

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591258

研究課題名（和文）RS ウイルス感染症の重症化に関係するホストの遺伝子変異に関する研究

研究課題名（英文）A study on host gene mutations associated with severity of RSV infection

研究代表者

堤 裕幸 (TSUTSUMI HIROYUKI)

札幌医科大学医学部教授

研究者番号：80217348

研究成果の概要：

本研究では、本邦の乳幼児の RSV 感染症の重症度と、ホストの TLR4、IL-4、IL-4R α 、IL-10、RANTES など自然免疫に関係する TLR、サイトカイン、ケモカイン遺伝子の多型との関係について明らかにすることを目的とした。札幌医科大学小児科学教室で 1980 年以降 20 数年間にわたって保存されている RS ウイルス下気道炎に罹患した乳幼児の臨床レコードを掘り起こし、先ず、RSV 細気管支炎、RSV 肺炎など下気道炎のリスクファクターとして明らかになっている事柄について検討した。つまり、早産未熟児であったか、先天性心疾患を有していたか、あるいは新生児期に呼吸障害を呈し慢性肺疾患などであったかなどである。それら、明らかなリスクファクターを有している乳幼児を除いた児 50 症例を対象としてピックアップした。対照群としては RSV 感染で受診歴の無い幼児、つまり RSV 感染が軽症に経過したと考えられる幼児 50 名を当てた。

次に、対象としてピックアップされた乳幼児より分離・保存された RSV、あるいは気道分泌液から抽出された RNA から、PCR により RSV のエンベロップ蛋白の一つで変異に富む G 蛋白遺伝子を検出し、PCR 産物のダイレクトシーケンス法より、RSV の遺伝子型（グループ A, A1～A7；グループ B, B1～B4）の決定を行った。しかし、特定の RSV 遺伝子型と RSV 感染重症例との関係は明らかでなかった。

次に、気道分泌液よりホストの DNA を抽出し、自然免疫応答のキーとなる TLR4 の遺伝子の LPS への反応性を低下させる 1 塩基置換（SNPs）（Asp299Gly、Thr399Ile）について、PCR 産物のダイレクトシーケンス法にて解析した。更に変異の頻度について検討したが RS ウイルス重症群と対象群との間にはいずれの遺伝子変異についても有意な違いを認めることはできなかった。現在、RS ウイルス感染症の重症化への関与が考えられているサイトカイン・ケモカインの遺伝子、つまり IL-4（-590 アリル）、IL-4R α （Q551R）、IL-10（-592C、-592A）、RANTES（-2459G、-2254T）等の SNPs についても同様に PCR 産物のダイレクトシーケンス法により検討を進めているが、やはり重症群と対照群の間には有意な差を認めることはできていない。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：RS ウイルス、分子疫学、細気管支炎、TLR4、IL-4

1. 研究開始当初の背景

急性細気管支炎 (bronchiolitis) は幼弱乳児を頻繁に襲う、生命を奪う危険のある呼吸器疾患であり、その多くが RS ウイルス (以下 RSV) 感染によるとされる。その殆どの乳児が回復するが、その後長期にわたり喘鳴を繰り返すというリスクを負う。RSV 感染症は 2 歳までにほぼ 100% の乳児が罹患し、そのうち 20-30% が細気管支炎を初めとした下気道炎を呈するとされる。

米国と欧州では細気管支炎により 1 歳未満乳児の 1,000 人当たり約 30 人の入院があるとされる。本邦においてもほぼ同様で、全国で 1 年間に 2~3 万人の乳幼児が入院治療を受けると推定される。ハイリスクグループは生後 6 週未満の乳児、未熟児であり、先天性心疾患や慢性呼吸器疾患、神経疾患、免疫不全症を有する児である。アレルギー素因の有無が RSV 感染症の重症化と関係するかどうかは明らかになっておらず、ホストの他の遺伝的背景、特に近年、注目を浴びている自然免疫に関係するホストの遺伝子多型と RSV 感染症の重症化に与える影響についての検討が不十分である。

2. 研究の目的

最近、アレルギーに関係が深いサイトカインである IL-4、その受容体である IL-4R α をコードする遺伝子の多型と RSV 細気管支炎との関係が明らかにされた。これは Th2 細胞が RSV 細気管支炎と関係していることを示すものでもある。また、IL-10 や RANTES 遺伝子多型と RSV 感染症の重症化との関係も明らかとなった。更に RSV の F 蛋白がリガンドとなり、自然免疫応答を開始させるといわれる TLR4 の遺伝子多型との関係も明らかにされてきた。この様なホストのサイトカインや TLR 遺伝子の多型と疾患の重症度との関係については人種的な背景を考慮することが必要であるが、本邦の乳幼児を対象とした研究は全くなされていない。本研究では、本邦の乳幼児の RSV 感染症の重症度と、IL-4、IL-4R α 、IL-10、RANTES、TLR4 遺伝子多型との関係について明らかにする。

当教室では、1980 年以降 20 数年間にわたって RSV 下気道炎に罹患した乳幼児の臨床レコードを保存している。また、RSV 分離株、あるいはウイルス遺伝子の保存を継続している。それらを詳細に解析することで、他のリスクファクターの無い症例を選び出すこ

とが可能である。それらの児のサイトカイン、TLR4 遺伝子などの良く見られる変異の有無を判定する。続いて RSV 感染症の重症度との関係について、対照群との間で統計学的な検討を行い、本邦の乳児に特異的な RSV 下気道炎への疾患感受性遺伝子を同定する。これらが明らかになれば、本邦の乳児を対象とした特異抗体や、ロイコロリエン受容拮抗剤などによる RSV 感染症の予防・治療における介入の可能性が出てくると考えられる。

3. 研究の方法

平成 19 年度

まず、当教室で 1980 年以降 20 数年間にわたって保存している RSV 下気道炎に罹患した乳幼児の臨床レコードを掘り起こし、RSV 下気道炎のリスクファクターとして明らかになっている物の有無について詳細に検討する。つまり、未熟児であったか、慢性肺疾患や先天性心疾患の有無などである。それら、明らかなリスクファクターを有している乳幼児を除いた児を対象とし、ピックアップする。症例数としては 100 名前後を想定している。また、対照群としては RSV 感染で受診歴の無い幼児、つまり RSV 感染が軽症に経過したと考えられる幼児 50 名を当てる。

次に、対象としてピックアップされた乳幼児より分離・保存された RSV、あるいは気道分泌液から抽出された RNA よりの RSV 遺伝子を用いた PCR・ダイレクトシーケンシング法より、RSV の遺伝子型 (グループ A, A1~A7; グループ B, B1~B4) を決定する。これには当教室の Seki ら、Kuroiwa らの方法を用いる。ここで、特定の遺伝子型への偏りについて解析し、本邦乳幼児の RSV 下気道炎の重症化に関与するウイルス側の遺伝的背景について検討する。

平成 20 年度

次に、ホストの IL-4、IL-4R α 、IL-10、RANTES、TLR4 をコードする遺伝子の変異、つまり翻訳領域、非翻訳領域、もしくは調節領域の 1 塩基置換 (SNPs) について検索する。IL-4 については Hoebee らの方法により、喘息との関係が深いとされるプロモーター領域の -590 アリルについて検索する。IL-4R α についても Hoebee らの方法により、重症の喘息、アトピーとの関係が深いとされる Q551R polymorphism について検索する。IL-10 多型についてはやはり Hoebee らの方法によ

り、高いプロモーター活性を示す-592C、-592A の homozygote について検索する。RANTES 遺伝子については Hu11 らに準じ、高いプロモーター活性を有する-2459G、-2254T 変異の有無について検索する。最後の TLR4 については Tal らに準じ、LPS への反応性を低下させるという、common な変異 (Asp299Gly, Thr399Ile) について検討する。これらの変異について、対象群と対照群との有意差検定を行い、本邦乳幼児の RSV 重症化の遺伝的背景について明らかにする。

4. 研究成果

札幌医科大学小児科学教室で 1980 年以降 20 数年間にわたって保存されている RS ウイルス下気道炎に罹患した乳幼児の臨床レコードを掘り起こし、RSV 歳気管支炎、RSV 肺炎など下気道炎のリスクファクターとして明らかになっている事柄について検討した。つまり、早産未熟児であったか、先天性心疾患を有していたか、あるいは新生児期に呼吸障害を呈し慢性肺疾患などであったかなどである。それら、明らかなリスクファクターを有している乳幼児を除いた児を対象としてピックアップした。症例数としては当初 100 名前後を想定していたが、臨床レコードが不備な者もあるため、最終的には 50 例前後となった。対照群としては RSV 感染で受診歴の無い幼児、つまり RSV 感染が軽症に経過したと考えられる幼児 50 名を当てた。

次に、対象としてピックアップされた乳幼児より分離・保存された RSV、あるいは気道分泌液から抽出された RNA から、PCR により RSV のエンベロープ蛋白の一つで変異に富む G 蛋白遺伝子を検出し、PCR 産物のダイレクトシーケンス法より、RSV の遺伝子型 (グループ A, A1~A7; グループ B, B1~B4) の決定を行った。重症群と対照群それぞれについて数株づつ程度が、A1~A7、B1~B4 に属したが、特定の RSV 遺伝子型と RSV 感染重症例との関係は明らかでなかった。

