

ない変異体 (E259Q) を作製した。ウエスタンブロットにより蛋白の発現を確認した後、Alu レトロ転移アッセイにより、APOBEC3G 変異体の抗 Alu 活性を検討した。その結果、まず C97/100A 変異体については、実験結果 2 に矛盾せず partial な抗 Alu 活性の消失を示したことから、APOBEC3G のアミノ酸番号 91-120 の領域においては二量体化能が抗 Alu 活性に重要である可能性が示唆された。また E259Q 変異体では完全に抗 Alu 活性を維持していたことから、以前我々が LINE-1 において報告したケースと同様に、Alu においても、APOBEC3G は脱アミノ化能とは異なる機能によりレトロ転移を抑制していることが明らかになった。

4. Real-time RT-PCR による DCM 関連遺伝子及び宿主自然免疫関連蛋白の mRNA 定量系の樹立
来年度以降、患者検体から抽出した RNA を用いて DCM 関連遺伝子群と宿主自然免疫関連蛋白の遺伝子発現を Real-time RT-PCR により定量していくが、今年度はまず、LINE-1 及び APOBEC3 ファミリー蛋白、計 8 種類の mRNA 発現の定量系の樹立を試みたところ、全ての遺伝子において、直線性の高い標準曲線を描くことができた。

D. 考察

今年度はまず、宿主自然免疫蛋白によるレトロトランスポソンの抑制メカニズムについて解析を進めた。我々は以前、Non-LTR レトロトランスポソン LINE-1 に対する抗レトロウイルス宿主蛋白 APOBEC3 ファミリーの抑制活性について報告した (Kinomoto et al. *Nucleic Acids Res.* 35:2955-64. 2007) が、本研究において、同様の活性が Alu レトロトランスポソンに対しても認められるか否かについての検証を試みた。その結果、全ての APOBEC3 ファミリー蛋白は Alu に対して、程度の違いはあるもののレトロ転移抑制活性を示した。特筆すべきこととして、APOBEC3 間の抗 Alu 活性が、以前我々が報告した抗 LINE-1 活性とほぼ平行であったことである。Alu の転移が本来 LINE-1 に依存することを前提にすると、今回の結果から、APOBEC3 ファミリー蛋白の抗 Alu 活性が抗 LINE-1 活性に依存する可能性がまず一義的に挙げられる。しかしながら、今回の Alu レトロ転移実験においては、全長の LINE-1 プラス

ミドは用いておらず、LINE-1 ORF2 発現ベクターのみを使用しているため、APOBEC3 ファミリー蛋白が LINE-1 ORF2 と相互作用することにより、Alu に対して抑制的な効果を示すのかもしれない。その逆の可能性として、APOBEC3 ファミリー蛋白の抗 LINE-1 活性が抗 Alu 活性に依存することも考えられ、これら両方の可能性について今後検証していく予定である。

APOBEC3 ファミリー蛋白がどのようなメカニズムで Alu の転移を抑制しているかについて検討する為に、次に APOBEC3 ファミリーのうちで最も分子レベルで研究が進み立体構造も明らかになってきている APOBEC3G を標的とし、その N 末側欠失変異体を複数作製して解析を進めた。その結果、APOBEC3G のアミノ酸番号 1-30 及び 91-120 の両領域が抗 Alu 活性に重要であることが分かった。後者の領域が責任領域であるという結果は、この領域に APOBEC3G の二量体化能を決定するアミノ酸があり、しかもその二量体化が抗 Alu 活性に重要であるという先頃のスイスのグループによる報告 (Bulliard et al. *J. Virol.* 83: 12611-21) に矛盾しない。実際、我々が引き続き行った APOBEC3G 点変異体を用いた実験においても、二量体化不全変異体 C97/100A は抗 Alu 活性を partial に失う結果が得られたことから、やはり APOBEC3G の Alu 転移抑制における最大活性には、APOBEC3G の二量体化が必要であることが明らかになった。一方で、今回の変異体実験の結果において意外だったのは、これまで APOBEC3G の機能に重要な領域とは見なされていなかった N 末端 1-30 アミノ酸の欠失が抗 Alu 活性を減弱させたという事実である。この領域の欠失が構造上、APOBEC3G の二量体化に影響を与える可能性も充分考えられる。が、APOBEC3G の脱アミノ化不全変異体 E259Q が完全に抗 Alu 活性を維持していた事実、即ち APOBEC3G が脱アミノ化に依らない未知の抑制活性 (逆転写抑制活性?) を有する可能性と併せて考えて、アミノ酸番号 1-30 の領域に未知の機能をもった配列があるか否かを今後検討していきたい。

DCM については、これから臨床検体入手するところであるが、今年度はまず、今後解析予定の 8 種類の標的遺伝子群についてそれら遺伝子発現の定量系の一部を樹立した。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。

E. 結論

LINE-1 と共に多くの遺伝子疾患に関わるとされるレトロトランスポゾン Alu が、抗レトロウイルス宿主因子 APOBEC3 ファミリー蛋白全種類によって転移抑制を受けることを見出した。そのうち APOBEC3G の抗 Alu 活性についてはアミノ酸番号 1-30 及び 91-120 が責任領域であ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

論文発表

1. Iwabu, Y., Fujita, H., Kinomoto, M., Kaneko, K., Ishizaka, Y., Tanaka, Y., Sata, T., and Tokunaga, K. HIV-1 accessory protein Vpu internalizes cell-surface BST-2/tetherin through transmembrane interactions leading to lysosomes. *J. Biol. Chem.* 284: 35060-72. 2009.

学会発表

1. 池田輝政、徳永研三、佐多徹太郎、原田信志、小糸厚：哺乳類 APOBEC1 による内在性レトロエレメント LINE-1 の阻害. 第 57 回日本ウイルス学会総会 (東京) 2009. 10.

2. 池田輝政、徳永研三、佐多徹太郎、原田信志、小糸厚：哺乳類 APOBEC1 による内在性レトロエレメント阻害. 第 32 回日本分子生物学会 (横浜) 2009. 12.
3. 小山貴芳、徳永研三、佐多徹太郎、石坂幸人：レンチウイルスベクターをヒよる内在性レトロエレメント阻害. 第 32 回日本分子生物学会 (横浜) 2009. 12. トゲノムの特定領域に挿入させる技術の開発. 第 32 回日本分子生物学会 (横浜) 2009. 12
4. Yukie Iwabu, Hideaki Fujita, Masanobu Kinomoto, Keiko Kaneko, Yukihito Ishizaka, Yoshitaka Tanaka, Tetsutaro Sata, and Kenzo Tokunaga (presenter): The 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2010). San Francisco, USA, 2010. 2.
5. Ikeda, T., Tokunaga, K., Maeda, K., Sata, T., Sakaguchi, N., Harada, S., Heidmann, T., and Koito, A. Intrinsic Restriction Activity by APOBEC1 against the Mobility of Autonomous Retrotransposons: The 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2010). San Francisco, USA, 2010. 2.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

3. 神経変性疾患と遅発性ウイルス感染との関連性

分担研究者 朝長 啓造 (大阪大学微生物病研究所 ウイルス免疫分野)
研究協力者 本田 知之、堀江 真行
(大阪大学微生物病研究所 ウイルス免疫分野)

研究要旨 ボルナ病ウイルス (BDV) は、ヒトなど多くの哺乳動物での感染が確認されている中枢神経系への持続感染を特徴とする RNA ウイルスである。これまでの疫学調査は、BDV 感染と神経疾患との関連性を示唆しているが確定的な証拠はいまだ得られていない。私たちは、神経変性疾患であるパーキンソン病やアルツハイマー病患者の剖検脳において BDV 遺伝子が検出されることを報告してきた。本研究は、難治性疾患である神経変性疾患の発症に関わるボルナウイルスの役割を明らかにすることを目的に進められた。平成 21 年度は、以下の点を中心に研究を行った。(1) BDV ならびにボルナウイルス科に属する鳥由来ボルナウイルスのヒトへの感染を明らかにするために血清疫学調査を実施した。(2) 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) の発現により影響を受ける宿主遺伝子を同定し、BDV の神経病態の発症機序について分子レベルの解析を行った。本年度の成果により、神経変性疾患とボルナウイルス感染との関連性について、今後より詳細な追究が可能になると考えられる。

A. 研究目的

ボルナウイルス科に属するボルナ病ウイルス (Borna Disease Virus: BDV) は、中枢神経系に強い感染性を示すマイナス鎖一本鎖の RNA ウイルスである。これまでの疫学研究では、ヒトをはじめとするさまざまな哺乳動物での BDV 感染が確認されている。BDV は神経細胞に持続感染し、遅発性に神経病態を誘導すると考えられている。わが国では、家畜を中心とする動物で BDV 感染に起因する神経疾患が発見されている。一方、ヒトにおいても神経疾患患者で BDV 特異抗体の高い保有率が報告されている。私たちはこれまでに、パーキンソン病や統合失調症患者の剖検脳から BDV 遺伝子の検出に成功している。このことは、BDV 感染が原因不明の神経疾患

