

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K08869

研究課題名(和文)細胞間接触によるウイルス再活性化メカニズムの解明と阻害因子の探索

研究課題名(英文)The mechanism of cell-contact mediated viral reactivation and search for its inhibitors

研究代表者

菅野 隆行 (Kanno, Takayuki)

国立感染症研究所・感染病理部・主任研究官

研究者番号：50272563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞間接触によるウイルス再活性化のメカニズムを明らかにするため、接着細胞とKSHV感染B細胞の共培養を行いヒト遺伝子、KSHVウイルス遺伝子のトランスクリプトーム解析を行った。接着細胞はHeLa、293細胞を、ウイルスドナー細胞はKSHV感染B細胞株 TY-1, BCBL-1, Spe1細胞を、対照としてKSHV陰性のBjab細胞を用いた。Transwellを介して接触しない群と接触する群について比較したところヒト遺伝子オントロジー解析でKSHV感染の有無に拘らずHypoxia関連遺伝子群が上位を占めた。B細胞と接着細胞の接触により誘導される普遍的な変化である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

cell-to-cell 感染がウイルス感染で重要な役割を果たしていることはよく知られているが、そのメカニズムについてはよくわかっていない。本研究の実験結果から接着細胞とB細胞を共培養することにより普遍的にHypoxiaシグナル伝達系に刺激が入る可能性が示唆された。接着細胞とB細胞との接触によるHypoxiaシグナル伝達系の活性化がウイルスのcell-to-cell感染に利用されている可能性があり、新たな感染様式の解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：To investigate the mechanism of cell-contact-mediated viral reactivation of KSHV, a co-culture experiment was conducted involving adherent cells and PEL cells, with or without the use of Transwell equipment. HeLa and HEK293 cells were cultured as adherent cells, while TY-1, BCBL-1, and Spe1 cells were cultured as KSHV-infected B cells. Bjab cells were utilized as KSHV non-infected B cells for control purposes. Total RNA was subsequently extracted. Transcriptome and gene ontology analysis revealed distinct functional enrichment of genes related to hypoxia signaling. Importantly, this finding was consistent across different adherent cell types and independent of the KSHV infection status in the B cells. Thus, the cell contact between adherent cells and B cells induces activation of the hypoxia signaling cascade, irrespective of viral infection.

研究分野：感染病理学

キーワード：カポジ肉腫 細胞間接触 再活性化 cell-to-cell感染 Hypoxiaシグナル伝達系

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エイズ日和見合併症としてカポジ肉腫は現在でも上位にランクされ、肺などの深部臓器に進展する内臓型は致死的となることから治療上の大きな問題となっている。カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス、ヒトヘルペスウイルス8 (Kaposi sarcoma-associated herpesvirus : KSHV, human herpesvirus 8)はカポジ肉腫 (Kaposi sarcoma : KS)以外にも、原発性体腔液性リンパ腫(Primary effusion lymphoma)、多巣性キャスルマン病の原因ウイルスである。これらの疾患の発症に、ウイルス再活性化が重要であることは抗ウイルス薬の臨床試験結果より指摘されていたが、再活性化メカニズムについては試験管内実験における薬物や化合物の報告があるのみで、明らかにされていない。KSHVやエプスタイン・バーウイルス(Epstein Barr virus: EBV)などのガンマヘルペスウイルスでは、感染細胞と非感染細胞が接触することで非感染細胞がウイルスに感染する、細胞間(cell-to-cell)感染が効率よくおこることが知られている。我々は、接着細胞と共培養すると細胞のコンタクトにより感染B細胞のウイルスが再活性化することを見出しており、以前より、生体内のウイルスリザーバーからKS発生母地である血管内皮細胞への生理的感染様式について、次のようなモデルを提唱してきた。

- 1) KSHV 潜伏感染リザーバーが抹消血管内皮細胞に接触
- 2) 細胞表面分子、あるいは環境因子によりリザーバー に刺激が入りウイルス再活性化
- 3) リザーバー と血管内皮細胞との間に cell-to-cell 感染に必要な相互作用
- 4) リザーバー から血管内皮細胞へ cell-to-cell 感染の成立

接着細胞と KSHV 感染 B 細胞株である PEL 細胞株を共培養すると再活性化スイッチタンパクが誘導されることよりこの実験系が上記 2), 3) を反映しているものと考えられた。

