

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591276

研究課題名(和文)

マイクロアレイとヒト組織モデルによる慢性活動性EBウイルス感染症の病原因子の探索

研究課題名(英文) Investigation of pathologic factors of chronic active EB virus infection using microarray and human tissue model

研究代表者

伊藤 嘉規 (ITO YOSHINORI)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20373491

研究成果の概要(和文)：Epstein-Barr ウイルス(EBV)研究のモデルを確立するため、B95-8 ウイルス株と蛍光タンパク EGFP を発現する EBV がヒトリンパ組織で増殖するか検討した。ヒトリンパ組織は、外科的に摘出された扁桃組織で、小片に切り分けて、培養液に浸したコラーゲンスポンジ上におき、EBV 培養液をかけて感染させた。24 日間培養すると、2 つのウイルスとも、感染後 12-15 日後に組織培養液に、EBV DNA 量の増大が確認された。培養組織から得たリンパ球に 8 種類の EBV 関連遺伝子の発現を確認した。さらに、フローサイトメータにより、感染細胞は CD19 陽性の B 細胞で、IgD 陽性のナイーブタイプおよび CD27 陽性メモリータイプともに存在した。EBV の増殖は、アシクロビルにより用量依存性に抑制された。以上から、今回の組織モデルは EBV の病原性の解析および新規薬剤のスクリーニングに有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To establish a model system for the study of Epstein-Barr virus (EBV) infection, we tested the ability of B95-8 virus and recombinant EBV expressing enhanced green fluorescent protein (EGFP-EBV) to replicate in human lymphoid tissue. Human tonsil tissues that had been surgically removed during routine tonsillectomy were sectioned into small blocks and placed on top of collagen sponge gels in culture medium at the air-interface, then a cell-free viral suspension was directly applied to the top of each tissue block. Increasing levels of EBV DNA in culture medium were observed after 12-15 days through 24 days post-infection in tissue models infected with B95-8 and EGFP-EBV. Expression levels of eight EBV-associated genes in cells collected from culture medium were increased during culture. Additionally, flow cytometry analyses revealed that most EGFP⁺ cells were CD3⁻ CD56⁻ CD19⁺ HLA-DR⁺, and represented both naïve (IgD⁺) and memory (CD27⁺) B cells. Moreover, EBV replication in this model was suppressed by acyclovir treatment in a dose-dependent manner. These data suggest that this model has potential for use in the pathological analysis of local tissues at the time of primary infection, as well as for screening novel antiviral agents.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：EB ウイルス、ヒト組織モデル、感染モデル、扁桃組織、慢性活動性 EB ウイルス感染症

1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr ウイルス (EBV) は、ヒトに普遍に感染し、小児期では、伝染性単核症から、血球貪食性リンパ組織球症、慢性活動性 EBV 感染症 (CAEBV)、および移植後リンパ腫に至るまで広範な疾患の病因ウイルスとして知られている。この中で、CAEBV は、発熱、リンパ節腫脹、および肝脾腫などの症状が持続し、10-15 年程度の経過で死亡率が高くなる予後不良の疾患である。発症は年間 50 症例程度と考えられるが、日本をはじめとしたアジア地域に集積しており、この疾患の解明は小児科領域では非常に重要である。2005 年に日本の研究グループから診断指針が発表されたが、重症度判定や治療法は未確立であり、病因の解明が待たれている。

CAEBV では EBV に感染したリンパ球が増殖し病態を形成する。様々な視点から病態の解明が試みられてきたが、私共はこれまでに、ウイルス学・免疫学的な検討の結果、(1) EBV 感染細胞が通常の B リンパ球ではなく、T リンパ球および NK リンパ球であること、(2) 細胞性免疫応答の異常が伺われること、(3) 感染した細胞が数少ない細胞から腫瘍性に増殖したと考えられること、などを報告し、臨床的な予後因子として、感染細胞の種類が影響を与えることを見出した。

他方、病因となる遺伝子を網羅的に解析しようと考え、CAEBV 患児の末梢血中リンパ球における遺伝子の発現をマイクロアレイ解析 (数多くのヒト遺伝子の発現を網羅的に解析できる) した結果、CAEBV の発症に関与する可能性のある遺伝子群 (分子群) を同定し、報告した (Ito Y, 他. J Infect Dis, 2007)。これらの遺伝子群は炎症や細胞増殖に関係していた。しかし、この分子群のみでは、疾患の成因をすべて説明できず、引き続き病因解析を行うことが必要と考えられた。また、EBV 感染細胞の解析のために、新たな実験モデルの構築が重要と思われた。

2. 研究の目的

以前に行ったマイクロアレイ解析は、疾患が成立し、診断された後に解析を行うため、病初期に積極的に関与した因子については発見できない可能性がある。そこで、既にリンパ球に感染する他のウイルスについて応用され、申請者自身も研究に携わったヒト扁桃組織を用いた感染モデルを EBV に応用できれば、特に、病初期の疾患成立過程における重要な因子を解析することが期待できる。このため、ヒト扁桃組織を用いた EBV 感染モデル

の構築を試みた。

次に、症初期での組織中の EBV 感染細胞を解析するために、フローサイトメトリーを用いた EBV 感染細胞の同定・定量法を応用することを目指した。

さらに、CAEBV 患者の血液中の EBV 感染細胞の種類に基づいた解析を進めるため、感染細胞を、T リンパ球や NK リンパ球毎の文画に分け、その文画毎にマイクロアレイ解析を行うことを想定した。

3. 研究の方法

I. ヒト組織感染モデルの確立

(1) 医学的理由で摘出された健常扁桃組織を、3 ミリ角の小片に切り分けた後、ゼラチンで作られたスポンジ台の上に置き、培養液に組織片の一部が浸る状態にして培養する。このように培養することで、リンパ組織の内部構造および機能を保ったまま、3 週間程度培養することが可能である。扁桃組織の利用については、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を受け、提供者の同意を得て行われた。

(2) 上記の組織に EBV 培養液を実験的に直接暴露させることにより感染させる。EBV は標準的な実験室株である、B95-8 と蛍光タンパクを発現する EBV ウイルス (EGFP-EBV) を使用した。EGFP-EBV は、名古屋大学組み替え DNA 実験安全委員会に承認された。

(3) 培養液中の EBV 量を経時的にリアルタイム PCR 法で測定し、ウイルスの増殖を確認する。

(4) 組織中でのウイルス感染を確認するため、培養液中の EBV DNA 量が増大した時点で、感染組織を免疫染色する。

(5) 培養組織を機械的に破碎し、リンパ球を単離する。フローサイトメータを用いて表面抗原を染色し、どのようなタイプのリンパ球が増えているか、どのタイプのリンパ球に感染しているかを解析する。

(6) (5) で回収したリンパ球中の EBV 関連遺伝子 8 種類 (BZLF1, LMP1, LMP2, EBNA1, EBNA2, EBER1, BARTs, gp350/220) の発現をリアルタイム RT-PCT 法で定量する。

(7) 抗ウイルス剤である、アシクロビルを培養液に加え、アシクロビルによる EBV 増殖抑制効果を検討した。

II. マイクロアレイを用いた CAEBV 病因遺伝子の探索

(1) CAEBV 症例で、既に、ウイルス感染細胞が同定されている症例を対象とする。また、病因に関係する遺伝子を網羅的に探すという観点から、非増悪期の症例を対象とする。患者リンパ球の解析については、名古屋大

学医学部倫理委員会の承認を受け、提供者の同意を得て行われた。

(2) 上記要件を満たす症例から、感染細胞が含まれるTリンパ球あるいはNKリンパ球を分離する。

(3) 分離した細胞より、高純度のRNAを抽出し、蛍光色素によるラベルをした後、ヒトの遺伝子を40,000個以上解析できるマイクロアレイチップに反応させ、蛍光強度(発現強度)を解析する。

