

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860303

研究課題名(和文)ヘルペスウイルス感染モデルにおける多分子反応性B細胞選択機構の解明

研究課題名(英文)Generation of polyreactive B cells in murine herpesvirus infection

研究代表者

榊原 修平 (Sakakibara, Shuhei)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：10618838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：MHV68感染において誘導される胚中心反応で、複数の抗原に反応する多分子反応性クローンが存在すること、それらが形質芽細胞分画でも認められることを見出した。特に、一過性に誘導される自己抗体価は、短寿命形質芽細胞に依存していることが明らかとなった。興味深いことに長寿命細胞では、ウイルス抗原特異的なクローンがより多く認められ、形質芽細胞の分化において、自己寛容の維持機構が存在していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To examine immunological mechanisms in autoantibody production in viral infection, we have utilized murine gamma-herpesvirus 68 (MHV68) infection to inbred mice. In this study, we found that MHV68 infection induced polyreactive B cell clones in germinal center B cells and plasmablasts/plasma cells in mice infected with MHV68. It should be noted that a transient autoantibody appeared to be originated from short-lived plasmablasts in spleen. In long-lived plasma cells, an increased proportion of virus-mono-specific clones were observed, indicating a novel tolerance checkpoint in the plasmablast compartment.

研究分野：免疫学

キーワード：自己抗体産生

1. 研究開始当初の背景

(1) Epstein-Barr ウイルス (EBV) は、成人の約 9 割が感染しているユピキタスなウイルスである。多くの場合、乳幼児期に EBV に感染し、不顕性感染を経験するが、青年期以降の初感染では、リンパ球の異常増殖を認める伝染性単核症 (IM) を発症する。また、EBV は全身性エリテマトーデス (SLE) との関連が疑われており、その根拠として、IM 発症時の自己抗体産生、SLE フレアにおける EBV 感染細胞の増加などが挙げられる。しかし、EBV 感染率と SLE 発症率の間には乖離があり、ある遺伝的素因における疾患発症の引き金となっていると考えられるが、詳細は不明である。

(2) 申請者は、EBV 感染で誘導される液性免疫応答にて、自己抗体が産生される可能性を検討すべく、そのモデルとして、murine γ -herpesvirus 68 (MHV68) を利用してきた。マウスへの経鼻接種で、MHV68 は気道や肺などでの急性感染を呈した後、リンパ節や脾臓へ移り、主に B 細胞にて潜伏感染を成立させる。MHV68 接種 2 週間後から血清抗ウイルス IgG が検出され、これは、少なくとも 6 ヶ月以上、高力価で保持される。その一方で、接種 2~3 週間後にかけて、一過性に DNA やカルジオリピンに対する自己抗体が産生される (図 1)。

申請者らは、これまでに、single-cell Ig cloning による抗体 (B 細胞レセプター [BCR]) 反応性解析を行い、以下の事項を明らかにした。

MHV68 感染マウスの脾臓 IgG⁺ 胚中心 B 細胞の約 50% は自己反応性を呈した。しかも、MHV68 粒子に反応性を有するクローンの約 65% は自己反応性であった (図 2)

これら自己反応性クローンの約半分以上は、複数の抗原に反応する多分子反応性クローンであった。

多分子反応性クローンのうち、可変領域の体細胞超変異 (SHM) によって自己反応性を獲得しているクローンが大半を占めた。

MHV68 感染 B 細胞と非感染 B 細胞で、自己反応性クローンの出現頻度は同等であった。

2. 研究の目的

申請者のこれまでの研究から、自己抗体産生を誘導する murine γ -herpesvirus 68 (MHV68) のマウスへの感染で、複数の抗原に反応する多分子反応性 (polyreactive) B 細胞が、胚中心を由来として誘導されることが明らかとなった。多分子反応性クローンの大半は、体細胞超変異 (SHM) により自己反応性を獲得していたことから、MHV68 感染では、積極的な多分子反応性クローンの選択を可能にする胚中心環境が

存在すると予想される。本課題では、胚中心 B 細胞への抗原提示に焦点をあて、抗原の細胞内局在や感染細胞死を改変した組換えウイルスの感染などにおける胚中心 B 細胞のレパトア解析を通じ、MHV68 感染をモデルとした、多分子反応性クローンの選択の機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) MHV68 感染における主要な B 細胞抗原の同定

これまでの研究から、MHV68 感染で誘導された脾臓胚中心においては、10% 以下の IgG⁺ GC B 細胞で抗原特異的なクローンが認められた。この時期の IgG 抗体が主に認識する抗原を血清 IgG を用いた免疫沈降法で回収し、質量分析によって同定した。

(2) MHV68 抗原反応性 B 細胞の分離と多分子反応性の確認

同定した抗原を組換えタンパク質として作製し、蛍光プローブを用いて、反応性 B 細胞を分離した。それらの抗体遺伝子をクローニングし、組換え抗体を作製し、反応性を調べた。

(3) 変異型 MHV68 の作製

バクテリア人工クロモソーム (BAC) システムを利用して *in vivo* での増殖力が低下したウイルス株を作製し、マウスに感染させ、自己抗体産生を調べた。

4. 研究成果

(1) MHV68 急性感染における抗体反応

上述の方法で、ウイルス抗原を同定した。感染細胞ライセートから、ORF25, ORF6, ORF61, ORF21, ORF17 などのウイルス遺伝子産物を同定した (図 1)。それぞれの反応性は、各遺伝子産物に対するウエスタンブロットや免疫蛍光染色にて確認した。

(2) MHV68 抗原反応性 GC B 細胞の検出と分離

同定されたウイルス抗原のうち、ORF17 を大腸菌にて発現させ、精製した後、ピオチンラベルし、プローブとした。脾臓 GC B 細胞における反応性細胞の頻度を FACS にて解析したところ、GC B 細胞の約 3% がウイルス抗原に反応することが分かった (図 2)。これらのウイルス反応性 B 細胞は、感染の早い段階で GC B 細胞より消失することがわかった。

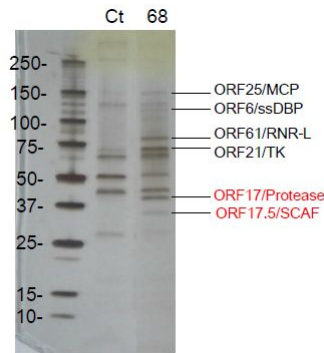


図1 . MHV68 主要 B 細胞抗原の同定。血清 IgG にてアフィニティカラムを作製し、感染 NIH3T3 細胞ライセートより、ウイルス抗原を回収し、SDS-PAGE で分離後、質量分析で同定した。

(3) 変異型ウイルスの作製

in vivo での増殖力が低下したウイルス株として、ORFM2 欠失変異株を作製した。マウスへの感染を行ったが、予想に反し、脾臓などへの感染拡大や自己抗体価で野生型と大きな差は認めなかった。

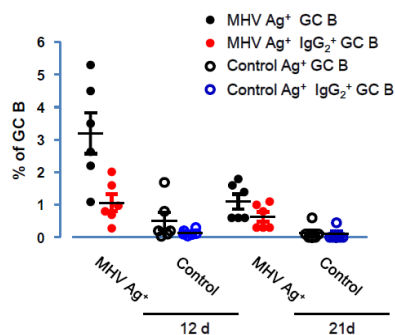


図2 . 脾臓におけるウイルス抗原反応性 B 細胞の割合。GC B 細胞 (B220⁺ CD38^{int} GL-7^{hi}) を MHV68 ORF17、コントロールとして GST で検出した。

以上の結果から、当初の予想に反し、MHV68 感染で誘導される多分子反応性 GC B クロームは、ウイルス抗原に対する GC 反応とは直接関係なく、あるいは無秩序な GC 反応に由来していることが考えられた。

そのような異常な GC B 細胞の性質を探るため、Microarray にて発現遺伝子を比較したところ、コントロールとして用いたヒツジ赤血球の免疫反応に対し、MHV68 では、IFN 応答因子を含む炎症関連遺伝子が多く発現していることが明らかとなった(図 3)。また、メモリー B 細胞

で高く発現している *Il2rb* が高発現し、しかしながら、明帯で誘導される *Nr4a1* が減少しているなど特徴的な遺伝子発現パターンを示した。

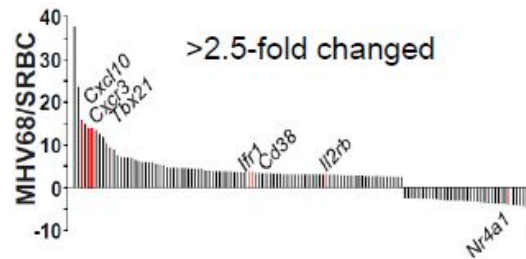


図3 . 脾臓 GC B 細胞の発現プロファイル

一連の研究を通じて、ウイルス抗原特異的な抗体価は最大半年にわたりほぼ一定の高い値で推移するが、自己反応性抗体は一過性であることがわかってきた。その詳細をクローンレベルで明らかにすべく、以下の実験を構築した。

抗体産生細胞あるいは、形質細胞のマスターレギュレーターである Blimp1 の GFP レポーターマウスを活用し、MHV68 感染で誘導される形質芽細胞 (PB) を分離することをこころみた。Blimp1 の発現は、短寿命 PB と長寿命 PB において発現に高低が認められ、GFP 発現の強度でそれらを分離することができる。MHV68 感染 3 週間後の脾臓における超寿命 PB と短寿命 PB の分化における多分子反応性クローンの割合を調べた。すると、短寿命 PB で認める自己反応性が超寿命 PB では低下し、反対にウイルス抗原特異的なクローンの頻度は短寿命 PB では少ないものの、超寿命 PB では増加した(図 4)。

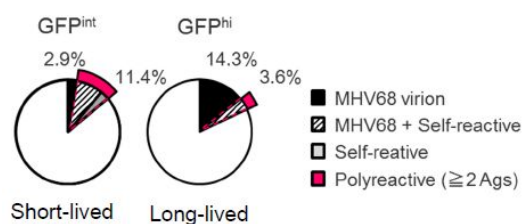


図4 . 短寿命 PB (GFP^{int}) と長寿命 PB (GFP^{hi}) における多分子反応性および、ウイルス抗原特異的なクローンの頻度

このことから PB 分画においても、その分化度において、免疫寛容チェックポイントが存在していることが示唆された。

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2件)

1. Evasion of affinity-based selection in germinal centers by Epstein-Barr virus LMP2A. Minamitani T, Yasui T, Ma Y, Zhou H, Okuzaki D, Tsai CY, Sakakibara S, Gewurz BE, Kieff E, Kikutani H. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Sep 15;112(37):11612-7. doi: 10.1073/pnas.1514484112 査読有
2. Contribution of viral mimics of cellular genes to KSHV infection and disease. Sakakibara S, Tosato G. Viruses. 2014 Sep 19;6(9):3472-86. doi: 10.3390/v609347 査読有

[学会発表](計3件)

1. “Antigen-specific maturation of anti-nuclear antibodies in systemic lupus erythematosus” S. Sakakibara, K. Takeda, T. Yasui, M. Narazaki, T. Tanaka, H. Kikutani The 44th Annual Meeting of the Japanese Immunology Society: 北海道 2015年11月18日~20日
2. “Generation and evolution of autoreactive B cells in systemic lupus erythematosus patients” Sakakibara S., et al The 43rd Annual Meeting of the Japanese Immunology Society: 千葉県 2014年12月10日~12日
3. “Generation and Evolution of Autoreactive B Cells in Systemic Lupus Erythematosus Patients” Sakakibara S., et al. The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity: 兵庫県 2014年9月23日~26日

6. 研究組織

(1)研究代表者

榊原 修平 (SAKAKIBARA, Shuhei)
大阪大学・微生物病研究所・分子免疫制御
分野・助教
研究者番号: 10618838