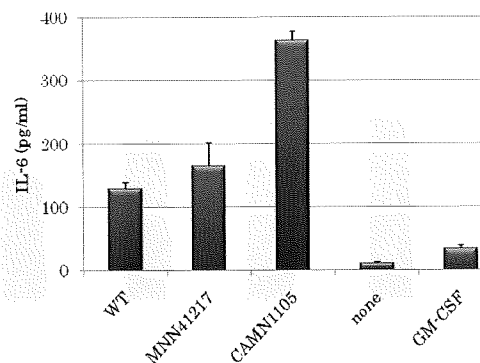


図2 ヒトモノサイトのIL-6産生

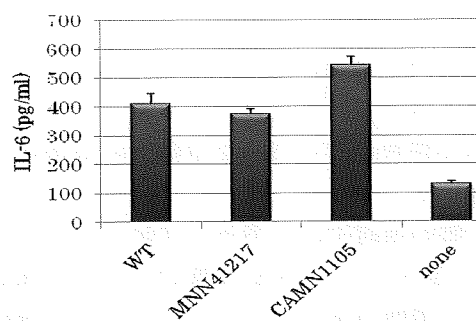
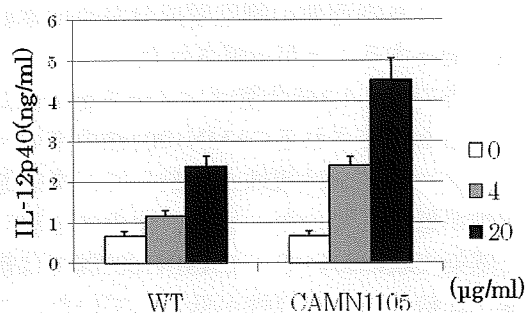


図3 マウス樹状細胞のIL-12p40産生



### 3. 血管炎：

CAMN1105のマンノプロテインを投与したマウスでは、大動脈から冠動脈分岐部にかけて血管炎を認めた。一方で、親株のマンノプロテインを投与したマウスでは、血管炎を認めなかった。

図4 血管炎の病理所見（弾性線維・マッソン染色）



大動脈（図の中央上方に位置する）壁に中膜弾性線維の著明な断裂を伴う炎症細胞（単核球及び多核球）の浸潤と線維芽細胞の増生を認める。

### 4. α1,3結合型マンノースの有無とサイトカイン産生：

α1,3結合型マンノースの欠損と推定されるCAMN1007のマンノプロテインは、WTと比較して、マウス樹状細胞からのIL-6（図5）及びIL-12p40（図6）誘導能が低い傾向を認めた。

図5 マウス樹状細胞のIL-6産生

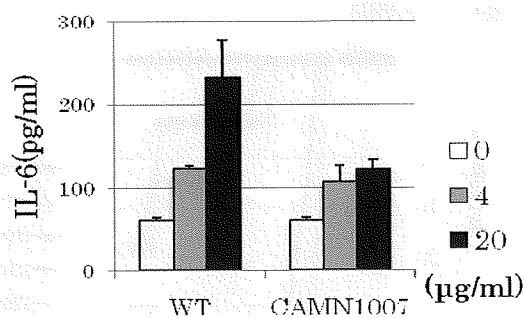




図6 マウス樹状細胞のIL-12p40産生

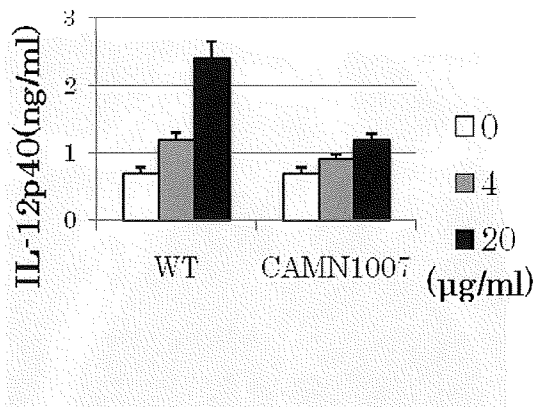
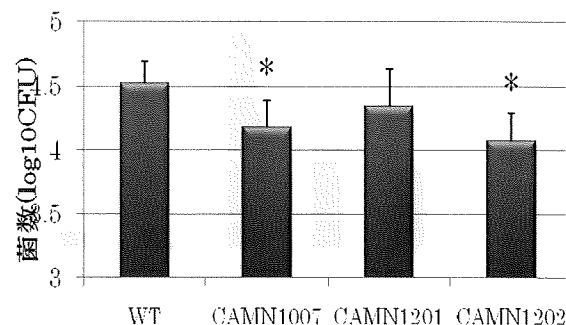


