

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790428

研究課題名（和文）水痘帯状疱疹ウイルスの潜伏感染および再活性化のメカニズム解析

研究課題名（英文）Analysis of mechanism of latent infection and reactivation of varicella-zoster virus

研究代表者

武本 眞清 (TAKEMOTO MASAYA)

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・助教

研究者番号：60379237

研究成果の概要（和文）：水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）の glycoprotein H（gH）に対する抗体が、どのようにして VZV の溶解感染を終息させ、潜伏感染状態に移行させるかを解析した。本研究課題により、抗 gH 抗体は autophagy による細胞内分解と、shedding microvesicle を介した細胞外排出の 2 つの機構により、gH およびウイルス粒子を排除していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Monoclonal antibody against glycoprotein H（gH）encoded by varicella-zoster virus（VZV）terminates lytic replication of VZV and induces the quiescently infected cells with dormant but recoverable VZV infectivity. It was demonstrated that autophagic clearance of intracellular gH and shedding microvesicle-mediated VZV virion outside the infected cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：抗原変調（antigenic modulation）、shedding microvesicles、オートファジー

1. 研究開始当初の背景

水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）の糖蛋白 gH に対する抗体は、ウイルス粒子の感染性の中和だけでなく、VZV では唯一感染の広がりやを阻止するという特異な機能を持つ。それだけでなく、我々の更なる解析により抗 gH 抗体処理を 4 週間続けた VZV 感染細胞では、一見ウイルスは排除されたかに見えるが、実際はウイルスゲノムが保持され、潜伏感染関連遺伝子 IE63 が発現し、なおかつ再活性化可

能な状態であることが判明した。我々が構築したモデルは、VZV の in vitro 潜伏感染系としては世界初である。

このような抗 gH 抗体の作用は、抗原変調（antigenic modulation）の一種であると考えられる。抗原変調による抗原消失のメカニズムには、細胞表面からの抗原抗体複合体の、1) internalization 後の分解、2) shedding による細胞外排出、3) Fc γ 受容体発現細胞による shaving/trogocytosis の 3 通りがある

と言われており、免疫学方面では生体内でのリンパ球の抗原変調は3)のshaving/trogocytosisが主体であるとされている。一方、VZVをはじめ麻疹ウイルスや他の多くのウイルス感染細胞でも抗原変調は確認され、生体内での感染病態との関連が指摘されてはいるものの詳細なメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

本課題では、抗gH抗体による抗原変調作用のメカニズムを明らかにすることで、VZV感染細胞が溶解感染サイクルから潜伏感染サイクルに移行するための必要十分条件となるウイルス側および細胞側の修飾を明らかにする。また潜伏感染関連遺伝子として知られているIE62とIE63が、抗gH抗体処理後4週間後の潜伏感染モデル細胞内で、蛋白として発現しているのか否か、また溶解感染時との性状の差異を検討することにより、潜伏感染状態維持の機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 抗gH抗体処理によるウイルス複製の抑制

ヒト胎児肺線維芽細胞(HEL)にVZV Oka株を感染させ、感染2時間後から培地中に抗gH抗体(15 µg/ml)を添加し、ウイルス蛋白の発現量をWestern Blot法で、局在の変化を蛍光抗体法で確認し、抗gH抗体によってVZVの溶解感染のどの過程が障害・修飾されているかを検討した。

(2) 細胞内外の抗gH抗体の局在とその輸送経路

培地中に添加した抗gH抗体の局在を細胞内外で追跡し明らかにすることで、抗原変調作用のメカニズム自体とそこに至るまでに抗gH抗体が辿るプロセスを明らかにする。そのために培地に添加した抗gH抗体(clone 94)とは異なるgHエピトープを認識する抗体(clone 36)を用いて、gHと抗gH抗体とを二重染色した。

(3) 潜伏感染モデル系におけるIE62とIE63の性状

VZV感染後ならびに抗gH抗体処理後4週間後の潜伏感染モデル系において、これまでに報告されている5つの潜伏感染関連遺伝子(ORF21, ORF29, IE62, IE63, ORF66)の発現を解析し、さらにIE62とIE63に関しては蛋白レベルでの発現の有無と局在を検討した。

