

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19638

研究課題名(和文) Epstein-Barrウイルス感染におけるヒト白血球でのインフラマソーム応答

研究課題名(英文) Epstein-Barr virus infection-induced inflammasome activation in human leukocytes.

研究代表者

鳥居 ゆか (TORII, Yuka)

名古屋大学・医学系研究科・特別研究員(RPD)

研究者番号：00770281

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)：ヒト白血球由来細胞株を用いてEpstein-Barrウイルス(EBV)感染時のインフラマソーム応答について検討した。通常EBVはヒトのB細胞に持続感染するが、細胞株を用いた実験では単球やT細胞にも感染することが示された。B細胞、T細胞由来の細胞株はEBV感染時にインフラマソーム応答の産物であるIL-1の産生はみられなかったが、単球由来の細胞株ではIL-1の産生がみられた。さらに細胞中の活性化カスパーゼ-1とパターン認識受容体の一つであるAIM2(Absent in Melanoma 2)の発現が増加しており、これら分子がEBV感染時の単球のインフラマソーム応答に関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Inflammasomes are cytoplasmic sensors that regulate the caspase-1 activation and the secretion of interleukin-1 (IL-1) or interleukin-18 (IL-18) in response to foreign molecules. Inflammasome activation in human leukocytes during Epstein-Barr virus (EBV) infection was investigated. It was shown that EBV could infect not only to B lymphocyte cell lines, but also to T lymphocyte and monocyte cell lines. EBV infection induced caspase-dependent IL-1 production in monocyte cell lines and primary human monocytes, while not in B-cell or T-cell lines. To identify the sensor molecule, we examined the mRNA and the protein levels of NLR family pyrin domain-containing 3 (NLRP3), absent in melanoma 2 (AIM2), and interferon-inducible protein 16 (IFI16). Increased AIM2 levels were observed in EBV-infected monocyte cell lines. Our results suggest that EBV infection of human monocytes induces caspase-1-dependent IL-1 production, and that AIM2 is involved in this response.

研究分野：感染症

キーワード：Epstein-Barr virus Inflammasomes interleukin-1

1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr ウイルス(EBV)はヒトに普遍的に感染し、一度感染するとBリンパ球や唾液腺に終生持続感染する。初感染時、殆どのヒトは無症状であるが、一過性に発熱・リンパ節腫大・肝機能異常を伴うこともある(伝染性単核球症)。ところが、一部のヒトにおいて、血球貪食性リンパ組織球症(EBV-HLH)や慢性活動性EBV感染症(CAEBV)を発症することがあり、これらの疾患はいずれも重症な経過を辿る。CAEBVは本邦で50例/年の発症率と考えられるが5-10年の経過で臓器不全やHLHへの移行により死亡率が高くなる予後不良の疾患である。造血幹移植が唯一の根治療法であるが、移植後の生存率は66%であり(Kimura H, 他. Blood, 2012)、病態にも不明な点が多く、さらなる病態の解明及び新たな治療法の確立が望まれる。インフラマソームとは、感染細胞において炎症性サイトカインを細胞外に放出するために必須の分子である。近年、ウイルス由来の核酸が細胞質のパターン認識受容体(PRR)で認識されることでインフラマソームが形成され、カスパーゼの活性化や、IL-1等の炎症性サイトカインが誘導されることが報告されている(Muruve DA, 他. Nature, 2008)。単純ヘルペスウイルス等で感染時のインフラマソーム活性の機序が解明されつつあるが、EBVの初感染時では報告がない。EBVはこれまでリンパ球を中心とした解析がすすめられてきたが、EBVの初感染に対する単球や好中球などの自然免疫応答についての解析は極めて限られている。EBV関連疾患患者の血清でIL-18が上昇しているという報告(Veerdonk, 他. J Infect Dis. 2012)等からEBV感染における自然免疫細胞のインフラマソーム活性に着目し、単球や末梢白血球のインフラマソーム活性を解析することは、EBV-HLHやCAEBV発症メカニズムの解明が期待でき、ひいては分子標的薬剤による治療を検討するうえで重要な知見になる。

