九州大学学術情報リポジトリ Kyushu University Institutional Repository

亜急性硬化性全脳炎(SSPE)の宿主側遺伝要因

楠原,浩一 九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野

https://doi.org/10.15017/12488

出版情報:福岡醫學雜誌. 99 (8), pp. 159-168, 2008-08-25. 福岡医学会

バージョン: 権利関係:

総説

亜急性硬化性全脳炎(SSPE)の宿主側遺伝要因

九州大学大学院医学研究院 成長発達医学分野

楠 原 浩 一

はじめに

亜急性硬化性全脳炎(subacute sclerosing panencephalitis, SSPE)は麻疹ウイルス(measles virus, MV)による中枢神経感染症の一つであり、麻疹罹患時に体内に侵入した MV が免疫系からの排除を逃れ、中枢神経系で持続感染を起こすことによって発症する。その発症機序には不明な点が多いが、ウイルス側と宿主側の要因、さらに環境要因が関与していると考えられる(図1).

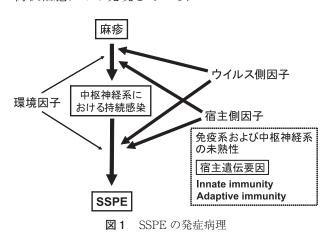
ウイルス側因子に関しては、SSPE 患者の脳から分離された MV は特有の遺伝子変異を有し感染性ウイルス粒子の形成能を欠くことが知られている。この性質が、SSPE の発症に関わっているのか、長い潜伏期間の間に変異が蓄積した結果であるのか、という点については明らかでない。

SSPE の発症に宿主側要因が関与していることを示唆する事実としては、2 歳未満での麻疹罹患では SSPE の発症リスクが高いことや SSPE 発症率の性差などが知られている $^{1/2}$). 一方,SSPE 患者の免疫学 的検討では,血清および髄液中の抗 MV 抗体価が高値であることや,中枢神経系だけでなく末梢血単核球 にも持続感染が成立することが報告されている $^{3/4}$). しかし,これまでに種々の免疫異常が報告されているものの,普遍的異常は未だ確立されていない.

我々は、SSPE 発症の宿主側要因を解明するために SSPE 患者における免疫学的・遺伝学的研究を行ってきたので、その成績を紹介する。

1. SSPE における MV レセプターの遺伝子解析

MV の細胞レセプターとして、これまで、実験室/ワクチン株のレセプターである CD46 と野生株、実験室/ワクチン株双方のレセプターである signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) が知られている。 CD46 が赤血球を除く全ての体細胞に発現しているのに対して、SLAM はリンパ球の一部と、単球、樹状細胞にのみ発現している。



SSPE の病変部では CD46 の発現が低下していることが報告されており 5)、CD46 が SSPE の病態に関与している可能性が示唆される。我々は、MV の細胞レセプターの遺伝子変化が SSPE の感受性に関与している可能性を検討した 6)。CD46 遺伝子の MV 結合部位である short consensus repeat (SCR) $^{-1}$, 2 をコードする exon 2 から 4 を含む翻訳領域を解析し、3 つの 1 塩基多型 (SNP) (C/T38、G/A176、C/T453)を見出した。前 2 者はアミノ酸置換を伴っていたが、MV 結合部位に存在するものは G/A176 のみであった。この 3 つ

の多型の頻度を SSPE 群と正常対照群で比較したが、両群間で特に差はみられず、 CD46 遺伝子の変化と SSPE との関連は否定的であった.

SLAM 遺伝子については,MV 結合部位である V domain を含む細胞外領域をコードする exon 1 から exon 3 を direct sequencing で解析した.exon 1 の多型については,Dde1 による RFLP で多数検体を調べた.SSPE20 例の direct sequencing では,leader sequence の 33C/A 多型をみとめたのみで,細胞外領域をコードする領域には塩基の変化をみとめなかった.また,33C/A 多型の頻度を SSPE 群と正常対照群で比較したが,両群間で特に差をみとめなかった.したがって,SLAM 遺伝子の変化も SSPE の発症には関連していないと考えられた.

2. SSPE における MxA 遺伝子の解析

MxA は、1型インターフェロン(IFN)である IFN- α 、 β によって誘導される抗ウイルス蛋白であり、ウイルスに対する innate immunity において重要な役割を果たしていると考えられている⁷⁾. MxA は、ヒト単球細胞株において MV の増殖を抑制することが知られているが⁸⁾、このような MV の増殖抑制は神経系の細胞においても観察され、その機序はウイルス遺伝子の転写抑制であると報告されている⁹⁾.

我々は MxA 遺伝子のプロモーター領域にある 2 つの SNP、-88G/T 多型と-123C/A 多型 10 について、SSPE 群と正常対照群の遺伝子型の決定を行った 11)。-88G/T 多型は Interferon-stimulated response element (ISRE)-like sequence 上にあるため、allele によって転写活性が変化する機能的多型であることが予

表1 SSPE 群および正常対照群における MxA promoter -88G/T 多型の頻度 $^{11)}$

| | Controls (%) (n=90) | SSPE (%) (n=40) | P-value |
|----------|------------------------|--------------------|---------|
| genotype | | | |
| G/G | 43 (48) | 16 (40) | NS |
| G/T | 41 (46) | 14 (35) | NS |
| T/T | 6 (6) | 10 (25) | 0.003 |
| allele | | | |
| G | 127(71) | 46 (58) | 0.040 |
| Τ | 53 (29) | 34 (42) | NS |

P values were calculated using 2 \times 2 chi square test. NS : not significant (P>0.05)

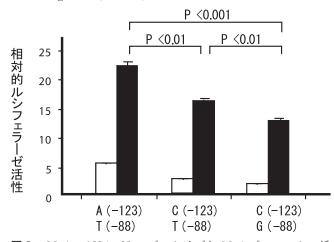


図2 *MxA* -123/-88 ハプロタイプと *MxA* プロモーター活性¹¹⁾
-123A/-88T, -123C/-88T, -123C/-88G を有する *MxA* のプロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼ発現プラスミドの転写強度(相対的ルシフェラーゼ活性)を IFN-a 添加の有無で比較. □:IFN-a 添加なし,
■:IFN-a 添加あり、エラーバーは標準偏差を示す.

想された。表 $1 \, \mathrm{c} - 88 \, \mathrm{G/T}$ 多型の解析結果を示す.遺伝子型では, $-88 \, \mathrm{o}$ 塩基がともに T であるホモタイプが正常対照群で $6 \, \mathrm{w}$ であるのに対し,SSPE 群では $25 \, \mathrm{w}$ を占め,有意に多かった.また,allele 頻度を両群間で比較しても SSPE 群での T allele の頻度が高いことが確認できた.一方, $-123 \, \mathrm{C/A}$ 多型の解析では,遺伝子型においても allele 頻度においても両群間に有意な差をみとめなかった.

正常対照者において-123と-88の多型のハプロタイプで頻度を推定したところ、C-Gが common なハプロタイプで7割近くを占め、A-Tは2割、A-Gは1割を占めていた。Hardy-Weinberg 平衡との比較から、この二つの多型は連鎖不平衡にあることが判明した。-123と-88の多型のハプロタイプで正常対照群と SSPE 群の推定頻度を比較したところ、-123A -88T が SSPE 群に多くみられた(31.2% vs. 19.8%)。-123A 単独では両群間に有意差をみとめないことから、-88T が両群の差の主たる原因と考えられた。

次に SSPE との関連がみとめられる -88G/T 多型の機能解析をデュアルルシフェラーゼアッセイにより行った $^{11)}$. -123C/A 多型の影響を考慮して、主なハプロタイプである C-G, A-G, A-T を有するプロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼ発現プラスミドをそれぞれ作成し、HeLa 細胞に導入し、IFN- α 添加後の転写強度を比較し

た. その結果, すべてのハプロタイプで IFN- α による転写活性の上昇が認められるが, その中で SSPE に多いハプロタイプである A-T が最も高い活性を示すこと, また, -88 に T を含む配列は G を含む配列よりも強く MxA 遺伝子の転写を誘導することが判明した(図 2). 以上の結果より, SSPE 群では MxA-88 T allele の頻度が高く, またこの T allele は MxA の発現を強く誘導することが示された.

SSPE 患者で抗ウイルス蛋白の発現が高いことは逆説的に思われるが、我々は以下のようなメカニズムを想定している。MxA が強く発現すれば感染細胞内でのウイルス遺伝子の転写は強く抑制され、ウイルス蛋白の合成がより低下し、感染細胞表面への発現はより低下する。このため、免疫系による排除を免れやすくなり、持続感染をおこしやすくすることが考えられる。このような仮説は、ドイツ Würzburg 大学の ter Meulen らのグループも提唱しており 12)、本研究で得られた、SSPE 患者で -88 T allele の頻度が高いという結果は妥当と考えられた。

3. SSPE における Th1/Th2 サイトカインおよび関連分子の遺伝子解析

SSPE 患者における MV に対する adaptive immunity を検討する目的で、末梢血単核球における MV 特異的 Th1/Th2 サイトカイン産生能を測定した $^{13)}$. 図 3 は、麻疹、ムンプス、水痘の各生ワクチンに対する Th1 サイトカイン IFN- γ の産生能を示したものであるが、SSPE 群では 15 例中 11 例で MV 刺激に対する反応が低下していた、データは示していないが、これらの症例においても Th2 サイトカインである IL-4、IL-10 の産生は保たれていた、麻疹罹患時の血清サイトカインの動きに関して、発疹出現までは Th1 反応が、回復期には Th2 反応が誘導されることが知られている 14 15)、大部分の SSPE 患者において Th1 サイトカインである IFN- γ の産生能が低下し、一方、Th2 サイトカインの産生は保たれていること から、SSPE 患者では麻疹罹患後も長期間にわたって相対的 Th2 優位が持続している可能性が示唆された、この仮説に基づいて、我々は Th1/Th2 バランスに関連するサイトカインの遺伝子多型が SSPE の発症に寄与している可能性を関連解析を用いて検討した 16)、対象には、Th1 サイトカインおよびその関連分子として、IFN- γ 、IFN- γ レセプター(IFN- γ R1)、IFN- γ R2、interferon regulatory factor-1(IRF-1)、IL-12R、Th2 サイトカインおよびその関連分子として、IL-4、IL-4R、IL-10 を選定した。その結果、表 2 に示したように、*IL4* promoter にある -589C/T 多型の T allele の頻度が、SSPE 群では P 値 0.031 で有意に高くなっていた。その他の多型では SSPE と正常対照群の間に有意差はみとめなかった。また、

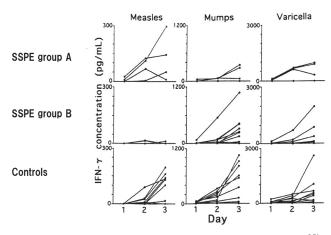


図3 SSPE 患者における MV 特異的 IFN-γ産生能の低下¹³⁾ 麻疹、ムンプス、水痘の各ワクチンウイルスの存在下に 末梢血単核球を培養し、1、2、3日後の培養上清の IFN-γ濃度を EILSA で測定。 SSPE group A (n=4): 応答 群、SSPE group B (n=11): 非応答 群、control 群 (n=11). 折れ線は各被検者に対応。 SSPE group B 11 名中8名、control 群 11 名中5名では IFN-γ産生が全く認められず、折れ線が X 軸と重なっている。

