

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790456

研究課題名(和文)水痘带状疱疹ウイルス特異的CTL抗原の探索とワクチン接種に伴う細胞性免疫の解析

研究課題名(英文) Screening of Varicella-Zoster virus specific CTL antigen and analysis of Varicella vaccine induced cell-mediated immunity.

研究代表者

金井 亨輔 (KANAI, Kyosuke)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：20596621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：水痘带状疱疹ウイルス(VZV)の感染防御には、細胞性免疫(CMI)が大きく関わっている。CMIを誘導するVZVの主要なタンパクを明らかにするため、エリスポット法を用いた抗原の探索を行った。核に分布するVZVタンパクを検索対象とし、健康人の末梢血単核球に共通してCMIを誘導するタンパクを探索した。その結果、ORF8, 61, 66がCMIを誘導することを明らかにした。このうち、ORF61についてはエピトープ配列の同定を行った。今回新たに明らかにされた抗原ペプチドは、標準化した抗原を用いたCMI定量系の樹立に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cell-mediated immunity (CMI) is thought to be crucial for protection against Varicella-Zoster virus (VZV) infection. We screened for major CMI-inducible VZV protein by Enzyme-Linked Immuno-Spot (ELISPOT) assay. Because already-known CMI antigens of other herpesviruses are localized in cell nuclei, nuclear distributed VZV proteins were examined as candidates for major CMI antigens. VZV protein(s) inducing CMI were searched among peripheral blood mononuclear cell specimens derived from healthy volunteers. As the result, ORF8, 61 and 66 induced CMI in more than 80% of specimens. About ORF61, epitope sequences were identified using oligo peptides. Our findings contribute to establish a new standardized CMI-quantification system.

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：水痘带状疱疹ウイルス(VZV) 感染防御 細胞性免疫

1. 研究開始当初の背景

水痘帯状疱疹ウイルス (Varicella Zoster Virus: VZV) は、 α ヘルペスウイルス亜科に属する。DNA ゲノムに 70 個の遺伝子を持ち、初感染時に水痘、再活性化時に帯状疱疹を起こす (Arvin et al., 2002)。水痘の予防を目的とした安全かつ有効なワクチンが実用化されているが、水痘ワクチン接種者の 5~20% はブレイクスルー水痘 (BTV) を発症する (Bernstein et al. 1993)。BTV とは、ワクチン接種者で抗体価が陽転しても、野生株 VZV に感染し発症してしまう水痘である。BTV は通常の水痘と比較して軽症ではあるが、次の水痘の感染源となり公衆衛生上の問題がある (Schmid & Jumaan., 2010)。BTV 予防のためには抗体価の陽転のみでは不十分であり、細胞性免疫 (CMI) が賦活化されることが重要である。

細胞性免疫は帯状疱疹 (HZ) の発症にも重要な役割を果たしている。VZV 再活性化は加齢による細胞性免疫力の低下と関連しており (Burke et al., 1982)、細胞性免疫力の賦活化は帯状疱疹の発症を抑制する (Oxman et al., 2008) ことが知られている。

2. 研究の目的

BTV や HZ の予防・治療法の開発のためには VZV に対する CMI 応答についての知見が不可欠である。VZV に対する CMI 応答は、水痘抗原の皮内接種や、VZV 感染ヒト 2 倍体細胞ライセート抗原を用いた Enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT) 法を用いて定量されるが、細胞性免疫の主力である CTL に対する抗原性については、これまでに 9 個のタンパクで検討された (Arvin et al., 2002, 2003; Giller et al., 1989; Jones et al., 2007) のみであり、残り 61 個のタンパクについては未だ抗原性が検討されていない。

そこで本研究では、VZV に対する細胞性免疫応答の中心的指標となる抗原タンパクを探索し、見出されたタンパクの抗原エピトープ配列の同定を行った。

3. 研究の方法

これまでに知られているヘルペスウイルスの主要抗原は、感染後の前初期、または初期に恒常的に発現する核抗原、という共通点を持つ。このため、VZV でも同様に核に発現するいずれのタンパクが主要な抗原であると予想し、VZV のコードするタンパクのうち、対象として検討を行った。

これまでの研究において、VZV 特異的 CMI を定量するための ELISPOT 法には VZV 感

染ヒト二倍体線維芽細胞抽出液が抗原として用いられてきた。我々はこれまでに、細胞分画して得た核画分ライセートを用いることで、抗原性を維持したまま非特異反応を低減できる VZV タンパク特異的 CTL の定量系を準備した。Oka ワクチン株 (V-Oka) 感染モルモット線維芽細胞 (GPL) を超音波破砕し可溶性画分をバルク抗原として用いた (vOka)。

また、他のヘルペスウイルス主要抗原の VZV ホモログ、及びそれらの共通点である核への局在が予想された VZV タンパクを His-tag 融合タンパクとして一過性発現させた HEK293T 細胞を低張液処理し、同様に核画分を回収・調製し個別の VZV タンパク抗原として用いた。

さらに、ORF61 タンパクの C 末端側アミノ酸配列をカバーするオリゴペプチド (1 番 ~ 22 番) を作成し、抗原として用いた。

CMI を定量する材料として、水痘既往のある健常者ボランティア 20 名から得た末梢血単核球を材料とし、抗原刺激により活性化し IFN- γ を産生する細胞を ELISPOT 法により計数することで行った。

4. 研究成果

水痘既往のある 20 人の健常人ボランティアから得た PBMC を対象に、21 種の核タンパク抗原に対する CMI 応答を解析した (図 1)。ORF8, 61, 62, 63, 66 の 5 種のタンパクに対し、80% 以上の検体で CMI 応答を誘導した。このうち、ORF62, 63 タンパクが CMI 応答を引き起こすことはこれまでの報告で示されているが、ORF8, 61, 66 については今回の我々の検討で初めて明らかにした。

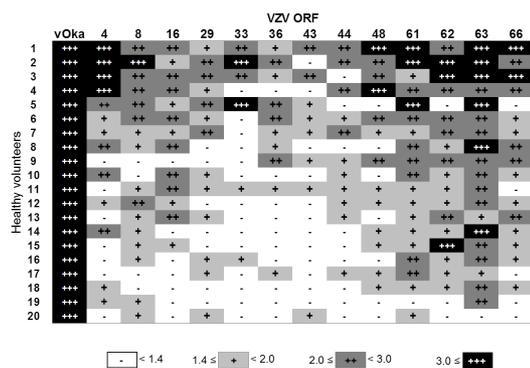


図 1

引き続き、ORF61, 66 の CMI 抗原となるエピトープの同定を試みた。ORF8 については、そのアミノ酸配列長が長大であり、組換え体の作成及びペプチド合成に難航が予想されたため本研究の研究対象から除外した。

まず、エピトープ領域を絞り込むために、ORF61, 66 のアミノ酸配列を 3 断片に分けた組換え体を作成した (図 2 A)。これらそれぞれ

れを抗原として ELISPOT 法を用い、ORF61, 66 に強い CMI 応答を引き起こした 4 名の PBMC を用いた ELISPOT 法により抗原性を比較した (図 2 B)。

その結果, ORF61 では C 末端側断片で共通して CMI 応答が見られた。一方 ORF66 では共通した CMI 応答が見られなかったことから、以降の解析を断念した。

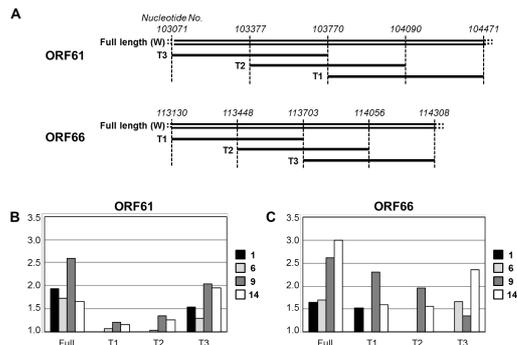


図 2

エピトープ配列を同定するために、ORF61 の C 末端領域をカバーする 22 種のオリゴペプチドを作成した(図 3 A)。このペプチド群をそれぞれ抗原とし、ORF61 に強い CMI 応答を引き起こした 3 名の健康人 PBMC を用いて ELISPOT 法によりエピトープ配列の検索を行った。その結果 (図 3 B), 11 番 (アミノ酸番号 348-367) と 17 番 (288-307) のペプチドで共通して CMI の誘導が見られ、これらの領域が CMI エピトープ配列であると考えられた。