2. 研究の目的

(1) ヒト由来細胞株およびヒト単球を用いたEBV感染およびそのインフラマソーム応答の解析

EBV産生細胞上清から作成したウイルス液をヒトのBリンパ球、Tリンパ球および単球由来の細胞株とインキュベートして、EBVが感染するか確かめる。同時に、インキュベート後の培養上清や細胞を用いて、IL-1の産生及びカスパーゼの活性について解析する。同様に、ヒト末梢血から磁気ビーズ法にて回収したヒト単球初代培養細胞で同様に検討を行う。

(2) EBV感染細胞におけるインフラマソーム関連分子の同定

(1)でEBウイルス感染時にIL-1の産生及びカスパーゼの活性が確認できた細胞株においてインフラマソームを構成するパター

ン認識受容体(PRR)についてmRNA発現およびイムノプロットで解析する。さらに、候補となるPRRについてsiRNA導入を行いインフラマソーム応答が抑制されるか観察する。

3. 研究の方法

(1) ヒト由来細胞株およびヒト単球を用いたEBV感染およびそのインフラマソーム応答の解析

感染するとGFP陽性となるEBVを産生するEBV陽性上皮由来細胞株(AGS-GFP-EBV)の培養上清を遠心で濃縮しウイルス粒子を精製した。BJAB(ヒトBリンパ球由来の細胞株)を用いて設定した感染力価(Green BJAB Unit)を定めた(表1)。

$$\text{GBU (Green BJAB Unit)} = -\ln \left(1 - \frac{\text{GFP陽性細胞数}^*}{\text{カウントした細胞数}^*} \right) \times \text{Well中の細胞数} \times \text{希釈倍率}$$

*フローサイトメトリーでカウントした細胞数およびGFP陽性細胞数

(表1.)

6×10^5 及び 6×10^6 GBUの力価のウイルス上清をTHP-1(ヒト単球由来細胞株)、Jurkat(ヒトT細胞由来株)とインキュベートさせて48時間培養し、経時的に蛍光顕微鏡で観察およびフローサイトメトリーで感染細胞を測定した。さらに、RT-PCRによるEBV関連遺伝子発現定量を行い感染のパターンを解析した。

経時的に培養上清中のIL-1、IL-18をELISAで測定し、培養細胞中のカスパーゼ活性についてmRNA発現解析およびイムノプロットにより発現を観察した。また、カスパーゼ-1の関与について検討するためカスパーゼ-1阻害薬の投与によりIL-1の産生に影響がみられるか検討した。

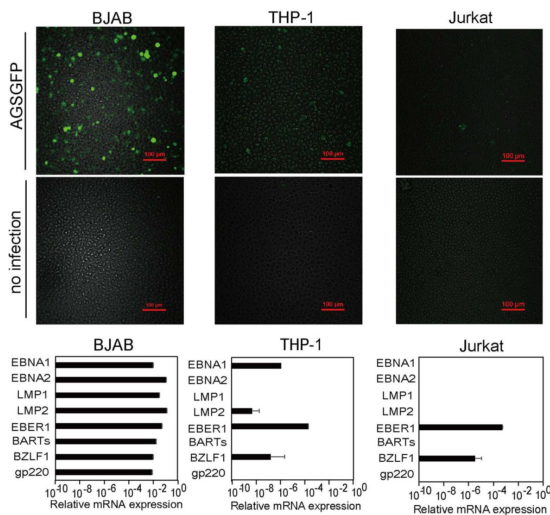
ヒト末梢血より磁気ビーズ法で回収したCD14陽性単球初代培養細胞を用いて同様にウイルス液とインキュベートして経時的に蛍光顕微鏡で観察し、培養上清のIL-1の測定と細胞のカスパーゼ活性についてmRNA発現解析およびイムノプロットにより発現を確認した。

(2) EBV感染細胞におけるインフラマソーム関連分子の同定

(1)でIL-1の産生及びカスパーゼの活性が確認できた細胞株について、cell lysateとRNA抽出を行い、イムノプロットおよび定量PCRによるmRNA発現解析を行い、代表的なPRRである3つのPRR分子、Absent in Melanoma 2 (AIM2)、Gamma-interferon-inducible protein16 (IFI16)、NOD-like receptor3 (NLRP3)について発現量の経時的变化を観察した。さらに候補となった分子についてTHP-1細胞にsiRNAをエレクトロポレーションで導入し、EBV感染によるインフラマソーム応答に変化がみられるか観察を行った。