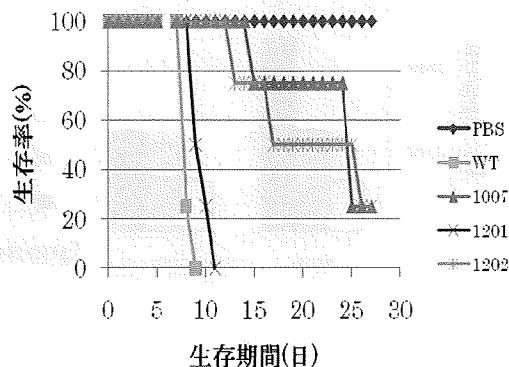
図8 腎臓内菌数



5. 病原性：

CAMN1007株とWTをマウスに感染させ、感染後の生存期間を調べたところ、CAMN1007株感染マウスではWT感染マウスと比較して、生存期間の延長を認めた(図7)。遺伝子相補株であるCAMN1201株では、WTと同様に生存期間が短く、比較対象株CAMN1202株ではCAMN1007株と同様に生存期間が延長した(図7)。また、感染3日後の腎臓内菌数を調べたところ、親株や遺伝子相補株CAMN1201株と比較して、CAMN1007株及び比較対象株CAMN1202株では菌数が少なかった(図8)。

図7 生存期間



D. 考察

血管炎の誘発に關与する*C. albicans*マンノース構造の同定を目的として、マンノース転移酵素と想定される遺伝子の破壊株を作成した。

今回の検討では、ホスホマンナンとβ-1,2結合型マンノースを欠損していると推定される菌株由来のマンノプロテインは親株と比較して、炎症惹起性が高く、投与マウスにて血管炎を発症した。そのことから、*C. albicans*細胞壁表層のβ-1,2結合型マンノースより内面側の細胞壁成分が炎症惹起性に關与することが示唆された。

一方で、α-1,3結合型マンノースを欠損していると推定されるCAMN1007株由来のマンノプロテインは親株と比較して、炎症惹起性が低下していた。また、マウスを用いた感染実験において、CAMN1007株では親株と比較して、病原性が低下していた。これらの結果より、生体によるカンジダの認識、及び炎症反応において、α-1,3結合型マンノースが關与する可能性が考えられた。

E. 結論

今回の解析により、マンナンの構造と炎症惹起性、血管炎の発症が關与する事が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表  
論文発表

1. Miyazaki T, Yamauchi S, Inamine T, Nagayoshi Y, Saijo T, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Roles of calcineurin and Crz1 in antifungal susceptibility and virulence of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*. doi:10.1128/AAC.01364-09. 2010.
2. Kaneko Y, Ohno H, Fukazawa H, Murakami Y, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Anti-*Candida*-biofilm activity of micafungin is attenuated by voriconazole but restored by pharmacological inhibition of Hsp90 related stress responses. *Medical Mycology*, doi:10.3109/13693780903426721. 2010.
3. Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. The effects of an hsp90 inhibitor on the paradoxical effect. *Jpn J Infect Dis*. Sep;62(5):392-3. 2009

学会発表

1. 大川原明子、山越 智、金子幸弘、大野秀明、宮崎義継. *C. albicans* 細胞壁表層のマンナン構造の違いによる初期免疫応答の解析. 第 83 回日本感染症学会 4 月 23 日-24 日 東京
2. 奥村彰規、大川原明子、山越 智. ガ

ラクトサミン/LPS 肝障害モデルを用いた LECT2 の機能解析. 第 39 回日本免疫学会 12 月 2 日-4 日 大阪

3. Ishida-Okawara A, Ohno H, Yamagoe S, Kaneko Y, Niimi M, Miyazaki Y. Evaluation of Mycological Character and Early Immune Response against Different Structures of Cell Surface Mannan of *Candida albicans*. 109th General meeting of American Society for Microbiology, May 17-21, Philadelphia
4. Ishida-Okawara A, Ohno H, Yamagoe S, Kaneko Y, Niimi M, Miyazaki Y. Characterization of mycological features of putative  $\alpha$ -type mannosyltransferase deleted *Candida albicans*. 17th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, May 25-29, Tokyo
5. Miyazaki Y. Antifungal Agent Update : Candins. 26th International Congress of Chemotherapy and Infection. Toronto, Canada.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。  
特許取得  
なし。  
実用新案登録  
なし。  
その他  
なし。

## 2. 特定疾患におけるレトロトランスポゾン及び内在性レトロウイルスの関与

研究分担者 佐多 徹太郎 (国立感染症研究所 感染病理部)

研究協力者 徳永 研三 (国立感染症研究所 感染病理部)

**研究要旨** 特定疾患におけるレトロトランスポゾン・内在性レトロウイルス及び宿主自然免疫蛋白の関与について検証することを目的とし、本年度はまず拡張型心筋症 (DCM) を標的として、患者心筋における DCM 関連遺伝子の発現レベルを定量すべく、各遺伝子のリアルタイム RT-PCR の系の樹立を行った。また既に報告されている LINE-1 に加えて Alu レトロトランスポゾンが DCM に関与する可能性を考慮し、以前我々が実施した LINE-1 レトロトランスポゾンの *in vitro* 実験系を応用した Alu レトロトランスポゾンの実験系を用いて、抗レトロウイルス宿主蛋白 APOBEC3 ファミリーによる抑制メカニズムについての解析を試みた。その結果、全ての APOBEC3 ファミリー蛋白が抗 Alu レトロ転移活性を有すること、また APOBEC3G においてはその N 末が抗 Alu 活性を有すること、APOBEC3G の二量体化が抗 Alu 活性に重要であること等を明らかにした。

### A. 研究目的

HIV-1 の様なモダン・レトロウイルスの原型と考えられているレトロトランスポゾンのうち、non-LTR 型である LINE-1 及び Alu は、それぞれヒトゲノムの 17%、11% を占める。活性化型 LINE-1 は血友病や筋ジストロフィー他、Alu は神経線維腫症、ハンチントン病他の遺伝子疾患の原因である一方で、LINE-1 は結腸癌を、Alu は B リンパ種をも引き起こすことから、両レトロトランスポゾンの転移は、生殖細胞のみならず体細胞でも起こり得ることが示唆されている。従って正常細胞においては、恒常的にこのレトロ転移を抑制する機構が存在する筈で、実際に我々は以前、抗レトロウイルス宿主蛋白 APOBEC3 ファミリーが抗 LINE-1 レトロ転移活性を有することを報告した。本年度、我々は Alu のレトロ転移に対する APOBEC3 ファミリー蛋白の抑制活性の有無を分子レベルで検証した。

拡張型心筋症 (Dilated cardiomyopathy, DCM) は、心室内腔の拡大と収縮不全により心不全を生ずる原因不明の心筋疾患である。遺伝子異常による DCM は、特定の遺伝子の変異・欠損による蛋白の発現不全・機能異常が原因とされており、原因遺伝子としてジストロフィン遺伝子、デス

ミン遺伝子、ラミン A/C 遺伝子等が

報告されている。特にジストロフィン遺伝子は、全ヒト遺伝子の中で最長の pre-mRNA を発現するため、LINE-1 または Alu の格好のターゲットとなり得る。実際、LINE-1 の挿入によるジストロフィン遺伝子欠損が DCM の原因となっているケースも報告されていることから、Alu の遺伝子挿入の可能性も含め、ジストロフィン遺伝子を初めとする DCM 関連遺伝子へのレトロトランスポゾンの転移の可能性及び APOBEC3 ファミリーによる防御の有無を検討することを本研究の目的とする。

### B. 研究方法

1. DNA コンストラクト : APOBEC3G の N 末端側からアミノ酸 150 番目まで 30 アミノ酸ずつ削った 5 種類の欠失変異体シリーズ (pA3G-N-30、-N-60、-N-90、-N-120 及び -N-150) を作製した。また APOBEC3G の二量体化不全変異体 (pA3G-C97/100A) 及び脱アミノ化不全変異体 (pA3G-E259Q) を QuikChange mutagenesis (Stratagene) により作製した。各々のプラスミドからの蛋白発現は、293T 細胞にトランスフェクション後、得られた細胞溶解液を用いてウエスタンブロット法により確認した。