表 2 SSPE 群および正常対照群における $\mathrm{Th1/Th2}$ サイトカイン関連遺伝子多型の allele 頻度 $^{16)}$

| | | Controls (total = 200) n (%) | SSPE (total = 76) n (%) | <i>P</i> -value |
|---------------|-----|------------------------------------|-------------------------------|-----------------|
| IL4 promoter | C | 69 (34.5) | 16(21.1) | 0.031 |
| -589 | T | 131 (65.5) | 60(78.9) | |
| IL4R | Ile | 76 (38.0) | 33 (43.4) | 0.411 |
| codon 50 | Val | 124 (62.0) | 43 (56.6) | |
| IL10 promoter | C | 76 (38.0) | 29 (38.2) | 0.981 |
| -627 | A | 124 (62.0) | 47 (61.8) | |
| IL12RB1 | Gln | 122(61.0) | 48 (63.2) | 0.742 |
| codon 214 | Arg | 78(39.0) | 28 (36.8) | |
| IL12RB1 | Met | 122(61.0) | 42 (55.3) | 0.386 |
| codon 365 | Thr | 78(39.5) | 34 (44.7) | |
| IL12RB1 | Gln | 121 (60.5) | 48 (63.2) | 0.686 |
| codon 378 | Arg | 79 (39.5) | 28 (36.8) | |
| IFNGR1 | Val | 195 (97.5) | 73(96.1) | 0.522 |
| codon 14 | Met | 5 (2.5) | 3(3.9) | |
| IFNGR2 | Gln | 103 (51.5) | 34(44.7) | 0.315 |
| codon 64 | Arg | 97 (48.5) | 42(55.3) | |

P values were calculated using 2×2 chi square test.

| よる | | | | |
|----------------------|-----------------------------|------------|------------|---------|
| Genotype combination | | Controls | SSPE | |
| IL4-589 genotype | <i>IRF1</i> allele 1 status | n = 100 | n = 38 | P value |
| TT | +/+;+/- | 22(22.0%) | 18(47.4%) | 0.003 |
| TT | -/- | 18(18.0%) | 5(13.2%) | 0.495 |
| CT; CC | +/+;+/- | 23(23.0%) | 2(5.3%) | 0.016 |
| CT; CC | -/- | 37 (37.0%) | 13 (34.2%) | 0.761 |

表3 *IL4* promoter - 589 多型と *IRFIGT* リピート多型の組み合わせに よる関連解析¹⁶⁾

IFNG および IRF1 のリピート多型についても有意差をみとめなかった。ロジスティック回帰分析により IL4 -589C/T 多型および他の多型との相互作用を解析したところ,IRF1 GT リピート多型の allele 1 が IL4 -589TT と相互作用をもつ傾向が見られた。遺伝子型の組み合わせの頻度を検討すると,-589TT homozygote と IRF1 allele 1 を少なくとも 1 つ持つものの頻度が SSPE 群では,P 値 0.003 で有意に高くなっていた(表 3).

IL4 promoter -589 T allele が、C allele より高い promoter 活性を示すことは既に報告されている $^{17)18)}$. また、我々は、IRF1 の allele 1 が、Th2 優位の疾患であるアトピー性皮膚炎と関連していることを報告した $^{19)}$. 以上を考え併せると、IL4 promoter -589 T allele と IRF1 の allele 1 の組み合わせは、Th2 反応の促進と、Th1 反応の抑制を通じて、SSPE の発症にかかわっていることが示唆された。

4. SSPE における遺伝子発現プロファイルと Granulysin 遺伝子-189G/T 多型解析

免疫系における MV の持続感染の分子メカニズムを検討するために、オリゴ DNA マイクロアレイを用いて SSPE 患者の末梢血において発現が低下している遺伝子を網羅的に検索した $^{20)}$. 約3万個の遺伝子に対応したオリゴ DNA マイクロアレイを用いて SSPE 患者と正常対照の末梢血単核球における遺伝子発現を解析したところ、granulysin 遺伝子(GNLY)の発現が SSPE 患者で有意に低下していることを見出した(表 4). 定量的 RT-PCR では、末梢血単核球における GNLY mRNA の 2 つのアイソフォーム、519と 520の発現レベルは SSPE 患者では正常対照に比較して低い傾向にあり、麻疹急性期の患者では 520については有意に高く、519 については高い傾向にあった(図 4 a).

granulysin は、近年同定された分子で、細胞傷害性 T 細胞(CTL)や NK 細胞の細胞傷害性顆粒に含まれている。膜の透過性を亢進させることにより、細菌や真菌、寄生虫などの種々の細胞外微生物や、perforin と共同で結核菌などの細胞内細菌寄生菌の killing に働く $^{21)\sim23)}$. また、アポトーシスの誘導により、感染細胞を溶解することも知られている。CTL や NK 細胞によるウイルス感染細胞の排除が peforin や

表4 SSPE において発現が低下している遺伝子 $^{20)}$

| Oligo ID | 遺伝子 | 発現比 | 機 能 |
|-------------|----------|------|----------------------------|
| AGhsA020814 | GNLY | 0.46 | Cellular defense response |
| AGhsA051623 | SNX6 | 0.59 | Negative regulation of EGF |
| AGhsA020403 | BIN2 | 0.64 | Endocytosis; synaptic |
| AGhsA130712 | ATP5E | 0.74 | |
| AGhsA210415 | TCTEL1 | 0.76 | |
| AGhsB221623 | KIAA1265 | 0.8 | Metal ion transport |
| AGhsC140322 | | 0.83 | |
| AGhsC060107 | OR1A1 | 0.83 | G-protein coupled receptor |
| AGhsB211414 | | 0.83 | |
| AGhsC141207 | | 0.83 | |
| AGhsB210411 | RNF29 | 0.83 | Signal transduction |
| AGhsB120923 | COTL1 | 0.84 | Actin-binding proteins |
| AGhsA091105 | CA12 | 0.85 | One-carbon compound |
| AGhsB190806 | | 0.86 | |
| AGhsC160710 | | 0.87 | |

granzyme を含む細胞傷害性顆粒を介して行われていること 24)を考慮すると、同じく細胞傷害性顆粒に含まれる granulysin も抗ウイルス作用を有していると推測される。実際、最近 Ogawa らはパルボウイルス B19 感染症や EB ウイルス感染症などの急性ウイルス感染症の患者で血清中の granulysin 濃度が一過性に上昇することを報告した 25). また、granulysin は in vitro でウイルス感染細胞のアポトーシスを誘導することによりウイルスの増殖を抑制することも報告されている 26). 本解析では、GNLYは麻疹急性期患者の末梢血単核球では高発現していた。MV 感染は、一過性ではあるが非常に強いリンパ球減少

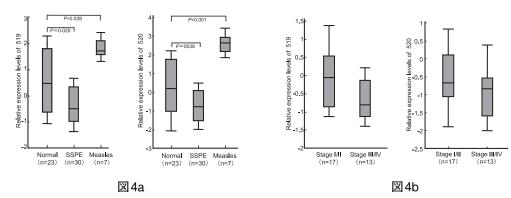


図4 *GNLY* mRNA の疾患群別定量的 RT-PCR²⁰⁾

図 4a 疾患群別の比較

GNLY mRNA の 2 つのアイソフォーム, 519 と 520 の末梢血単核球での発現を, 対照群, SSPE 患者群, 麻疹患者群で比較. 箱ひげ図の横線は下から 10, 25, 50 (中央値), 75, 90 パーセンタイルの値を示す.

図4b SSPEの病期による比較

GNLYmRNA の 2 つのアイソフォーム, 519 と 520 の末梢血単核球での発現を, Stage I/II と III/IV の SPPE 患者群で比較. 箱ひげ図の横線は下から 10, 25, 50 (中央値), 75, 90 パーセンタイルの値を示す.

(CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞の減少を伴う)を引き起こす 27 . さらに,麻疹の急性期では NK 活性の低下も報告されている 28 . MV 特異的な CD8 陽性 CTL は麻疹急性期における MV 感染細胞の排除に主要な役割を果たしていることから 29),末梢血単核球 における GNLY の発現増加は CD8 陽性 T 細胞の減少と NK 活性の低下の代償機構としての CD8 陽性 T 細胞の著明な活性化を反映しているものと考えられ,このことは CTL からの細胞傷害性顆粒を介した granulysin の放出が MV 感染に対する宿主免疫に関与していることを示唆している.

対照的に、SSPE 患者、とくに StageII/IV の患者では末梢血単核球における GNLY の発現は、統計学的に有意ではないものの、低い傾向にあった(図 4 b)。麻疹急性期では GNLY の発現が亢進していたことから、CTL 反応の低下を示唆する GNLY の発現低下は MV の持続感染の成立や維持に有利に働くと考えられた。この仮説は、SSPE 患者では MV に対する CTL が低下しているという報告 30 と矛盾せず、また、MV に感染したニューロンは末梢血から中枢神経系に侵入した CTL の標的であることを考えると 31 、SSPE の中枢神経病変の形成にもあてはまる可能性がある.

次に、GNLY遺伝子と SSPE 発症との関連を調べるために、これまでに登録されている GNLYの 25 個の SNP のうち Assays on Demand TM の系が利用可能であった -189G/T および 4212G/C の 2 つの SNP について関連解析を行った。 2 つの SNP は完全な連鎖不平衡にあり、その遺伝子型およびアリルの頻度には、SSPE 群と正常対象群との間には有意差をみとめなかった。 したがって、GNLY そのものが SSPE の宿主側遺伝要因であるとは結論づけることができなかった。 このことについては、GNLY の発現低下が持続感染の原因ではなく結果である可能性も否定できないが、今後、GNLY の発現を制御する遺伝子が SSPE の発症に関与している可能性について検討する必要がある。

5. SSPE における dsRNA 認識関連分子の遺伝子多型解析

SSPE 発症の宿主側要因を解明するために、自然免疫における dsRNA の認識分子である toll-like receptor 3(TLR3)および近年同定された retinoic acid-inducible gene I(RIG-I)、RIG-I のファミリー分子である melanoma differentiation-associated gene 5(MDA5)の SSPE 発症との関連を SNP を用いて解析した 32)。 それぞれの遺伝子について HapMap Project 33)による情報を参考に検出力の高い SNP を選択し、SSPE 患者と血縁関係のない正常対照について TaqMan® SNP Genotyping Assay または restriction fragment length polymorphism(RFLP)を用いて遺伝子型を決定し、 χ^2 検定により関連解析を行った。 SSPE 罹患感受性に関連をみとめた場合は近傍の SNP も解析した.

| Zo octa ii ozamiya, mii vatay o talito yay za amete xix | | | | | |
|---|------------------|--------|-------------|-----------|---------|
| Gene | Polymorphism | Allele | Controls(%) | SSPE(%) | P value |
| TLR3 | -7C/A | С | 130(77.4) | 60 (75.0) | 0.69 |
| | | Α | 38(22.6) | 20(25.0) | 0.68 |
| | IVS3 + 71C/A | С | 132(78.6) | 61 (76.3) | 0.60 |
| | | А | 36(21.4) | 19(23.8) | 0.68 |
| | c.1234C/T(L412F) | C(L) | 122(72.6) | 47(58.8) | 0.00 |
| | | T(F) | 46 (27.4) | 33(41.3) | 0.03 |
| | c.1377C/T | С | 107(63.7) | 53(66.3) | 0.69 |
| | | Т | 61 (36.3) | 27 (33.8) | 0.09 |

