

平成 27 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：2012～2014

課題番号：24590550

研究課題名(和文)ガンマヘルペスウイルス感染による慢性炎症化と細胞形質転換機構の解明

研究課題名(英文) Study on the chronic inflammation and cell growth transformation induced by gammaherpesvirus 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Epstein-Barrウイルス(EBV)は全世界人口の約9割に感染し、発がんへの関与が示唆されている。EBV遺伝子産物であるLMPは発がん活性が認められているが、その発がん分子メカニズムは未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、EBVによる細胞形質転換機構を明らかにするために、B細胞特異的なLMP1、LMP2a同時発現マウスを樹立し、その発がん過程を検討した。その結果、このマウスにおけるT細胞の除去により、異形B細胞の異常増殖による脾臓腫大が認められた。EBV発がん過程はT細胞によるB細胞異常増殖の制御機構が存在しており、その破綻が発がんを誘導する可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Epstein-Barr virus (EBV) infects into the 90% of human being in the world-wide and is thought to a causative agent for some malignancies. Of the EBV-coding genes, Latent membrane protein (LMP) has been known to be involved in the tumorigenesis. Here this study demonstrates that molecular pathogenesis by which both LMP1 and LMP2a expression in B cells gives rise to lymphomagenesis. Depletion of T cells resulted in the development of splenomegaly induced by aberrant B cell growth. In conclusion, this study clearly indicates that T cells is responsible for the regulation of EBV-induced cell growth transformation in vivo.

研究分野：ウイルス学

キーワード：Epstein-Barrウイルス ウイルス発がん Latent membrane protein B細胞 リンパ腫 ノックインマウス 持続感染 自己免疫疾患

1. 研究開始当初の背景

ヒト g-HV は現在 EBV と KSHV の二種類が同定されており、その中で EBV は全世界人口の約 90% が感染する B 細胞、上皮指向性ウイルスであり、リンパ球増殖疾患 (伝染性単核球症、バーキットリンパ腫、ホジキン病、AIDS 誘導性及び関節リウマチ、多発性筋炎関連リンパ腫、移植後リンパ球増殖疾患)、自己免疫疾患 (全身性エリテマトーデス、多発性硬化症) 及び、上皮性悪性腫瘍 (胃癌、上咽頭がん) の発症に深く関与していることが知られている。一方、KSHV は AIDS 患者に頻発するカポジ肉腫の原因ウイルスであり、その他疾患として原発性滲出性リンパ腫 (PEL) 及び多中心性 Castleman 病 (MCD) 等のリンパ増殖疾患に関与していると考えられている。これらの g-HV 病態共通の特徴として、1) がん細胞あるいは辺縁支持細胞におけるウイルスの持続感染、2) 免疫細胞浸潤を伴った慢性炎症が認められることから、ウイルス潜伏感染遺伝子産物による細胞形質転換作用 (Direct transformation) と病原体-免疫細胞相互作用による免疫応答が g-HV 病態発現に重要であることが強く示唆されている (Chronic inflammation) 。これまで、実験的に EBV に関してウイルス遺伝子産物で膜タンパクである Latent membrane protein 1 (LMP1) が NF- κ B 活性化を介した強い細胞形質転換作用を誘導することが明らかとなっており、その B 細胞特異的トランスジェニックマウスにおいてリンパ腫を多発することが報告されている。一方、マウス g-HV の Murine gammaherpesvirus 68 (MHV68) のマウス感染モデルにより、細胞傷害性 T 細胞を欠損したマウスにおいて、病変部位にウイルス感染は認められるが、ウイルス非感染の B 細胞リンパ腫が発生することから、直接的、あるいは間接的にウイルス感染が発がんを誘導することが示唆されてきた (Paracrine) 。しかし、g-HV の感染形態が染色体外にエピソームとして存在するため、宿主細胞分裂に伴ったウイルスゲノムの消失 (Hit and run) が原因で、関連疾患病巣でのウイルスゲノムの有無をめぐって関連疾患か否かの議論が生じ、その結果、その発がん分子メカニズム、上皮細胞がんへの関与、さらに発がん過程における慢性炎症と免疫細胞の関与は未だ十分に明らかとなっていない。

2. 研究の目的

Epstein-Barr ウイルス (EBV) やカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) といったヒトガンマヘルペスウイルス (g-HV) はリンパ球、上皮細胞に直接感染することによって、がん発症に関与することが強く示唆されている。しかし、それらの発症機構は未だ十分に解明されておらず、さらに治療予後不良も社会的問題となっている。本研究では g-HV 関連病態発現の分子機構を明らかにする目的で、EBV

遺伝子及び g-HV 感染マウスモデルに焦点をおき、発がん過程及び EBV 関連病態発現過程をウイルス学的あるいは免疫学的手法を用いて解析する。最終目標として本研究結果による g-HV 関連疾患の治療戦略構築と他 HV 関連疾患治療について応用研究への発展性を目指す。

3. 研究の方法

(1) EBV Latent membrane protein (LMP) ノックインマウスの作製

EBV 遺伝子産物 LMP1 及び LMP2a cDNA は EBV ゲノムより PCR にて、増幅及びクローニングした。ES 細胞において、Rosa26 遺伝子座に floxSTOP カセットとともに LMP1 あるいは LMP2a cDNA を挿入した。常法に従い、ノックインマウスを作成した (図 1) 。

(2) B 細胞及び胚中心 B 細胞特異的 LMP1、LMP2a 発現マウスの作製

上記で作成した LMP ノックインマウスに、CD19-Cre トランスジェニックマウス (tg) (B 細胞特異的)、Aid-Cre tg (胚中心 B 細胞特異的) を交配させることによって樹立した (図 1) 。

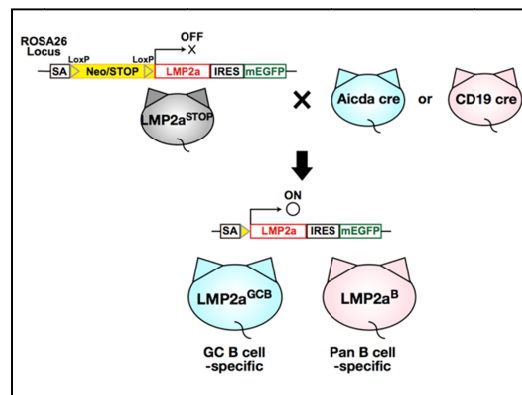


図 1 . LMP1 ノックインマウスの作製

(3) マウスの免疫学的解析

抗原特異的免疫応答は 4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl を会合させたニトリガンマグロブリン (NP-CGG) を免疫することによって誘導した。免疫組織学的解析、ELISA は常法に従い行った。また、リンパ球集団解析はフローサイトメトリーにより行った。

(4) マウス個体における T 細胞、NK 細胞除去試験

マウスに抗 CD4、CD8、Thy1、アシアロ GM1 抗体を腹腔内投与することによって除去した。

(5) 分子生物学的解析

常法に従い、ウエスタンブロットを行った。

4. 研究成果

(1) マウスにおける LMP1 及び LMP2a の B 細胞特異的発現

マウス B 細胞における LMP1 及び LMP2a

の発現をウエスタンブロット及びフローサイトメトリーにおいて検討した結果、LMP1、LMP2a ともに Cre の発現誘導に依存して、発現誘導が認められ、マウスモデルの正当性が確認された (図 2)。

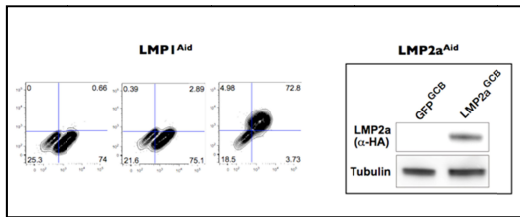


図 2 .マウスにおける LMP1 及び LMP2a の B 細胞特異的発現

(3) 胚中心 B 細胞特異的 LMP2a 発現マウス (LMP2a^{Aid}) における自己免疫疾患様病態の発症

EBV 感染は疫学的に全身性エリテマトーデス (Systemic Lupus Erythematosus: SLE) や多発性硬化症 (Multiple sclerosis: MS) に関連することが示唆されている。一方、LMP2a は機能的に B 細胞抗原レセプターシグナルを模倣する分子として明らかとなっており、B 細胞活性化を誘導することが知られている。したがって、LMP2a が B 細胞活性化によって、自己免疫疾患誘導に関与するかどうかを動物モデルで検討した。

糸球体腎炎様病態の発症

14 週齢における LMP2a^{Aid} マウスの腎臓を採取し、抗 C3 抗体で免疫染色を行い、糸球体における免疫複体の沈着を検討した。コントロールと比較し、LMP2a^{Aid} マウスの糸球体においてメサングウム細胞の増殖、C3 を含む免疫複体の沈着が認められた (図 3)。

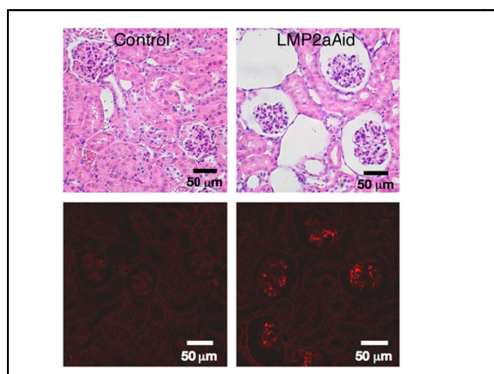


図 3. LMP2a^{Aid} マウスにおける糸球体腎炎様病態の発症

LMP2a による自己抗体産生誘導

LMP2a^{Aid} マウスにおける糸球体腎炎様病態の発症が認められたことから、全身性エリテマトーデス (SLE) 様病態を発症している可能性が示唆された。したがって、次に血清中自己抗体価の測定を行った。Control マウスにおいて抗 DNA 抗体価 (Anti-dsDNA IgG)

及び抗カルジオリピン抗体価 (Anti-Cardiolipin IgG) は検出以下かあるいは非常に低値を示していたのに対し、LMP2a^{Aid} マウスにおいて有意な抗体価の上昇が認められた。一方、B 細胞特異的発現 LMP2a マウス (LMP2a^B) においてはカルジオリピン抗体価は有意に上昇していたものの、抗 DNA 抗体価は検出限界以下であった。この結果により LMP2a は自己免疫疾患様病態を誘導するが、その誘導には胚中心 B 細胞といった B 細胞分化段階特異的な発現が必要であることが明らかとなった (図 4)。これらの結果は今まで明らかとなっていなかった EBV と自己免疫疾患の相関を LMP2a の機能で実証した初めての成果である。

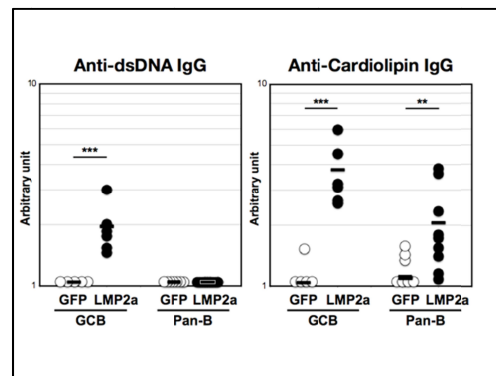


図 4. 胚中心 B 細胞特異的 LMP2a 発現による自己抗体産生誘導

(4) 胚中心 B 細胞特異的 LMP1/2a 発現マウスにおける B リンパ球増殖疾患様病態の誘導

LMP1^{Aid} と LMP2a^{Aid} マウスを交配させることによって、胚中心 B 細胞特異的に LMP1/2a を同時発現するマウスを樹立した (LMP1/2a^{Aid})。このマウスを用いて EBV 感染で認められるようなリンパ球増殖疾患様病態が発症するか否かを検討した。

LMP1/2a^{Aid} マウスにおける T 細胞、NK 細胞除去による生存率低下

マウスは少なくとも 6 ヶ月齢まではリンパ腫等表現型に異常は認められなかった。しかしながら、抗体投与による T 細胞及び NK 細胞の除去により、約 8 日目生存率の低下が認められた。さらに B 細胞異常増殖による脾腫及び肝臓への異所性濾胞形成が認められた。

LMP1/2a^{Aid} マウスにおける脾腫及び B 細胞異常増殖

一方、LMP1^{Aid} 及び LMP2a^{Aid} マウスにおいてこれら免疫細胞集団の除去によっても上記異常は認められなかった。したがって、胚中心 B 細胞における LMP1 と LMP2a の同時発現により B 細胞が異常増殖能を獲得することが明らかとなった。さらに、これらの B 細胞異常増殖制御は T 細胞及び NK 細胞によって、生体内で行われていることが新たに明らかとなった。しかしながら、その分子メカニズムについては未だ不明であり、今後の研

究課題である。

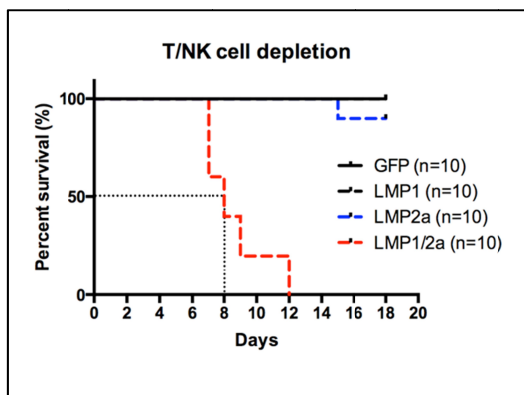


図5. LMP1/2a^{Aid} マウスにおける T 細胞、NK 細胞除去による生存率

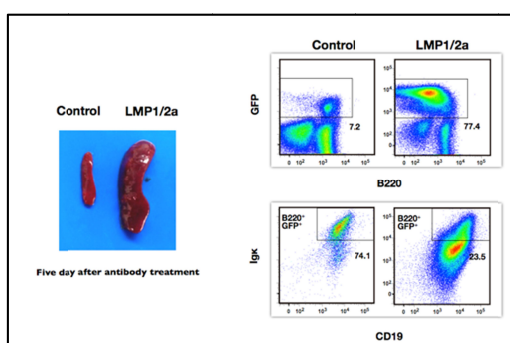


図6. LMP1/2a^{Aid} マウスにおける T 細胞、NK 細胞除去による脾腫と B 細胞異常増殖

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)(全て査読あり)

Wang Y, Murakami Y, **Yasui T**, Wakana S, Kikutani H, Kinoshita T, Maeda Y. Significance of glycosylphosphatidylinositol-anchored protein enrichment in lipid rafts for the control of autoimmunity. *J. Biol. Chem.* 2013, 288, 25490-9. 10.1074/jbc.M113.492611

Tada S, **Yasui T**, Nakatsuji Y, Okuno T, Koda T, Mochizuki H, Sakoda S, Kikutani H. BAFF controls Neural cell survival through BAFF receptor. *PLOS ONE* 2013, 8, e70924. 10.1371/journal.pone.0070924

Yasui T, Sakakibara-Yada K, Nishimura T, Morita K, Tada S, Mosialos G, Kieff E, Kikutani H. Protein kinase N1, a cell inhibitor of Akt kinase, has a central role in quality control of germinal center formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012, 109, 21022-7.

10.1073/pnas.1218925110

Morihana T, Goya S, Mizui M, **Yasui T**, Prasad DVR, Kumanogoh A, Tamura M, Shikina T, Maeda Y, Iwamoto Y, Inohara H, Kikutani H. An Inhibitory role for Sema4A in antigen-specific allergic asthma. *J Clin Immunol.* 2012, 33, 200-209. 10.1007/s10875-012-9798-5

Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shoji M, Okoshi Y, Nakano-Yokomizo T, Ohkohchi N, **Yasui T**, Kikutani H, Honda S, Shibuya K, Nagata S, Shibuya A. Apoptotic cells suppress mast cell inflammatory responses via the CD300a immunoreceptor. *J Exp Med.* 2012, 209, 1493-1503. 10.1084/jem.20120096

Inoue T, Iijima H, Tajiri M, Shinzaki S, Shiraishi E, Hiyama S, Mukai A, Nakajima S, Iwatani H, Nishida T, Mizushima T, **Yasui T**, Isaka Y, Kanto T, Tsujii M, Miyoshi E, Wada Y, Takehara T. Deficiency of N-acetylgalactosamine in O-linked oligosaccharides of IgA is a novel biologic marker for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2012, 18:1723-34. 10.1002/ibd.22876

〔学会発表〕(計 18 件)

Sakakibara S, Takeda K, **Yasui T**, Kikutani H(国内・口演) Generation and evolution of autoreactive B cells in systemic lupus erythematosus patients. 第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月、京都

Minamitani T, Sakakibara S, Tsai Chau-Yuang, Kikutani H, **Yasui T**(国内・口演) A aberrant activation of Akt in antigen-committed B cells results in selective IgA deficiency. 第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月、京都

