

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790440

研究課題名(和文)ガンマヘルペスウイルスによる自己抗体産生誘導機序の解明

研究課題名(英文) Autoantibody production during gamma-herpesvirus infection

研究代表者

榊原 修平 (SAKAKIBARA, Shuhei)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：10618838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、マウスにて自己抗体産生を誘導するmurine gamma-herpesvirus 68 (MHV68)を使用し、自己反応性B細胞出現の機構メカニズムを解明することを目的とした。単一B細胞からの抗体遺伝子クローニングにより、感染時におけるマウス脾臓IgG+胚中心B細胞には、複数の自己抗原とウイルス抗原に反応する多分子反応性B細胞が含まれることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to unveil the underlying mechanisms how autoreactive B cells emerge during viral infection. Murine gamma-herpesvirus 68 (MHV68) reportedly induced serum IgG autoantibody. Employing this model, we analyzed the reactivities of the germinal center B cells by single-cell based cloning method. It was revealed that the splenic IgG-positive germinal center B cells from MHV68-infected mice exhibited auto- and polyreactivity, which is defined as an ability to recognize multiple antigens.

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：自己反応性免疫応答

## 1. 研究開始当初の背景

免疫系は、病原体などの外来抗原のみに反応し、自己抗原に不応答な自己寛容の性質を持つ。これが正常でないと、免疫系が自己の細胞や組織を攻撃する自己免疫疾患となる。自己免疫疾患のトリガーとして、種々の感染因子の存在が以前より想定されており、なかでも、ヘルペスウイルス属に分類されるウイルスの多くは、様々な自己免疫疾患との関連が疑われている。その例として、多発性硬化症 (MS)、全身性エリテマトーデス (SLE)、関節リウマチ、シェーグレン症候群、ウイルス関連血球貪食症候群などが挙げられる。しかし、一部を除きヘルペスウイルスはヒトにおいて常在性であり、疫学的に特定の自己免疫疾患との関連を証明することは困難な場合が多い。また、実験免疫学的な詳細な解析は殆ど行われていない。

SLEでは、自己の細胞や組織を認識する自己抗体の産生が認められ、これが疾患の原因となる。特に、ガンマヘルペスウイルスは、この自己抗体産生を誘導する可能性が示唆されている。例えば、Epstein-Barrウイルス (EBV) による伝染性単核症 (IM) 患者の血清中には、自己抗体が検出されることがあり、また、逆に、SLE患者では、高いEBV抗体価が認められる (Misra R et al., 1987, Lancet, 330, 629; James JA et al., 1997, J Clin Invest, 100, 3019-26)。さらに、マウスガンマヘルペスウイルス (murine  $\gamma$ -herpesvirus 68 [MHV68]) は、抗DNA抗体などの自己抗体を近交系マウスに誘導することが報告されている (Sangster M et al., J Immunol, 2000, 164, 1820-8)。

## 2. 研究の目的

本研究は、自己免疫疾患との関連が疑われているB細胞指向性ガンマヘルペスウイルスが、いかにして、自己寛容の成立と維持を妨げているかを解明することを

目的としている。具体的には、MHV68感染が誘導する自己抗体産生をモデルとして採用し、感染細胞が自己反応性を示す頻度を明らかにした。感染細胞が高頻度で自己反応性を有することが判明した場合、それらの細胞で認められる遺伝子発現やシグナル経路の異常を明らかにし、その原因となるウイルス遺伝子を同定することを試みた。また、ヒトにおけるEBVとSLEの関連について、患者血液からB細胞を分離し、ウイルス感染と自己反応性の相関を調べることで、この疾患におけるEBVの寄与を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

single cell として分離したB細胞から、免疫グロブリン遺伝子をクローニングし、再構築して得られた抗体の性状をELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) などで調べることで、自己反応性の出現頻度を明らかにした。MHV68 に関しては、感染細胞の遺伝子発現プロファイリングなどから、遺伝子発現の違いやシグナル伝達の異常を探索し、このウイルスによるB細胞自己寛容破綻のメカニズムを明らかにすることを目指した。MHV68 感染系の解析から、ヒトにおけるEBV感染が引き起こす自己抗体産生について、比較、分析し、それに関わるウイルス潜伏感染遺伝子を類推し、宿主細胞に与える影響を検証しようとして試みた。

## 4. 研究成果

(1) MHV68 感染で誘導される自己抗体産生

### a) MHV68感染B細胞の検出

MHV68は、胚中心B細胞に潜伏感染することが報告されている。この性質を踏まえ、MHV68感染によって誘導される自己反応性B細胞の由来を明らかにすることを目的として、蛍光蛋白質を発現する組換えウ

