

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19590470

研究課題名 (和文) 水痘・帯状疱疹ウイルス糖蛋白質 gH の新規レセプターの同定

研究課題名 (英文) Characterization of Neutralizing Epitopes Varicella-Zoster Virus Glycoprotein G

研究代表者

大黒 徹 (DAIKOKU TOHRU)

富山大学・大学院医学薬学研究部ウイルス学・准教授

研究者番号：80291409

研究成果の概要 (和文)：抗 gH 抗体カラムに VZV 感染細胞抽出液をアプライ後溶出し、抗 gH 抗体と反応性のある蛋白質を精製した。この精製画分から gH アフィニティカラムを作成した。VZV 感染 HEL 細胞の抽出液をアプライし溶出を精製を試みた。

9 種類の抗体の内、3 種類は相互に avi-tag 抗体の結合がブロックされた。他のクローンはホモでのみブロックがかかり、ヘテロではブロックされなかった。また、いずれの抗体の組み合わせも中和活性に関して相乗的に作用するものは認めず、相加的または阻害的に作用した。

上記の結果より、4 つのクローンのエピトープは極めて接近していると考えられる。他の 5 つのクローンはホモでのみにブロックがかかり、ヘテロではブロックされなかったことから、これらの抗体の認識エピトープは異なる事が示された。水痘帯状ウイルスの gH の中和の標的 domain は 1 カ所、少なくとも 5 カ所のエピトープより構成されていることが予想された。

VZV 感染後に抗 gH ヒト型モノクローナル抗体を培地中に添加することにより、約 1 週間で感染性が消失することが明らかとなった。抗体存在下では VZV 特有の細胞変性も、感染細胞数の増加も認めなかった。VZV-HBs 感染 2 8 日後に VZV 野生株を感染させ、一旦ウイルスを増殖させた後、cell-free virus を HEL 上に重層したところ、アシクロビル存在下で VZV-HBs によるプラーク形成が認められた。このことは VZV-HBs が潜伏感染していたことを示唆する。

感染細胞を抗 gH 中和抗体で処理することにより、やがて感染性は完全に消失し、種々の刺激でも容易に復帰しない状態へと移行した。これは潜伏感染に類似した状態であることが示唆された。それゆえ、抗 gH 抗体は水痘および帯状疱疹の予防・治療に極めて有用であるといえる。

研究成果の概要 (英文)：Varicella-zoster virus (VZV) gH is a target of neutralization of viral infectivity. The neutralizing epitopes of gH are conformational and it is difficult to characterize the epitope mapping. As gH is not detectable by western blot, the neutralizing epitope of gH is conformational. Human monoclonal antibodies to gH were isolated from a combinatorial library of human antibodies using a phage-display system. Eight kinds of Fab-protein A (pp) form with the concentrations showing 50% inhibition of plaque formation ranging from 0.12 to 400 nM were used for the characterization of neutralizing epitopes of gH. Fixed infected cells were treated with each pp form and then with each Fab form with His-tag and finally with anti-tag antibody conjugated with peroxidase for visualization of blocking of the antigenic epitope. Blocking of secondary antibody reaction indicated the presence of five groups in the recognition of gH epitopes. Combinational neutralization efficacy with two epitope groups were not synergistic and additive or more than additive. The first antibody binding modify the conformational structure of gH, which might have interfered with the second antibody binding. Another possibility was that a single functional region was the target for neutralization for each epitope group and no synergism was observed. Thus VZV gH had at least five neutralization epitope groups and no enhancing activity in neutralization was observed in the combination of different epitope groups.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：ウイルス, VZV, glycoprotein, gH

1. 研究開始当初の背景

水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) は単純ヘルペスウイルス (HSV) と遺伝子産物の類似性は高いが、HSV の侵入に必須な glycoprotein D (gD) を VZV はコードしていない。HSV gD は glycoprotein H (gH) と複合体を形成し、宿主細胞膜上に存在する HVEM と結合することで侵入するが、VZV の gH の役割はまだ不明な点が多い。また VZV gB は HSV gB 同様ヘパラン硫酸に結合するが、Fc レセプター活性を有する gE と複合体を形成して初めてその機能を持つ点が異なる。さらに gB, gE, gH は抗体による中和活性という点から臨床医学的にも重要視されており、糖蛋白質ワクチンは動物実験で試行され有効性が報告されている。gH は gL と複合体を形成し、gL は gH の分子シャペロンとして機能している。VZV gE と結合しウイルスの中和や細胞間の感染の広がりを抑制する分子として insulin degrading enzyme について報告がなされた。本研究では HSV で近年非常に注目されているエンベロープ糖蛋白質に注目し、VZV gH の機能を抗 gH モノクローナル抗体により解析を試みた。

2. 研究の目的

水痘ウイルスの gH はウイルスの感染において極めて重要な役割を果たしており抗体治療の標的分子としても注目されている。そこで、HSV と VZV の違いに着目しながら、HSV で最近注目されているエンベロープ糖蛋白質と細胞側レセプターの研究を参考に、VZV の独自の役割を解明することを目的とした。ヒト型抗体ライブラリーを用いたスクリーニングによって 8 種類の中和抗体を単離した。これらの抗体の 50% 感染阻止濃度は 0.12-400nM で中和活性の強弱によって認識されるエピトープの相関を解析し、特に中和能の高いエピトープ構造を同定してゆくこ

とが重要である。今回 pp-form と avi-tag form という 2 種類の抗体分子を作製し、抗体相互のブロック効果を解析することによってエピトープの相関を解析した。さらに、2 種の抗体の組み合わせによる中和活性の影響を検討した。また、ここで作製したヒト型モノクローナル抗体を用いて、VZV 感染細胞に長期間作用させることにより、ウイルス感染性の消失と潜伏感染状態に誘導することが明らかになってきたのでこれらの機構を詳細に検討する。

3. 研究の方法

(1) VZV gH の精製と反応性蛋白質の解析

VZV gH の精製には抗 gH モノクローナル抗体を結合させたカラムを用いた。精製した gH 蛋白質をカラムに結合させ、gH アフィニティカラムを作製した。これにヒト胎児肺細胞 (HEL) 非感染細胞、VZV 感染細胞の lysate をアプライし、洗浄した後、各種 buffer で溶出を試みた。

(2) VZV gH 抗原に対する中和抗体のエピトープ解析

9 種類の単離抗体クローンの pp-form、avi-tag form への変換は遺伝子組換えによって行った。24 well plate に HEL 細胞を生育させた後、水痘ウイルスに感染させ、これらを固定し、それぞれの pp-form 抗体で処理後、さらに avi-tag 抗体を作用させ、洗浄したのち、Streptavidin-HRP を反応させ POD 発色を行った。中和活性は、2 種の抗体を単独と組み合わせにより、中和活性を測定した。

(3) VZV gH に対するモノクローナル抗体による感染細胞内ウイルスの不活化と潜伏感染の誘導

HEL に VZV を感染させ、通常培地で 2 時間培養後に抗 gH 抗体 (クローン 94) を含む培地で培養し、経時的に感染細胞を非感染細胞上

に接種し、1週間後のプラーク数を測定した。次に抗体存在下で28日間培養した後、各種の処理・感染による刺激を行い、VZVの再増殖の有無を検討した。さらに、VZVチミジンキナーゼ(TK)遺伝子をB型肝炎ウイルス表面抗原(HBs)遺伝子に置き換えた組換えウイルス(VZV-HBs)がVZV野生株の感染によって再増殖するかについても検討した。

4. 研究成果

(1)

抗gH抗体カラムにVZV感染細胞抽出液をアプライ後溶出し、抗gH抗体と反応性のある蛋白質を精製した。精製画分の電気泳動パターンから分子量約100kDa付近のgHと思われるメジャーバンドと、15kDa付近にも蛋白質が検出され、こちらはgHと複合体を形成するgLと考えられた。この精製画分をレジンに結合させgHアフィニティカラムを作成した。

VZV gHと相互作用のあるウイルス由来の蛋白質の分離

VZV感染HEL細胞の抽出液をgHアフィニティカラムにアプライし、1M NaCl, 1.5M NaCl, グリシン HCl (pH2.8), 50%エチレングリコールを含む緩衝液で溶出を試みた。SDS-PAGEの解析により、50kDa~80kDaにかけて複数の蛋白質のバンドが検出された。またウエスタンブロッティングから60k, 65k, 80kの各バンドが反応性を示し、これらがウイルス由来蛋白質(gB, gE)である可能性が示唆された。さらにこれらの蛋白質はS-S結合で複合体を形成し、非還元状態では200kDaといった大きな複合体を形成していることがわかった。

(2)

9種類の抗体のうち3種類(クローン10, 120, 192, 431)は相互にavi-tag抗体の結合がブロックされた。他のクローン(クローン11, 24, 36, 60, 94)はホモでのみブロックがかかり、ヘテロではブロックされなかった。また、いずれの抗体の組み合わせも中和活性に関して相乗的に作用するものは認めず、相加的または阻害的に作用した。



図1.抗gH抗体の各クローンによるVZV感染の拡大阻害

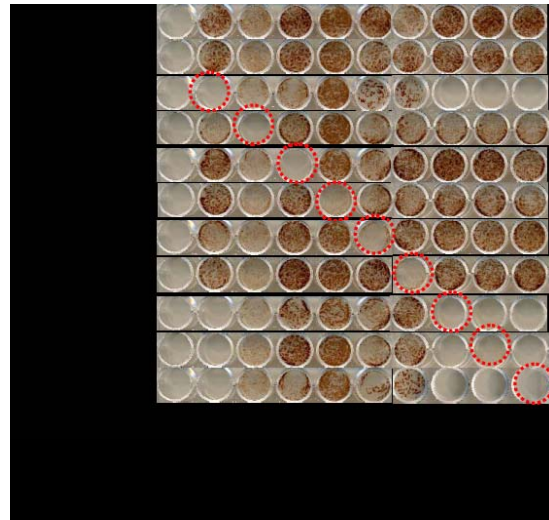


図2. Pp-formとAvi-tag formでのチャレンジング assay

これらの結果より、クローン10, 120, 192, 431のエピトープは極めて接近していると考えられる。他のクローン(クローン11, 24, 36, 60, 94)はホモでのみにブロックがかかり、ヘテロではブロックされなかったことから、これらの抗体の認識エピトープは異なる事が示された。エピトープ解析から、gH上に少なくとも5種類のエピトープが存在していることが示された。

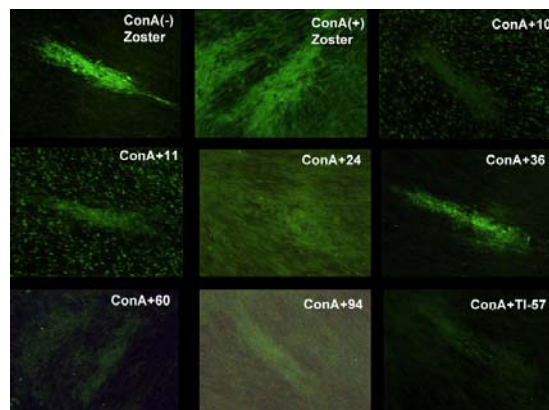
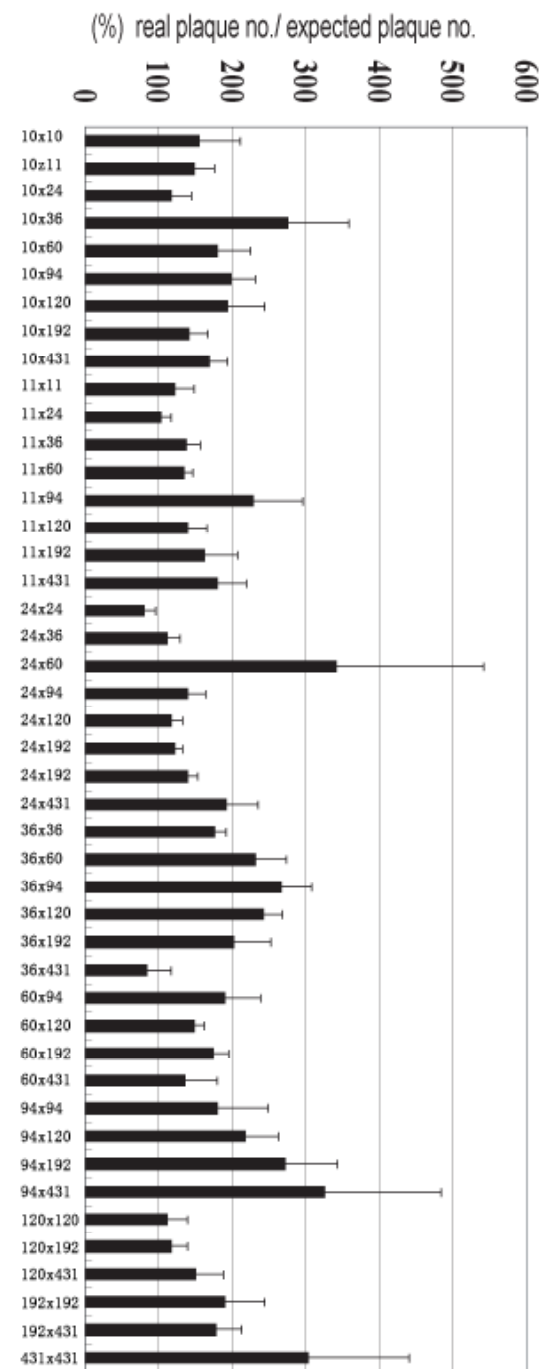


図3. ConAによる抗体吸着阻害実験
クローン36はConAでブロックされなかった

さらに、中和活性が相乗的に作用しないことから、これらのエピトープは同一機能を有する domain を認識していることが示唆された。以上のことから、水痘帯状ウイルスの gH の中和の標的 domain は1カ所で、少なくとも5カ所のエピトープより構成されていることが予想された。

図4. 抗gH抗体の組み合わせによるプラーク阻害効果



(3)

VZV感染後に抗gHヒト型モノクローナル抗体を培地中に添加することにより、約1週間感染性が消失することがあきらかとなった。抗体存在下ではVZV特有の細胞変性も、感染細胞数の増加も認めなかった。蛍光顕微鏡観察の結果、感染3日後までに前初期・初期・後期蛋白質は発現するものの、5日後以降発現量の減少と局在性の変化が認められ、一部はライソゾームに局在するものもあった。次に、感染28日後に各種刺激を施したが、VZVの再増殖は認められなかった。また、感染28日後に抗体を除去し、さらに2ヶ月間培養したが、ウイルスゲノムは検出されるもののやはりVZVの再増殖はみられなかった。しかし、VZV-HBs感染28日後にVZV野生株を感染させ、一旦ウイルスを増殖させた後、cell-free virusをHEL上に重層したところ、アシクロビル存在下でVZV-HBsによるプラーク形成が認められた。このことはVZV-HBsが潜伏感染していたことを示唆する。感染細胞を抗gH中和抗体で処理することにより、やがて感染性は完全に消失し、種々の刺激でも容易に復帰しない状態へと移行した。この状態は本研究結果から潜伏感染に類似した状態であることが示唆された。それゆえ、抗gH抗体は水痘および帯状疱疹の予防・治療に極めて有用である可能性を持つ。本研究が抗gH抗体による感染細胞内ウイルスの不活化、潜伏感染化、ならびに再活性化の各機構の解明の足がかりとなることが期待される。

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6件)

①Kuramoto T, Daikoku T, Yoshida Y, Takemoto M, Oshima K, Eizuru Y, Kanda Y, Miyawaki T, Shiraki K.

Novel anticytomegalovirus activity of immunosuppressant mizoribine and its synergism with ganciclovir.

J Pharmacol Exp Ther. 査読有、2010 Jun;333(3):816-821.

②Iwai M, Yoshida H, Obara M, Horimoto E, Nakamura K, Takizawa T, Kurata T, Mizuguchi M, Daikoku T, Shiraki K.

Widespread circulation of echovirus type 13 demonstrated by increased seroprevalence in Toyama, Japan, between 2000 and 2003.

Clin Vaccine Immunol. 査読有、2010 May;17(5):764-770.

③Hama Y, Shiraki K, Yoshida Y, Maruyama A, Yasuda M, Tsuda M, Honda M, Takahashi M, Higuchi H, Takasaki I, Daikoku T, Tsumoto T.

Antibody to varicella-zoster virus immediate-early protein 62 augments allodynia in zoster via brain-derived neurotrophic factor.

J Virol. 査読有、2010

Feb;84(3):1616-1624.

④Abaitua F, Souto RN, Browne H, Daikoku T, O'Hare P.

Characterization of the herpes simplex virus (HSV)-1 tegument protein VP1-2 during infection with the HSV temperature-sensitive mutant tsB7.

J Gen Virol. 査読有、2009 Oct;90(Pt 10):2353-2263.

⑤Akahori Y, Suzuki K, Daikoku T, Iwai M, Yoshida Y, Asano Y, Kurosawa Y, Shiraki K. Characterization of neutralizing epitopes of varicella-zoster virus glycoprotein H.

J Virol. 2009、査読有

Feb;83(4):2020-2024.

⑥Tanino T, Nawa A, Kondo E, Kikkawa F, Daikoku T, Tsurumi T, Luo C, Nishiyama Y, Takayanagi Y, Nishimori K, Ichida S, Wada T, Miki Y, Iwaki M.

Paclitaxel-2'-Ethylcarbonate prodrug can circumvent P-glycoprotein-mediated cellular efflux to increase drug cytotoxicity.

Pharm Res. 査読有、2007

Mar;24(3):555-565.

[学会発表] (計4件)

①武本眞清、鈴木和弘、赤堀泰、浅野喜造、吉田与志博、大黒 徹、白木公康

VZV gHに対するヒト型モノクローナル抗体による感染細胞内ウイルスの不活化と潜伏感染の誘導、日本ウイルス学会、2009年10月25-27日、東京

②赤堀泰、鈴木和弘、浅野喜造、吉田与志博、大黒 徹、鈴木美輝子、白木公康

水痘ウイルス gH糖タンパクに中和抗体のエピトープ解析、日本ウイルス学会、2007年10月21-23日、札幌

③ Shiraki K, Daikoku T, Takemoto M, Yoshida Y, Suzuki K, Akahori Y, Kurosawa Y, Asano Y.

Role of anti-gH neutralizing antibody in varicella-zoster virus infection.

The 34th International Herpesvirus Workshop, July 25-31, 2009 Ithaca, New York, USA

④Shiraki K, Akahori Y, Suzuki K, Asano Y, Daikoku T, Kurosawa Y.

Characterization of Neutralizing Epitopes of Varicella-Zoster Virus Glycoprotein gH.

The 32nd International Herpesvirus Workshop, July 7-13, 2007, Asheville, North Carolina, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大黒 徹 (DAIKOKU TOHRU)

富山大学・大学院医学薬学研究部ウイルス学・准教授

研究者番号：80291409

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：