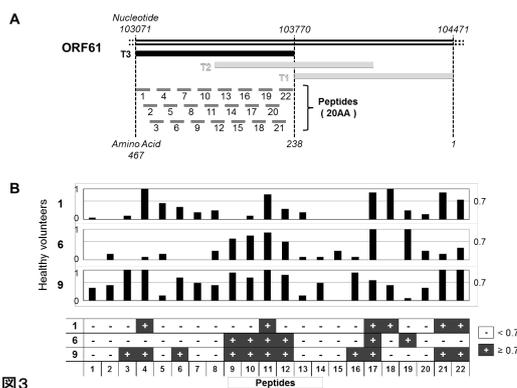


図 3

以上の実験結果から、CMI 応答を誘導する VZV タンパクとして ORF8, 61, 66 を新たに同定した。さらに、ORF61 のエピトープスクランを行い、アミノ酸番号 288-307, 348-367 がエピトープであることを明らかにした。しかしながら VZV では、ヒトサイトメガロウイルスの核タンパクである pp65 のような、単独で他の全抗原に比肩する抗原性を示すタンパクは見いだせなかった。このことから、

VZV では、複数の抗原によって CMI 応答を引き起こされている可能性が示された。本研究結果は、今回同定された抗原及び既知の抗原エピトープペプチドを用いることで、標準化した抗原を用いた ELISPOT 法による CMI の定量法の樹立に寄与できるものだと考えられる。

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 2 件)

Nagata K, Higaki K, Nakayama Y, Miyauchi H, Kiritani Y, Kanai K, Matsushita M, Iwasaki T, Sugihara H, Kuwamoto S, Kato M, Murakami I, Nanba E, Kimura H, Hayashi K. Presence of Epstein-Barr virus-infected B lymphocytes with thyrotropin receptor antibodies on their surface in Graves' disease patients and in healthy individuals. *Autoimmunity*, 査読有, 47(3), 2014, 193-200, doi: 10.3109/08916934.

Sano H, Nagata K, Kato K, Kanai K, Yamamoto K, Okuno K, Kuwamoto S, Higaki-Mori H, Sugihara H, Kato M, Murakami I, Kanzaki S, Hayashi K. EBNA-2 -deleted Epstein-Barr virus from P3HR-1 can infect rabbits with lower efficiency than prototype Epstein-Barr virus from B95-8. *Intervirology*, 査読有, 56(2), 2013, 114-121, doi: 10.1159/000343753.

〔学会発表〕(計 3 件)

金井亨輔, 谷口留美, 湯華民, 森康子, 井上直樹, 水痘帯状疱疹ウイルス特異的細胞性免疫を誘導する抗原の探索, 第 16 回日本ワクチン学会学術集会, P-061, 2012 年 11 月 17 日~18 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

金井亨輔, 湯華民, 森康子, 井上直樹, 水痘帯状疱疹ウイルス特異的細胞性免疫を誘導する抗原の探索, 第 60 回日本ウイルス学科九学術集会, O1-B-08, 2012 年 11 月 13 日~15 日, グランキューブ大阪 (大阪府)

金井亨輔, 谷口留美, 湯華民, 森康子, 井上直樹, 水痘帯状疱疹ウイルス特異的 CTL 抗原の探索, 第 27 回ヘルペスウイ

ルス研究会, 14, 2012年6月8日, あい
ち健康プラザ(愛知県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金井 亨輔 (KANAI, Kyosuke)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号: 20596621