

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590463

研究課題名(和文) 血球貪食症を伴う慢性活動性EBV感染ウサギモデルの病態解析

研究課題名(英文) Pathological analysis of chronic active EBV-infection rabbit model with hemophagocytosis

研究代表者

林 一彦 (Hayashi, Kazuhiko)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：30180962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：1) EBVウサギ感染モデルの長期自然経過を観察するとEBVが持続的に陽性で血球貪食を伴うものとEBV陰性のものが見られた。

2) EBNA-2遺伝子欠損型EBVは、この遺伝子欠損のないEBVよりウサギへ感染の効率が低かった。

3) B細胞の感染に必要なEBVの糖鎖に対する合成ペプチドワクチンをウサギに投与すると、EBV感染の程度を弱めたが、EBVの感染は防げなかった。

研究成果の概要(英文)：1) EBER-1 ISH revealed EBV-positive and -negative rabbits lifelong observation after EBV-inoculation.

2) EBNA-2-deleted EBV from P3HR-1 can infect rabbits with lower efficacy than prototype EBV from B85-8. However, this is the only one in vivo system to study the function of EBNA-2 gene.

3) Synthetic peptides of Epstein-Barr Virus-major envelope glycoprotein-350/220 do not prevent infection in a rabbit Epstein-Barr Virus infection model.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験医学

キーワード：EBVの感染モデル ウサギモデル EBNA2遺伝子欠損型EBV ワクチン

1. 研究開始当初の背景

EBV 関連疾患としては伝染性単核球症や Burkitt リンパ腫、咽頭癌以外に種々のリンパ腫、NKT 細胞増殖症、胃癌や肉腫の一部、慢性活動性 EBV 感染症や EBV 関連血球貪食症等の種々の疾患が知られている。これらの EBV 関連疾患の病態解明と治療法の開発には適切な動物実験モデルが必要であるが、EBV 感染モデルとしては、ごく一部の稀少な種類のサル(マーモセット等)を用いた実験系でのみ感染性が報告されているにすぎなかった。しかし、最近、我々が、ヒト EBV の静注による感染ウサギモデルを初めて報告した(J. Med. Virol. 80:455, 2008)。また、経鼻・経口投与による EBV ウサギ初感染モデルも確立して、末血のウイルス量や抗体反応の特徴等詳細に解析した(J. Med. Virol. 82: 977-986 2010)。さらに、EBV の静注による感染ウサギモデルで数ヶ月以上末血から EBV-DNA が検出された3羽を死亡するまで(最長は投与後 1522 日間)観察して解剖して詳細に検討すると EBV 感染リンパ球の増加や軽度の血球貪食症を2羽に認められた(Virus Research in press 2010)。ウサギの平均寿命が約7-10年とされていることから EBV の慢性感染症がウサギの寿命に影響を与えたと考えられる。特に慢性活動性 EBV 感染症や軽度の EBV 関連血球貪食症が起こっていたと推測される。今回の研究目的は、EBV に感染したウサギの中で長期間にわたって EBV 感染を維持する一群のウサギにおける病態を多数例で詳細に解明して、EBV 関連血球貪食症や慢性活動性 EBV 感染症等のウサギモデルを確立して、これら EBV 関連疾患の研究やその治療法の開発に役立てることである。

また、これまで我々はサル由来の EBV-like virus である Cyno-EBV (カニクイザル由来)によるウサギ悪性リンパ腫誘

発モデル(Lab Invest. 79: 823, 1999)や HVP(Herpesvirus papio, ヒヒ由来)によるウイルス関連血球貪食症候群を伴う致死性 T リンパ球増殖症モデル(Am J Pathol 158:1533, 2001; Am J Pathol 162:1721, 2003)とその治療法の検討(Hist. Histopathol. 18:1155, 2003)等を報告してきたが、これらの EBV-like virus によるウサギ感染は短期間に高率に致死性ウイルス関連リンパ球増殖疾患を誘発するのに対して、ヒト由来の EBV のウサギ感染により起こされる病変は比較的軽度でヒトの慢性 EBV 感染症モデルの研究解析にも有用である。そこで、ヒト EBV とサル由来の EBV-like virus が同種の動物であるウサギに対して示す感染感受性や病原性の大きな差異の原因の解明にも挑戦したい。

上述したヒト EBV によるウサギ感染実験の結果は、ヒト EBV のヒト初感染および伝染性単核球症さらに潜伏感染や慢性活動性 EBV 感染症や EBV 関連血球貪食症等の動物モデルとなる可能性が示されたものである。汎用性のあるウサギ EBV 感染モデルは極めて独特で、容易な動物実験系であり、その病態をさらに詳細に検討するとともに新しい EBV 関連疾患モデルの開発や治療研究への応用が期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、多くの Epstein-Barr virus (EBV)関連疾患の中で、難治性で予後不良な慢性活動性 EBV 感染症や EBV 関連血球貪食症の動物疾患モデルを、ウサギにヒト由来の EBV を経口・経鼻投与して作製し、その治療法の開発に役立てることである。さらに、従来研究してきたサル由来の EBV-like virus のウサギ感染により誘発される高頻度で劇的な血球貪食症やリンパ球増殖疾患モデルと比較して、ヒトの EBV とサル由来 EBV-like virus の病原性の差異の原因も追究したい。In vivo の EBV 感染

実験系として、高価で稀少なため入手不可能なサルモデル以外ほとんどない現況では、ウサギを用いた EBV 動物感染モデルを確立してその感染病態を解明することが、EBV 関連疾患の研究と治療のために有意義であると考えられる。

3. 研究の方法

A) ヒトEBVによるウサギ初感染および慢性感染モデル:

(1) EBVのウサギ経口感染機序の解明

目的 : ウサギのEBV経口感染病態解明のため経時的に口腔内組織の感染細胞を同定してリンパ球

感染に至る経過を明らかにする。また、唾液中のEBVウイルスの排出の有無も検討する。

(2) EBVのウサギ感染モデルによる自然経過を経時的に画像検査や血液中抗体価、ウイルス定量、

肝臓や骨髓生検等で対比しながら詳細に解析する。目的 : 血中のウイルス量と抗体価の変動の相関および画像検査(超音波、CT検査)による肝

脾腫の程度の関連を解明し、慢性EBV感染症に対応する肝脾腫の出現時期を調べる。

(3) 遺伝子欠損株EBVを用いたウサギ感染と病原性の違いを明らかにし、in vivoでの遺伝子機能を解明する。

EBVの原型B95-8株とEBNA2遺伝子欠損のP3HR1株のウサギ感染性や病原性の違いを比較する。

(P3HR1株で感染が起こらなかったり、差異がないときは北海道大学高田賢蔵教授のAKTA株(遺

伝子の欠損が容易におこる)の欠損株を用いて比較する。)

(4) 日和見EBV関連リンパ腫モデルを作製する。

目的 : EBV潜伏感染ウサギを免疫抑制状態にしてEBV関連リンパ球増殖症(リンパ腫)誘発

(5) 長期観察によるEBV 関連腫瘍の発生の有無

目的 : 免疫不全が原因でないEBV関連疾患・腫瘍をみつける。

(B) ヒトEBV とサル由来のEBV-like virus のウサギに対する感染感受性や病原性の大きな差異

を生ずる原因の解明;

(6) 目的 : Cyno-EBV やHVP の塩基配列は一部しか解明されていないので、まず、これらのEBV-like viruses の全塩基配列を解明してヒトEBV と比較解析をする。

4. 研究成果

(1) EBVのウサギ感染モデルによる自然経過を経時的に血液中抗体価、ウイルス定量等に対比しながら詳細に解析し、剖検で組織内のEBV感染細胞をEBER-1 ISH法で明らかにした。

(2) EBV投与ウサギの中で、持続的にEBV感染するものと、一過性にEBV感染してその後はウイルスが排除されるもの、はじめからEBVに感染しないウサギがあることが明らかになった。持続EBV感染するウサギは、解剖するとリンパ節の一部に血球貪食像を伴うことがあった。

(3) EBVのウサギ経口感染機序の解明のための実験は、まだ施行できていない。

(4) In vitroのEBVウサギの末血や脾臓のリンパ球に感染が成立しウイルス蛋白発現を確認し、その標的はB-cellであることを明らかにした。また、ヒトリンパ球感染に似た不死化様の増殖を示した。In vivoのウサギEBV感染では、CD20+リンパ球は一過性減少の後増加したのに対し、CD8+リンパ球の増加が認められた。

(5) EBNA-2欠損株のP3HR1由来EBVを用いたウサギ感染実験を行なった結果、P3HR1株のEBVはEBNA-2が欠損してもウサギに溶解感染を引き起こせる能力があるが、プロトタイプの本95-8株由来EBVと比べると感染の頻度や程度が低いことが判明し、EBV感染動物モデルとしてはB95-8の方が実験効率が良いが、P3HR1-EBVの感染モデルはEBNA-2の機能を解明する唯一のin vivoモデルとしての意義が

ある。

(6) B細胞表面抗原CD21と結合すると想定されるEpstein-Barr virus (EBV)の主要なエンベロープ糖蛋白であるgp-350/220の3つの領域に対する合成ペプチドワクチンの効果をウサギEBV感染モデルで検定した。これらのペプチドワクチンは、EBV感染の程度を低減させたが、EBVの初感染の予防はできなかった。この結果より、ウサギEBV感染モデルでは、EBVエンベロープ糖蛋白gp-350/220とB細胞CD21との結合による感染経路以外にもEBV感染経路が存在することが示唆された。

(7) EBV潜伏感染ウサギを免疫抑制状態にしてEBV関連リンパ球増殖症(リンパ腫)誘発にはまだ成功していない。

(8) EBVのウサギ経口EBV感染機序の解明は、EBER-1陽性リンパ球の咽頭扁平上皮内浸潤を確認したが、感染初期からそこにいるのか、全身感染した後で血液中のリンパ球が浸潤したのかは不明である。

(9) サル由来のEBV-like virusesの全塩基配列を解明してヒトEBVと比較解析することはまだできていない。将来的に次世代シーケンサーが利用できる環境になったら行いたい。

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 5件)

Kyosuke Kanai, Kaoru Kato, Hitoshi, Sano, Keiko Nagata, Keisuke Okuno, Satoshi Kuwamoto, Hiromi Higaki, Hirotsugu Sugihara, Masako Kato, Ichiro Murakami, Kazuhiko Hayashi In Vitro EBV infection Model of Rabbit Lymphocytes from Peripheral Blood or Spleen. *Intervirology*, 査読有 2011, 54;17-24

Hayashi K, K Takashima, K Okuno, K. Kato, S Sano, H Sugihara, M Kato, I Murakami K, K Nagata, A rabbit model for primary and lifelong persistent Epstein-Barr virus infection. *Virchows Arch*, 査読有 2011, 459(Suppl 1), S302

Kaoru Kato, Hitoshi Sano, Keiko Nagata, Hirotsugu

Sugihara, Kyosuke Kanai, Satoshi Kuwamoto, Masako Kato, Ichiro Murakami, Kazuhiko Hayashi Synthetic Peptides of Epstein-Barr Virus-major envelope glycoprotein-350/220 Do Not Prevent Infection in a Rabbit Epstein-Barr Virus Infection Model. *J Vaccine & Vaccination*, 査読有 2012, 4; 2157-2160

H. Sano, K. Nagata, K. Kato, K. Kanai, K. Yamamoto, K. Okuno, S. Kuwamoto, H. Higaki-Mori, H. Sugihara, M. Kato, I. Murakami, S. Kanzaki, K. Hayashi EBNA-2-deleted Epstein-Barr virus from P3HR-1 can infect rabbits with lower efficiency than prototype Epstein-Barr virus from B95-8. *Intervirology* 査読有 56: 114-121 2013

長田 佳子, 林 一彦 EBウイルスと甲状腺疾患 成人病と生活習慣病, 査読無 2013, 43; 1103-1107

〔学会発表〕(計 5件)

Hayashi K, K Takashima, K Okuno, K. Kato, S Sano, H Sugihara, M Kato, I Murakami K, K Nagata, A rabbit model for primary and lifelong persistent Epstein-Barr virus infection. 23rd European Congress of Pathology, 2011-8-31, Helsinki Exhibition & Convention Centre, Helsinki, Finland

佐野仁志、金井亨輔*、加藤郁、長田佳子、林一彦、P3HR-1株産生EBVの経鼻投与におけるEBウイルス感染ウサギの解析。第8回EBウイルス研究会、2011-7-8、大阪大学大学院 銀杏会館(大阪)

長田佳子、檜垣克美、中山祐二、金井亨輔、桐谷唯、佐野仁志、加藤 郁、木村 宏、西蓮寺 剛、林 一彦、EBウイルス感染B細胞株の再活性化後期におけるEBERとgp350/220の局在 : 72A1抗体を用いたP3HR-1細胞株の蛍光染色 日本ウイルス学会 2012年11月13日~2012年11月15日 大阪国際会議場(大阪府)

桐谷唯、長田佳子、木村宏、石黒清介、佐野仁志、加藤郁、林一彦 パセドウ病患者の末梢血におけるEBV loadの検討 第9回EBウイルス研究会 2012年07月06日~2012年07月06日 米子市文化ホール(鳥取県)

越智 万梨華、長田 佳子、松下倫子、佐藤幸夫、
林 一彦 EBV関連遺伝子mRNA発現の定量法の検討
第10回EBウイルス研究会 2013年07月12日～2013年07
月12日 キャンパスプラザ京都

〔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
なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 一彦 (HAYASHI Kazuhiko)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号： 3 0 1 8 0 9 6 2

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：