

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2017～2020
 課題番号：17K08694
 研究課題名(和文) EBウイルス再活性化による自己抗体産生機序の解明とバセドウ病の予防・診断・治療

研究課題名(英文) EBV reactivation-induced autoantibody production and management of Graves' disease

研究代表者
 長田 佳子(NAGATA, Keiko)
 鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：50304209
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： Epstein-Barr virus (EBV)はほとんどの成人に潜伏感染している。本研究で我々はEBVの潜伏先であるB細胞が、EBVの再活性化に伴い形質細胞へ分化して抗体産生を行う際に、活性化誘導シチジンデアミナーゼ(AID)が誘導されること、そしてもともとB細胞上にあるIgMからクラススイッチしたIgG、IgEさらにはIgG4も産生されることを示した。

EBV再活性化ではバセドウ病の原因自己抗体であるTSHレセプター抗体(TRAb)も産生される。我々は骨髄・胚中心を bypass してTRAbが産生され、バセドウ病の発症・増悪に関与すること、さらに診断法として利用できること(特許取得)を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究によって、遺伝因子の関与が大きいといわれてきたバセドウ病の原因として環境因子のひとつであるEBV感染と、その再活性化が重要であることが示された。

EBV再活性化に誘導される抗体産生系は、従来の骨髄・胚中心を介する抗体産生系とは別の抗体産生系である。EBV再活性化に誘導される抗体産生系は、特に自己抗体を産生しやすい傾向があり、今後種々の自己免疫疾患の発症機序の解明においても、さらに研究されるべき分野である、ということが示された。

研究成果の概要(英文)： Epstein-Barr virus (EBV) is a ubiquitous herpes virus mainly persists in human B cells, and most adults have its antibodies. In the present study, we confirmed that EBV-infected B cells differentiated to plasma cells to produce antibodies along with EBV reactivation. In the EBV reactivation-induced Ig production, an activation-induced cytidine deaminase (AID) is induced, and thus class-switched antibodies including IgG, IgE, and IgG4 are produced as well as IgM which is the original isotype expressed on B cell surface.

TRAb, the causative autoantibodies of Graves' disease, are produced in EBV reactivation-induced Ig production. Our results showed that TRAb produced without germinal center or bone marrow may play important roles in development and exacerbation of Graves' disease. We constructed a new ELISA test to know clinical condition of Graves' disease and obtained a patent (No. 6667806).

研究分野：ウイルス学と免疫学の視点から、自己免疫やアレルギーを研究しています。

キーワード：Epstein-Barr virus (EBV) 再活性化 抗体産生 バセドウ病 自己免疫疾患 IgM IgG4 活性化誘導シチジンデアミナーゼ (AID)

1. 研究開始当初の背景

バセドウ病は甲状腺刺激ホルモン受容体に対する自己抗体である TSH レセプター抗体 (TRAb) が甲状腺濾胞上皮細胞を刺激して甲状腺ホルモンを過剰に産生させる疾患で、多くの原因遺伝子が報告されてきたが、遺伝因子のみで発症を説明することは難しかった。

我々はバセドウ病の発症・増悪の原因として、環境因子としての Epstein-Barr virus (EBV) に着目した。自己抗体産生 B 細胞は分化して形質細胞となり、自己抗体を産生するが、EBV はこの B 細胞に潜伏感染するウイルスである。

本研究以前に我々は、末梢血中には TRAb を発現し EBV に感染した細胞 (TRAb+EBV+ cells) が存在しており (Autoimmunity, 2014)、その EBV を再活性化させることで培養上清中に TRAb が産生されたことから (Autoimmunity, 2015)、自己抗体産生細胞に感染した EBV の再活性化が、自己抗体産生を刺激することを見出ししていた。さらに TRAb+EBV+ cells は健常者にも存在しており、EBV の再活性化しやすさが発症を左右していることがわかった。私たちの観察は「バセドウ病の発症は、環境因子である EBV の再活性化が最終的な引き金になっている」ということを示していた。

2. 研究の目的

本研究では、まず第一に EBV 再活性化による自己抗体産生経路を解明することを目的とした。さらにバセドウ病に特異的な EBV 株および EBV 遺伝子多型を検出することにより、再活性化阻害による TRAb の過剰産生抑制を証明すること、また将来的なワクチン株の創出をめざした。

