

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19613

研究課題名(和文) ヒトヘルペスウイルス6B感染児におけるCD134発現T細胞の証明

研究課題名(英文) Analysis of CD134 expression on T cell in febrile infants with primary human herpes virus 6B infection

研究代表者

長坂 美和子 (NAGASAKA, MIWAKO)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：70723998

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)： 研究には0-4歳までの発熱患者より採取した末梢血を用いた。末梢血より末梢血単核球細胞を分離し、一部は抗CD134抗体を用いてフローサイトメトリーを行い、CD134分子発現の有無を確認した。また一部はDNAを抽出し、PCR法によりウイルスDNAの検出を行った。HHV-6B抗体価は血清もしくは血漿を用いて測定し、HHV-6B DNAが陽性かつ抗体価が陰性的の場合にHHV-6B初感染と診断した。延べ230検体を解析し、HHV-6B初感染と診断したのは30例、このうちCD134分子の高発現を認めたのは1例のみであった。

研究成果の概要(英文)： Blood samples from 230 febrile patients 0-4 years of age were used for this study. From whole blood samples, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated. We checked expression of CD134 using flow cytometry. DNA was extracted from the PBMCs, then we detected viral DNA by polymerase chain reaction technique. Antibody titers of HHV-6 IgG were measured by indirect immunofluorescence assays using serum/plasma samples. Febrile patients were considered to have primary HHV-6B infection when HHV-6B DNA was positive and HHV-6 IgG was negative. Of the 230 febrile patients, 30 patients were diagnosed with primary HHV-6B infection and one of them was observed highly expression of CD134 on T cell.

研究分野：小児科学

キーワード：ヒトヘルペスウイルス6B CD134分子 突発性発疹症

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトヘルペスウイルス 6 (Human herpesvirus 6; HHV-6) は、ヘルペスウイルス亜科に属するヘルペスウイルスであり、ヒトのみを自然宿主とする DNA ウイルスである。塩基配列、細胞向性などの違いにより 2 つのバリエーション HHV-6A および HHV-6B に分けられている。

HHV-6B の初感染の多くは乳幼児において突発性発疹を引き起こす。一般的には予後良好といわれているが、中枢神経系合併症として HHV-6 脳炎/脳症の発症が報告されている。我が国の報告では年間約 150-200 例程度発生し、その半数程度が重篤な神経学的後遺症を残す。また、臓器移植後やエイズ患者などの免疫不全宿主において、再活性化し脳炎/脳症・肝炎の発症を引き起こすことや HHV-6B の再活性化により重症薬剤過敏性症候群を引き起こすことが多数報告され、死亡例も発生している。このように HHV-6B 感染による合併症は予後に大きく影響を及ぼすため、HHV-6 の病原性発症機序の解明や治療法の確立は急務である。

HHV-6B 感染に伴う重篤な合併症の発症機序や治療法を考えるためには、まず、HHV-6B 自体の感染成立機序を明らかにしておくことが必要である。以前から HHV-6B は T 細胞、特に活性型 CD4 + T 細胞に細胞向性を持つことが知られていたが、その感染成立の機序は不明であった。我々は、2013 年に HHV-6B の宿主レセプターが CD134 であることを発見した (Tang, Mori, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013)。CD134 は分子量 35kDa の型膜貫通タンパクで、腫瘍壊死因子 (TNF) 受容体スーパーファミリーの一つである。ヒトでも HHV-6 の初感染により、CD134 が CD4 + T 細胞で高発現する可能性が高い。しかし、実際に HHV-6B 初感染をおこした児の血液で CD134 が高発現していることを証明した

報告はない。

### 2. 研究の目的

HHV-6B の初感染時に発症し、患者数の多い突発性発疹症患者の T 細胞で CD134 が実際に高発現していることを証明することである。

本研究により、実際のヒトにおいても、HHV-6B の感染成立に CD134 が関連していることが明らかになる。その成果は CD134 を標的としたヒト HHV-6 感染に対する分子標的療法に応用できる。それにより、現在、有効な治療法が確立されていない HHV-6 脳炎/脳症患者の初めての治療法の開発へと発展し、その予後を大きく改善できる可能性がある。さらに、ワクチンなどの予防薬の開発につながる事が期待できる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 対象、検体の採取・保存、臨床データ収集