2. LINE-1 レトロ転移アッセイ：ネオマイシン耐性遺伝子(neor) レポーターAlu 発現ベクターpBS Ya5 neoTET (T. Heidmann より分与) 3 µg、LINE-1 ORF2 発現ベクターpBudORF2opt (A.M. Roy-Engel より分与) 1 µg、APOBEC3 ファミリー発現ベクター1 µg、(陰性対照として GFP 発現ベクターのみ)をFuGENE6を用いて2 x 10<sup>5</sup>個のHeLa細胞にトランスフェクションした。3日後、0.4 mg/mlのG418存在下で14日間培養、レトロ転移の結果発現してきたneorによりG418耐性で生き残った細胞は、クリスタル・バイオレット(Merck)で固定・染色したコロニーをカウントすることにより定量比較した。

3. Real-time RT-PCR：段階希釈した標的遺伝子断片(LINE-1、APOBEC3A、3B、3C、3DE、3F、3G、3H及びGAPDH、今後更に19種類のDCM関連遺伝子を追加予定)を有するプラスミドとそれぞれのプライマーとプローブ、QuantiTect Multiplex RT-PCR(Qiagen)を用いてMx3005P(Stratagene)によるReal-time RT-PCRで高直線性の標準曲線を描けるか否かを検討した。

(倫理面への配慮)

患者検体を用いる来年度以降の実験にあたり、国立感染症研究所・ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会において、平成21年5月11日付け承認番号187により承認を得た。また遺伝子組換え実験は、国立感染症研究所・組換えDNA実験安全委員会において、平成21年10月26日付け承認番号・機21-74により承認を得たプロトコールに従って行われた。

### C. 研究結果

1. APOBEC3 ファミリー蛋白のAlu レトロトランスポゾンに対する抑制効果 APOBEC3 ファミリー蛋白による抗Alu レトロトランスポゾン活性を、レポーターAlu 発現ベクターpBS Ya5 neoTETを用いて検討した。このコンストラクトにおいては、全長のAluの下流にneorが逆向きに、更にその下流にSV40プロモーターが逆向きに挿入してあり、またneorそのものがβグロブリンのイントロンで分断されている為、neorの発現は、転写・スプライシング・逆転写・インテグレーションが完結して初めて起

る(つまりneor陽性細胞、即ちG418処理後の生き残り細胞のコロニーは、Aluのレトロ転移が起きた細胞である)。このAluコンストラクトとLINE-1 ORF2発現ベクターpBudORF2opt及びAPOBEC3発現ベクターのHeLa細胞へのコトランスフェクションの3日後、14日間G418存在下で培養、生き残り細胞の染色後のコロニーをカウントした結果、APOBEC3A、3B、及び3Gが特に強い抑制活性を示し、APOBEC3C、3DE、及び3Hもpartialな活性を示した。これらの結果より、全てのAPOBEC3ファミリー蛋白は、強弱の差はあれ、Aluのレトロ転移を抑制する活性を有していることが明らかになった。

2. APOBEC3Gの抗Alu活性に関わる責任領域の同定 上記の実験でAPOBEC3ファミリー蛋白は全てAluに対して抑制活性を持つことが分かったが、この中でAPOBEC3Gに焦点を絞り、その抗Alu活性に関わる責任領域を同定することを試みた。APOBEC3GのN末から順に30アミノ酸ずつ150番目まで欠失させた変異体を5種類作製して、まずそれぞれのプラスミドのトランスフェクション後の細胞溶解液を用いて、ウエスタンブロットにより蛋白の発現を確認した。その結果、どの変異体も同レベルで、予想される分子量の位置にバンドが認められた。これらの変異体を用いてAluレトロ転移アッセイを行った結果、A3G-N-30はpartialに抗Alu活性を失い、更にA3G-N-120で完全にその活性が消失することが分かった。即ち、N末端30アミノ酸及びアミノ酸番号91-120の二つの領域が抗Alu活性の責任領域であることが明らかになった。

3. 点変異導入によるAPOBEC3Gの抗Alu活性に関わる責任アミノ酸の検索 上記責任領域2箇所のうち、アミノ酸番号91-120の領域には、これまでに97番目と100番目のシステインがAPOBEC3Gの二量体化に関わることが報告されてきた。また上記の変異体を用いた実験においては、C末領域、特に脱アミノ反応に必須な領域として知られるC末シチジン脱アミノ化領域(C-CDA)の重要性については未検証であることから、我々は、APOBEC3Gの二量体化能を欠く変異体(C97/100A)及び脱アミノ化能を持た