3. 研究の方法

(1) EBV 再活性化による自己抗体産生経路の解明

骨髄で産生された B 細胞は IgM 産生性である。この B 細胞に EBV 感染がおこり、EBV 再活性化にともなって抗体が産生されるときに、抗体の isotype はどのような割合になっているのか、また抗体産生の過程で、クラススイッチが起きているのかどうかを検討する。さらにクラススイッチを誘導する酵素である、活性化誘導シチジンデアミナーゼ (AID) の発現が、B 細胞においておこっているのかどうかを、EBV 潜伏感染タンパク、再活性化タンパクの発現と対照して検討する。

(2) TRAb の各 isotype の病態診断法としての利用

様々な甲状腺機能のバセドウ病患者血清について、TRAb-IgG および TRAb-IgM を測定し、その比率 (IgM/IgG: M/G 比) と甲状腺機能を比較する。

(3) EBV の再活性化抑制による TRAb 過剰産生を抑制

EBV 再活性化遺伝子を siRNA によって抑制し、TRAb 産生抑制を確認する。

(4) バセドウ病に特異的な EBV 株および EBV 遺伝子多型

EBV 遺伝子は大きく潜伏感染遺伝子と溶解感染遺伝子に分けられ、それぞれ宿主の不死化と再活性化に関与している。これらの遺伝子の多型を検索し、再活性化しやすい型を同定する。

4. 研究成果

(1) EBV 再活性化が B 細胞を活性化し、活性化誘導シチジンデアミナーゼ (AID) を発現させる

ことを見出し、EBV 再活性化に誘導される抗体産生の経路を示した。

EBV 感染 B 細胞に EBV 再活性化誘導を行うと、IgM 優位な抗体産生が起こったが、同時に種々の isotype の抗体産生がみられた。骨髄から末梢に出てきた B 細胞は IgM 型であり、IgM 優位の抗体産生がみられたということは、EBV 感染によって B 細胞がランダムに、polyclonal に活性化され、抗体産生細胞に分化していることを示していた。

さらに、培養上清に IgM 以外の isotype の抗体が含まれていたことは、EBV 感染細胞内での AID の発現と、AID に触媒されたクラススイッチがおこることが想定されたため、EBV 再活性化誘導した B 細胞における AID のタンパク発現と mRNA を調べ、これらの発現を証明した。また AID 発現の過程で EBV のウイルスタンパクである LMP1 と転写因子である NF- κ B の発現も確認され、LMP1 から NF- κ B を経て AID 遺伝子発現に至る経路が示された。

以上の結果は *Viral Immunology* 30 (3): 240-249, 2017 に誌上発表した。

(2) EBV 再活性化に誘導される抗体産生の IgG4 関連疾患への関与を示した。

EBV 再活性化に誘導される抗体産生系では AID 誘導により、種々の isotype の抗体が産生されることが示されたが、AID によるクラススイッチでは IgG4 も産生可能である。EBV 感染 B 細胞は、いまだ病態の解明されていない IgG4 関連疾患における IgG4 の産生源にもなりうるのではないかという疑問も生じ、同様の系にて EBV 再活性化による IgG4 の産生を確認した。また、治療抵抗性で手術療法を選択されたバセドウ病症例の甲状腺組織では、IgG4 関連疾患と同様に多くの IgG4 陽性形質細胞が、EBV-encoded small RNA1 (EBER1)陽性リンパ球の集簇と同じ部位に観察された。これらの結果から、バセドウ病の一部は IgG4 関連疾患様の状態であり、その IgG4 産生には EBV が関与していると考えられた。

この結果は *Viral Immunology* 31 (8): 540-547, 2018 に誌上発表した。

(3) TRAb の各 isotype 測定を利用した、バセドウ病の病態診断法を構築した。

種々の甲状腺機能におけるバセドウ病患者血清について、TRAb-IgG および TRAb-IgM を測定し、その比率 (IgM/IgG: M/G 比) と甲状腺機能を比較することにより、甲状腺機能を TRAb の M/G 比によって推定することができることがわかった。

この結果について、「甲状腺刺激ホルモンレセプター抗体アイソタイプ測定を用いたバセドウ病の病態診断キット及びバセドウ病の病態の診断方法」(特許第 6667806 号)の特許を取得した。

(4) バセドウ病に特異的な EBV 株、EBV 遺伝子多型の同定と EBV 再活性化抑制による TRAb 過剰産生抑制についての実験は、十分な結果を得られなかったが、EBV ゲノムシーケンスのための primer sets を作成することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Hara S, Nagata K, Nakayama Y, Higaki K, Matsushita M, Kuwamoto S, Kato M, Hayashi K	4. 巻 62
2. 論文標題 High Level Estradiol Induces EBV Reactivation and EBV gp350/220(+)CD138(+) Double-positive B Cell Population in Graves' Disease Patients and Healthy Controls.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Yonago Acta Med	6. 最初と最後の頁 240-243
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.33160/yam.2019.06.010. eCollection 2019 Jun.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tamoto N, Nagata K, Hara S, Nakayama Y, Kuwamoto S, Matsushita M, Kato M, Hayashi K	4. 巻 32
2. 論文標題 Subclinical Epstein-Barr virus primary infection and lytic reactivation induce thyrotropin receptor autoantibodies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Viral Immunology	6. 最初と最後の頁 362-369
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/vim.2019.0086. Epub 2019 Oct 3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nagata K, Hara S, Nakayama Y, Higaki K, Sugihara H, Kuwamoto S, Matsushita M, Kato M, Tanio S, Ishiguro K, Hayashi K.	4. 巻 31 (8)
2. 論文標題 Epstein-Barr Virus Lytic Reactivation Induces IgG4 Production by Host B Lymphocytes in Graves' Disease Patients and Controls: A Subset of Graves' Disease Is an IgG4-Related Disease-Like Condition.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Viral Immunology	6. 最初と最後の頁 540-547
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/vim.2018.0042.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hara S, Nagata K, Kumata K, Matsushita M, Kuwamoto S, Kato M, Hayashi K.	4. 巻 31 (7)
2. 論文標題 Estradiol Affects Epstein-Barr Virus Reactivation-Induced Thyrotropin Receptor Antibody and Immunoglobulin Production in Graves' Disease Patients and Healthy Controls.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Viral Immunology	6. 最初と最後の頁 486-491
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/vim.2018.0032.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nagata K, Kumata K, Nakayama Y, Satoh Y, Sugihara H, Hara S, Matsushita M, Kuwamoto S, Kato M, Murakami I, Hayashi K.	4. 巻 30 (3)
2. 論文標題 Epstein-Barr Virus Lytic Reactivation Activates B Cells Polyclonally and Induces Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression: A Mechanism Underlying Autoimmunity and Its Contribution to Graves' Disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Viral Immunology	6. 最初と最後の頁 240-249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/vim.2016.0179.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mohri T, Nagata K, Kuwamoto S, Matsushita M, Sugihara H, Kato M, Horie Y, Murakami I, Hayashi K.	4. 巻 13 (6)
2. 論文標題 Aberrant expression of AID and AID activators of NF- B and PAX5 is irrelevant to EBV-associated gastric cancers, but is associated with carcinogenesis in certain EBV-non-associated gastric cancers.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 4133-4140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2017.5978.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsushita M, Iwasaki T, Nonaka D, Kuwamoto S, Nagata K, Kato M, Kitamura Y, Hayashi K.	4. 巻 60 (3)
2. 論文標題 Higher Expression of Activation-induced Cytidine Deaminase Is Significantly Associated with Merkel Cell Polyomavirus-negative Merkel Cell Carcinomas.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Yonago Acta Med.	6. 最初と最後の頁 145-153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nagata K, Hayashi K	4. 巻 6 (2)
2. 論文標題 Immunoglobulin Production Induced by EBV Reactivation: Underlying Mechanisms of Autoimmune Diseases Including Graves' Disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Basic & Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 4-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nagata K, Hayashi K	4. 巻 8
2. 論文標題 Epstein-Barr virus reactivation-induced immunoglobulin production: Significance on autoimmunity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 E1875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms8121875.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計16件(うち招待講演 2件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 長田佳子、尾崎充彦、佐藤幸夫、原 小百合、桑本聡史、松下倫子、加藤雅子、林一彦