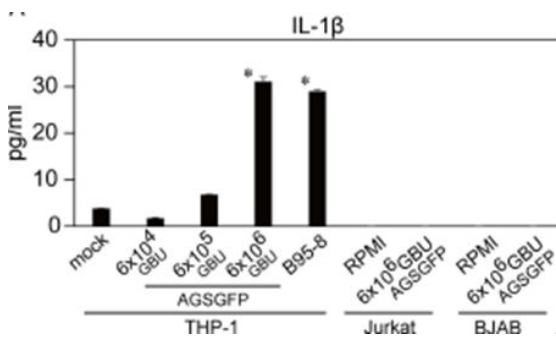
4. 研究成果

6 × 10⁶ GBU の力価のウイルス上清を THP-1 とインキュベートしたところ、48 時間後に 1.73% が GFP 陽性になり、EBV 感染を認めた。EBV 感染遺伝子の解析では、BJAB においては EBNA1, EBNA2, LMP1, LMP2, EBER1, BARTs, BZLF1, gp220 の 8 つの遺伝子全て発現していたが、THP-1 では LMP2, EBNA1, EBER1, BZLF1 の 4 つの遺伝子が発現していた。BZLF1 は溶解感染遺伝子だが、エンペロープタンパクである gp220 遺伝子の発現はなく、インキュベート後 48 時間をピークに GFP 陽性細胞が消退することから、THP-1 における EBV 感染は不完全な溶解感染であると考えられた (図 1.)。



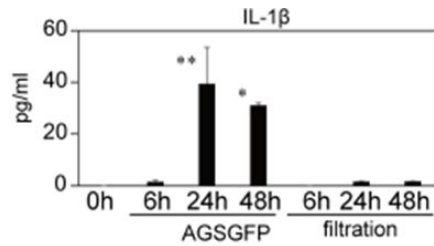
(図 1.)

EBV 感染後の培養上清の IL-1 を ELISA で測定したところ、BJAB および Jurkat では 1 は産生しなかったものの、THP-1 では有意に産生が増加した。B95-8 細胞 (EBV 産生細胞) の培養上清とインキュベートしたときも IL-1 は産生した (図 2.)。

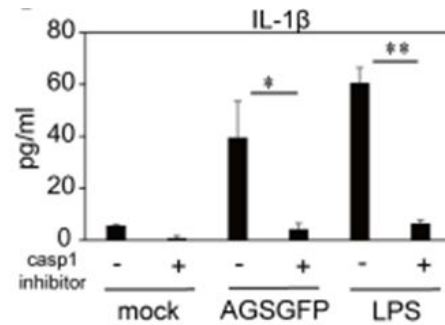


(図 2.)

さらに、ウイルス液からフィルターにてウイルス粒子を除いた液では IL-1 の産生が見られなかったことから EBV 粒子が単球に感染することで、IL-1 が産生されると考えられた (図 3.)。さらに、カスパーゼ-1 阻害薬との併用で IL-1 の産生が著明に抑制されたことから、EBV 感染による IL-1 の産生はカスパーゼ-1 依存性であることが示唆された (図 4.)。

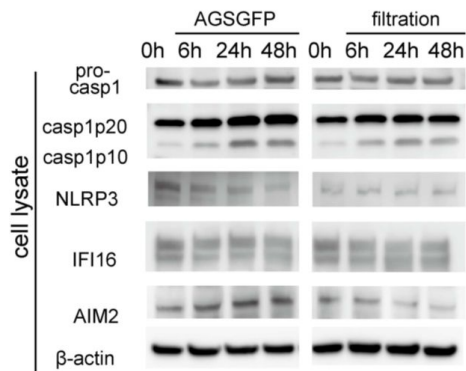


(図 3.)

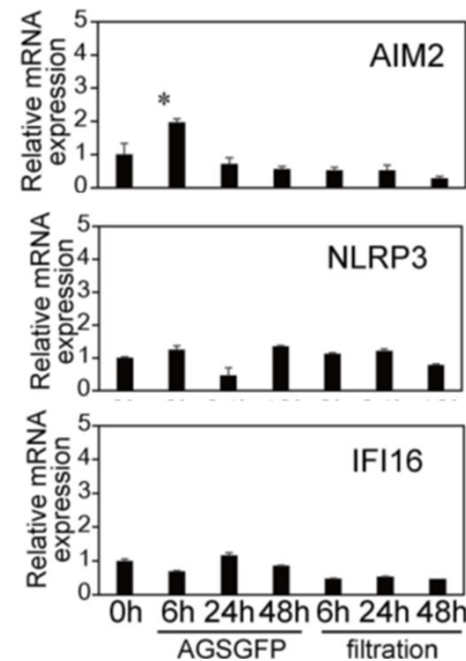


(図 4.)

次に、PRR についての発現を調べたところ、免疫プロット (図 5.)、mRNA 解析 (図 6.) において、AIM2 のみ、発現増強をみとめた。



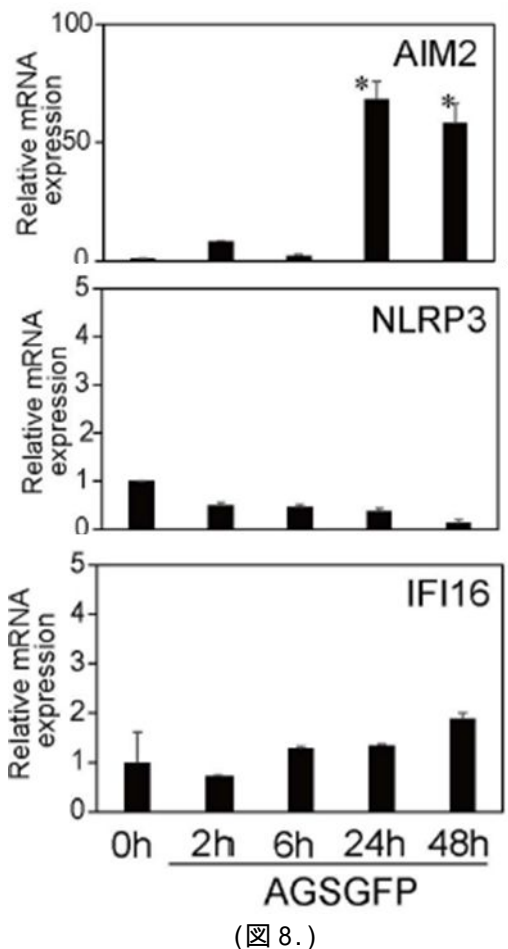
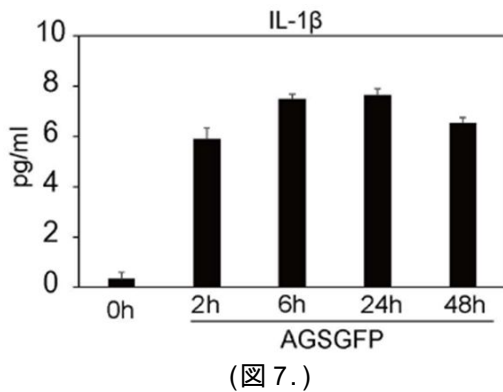
(図 5.)



(図 6.)

さらに、ヒト単球の初代細胞でも同様に EBV

ウイルス液とインキュベートして感染およびインフラマソーム応答について検討したところ、THP-1 同様、EBV ウイルスとインキュベート後 48 時間で感染細胞が検出され、IL-1 の産生が認められた(図 7.)。PRR の解析では免疫プロットでは差がみられないものの、mRNA の解析では THP-1 と同様に AIM2 の発現が上昇していた(図 8.)。



これらの結果より、EBV 感染は単球のインフラマソーム活性化を起こすことが示された。またインフラマソーム応答には AIM2 が関与していることが示唆された。

<引用文献>

Kimura H, Ito Y, Kawabe S, Gotoh K et al. EBV-associated T/NK-cell lymphoproliferative diseases in nonimmune-

compromised hosts: prospective analysis of 108 cases. *Blood*. 119(3), 2012, 673-86.

Muruve DA, Pétrilli V, Zaiss AK et al. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature*. 452(7183), 2008, 103-7.

van de Veerdonk FL, Wever PC, Hermans MH et al. IL-18 serum concentration is markedly elevated in acute EBV infection and can serve as a marker for disease severity. *J infect Dis*. 206(2), 2012, 197-201.

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9件)

Kawada J, Ando S, Torii Y, Watanabe T, Sato Y, Ito Y and Kimura H. Antitumor effects of duvelisib on Epstein-Barr virus-associated lymphoma cells. *Cancer Med*. 査読有. 7(4), 2018, 1275-84.

DOI : 10.1002/cam4.1311

Torii Y, Kawada J, Murata T, Yoshiyama H, Kimura H, Ito Y. Epstein-Barr virus infection-induced inflammasome activation in human monocytes. *PLoS One*. 査読有. 12, 2017, e0175053.

DOI : 10.1371/journal.pone.0175053

Torii Y, Kawano Y, Sato H, Fujimori T, Sasaki K, Kawada J, Takikawa O, Lim C. K., Guillemin G. J., Ohashi Y and Ito, Y. Metabolome analysis reveals the association between the kynurenine pathway and human herpesvirus 6 encephalopathy in immunocompetent children. *Metabolomics*. 査読有. 13(11), 2017, 126.

DOI : 10.1007/s11306-017-1268-x

Suzuki T, Kawada J, Okuno Y, Hayano S, Horiba K, Torii Y, Takahashi Y, Umetsu S, Sogo T, Inui A and Ito Y.

Comprehensive detection of viruses in pediatric patients with acute liver failure using next-generation Sequencing. *J Clin Virol*. 査読有. 96, 2017, 67-72.

DOI : 10.1016/j.jcv.2017.10.001

Horiba K, Kawada J, Okuno Y, Tetsuka N, Suzuki T, Ando S, Kamiya Y, Torii Y, Yagi T, Takahashi Y and Ito Y.

Comprehensive detection of pathogens in immunocompromised children with bloodstream infections by next-generation sequencing. *Sci Rep*. 査読有. 8, 2017.

DOI : 10.1038/s41598-018-22133-y

Kawada J, Okuno Y, Torii Y, Okada R, Hayano S, Ando S, Kamiya Y, Kojima S, Ito Y. Identification of Viruses in Cases of

Pediatric Acute Encephalitis and Encephalopathy Using Next-Generation Sequencing. Sci Rep. 査読有 .6, 2016, 33452.

DOI : 10.1038/jp.2016.157

Kamiya Y, Hasegawa T, Takegami Y, Horiba K, Ando S, Torii Y, Kidokoro H, Taichi K, Natsume J, Kawada J and Ito Y. Primary psoas abscess caused by group A streptococcus in a child: Case report with microbiologic findings. J Infect Chemother. 査読有. 22(12), 2016, 811-4.

DOI : 10.1016/j.jiac.2016.06.011

Ando S, Kawada J, Watanabe T, Suzuki M, Sato Y, Torii Y, Asai M, Goshima F, Murata T, Shimizu N, Ito Y and Kimura H. Tofacitinib Induces G1 Cell-Cycle Arrest and Inhibits Tumor Growth in Epstein-Barr Virus-Associated T and Natural Killer Cell Lymphoma Cells. Oncotarget. 査読有. 7(47), 2016, 76793-805.

DOI : 10.18632/oncotarget.12529

Kawano Y, Kawada J, Kamiya Y, Suzuki M, Torii Y, Kimura H and Ito Y. Analysis of circulating human and viral microRNAs in patients with congenital cytomegalovirus infection. J Perinatol. 査読有 .36(12), 2016, 1101-5.

DOI : 10.1038/jp.2016.157

〔学会発表〕(計 15 件)

川田潤一、安藤将太郎、渡辺崇広、佐藤好隆、鳥居ゆか、五島典、村田貴之、清水則夫、伊藤嘉規、木村宏. EBV 関連 T および NK リンパ腫におけるトファシチニブの抗腫瘍効果の検討. 第 26 回 EB ウイルス感染症研究会. 2017

堀場千尋、川田潤一、手塚宜行、武内俊、鈴木高子、安藤将太郎、神谷泰子、鳥居ゆか、伊藤嘉規. 次世代 9 ゲノム分析解析と臨床応用. 第 91 回日本感染症学会総会学術講演会. 2017

堀場千尋、川田潤一、手塚宜行、鈴木高子、安藤将太郎、神谷泰子、鳥居ゆか、高橋義行、伊藤嘉規. 小児菌血症患者の病原菌診断における次世代シーケンサーの臨床応用. 第 120 回日本小児科学会学術集会. 2017