対象は、神戸大学医学部附属病院小児科または神戸こども初期急病センターを受診した児のうち、発熱を主訴に受診した児 (事前に家族に研究の主旨を十分に説明し、同意を得た) ウイルス感染の診断は、病歴の聴取、採血による白血球数、特にリンパ球の増加や C 反応性タンパク (CRP) の評価を行い判断した。その他、患者の病歴や臨床情報を収集した。

#### (2) HHV-6B の分離やゲノム DNA の検出を行い、HHV-6B 感染の確認

発熱を主訴に受診し、ウイルス感染症を疑う乳幼児の血液から、末梢血単核球を分離し、この単核球からこれ単独あるいは臍帯血のリンパ球との共培養により IL-2、PHA などの試薬を加えて培養し HHV-6 の分離を行った。PCR 法にてゲノム DNA の検出を行った。さらに、血清診断として間接蛍光抗体法による HHV-6 IgG 測定を行った。

### (3) T細胞での CD134 発現解析

HHV-6B 感染の証明された単核球において、CD134 に特異的な蛍光色素で標識した抗体を用い、フローサイトメトリーによるサブセット解析を行い、CD134 が発現しているかを確認した。

### (4) HHV-6B 初感染児の T細胞における CD134 の発現解析

HHV-6B が検出された児と検出されず HHV-6B 以外のウイルス感染と診断され児の 2 群にわけ、これらの T細胞において細胞表面分子である CD134 の発現に違いがみられるかを比較検討した。

## 4. 研究成果

研究期間中に発熱を主訴に受診した患者よりのべ 230 検体を採取し、全例で末梢血単核球を分離し、フローサイトメトリーによる CD134 発現解析、DNA 抽出を行った。また血清・血漿を用いて間接蛍光抗体法による抗体価測定、Bio-Plex®によるサイトカイン測定を行った。HHV-6B 初感染の定義は、PCR 法によりウイルス DNA が検出され、かつ抗体価が 40 倍未満であるものとした。今回の研究で、HHV-6B 初感染と診断されたのは 230 例のうち 30 例であった。その中で 4 例のみウイルス分離に成功した。フローサイトメトリーにより CD134 の発現が確認できたのは 230 例中 6 例であり、HHV-6B 初感染かつ CD134 の発現を認めたのは 1 例のみであった。

今回の結果からは HHV-6B 初感染児の T細胞において CD134 が高発現しているかどうかはわからなかった。CD134 は HHV-6B の宿主側レセプターであり、ウイルスが細胞に感染する際に、ウイルスと結合しエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる。そして、ウイルスは細胞内で増殖し、血液中に放出されウイルス血症となるわけであるが、発熱期はすでにウイルス血症の時期であり、CD134 はすでに細胞内に取り込まれてしまっている

可能性が高い。よって、発熱期ではなく潜伏期の段階で検体を採取することができれば CD134 の発現を確認できる可能性があるが、潜伏期には特に症状もなく、また病院を受診することもないためその検体の採取は困難であり、実際に検証することは難しいと考える。今回実際に HHV-6B 初感染時に CD134 の発現が認められた症例は 2 か月児であり、発熱初期に検体を得られたことが CD134 発現を捉えることができた要因かもしれない。

今回、血清を用いてサイトカイン測定も行った。HHV-6B 初感染時には IL-6、MCP-1 をはじめ、種々のサイトカイン上昇の報告されている。今回我々は、HHV-6B 初感染児 25 検体を用いて、Bio-Plex®による 40 種類のサイトカイン測定を行い、非 HHV-6B 感染群のサイトカイン動態と比較検討した。HHV-6B 初感染児で有意に上昇を認めたのは CXCL-11 である。CXCL-11 は IFN- $\gamma$  の刺激によって誘導され、活性化 T細胞に対して遊走作用をもつケモカインである。HHV-6B は活性化 T細胞に感染することから、CXCL-11 の上昇により活性化 T細胞が局所に遊走され、感染の進展をひきおこしている可能性が示唆された。

## 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)  
Nagasaka M, Morioka T, Mori Y et al.  
Comprehensive analysis of serum cytokines/chemokines in febrile children with primary human herpes virus-6B infection. *Journal of Infection and Chemotherapy*.(査読あり),  
Vol22,2016,593-598  
DOI:10.1016/j.jiac.2016.05.010

[学会発表](計 1 件)  
Nagasaka M  
Serum level cytokine/chemokine during primary infection of HHV-6B  
9<sup>th</sup> International conference on HHV-6&7

9-11 November, 2015  
Boston (America)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

長坂 美和子 (NAGASAKA, Miwako)  
神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員  
研究者番号：70723998

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )