

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590509

研究課題名（和文）EB ウイルスの感染可視化による病態発現機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism how EB virus induces the pathogenesis by visualizing viral infection

研究代表者

安居 輝人（YASUI TERUHITO）

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：60283074

研究成果の概要（和文）：Epstein-Barr（EB）ウイルスは世界人口の約9割に感染している発がんヘルペスウイルスである。EBウイルスによる病態発現機構を明らかにするために、感染可視化EBウイルスを作成し、エントリーに関わる宿主因子の同定を試みた。さらにEBウイルス由来遺伝子産物、Latent membrane protein に会合する宿主分子を同定するために、分子会合を可視化する評価システムを構築した。

研究成果の概要（英文）：Epstein-Barr virus is an oncogenic herpesvirus that infects into over 90 % of worldwide human beings. To elucidate the molecular pathogenesis in which EB virus induce cell growth transformation, recombinant EB virus was produced to visualize the viral infection and then utilized for identification of host factor that is responsible for the viral entry. Furthermore, the novel cloning strategy for identifying host molecules associated with latent membrane proteins was established to clarify the contribution of the interacting host factor in EB virus infection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：Epstein-Barr ウイルス、B細胞、Latent membrane protein, 潜伏感染、自己免疫疾患、ヘルペスウイルス、リンパ腫、モノクローナル抗体

1. 研究開始当初の背景

EBウイルスは全世界人口の約9割に感染するB細胞及び上皮指向性ヘルペスウイルスであることが知られている。EBウイルスはヒトの一生にわたって潜伏感染し、また再活性化することで様々な疾患を引き起こすことが示唆されており、伝染性単核球症、バーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、AIDS、臓器

移植あるいは老化等の免疫機能低下時に認められるリンパ球増殖疾患が関連疾患として考えられている。したがって、我が国の社会背景、とりわけ高齢化社会、移植医療の拡充、AIDS感染拡大等を考慮すれば、今後もEBウイルス関連疾患にかかる患者数の増大は必至である。本研究ではEBウイルスのB細胞形質転換機構に着目し、ウイルス遺伝子

産物と宿主因子との相互作用を理解することによって、それら相互作用の抑制及び修飾をもって病態発現の回避を目的としている。特に EBV 潜伏感染遺伝子産物 Latent membrane protein1(LMP1)が TNF レセプターファミリー分子である CD40 シグナルを恒常的に一部模倣し、B 細胞分化を修飾していることが明らかになってきた経緯から、ウイルス膜タンパクの作用機序解明に有用な情報、ツールを駆使して、さらに EB ウイルス病態発現機構を試みるのが本目的の近道であると考えている。しかし、これまで EB ウイルスの感染スペクトラムの狭さから、動物モデルを用いた個体レベルの解析が困難であったため、1) 感染動態及び病態発症機構が未だ明らかになっておらず、一方、2) 細胞内感染動態及び細胞侵入機構も未だ十分に解明されていない。これらの不明点は EB ウイルス関連病態の治療戦略を構築する上でも障害となるため、解明されなければならない重要課題である。

2. 研究の目的

本研究は EB ウイルスによる病態発現機構を解明するために、EBV 感染を可視化できるシステムを構築する。さらに細胞レベルの感染システムを用いて、EBV の 1) 細胞への侵入、2) 病態発症のメカニズムを包括的に解析する。一方、病態発現機構に重要な役割を果たすウイルス由来膜タンパクに着目し、これら遺伝子産物に会合する分子を同定することによって、EB ウイルス細胞形質転換の分子機構の一端を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) EBV エントリー阻害抗体の単離:

① Daudi 細胞特異的抗体パネルの作成: EB ウイルス感染高感受性のヒトバーキットリンパ腫 Daudi 細胞を BALB/c マウスに Complete Freund's Adjuvant と共に踵下に免疫後、10 日後に再度 Incomplete Freund's Adjuvant にて追加免疫を行った。追加免疫 3 日後、膝窩リンパ節よりリンパ球を調製後、P3U1 マウスミエローマ細胞と細胞融合することによって、Daudi 特異的抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。約 2200 独立クローンより抗体が含まれる細胞培養上清を調製した。

② EB ウイルス感染における阻害抗体の同定: 96 穴プレートに播種された 1×10^5 Daudi 細胞に先に調製した抗体パネルを添加し 10 分間水中で反応させた。さらにオワンクラゲ由来蛍光蛋白 GFP 遺伝子をウイルスゲノム内に組み込まれたリコンビナント EB ウイルス粒子を一時間感染させた。細胞を洗浄後固定し、フローサイトメーターにより細胞の蛍光強度を測定した。

(2) Enhanced retrovirus

mutagen/Bimolecular fluorescence complementation (ERM/BiFC) を用いた EB ウイルス Latent membrane protein (LMP) 会合宿主分子の同定: LMP1 及び LMP2a の C 末端領域に GFP (159-239) C 末端部分を融合させた蛋白 (LMPCGFP) を発現するヒト B リンパ腫細胞株 BJAB をそれぞれ樹立した。3 種類の pERM retrovirus vector よりそれぞれレトロウイルスを 293 細胞で作成し、LMP-GFP (159-239) 発現 BJAB 細胞に感染後、puromycin 処理によりレトロウイルス感染細胞を濃縮した。10 日後 2uM Doxycycline によりレトロウイルス内 N 末端 GFP (1-158) 蛋白 (NGFP) を発現誘導後、セルソーターにて緑色蛍光を発する細胞集団を分取した。その後 2 回の同様のセルソーティングにより細胞集団を精製後、PCR にてレトロウイルス部分を含む挿入遺伝子部位をクローニングし、塩基配列を決定した (Fig. 1)。

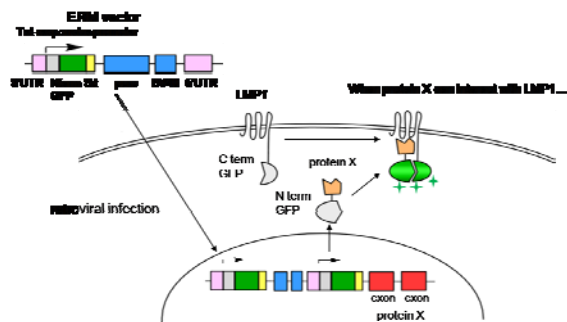


Fig.1 ERM/BiFC システムを用いた LMP 会合蛋白同定法

4. 研究成果

(1) EBV エントリー阻害抗体の単離:

B 細胞において EBV 感染は細胞側宿主因子 CD21 と EBV gp350/gp220、並びに HLA クラス 2 抗原と gp42 の相互作用が必要であることが

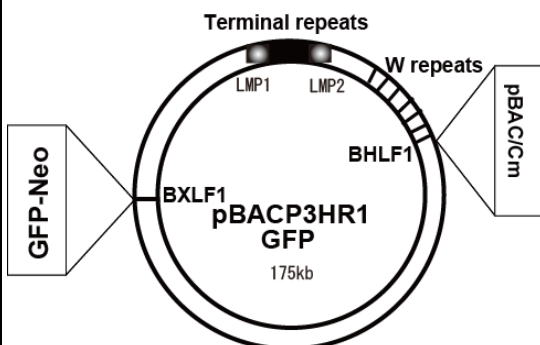


Fig.2 GFP 遺伝子を有するリコンビナント EBV 遺伝子

知られている。しかし、EBV エントリーに必要な他の EBVgp と宿主因子の相互作用は全く報告されていない。さらに、EBV 粒子内に宿主因子の取り込みが報告されているが、それらの EBV エントリーへの関与は明らかとなっていない。そこで EBV エントリーに必要な新たな宿主因子及びウイルス粒子側因子を同定、さらに、EBV 感染阻止の有効材料を開発するために、マウスに EBV 感染に高感受性のヒトバーキットリンパ腫細胞株 Daudi 細胞あるいは、精製 EBV 粒子を免疫することによって、それぞれの抗体パネルを作成した。さらに感染すると GFP を発現するリコンビナント EBV 粒子と Daudi 細胞を用いた感染実験における抗体パネルの感染抑制効果を検討することによって、新たな EBV 感染阻害抗体を探索した (Fig. 2)。

その結果、約 1700 クローンのスクリーニングによって、16 クローンの EB ウイルス感染阻止活性を有するクローンが同定された。現在、このクローンが産生する抗体を認識する宿主分子の同定中である (Fig. 3)。

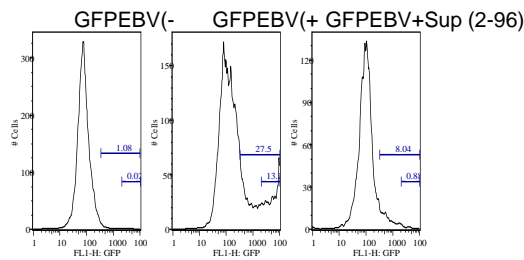


Fig. 3 クローン抗体上清を用いた EB ウイルス感染阻止活性試験-GFPEBV を感染させることによって蛍光 (中央、右; 対照) がクローン 2-96 の培養上清の添加によって蛍光強度の著しい減少が認められた。

(2) Enhanced retrovirus mutagen/Bimolecular fluorescence complementation (ERM/BiFC) を用いた EB ウイルス Latent membrane protein (LMP) 会合宿主分子の同定: LMPCGFP は細胞内においてランダムに挿入されたレトロウイルスから発現される NGFP と内在性蛋白との融合蛋白と会合すると GFP の緑色蛍光が復帰するのを利用した蛋白間相互作用を可視化できるシステムである。本方法を用いて LMP1 及び LMP2a の会合分子はそれぞれ CDV3 (TPP36), prepronociceptin, Cyclin1, ATP11b, CamK1, Meningioma1 の 5 種類、及び

LSM containing 1 であった。現在、これらの同定された蛋白について、LMP シグナルへの関与について分子生物学的手法を用いて解析中である。

(3) 結論

新たに単離された EBV 感染阻害活性を有する抗体は将来的に伝染性単核球症等の EB ウイルス急性期感染の治療に適用される可能性がある。また同定されるべき抗体が認識する宿主因子は新たな EBV 関連疾患の分子ターゲットとなる可能性が強く示唆された。一方、新規 LMP 会合分子は EB ウイルスによる細胞形質転換を阻害する標的分子となるばかりではなく、B 細胞活性化メカニズムを考える上での新たなシグナル伝達経路を提供する可能性がある。

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)

① Tada S, Okuno T, Yasui T, Nakatsuji Y, Sugimoto T, Kikutani H, Sakoda S. Deleterious effects of lymphocytes at the early stage of neurodegeneration in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation* 2011, 8, 19 (査読有)

② Nakano-Yokomizo, T., S. Tahara-Hanaoka, C. Nakahashi-Oda, T. Nabekura, N.K. Tchao, M. Kadosaki, N. Totsuka, N. Kurita, K. Nakamagoe, A. Tamaoka, T. Takai, T. Yasui, H. Kikutani, S. Honda, K. Shibuya, L. L. Lanier, A. Shibuya. An immunoreceptor adapter protein, DAP12, suppresses adaptive immune responses mediated by B lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 2011, 208, 1661-1671 (査読有)

③ Hoshino K, Sasaki I, Sugiyama T, Yano T, Yamazaki C, Yasui T, Kikutani H, Kaisho T. Critical role of IkappaB Kinase alpha in TLR7/9-induced type I IFN production by conventional dendritic cells. *J. Immunol.* 2010 184, 3341-3345. (査読有)

④ Ikeda O, Miyasaka Y, Yoshida R, Mizushima A, Oritani K, Sekine Y, Kuroda M, Yasui T, Fujimuro M, Muromoto R, Nanbo A, Matsuda T. BS69 cooperates with TRAF3 in the regulation of Epstein - Barr virus-derived LMP1/CTAR1-induced NF-kB activation. *FEBS Lett.* 2010, 584, 865-872. (査読有)

⑤ Ikeda O, Sekine Y, Mizushima A, Oritani K, Yasui T, Fujimuro M, Muromoto R, Nanbo A, Matsuda T. BS69 negatively regulates the canonical NF-kappaB activation induced by Epstein-Barr virus-derived LMP1. FEBS Lett. 2009, 583, 1567-74. (査読有)

⑥ Honda S, Kurita N, Miyamoto A, Cho Y, Usui K, Takeshita K, Takahashi S, Yasui T, Kikutani H, Kinoshita T, Fujita T, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. Enhanced humoral immune responses against T-independent antigens in Fc alpha/muR-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009, 106, 11230-11255. (査読有)

[学会発表] (計 21 件)

- ① Chigusa Oda-Nakhashi, Teruhito Yasui, Apoptotic cells suppress mast cell inflammatory responses via the CD33a immunoreceptor, 第 40 回日本免疫学会学術集会、2011 年 11 月 27 日、千葉
- ② Satoru Tada, Teruhito Yasui, Novel role of BAFF-BAFF-R interaction in neuroprotection, 第 40 回日本免疫学会学術集会、2011 年 11 月 27 日、千葉
- ③ 南谷武春、安居輝人、EB ウイルス LMP2a による BCR シグナル変化に伴う胚中心 B 細胞分化抑制、第 40 回日本免疫学会学術集会、2011 年 11 月 27 日、千葉
- ④ Satoko Tahara-Hanaoka, An Immunoreceptor adaptor protein, DAP12, suppresses adaptive immune responses mediated by B lymphocytes, 第 40 回日本免疫学会学術集会、2011 年 11 月 27 日、千葉
- ⑤ Takeharu Minamitani, Teruhito Yasui, Impaired germinal center reaction by Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A, XV International congress of Virology, September 13th 2011, Sapporo, Japan
- ⑥ 南谷武春、安居輝人、EB ウイルス LMP2A シグナルは胚中心 B 細胞分化を修飾する、第 8 回 EB ウイルス研究会、2011 年 7 月 8 日、大阪
- ⑦ 南谷武春、安居輝人、Epstein-Barr ウイルス Latent membrane protein 2A シグナルによる胚中心 B 細胞分化修飾、第 26 回ヘルペスウイルス研究会、2011 年 6 月 3 日、大阪
- ⑧ 安居輝人、ERM/BiFC system を用いた EBV Latent membrane 会合宿主分子の包括的解析、第 7 回 EB ウイルス研究会、2010

年 7 月 9 日、札幌

- ⑨ Satoru Tada, Teruhito Yasui, A role of lymphocytes in an animal model of inherited ALS, The 4th International RIMD-CVRDC joint symposium, June 17th, 2010, Okayama, Japan
- ⑩ 森本智美、安居輝人、Murine herpesvirus 68 組換えウイルスの作成と潜伏感染動態の解析、第 25 回ヘルペスウイルス研究会、2010 年 5 月 27 日、静岡
- ⑪ 安居輝人、ERM/BiFC system を用いた EBV Latent membrane 会合宿主分子の包括的解析、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 8 日、徳島
- ⑫ Teruhito Yasui, PKC-related kinase, PKN1 is involved in quality control of germinal center by regulating BCR signaling threshold dependent on the Akt activation, The 14th International congress Immunology, August 23th, 2010, Osaka, Japan
- ⑬ Teruhito Yasui, Comprehensive detection assay of physiological interaction partners for the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 by bimolecular fluorescence complementation system coupled with enhanced retrovirus mutagenesis, The 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr virus & Associated Diseases, September 4th, 2010, Birmingham, UK
- ⑭ Teruhito Yasui, The quality control of humoral immune response by PKC-related kinase, PKN1, International Symposium on Organelle Network: Microbiology, Immunology, and Cell Biology, July 12, 2010, Osaka, Japan
- ⑮ 安居輝人 PKN1 は Akt 依存性 BCR シグナル閾値を制御することによって抗体親和性成熟をコントロールする、第 39 回日本免疫学会学術集会、2009 年 12 月 3 日、大阪
- ⑯ Yeteo Wang、安居輝人、GPI アンカー型タンパク質のラフトへの局在に免疫寛容が重要である、第 39 回日本免疫学会学術集会、2009 年 12 月 3 日、大阪
- ⑰ 池田収、安居輝人、BS69 による EB ウイルス遺伝子産物 LMP1 の活性制御機構の解析、第 39 回日本免疫学会学術集会、2009 年 12 月 3 日、大阪
- ⑱ 安居輝人、EBV 膜蛋白の細胞形質転換機構、平成 21 年度遺伝子病研究所研究集会、平成 22 年 1 月 18 日、札幌
- ⑲ 安居輝人、発現制御可能な EB ウイルス latent membrane protein 2A トランスジ

ェニックマウスを用いた B 細胞分化修飾機構の解析、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 27 日、東京

- ⑳ 安居輝人、発現制御可能なトランスジェニックマウスを用いた EB ウイルス latent membrane protein による B 細胞分化修飾機構の解析、第 6 回 EB ウイルス研究会、2009 年 7 月 9 日、東京
- ㉑ 安居輝人、EB ウイルス latent membrane protein による B 細胞分化修飾機構の解析、第 24 回ヘルペスウイルス研究会、2009 年 7 月 4 日、静岡

[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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/mo1-imm/Molecular_Immunology/Welcome.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安居 輝人 (TERUHITO YASUI)

大阪大学・微生物病研究所・准教授
研究者番号：60283074

(2) 連携研究者

菊谷 仁 (HITOSHI KIKUTANI)

大阪大学・微生物病研究所・教授
研究者番号：80161412