

SSPE 発症における宿主側要因の解明

研究分担者：楠原浩一 産業医科大学小児科
研究協力者：石崎義人 九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野
研究協力者：原 寿郎 九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野

研究要旨 SSPE 発症の宿主側要因を解明するために、SSPE 患者における免疫遺伝学的研究を行い、また、麻疹ウイルスへの感受性の亢進を確認するための患者由来人工多能性幹細胞 (iPSC) からの神経細胞の樹立を試みた。近年報告された麻疹ワクチン応答の個人差に関連する遺伝子群が SSPE 発症に関連するかを明らかにするために関連解析を行ったが、これらの遺伝子のバリエーションと SSPE に対する疾患感受性との関連は否定的であった。SSPE 患者の末梢血単核球から作成した患者由来 iPSC の分化誘導を行い、神経幹細胞を樹立した。

A. 研究目的

SSPE の宿主遺伝的要因は正確には解明されていない。私たちは、これまで、遺伝子多型を用いた関連解析により、自然免疫に関わる遺伝子の中で *MxA* と *TLR3*、獲得免疫に関わる遺伝子の中で *IL4* と *PDI* のバリエーションが SSPE の発症に関与していることを報告してきた。

SSPE 患者末梢血単核球を用いた検討では麻疹ウイルスに対する 1 型 IFN 応答の低下が報告されている¹⁾。近年麻疹ワクチン応答の個人差に関連する遺伝子多型がいくつか報告されたので²⁾³⁾⁴⁾、報告された遺伝子多型が SSPE 発症に関連するかを明らかにするために関連解析を行った。

最近、宿主側の遺伝的要因が解明されてきたウイルス性脳炎として、単純ヘルペス脳炎 (HSE) がある。HSE は、基本的には散発性に発生する。しかし、家族集積性が認められる家系があること、そのような家系の一部に血族婚がみられること、再発を繰り返す症例があることなどから、何らかの遺伝的要因が関与していることが示唆されていた。2000 年代の後半から、*TLR3* から IFN 産生、IFN-stimulated genes 発現に至る経路の遺伝子異常が HSE の発症要因となることが報告されるようになった⁵⁾。この中で、*UNC93B* 欠損症と *TLR3* 欠損症では、患者由来の人工多能性幹細胞 (iPSC) から分化させた神経細胞を用いた研究が行われている⁶⁾。これによ

れば、*UNC93B* 欠損症患者および *TLR3* 欠損症患者由来の iPSC から分化させた神経細胞は正常対照由来と比較して *HSV-1* に対する感受性が高いこと報告されている。このような現象が、SSPE 患者でもみられるかを検討するために、患者の末梢血単核球から作成した iPSC の分化誘導を行い、神経細胞の樹立を試みた。本研究は、「SSPE の診療ガイドラインの策定・改訂」に関連した研究である。

B. 研究方法

1. SSPE 患者における免疫遺伝学的研究

SSPE 患者 40 名と健常対照 50 名を対象とした。候補 SNPs の genotype および allele 頻度について統計解析を行った。

参考論文²⁾³⁾⁴⁾で麻疹ウイルス特異的免疫応答と positive な関連がみられた遺伝子が 20 あった。このうち、当グループの先行研究で解析済の遺伝子を除外して 12 遺伝子となった。さらに、HapMap の日本人の遺伝子多型データから、解析可能でウイルス応答に関連した遺伝子として 3 遺伝子 (*TICAM1*, *ADAR1*, *CD209*) を選択した。

TICAM1 については、既報²⁾でワクチン接種後の麻疹ウイルス刺激による TNF- α 産生との関連がみられた synonymous SNP rs2292151 を選択した。

ADAR1 については、既報³⁾から、ワクチン接

種後の麻疹ウイルス刺激による IFN- γ 産生との関連がみられた non-synonymous SNP rs2229857 を選択した。

CD209 については、既報⁴⁾から、ワクチン接種後の麻疹抗体価と関連がみられた 5'-UTR の SNP rs735239 を選択した。

2. 患者由来人工多能性幹細胞(iPSC)からの神経細胞の樹立

対象は、SSPE 患者 3 名とした。まず、末梢血から密度勾配遠心法により単核球分画を濃縮し、T リンパ球を拡大培養した。この T リンパ球に、センダイウイルスベクターを用いて Sox2, KLF4, Oct4, Myc の 4 遺伝子を導入し、患者ごとに 3~6 株の iPSC を樹立した。次に、STEMdiff Neural Induction Medium を用いて、iPSC から nestin および Sox1 陽性の神経前駆細胞の豊富な Neural rosette clusters を作成した。さらに、FGF2 および EGF を添加した培養条件下で、SFEB-quick 法により神経系細胞への誘導を行った⁷⁾。

(倫理面への配慮)

本研究は所属施設の倫理委員会の承認を受けており、被検者あるいは保護者の文書による同意を得て行った。

C. 研究結果

1. SSPE 患者における免疫遺伝学的研究

表1はSSPE群と健常対照群における *TICAM1* rs2292151 多型の Genotype および Allele 頻度を比較したものである。genotype 頻度は両群間で近似しており、allele 頻度はほぼ同じであった。

表2は *ADAR1* rs2229857 多型の genotype 頻度と allele 頻度を SSPE 群と健常対照群で比較したものである。genotype 頻度は両群間で有意差がなく、allele 頻度もほぼ同じであった。

表3はSSPE群と健常対照群における *CD209* rs735239 多型の genotype および allele 頻度を比較したものである。genotype 頻度は両群間で有意差がなく、allele 頻度はほぼ同じであった。

2. 患者由来人工多能性幹細胞(iPSC)からの神経細胞の樹立

患者ごとに 3~6 株の iPSC を樹立した。次に、細胞の品質評価のため、形態学的観察と未分化マーカー NANOG、OCT3/4、SSEA4、TRA1-60

の免疫蛍光染色を行い、未分化性維持に異常がないことを確認した(図1)。また、遺伝子導入に用いたセンダイウイルスベクターがコードする nucleoprotein が発現していないことも確認した。

患者ごとに神経幹細胞を樹立した。細胞の品質評価のため、形態学的観察と神経前駆細胞のマーカーである nestin、神経幹細胞のマーカーである PAX6 および SOX2 の免疫蛍光染色を行った。得られた細胞は、ロゼットを形成し、また上記のマーカーが陽性であった(図2, 図3)。SSPE 患者由来と健常者由来で、iPSC から神経幹細胞への分化誘導段階において形態やマーカー発現に特に差を認めなかった。

D. 考察

1. SSPE 患者における免疫遺伝学的研究

TICAM1 (TIR domain-containing adapter molecule 1) は、別名 TRIF と呼ばれ、ウイルスゲノムを認識する TLR3 の下流に存在している。IFN- β 遺伝子のプロモーターを活性化する。単純ヘルペスウイルス脳炎の4番目の原因遺伝子としても報告されている⁸⁾。

ADAR1 (adenosine deaminase, RNA-specific 1) は、麻疹ウイルスの複製を促進し、感染細胞のアポトーシスを抑制することが報告されている。また、SSPE でみられる A-to-I hypermutation にも関与している。

CD209 は、ウイルス糖タンパクのマンノースを認識する機能がある。麻疹ウイルスの樹状細胞への感染に関与しているとされている。

今回および過去の我々の結果と麻疹ワクチン応答の個人差を報告した論文を比較検討した。麻疹ワクチン応答の個人差には関連していたが、SSPE 発症との関連が認められなかった遺伝子として、*CD46*、*IL12RB*、*IL10*、*RIGI*、*TICAM1*、*ADAR1*、*CD209* があつた。一方、麻疹ウイルス応答の個人差と SSPE 発症の両方に関連している遺伝子としては、*TLR3* が挙げられた²⁾⁹⁾。

麻疹ワクチン応答の個人差に関連していた遺伝子としては、*CD46*、*IL12RB*、*IL10*、*RIGI*、*TICAM1*、*ADAR1*、*CD209*、*TLR3* があるが、このうち *RIGI*、*TICAM1*、*ADAR1*、*CD209*、*TLR3* は、自然免疫に関与する遺伝子であり、ウイルスゲ

ノムや糖タンパクを認識し、IFN 応答を誘導する機能がある。

麻疹ワクチン応答の個人差の検討は、末梢血単核球を用いた検討であり、中枢神経系での免疫応答とは違いがある可能性がある。TLR3 は中枢神経系でも発現しており TLR3 経路が重要な役割を果たしていることも考えられる。

2. 患者由来人工多能性幹細胞(iPSC)からの神経細胞の樹立

SSPE 患者の疾患感受性の解析に関して、中枢神経では、末梢血球と異なる intrinsic な自然免疫応答が起こっている可能性があり、患者由来 iPSC を神経細胞に分化させた検討が必要と思われる。今後は、最終段階として、今回 iPSC から樹立した神経幹細胞を神経系細胞に分化させる予定である。さらに、この iPSC 由来の神経系細胞に麻疹ウイルスを感染させ、麻疹ウイルスへの感受性を健常対照由来のものと比較する予定である。

E. 結論

麻疹ワクチンに対する免疫応答に関与する *TICAM1*, *ADAR1*, *CD209* の遺伝子多型は、SSPE に対する疾患感受性に関与していないと考えられる。

SSPE 患者 3 名の末梢血単核球を出発点として、患者由来 iPSC を経て神経幹細胞を樹立した。今後は、この iPSC を神経細胞に分化させ、麻疹ウイルスに対する感受性を正常対照由来のものと比較する予定である。

[参考文献]

- 1) Hara T, Yamashita S, Aiba H et al. Measles virus-specific T helper 1/T helper 2-cytokine production in subacute sclerosing panencephalitis. *J Neurovirol* 6:121-6, 2000.
- 2) Ovsyannikova IG, Haralambieva IH, Vierkant RA et al. The role of polymorphisms in Toll-like receptors and their associated intracellular signaling genes in measles vaccine immunity. *Hum Genet* 130:547-61, 2011.
- 3) Haralambieva IH, Ovsyannikova IG, Umlauf BJ et al. Genetic polymorphisms in host antiviral genes: associations with humoral and cellular

immunity to measles vaccine. *Vaccine* 29:8988-97, 2011.