(4) 遺伝子の発現強度について解析用ソフトウェアを用いて解析する。

4. 研究成果

I. ヒト組織感染モデルの確立

ヒト扁桃組織モデルでは、24日間培養すると、2つのウイルスとも、感染後12-15日後に、組織培養液中のEBV DNA量の増大が確認された(図1)。

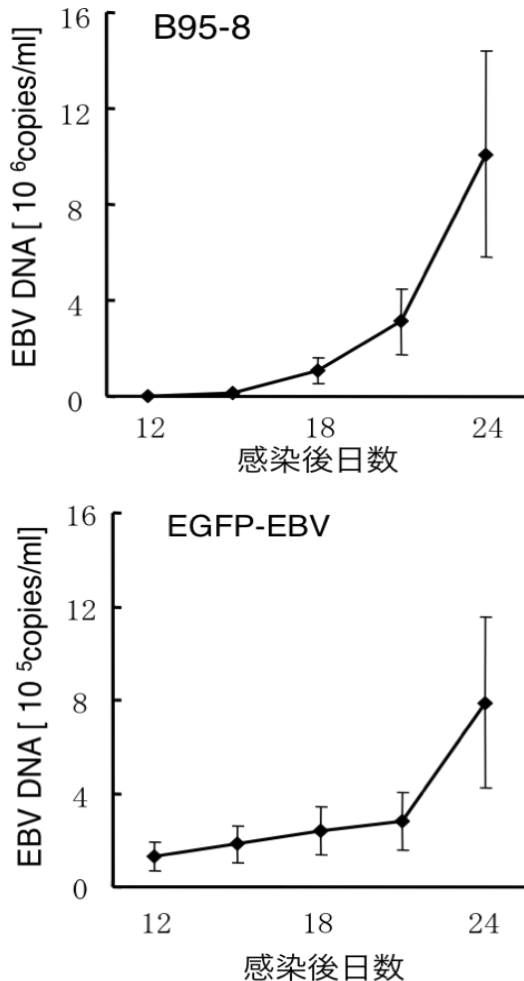


図1. 培養液中EBV DNA量

培養組織から得たリンパ球において8種類のEBV関連遺伝子(BZLF1, LMP1, LMP2, EBNA1, EBNA2, EBEB1, BARTs, gp350/220)の発現増強を確認した。次に、感

染組織のパラフィン切片で、EBVの抗原であるEBERが陽性のリンパ球様細胞を確認した。組織から得られたリンパ球のフローサイトメータによる解析では、感染細胞はCD3-CD56-CD19+HLA-DR+細胞で、Bリンパ球と考えられ(図2)、IgD陽性のナイーブタイプおよびCD27陽性メモリータイプともに存在した。