4. 研究成果

(1) 抗gH抗体処理細胞におけるウイルス複製の抑制

VZVのglycoprotein E (gE) とgHの細胞

内局在を調べた結果、抗gH抗体存在下、感染2日後までは両者はよく共局在したが、5日後になるとgHとgEとの解離が観察された。

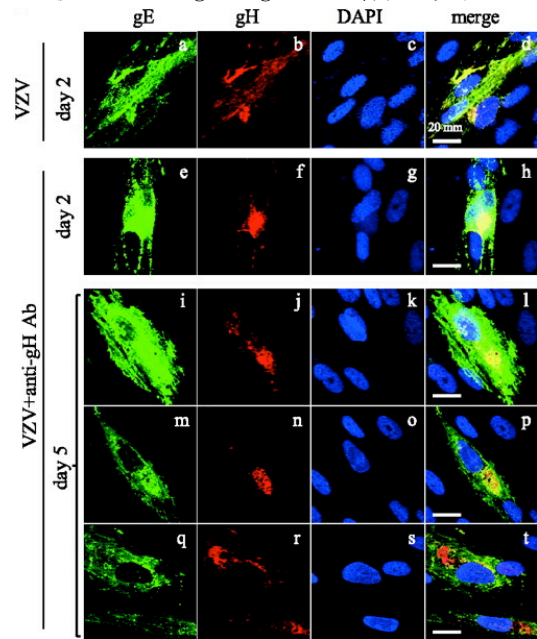


図1. 抗gH抗体処理細胞におけるgHとgEとの解離

ウイルス粒子構成タンパクの解離は、粒子形成の障害が起きていることを示唆する。これら糖タンパクの細胞内局在を明らかにするために様々な細胞内器官に対する抗体と二重染色した結果、gH抗体存在下5日後の感染細胞で、gHは小胞体マーカーであるBiP/GRP78と共局在を示した。しかしながらBiP/GRP78の染色像は、非感染細胞にくらべて顕著に肥大しており、小胞体ストレス: Unfolded Protein Response (UPR)の誘導が予想された。

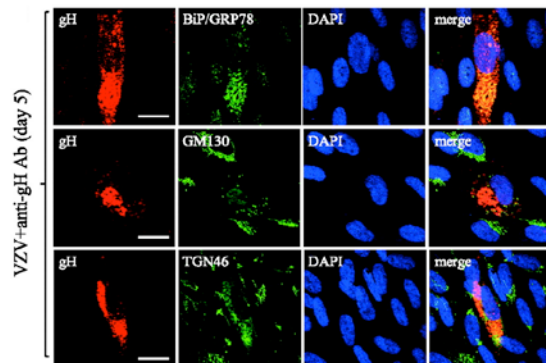


図2. gHと肥大化したBiP/GRP78の共局在

通常UPRの後には、プロテアソーム分解系もしくはオートファジーのいずれかの機構によって異常タンパクは排除される。その可能性については以下の(2)で検証した。

(2) 細胞内外の抗gH抗体の局在とその輸送経路

抗gH抗体は細胞表面でgHと複合体を形成

した後、clathrin 依存性 endocytosis により細胞内に取り込まれて、gH 以外の粒子形成蛋白 (gB, gE, IE62) とともに trans-Golgi 網 (TGN) に共局在することが明らかとなった。

また我々は、感染細胞周辺に抗 gH 抗体と粒子形成蛋白 (gH, gE, IE62) を含む microvesicles (MVs) が存在することを見出した。細胞外に放出される MVs は exosomes と shedding microvesicles (SMVs) とに大別され、それぞれ endosomes と細胞膜を由来とするため異なるマーカー蛋白を持つ (exosomes は CD63, SMVs は integrin 等)。そこで各マーカー蛋白に対する抗体で染色したところ CD63 陰性・integrin 陽性であったので、VZV 抗原変調細胞は SMVs を産生していると結論づけた。

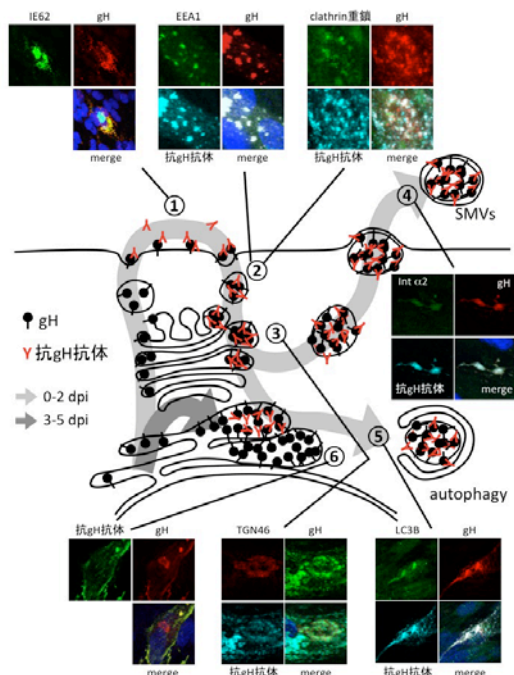


図 3. 抗 gH 抗体の細胞内局在と輸送経路

一方、細胞内では核近傍に gH と抗 gH 抗体が集積して 'aggresome' を形成し、それが autophagy マーカー蛋白である LC3B と共局在することが明らかとなり、gH と抗 gH 抗体の細胞内処理機構として autophagy の関与が示唆された。

(3) 潜伏感染モデル系における IE62 と IE63 の性状

5 つの潜伏感染関連遺伝子のうち 4 つ (ORF21, ORF29, IE62, IE63) は mRNA の発現が認められ、1 つ (ORF66) は検出できなかった。遺伝子ごとに検出率は異なり、IE63 と IE62 はそれぞれ 100% と 80% と高率に検出されたが、ORF21 と ORF29 は 60% に留まった。

IE62 と IE63 が蛋白レベルで発現しているかどうかをチェックしたところ、Western

blot 法では検出できなかったが、蛍光抗体法では両者の発現を確認することができた。その細胞内局在は、溶解感染時のそれとは大きく異なっており、IE62 はドット状を呈して主には細胞質に、一部は核に局在し、IE63 は顆粒状にほとんどが細胞質に局在していた。

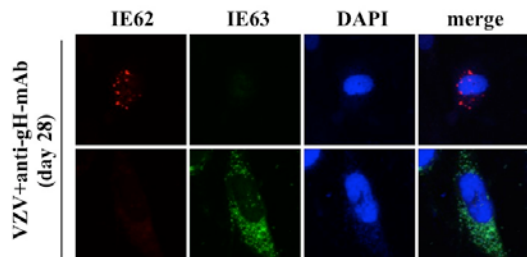


図 4. 潜伏感染モデル系での IE62 と IE63 の細胞内局在

これら IE 蛋白のイレギュラーな細胞内局在から、溶解感染時に本来果たされる IE 蛋白の機能が不全状態に陥っていることが明らかである。しかしながらそれが潜伏感染維持機構の原因であるのか結果であるのかまでは、本課題では追究できなかった。今後潜伏感染機構および再活性化機構のさらなる解明に向けて、本課題で得た知見が有益な足がかりとなることが期待できる。

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 4 件)

① Efficacy of ASP2151, a helicase-primase inhibitor, against thymidine kinase-deficient herpes simplex virus type 2 infection in vitro and in vivo. Takehiro Himaki, Yumi Masui, Koji Chono, Tohru Daikoku, Masaya Takemoto, Bo Haixia, Tomoko Okuda, Hiroshi Suzuki, Kimiyasu Shiraki. Antiviral Research. 査読有り 2012 Feb;93(2):301-4.

② Characterization of a fully human monoclonal antibody against extracellular domain of matrix protein 2 of influenza A virus. Tatsuhiko Ozawa, Aishun Jin, Kazuto Tajiri, Masaya Takemoto, Tomoko Okuda, Kimiyasu Shiraki, Hiroyuki Kishi, Atsushi Muraguchi. Antiviral Research. 査読有り 2011 Sep;91(3):283-7

③ Neutralizing anti-gH antibody of Varicella-zoster virus modulates distribution of gH and induces gene regulation, mimicking latency. Kimiyasu Shiraki, Tohru Daikoku, Masaya Takemoto, Yoshihiro Yoshida, Kazuhiro Suzuki, Yasushi Akahori, Toshiomi Okuno, Yoshikazu Kurosawa, and Yoshizo Asano. Journal of Virology. 査読有り 2011

Aug;85(16):8172-80.

④ Novel anticytomegalovirus activity of immunosuppressant mizoribine and its synergism with ganciclovir. Takashi Kuramoto, Tohru Daikoku, Yoshihiro Yoshida, Masaya Takemoto, Kumi Oshima, Yoshito Eizuru, Yoshinobu Kanda, Toshio Miyawaki and Kimiyasu Shiraki. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 査読有り 2010 Jun;333(3):816-21.

〔学会発表〕(計4件)

① Masaya Takemoto, Tohru Daikoku, Kazuhiro Suzuki, Yasushi Akahori, Yoshikazu Kurosawa, Yoshizo Asano, Kimiyasu Shiraki, Aberrant VZV glycoproteins traffic modulated by neutralizing anti-gH MAb, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011年9月13日, 札幌コンベンションセンター(北海道)

② Masaya Takemoto, Tohru Daikoku, Kazuhiro Suzuki, Yasushi Akahori, Yoshikazu Kurosawa, Yoshizo Asano, Kimiyasu Shiraki, Aberrant VZV glycoproteins traffic modulated by neutralizing anti-gH MAb, 36th Annual International Herpesvirus Workshop, 2011年7月27日, Gdansk, Poland

③ Masaya Takemoto, Tohru Daikoku, Kazuhiro Suzuki, Yasushi Akahori, Yoshikazu Kurosawa, Yoshizo Asano, and Kimiyasu Shiraki. Anti-gH neutralizing antibody alters localization of VZV glycoproteins B and E, 35th Annual International Herpesvirus Workshop, 2010年7月26日, University of Utah, USA

④ 武本眞清, 大黒 徹, 吉田与志博, 浅野喜造, 白木公康, 水痘・帯状疱疹ウイルス glycoprotein H に対する中和抗体による、細胞内ウイルスの感染性消失過程の解析, 第58回日本ウイルス学会, 2010年11月9日, あわぎんホール(徳島)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武本 眞清 (TAKEMOTO MASAYA)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教
研究者番号: 60379237

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: