

令和元年6月12日現在

機関番号：84420

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14650

研究課題名(和文)抗体遺伝子変異の変遷追跡による病原体感染歴予測

研究課題名(英文) The prediction of the clinical records for infectious diseases by tracking the diversity of Immunoglobulin gene mutation

研究代表者

安居 輝人 (YASUI, TERUHITO)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 感染症制御プロジェクト・プロジェクトリーダー

研究者番号：60283074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：病原体感染に対する獲得免疫応答において、B細胞は抗体遺伝子の体細胞突然変異を行うことが知られているが、その速度、および規則性は未だ明らかとなっていない。ヒト免疫応答による抗体親和性変化のメカニズムを明らかにする目的で、病原体に反応する抗体の遺伝子変遷過程を分子生物学的に解析した。その結果、ヒトでのワクチン抗原、持続感染ウイルスに対して、病原体抗体産生細胞クローン数、および種が同定された。ここで得られた結果は、持続感染ウイルスが常に再活性化、抗原供給し、液性免疫応答を誘導する可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトにおける感染に関する疫学的調査と、抗体遺伝子変異解析や抗体親和性解析といった、分子生物学的アプローチによってなされる融合研究である。一方、抗体遺伝子変異解析によって得られた知見を基に、規則性が見いだせれば、環境応答と遺伝子変異の相関性といった生命科学に新たなパラダイムを生むこととなる。また病原体にいつ感染したのかという予想が行えれば、本研究成果の発展型として、網羅的なIg遺伝子変異による「感染プロファイル」が可能となる。

研究成果の概要(英文)：Human acquired immune responses includes B cell differentiation in which immunoglobulin (Ig) genes undergo somatic mutations against pathogen infection. However, it has not been understood how fast and ordered Ig gene got mutations in response to the infections. To elucidate molecular mechanisms in which the human immune responses regulates Ig affinity, pathogen-induced Ig gene mutation was analyzed with molecular biological approach. As a result, we were able to identify the numbers and hot spots in the Ig gene mutations induced by vaccine components, and viral proteins derived from persistent infections. Collectively, the findings in this project indicate persistently viral infection always maintains the humoral immune responses through the continuous stimulation by viral proteins that the reactivation provides in human.

研究分野：ウイルス学、免疫学

キーワード：イムノグロブリン 体細胞突然変異 破傷風毒素 サイトメガロウイルス 次世代シーケンサー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物進化のストリームは遺伝子変異と環境適応によって形成されている。B 細胞や T 細胞といったリンパ球は、細菌、ウイルスといった外来抗原刺激により、細胞内遺伝子改変機構を活性化した後、特異的な遺伝子変異イベントを開始する。とりわけ B 細胞は、抗体 (Immunoglobulin: Ig) 遺伝子の遺伝子再構成、クラススイッチ、SHM (Somatic hypermutation: SHM) といった多様な遺伝子変異によって分化、成熟を遂げている。そして、Ig 遺伝子産物である抗体が、外来抗原との親和性を SHM により高め、最終的にこのメカニズムが B 細胞の環境適応を規定している。一方、病原体側について、ヒトヘルペスウイルスであるサイトメガロウイルス (Cytomegalovirus: CMV) は、成人の約 90% 以上に持続感染し、恒常的にウイルス蛋白を発現する。そのウイルス蛋白が多様な Ig 遺伝子を持った B 細胞を分化誘導することが知られている。

2. 研究の目的

CMV に対するヒトでの抗体産生について、CMV 粒子構成タンパクをはじめとする CMV 由来タンパクは、ヒト免疫原性が高く、CMV 感染後、血清抗体価が速やかに上昇することが知られている。そこで本研究課題では、健康人血清及び末梢血 B 細胞を用い、CMV 感染前後における CMV 特異的 B 細胞 Ig 遺伝子の SHM 変異、その抗体の抗原親和性を解析するとともに、SHM の導入速度、及び規則性に対する数理モデリングによって、最終的に Ig 遺伝子変異より病原体初感染の時期予測、さらに、この感染モデルを一般化し、1) どのような病原体に、2) いつ頃感染したかといった病原体感染における「既往履歴」の予測、遡及化を最終目標とする。

3. 研究の方法

CMV 陽性ヒト末梢血単核球を用いて、Epstein-Barr ウイルスを感染させることにより B 細胞を不死化した。細胞培養上清に産生された抗体について、CMV 感染細胞抽出液を用いた ELISA を行うことにより、CMV 反応性 B 細胞クローンを検出した。一方、破傷風毒素に対する B 細胞クローンの検出は、3 種混合ワクチン接種者より得た末梢血単核球を用いた同様に行った。Ig 遺伝子配列の決定は、PCR にて H 鎖遺伝子、L 鎖遺伝子を増幅し、次世代シーケンサーにて行った。さらにその遺伝子配列をもとに、リコンビナント抗体は HEK 293 細胞を用いて作成し、解析に供した。

4. 研究成果

ヒト末梢血単核球 (PBMC) を単離し、EB ウイルス、および TLR 9 リガンドによる PBMC 内 B 細胞集団の形質転換株を樹立した。1x10⁷ 個 PBMC あたり、形質転換細胞株を約 1000 クローンの取得が可能であった。さらにヒト DPT 3 種混合ワクチンのコンポーネントである破傷風毒素 (TeNT) に対して ELISA を行った結果、15 クローンの抗 TeNT IgG/IgA を得た。次世代シーケンサー (NGS) を用いて Ig 遺伝子配列を決定した結果、ほとんどのクローンが IgG サブタイプであった。

一方、サイトメガロウイルス (CMV) に対する抗体クローンの Ig 遺伝子解析を行うために、先述と同様のスクリーニングを行った。CMV 感染細胞に反応する抗体クローンは、TeNT に対して約 4 倍の陽性数が認められた。

DPT 三種混合ワクチン接種者由来末梢血単核球中の TeNT 反応性抗体クローンは、被接種者に比し、約 4 倍のクローン数の増大が認められた。抗体親和性についてもワクチン接種者抗体クローンで上昇していた。

この結果は、CMV はヒト生体内において、常に再活性化することによって CMV 抗原を供給し、

液性免疫応答を誘導している可能性を強く示唆している。

本研究計画において、高効率でヒト由来 B 細胞形質転換細胞株を取得する方法が確立できた。また、NGS による包括的遺伝子解析により、短期間でのクローン同定が可能となった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Kanai K, Park AM, Watanabe A, Arikawa T, Yasui T, Yoshida H, Tsunoda I, Yoshie O. Murine γ -Herpesvirus 68 Induces Severe Lung Inflammation in IL-27-Deficient Mice with Liver Dysfunction Preventable by Oral Neomycin. *J Immunol.* 査読有, 2018; 200(8): 2703-2713, doi: 10.4049/jimmunol.1700412.

Tsai CY, Sakakibara S, Yasui T, Minamitani T, Okuzaki D, Kikutani H. Bystander inhibition of humoral immune responses by Epstein-Barr virus LMP1. *Int Immunol.* 査読有, 2018, 30(12): 579-590, doi: 10.1093/intimm/dxy053.

Togi S, Hatano Y, Muromoto R, Kawanishi E, Ikeda O, Hirashima K, Kon S, Kitai Y, Yasui T, Oritani K, Matsuda T. Caspase-dependent cleavage regulates protein levels of Epstein-Barr virus-derived latent membrane protein 1. *FEBS Letters*, 査読有, 2016, 590(6): 808-18, doi: 10.1002/1873-3468.12119.

Minamitani T, Ma Y, Zhou H, Kida H, Tsai CY, Obana M, Okuzaki D, Fujio Y, Kumanogoh A, Zhao B, Kikutani H, Kieff E, Gewurz BE, Yasui T. Mouse model of Epstein-Barr virus LMP1- and LMP2A-driven germinal center B-cell lymphoproliferative disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 査読有, 2017, 114(10): 4751-4756, doi: 10.1073/pnas.1701836114

Kyosuke Kanai, Ah-Mee Park, Akiko Watanabe, Tomohiro Arikawa, Teruhito Yasui, Hiroki Yoshida, Ikuo Tsunoda and Osamu Yoshie. Murine γ -Herpesvirus 68 Induces Severe Lung Inflammation in IL-27-Deficient Mice with Liver Dysfunction Preventable by Oral Neomycin. *J Immunol*, 査読有, 2018, 200(8): 2703-2713, doi: 10.4049/jimmunol.1700412

南谷武春、安居輝人、自己免疫疾患発症と EB ウイルス由来蛋白 LMP2A. *臨床免疫・アレルギー科*, 査読無, 68(3), 2017, 334-340

Minamitani T, Ma Y, Zhou H, Kida H, Tsai CY, Obana M, Okuzaki D, Fujio Y, Kumanogoh A, Zhao B, Kikutani H, Kieff E, Gewurz BE, Yasui T. Mouse model of Epstein-Barr virus LMP1- and LMP2A-driven germinal center B-cell lymphoproliferative disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 査読有, 2017, 114(10): 4751-4756, doi: 10.1073/pnas.1701836114

Yamazumi Y, Sasaki O, Imamura M, Oda T, Ohno Y, Shiozaki-Sato Y, Nagai S, Suyama S, Kamoshida Y, Funato K, Yasui T, Kikutani H, Yamamoto K, Dohi M, Koyasu S, Akiyama T. The RNA Binding Protein Mex-3B Is Required for IL-33 Induction in the Development of Allergic Airway Inflammation. *Cell Rep.* 査読有, 16(9), 2016, 2456-71, doi: 10.1016/j.celrep.2016.07.062

〔学会発表〕(計 11 件)

南谷武春、ウイルス感染が誘導する自己免疫疾患, 第 24 回日本免疫毒性学会学術年会 (招待講演), 2017 年

南谷武春、安居輝人、胚中心 B 細胞における EB ウイルス LMP1 と LMP2A の協調的発現がリンパ増殖性疾患を誘導する, 第 31 回ヘルペスウイルス研究会, 2017 年

南谷武春、Yijie Ma、Hufeng Zhou、木田博、Chao-Yan Tsai、尾花理徳、奥崎大介、藤尾慈、熊ノ郷淳、Bo Zhao、菊谷仁、Elliott Keff、Benjamin E. Gewurz、安居輝人、EB ウイルス LMP1 と LMP2A の協調的発現は T/NK 細胞と競合的にリンパ腫プロセスを誘導する、第 14 回 EB ウイルス研究会,2017 年

南谷武春、Yijie Ma、木田博、Chao-Yuan Tsai、尾花理徳、奥崎大介、藤尾慈、熊ノ郷淳、菊谷仁、Elliott Kieff、Benjamin E. Gewurz、安居輝人、EBV LMP1 and LMP2A coordinately induce EBV-associated lymphoproliferative diseases in mouse model.,第 65 回日本ウイルス学会学術集会,2017 年

Takeharu Minamitani, Yjie Ma, Hufeng Zhou, Hiroshi Kida, Chao-Yuan Tsai, Masanori Obana, Daisuke Okuzaki, Yasushi Fujio, Atsushi Kumanogoh, Bo Zhao, Hiroshi Kikutani, Elliott Kieff, Benjamin E Gewurz, Terihito Yasui.,The concerted impact of Epstein-Barr Virus LMP1 and LMP2A on the virus-induced lymphoproliferative diseases in mouse model.,第 42 回国際ヘルペスウイルスワークショップ 2017 (国際学会),2017 年

安居輝人、EB ウイルスによるリンパ増殖性疾患発症機構の解明,第 13 回霊長類医科学フォーラム (招待講演),2017 年

安居輝人、ヒト免疫機構を基盤とした免疫駆動型バイオロジクス ワクチンターゲット探索と感染症関連抗体医薬品開発 ,平成 29 年度第 3 回「ワクチン用新規アジュバント開発のための基盤研究プロジェクト」進捗状況報告会 (招待講演),2018 年

安居輝人、ヒト免疫原性に基づいた感染症関連バイオロジクス探索技術,メディカルジャパン 2018 大阪「関西広域連合研究成果企業化促進セミナー」(招待講演),2018 年。

Takeharu Minamitani, Chiau-Yuang Tsai, Hitoshi Kikutani and Teruhito Yasui,B cell-specific simultaneous expression of EB virus LMP1 and LMP2A induces lethal lymphoproliferative. pathogenesis in murine model.,第 64 回日本ウイルス学会学術集会,2016 年

Takeharu Minamitani, Teruhito Yasui, Yijie Ma, Hufeng Zhou, Daisuke Okuzaki, Chiau-Yuang Tsai, Shuhei Sakakibara, Benjamin E. Gewurz, Elliott Kieff and Hitoshi Kikutani,Epstein-Barr virus LMP2A modifies the affinity-based selection of B cells in germinal centers.,17th International Symposium on EBV and associated diseases (国際学会),2016 年

南谷武春、古田里佳、河 敬世、安居輝人、LIPS/DDP 法を用いた EBV のヒト免疫原性探索,第 30 回ヘルペスウイルス研究会,2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：南谷 武春

ローマ字氏名：MINAMITANI,Takeharu

所属研究機関名：国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所

部局名：医薬基盤研究所 感染症制御プロジェクト

職名：プロジェクト研究員

研究者番号（8桁）：00374679

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。