

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860888

研究課題名(和文) HHV-6と内側側頭葉てんかんの関連解析

研究課題名(英文) The analysis between HHV-6 and medial temporal lobe epilepsy

## 研究代表者

河村 吉紀 (KAWAMURA, Yoshiki)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：30581475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：難治性てんかんである内側側頭葉硬化症(MTS)とヒトヘルペスウイルス6(HHV-6)の関連を解析するため難治性てんかんで脳外科手術を受けたMTS症例と非MTS症例の脳検体を用いて研究を行った。HHV-6以外のヒトヘルペスウイルス7つも同時に解析したところHHV-6が75名中27名と最も多く検出され、HHV-6のウイルスDNA量はMTSと非MTSと比較するとMTSで有意に高値に検出された。

MTS患者においてHHV-6検出群と非検出群で患者の遺伝子発現を比較したところ、検出群で有意に高値な遺伝子発現のあるものを認め、HHV-6感染によるMTS発症の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed brain samples of intractable epilepsy patients who took neurosurgery in order to elucidate association between mesial temporal lobe sclerosis (MTS) which is intractable epilepsy and human herpesvirus 6 (HHV-6). HHV-6 was the most detected virus in 8 human herpesviruses. And HHV-6 DNA loads were significantly higher in the MTS than non-MTS patients.

Some host gene expressions were significantly higher levels in MTS patients with HHV-6 than those without HHV-6. These results suggested that the association between MTS and HHV-6.

研究分野：小児科

キーワード：ヒトヘルペスウイルス6 内側側頭葉硬化症 宿主遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトヘルペスウイルス 6B(HHV-6B)初感染(突発疹)臨床像は一般的に予後良好であるが、合併症として熱性痙攣や脳炎・脳症といった中枢神経系合併症を引き起こすことが知られている。我々の以前の研究で、熱性痙攣合併例は特に複雑型熱性痙攣をともなう頻度が高いことが明らかとなっているが、今回の研究対象である内側側頭葉てんかん(MTLE)の原因として、複雑型熱性痙攣をはじめとした乳幼児期の痙攣持続による海馬硬化が重要な役割を果たしていることが示唆されている。米国 NIH のグループからも内側側頭葉てんかん(MTLE)や多発性硬化症などの神経疾患への本ウイルスの関与が報告されている。また、HHV-6B は他のヘルペスウイルス同様初感染後、潜伏感染し宿主が免疫抑制状態に陥った際に再活性化し、移植後辺縁系脳炎の主要な病原ウイルスとなることがわかってきており、我々の real-time PCR 法による解析でも移植後 HHV-6B 脳炎患者髄液には大量のウイルス DNA が存在することが明らかとなった。さらに移植後 HHV-6B 脳炎剖検例についての病理学的解析で、HHV-6B ゲノムや抗原が海馬から検出されることから考えると、本ウイルスが初感染後中枢神経系、特に海馬に潜伏感染し、時に再活性化し MTLE や移植後辺縁系脳炎の発症に重要な役割を演じている可能性が考えられる。また、以前当研究室で実施された、グリア細胞での HHV-6B 持続感染、再活性化系を用いた解析で、HHV-6B の潜伏感染、再活性化がグリア細胞での炎症性サイトカイン遺伝子発現、合成促進に関与していることが示されていることから、海馬での HHV-6B 潜伏感染、再活性化が海馬硬化の原因となる可能性は高い。

MTLE は薬剤抵抗性の難治性てんかんで、病理学的所見としては内側側頭葉硬化症(MTS)が主であり患者 QOL を改善するため

側頭葉前部切除術や選択的扁桃核海馬切除術などの外科的治療も行われている。よって、最終的な本疾患患者予後の改善を目指し、MTLE 発症における HHV-6B の役割を明らかにすることで新規治療法開発につなげることを着想した。更に、最近我々は HHV-6B の潜伏感染と再活性化を区別する方法として、ウイルス複製の際に発現する HHV-6B 前初期、後期遺伝子を定量的に検出する real-time RT-PCR 法を開発し、この方法を用いることにより、海馬を含む脳での HHV-6B の再活性化が起きているかどうかを明らかにすることが可能となり、中枢神経系での HHV-6B の感染病態を解明する上での極めて有用なツールを得た。

## 2. 研究の目的

本研究では、MTLE 患者から手術にて摘出された脳検体を用いて、HHV-6B DNA 及び mRNA を検出し、MTLE 患者脳組織中での HHV-6B 潜伏感染、再活性化について解析するとともに、Taqman Gene Expression Assay を用いた宿主脳組織での網羅的遺伝子発現解析を行い、MTLE の病態形成における HHV-6B の役割、分子メカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

1) 静岡てんかん・神経医療センター脳神経外科松田一巳先生から難治性てんかん患者の脳手術検体の供与を受ける(本施設、静岡てんかん・神経医療センター倫理委員会承認済(No.10-177))。

2) 脳検体から DNA 抽出を行い、real-time PCR 法により HHV-6B DNA 量を測定する。その他のヒトヘルペスウイルス(単純ヘルペス 1 型・2 型、水痘帯状疱疹ウイルス。サイトメガロウイルス、EB ウイルス、HHV-7、HHV-8)も同様に real-time PCR 法にてウイルス DNA 量を測定した。

3) 脳検体から mRNA 抽出後 cDNA を合成、

real-time RT-PCR 法による HHV-6B mRNA 発現解析。

4) 3)で合成された cDNA から、Taqman Gene Expression Assay を用い、HHV-6B 感染有、無群で宿主遺伝子発現(サイトカイン: IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12b, TNF-, IFN-, ケモカイン: MCP-1, MIG, RANTES、神経系マーカー: NF-L, S100B, GFAP, Iba1, PLP1, MBP, NGF, BDNF, c-fos, Fyn, GRIN1, GLUT1)を比較する。

5) 1)から 4)で得られた結果、さらに臨床情報、脳の病理所見を総合し脳組織での HHV-6B 感染と MTLE 発症との関連性を解析する。

#### 4. 研究成果

症例はが MTS が 52 例、非 MTS が 23 例であり臨床徴候としては熱性けいれんの既往が MTS 群で非 MTS 群に比し有意に高値であり ( $P=0.001$ )、性差、てんかん発症年齢、手術時年齢、術前知能指数、頭部外傷・中枢神経感染症の既往に有意差は認めなかった。

脳検体中のウイルス DNA に関しては HHV-6 が 75 例中 27 例と最多で検出され、他のヘルペスウイルスの検出数は 0 から 4 例と少数であった。また HHV-6 のウイルス DNA 量に関して、MTS が非 MTS に比較して有意に高値であった(中央値/interquartile range(IQR); 19.1/0.0-89.2 vs 0.0/0.0-0.0/ $\mu\text{gDNA}$ ;  $P=0.004$ )。HHV-6B mRNA は全検体で検出感度以下であった。

また MTS 群の海馬、扁桃体において HHV-6 DNA 検出群と非検出群のサイトカイン、ケモカイン、神経系マーカーの遺伝子発現を比較に関しては、扁桃体において HHV-6 検出群で MCP-1( $P=0.029$ )、GFAP( $P=0.043$ )の発現が有意に高値を示し、さらに HHV-6 ウイルス DNA 量とこれら 2 つの宿主遺伝子発現量に正の相関を認めた (MCP=1:  $P=0.033$ 、GFAP:  $P<0.001$ )。

本研究の結果から HHV-6 の検出された MTS においては HHV-6 感染による宿主の遺伝子発現の変化が疾患発症に関与している可能性が示唆された。今後、本疾患発症の予防あるいは進行抑制に関して抗ウイルス療法あるいは抗サイトカイン療法の有効性を検討する必要がある。

#### 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 1 件)

Yoshiki Kawamura, Ai Nakayama, Taichi Kato, Hiroki Miura<sup>1</sup>, Naoko Ishihara, Masaru Ihira, Yukitoshi Takahashi, Kazumi Matsuda and Tetsushi Yoshikawa  
Pathogenic Role of Human Herpesvirus 6B Infection in Mesial Temporal Lobe Epilepsy  
The Journal of Infectious Disease、査読有、Epub ahead of print

[学会発表](計 9 件)

河村吉紀、内側側頭葉硬化症発症におけるヒトヘルペスウイルス 6B の役割、第 45 回小児感染症学会総会・学術集会、平成 25 年 10 月 26~27 日、札幌、札幌コンベンションセンター

河村吉紀、内側側頭葉硬化症発症におけるヒトヘルペスウイルス 6B の役割、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、平成 25 年 11 月 10~12 日、神戸、神戸国際会議場

河村吉紀、内側側頭葉硬化症発症におけるヒトヘルペスウイルス 6B の役割、第 18 回日本神経感染症学会総会学術集会、平成 25 年 10 月 11~12 日、宮崎、シーガイアコンベンションセンター

河村吉紀、三浦浩樹、井平勝、高橋幸利、松田一己、吉川哲史、内側側頭葉硬化症におけるヒトヘルペスウイルス 6B の役割、第 19 回日本神経感染症学会総会学術集会、平成 26

年 9 月 4 日、金沢、歌劇座

Yoshiki Kawamura, Hiroki Miura, Naoko Ishihara, Masaru Ihira, Yukitoshi Takahashi, Kazumi Matsudam, Tetsushi Yoshikawa, Pathogenic Role of Human Herpesvirus 6B Infection in Mesial Temporal Sclerosis, The 48<sup>th</sup> Congress of the Japan Epilepsy Society, 平成 26 年 10 月 2 日、東京、京王プラザホテル

Yoshiki Kawamura, Hiroki Miura, Naoko Ishihara, Masaru Ihira, Yukitoshi Takahashi, Kazumi Matsudam, Tetsushi Yoshikawa, Pathogenic Role of Human Herpesvirus 6B Infection in Mesial Temporal Sclerosis, IDWeek 2014, 平成 26 年 10 月 8 ~ 12 日、Philadelphia、ペンシルバニアコンベンションセンター

Yoshiki Kawamura, Hiroki Miura, Naoko Ishihara, Masaru Ihira, Yukitoshi Takahashi, Kazumi Matsudam, Tetsushi Yoshikawa, Pathogenic Role of Human Herpesvirus 6B Infection in Mesial Temporal Sclerosis, 39<sup>th</sup> Annual International Herpesvirus Workshop 2014, 平成 26 年 7 月 19 ~ 23 日、神戸、神戸コンベンションセンター

河村吉紀、三浦浩樹、井平勝、吉川哲史、内側側頭葉てんかんにおけるヒトヘルペスウイルス 6B の役割、第 53 回日本臨床ウイルス学会、平成 26 年 6 月 14 日、札幌、ロイトン札幌

河村吉紀、三浦浩樹、井平勝、高橋幸利、松田一己、吉川哲史、内側側頭葉硬化症におけるヒトヘルペスウイルス 6B の役割、第 117 回日本小児科学会学術集会、平成 26 年 4 月 12 日、名古屋、名古屋国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特記事項なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

河村 吉紀 (KAWAMURA, Yoshiki)  
藤田保健衛生大学・医学部・助教  
研究者番号 : 30581476

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし