

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：82603

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06152・19K21265

研究課題名(和文)重症熱性血小板減少症候群に特徴的な異形リンパ球と、末梢血単核球の関連性を解明する

研究課題名(英文) Investigation of SFTS patients-characteristic atypical lymphocyte by using human PBMC

研究代表者

和田 雄治 (Wada, Yuji)

国立感染症研究所・感染病理部・研究員

研究者番号：60825248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：重症熱性血小板減少症候群(SFTS)は主にダニによって媒介されるSFTSウイルス(SFTSV)の感染により引き起こされ、発熱、白血球減少、血小板減少等を主症状とする致死率の高いウイルス性感染症である。SFTS発症者では特徴的な異形リンパ球が出現する事が明らかとなっており、病態形成や重症化との関連性が指摘されているが、異形リンパ球の出現機序や生体内における役割は未解明である。本研究では、ヒト由来初代培養細胞を用いたSFTSV感染試験系を確立し、異形リンパ球を実験的に誘導する事に成功すると共に、その誘導機序の一端を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、SFTS発症者で特徴的に観察される異形リンパ球を実験的に再現し、その誘導機序の一端を明らかにした。SFTSの病態形成や重症化に果たす異形リンパ球の役割を詳細に解析する為には、実験室内で異形リンパ球を解析する事ができる試験系の確立が必要不可欠であり、ヒト由来初代培養細胞から異形リンパ球を誘導する事に成功した本研究は学術的に大きな意義がある。また、SFTSの病態を正確に理解する事は有効な治療・予防法開発の発展に大きく寄与する為、異形リンパ球の誘導機序の一端を明らかとした事は大きな社会的意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：Severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) is a tick-borne diseases caused by SFTS virus (SFTSV) infection. SFTS patients generally show acute fever, thrombocytopenia and lymphocytopenia with high fatality. Recently, it has been revealed atypical lymphocytes were characteristically emerged in SFTS patients, and their relation to pathogenesis was suggested. In this research, we have constructed novel SFTSV infection assay by using human-derived peripheral blood mononuclear cells which can induce atypical lymphocytes in vitro, and shed light on a part of induction mechanism of them.

研究分野：ウイルス学

キーワード：重症熱性血小板減少症候群 SFTSV PBMC 初代培養 異形リンパ球 人獣共通感染症 新興感染症 ウイルス学

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) はブニヤウイルス科フレボウイルス属に属する SFTS ウイルス (SFTSV) の感染により惹起されるダニ媒介性の新興感染症である。SFTS の主な症状は発熱や消化器症状等であり、特徴的な検査所見として白血球減少及び血小板減少が観察される。SFTS は高い致死率 (約 27%) を示し、公衆衛生上の大きな問題となっているが、その病態形成機序は依然として解明されていない。

研究代表者の所属研究室では、本研究開始当初までに、SFTS 患者のリンパ組織及び末梢組織中に特徴的な形質芽細胞様の異型リンパ球が増生・浸潤している事を明らかとした。また、これらの異型リンパ球から SFTSV 抗原が検出され、ヒト生体内における SFTSV の感染標的細胞である事が示唆された (参照: Suzuki T, *et al.*, *J Clin Invest.*, 2020.)。白血球減少及び血小板減少を特徴的な検査所見とする SFTS において、異型リンパ球の増生は病態形成に寄与する事が示唆された。研究開始当初 (2018 年度) において、日本、中国、韓国の三国で SFTS の発生が報告されていたが、SFTS 患者検体の病理学的解析は本国以外では報告されておらず、SFTS 患者検体の病理学的検索により見出した本知見は、SFTS の病態研究において先駆的な発見であった。

2. 研究の目的

感染症による被害を抑制する為には、その発症及び病態形成機序を正確に理解し、適切な対応策を設立する事が重要である。「病原体がどのように人に感染し、どのような過程を経て病態を引き起こすのか」を解明する事は感染症による被害の抑制を目指す上で最も重要な課題であり、本研究の核心をなす学術的な問いである。以上より、本研究では「SFTS の病態形成機序の解明に寄与する知見を獲得する事」を最終的な目的に SFTS の病態形成と異型リンパ球の関連性の解析を実施した。

研究開始当初において、SFTS の病態形成に異型リンパ球が関与する可能性が示唆されていたが、生体内において異型リンパ球が果たす役割に関する研究は黎明期にあった。そこで、本研究では異型リンパ球により惹起される免疫応答及びその誘導機序の解明を志し、ヒト由来末梢血単核球 (PBMC) を用いた新たな SFTSV 感染試験系の開発に着手した。

3. 研究の方法

感染性病原体に対する生体内の免疫応答において、一般的に、種々の免疫担当細胞が相互作用する事により感染防御を担う事が知られている。PBMC は各リンパ球サブセット及び単球・マクロファージ等により構成される為、初代培養 PBMC を用いる事により生体内環境を模した条件下で SFTSV 感染試験を実施する事が可能となる。

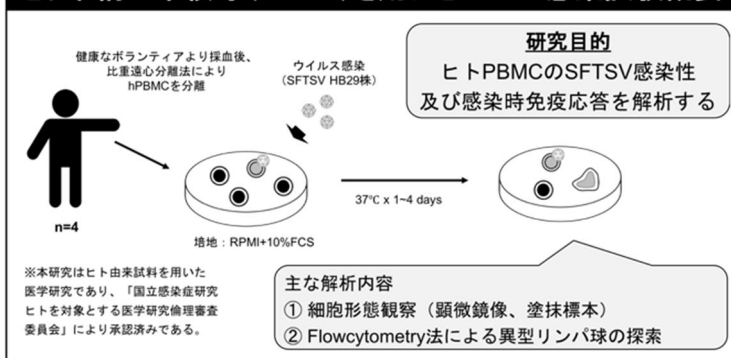
健康なボランティアより採血後、比重遠心分離法により PBMC を分離した。分離した PBMC は細胞数を調整後、凍結保存した。これらの保存細胞は速やかに融解した後、初代培養に供した。

(1) PBMC 培養開始と同時に、SFTSV HB29 株 (multiplicity of infection; MOI = 1 もしくは 10) を接種し、ウイルス感染に対する PBMC の応答を 4 日間観察した。試験対象として、UV 不活化ウイルス接種群及び mock 群を設定した。解析項目は細胞形態の観察、細胞表面マーカーの解析、細胞増殖効率の解析、SFTSV 感染性の解析である。

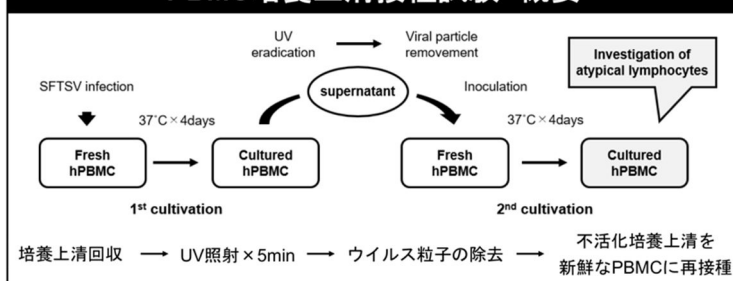
(2) 磁気ビーズ細胞分離法により PBMC から B 細胞を単離した。単離後の B 細胞に SFTSV (MOI = 10) を接種し、ウイルス接種により誘起される B 細胞の変化をフローサイトメトリー法により解析した。

(3) SFTSV 感染 PBMC の培養上清を回収し、UV 照射によるウイルス不活化後、Cellufine sulfate resin によりウイルス粒子を除去した (参照: Ohtaki, *et al.*, *J Virol Methods.*, 2011.)。精製後の培養上清を新たな PBMC に再接種し、4 日間培養した。以上の試験により、SFTSV 感染・培養後の PBMC 培養上清により誘起される PBMC の変化をフローサイトメトリー法により解析した。

ヒト末梢血単核球 (PBMC) を用いた SFTSV 感染試験概要



PBMC 培養上清接種試験 概要



4. 研究成果

(1)【研究の方法(1)の成果について】

初めに、SFTSV 感染が PBMC に及ぼす影響を評価する為に、高力価(MOI = 10)の SFTSV を試験的に PBMC に接種した。位相差顕微鏡により PBMC の状態を日々観察した所、ウイルス接種 3~4 日後において、細胞増殖像を想起させる細胞塊が SFTSV を接種した PBMC 群特異的に観察された。これら細胞塊が出現時の PBMC から細胞塗抹標本を作成し、細胞形態を観察した結果、異型リンパ球に類似したリンパ芽球様の大型細胞が誘導されている事が明らかとなった。

これら大型細胞に発現する細胞表面マーカーをフローサイトメトリー法により解析した。その結果、SFTSV 接種により PBMC から誘導された大型細胞は、SFTS 患者で観察される異型リンパ球と類似した B 細胞系の表現系を有する事が明らかとなった。細胞形態学的所見と併せて、本試験系により観察された大型細胞は PBMC から誘導された異型リンパ球であると定義できる。以って、SFTS に特徴的な異型リンパ球を in vitro で再現する事に成功した。

フローサイトメトリー法により各リンパ球種の割合を解析した結果、B 細胞及び異型リンパ球の割合が SFTSV 接種群で優位に増加している事が明らかとなった。また、MTT 法により細胞増殖効率を評価した結果、SFTSV 接種群において細胞増殖効率が有意に増加していた。以上のことから、SFTSV 感染により PBMC 中の B 細胞が特異的に増殖する事が明らかとなった。

異型リンパ球の誘導と SFTSV の感染性の関連を解析する為に、異なる力価の SFTSV (MOI = 1 もしくは 10) 及び UV 不活化 SFTSV (MOI = 10 相当) を PBMC に接種し、各条件下における異型リンパ球の誘導効率を評価した。その結果、異型リンパ球の誘導は感染性 SFTSV 接種群でのみ観察され、その誘導効率もウイルス力価に依存する事が明らかとなった。一方、高力価の SFTSV を接種した場合においても SFTSV 感染細胞の割合は低かった(約 0.1%)。SFTSV 感染率を指標として、PBMC 中に含まれる SFTSV 標的細胞を探索した結果、B 細胞群で有意に高い SFTSV 陽性率(約 0.5%)を示す事が明らかとなった。これより、B 細胞が SFTSV の標的細胞であり、異型リンパ球の誘導に何らかの役割を担う事が示唆された。

(2)【研究の方法(2)の成果について】

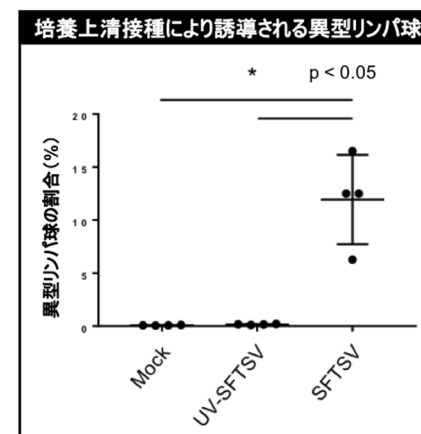
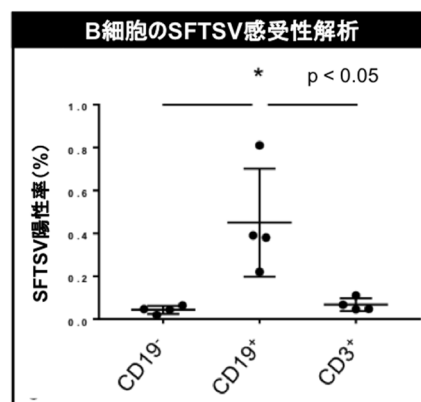
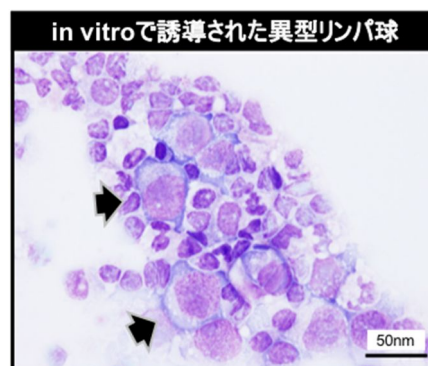
異型リンパ球の誘導に B 細胞が果たす役割を解析する為に、PBMC より単離した B 細胞を用いて上記と同様の SFTSV 感染試験を実施した。その結果、単離した B 細胞に SFTSV を感染させた場合においても異型リンパ球が誘導される事が確認された。一方、本条件においても SFTSV 感染率は依然として低く(約 7%)、誘導された異型リンパ球の多くが SFTSV 非感染の状態であった。以上の結果から、異型リンパ球は B 細胞に由来し、B 細胞自身により誘導される事が明らかとなった。また、SFTSV 感染 B 細胞は何らかの方法により周囲の非感染 B 細胞を刺激し、異型リンパ球への誘導を誘起する可能性が推察された。

(3)【研究の方法(3)の成果について】

SFTSV 感染 B 細胞が何らかの液性因子を産出する事によりウイルス非感染の状態でも異型リンパ球が誘導される可能性を検証する為に、PBMC 培養上清接種試験を実施した。SFTSV 感染 PBMC の培養上清を回収し、ウイルス粒子を不活化及び除去した上清を新鮮な PBMC に接種した。その結果、感染性 SFTSV 存在下で培養した PBMC から回収した上清を接種した群でのみ異型リンパ球の誘導が確認された。これより、異型リンパ球の誘導には培養上清中に産出される何らかの液性因子が決定的な役割を担う事が明らかとなった。

(4)まとめ

本研究により、異型リンパ球を in vitro で解析する事ができる新たな試験系の確立に成功し、異型リンパ球が誘導される機序の一端を明らかとする事に成功した。本研究により確立した試験系を活用する事により、SFTS の病態に異型リンパ球が果たす役割の解析が飛躍的に発展する事が期待される。また、異型リンパ球の誘導機序の一端を明らかにした事で、これまで未解明であった異型リンパ球の出現機序の解明に大きく貢献する事ができた。SFTS 病態形成機序及び重症化機構の解明に向けて、本研究成果が大きな意義を有する事は疑う余地がない。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suzuki Tadaki, Sato Yuko, Sano Kaori, Arashiro Takeshi, Katano Harutaka, Nakajima Noriko, Shimojima Masayuki, Kataoka Michiyo, Takahashi Kenta, Wada Yuji, Morikawa Shigeru, Fukushi Shuetsu, Yoshikawa Tomoki, Saijo Masayuki, Hasegawa Hideki	4. 巻 130
2. 論文標題 Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus targets B cells in lethal human infections	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 799 ~ 812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI129171	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 和田 雄治、鈴木 忠樹、相内 章、佐野 芳、齋藤 訓平、片野 晴隆、長谷川 秀樹
2. 発表標題 ヒト由来末梢血単核球を用いた新たなSFTSV感染試験系の開発
3. 学会等名 第二回SFTS研究会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 和田 雄治、鈴木 忠樹、相内 章、佐野 芳、齋藤 訓平、片野 晴隆、長谷川 秀樹
2. 発表標題 ヒト由来末梢血単核球を用いて、SFTSV感染がリンパ球集団に及ぼす影響を評価する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----