ウイルスを作製した。Venus発現カセットを組み込んだ組換えMHV68株の作製に成功し、in vitroにおけるfibroblastへの感染で蛍光蛋白質の発現を確認した。MHV68感染後、single cellにソーティングした脾臓胚中心B細胞 (B220<sup>+</sup> CD38<sup>lo</sup> GL7<sup>hi</sup>) では、約10%の細胞がMHV68遺伝子を発現していた。しかし、今回作製したVenus-MHV68をマウスに感染させても、潜伏・持続感染での主な標的である脾臓細胞で、蛍光蛋白質の発現は認めなかった。このウイルス株の脾臓細胞への感染はRT-PCRで確認することができたので、挿入した蛍光タンパク質発現カセットが挿入部位周辺のクロマチン因子によって不活性化されるなどしているのかもしれない。従って、感染・非感染に関わらずB細胞を採取し、その後に感染の有無をRT-PCRで確認する方法をとった。

b) 単一細胞からの免疫グロブリン遺伝子クローニング

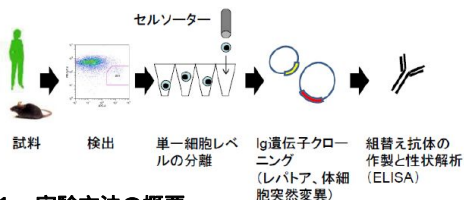


図1 . 実験方法の概要

単一細胞からの抗体遺伝子クローニングは、すでに報告されている方法に修飾を加え、行った。脾臓胚中心 IgG<sup>+</sup> B 細胞 (B220<sup>+</sup> CD38<sup>lo</sup> GL7<sup>hi</sup> IgG<sup>+</sup>) を BD FACS Aria にて single cell にソートし、逆転写反応へ細胞を直接反応させることで、一細胞に由来する cDNA を合成した(図1)。これらから、IgG 可変領域と Igkappa 可変領域を PCR にて合成し、それぞれの定常領域を含む発現プラスミドにサブクローニングした。それらを 293T 細胞へ導入することで、組換え抗体を得ることができた。

得られた組換え抗体の反応性は、胚中心 B

細胞の反応性を反映することとなる。本研究では、自己反応性を dsDNA、インスリン、カルジオピンについて判定し、MHV68 への反応性を粗精製した virion 溶解液を用いた。ELISA では、16%のクローンがウイルス抗原に反応する一方、いずれかの自己抗原に反応するクローンは、約 50%となり、大部分の IgG<sup>+</sup> 胚中心B細胞クローンが自己反応性を獲得していることが明らかとなった。また、RT-PCR により、MHV68 感染の有無を調べたが、胚中心 B 細胞については、全体の約 10%のみで、潜伏感染遺伝子 M2 の発現を検出できたにとどまり、また、それらについても、特に強い自己反応性を示すクローンが高頻度に存在するわけではなかった(図2)。従って、MHV68 感染で誘導される IgG 自己抗体は、胚中心より高頻度に出現し、それらの大半は、多分子反応性を有していることが明らかとなった。ウイルス抗原反応性 B 細胞の半分が、自己反応性を併せ持った多分子反応性であることから、ウイルス抗原に対する B 細胞選択が行われつつも、何らかの理由で、自己反応性を有したクローンが選択されている可能性が示唆された。この時点で、計画当初の予想とは異なる結果となった。近年の報告では、健康人末梢血中の IgG<sup>+</sup> メモリー B 細胞の約 25%は、多分子反応性であることが報告されている。これらは、SHM を複数有し、ゆえに胚中心反応での選択を経たと考えられるが、そうであるならば、胚中心反応での B 細胞選択は必ずしも厳格ではないか、感染などによって、その厳格さを妥協させる環境が作り出されると考えられる。以降は、自己反応性、および多分子反応性 B 細胞が、いかにして胚中心反応により出現するかを明らかにする為に、研究を進めたので、以下に報告する。

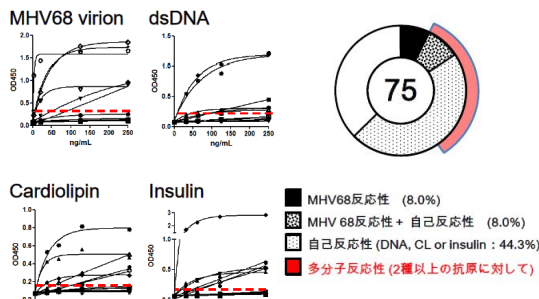


図2 .MHV68 感染脾臓 IgG + 胚中心 B 細胞の反応性プロファイル

### c) SHM の自己反応性、およびウイルス抗原反応性への影響

胚中心では、体細胞超変異 (SHM) を受けた抗体遺伝子により B 細胞は、反応性の多様性を獲得し、より抗原親和性を持つ B 細胞のみが選択されると考えられている。MHV68 感染脾臓胚中心 B 細胞由来の抗体遺伝子には、複数の SHM を持つものが認められたので、その SHM を germline 配列へ戻すことで、それらの反応性への重要性を調べた。すると、ウイルス抗原へ反応性を示すクローンについては、SHM を germline 配列へ戻しても、それらの反応性は大きく変化することはなかった。即ち、ウイルス抗原への反応性は、V(D)J recombination と H 鎖 L 鎖の組み合わせで決定されていると考えられる。しかし、polyreactive clone の自己反応性に関しては、大半のクローンで SHM に依存していることがわかり、これらのクローンが胚中心反応において出現し、選択を受けている可能性が示された。