の発症に関与する可能性を示唆している。

近年、神経症状を呈した鳥において BDV に近縁でボルナウイルス科に属する新たなウイルス、鳥ボルナウイルス (Avian bornavirus: ABV) が発見された。わが国においてもオウム類を中心とするペットの鳥において ABV 感染が確認されている。これまで、ABV の感染は鳥のみで観察されているが、実験的には哺乳動物への感染も示唆されており、人獣共通感染症としての危険性も懸念されている。

ボルナウイルスは幅広い宿主域を持ち、多くの動物に神経疾患を誘導することが知られている。しかしながら、ヒトの神経疾患発症との関連性については詳細な検討がなされていない。本研究は、神経変性疾患を中心とする神経疾患発症へのボルナウイルス感

染の関与を明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

1. ボルナウイルスに関する疫学調査：

精神疾患患者 101 名、健常者 47 名の血清を用いて（大阪府大阪府立急性期・総合医療センター倫理委員会承認済）、ABV、特に BDV を遺伝的に近縁である 5 型 ABV（ABV5）のリン酸化（P）蛋白質に対する特異抗体について、ウェスタンブロット法ならびにラジオリガンド法を用いて検出を行った。経時的な採血が可能な患者では、IgG ならびに IgM クラス抗体について抗体価の推移を観察した。また、大阪大学医学部附属病院小児科外来受診中患児の血清を収集し（大阪大学医学部倫理委員会承認済：#09069）、疫学調査に向けた準備を行った。

2. BDV の病原性解析：

i) ボルナウイルスの新規病原性の検討：

BDV mRNA の DNA への逆転写を明らかにするために、BDV が持続感染した様々な哺乳類細胞より DNA を抽出し、DNase あるいは RNase で処理したのちに特異的プライマーを用いて PCR を行った。また、宿主ゲノムへの BDV mRNA のインテグレーションを Alu-PCR 法にて検出した。さらに、inverse PCR 法を用いて、宿主ゲノムにおけるインテグレーション部位を同定した。一方、哺乳動物ゲノムにおけるボルナウイルス様配列の存在を遺伝子データベース（NCBI）を用いて解析した。

ii) マウスモデルを用いた中枢神経系病態の発症機構解析： 昨年度に cDNA マイクロアレイを用いて明らかにした BDV P 遺伝子の発現により影響を受けるグリア細胞由来遺伝子群のうち、インスリン様成長因子結合蛋白質 3（insulin-like growth factor: IGFBP3）に着目し解析を行った。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 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を行った。

C. 研究結果

1. ボルナウイルスに関する疫学調査：

大腸菌を用いて発現させた組換え ABV5 P 蛋白質を用いたウェスタンブロットを行った（図 1）。その結果、8 検体中 2 検体において強い陽性反応が観察された（図 1 矢印）。また、2 検体において弱い反応性が認められたが、その特異性に関しては確認できなかった。一方、ラジオリガンド法を用いて ABV5 P に対する反応性を解析した結果、患者 101 人中 15 人（14.9%）で陽性を示した。一方、健常者においても 47 人中 7 人（14.9%）で抗体陽性を示し、抗体陽性率では患者と健常者との間に差は認められなかった。また、BDV P 抗体陽性を示した検体では ABV5 P 抗体陽性になる率が有意に高く、BDV と ABV5 の P

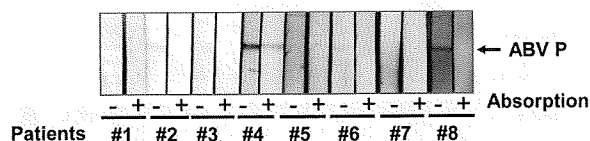


図1. ウェスタンブロット法によるABV P抗体の検出。組換え ABV P 抗原を用いて、100倍希釈した患者血清と反応を行った。ABV P に対する特異的反応の位置を矢印で示す。

抗原に対する抗体の交差反応が示唆された。

経時的な採血が可能であった患者については、ABV5 P 抗原に対する IgG ならびに IgM クラス抗体の変化を観察した。その結果、IgG クラス抗体が高く推移する患者に加えて、IgG 抗体は低いものの、IgM クラス抗体を 7 年間わたり高く維持している患者が確認された（図 2、#B）。

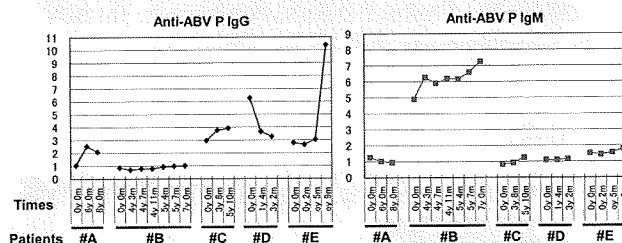


図2. ABV抗体価の経年推移。ABV P 抗原に対するIgGならびにIgM抗体の経年推移をラジオリガンド法にて解析した。

2. BDV の病原性解析

i) ボルナウイルスの新規病原性の検討：

BDV が持続感染した様々な哺乳類由来細胞より DNA を抽出して、BDV 特異的 DNA の存在を確認した。その結果、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 (図 3a)。一方、サル由来 Vero 細胞ならびにラット由来 C6 細胞では確認されなかった (図 3a)。また、検出された BDV DNA は mRNA を鋳型に逆転写により産生されていることが示された (図 3b)。Alu-PCR 法を用いて解析した結果、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が明らかとなった。また、inverse PCR 法により、インテグレーション部位の決定も行われ、BDV 由来 DNA が宿主ゲノムにインテグレーションされることが証明された。

ボルナウイルスの mRNA に由来する DNA 配列が宿主ゲノムにインテグレーションされるという現象は、様々な哺乳類ゲノムに BDV の N 遺伝子にきわめて相同性が高い遺伝子配列が存在することからも証明され、ボルナウイルスは持続感染により宿主ゲノムに遺伝的な新奇性をもたらす可能性が示さ

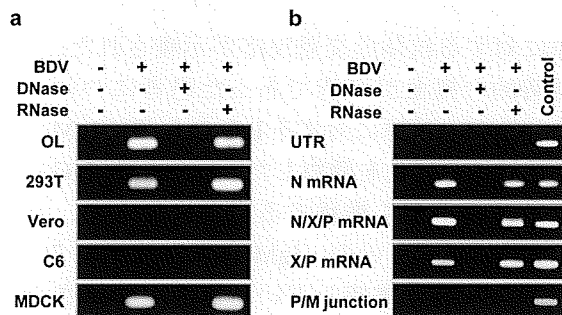


図3. 感染細胞におけるBDV DNAの検出。(a) 哺乳類由来細胞を用いてN遺伝子特異的なPCRを行った。(b) BDV由来DNAはmRNAの産生と相関して検出された。

れた。

ii) マウスモデルを用いた中枢神経系病態の発症機構解析：

昨年度の成果により、BDV P 遺伝子を発現

したグリア細胞において 68 個の遺伝子の有意な発現変化が示されている。今年度は、その中でインスリン様成長因子結合蛋白質 3 (IGFBP3) に着目して解析を行った。リアルタイム PCR の結果、P-Tg 脳由来グリア細胞における IGFBP3 mRNA 発現の顕著な上昇が確認された。また、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た。また、IGFBP3 のアンタ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結果、神経細胞の生存率に顕著な上昇が認められた。一方、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

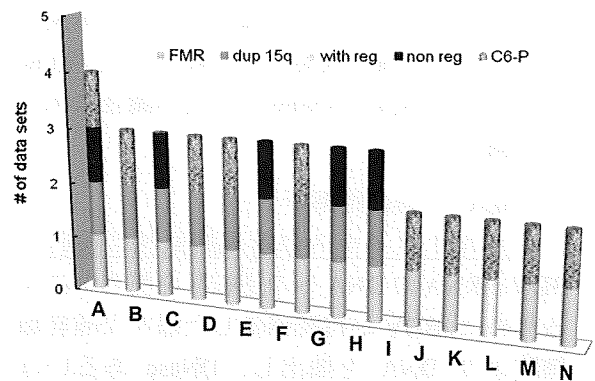


図4. 発達障害患者脳におけるデータベース解析。各種発達障害患者ならびにBDV P遺伝子発現C6細胞(C6-P)を用いたマイクロアレイ解析で見られたシグナル異常の出現頻度を示した。横軸は各シグナルを示す(具体的なシグナルは記載しない)。ただし、AはIGFシグナルを示す。多くの疾患ならびにP遺伝子発現により共通してIGFシグナルの異常がみられる。

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ることが明らかとなった (図 4)。

D. 考察

ヒトにおいて ABV5 に対する抗体を検出した。しかしながら、今回の解析では神経疾患患者と健常人との間に抗体陽性率に顕著な差は認められず、疾患とボルナウイルス感染との関連性は明らかにされなかった。一方、BDV と ABV5 の P 抗原に対する抗体の交差反応が示唆された。今後、ABV に対する特異的抗体を検出するためには、検出抗原の種類

や発現部位を検討する必要であると考えられた。さらに、今回の解析において、ボルナウイルスに対する抗体価の経年推移も観察された。この成果は、今後、ボルナウイルス感染を評価する上でも必要な知見になると考えられた。

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のかもしれない。今後は、この可能性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 は脳内でも多く発現されている因子であり、神経栄養因子としての役割も知られている。その作用は不足でも、また過剰でも細胞の生存にダメージを与えることが知られており、P-Tg 脳で見られた IGFBP3 の発現亢進は、IGF のシグナル活性を抑制するものと考えられた。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。

E. 結論

ヒトにおいて BDV に近縁の ABV5 の感染を示唆するデータが得られた。また、ボルナウ

イルスの病原性に関与して、宿主細胞のゲノムへの組み込みという新たな病原性機序を突き止めた。脳内での IGF シグナルの傷害など、本年度の成果を発展させることで、難治性神経疾患、特に神経変性疾患とボルナウイルスとの関連性の追究を行う予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 学会発表

1. Keizo Tomonaga : Bornavirus infection: discovery of a novel interaction between RNA virus and the nucleus. 3rd International CVRDC-RIMD Joint Symposium, Korea 2009.
2. Daito, T., Horie, M., Fujino, K., Matsumoto, Y., Honda, T., Ikuta, K. and Tomonaga, K. : Development of a Borna disease virus vector system for efficient gene delivery into the CNS. The 9th Awaji international forum on infection and immunity 2009, Awaji Island, Japan.
3. Honda, T., Ohtaki, N., Daito, T., Horie, M., Fujino, K., Matsumoto, Y., Ikuta, K. and Tomonaga, K. : Cooperative transcriptional activity of Borna disease virus polymerase complex with the 3'-untranslated region. The 8th Awaji international forum on infection and immunity 2008, Awaji Island, Japan.
4. Horie, M., Fujino, K., Honda, T., Daito, T., Matsumoto, Y., Ikuta, K. and Tomonaga, K. : Comparative analysis of X and P proteins form three different species of Bornaviruses. The 9th Awaji international forum on infection and immunity 2009, Awaji Island, Japan.
5. 本田知之, 林 陽平, 堀江真行, 大東卓史, 朝長啓造 : ウイルス病原性を用いた自閉症病態関連シグナルの同定. 第2回ボルナウイルス研究会 2009年, 東京 (麻布大学)
6. 朝長啓造, 堀江真行, 本田知之, 鈴木善幸, 小林由紀, 押田龍夫, 大東卓史, 林陽平, 生田和良, 五條堀 孝 : 内在性

- ボルナウイルスエレメントとRNAウイルスの内在化プロセス. ワークショップ「レトロエレメントのダイナミズム」第147回日本獣医学会学術集会 2009年4月2日, 栃木
7. 大東卓史, 林 陽平, 本田知之, 堀江真行, 生田和良, 朝長啓造: BDV を利用した RNA ウイルスベクターの開発の試み. 第 147 回日本獣医学会学術集会 2009 年, 栃木
 8. 堀江真行, 上田謙吾, 藤野 寛, 松本祐介, 大東卓史, 朝長啓造: 毛引き症のオオハナインコにおける鳥ボルナウイルス遺伝子の検出. 第 148 回日本獣医学会学術集会 2009 年, 鳥取
 9. 藤野 寛, 堀江真行, 上田謙吾, 本田知之, 大東卓史, 松本祐介, 朝長啓造: 鳥ボルナウイルス X および P 遺伝子の相互作用の解析. 第 148 回日本獣医学会学術集会 2009 年, 鳥取
 10. 大東卓史, 本田知之, 堀江真行, 松本祐介, 藤野 寛, 生田和良, 朝長啓造: BDV のゲノム変化に基づいた新規 RNA ウイルスベクターの樹立. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009 年, 東京
 11. 堀江真行, 松本祐介, 本田知之, 大東卓史, 藤野 寛, 生田和良, 朝長啓造: ボルナ病ウイルスのクロマチン結合に関与するウイルス因子の同定. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009 年, 東京
 12. 藤野 寛, 堀江真行, 本田知之, 大東卓史, 松本祐介, 生田和良, 朝長啓造: ボルナウイルス属ウイルスの X および P 蛋白質の相互作用の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009 年, 東京
 13. 松本祐介, 堀江真行, 大東卓史, 本田知之, 藤野 寛, 生田和良, 朝長啓造: BDV 感染細胞核にみられるドット状構造物の形態解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009 年, 東京
 14. 本田知之, 大滝尚広, 大東卓史, 堀江真行, 藤野 寛, 松本祐介, 生田和良, 朝長啓造: BDV P 蛋白質は IGFBP3 の発現上昇を介して持続感染病態を誘導する. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009 年, 東京
- 2) 原著論文による発表
1. Horie M, Honda T, Suzuki Y, Kobayashi Y, Daito T, Oshida T, Ikuta K, Jern P, Gojobori T, Coffin JM and Tomonaga K. Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature* 463:84-87 (2010)
 2. Watanabe Y, Ohtaki N, Hayashi Y, Ikuta K and Tomonaga K. Autogenous translational regulation of the Borna disease virus negative control factor X from polycistronic mRNA using host RNA helicases. *PLoS Pathog.* 5:e1000654 (2009)
 3. Honda T, Horie M, Daito T, Ikuta K and Tomonaga K. Molecular chaperone BiP interacts with Borna disease virus glycoprotein at cell surface. *J. Virol.* 83:12622-12625 (2009)
 4. Hayashi Y, Horie M, Daito T, Honda T, Ikuta K and Tomonaga K. Heat shock cognate protein 70 controls Borna disease virus replication via interaction with the viral non-structural protein X. *Microbes Infect.* 11:3940-3402 (2009)
 5. Matsunaga H, Tanaka S, Fukumori A, Tomonaga K, Ikuta K, Amino N, Takeda M. Isotype analysis of human anti-Borna disease virus antibodies in Japanese psychiatric and general population. *J. Clin. Virol.* 43:317-322 (2008)
 6. Lee B-J, Matsunaga H, Ikuta K and Tomonaga K. Ribavirin inhibits Borna disease virus proliferation and fatal neurological diseases in neonatally infected gerbils. *Antiviral Res.* 80:380-384 (2008)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

4. 神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明

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 小林 伸行 (東京慈恵会医科大学ウイルス学講座)

研究要旨 我々は、これまでの研究で、クローン病患者や、うつ病患者において、異常な抗体反応を示す、ヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6) の潜伏感染特異的遺伝子タンパク SITH-1 を見出した。今年度は、SITH-1 の発現量を異なるものとするにより、SITH-1 単独で、躁状態と、うつ状態という全く反対の症状を引き起こすことが可能であることを明らかにした。このことは、SITH-1 が躁鬱病の原因となることを示すと共に、クローン病、慢性疲労症候群、うつ病、躁鬱病などの他種類の疾患の気分障害様症状に関係することを示唆する。

さらに我々は、疲労因子 (FF) を同定し、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でき方法論を得ることに成功した。

A. 研究目的

難治性疾患は、慢性疾患であると同時に、寛解と増悪を繰り返すものが多い。この現象は、ヘルペスウイルスの特徴である、潜伏感染と再活性化の反復と似ているため、ヘルペスウイルスと難治性疾患との関係は、古くから疑われてきた。

我々は、ヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6) と疲労との関係を明らかにし、うつ病や難病との関係性に関しても知見を蓄積しつつある (図1)。

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)、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。

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、再活性化したウイルスが検出されている。しかし、ウイルスの検出だけでは、このウイルスの再活性化が、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ということはできない。

我々は、この問題を解決するために、主としてHHV-6の潜伏感染・再活性化機構と、潜伏感染特異的遺伝子産物に関する研究を行なって来た。これまでの研究で、難治性疾患、特に中枢神経疾患である「うつ病」や、消化器疾患であるクローン病と関係すると考えられる、潜伏感染特異的遺伝子タンパク Small protein encoded by the Intermediate stage Transcript of HHV-6 (SITH) -1 を見出した。

HHV-6 潜伏感染蛋白 SITH-1 は、クローン病患者において、異常な抗体反応が見られた。また、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SITH-1 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 SITH-1 抗体が陽性であることが判った (図4)。

これらの成果に加えて我々は、今回新たに、疲労の分子メカニズムを相当部分明らかにすることができた。これによって、SITH-1 と疲労との関係をさらに深く検討し、疲労と難病やうつ病との関係の分子メカニズムを解明する

ための手掛かりを得た(図 2、3)。

これまでに、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 SITH-1 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ため、SITH-1 は、鬱症状および鬱病の発症メカニズムの研究に有用な材料を提供するものと考えられた。

様々な難病は、感染などの他に、必ずと言って良いほど、過労がその誘因となっている。このため、感染因子の解明に合わせて、疲労の分子メカニズムを解明することが、難病発症の機構を明らかにするためには必要と考えられた。本年度は、HHV-6 SITH-1 がうつ病やうつ症状などを引き起こす原因となることをさらに確かなものとし、その分子機構を明らかにするために、うつ病の最大の誘因である疲労の分子メカニズムを明らかにすると共に、HHV-6 SITH-1 との関係について検討した。

また、HHV-6 SITH-1 は、クローン病、慢性疲労症候群、うつ病、躁鬱病などの他種類の疾患の気分障害様症状に関係する可能性がある。それぞれの疾患における気分障害は、共通点もあるが相違点もあるため、SITH-1 が多彩な精神症状を発現し得るかにおける検討も行なった。

B. 研究方法

1. 疲労の分子メカニズムの検討

疲労の分子機構の解明のヒントとなったのは、疲れるとヘルペスウイルスが再活性化するという現象であった。特に、HHV-6 はその再活性化と疲労とが深く結びついているので、これを利用して、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。さらに FF は、アポトーシスを促進させる働きがあり、過労時の組織破壊にも関係するものと考えられた(図 3)。

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できると考えられた。

2. SITH-1 遺伝子によるマウスの行動異常

HHV-6 潜伏感染特異的遺伝子タンパク SITH-1 をマウスの脳内における HHV-6 潜伏感染細胞で発現させた。HHV-6 は、脳内ではアストロサイトにおいて潜伏感染すると考えられており、SITH-1 も主としてアストロサイトにおいて発現する。そこで、SITH-1 発現をヒトの状態にできるだけ近づけるため、発現は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て行なった(図 5)。

また、遺伝子導入は、発現期間はあまり長くないが、高発現が期待できるアデノウイルスベクターと、発現量は低いが長期間の発現が期待できるレンチウイルスベクターの両者を用いて行なった。HHV-6 は生後 1 年以内の乳児期に感染するため、両ウイルスとも、生後 48 時間以内にマウス脳内に接種した。

SITH-1 に対する抗体が、精神疾患やクローン病のうつ症状を多く伴う患者から検出されることから、うつ病などの精神疾患である、気分障害を観察するために用いられる行動実験を SITH-1 導入マウスに対して行なった。

行なった行動実験は、以下のものである。

i. 尾懸垂テスト

尾懸垂テストは、気分障害の判定のために用いられる試験で、尾を固定して吊るした動物が、どの程度の時間静止しているかを観察する。懸垂は 10 分程度行い、静止時間が短縮していれば、興奮状態になっていることを表す。

ii. Prepulse Inhibition (PPI)テスト

これは、音刺激に対する驚愕反応の強さを定量化する検査で、人に対しても躁鬱病や統合失調症の検査目的で行なわれる。PPI テストは、強い音刺激の前に、少し小さめの音を聞かせると、音刺激に対する反応が弱まるという現象 (Prepulse Inhibition) を利用したもので、躁鬱病や統合失調症の患者では、この PPI の効果が減少する。

iii. Wheel running テスト

これは、マウスが自発的に運動した量を、滑車を回す回数によって計測する試験である。

マウスが車輪を回転させた回数を記録した。自発運動は、マウスが夜行性であることを考慮して夜間の運動量において評価した。

(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。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. 疲労の分子メカニズムの検討

我々は、疲労に関係する分子として、疲労因子 (FF) を同定した。マウス疲労モデルにおける疲労因子 (FF) の発現を図 2 に示す。

脳、心臓、脾臓、肝臓、筋肉と血液を含む多くの臓器において、FF は、12 時間の不眠疲労によって有意に増加しました。

また、疲労因子 (FF) が他の疲労によっても増加するかどうかを検討した。疲労因子 (FF) は、不眠と同じく、水泳によっても増加することが判明した。

さらに我々は、疲労物質 (FS) と疲労回復因子 (FR) も同定した (図 3)。その関係は、まず、生命活動の結果の老廃物として、疲労物質 (FS) が細胞内で産生される。これによって疲労シグナルの伝達物質である疲労因子 (FF) が誘導される。

疲労因子 (FF) は、今回のスライドでお示した、ほとんどすべての疲労で誘導される FF-1 に加えて、強い疲労で特異的に誘導される FF-2 も見出した。

疲労因子 (FF) の発現は、4 種類の疲労回復因子 (FR) によって抑制される。疲労回復因子 (FR) の何れの分子が使われるかは、疲労の程度、臓器の種類、持続時間などの条件によって変化するが、生体は、疲労因子 (FF) と疲労回復因子 (FR) が上手くバランスをとって維持されているものと考えられる。

疲労因子 (FF) は、数種の炎症性サイトカインを誘導することによって、脳へ疲労を伝え、疲労感として認識されると考えられる。

また、HHV-6 の再活性化は、疲労因子 (FF) の作用で誘導されることも判明した。このため、唾液中の HHV-6 量は、疲労因子 (FF) の発現を直接に反映し、疲労の測定に非常に有用な手段であることが判った。

2. SITH-1 遺伝子によるマウスの行動異常

ウイルスベクターを利用して脳内摂取した SITH-1 脳内における発現を検討した。アデノウイルスで SITH-1 を発現させた方が、レンチウイルスを使用するよりも発現が強いことがわかった。また、GFAP を染色したスライドより、SITH-1 は GFAP と一致した部位に発現していることが判った (図 5)。

i. 尾懸垂テスト

アデノウイルスベクターを用いた SITH-1 導入 3 週間後とレンチウイルスベクターを用いた 8 週間後に、10 分間尾懸垂テストを行なった。アデノウイルスベクターで無動時間の有意な短縮が認められた。これは無動にならず動き続けていることを意味し、躁状態になっていると考えられた。一方、レンチウイルスベクターで SITH-1 を導入した場合、無動時間の延長を認めた。これは逆にうつ状態を呈していると考えられた。つまり、SITH-1 が躁症状およびうつ症状を引き起こすことが示唆された (図 6)。

ii. Prepulse Inhibition テスト

Prepulse Inhibition (PPI) とは通常、大きな音を鳴らすと驚愕反応を示すが、大きな音の前に小さな音を鳴らすことにより驚愕反応が弱まることを指す。躁うつ病の躁状態や、統合失調症患者ではこの PPI が障害されていることが知られている。PPI はラットやマウスでも応用されており、動物モデルの行動評価に用いられる。

今回は、アデノウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターを用いて SITH-1 導入した後に、PPI を測定した。prepulse として 74 から 86dB、pulse として 110dB または 120dB の音を与えた。グラフが低いほど驚愕反応が強く、PPI が障害されていることを示す。アデ

ノウイルスベクターを用いて SITH-1 を発現したマウスでは PPI 障害が起こっていることが判った。これはマウスが躁状態になっていることを示していた。一方レンチウイルスベクターで SITH-1 を導入した場合は差はなかった。PPI 障害は双極性障害の場合、躁状態の時のみ出現するので、この結果は、と一致するものと考えられた(図 7)。

iii. Wheel running テスト

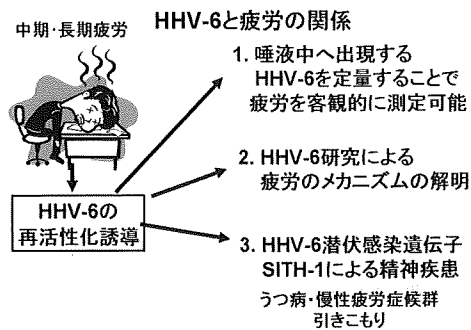
さらにマウスの行動を評価するために、回転ケージを用いて、自発運動量の測定を行なった。48 時間にわたりマウスが車輪を回転させた回数を記録した。SITH-1 発現マウスでは自発運動量が少ないことが判った。アデノウイルスベクターを用いて SITH-1 を導入した場合、自発運動量に差はなかったが、レンチウイルスベクターを用いて SITH-1 を導入した場合は、自発運動量が低下する傾向を示した。これはアデノウイルスで導入した場合、3 週齢で実験を行っているため、体重が軽く、十分にホイールを回転させられないことが結果に影響している可能性が考えられた(図 8)。