表5 SSPE 群と正常対照群における TLR3 の各多型の allele 頻度³²⁾

表6 TLR3-7C/A, IVS + 71C/A, L412F および c.1377C/T によるハプロタイプの推定頻度³²⁾

| Haplotype | Controls(%) | SSPE(&) | P value |
|-------------------------------|-------------|---------|---------|
| -7C/IVS3 + 71C/Leu412/c.1377C | 34.1 | 25.0 | 0.15 |
| -7C/IVS3 + 71C/Phe412/c.1377C | 24.1 | 41.2 | 0.006* |
| -7A/IVS3 + 71A/Leu412/c.1377T | 16.2 | 23.7 | 0.16 |
| -7C/IVS3 + 71C/Leu412/c.1377T | 14.7 | 6.7 | 0.19 |

ハプロタイプ頻度は EH software program で推定.

 $RIGI,\ MDA5$ では選択した SNP と SSPE との間に有意な関連をみとめなかったが、TLR3 の c.1234C/T (L412F) 多型において SSPE 群と正常対象の多型頻度に有意差をみとめた(表 5). すなわち、T (アミノ酸では F) アリルが、SSPE 群で有意に高頻度であった(41.3% vs. 27.4%、P=0.028). 次に、c.1234C/T (rs3775291)の近傍にある 3 つの SNP すなわち、- 7C/A、IVS + 71C/A および c.1377C/T (rs3775290)について RFLP 法により遺伝子型を決定し、関連解析を行ったが、両群間でアリル頻度に差をみとめなかった。L412F の近傍の SNP は以前の日本人を対象とした研究で連鎖していることが報告されているが、今回の解析でも L412F と他の 3 つの SNP は、連鎖不平衡にあり、特に L412F と c.1377C/T は D'値 1 で完全に連鎖していた。これら 4 つの SNP によるハプロタイプ解析を行ったところ、SSPE 群と正常対照群の間で - 7C/IVS + 71C/412F/c.1377C ハプロタイプの推定頻度に有意差をみとめた(41.2% vs. 24.1%、Pc=0.024)(表 6).

本解析により、TLR3 の L412F 多型が SSPE の発症と関連していることが明らかになった。TLR3 や RIG-I などの dsRNA 認識分子は、ウイルス感染を細胞内で検知することによって I 型 IFN の産生を誘導し、ウイルス感染に対する初期自然免疫において重要な役割を果たしている。末梢血においては、MV 野性株に対する初期免疫の発動には RIG-I が主に働いているとされている。一方、神経系の細胞では、RIG-I はほとんど発現していないのに対して、TLR3 は発現がみられ、特に脳血液関門を構成するアストロサイトでは強発現している³⁴⁾。したがって、中枢神経系 MV 感染に対する自然免疫発動には RIG-I よりも TLR3 が関与していると考えられる。また、 TLR3 は中枢神経感染症の発症病理にも関与しており、MV と同じ RNA ウイルスであるウエストナイルウイルスでは、TLR3 を介した炎症反応がウイルスの脳血液関門通過を容易にし、致死的感染症を引き起こす機構が報告されている³⁵⁾。

TLR3 の細胞外ドメインは、リガンド結合モチーフである leucin-rich repeat (LRR) が 25 個連なった構造をとっている 36). L412F 多型では、 15 番目の LRR を構成する L の 1 個が F に置換される.この置換は TLR3 の立体構造にはあまり変化を与えないが、dsRNA の結合部位として最も有力視されている糖鎖修飾部位のすぐ近傍であることから、糖鎖修飾の程度や方向が変わって TLR3 と dsRNA の結合が変化する可能性がある.そうであれば、中枢神経系の MV 感染において TLR3 を介した自然免疫シグナルが修飾されることにより、SSPE の疾患感受性に影響する可能性が考えられる.

頻度 5% 以上のハプロタイプのみ表示。

^{*}Bonferoni 補正後のP値(Pc) = 0.024

6. フィリピンの SSPE 患者における MxA, IL-4, IRF-1 および TLR3 の遺伝子解析

SSPE 発症に普遍的に関与している宿主側要因を明らかにするために、これまでの研究で日本人において SSPE 発症との関連がみとめられた 4 つの遺伝子多型について、フィリピン人において同様の関連がみとめられるかを検討した³⁷⁾.

MxA-88G/T 多型では、genotype 頻度、allele 頻度ともに SSPE 患者と正常対照との間に差をみとめなかった。 TT genotype については、SSPE 患者で多く、日本人と同様の傾向を示したが、有意ではなかった。 IL4-589C/T 多型では、genotype 頻度では CT genotype が SSPE 群で有意に多くみとめられたが、allele 頻度では両群間に差をみとめなかった(表 7)。 IRFI GT リピート 多型の genotype 頻度の分布では、アリルごとでも、全アリルの頻度分布でも、SSPE 患者と正常対照の間に差をみとめなかった。 TLR3 c.1234C/T(L412F)多型の解析では、genotype 頻度では CC genotype が SSPE 群で有意に少なく、CT genotype が SSPE 群で有意に多くみとめられたが、allele 頻度では両群間に差をみとめなかった(表 7).