安居輝人, 南谷武春, Chiau-Yuang Tsai, 菊谷仁(国内・口演) EBV LMP1/LMP2a 誘発 B 細胞不死化過程における宿主 Immunoediting 制御。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月、横浜

安居輝人(国内・招待講演) Akt 異常活性化による液性自己免疫疾患と免疫不全—抗体の科学と創薬—。近畿大学医学会学術講演会、2014 年 8 月、大阪狭山市

Yasui T, Minamitani T, Tsai CY, Sakakibara S, Busslinger M, Kieff E, Kikutani H (国際・招待講演) EBV LMP2a reduces the stringency of B cell selection in germinal centers. 2014年3月 EBV@50, Oxford, UK

Minamitani T, **Yasui T**, Sakakibara S, Tsai CY, Kikutani H(国内・口演) Epstein-Barr virus LMP2a reduces the stringency of B cell selection in germinal center by augmenting BCR signal strength and enhancing plasma cell differentiation. 第42回日本免疫学会学術集会、2013年12月、千葉

Tsai Chiau-Yuang, **Yasui T**, Minamitani T, Sakakibara S, Kikutani H(国内・口演) Direct and indirect inhibition of germinal center formation and humoral immune responses by Epstein-Barr virus LMP1. 第42回日本免疫学会学術集会、2013年12月、千葉

Sakakibara S, **Yasui T**, Minamitani T, Kikutani H(国内・口演) Generation of polyreactive B cells during murine herpesvirus infection. 第42回日本免疫学会学術集会、2013年12月、千葉

安居輝人、渡辺明子、榊原修平、義江修、菊谷仁(国内・口演) Single-cell biology 技術を用いたヒト抗 HSV1 抗体の単離-持続感染ウイルスに対するヒト液性免疫応答の推移。第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸

Tada S, **Yasui T**, Okuno T, Nakatsuji Y, Sakoda S, Kikutani H(国内・口演) Novel role of BAFF-BAFFR interaction in neuroprotection. 第40回日本免疫学会学術集会、2012年11月、千葉

Minamitani T, Kikutani H, **Yasui T**(国際・一般口演) Impaired germinal center B cell differentiation by altered BCR signal strength with Epstein-Barr virus LMP2A. 第40回日本免疫学会学術集会、2012年11月、千葉

Tahara S, Nakano T, Oda C, Nabekura T, Totsuka N, Kurita N, Takai T, **Yasui T**他4名(国内・口演) An immunoreceptor adapter protein, DAP12, suppresses adaptive immune responses mediated by B lymphocytes. 第40回日本免疫学会学術集会、2012年11月、千葉

榊原修平、**安居輝人**、南谷武春、菊谷仁(国内・口演) ガンマヘルペスウイルス

感染による自己抗体産生第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月、大阪

Yasui T(国際・招待講演) Pathogenic activation and evasion of humoral immune responses by gamma-herpesvirus infection. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2012年9月、Awaji, Hyogo

Tsai Chiau-Yuang, 南谷武春、榊原修平、森田健太郎、菊谷仁、**安居輝人**(国内・口演) EBウイルス LMP1は関連腫瘍発生の必要十分因子となり得るか?-胚中心B細胞特異的LMP1発現マウスの解析。第27回ヘルペスウイルス研究会、2012年6月、愛知県大府市

南谷武春、菊谷仁、**安居輝人**(国内・口演) Epstein-Barrウイルス Latent membrane protein 2Aは抗原特異的B細胞の選択除去によってウイルス感染成立に寄与している。第27回ヘルペスウイルス研究会、2012年6月、愛知県大府市

榊原修平、**安居輝人**、南谷武春、森田健太郎、Chi-Yuang Tsai、菊谷仁(国内・口演) ガンマヘルペスウイルス感染による免疫関連疾患発症機構の解明。第27回ヘルペスウイルス研究会、2012年6月、愛知県大府市

多田智、**安居輝人**、奥野龍禎、中辻裕司、佐古田三郎、望月秀樹、菊谷仁(国内・口演) 新規神経栄養因子としてのB細胞刺激因子(BAFF) 第53回日本神経学会学術大会、2012年5月、東京

6. 研究組織

(1) 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