これらの行動実験の結果からアデノウイルスベクターを用いて SITH-1 を強発現させた場合は躁状態になりレンチウイルスベクターを用いて SITH-1 を発現させた場合はうつ状態になることが判った。これは、発現量の違いによるものか、週齢によるものかは現在検討中であるが、いずれにしても、SITH-1 が躁状態とうつ状態の両者を作り出せることが示唆された。

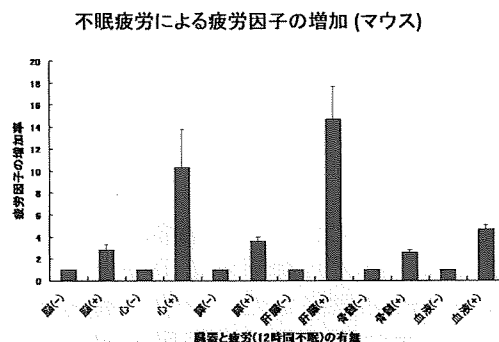
図 1: 疲労と HHV-6 の関係

HHV-6 は疲労によって再活性化を誘導され、small protein encoded by the intermediate stage transcripts of HHV-6(SITH-1)を発現する。この性質は、疲労の測定に応用できる他、疲労の分子メカニズムの解明や、HHV-6 によるうつ病などの発症と関係する。

(図 1)



(図 2)



(図 3)

疲労因子(FF)、疲労物質(FS)、疲労回復因子(FR)の関係

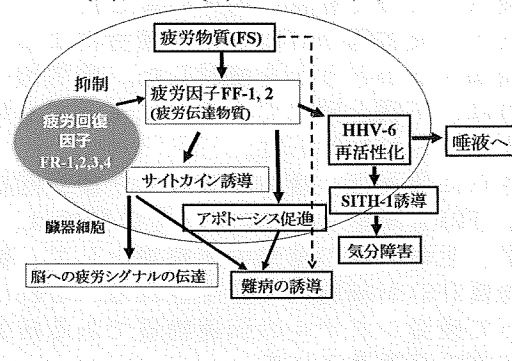


図 2: マウス疲労モデルにおける疲労因子(FF)の発現

疲労による、疲労因子(FF)発現の増加を示す。Y 軸は、疲労因子の増加率を疲労なしの状態を 1 として、倍率で表したものの。脳、心臓、脾臓、肝臓、筋肉と血液を含む多くの臓器において、疲労因子は、12 時間の不眠疲労によって有意に増加する。

図 3: 疲労因子(FF)、疲労物質(FS)、疲労回復因子(FR)の関係

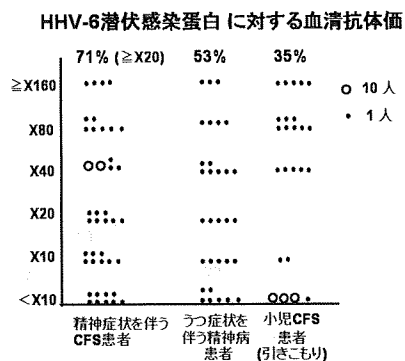
生命活動の結果の老廃物として、疲労物質(FS)

が細胞内で産生され、これによって疲労シグナルの伝達物質である疲労因子(FF)が誘導される。

疲労因子(FF)は、ほとんどすべての疲労で誘導されるFF-1に加えて、強い疲労で特異的に誘導されるFF-2が存在する。

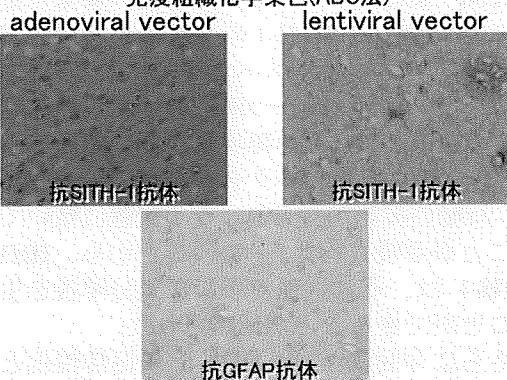
疲労因子(FF)の発現は、4種類の疲労回復因子(FR)によって抑制される。

(図 4)

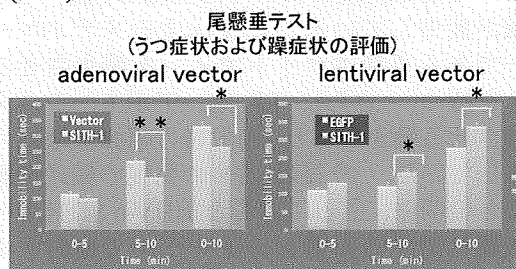


(図 5)

ウイルスベクターによるSITH-1発現量の比較
免疫組織化学染色(ABC法)



(図 6)



unpaired t-test * $p<0.05$ ** $p<0.01$
 アデノSITH-1発現マウスで無動時間の短縮(躁状態)
 レンチSITH-1発現マウスで無動時間の延長(うつ状態)

図 4: うつ症状を呈する患者における抗体価

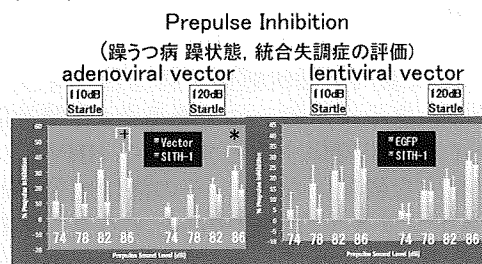
HHV-6 潜伏感染蛋白 SITH-1 に対する抗体価を検討した。抗体価は、潜伏感染細胞に対する抗体を蛍光抗体法にて検出した。健康人や臓器移植によって HHV-6 の再活性化を生じた患者では潜伏感染蛋白に対する抗体がほとんど検出されないのに対し、慢性疲労症候群(CFS)患者や引きこもりとも呼ばれる小児の CFS 患者において抗体陽性者が存在することが判った。

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 5: 脳内における SITH-1 の発現

マウス脳の切片を示す。ブラウンに染まっているところが SITH-1 の発現を意味する。アデノウイルスで SITH-1 を発現させた方が、レンチウイルスを使用するよりも発現が強いことがわかる。また、GFAP を染色したスライドより、SITH-1 は GFAP と一致した部位に発現していることが判る。

(図 7)

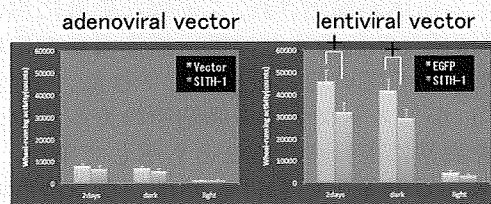


unpaired t-test * $p<0.05$ + $p<0.1$

アデノSITH-1発現マウスでPP(障害(躁状態))

(図 8)

自発運動量測定
(うつ症状, 躁症状の評価)



unpaired t-test + $p<0.1$

レンチSITH-1発現マウスで自発運動量の低下(うつ状態)

図 6: 尾懸垂テスト

アデノウイルスベクターを用いた SITH-1 導入 3 週間後とレンチウイルスベクターを用いた 8 週間後に、10 分間尾懸垂テストを行なった。赤が SITH-1 発現マウス。

図 7: Prepulse Inhibition (PPI) テスト

アデノウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターを用いて SITH-1 導入した後に、PPI を調べた。prepulse として 74 から 86dB, pulse として 110dB または 120dB の音を与えた。グラフが低いほど驚愕反応が強く、PPI が障害されていることを示す。

図 8: Wheel running テスト

アデノウイルスベクターを用いて SITH-1 を導入した場合、自発運動量に差はなかったが、レンチウイルスベクターを用いて SITH-1 を導入した場合は、自発運動量が低下する傾向を示した。

D. 考察

HHV-6 は脳内で潜伏感染・再活性化を生じる数少ないウイルスの一つであるため、精神症状とウイルスが関係するとすると、HHV-6 は極めて有力な候補となる。その潜伏感染細胞は、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、クローン病、慢性疲労症候群、うつ病などで、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、この様な患者において、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してきた。また、SITH-1 がアストロサイト細胞中のカルシウム濃度を異常に上昇させることも示して来た。

アストロサイト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。また、アストロサイトの支配するシナプスは非常に数が多いため、フォーカス状に潜伏感染している HHV-6 の影響は計り知れない。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と予測される。

HHV-6 SITH-1 は、クローン病、慢性疲労症候群、うつ病、躁鬱病などの他種類の疾患の気分障害様症状に関係する可能性がある。それぞれの疾患における気分障害は、共通点もあるが相違点もあるため、SITH-1 が多彩な精神症状を発現し得るかが問題であった。

今回は、この SITH-1 蛋白をマウスの脳内アストロサイトで、アデノウイルスベクターとレンチウイルスベクターの 2 つの性質の異なったベクターを用いて発現させ、マウスの行動異常の差異を観察した。両ベクターとも、SITH-1 がアストロサイト特異的に発現する様に、GAPF プロモーターを用いて発現させた。両ベクターによって導入された SITH-1 は、何れもアストロサイトに発現したが、その発現量は、アデノウイルスベクターによるものの方が、100 倍程度多かった。

行動試験の結果、尾懸垂テスト、Prepulse Inhibition テスト、Wheel running テストといった代表的な気分障害に関する検討において、SITH-1 導入マウスが気分障害様の異常行動を示した。特に、SITH-1 の発現量が多いと考えられるアデノウイルスベクターによる SITH-1 導入マウスでは、躁うつ病様の症状が観察された。反対に 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を用いたマウスでは、行動の抑制が見られ、うつ状態に傾いていることが示唆された。このことから、HHV-6 SITH-1 は、それ単独で多彩な気分障害を生じることができることが示唆された。

さらに今回我々は、HHV-6 の再活性化と疲労とが深く結びついていることを利用して、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。さらに FF は、アポトーシスを促進させる働きがあり、過労時の組織破壊にも関係していた。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できると考えられた。

E. 結論

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 SITH-1 は、発現量を異なるものとする事により、それ単独で、躁状態と、うつ状態という全く反対の症状を引き起こすことが可能であることが判明した。これは、SITH-1 が躁鬱病の原因となるうることを示すと共に、クローン病、慢性疲労症候群、うつ病、躁鬱病などの他種類の疾患の気分障害様症状に関係することを示唆するものであった。さらに我々は、疲労因子(FF)を同定し、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でき方法論を得ることに成功した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 招待講演 K. Kondo

Identification of a novel molecular mechanism and a major cause of fatigue.
36th International Congress of Physiological Sciences. Late-breaking symposium
(Aug.1 Kyoto 2009)

2. A. Shimizu and K. Kondo

Application of human herpesvirus 6 (HHV-6) for the gene therapy vector
14th International Conference on Immunology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infection (Oct. 6 Kobe 2009)

3. M. Kamada and K. Kondo

Establishment of SCID-hu mouse model for human herpesvirus 6 (HHV-6) latent infection and identification of HHV-6 latent cells
14th International Conference on Immunology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infection (Oct. 6 Kobe 2009)

4. N. Kobayashi and K. Kondo

Identification of novel HHV-6 latent protein associated with CFS and mood disorders
14th International Conference on Immunology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infection (Oct. 6 Kobe 2009)

5. K. Shimada and K. Kondo

Alternative splicing regulation of human herpesvirus 6 (HHV-6) iel/ie2 genes by immediate-early 2 and splicing factor SART3
14th International Conference on Immunology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infection (Oct. 6 Kobe 2009)

6. 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 関連疾患における、多彩な精神症状の出現機構に関する検討
(第 57 回日本ウイルス学会、2009 年 10 月 東京)

7. 鎌田美乃里、近藤一博

HHV-6 感染 SCID-hu マウス末梢血中の HHV-6 genome 出現の検討
(第 57 回日本ウイルス学会、2009 年 10 月 東京)

8. 清水昭宏、小林伸行、近藤一博

組み換えヒトヘルペスウイルス 6 への bacterial artificial chromosome (BAC) システムの導入と、産生条件の検討
(第 57 回日本ウイルス学会、2009 年 10 月 東京)

9. 嶋田和也、近藤一博

ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) 前初期遺伝子産物 IE2 とスプライシング関連因子 SART3 の相互作用による iel/ie2 の選択的スプライシング調節
(第 57 回日本ウイルス学会、2009 年 10 月 東京)

3. 書籍等

1. 近藤一博

疲労のバイオマーカー：唾液中ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6)
「最新・疲労の科学」p76-80 別冊・医学のあゆみ(医歯薬出版 2010 年 1 月).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 近藤一博

疲労因子(FF)と疲労回復因子(FR)の同定とその利用法(特許出願準備中)

5. 慢性肺気腫ないし呼吸不全とウイルス感染

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 教授)

研究協力者 吉田 元樹、浅田 成紀 (東北大学病院老年科)

久保 裕司 (東北大学先進感染症予防学寄附講座)

佐々木 陽彦 (東北大学病院呼吸器内科)

中山 勝敏 (東京慈恵会医科大学呼吸器内科)

新矢 恭子 (神戸大学医学部人畜共通感染症講座)

研究要旨 1) 肺気腫増悪患者 5 名を追加した 23 例中 4 例で RS ウイルス血清抗体価上昇を認め、日本人肺気腫増悪における RS ウイルス感染の関与が示唆された。2) 肺気腫治療の第一選択薬であるチオトロピウムの、ヒト気道上皮における感染受容体 ICAM-1 発現抑制およびウイルス侵入抑制を介したライノウイルス感染抑制効果が認められた。また、気道炎症惹起物質放出抑制効果を認めた。3) HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (スタチン) による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が認められた。また、気道炎症惹起物質放出抑制効果を認めた。ウイルス侵入経路に関しては、短時間の処理では侵入抑制効果を認めなかった。4) マクロライドおよび喀痰調整薬の季節性 A 型インフルエンザ感染抑制効果、および RS ウイルス感染抑制効果の機序をさらに検討した。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。これに対し、季節性 A 型インフルエンザウイルスの感染に関与するセリン・プロテアーゼ発現、および RS ウイルス感染受容体ヘパラン硫酸発現を測定し、マクロライドおよび喀痰調整薬が影響しないことが明らかになった。

A. 研究目的

1) RS (Respiratory Syncytial) 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従来から報告がなされ、乳幼児にのみ関係があると認識されてきた。しかし、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になると、欧

米から報告が近年なされている。本研究班において、私たちはライノウイルス、季節性インフルエンザウイルス、アデノウイルスが慢性肺気腫の増悪を惹起すると報告してきた。昨年度から RS ウイルス感染の、慢性肺気腫増悪における役割の調査を開始した。本年度も増悪の症例数を増やして調査を継続した。

2) 長時間作用型抗コリン薬であるチオトロピウム (スピリーバ®) は気管支拡張作用が 24 時間継続し、肺気腫患者の症状軽快や肺機能改善作用を有するため、欧米および本邦の治療ガイドラインでは第一選択の治療薬となっている。さらに、チオトロピウムは最近の大規模試験において増悪回数を 20% ~ 30% 減少し、予後の改善効果も報告されている。他方で、肺気腫の増悪は気道ウイルス感染および細菌感染が主たる原因とされている。気道感染ウイルスのうち、ライノウイルス感染が半数を占めている。しかし、チオトロピウムがライノウイルス感染や感染に伴う気道炎症を抑制するかどうか不明である。この課題を解決するため、ヒト気管上皮細胞にチオトロピウムを作用させ、ライノウイルス感染を抑制するかどうかを検討した。

3) HMG-CoA 還元酵素阻害薬(スタチン) はコレステロール減少を介した動脈硬化関連疾患、虚血性心疾患などの予防効果を有している。一方で血管の炎症抑制作用も有している。HMG-CoA 還元酵素阻害薬は血管以外の細胞においてもライノウイルス感染受容体 ICAM-1 発現抑制作用や炎症性サイトカイン放出抑制作用、慢性閉塞性肺疾患(肺気腫) のインフルエンザ感染・肺炎による死亡減少効果が報告されている。この背景より、ライノウイルス感染抑制作用を有するかどうか、昨年度から気道上皮細胞で検討を開始した。昨年度はライノウイルス放出量が HMG-CoA 還元酵素阻害薬で減少し、その機序として感染受容体 ICAM-1 の減少が考えられると報告した。本年度はウイルス RNA が細胞質に侵入する場所である酸性エンドゾームに対する作用を検討した。

5) 昨年までの報告で、マクロライドおよび喀痰調整薬の季節性 A 型インフルエンザ感染抑制効果、および RS ウイルス感染抑制効果を明らかにした。また、マクロライドおよび喀痰調整薬は季節性 A 型インフルエンザウイルスの受容体発現抑制、RNA 進入抑制を有することも報告した。さらに、マクロライドは RS ウイルス感染受容体である活性化 RhoA の減少効果を有した。本年度は、季節性 A 型インフルエンザウイルスの感染に関与するセリン・プロテアーゼ発現、および RS ウイルスの別の感染受容体であるヘパラン硫酸発現を測定し、マクロライドおよび喀痰調整薬の効果を検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト気管上皮細胞培養、および慢性肺気腫における風邪罹患および呼吸不全に対する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) 昨年調査した肺気腫患者 54 名に 6 名を加えた 61 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を中和試験法で測定した。動脈血酸素飽和度、血中 Interleukin(IL)-6 および可溶性 ICAM-1 を測定した。風邪罹患後の増悪を生じた患者は昨年 18 名に 5 名を加えた 23 名(平均年齢 74 歳、すべて男性)であった。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。