このように、alelle 頻度については、日本人において SSPE 患者で頻度が有意に高く、SSPE との関連が示された 4つの遺伝子多型の各アリル(MxA -88T、IL4 -589T、IRF1 GT repeat allele 1、TLR3c. 1234C/T[413F])は、フィリピン人においては SSPE 患者と正常対照の間で頻度の差がみられなかった。したがって、フィリピン人においては、これらの遺伝子と SSPE との関連は明らかにできなかった。フィリピン人において日本人と同様の結果が得られなかった理由として、二国間の遺伝学的背景の違いに加えて、フィリピンでは日本と比較して栄養などの環境因子の関与が大きい可能性が考えられた。

一方, genotype 頻度については、IL4 – 589C/T 多型および TLR3c.1234C/T 多型では CT genotype が SSPE 群で有意に多くみとめられた。この結果は、TT genotype の頻度には差がみられなかったことから、T allele を日本人の場合と同様に susceptible allele と考えた場合、解釈が困難である。しかし、TT genotype が進行の早い SSPE と関連している場合、早期死亡につながりやすくなり、結果としてこのタイプの頻度が低くなっている可能性も否定できない。一方、TLR3c.1234 の CC genotype の頻度 は、SSPE 患者で有意に低く、CC genotype が resistant allele である可能性が示唆された。

7. SSPE における抑制性副刺激分子の遺伝子多型解析

既に述べたように、SSPE 患者においては他の慢性ウイルス感染と同様に MV 特異的 IFN- γ の産生が低下している¹³⁾. T リンパ球機能の抑制に関与している抑制性副刺激分子が SSPE 発症に関連している

表7 SSPE 患者群と正常対照群における IL4 - 589C/T 多型および TLR3 c.1234 C/T (L412F)多型の genotype 頻度および allele 頻度 (フィリピン人) (文献 37) より引用, 一部改変)

| SNPs | Controls | SSPE | OR [95%CI] | P-value |
|---------------------|-----------|----------|------------------|---------|
| <i>IL4</i> – 589C/T | | | | |
| Genotype 頻度 | | | | |
| CC | 13(11%) | 4(7%) | 0.58 [0.18-1.88] | 0.36 |
| CT | 53 (44%) | 36 (60%) | 1.89 [1.01-3.55] | 0.04 |
| TT | 54 (45%) | 20 (34%) | 0.61 [0.32-1.16] | 0.13 |
| Total | 120 | 60 | | |
| Allele 頻度 | | | | |
| С | 79 (33%) | 44 (37%) | 1.17 [0.74-1.86] | 0.47 |
| T | 161 (67%) | 76 (64%) | 0.84 [0.53-1.34] | 0.47 |
| TLR3 c.1234 C/ | Γ (L412F) | | | |
| Genotype 頻度 | | | | |
| CC (LL) | 21 (18%) | 2(3%) | 0.16 [0.03-0.71] | 0.007 |
| CT (LF) | 51 (43%) | 40 (67%) | 2.70 [1.42-5.17] | 0.002 |
| TT (FF) | 48 (40%) | 18 (30%) | 0.64 [0.33-1.24] | 0.19 |
| Total | 120 | 60 | | |
| Allele 頻度 | | | | |
| C (L) | 93 (73%) | 44 (72%) | 0.91 [0.58-1.43] | 0.70 |
| T (F) | 147 (27%) | 76 (28%) | 1.09 [0.69-1.72] | 0.70 |

かを明らかにするために、SNP を用い て患者対照研究を行った38). 8遺伝 子 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4 [CTLA4], programmed cell death 1 [PD1], B and T lymphocyte attenuator [BTLA], CD80, CD86, programmed cell death-ligand 1 [PDL1], PDL2, herpes virus entry mediator [HVEM]) の20個のSNPに ついて、日本人集団において TagMan® SNP Genotyping Assay を 用いて genotype を決定した. なお, 他疾患で関連解析が行われている CTLA4, CD80, CD86, PD1 に関し ては、先行研究を参考に SNP を選択 し、他の遺伝子については HapMap Project³³⁾による情報を参考に既に日本人で頻度が報告されている SNP を検索し、遺伝子領域をカバーできるように検出力の高い SNP を tag SNP から選択した。次に、Haploview を使用してハプロタイプ頻度を推定し関連解析を行った。

その結果 PDI 遺伝子の 3 ヶ所の SNP(rs4656739 G/A,rs4978592 G/A,rs2227982 C/T)で SSPE 患者と健常対照の間の minor alelle 頻度に有意差をみとめた(それぞれ,P=0.007,0.007,0.017)。 PDI では,rs4656740 を含めた 4 ヶ所の SNP によるハプロタイプの頻度においても患者群と対照群の間に有意差をみとめた(GCGC,P=0.022;ATAT,P=0.009)。日本人集団で有意差をみとめた PDI 遺伝子について,フィリピン人集団でも同様の解析を行ったところ,各 SNP の minor alelle 頻度では有意差をみとめなかったが,ハプロタイプ解析が可能であった 3 ヶ所の SNP のハプロタイプ頻度で患者群と対照群に有意差をみとめた(GCG,P=0.011)。 翻訳領域と exon-intron junction のシークエンスでは両集団とも変異や新規の多型はみられなかった。次に日本人 SSPE 患者と年齢性別をマッチさせた対照群において,PBMNC から cDNA を作成し PDI 遺伝子の発現を比較したところ,SSPE 群では PDI 遺伝子発現が有意に高値であった(P < 0.001)。

慢性ウイルス感染時にはウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞は,"疲弊した"と表現されるサイトカイン産生能や増殖能が低下した状態にあるが,そのような細胞では PD1 発現が高値であることがこの現象に関与していることが明らかにされている 39)。今回の関連解析では,日本人とフィリピン人の 20 つの集団で,SSPE 群で 20 伊D1 遺伝子の GCG ハプロタイプの頻度が高く,さらに日本人 SSPE 患者末梢血単核球の 20 の発現が高いことが示された。 20 PD1 遺伝子のハプロタイプによる免疫応答の違いにより, PD1 を介した抑制シグナルが強く働くことで,初期の MV の排除が不十分となり,ウイルスの持続感染を許してしまう機構があるのではないかと考えられる。

おわりに

我々がこれまでに得た SSPE の宿主側遺伝要因に関する知見を紹介した。この分野における研究の進展は、SSPE の発症リスクの予測や発症予防、遺伝子の型に応じた治療法の選択、さらには新しい治療法の開発につながるものと期待される。

共同研究者

武本環美,石崎義人,由茅直子,鳥巣浩幸,吉良龍太郎,Wafaa M. Bassuny,佐々木由佳,中尾 太,井原健二,原 寿郎 (九州大学小児科),井上岳彦,竹下研三 (鳥取大学脳神経小児科), Judy R. Pipo-Deveza, Marissa B. Lukban, Aida M. Salonga (フィリピン大学小児神経科)

謝辞

ご協力をいただいた SSPE 青空の会(親の会)の方々, 患者末梢血をご提供いただいた全国 31 施設の先生方に深謝いたします.

参考文献

- 1) Gascon GG: Subacute sclerosing panencephalitis. Semin. Pediatr. Neurol. 3: 260-269, 1996.
- 2) Britt JB : Slow viruses. In : Feigin RD, Cherry JD (ed) : Textbook of Pediatric Infectious Diseases 5th ed. pp. 1646–1665, WB Saunders, Philadelphia, 1998.
- 3) Dyken PR: Subacute sclerosing panencephalitis: current status. Neurol. Clin. 3: 179-196, 1985.
- 4) Fournier JG, Tardieu M, Lebon P, Robain O, Ponsot G, Rozenblatt S and Bouteille M: Detection of measles virus RNA in lymphocytes from peripheral-blood and brain perivascular infiltrates of patients with subacute sclerosing panencephalitis. N. Engl. J. Med. 313: 910-915, 1985.
- 5) Ogata A, Czub S, Ogata S, Cosby SL, McQuaid S, Budka H and ter Meulen V, Schneider-Schaulies J: Absence of measles virus receptor (CD46) in lesions of subacute sclerosing panencephalitis brains. Acta. Neuropathol.

- (Berl) 94: 444-449, 1997.
- 6] Kusuhara K, Sasaki Y, Nakao F, Ihara K, Hattori H, Yamashita S, Nihei K, Koide N, Aiba H, Takeshita K and Hara T: Analysis of measles virus binding sites of the CD46 gene in patients with subacute sclerosing panencephalitis. J. Infect. Dis. 181: 1447–1449, 2000.
- 7) Horisberger MA: Interferons, Mx genes, and resistance to influenza virus. Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 152: S67-71, 1995.
- 8) Schnorr JJ, Schneider-Schaulies S, Simon-J? dicke A, Pavlovic J, Horisberger MA and ter Meulen V: MxA-dependent inhibition of measles virus glycoprotein synthesis in a stably transfected human monocytic cell line. J. Virol. 67: 4760-4768, 1993.
- Schneider-Schaulies S, Schneider-Schaulies J, Schuster A, Bayer M, Pavlovic J and ter Meulen V: Cell type-specific MxA-mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells. J. Virol. 68: 6910-6917, 1994.
- 10) Hijikata M, Mishiro S, Miyamoto C, Furuichi Y, Hashimoto M and Ohta Y: Genetic polymorphism of the MxA gene promoter and interferon responsiveness of hepatitis C patients: revisited by analyzing two SNPites (-123 and -88) in vivo and in vitro. Intervirology 44: 379-382, 2001.
- Torisu H, Kusuhara K, Kira R, Bassuny WM, Sakai Y, Sanefuji M, Takemoto M and Hara T: Functional MxA promoter polymorphism associated with subacute sclerosing panencephalitis in Japan. Neurol. 62: 457–460, 2004.
- 12) Schneider-Schaulies J, Niewiesk S, Schneider-Schaulies S and ter Meulen V: Measles virus in the CNS: the role of viral and host factors for the establishment and maintenance of a persistent infection. J. Neurovirol. 5: 613-622, 1999.
- Hara T, Yamashita S, Aiba H, Nihei K, Koide N, Good RA and Takeshita K: Measles virus-specific T helper 1/T helper 2-cytokine production in subacute sclerosing panencephalitis. J. Neurovirol. 6: 121-126, 2000.
- 14) Griffin DE and Ward BJ: Differential CD4 T cell activation in measles. J. Infect. Dis. 168: 275-281, 1993.
- 15) Griffin DE, Ward BJ and Esolen LM: Pathogenesis of measles virus infection: a hypothesis for altered immune responses. J. Infect. Dis. 170 (Suppl 1): S24-31, 1994.
- 16] Inoue T, Kira R, Nakao F, Ihara K, Bassuny WM, Kusuhara K, Nihei K, Takeshita K and Hara T: Contribution of the interleukin 4 gene to susceptibility to subacute sclerosing panencephalitis. Arch. Neurol. 59: 822-827, 2002.
- 17) Rosenwasser LJ, Klemm DJ, Dresback JK, Inamura H, Mascali JJ, Klinnert M and Borish L: Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. Clin. Exp. Allergy 25 (Suppl 2): 74–78, 1995
- 18) Kawashima T, Noguchi E, Arinami T, Yamakawa-Kobayashi K, Nakagawa H, Otsuka F and Hamaguchi H: Linkage and association of an interleukin 4 gene polymorphism with atopic dermatitis in Japanese families. J Med Genet 35: 502-504, 1998.
- 19) Nakao F, Ihara K, Kusuhara K, Sasaki Y, Kinukawa N, Takabayashi A, Nishima S and Hara T: Association of IFN-gamma and IFN regulatory factor 1 polymorphisms with childhood atopic asthma. J. Allergy Clin. Immunol. 107: 499-504, 2001.
- **20]** Takemoto M, Kira R, Kusuhara K, Torisu H, Sakai Y and Hara T: Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients with subacute sclerosing panencephalitis using oligonucleotide microarrays. J. Neurovirol. 11: 299–305, 2005.
- 21) Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Ganz T, Thoma-Uszynski S, Melián A, Bogdan C, Porcelli SA, Bloom BR, Krensky AM and Modlin RL: An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. Science 282: 121–125, 1998.
- 22) Kaspar AA, Okada S, Kumar J, Poulain FR, Drouvalakis KA, Kelekar A, Hanson DA, Kluck RM, Hitoshi Y, Johnson DE, Froelich CJ, Thompson CB, Newmeyer DD, Anel A, Clayberger C and Krensky AM: A distinct pathway of cell-mediated apoptosis initiated by granulysin. J. Immunol. 167: 350-356, 2001.
- 23) Anderson DH, Sawaya MR, Cascio D, Ernst W, Modlin R, Krensky A and Eisenberg D: Granulysin crystal structure and a structure-derived lytic mechanism. J. Mol. Biol. 325: 355-365, 2003.
- 24) Trapani JA, Sutton VR and Smyth MJ: CTL granules: evolution of vesicles essential for combating virus infections. Immunol. Today 20: 351–356, 1999.
- 25) Ogawa K, Takamori Y, Suzuki K, Nagasawa M, Takano S, Kasahara Y, Nakamura Y, Kondo S, Sugamura K, Nakamura M and Nagata K: Granulysin in human serum as a marker of cell-mediated immunity. Eur J