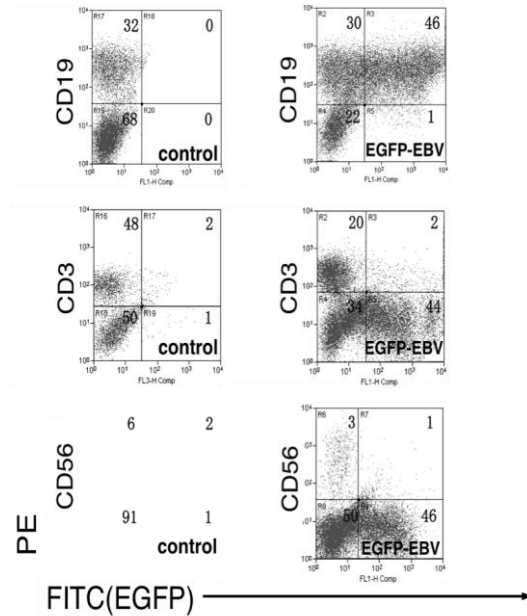


図2. EBV感染組織中のリンパ球の性状

抗ウイルス剤の効果を確かめる実験では、アシクロビル1.5μg/mLから45μg/mLまでの濃度で、EBVの増殖は用量依存性に抑制された(図3)。

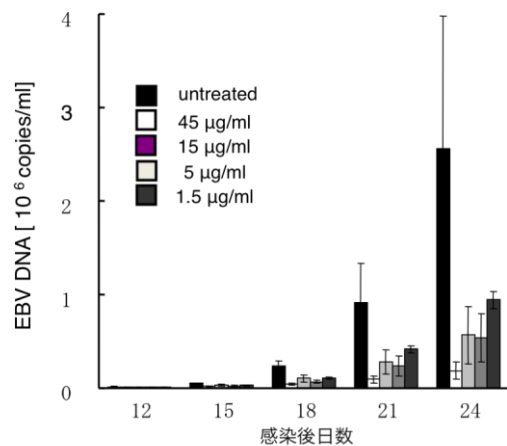


図3. 組織感染モデルにおけアシクロビルのEBV増殖抑制効果

II. マイクロアレイを用いたCAEBV病因遺伝子の探索

CAEBV症例2例から、感染細胞が含まれるTリンパ球あるいはNKリンパ球を分離した。これらの細胞がどの程度EBVに感染しているかを調べたところ、0.5%-1.0%程度であり、

EBV 感染細胞を調べるためには、感染細胞の比率が少なかった。感染細胞の比率が多い症例を選び、今後解析を進める予定とした。

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 25 件)

- 1) Kimura H, Ito Y, et al (6名、6番目). Serum concentrations of complement anaphylatoxins and proinflammatory mediators in patients with 2009 H1N1 influenza. *Microbiol Immunol* 2011, in press. 査読有
- 2) Ito Y, Kimura H, (7名、2番目). Effectiveness and safety of inactivated influenza vaccination in pediatric liver transplant recipients over three influenza seasons, *Pediatr Transplant* 15(1): 112-6, 2011. 査読有
- 3) Ito Y, Kimura H, et al (10名、2番目). Immunologic and Virologic Analyses in Pediatric Liver Transplant Recipients with Chronic High Epstein-Barr Viral Loads. *J Infect Dis* 202(3):461-9, 2010. 査読有
- 4) Ito Y, Kimura H, et al (7名、2番目). Comparison of the levels of human herpesvirus 6 (HHV-6) DNA and cytokines in the cerebrospinal fluid and serum of children with HHV-6 encephalopathy. *J Med Virol* 82(8):1410-5, 2010. 査読有
- 5) Ito Y, Kimura H, (12名、1番目). Multicenter Evaluation of Prototype Real-time PCR Assays for EBV and CMV DNA in Whole Blood Samples from Transplant Recipients. *Microbiol Immunol* 54(9): 516-22, 2010. 査読有
- 6) 伊藤嘉規、他(31名、10番目). インフルエンザ脳症ガイドライン(改訂版)(解説). *小児感染免疫* 21:421-66 2010. 査読無
- 7) Ito Y, Kimura H, et al (10名、9番目) Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus coinfection in three toddlers with prolonged illnesses. *J Med Virol* 81(8):1399-402, 2009. 査読有
- 8) Kimura H, Ito Y, et al (4名、2番目) Identification of Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocyte subtypes by flow cytometric in situ hybridization in EBV-associated lymphoproliferative diseases. *J Infect Dis* 200(7):1078-87, 2009. 査読有
- 9) Ito Y, et al (6名、2番目), Serum and cerebrospinal fluid levels of cytokines in acute encephalopathy associated with human herpesvirus-6 infection. *Brain*

- Dev-Jpn 31(10):731-8, 2009. 査読有
- 10) Ito Y, Kimura H (7名、1番目). Oligonucleotide Microarray Analysis of Gene Expression Profiles followed by a Real-time RT-PCR Assay in Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection, *J Infect Dis*, 197(5):663-666, 2008. 査読有
 - 11) Ito Y, Kimura H, et al (9名、2番目). Clinical and virologic characteristics of 15 patients with chronic active Epstein-Barr virus infection treated with hematopoietic stem cell transplantation, *Clin Infect Dis*, 46(10):1525-34, 2008. 査読有
 - 12) Ito Y, et al (6名、2番目), Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1-specific CD4+ T cells directly kill EBV-carrying NK and T cells, *Cancer Sci*, 99(8):1633-42, 2008. 査読有
 - 13) Kimura H, Ito Y, et al (4名、2番目), Measuring Epstein-Barr virus (EBV) load: the significance and application for each EBV-associated disease, *Rev Med Virol*, 18(3):305-319, 2008. 査読有
 - 14) Ito Y, Kimura H, et al (11名、2番目) Simultaneous monitoring by real-time PCR of Epstein-Barr virus, human cytomegalovirus, and human herpesvirus 6 in juvenile and adult liver transplant recipients, *Transplant Proceedings* 40(10):3578-3582, 2008. 査読有

[学会発表] (計 71 件)

- 1) Y. Ito, et al, Increased levels of cytokines and high-mobility group box 1 are associated with the development of severe pneumonia, but not acute encephalopathy, in 2009 H1N1 influenza-infected children, *Cell Symposia Influenza:Translating basic insights*, Washington DC, USA, 2010. 12. 2
- 2) 後藤研誠、伊藤嘉規、他、ヒトリンパ組織を用いた Epstein-Barr Virus 感染モデルの確立とその応用、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010. 11. 7
- 3) 伊藤嘉規、他、B 型肝炎ウイルスキャリアとなった小児 19 例における感染要因の検討、第 42 回日本小児感染症学会総会学術集会、仙台、2010. 11. 27
- 4) 伊藤嘉規、インフルエンザの治療戦略、愛知県インフルエンザセミナー、名古屋、2010. 9. 25
- 5) 河邊慎司、伊藤嘉規、他、Flow cytometric in situ hybridization 法を用いた EBV 感染症の非侵襲的診断、第 113 回日本小児科学会学術集会、盛岡、2010. 4. 23

- 6) 後藤研誠、伊藤嘉規、他、肝移植後小児例におけるインフルエンザワクチンの有効性・安全性に関する検討、第41回日本小児感染症学会総会・学術集会、福井、2009. 11. 14
- 7) 伊藤嘉規、他、Multiplex Real-time PCR法によるBK virus・JC virus・Adenovirus同時同定システムの確立、第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009. 10. 25
- 8) Gotoh K, Ito Y, et al. Restricted EBV gene expression in pediatric liver transplant recipients with chronic high Epstein-Barr viral loads. 14th International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus infections, Kobe, 2009. 10. 6.
- 9) 伊藤嘉規、全血検体を使用したEBV、CMVおよびHHV-6同時定量システムの移植後感染症診断への応用、第13回多摩ウイルス感染症研究会、東京、2009. 9. 19
- 10) Ito Y, et al. Comparison of the cerebrospinal fluid levels and serum concentrations of human herpesvirus 6 (HHV-6) DNA and cytokines in children with HHV-6 encephalopathy. 12th International CMV/BetaHerpesvirus Workshop, Boston, 2009. 5. 10.
- 11) 伊藤嘉規、他、リアルタイムPCR法によるEBV・CMV定量法の標準アプリケーション開発に向けた多施設共同試験、第83回日本感染症学会総会、東京2009. 4. 23
- 12) 木村宏、伊藤嘉規、他、FISH法によるEBV感染細胞同定の確立とEBV感染症解析への応用、第112回日本小児科学会学術集会、奈良、2009. 4. 17
- 13) 祖父江文子、伊藤嘉規、他、後遺症を残したHHV-6関連脳症2症例の臨床経過および病態についての検討、後遺症を残したHHV-6関連脳症2症例の臨床経過および病態についての検討、第40回日本小児感染症学会、名古屋、2008. 11. 15
- 14) 伊藤嘉規、木村宏、臓器・造血器幹細胞移植後の臨床検体を用いた比較検討によるEBVおよびCMV定量法の標準化に向けた多施設共同試験、第56回日本ウイルス学会、岡山、2008. 10. 26
- 15) Yoshinori Ito, et al. Multiplex real-time PCR for the simultaneous detection of herpes simplex virus, human herpesvirus 6, and human herpesvirus 7. 33rd International Herpesvirus Workshop, Estoril, 2008. 7. 27
- 16) 伊藤嘉規、他、慢性活動性EBウイルス感染症においてマイクロアレイ解析で発現増強を認めた遺伝子、第111回日本小児科学会、東京、2008. 4. 25

〔図書〕(計2件)

- 1) 伊藤嘉規. 単純ヘルペスウイルス感染症: 小児科ピクシス11 抗菌薬・抗ウイルス薬の使い方:152-157, 中山書店, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 嘉規 (ITO YOSHINORI)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 20373491

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

木村 宏 (KIMURA HIROSHI)
名古屋大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 30303621