2. 研究の目的

エイズの合併症として臓器カポジ肉腫は治療にも難渋する致死の可能性がある疾病である。カポジ肉腫発症とウイルス再活性化は関連することが指摘されており、細胞間接触による再活性化は生体内でのカポジ肉腫発症につながるイベントを示唆している可能性がある。そこで生理的な KSHV の感染様式である cell-to-cell 感染メカニズムの一部であると考えられる細胞間接触によるウイルス再活性化メカニズムの詳細な解析を進めることを目的とし、それと同時に細胞間接触によるウイルス再活性化の阻害因子を特定しカポジ肉腫発症予防薬の開発を目的とした。

3. 研究の方法

細胞間接触によるウイルス再活性化メカニズムを検索するために、接着細胞、KSHV 潜伏感染 B

細胞株を共培養し 0, 24, 48 時間後に全ての細胞を回収し total RNA を抽出した。共培養の際には Transwell(Corning)を用いて接着細胞、B 細胞が接触しない群と接触する群とをもうけた。接着細胞としては HeLa 細胞、293 細胞を、KSHV 潜伏感染 B 細胞として TY-1, BCBL-1, Spel 細胞を用いた。ウイルスの感染していない B 細胞株として Bjab 細胞を用いた。mRNA を精製した後、NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina(NEB)を用いてライブラリを作成、1 検体あたり 4Gb カバレッジで Nextseq1000(Illumina)にて解読を行った。CLC Genomics Workbench(Qiagen)を用いてヒト遺伝子発現差異解析を行った後、差異を 2 倍以上、p 値<0.05 を有意として遺伝子オントロジー解析を行なった。

4 . 研究成果

細胞間接触群と非接触群 (Transwell 使用群) との比較により Hypoxia 関連遺伝子変化が誘導されることが明らかになった。ウイルスドナー細胞として KSHV 潜伏感染 B 細胞と共培養した場合のみならずウイルス陰性の Bjab 細胞との共培養でも細胞間接触により Hypoxia 関連遺伝子群が誘導されることから B 細胞と接着細胞の接触による普遍的な遺伝子発現変化である可能性も考えられた。Hypoxia 関連遺伝子の代表的な分子である hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1a) について、ウエスタンブロットでタンパク発現を確認したところ、細胞接触後 48 時間での発現上昇が認められた。KSHV 遺伝子の RNAseq の結果では、いずれの実験系でも lytic 遺伝子である T1.1、vIL-6、潜伏感染遺伝子である ORF73 などの発現が認められたが、接触、非接触群で有意な差が見られる遺伝子はなかった。KSHV 遺伝子プロファイルに強い溶解遺伝子誘導は認められず再活性化には遺伝子発現変化だけでは説明できない機序も含まれる可能性が示唆された。

KSHV はヒト体内においては B 細胞に潜伏し、免疫不全状態で再活性化し、さまざまな疾患を起こすことが想定されている。KSHV 感染 B 細胞は感染者でも極めて少なく、再活性化もまれな事象と考えられるが、免疫不全状態ではある条件下で頻度が高いと考えられていた。細胞同士の接着もその条件の一つと考えられるが、詳細なウイルス再活性化機構は明らかにされていない。本研究結果から得られた hypoxia 関連遺伝子群については、HIF1a と KSHV 感染の関連についてすでに数報の報告がある。KSHV は低酸素状況により活性化されることがわかっているが、HIF1a は低酸素状態で KSHV の潜伏関連タンパク LANA1 を介し、KSHV 溶解感染タンパクである RTA を誘導し、KSHV 再活性化を誘導する。細胞間接触による hypoxia 関連遺伝子群の活性化は非感染細胞である Bjab 細胞と共培養した際にも認められたことから、KSHV 感染とは関連なく、細胞同士のコンタクトにより発生する一般的な現象と思われる。KSHV はそうした生理的な細胞内活性化分子をウイルス複製に利用している可能性がある。

さらに詳細な分子機構を知るためには本実験系で hypoxia 関連遺伝子を詳細に検討する必要があるが、細胞接触から KSHV が活性化する機構を抑制する方法や、その阻害薬が見つければウイルス感染予防薬、ないしは、カポジ肉腫発症の新規予防薬、治療薬に結び付く可能性がある。細胞間接触による細胞内生理活性をターゲットとした新しい薬剤の開発、細胞間接触とウイルス感染に関する知見はまだ少なく、さらなる調査、研究によりウイルス感染の新たなメカ

ニズムの解明を目指したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takayuki Kanno, Yuko Sato, Kaori Sano, Tadaki Suzuki, Hideki Hasegawa, Harutaka Katano
2. 発表標題 Production of recombinant KSHV vIL-6 and development of a new monoclonal antibody
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	片野 晴隆 (Katano Harutaka)	国立感染症研究所・感染病理部・室長 (82603)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------