Immunol 33: 1925-1933, 2003.

- 26) Hata A, Zerboni L, Sommer M, Kaspar AA, Clayberger C, Krensky AM and Arvin AM: Granulysin blocks replication of varicella–zoster virus and triggers apoptosis of infected cells. Viral Immunol. 14:125–133, 2001.
- 27) Arneborn P, Biberfeld G, Forsgren M and von Stedingk LV: Specific and non-specific B cell activation in measles and varicella. Clin. Exp. Immunol. 51: 165-172, 1983.
- 28) Griffin DE, Ward BJ, Jauregui E, Johnson RT and Vaisberg A: Natural killer cell activity during measles. Clin. Exp. Immunol. 81: 218–224, 1990.
- 29) Griffin DE, Ward BJ and Esolen LM: Pathogenesis of measles virus infection: an hypothesis for altered immune responses. J. Infect. Dis. 170: S24-S31, 1994.
- 30) Dhib-Jalbut S, Jacobson S, McFarlin DE, McFarland HF: Impaired human leukocyte antigen-restricted measles virus-specific cytotoxic T-cell response in subacute sclerosing panencephalitis. Ann. Neurol. 25: 272-280, 1989.
- 31) Ransohoff RM, Kivisakk P and Kidd G: Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. Nat. Rev. Immunol. 3: 569–581, 2003.
- **32]** Ishizaki Y, Takemoto M, Kira R, Kusuhara K, Torisu H, Sakai Y, Sanefuji M, Yukaya N and Hara T: Association of TLR3 gene polymorphism with subacute sclerosing panencephalitis. J. Neurovirol. (in press)
- 33) The International HapMap Consortium: The International HapMap Project. Nature 426: 789-796, 2003.
- 34) Jack CS, Arbour N, Manusow J, Montgrain V, Blain M, McCrea E, Shapiro A and Antel JP: TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. J. Immunol. 175: 4320–4330, 2005.
- Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E and Flavell RA: Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. Nat. Med. 10: 1366-1373, 2004.
- 36) Bell JK, Botos I, Hall PR, Askins J, Shiloach J, Segal DM and Davies DR: The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102: 10976-10980, 2005.
- 37] Pipo-Deveza JR, Kusuhara K, Silao CL, Lukban MB, Salonga AM, Sanchez BC, Kira R, Takemoto M, Torisu H and Hara T: Analysis of MxA, IL-4, and IRF-1 genes in Filipino patients with subacute sclerosing panencephalitis. Neuropediatrics 37: 222-228, 2006.
- 38) Ishizaki Y, Yukaya N, Kusuhara K, Kira R, Torisu H, Sakai Y, Sanefuji M, Pipo-Deveza JR, Silao CL, Sanchez BC, Lukban MB, Salonga AM, Hara T. PD1 as a common susceptibility gene of subacute sclerosing panencephalitis in two distinct ethnic populations. (submitted)
- 39) Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ and Ahmed R: Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. Nature 439: 682-687, 2006.

(参考文献のうち,数字がゴシック体で表示されているものについては,著者により重要なものと指定された分です.)

プロフィール

楠原 浩一(くすはら こういち)

九州大学准教授(大学院医学研究院成長発達医学分野). 医博.

- ◆略歴: 1958 年鹿児島県に生る. 1983 年九州大学医学部卒業. 1992 年九州大学医学部助手. 1996 年バンダービルト大学医学部微生物学免疫学教室研究員. 1997 年同小児感染症科研究員. 1999 年九州大学医学部附属病院講師. 2000 年九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野助教授. 2007 年より現職.
- ◆研究テーマ:感染症の罹りやすさや重症度を規定している宿主側遺伝要因の解明,各種熱性疾患の病態解析,造血幹細胞を標的とする新規遺伝子治療の開発.

◆趣味:山登り