- 4) Ovsyannikova IG, Haralambieva IH, Vierkant RA et al. The association of CD46, SLAM and CD209 cellular receptor gene SNPs with variations in measles vaccine-induced immune responses: a replication study and examination of novel polymorphisms. *Hum Hered* 72:206-23, 2011.
- 5) Sancho-Shimizu V, Perez de Diego R, Jouanguy E et al. Inborn errors of anti-viral interferon immunity in humans. *Curr Opin Virol* 1:487-496, 2011.
- 6) Lafaille FG, Pessach IM, Zhang SY et al. Impaired intrinsic immunity to HSV-1 in human iPSC-derived TLR3-deficient CNS cells. *Nature* 491:769-773, 2012.
- 7) Eiraku M, Watanabe K, Matsuo-Takasaki M, Kawada M, Yonemura S, Matsumura M, Wataya T, Nishiyama A, Muguruma K, Sasai Y. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell* 3:519-532, 2008.
- 8) Sancho-Shimizu V, Pérez de Diego R, Lorenzo L et al. Herpes simplex encephalitis in children with autosomal recessive and dominant TRIF deficiency. *J Clin Invest* 121:4889-4902, 2011.
- 9) Ishizaki Y, Takemoto M, Kira R et al. Association of toll-like receptor 3 gene polymorphism with subacute sclerosing panencephalitis. *J Neurovirol* 14:486-491, 2008.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hoshina T, Takimoto T, Nanishi E, Nishio H, Kusuhara K, Hara T. The uselessness of procalcitonin in the diagnosis of focal bacterial central nervous system infection. *J Infect Chemother* 21:620-2, 2015.

2. 学会発表

なし

2. 実用新案登録

なし

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

3. その他

なし

表1 *TICAM1* rs2292151のGenotypeおよびAllele頻度

	Control群	SSPE群	P値
Genotype頻度			
CC	19 (38%)	13 (33%)	0.79
CT	20 (40%)	16 (40%)	
TT	11 (22%)	11 (28%)	
Total	50	40	
Allele頻度			
C	58 (58%)	42 (53%)	0.46
T	42 (42%)	38 (48%)	

表2 *ADAR1* rs2229857のGenotypeおよびAllele頻度

	Control群	SSPE群	P値
Genotype頻度			
AA	26 (53%)	20 (50%)	0.73
AG	19 (39%)	20 (50%)	
GG	4 (8%)	0 (0%)	
Total	49	40	
Allele頻度			
A	71 (72%)	60 (75%)	0.70
G	27 (28%)	20 (25%)	

表3 *CD209* rs735239のGenotypeおよびAllele頻度

	Control群	SSPE群	P値
Genotype頻度			
AA	39 (78%)	29 (73%)	0.69
AG	9 (18%)	10 (25%)	
GG	2 (4%)	1 (3%)	
Total	50	40	
Allele頻度			
A	87 (87%)	68 (85%)	0.70
G	13 (13%)	12 (15%)	

図1 樹立されたSSPE患者由来iPSC

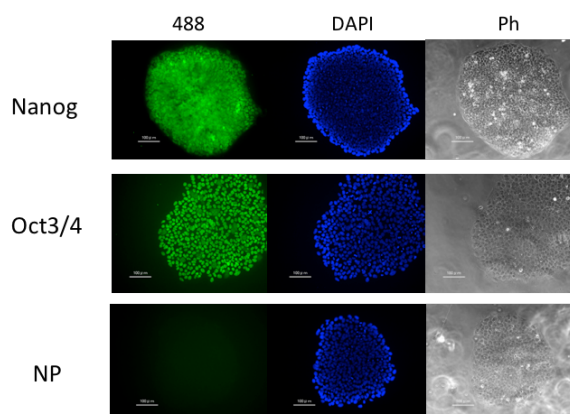


図2 樹立されたSSPE患者由来神経幹細胞 (day 12)

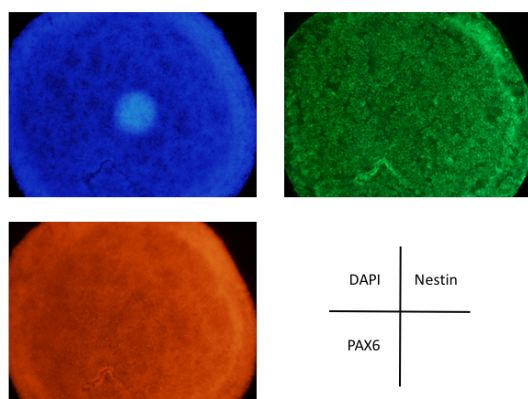


図3 樹立されたSSPE患者由来神経幹細胞 (day 17)

