

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659525

研究課題名(和文)川崎病・白血病・HTLV感染・慢性疲労症候群における内因性レトロウイルスの活動性

研究課題名(英文)Activity of human endogenous retrovirus in Kawasaki disease, leukemia, HTLV-1 infection or chronic fatigue syndrome

研究代表者

森内 浩幸(MORIUCHI, HIROYUKI)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：90315234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト内因性レトロウイルス(HERV)が川崎病の発症病態に関与する可能性を追求した。川崎病ではスーパー抗原(SA)が患児の免疫系を異常に活性化させると考えられ、細菌由来SAの関与についてはよく調べられている。本研究ではEBウイルス[EBV]感染によるHERV関連SAの誘導がV<sub>β</sub>7陽性T細胞を活性化させることが、川崎病の原因の一つとなっていると仮説を立てた。V<sub>β</sub>7発現率は川崎病群全体としては対照群と比べ大差なかったが、一部の患児ではその発現が高くEBV血症をしばしば伴っていた。発現が低い患児ではEBV血症を認めなかった。これは川崎病の一部においてEBV感染が発症に関与している可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：We investigated possible involvement of human endogenous retrovirus (HERV) in the etiology of Kawasaki disease (KD) that is hypothesized as a superantigen (SA) disease. While bacterial SAs have been extensively studied, this study has focused on HERV-associated SA, which is inducible upon EB virus (EBV) infection. Expression of V<sub>β</sub>7 that is induced by HERV-associated SA was comparable between control and KD patients as a whole. However, a subgroup of KD patients was shown to have larger population of V<sub>β</sub>7-positive T cells, and many of them had EBV viremia. In contrast, EBV viremia was not detected in those with less V<sub>β</sub>7-positive T cells. Our results suggest that EBV-induced HERV-associated SA may be involved in the etiology of a subgroup of KD patients.

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：小児感染症学 ウイルス学

## 1. 研究開始当初の背景

・私たちのゲノムの約1割はHERV、つまりもともとは外来性のレトロウイルスがゲノムの中に取り込まれてその一部となったもの(ヒトゲノムはレトロウイルスの墓場?)  
・ヒトへの進化の歴史はHERVがヒトゲノムに取り込まれる歴史?(特にHERV-Kは最近になってヒトゲノムに取り込まれたもので、ウイルス遺伝子の発現が起こりうるものが多く、中にはウイルス粒子を形成する能力が残っているものもある。)

近年HERVが様々な病態に関与していることがわかってきた!

1) HERV-K18のEnvにはスーパー抗原活性があり、EBV感染やインターフェロンによってその発現が誘導される。これによって各種自己免疫疾患が起こるかも?

(N.Sutkowski et al. Immunity 2001;15:579-89)

2) HIV患者ではHERV-Kの発現が亢進しており、しかもHIV感染の活動性に先行するような動向を示す。内因性と外因性のレトロウイルス間に相互作用がある?

(R.Contreras-Galindo et al. AIDS Res Hum Retroviruses 2007;23:1083-6)

## 2. 研究の目的

ヒト内因性レトロウイルス(HERV)がどのような疾患病態に影響を及ぼすのかを、川崎病(炎症性疾患)、急性白血病(悪性新生物)、HTLV感染(感染症)、そして慢性疲労症候群(非特異的慢性疾患)をモデルとして検討する。

## 3. 研究の方法

1) 川崎病患者の急性期にHERV-Kの発現が亢進し、かつ急性期の血清にスーパー抗原活性があるかどうかを明らかにする。合わせて、川崎病患儿の詳細な疫学的臨床的データを取り記録する。

急性期、回復期、および(該当する場合は)再燃時に採血し、血漿と単核球ペレットを採取し、一部からDNA/RNAを抽出後、凍結保存する。対照として、健康同胞および別の熱性疾患で入院の患儿からも採血する。

RNA検体を用い、real-time RT-PCRによりHERV-K mRNAレベルを算定する(J. Virol. Methods 2006;136:51-7)。

急性期、回復期、および(該当する場合は)再燃時に採血し、HERV-K系内因性レトロウイルスが発現する内因性スーパー抗原の刺激

によって増幅されるVB7陽性Tリンパ球の率をフローサイトメトリーによって算定する。

回復期患儿リンパ球に急性期血漿または回復期血漿を添加し、リンパ球増殖能や各種VBマーカー発現レベルをチェックする(Clin Immunol Immunopathol 1996;79:278-87)。

さらに「免疫グロブリン療法不応性の川崎病患儿 vs 反応良好な川崎病患儿」や「冠動脈病変を起こした川崎病患儿 vs 起こさなかった川崎病患儿」での比較検討も行う。

2) 急性白血病患者由来の白血病細胞におけるHERV-Kの活動性を調べる。白血病のタイプによって違いがあるかどうかを明らかにする。

急性白血病患者の詳細な疫学的臨床的病理学的データを取り記録する。

発症時、寛解導入後、および(該当する場合は)再発時に血液および骨髓液を採取し、一部からDNA/RNAを抽出後、凍結保存する。対照として、特発性血小板減少症で入院の患儿からも血液と骨髓液を採取する。

RNA検体を用い、real-time RT-PCRによりHERV-K mRNAレベルを算定する(J. Virol. Methods 2006;136:51-7)。