2) チオトロピウム(スピリーバ®)(10 μ M) をヒト気管上皮細胞に 3 日間作用させ、ライノウイルス 14 型(以下 RV) 10^5 TCID₅₀ units/ml (TCID₅₀; tissue culture infective dose 50) を 1 時間感染させた。培養液 RV 量、細

胞内 RV-RNA 量、培養液 IL-1 β 、IL-6、可溶性 ICAM-1、細胞内 ICAM-1mRNA 発現量を測定した。さらに、ライノウイルス侵入部位である酸性エンドゾーム数に対する作用を調べるため、上皮細胞を蛍光色素 LysoSensor DND-189 (Molecular Probes)で染色した。

3) HMG-CoA 還元酵素阻害薬 Pitavastatin (リバロ®) (10 μ M)および Lovastatin(10 μ M)をヒト気管上皮細胞に3日間作用させ、ライノウイルス 14 型 (RV) 10⁵ TCID₅₀ units/ml (TCID₅₀; tissue culture infective dose 50)を1時間感染させた。培養液 RV 放出量、培養液可溶性 ICAM-1 量、細胞内 ICAM-1mRNA 発現量を測定した。さらに、酸性エンドゾーム数に対する作用を調べるため、上皮細胞を蛍光色素 LysoSensor DND-189 (Molecular Probes)で染色した。

4) ヒト気道上皮細胞にクラリスロマイシン (10 μ M)あるいは喀痰調整薬 L-カルボシステイン(10 μ M)を3日間作用させた。ヒト気道上皮で発現が確認され、現在日本での測定が可能なセリン・プロテアーゼである TMPRSS2 (transmembrane protease, serine 2) および TMPRSS11 (transmembrane protease, serine 11= HAT, human airway trypsin-like protease) の mRNA 発現を real-time RT-PCR 法で測定した。また、ヘパラン硫酸の蛋白発現を、フロー・サイトメトリー法を用いて測定した。

ヒト気管上皮におけるヒト型インフルエンザ感染受容体であるシアル酸(SA α 2,6Gal)のマクロライドおよび喀痰調整薬による発現抑制を調べた。クラリスロマイシン(10 μ M)あるいはL-カルボシステイン(10 μ M)を24時間処理したヒト気管上皮を、FITC ラベルした *Sambucus nigra* (SNA) lectin (Vector Laboratories, Burlingame, CA) および

Alexa Fluor 594 に結合した streptavidin, で培養した。その後、4',6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI)で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

酸性エンドゾーム数に対する作用を調べるため、上皮細胞を蛍光色素 LysoSensor DND-189 (Molecular Probes)で染色し、クラリスロマイシン(10 μ M)あるいはL-カルボシステイン(10 μ M)の効果を検討した。

RS ウイルスの細胞側受容体である活性化 RhoA はウエスタンブロット法にて測定した。

C.研究結果

1) 風邪症状後に増悪を来たした23例において、血清RSウイルス抗体価は増悪時に種々の値を示した。そのうち、2週間後の回復期において4倍以上の上昇を示したのは4例であった(図1)。

図1

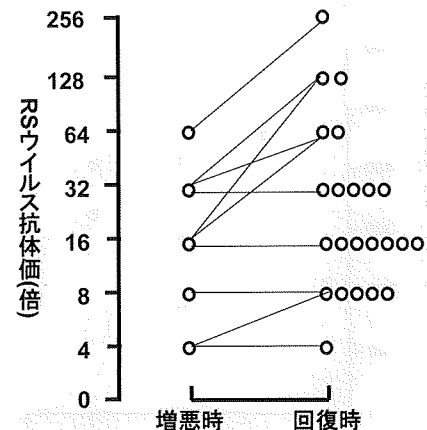


図1. 増悪を示した患者におけるRSウイルス抗体価の変化。3例において、回復期の4倍以上の有意の上昇を認めた。

さらに、血中 IL-6 および可溶性 ICAM-1 (sICAM-1)が増悪時に上昇し、回復時に低下した(図2)。上昇の程度は以前に本研究班で報告し

た、ライノウイルス感染時と同等であった。また、動脈血酸素分圧は増悪時に低下し、回復時に上昇・回復した (図3)。

図 2a

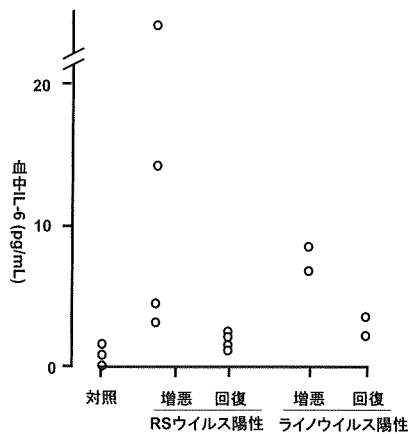


図 2a. 増悪時および回復時の血中 IL-6 濃度 (pg/mL). 対照者に比較して増悪時に上昇、ライノウイルス陽性と比較して同等であった。

図 2b

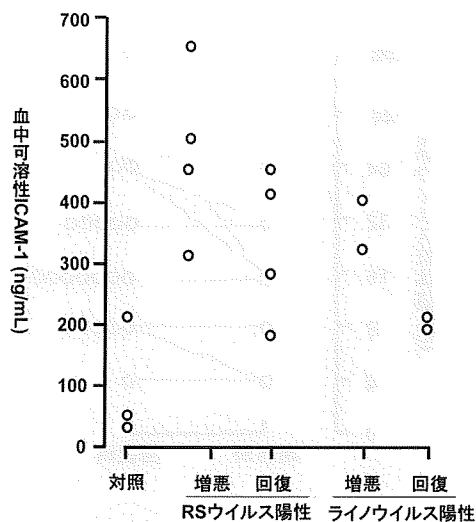


図 2b. 増悪時および回復時の血中可溶性 ICAM-1 濃度 (ng/mL). 対照者に比較して増悪時に上昇、ライノウイルス陽性と比較して同等であった。

2) 培養液ライノウイルス放出量およびヒト気管上皮細胞内ライノウイルス RNA 複製量は、感染後時間経過で増加し、3 日後に最大

量になった。チオトロピウム (スピリーバ®) (10 μ M) を作用したヒト気管上皮細胞において培養液ライノウイルス放出量およびヒト気管上皮細胞内ライノウイルス RNA 複製量が減少した (図4)。

図 3

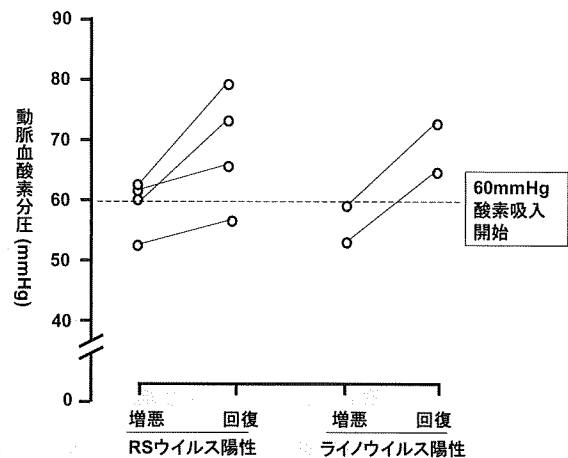


図 3. RS ウイルス感染増悪時前後の動脈血酸素分圧. RS ウイルス感染増悪時、動脈血酸素分圧が低下し、回復時に上昇する。動脈血酸素分圧の低下の程度はライノウイルス感染増悪時と同等。

図 4

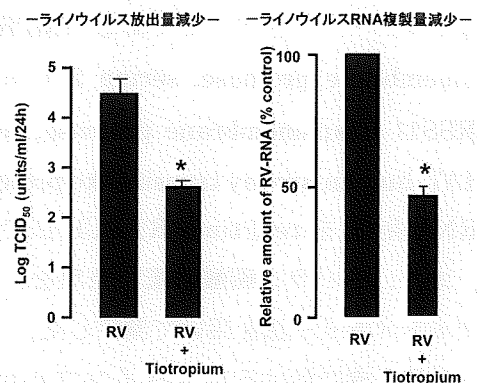


図 4. チオトロピウムのライノウイルス感染抑制作用. チオトロピウムを作用した細胞では培養液ライノウイルス放出量 (図左、感染 3 日後) および細胞内ライノウイルス RNA 複製量 (図右、感染 3 日後) は減少した。* $P < 0.05$, ライノウイルス感染のみ (RV) に対する有意差。

ライノウイルス感染受容体である細胞接着分子 ICAM-1 の遺伝子 (mRNA) 発現お

よび培養液可溶性 ICAM-1 量を測定すると、チオトロピウム (10 μ M、3 日間) を前処置したヒト気管上皮細胞において、いずれも減少した (図 5)。

図 5

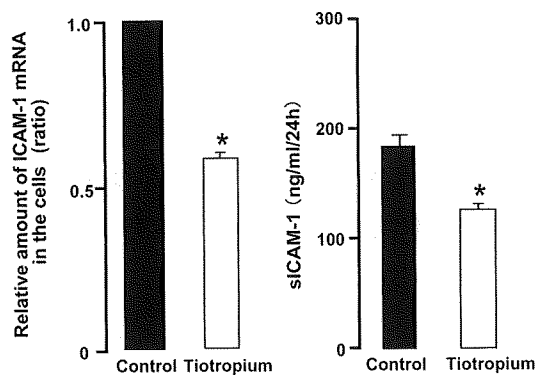


図 5. チオトロピウムのライノウイルス感染受容体発現抑制作用. チオトロピウムを 3 日間作用した細胞では細胞接着分子 ICAM-1mRNA 発現量 (図左) および培養液可溶性 ICAM-1 濃度 (図右, sICAM-1) は減少した。* $P < 0.05$, 培養液のみ (Control) に対する有意差。

さらに、ライノウイルス RNA が細胞質に侵入する経路である酸性エンドゾーム数を測定した。蛍光色素で緑色に染色される酸性エンドゾームはチオトロピウム処理により減少した。さらに、蛍光強度も明らかに低下した (図 6)。

図 6

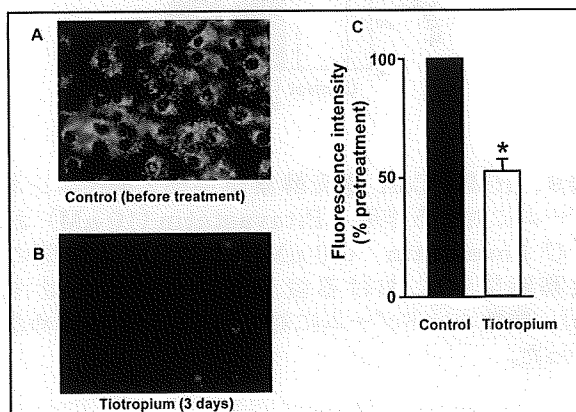


図 6. チオトロピウムの酸性エンドゾーム減少効果. チオトロピウムを 3 日間作用した細胞 (図 B) では緑色に染色する酸性エンドゾームが作用前

(図 A) に比べて減少した。酸性エンドゾームから発生する蛍光強度も減少した (図 C)。* $P < 0.05$, 培養液のみ (Control) に対する有意差。

3) HMG-CoA 還元酵素阻害薬 Pitavastatin (リバロ®) (10 μ M) および Lovastatin (10 μ M) はヒト気管上皮細胞における培養液ライノウイルス放出量を減少した (図 7)。

図 7 a

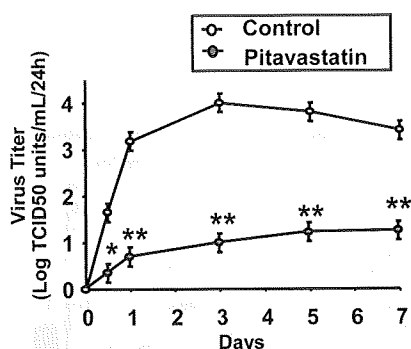


図 7 b

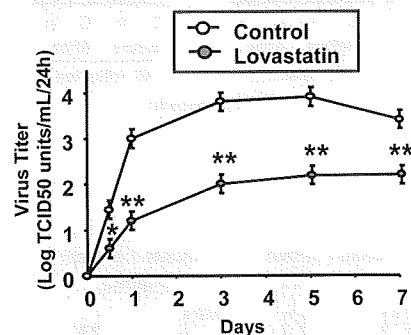


図 7. HMG-CoA 還元酵素阻害薬のライノウイルス感染抑制作用. Pitavastatin (10 μ M, 7a) および Lovastatin (10 μ M, 7b) を 3 日間作用した細胞ではライノウイルスの培養液放出量が減少した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; ウイルスのみ (Control) に対する有意差。

HMG-CoA 還元酵素阻害薬のライノウイルス感染抑制作用の機序を明らかにするため、ヒト気管上皮細胞における細胞接着分子 ICAM-1mRNA 発現量および培養液可溶性 ICAM-1 の放出量を測定した。ICAM-1mRNA 発現量および培養液可溶性 ICAM-1 放出量はラ

インフルエンザウイルス感染前 3 日間の HMG-CoA 還元酵素阻害薬の前処置によって減少した (図 8)。

ライノウイルス感染後に ICAM-1 mRNA 発現量および培養液可溶性 ICAM-1 放出量が増加した (図 8)。HMG-CoA 還元酵素阻害薬を培養液に添加して処理した場合、ライノウイルス感染によって増加した ICAM-1 mRNA 発現量および培養液可溶性 ICAM-1 放出量は減少した (図 8)。

図 8 a

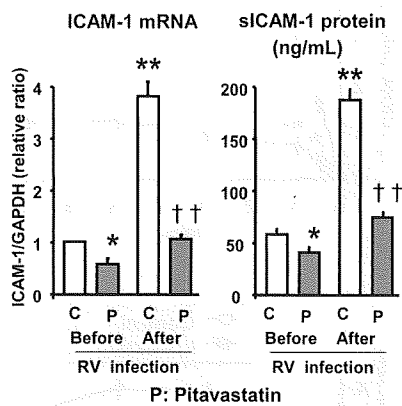


図 8 b

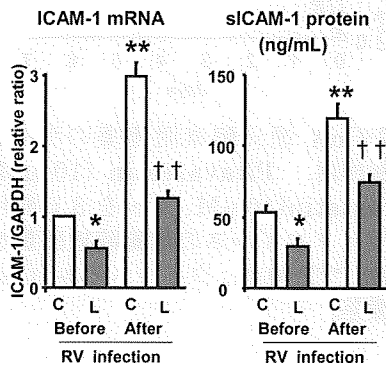


図 8. HMG-CoA 還元酵素阻害薬のライノウイルス感染受容体発現抑制作用. ライノウイルス (RV) 感染後、ICAM-1 は増加する。Pitavastatin (10 μ M, 8 a) および Lovastatin (10 μ M, 8 b) を 3 日間作用した細胞では細胞内細胞接着分子 ICAM-1 mRNA 発現量 (図左) および培養液可溶性 ICAM-1 濃度 (図右) は減少した。*P<0.05, **P<0.01; 培養液のみ (Control) 対

する有意差。++P<0.01; ライノウイルス感染のみに対する有意差。

さらに、ライノウイルス RNA の細胞内侵入経路である酸性エンドゾームに対する HMG-CoA 還元酵素阻害薬の作用を調べた。酸性エンドゾームは緑色に染色され、顆粒状の形態を呈した。添加後 5 分間の蛍光強度を測定した場合、HMG-CoA 還元酵素阻害薬は蛍光強度を変化させず、酸性エンドゾームに対する抑制効果を認めなかった (図 9)。

図 9 a

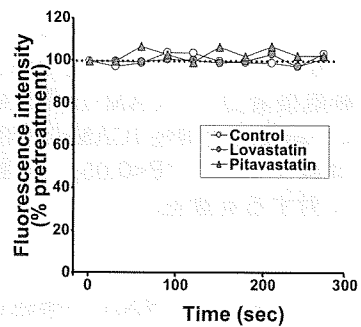


図 9 b

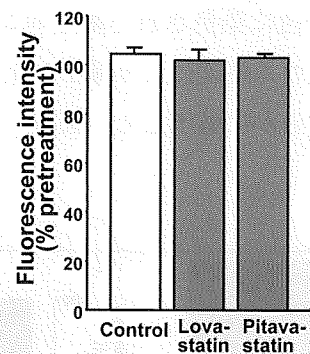


図 9. HMG-CoA 還元酵素阻害薬の酸性エンドゾームに対する作用. Pitavastatin (10 μ M) および Lovastatin (10 μ M) はともに 5 分間の観察時間 (a) における蛍光強度を変化させず (b)、酸性エンドゾームに対する抑制効果を認めなかった。

4) ヒト気道上皮細胞にクラリスロマイシン (10 μ M) あるいは L-カルボシステイン (10