

手足口病ウイルスが樹状細胞に惹起するサイトカイン産生シグナルの解明

西村順裕

国立感染症研究所 ウィルス第二部

【研究の背景】

手足口病は四肢末端・口腔粘膜の水疱性発疹を主症状とし、幼児に流行する。主要な病原体はエンテロウイルス 71 型 (EV71)、コクサッキーウィルス A16 型(ともにピコルナウィルス科・エンテロウイルス属)である。一般に症状は軽いが、EV71 感染では髄膜炎・脳炎・脳症を起こし死に至ることがある。中国・東南アジアでは EV71 による手足口病が近年大流行しており、重篤な中枢神経症状のため毎年数十人から数百人が亡くなっている。しかし、その重症化の原因は解明されておらず、ウイルス特異的な治療法も確立されていない。

【目的】

EV71 感染による無菌性髄膜炎・肺水腫など、重症化メカニズムは不明であるが、EV71 が惹起する異常なサイトカイン産生も関与すると思われる。我々は EV71 の受容体として PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1; CD162) を同定した。PSGL-1 は白血球全般に発現するが、EV71 はヒト末梢血単核球 (PBMC) の非常にわずかな集団 (0.2%程度) に感染し、炎症性サイトカイン産生を惹起することを見出した。樹状細胞は全白血球の 1%以下の存在であることからも、PBMC 中のわずかな EV71 感染細胞は主に樹状細胞と考えられる。本研究では樹状細胞に着目し、EV71 の感染性、EV71 によるサイトカイン産生シグナルを解明し、治療薬開発に役立てることである。

【方法】

ヒト樹状細胞株として、CAL-1 細胞¹⁾、PMDC05 細胞²⁾を用いた。これらの細胞における PSGL-1 発現確認には抗ヒト PSGL-1 モノクローナル抗体 (KPL-1) を用い、フローサイトメトリーにて解析した。EV71 分離株として、1095/Shiga 株、75-Yamagata 株を用いた。サイトカインの定量には LEGENDplex multi-analyte flow assay kit (human inflammation panel, 13-plex) (Biolegend 社) とフローサイトメトリーを用い、IL-1 β 、IFN- α 、IFN- γ 、TNF- α 、MCP-1、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-17A、IL-18、IL-23、IL-33 を測定した。

【結果】

1. CAL-1 細胞、PMDC05 細胞とも、細胞表面に PSGL-1 を高く発現していた。
2. EV71 は CAL-1 細胞、PMDC05 細胞に効率良く感染した。しかし、興味深いことにウイルス感染細胞は感染から 24 時間経過した後も顕著な細胞死を起こさなかった。
3. EV71 を感染させた CAL-1 細胞、PMDC05 細胞からは MCP-1 の産生が特異的に増加した。予想に反し、他の炎症性サイトカイン産生はほぼ不変であった。

【考 察】

EV71 を感染させたヒト PBMC からは、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-8 などの産生が増加したが、これらのサイトカインは EV71 感染樹状細胞株からは検出されなかった。ヒト PBMC における EV71 感染細胞の発現マーカーを解析したところ、B 細胞、NK 細胞も含まれることが明らかとなった。これらの細胞群が IL-1 β などを産生した可能性もあり、今後さらに詳細な解析が必要である。

PSGL-1 は PBMC に高発現しているが、ごく一部の PBMC のみに EV71 が感染する。各種の白血球細胞株を用いた感染実験においても、EV71 が効率よく増殖する細胞は Jurkat 細胞のみであった。今回解析した樹状細胞株は 2 株とも EV71 に対して非常に効率の良い感染性を示した。したがって、in vivo における PSGL-1 依存性感染の主要な標的は樹状細胞である可能性が示唆された。EV71 感染により中枢神経症状を起こした患者の中枢神経においては、マクロファージの浸潤が認められる。この現象には EV71 感染樹状細胞が産生する MCP-1 が関与する可能性が示唆された。

一般に EV71 が感染した細胞は感染後 10 時間前後で細胞死を起こすが、樹状細胞株は顕著な細胞死を起こさなかった。つまり、EV71 抗原を効率良く提示し、EV71 に対する免疫応答を強力に惹起することも考えられた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

EV71 感染による手足口病の重症化には、EV71 感染により樹状細胞に惹起される MCP-1 産生が関与することが考えられた。EV71 の PSGL-1 依存的な感染を阻害する低分子化合物³⁾は、重症化に対する有効な治療法となる可能性が示唆された。EV71 に対する抗ウイルス薬開発の最大の障害は感染モデル小動物が十分に確立されていないことである。樹状細胞感染を制御できる抗ウイルス薬開発のためにも、ヒト EV71 受容体を発現する新しい遺伝子組換えマウスの作製を進めている。

【参考・引用文献】

1. Maeda T, Murata K, Fukushima T, Sugahara K, Tsuruda K, Anami M, Onimaru Y, Tsukasaki K, Tomonaga M, Moriuchi R, Hasegawa H, Yamada Y, Kamihira S. A novel plasmacytoid dendritic cell line, CAL-1, established from a patient with blastic natural killer cell lymphoma. *Int J Hematol.* 2005; 81(2):148-54.
2. Narita M, Watanabe N, Yamahira A, Hashimoto S, Tochiki N, Saitoh A, Kaji M, Nakamura T, Furukawa T, Toba K, Fuse I, Aizawa Y, Takahashi M. A leukemic plasmacytoid dendritic cell line, PMDC05, with the ability to secrete IFN- α by stimulation via Toll-like receptors and present antigens to naïve T cells. *Leuk Res.* 2009; 33(9):1224-32.
3. Nishimura Y, McLaughlin NP, Pan J, Goldstein S, Hafenstein S, Shimizu H, Winkler JD, Bergelson JM. The suramin derivative NF449 interacts with the 5-fold vertex of the enterovirus A71 capsid to prevent virus attachment to PSGL-1 and heparan sulfate. *PLoS Pathog.* 2015; 11(10):e1005184.