さらに白血病の病型別に比較検討する。

追加実験として、既存の白血病細胞由来細胞株またはラインからもHERV-K mRNAの検出と定量を行う。現在準備できている細胞は、Jurkat, A301, U937, BJAB等である。

3) HTLVキャリアから経時的に採取された血液検体におけるHERV-Kの活動性を調べ、HTLV viral loadとの相関の有無を明らかにする。またATL細胞におけるHERV-Kの活動性も明らかにする。

インフルエンザワクチン接種のために来院した時に採血し、一部からDNA/RNAを抽出後、凍結保存する。

RNA検体を用い、real-time RT-PCRによりHERV-K mRNAレベルを算定する(J. Virol. Methods 2006;136:51-7)。

DNA検体を用い、real-time PCRによりHTLV-I proviral loadを算定する(研究代表者らが長年実施している手技である)。

HTLV-I proviral loadとHERV-K mRNAレベルとの相関の有無を調べる。

追加実験として、既存のATL細胞からもHERV-K mRNAの検出と定量を行う。これらの細胞は長崎大学医学部附属原爆後障害研究

施設臨床部門（血液内科）より供与される。

4) 慢性疲労症候群患者から採取した血液検体における XMRV (原因ウイルス候補) 感染の有無と HERV-K の活動性ととの相関の有無を明らかにする。

患者の詳細な疫学的臨床的データを取り記録する。

活動期と回復期に採血し、血漿と単核球ペレットを採取し、一部から DNA/RNA を抽出後、凍結保存する。

RNA 検体を用い、real-time RT-PCR により HERV-K mRNA レベルを算定する (J. Virol. Methods 2006;136:51-7)。

DNA 検体を用い、real-time PCR により XMRV proviral DNA を検出する (Science online 2009. 1179052)。

両者の相関の有無を検討する。

#### 4. 研究成果

当初考えていた疾病モデルのうち、急性白血病および HTLV-1 キャリアについては、preliminary な研究で HERV-K mRNA の発現増加が認められなかったことからいったん休止とした。慢性疲労症候群については、XMRV の存在が実験室内 contamination による誤りであったことが報告され、研究の基盤となる事実が崩壊したことから中止とした。

そこで、本研究～ヒト内因性レトロウイルス (HERV) がどのような疾患病態に影響を及ぼすのか～の追求にあたり、川崎病 (炎症性疾患) をモデルとして検討した。

合計 70 人の川崎病患儿と 10 人の健康児、7 人のアレルギー性紫斑病患儿、2 人の新生児毒素性ショック症候群様発疹症 (NTED) 患儿を対象にフローサイトメトリーを行い、V 2 および V 7 の発現率を同定した。V 2 (細菌由来スーパー抗原が誘導) 陽性率は、川崎病患儿で  $3.7 \pm 1.5\%$  と、健康児の  $2.7 \pm 0.8\%$  やアレルギー性紫斑病患儿の  $2.4 \pm 0.6\%$  と比べると有意に高かった ( $p < 0.04$ ) が、NTED 患儿と比べるとずっと低かった。臨床病型別に比べてみると、BCG 痕発赤が認められた群で V 2 陽性率が  $4.0 \pm 1.6\%$  と、BCG 痕発赤が認められなかった群の  $3.1 \pm 0.9\%$  と比べ有意に高かった。また免疫グロブリン大量静注療法を繰り返す必要があった治療抵抗群では V 2 陽性率が  $2.9 \pm 1.2\%$  と治療反応群の  $3.8 \pm 1.5\%$  より有意に低かった。

一方、V 7 (HERV 関連スーパー抗原が誘導) の陽性率は全ての疾患群でと大差なかった。ただ、V 7 発現が高い患者 9 人と低い患者

51 名とで、末梢血単核細胞中の Epstein-Barr ウイルス (HERV 関連スーパー抗原の発現を誘導すると報告されている) DNA の検出・定量を real-time PCR で行ったところ、前者では 4 人 (44%) でウイルス血症 ( $21-540$  copies/ $1.0E+06$  cells) が認められたのに対し、後者では 3 人 (5.9%) に認めた ( $16-35$  copies/ $1.0E+06$  cells) のみであった。これは VB7 の発現に EB ウイルスが関与していることを示すデータであり、川崎病の一部において EB ウイルス感染が HERV の発現を誘導し、この内因性スーパー抗原が VB7 を誘導し、過剰な炎症反応を惹起している可能性を示唆する。

#### 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 2 件)

(1) T Shirakawa, K Ikeda, S Nishimura, H Kuniba, K Nakashima, H Motomura, Y Mizuno, M Zaitu, M Nakazato, T Maeda, Y Hamasaki, T Hara and H Moriuchi. Lack of association between E-selectin gene polymorphisms and risk of Kawasaki disease. Pediatrics International 54(4):455-60, 2012. 査読有 (DOI: 10.1111/j.1442-200X.2012.03608.x)  
(2) H Moriuchi, H Masuzaki, H Doi, S Katamine. Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1. Pediatric Infectious Disease Journal. 32(2):175-7. 2013. 査読有 (doi: 10.1097/INF.0b013e31827efc39.)

[学会発表] (計 0 件)

[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

森内 浩幸 (Moriuchi Hiroyuki)  
長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・教授  
研究者番号：90315234

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：