次に、気道分泌液よりホストの DNA を抽出し、自然免疫応答のキーとなる TLR4 の LPS への反応性を低下させる遺伝子の 1 塩基置換 (SNPs) (Asp299Gly, Thr399Ile) について、PCR 産物のダイレクトシーケンス法にて解析した。重症群と対照群においてそれぞれ数%に変異がみられた。両方の変異とも重症群における変異の率がやや高かったが、統計学的に有意な違いを認めることはできなかった。更に、現在、RS ウイルス感染症の重症化への関与が考えられているサイトカイン・ケモカインの遺伝子、つまり IL-4 (-590 アリル)、IL-4R α (Q551R)、IL-10 (-592C、-592A)、RANTES (-2459G、-2254T) 等の SNPs についても同様に PCR 産物のダイレクトシーケンス法により検討を進めているが、現在

までのところ、やはり重症群と対照群との間には有意な差を認めることはできていない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. 堤 裕幸、特集 小児ウイルス感染症の現状、序—今、小児ウイルス感染症では何が問題か?何が話題か?、化学療法の領域 24:18-19,2008
2. 堤 裕幸、第 39 回日本小児感染症学会教育講演 3、RS ウイルス感染症と喘鳴・喘息、小児感染免疫 20:206-212,2008
3. 堤 裕幸、特集 RS ウイルス感染症、病原微生物検出情報 29:271-274,2008
4. 堤 裕幸、小児疾患診療のための病態生理 1、RS ウイルス感染症、小児内科 40:1168-1172,2008
5. Shingai M, Azuma M, Ebihara T, Sasai M, Funami K, Ayata M, Ogura H, Tsutsumi H, Matsumoto M, Seya T. Soluble G protein of respiratory syncytial virus inhibit Toll-like receptor 3/4 mediated IFN-beta induction. Int Immunol 42:374-380, 2008
6. Tanaka K, Hori T, Hatakeyama N, Yamamoto M, Takayama R, Yoto Y, Suzuki N, Hayashi T Ikeda Y, Ikeda H, Ishida T, Tsutsumi H. Quantification of BK polyoma viruria in Japanese children and adults with hemorrhagic cystitis complication stem cell transplantation. J Med Virol 80:2108-2112,2008
7. 堤 裕幸 RS ウイルス感染症、新感染症学(下)、日本臨床 65:384-388,2007
8. 堤 裕幸 RS ウイルス感染症 —最近のトピックスも含めて 感染と抗菌薬 10:301-307,2007
9. 堤 裕幸 RS ウイルス感染症 Sysmex Journal Web 8:1-12,2007
10. 堤 裕幸、RS ウイルスと気道疾患、アレルギー 56:1493-1497,2007
11. 永井和重、堤 裕幸、特集：冬のウイルス感染症、IIRS ウイルス感染症、RS ウイルス感染症総論、小児科診療 70:2237-2241,2007

[学会発表] (計 4 件)

1. 堤 裕幸、教育講演 RS ウイルス感染症の疫学と病態、第 41 回日本小児呼吸器疾患学会 2008 年 10 月 3 日、函館
2. 堤 裕幸、会頭講演 感染免疫から見た親と子、そして社会の絆、第 55 回日本小

- 児保健学会 2008年9月25日, 札幌
3. 堤 裕幸、招請講演 RSウイルスと気道疾患 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会 2007年6月10日, 横浜
 4. 堤 裕幸、教育講演 小児ウイルス性呼吸器感染症の最近の話題, 第81回日本感染症学会 2007年4月10日, 京都

[図書] (計4件)

1. 堤 裕幸、モノクローナル抗体、KEYWORD 感染症(第2版)、先端医学社 p 274-275,2008
2. 堤 裕幸、第8章呼吸器疾患、小児科学・新生児学テキスト(第5版)、診断と治療社 p 371-391,2007
3. 堤 裕幸、Ⅲ特殊な状況下の感染症、E胎児感染症、小児感染症学 診断と治療社 p 175-180,2007
4. 堤 裕幸、1呼吸器疾患 気管支炎・肺炎、小児科診療ガイドライン、総合医学社 p 12-15,2007

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)
無し

○取得状況 (計0件)
無し

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堤 裕幸 (TSUTSUMI HIROYUKI)
札幌医科大学医学部・教授
研究者番号：80217348

(2) 研究分担者

本間 真二郎 (HONMA SHINJIRO)
札幌医科大学医学部・助教
研究者番号：00404658

(3) 連携研究者

無し