川田潤一、鳥居ゆか、武内俊、堀場千尋、鈴木高子、村田貴之、吉山裕規、木村宏、伊藤嘉規. ヒト単核球細胞における EB ウイル

ス感染によるインフラソーム活性の検討. 第 31 回ヘルペスウイルス研究会. 2017

Kawada J, Torii Y, Murata T, Yoshiyama H, Kimura H, Ito Y. Inflammasome-mediated IL-1 production by human monocyte with primary EBV infection. IHW2017

Kazuhiro Horiba, Jun-ichi Kawada Yusuke Okuno, Nobuyuki Tetsuka, Takako Suzuki, Shotaro Ando, Yasuko Kamiya, Yuka Torii, Tetsuya Yagi, Yoshiyuki Takahashi, Yoshinori Ito. Comprehensive Detection of Pathogens in Immunocompromised Children with Bloodstream Infections by Next-generation Sequencing. IDSA 2017

館明日香、小谷友美、飯谷友佳子、水谷輝之、丹羽優莉、牛田貴文、今井健史、中野知子、津田弘之、田中亮、鳥居ゆか、伊藤嘉規、吉川史隆、CMV 既感染が疑われた母体から出生した症候性先天性 CMV 感染症の 2 症例. 第 106 回愛知産科婦人科学会学術講演会. 2017.

Atsushi Narita, Yoshinori Ito, Yuka Torii, Juinichi Kawada, Kotaro Narita, Hironobu Kitazawa, Motoharu Hamada, Shinsuke Kataoka, Daisuke Ichikawa, Rieko Taniguchi, Norihiro Murakami, Daiei Kojima, Kyogo Suzuki, Eri Nishikawa, Nozomu Kawashima, Yusuke Okuno, Hideki Muramatsu, Nobuhiro Nishio, Asahito Hama, Seiji Kojima, and Yoshiyuki Takahashi, Risk Factors for Viral Infections in Pediatric Patients Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 59th ASH, 2017

川田潤一、鳥居ゆか、安藤将太郎、鈴木高子、神谷泰子、小島勢二、伊藤嘉規. 次世代シーケンサーを用いた急性脳炎・脳症の病原ウイルスの検出. 第 30 回ヘルペスウイルス研究会. 2016

安藤将太郎、川田潤一、渡辺崇広、佐藤好隆、鳥居ゆか、五島典、清水則夫、村田貴之、伊藤嘉規、木村宏. EBV 関連 T および NK リンパ腫におけるトファシチニブの抗腫瘍効果の検討. 第 30 回ヘルペスウイルス研究会. 2016

鈴木高子、鳥居ゆか、鈴木道雄、神谷泰子、

安藤将太郎、堀場千尋、川田潤一、伊藤嘉規.
肝移植後小児症例における不活性化4価インフル
エンザワクチン接種の経験. 第20回日
本ワクチン学会学術集会. 2016

安藤将太郎、神谷泰子、堀場千尋、鈴木高
子、鳥居ゆか、川田潤一、伊藤嘉規.

生後3ヶ月でMSSAによる右前腕部蜂窩織
炎・筋炎・骨髄炎を発症した1例. 第20回
東海小児感染症研究会. 2016

堀場千尋、川田潤一、奥野友介、手塚宜行、
鈴木高子、安藤将太郎、神谷泰子、鳥居ゆか、
高橋義行、伊藤嘉規.

小児血流感染症における病原微生物診断へ
の次世代シーケンサーの応用. 第48回日本
小児感染症学会総会・学術集会. 2016

鈴木高子、鳥居ゆか、鈴木道雄、神谷泰子、
安藤将太郎、堀場千尋、川田潤一、伊藤嘉規.

小児肝移植症例への不活性化4価インフルエ
ンザワクチン接種の検討. 第48回日本小児
感染症学会総会・学術集会. 2016

Kawada J, Okuno Y, Torii Y, Horiba K,
Suzuki T, Ando S, Kamiya Y, Ito Y.
Next-generation sequencing for the
identification of viruses in pediatric
acute encephalitis and encephalopathy.
IDSA 2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥居 ゆか (TORII, Yuka)

名古屋大学・医学系研究科・特別研究員(RPD)

研究者番号: 00770281

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

川田 潤一 (KAWADA Junichi)

村田 貴之 (MURATA Takayuki)