2. 発表標題 EBウイルス再活性化によって誘導されたTSHレセプター抗体による甲状腺濾胞上皮障害 An injury to the thyroid follicular epithelium by TRAbs induced by EBV reactivation
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長田佳子
2. 発表標題 EBウイルスはBasedow病の原因になるか?_EBウイルス再活性化に誘導される抗体産生とBasedow病の発症・増悪(イブニングセミナー)
3. 学会等名 第29回日本内分泌学会・臨床内分泌代謝update(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko Nagata, Kazuhiko Hayashi
2. 発表標題 Significance of Epstein-Barr Virus Reactivation-Induced Antibodies to Autoimmune Diseases: Relevance to Graves' disease
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko Nagata, Sayuri Hara, Yuji Nakayama, Katsumi Higaki, Hirotsugu Sugihara, Satoshi Kuwamoto, Michiko Matsushita, Masako Kato, Kazuhiko Hayashi
2. 発表標題 EB virus reactivation induces IgG4 production from B cells in Graves' disease patients and controls
3. 学会等名 第107回 日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiko Nagata, Kazuhiko Hayashi
2. 発表標題 The Role of the Immunoglobulins Produced by Epstein-Barr Virus Reactivation-Induced Pathway in Autoimmune Reaction
3. 学会等名 第47回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiko Nagata, Mitsuhiro Osaki, Yukio Satoh, Sayuri Hara, Satoshi Kuwamoto, Michiko Matsushita, Masako Kato, Kazuhiko Hayashi
2. 発表標題 Cytotoxicity of Epstein-Barr Virus Reactivation-Induced TRAb-IgM to Thyrocytes
3. 学会等名 ENDO 2019 (米国内分泌学会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長田佳子、熊田圭祐、原 小百合、松下倫子、桑本聡史、加藤雅子、村上一郎、林 一彦
2. 発表標題 バセドウ病継続観察例における刺激性および阻害型TSHレセプター抗体価の変動
3. 学会等名 題106回 日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Keiko Nagata, Kazuhiko Hayashi
2. 発表標題 ImmunoglobulinG4 production is induced by reactivation of Epstein-Barr virus persistent in B lymphocytes from Graves' disease patients and controls
3. 学会等名 第46回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Keiko Nagata, Kazuhiko Hayashi
2. 発表標題 パセドウ病患者および健常者のPBMCでは潜伏しているEBウイルス再活性化によってIgG4産生が誘導される
3. 学会等名 第107回 日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長田佳子、熊田圭祐、原小百合、桑本聡史、松下倫子、加藤雅子、林 一彦
2. 発表標題 パセドウ病患者と健常者においてEpstein-Barr virusの再活性化に関連した抗体産生ではIgG4の産生も起こる
3. 学会等名 第14回 EBV研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長田佳子、原 小百合、中山祐二、檜垣克美、杉原弘貢、桑本聡史、松下倫子、加藤雅子、林 一彦
2. 発表標題 パセドウ病患者および健常者の末梢血単核球では、潜伏しているEBウイルスの再活性化によってIgG4産生が誘導される
3. 学会等名 第11回 IgG4研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsushita M, Kuromi T, Iwasaki T, Kuwamoto S, Nonaka D, Nagata K, Kato M, Kitamura Y, Hayashi K.
2. 発表標題 Association of Hedgehog signal expression with MCPyV infection and outcome in Merkel cell carcinoma.
3. 学会等名 29th European Congress of Pathology, Amsterdam, Netherlands (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長田佳子
2. 発表標題 パセドウ病とEBウイルス再活性化(ワークショップ8「病態から読み解く非腫瘍性内分泌疾患」)
3. 学会等名 第110回 日本病理学会総会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長田佳子、林一彦、熊田圭祐、原小百合、桑本聡史、梅北義久
2. 発表標題 EBウイルス再活性化に誘導されたTRAb-IgM: パセドウ病における重要性
3. 学会等名 第109回 日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長田佳子、林一彦、佐藤幸夫、尾崎充彦、桑本聡史、三明淳一郎、市原克則、澤野達哉、松澤和彦、今村武史
2. 発表標題 Epstein-Barr virus 再活性化に誘導されるTSHレセプター抗体は甲状腺濾胞上皮を破壊する
3. 学会等名 第110回 日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keiko Nagata, Kazuhiko Hayashi, Yukio Satoh, Mitsuhiro Osaki, Junichiro Miake, Yoshinori Ichihara, Tatsuya Sawano, Yuhang Zhou, Agung Kurniawan Priyono, Kazuhiko Matsuzawa, Takeshi Imamura
2. 発表標題 Thyrotropin receptor antibodies (TRAbs) induced by Epstein-Barr virus reactivation : Significance on Graves' disease
3. 学会等名 第94回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 長田佳子・林一彦：深田修司（編）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 352
3. 書名 臨床で使える！ 甲状腺疾患診療のテキスト【電子版付】	

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 甲状腺ホルモンレセプター抗体アイソタイプ測定を用いたバセドウ病の病態診断キット及びバセドウ病の病態の診断方法	発明者 国立大学法人鳥取大学 代表発明者：長田佳子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特開2017-106884	取得年 2017年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

鳥取大学医学部 薬理学・薬物療法学 https://tottori-univ-medpharm.jp/
鳥取大学医学部 Research Pick up https://www.med.tottori-u.ac.jp/researchers/pickup/25124.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	林 一彦 (HAYASHI Kazuhiko) (30180962)	鳥取大学・医学部・特任教員 (15101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関