### (2) 自己反応性および多分子反応性抗体出現機構について

MHV68 の B 細胞への感染が、自己抗体産生の原因ではないことが明らかとなり、宿主免疫細胞における原因を検討した。MHV68 感染では、Th1 CD4<sup>+</sup>T 細胞が圧倒的優位に誘導されるが、これらの過剰な働きが液性免疫応答に影響していると予想した。そこで、IFN $\gamma$  KO マウスにおいて、MHV68

感染時の自己抗体産生を検討したが、野生型マウスとの間に大きな差は認められなかった。また同様に、MHV68 感染で過剰に誘導される CD8<sup>+</sup>T 細胞や NKT 細胞の関与についても、 $\beta$ 2M KO マウスや J $\alpha$ 18 KO マウスへの感染で検討したが、これらも自己抗体価の誘導に変化はなかった。MHV68 感染マウスの胚中心 B 細胞の遺伝子発現について、免疫学実験で通常使用される抗原免疫での脾臓胚中心 B 細胞と比較したところ、IFN 誘導遺伝子群が発現上昇していることが観察された。今後、IFN-I の胚中心 B 細胞選択への影響を調べる必要がある。

MHV68 に BAC 配列を組み込んだ変異体は、大腸菌での遺伝子改変の為に使用されるが、これをマウスに感染させた場合、肺での局所感染には影響はないが、脾臓などへの伝播能力が低下するとされる (H Adler et al., 2000 J Virol)。この BAC ウイルスを感染させた場合、抗ウイルス抗原価は野生株と遜色がないが、自己抗体は約 30%にまで低下することを見出した。従って、MHV68 感染が局所であると自己抗体の産生は限定的となるようである。事実、インフルエンザ (strain A/Puerto Rico/8/1934 H1N1) の感染では、自己抗体が産生されず、脾臓胚中心 B 細胞でも多分子反応性クローンの出現は、ほとんど認められなかった。

### (3) ヒト抗体クローンの解析

マウスでの実験をもとに、ヒトにおける多分子反応性 B 細胞の出現について検討した。Esptein-Barr ウイルス (EBV) の青年期以降の初感染で起こる伝染性単核球症 (IM) に患者より末梢血単核球を分離し、形質細胞から IgG 抗体をクローニングした。しかし、EBV 抗原に反応を示す IgG クローンが存在せず、報告にあるように IM の急性期では、宿主にとって有効な液性免疫反応

が誘導されていないことが考えられた。多分子反応性を示すクローンの存在頻度は、約 15%となり、あまり顕著ではなかった。現在、ウイルス抗原に反応を示すクローンを多く含むであろう IM 寛解期の検体について解析を進めている。

本研究では、ヒトや様々な宿主に対して、ユビキタスに存在しているヘルペスウイルスの感染が自己抗体を誘導することを見出し、それらは胚中心 B 細胞で出現する多分子反応性 B 細胞に由来することを突き止めた。多分子反応性 B 細胞の出現が誘導されるとするのは、これまでに HIV やマラリア原虫などで報告があるが、胚中心より出現することを明らかにしたものは本研究で採用した MHV68 感染のみである。これらの自己抗体の産生は、MHV68 感染の初期に一過性に起こるもので、それを制御する因子の存在が予想される。また、この多分子反応性 B 細胞の出現に、MHV68 の B 細胞への感染は関与せず、インフルエンザの感染では、自己抗体産生が認められないことなどから、MHV68 の全身性感染、とくに脾臓での感染に原因があるのではないかと予想している。今後、この MHV68 モデルでの自己抗体産生の直接の原因を突き止め、ヒトにおける近縁のウイルスの感染で同様の現象が認められないかを探していきたい。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. 榊原修平、菊谷仁：ウイルス感染による自己抗体産生誘導：臨床免疫・アレルギー科(査読なし) 2014; vol.61, No.1, p74-80
2. Sakakibara, S., Espigol-Frigole G\*, Gasperini P., Uldrick T.S., Yarchoan R., and Tosato G. (2013) A20/TNFAIP3 inhibits NF- $\kappa$ B activation induced by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus vFLIP oncoprotein. *Oncogene* 32, 1223-1232. \*Equally contribute (査読あり)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Sakakibara, S., T. Yasui, T. Minamitani, and H. Kikutani: Generation of polyreactive B cells during murine herpesvirus infection. 第 42 回日本免疫学会、千葉市、2013 年 12 月 11 日~12 月 13 日。(口頭)
  2. Sakakibara, S., T. Yasui, T. Minamitani, H. Jinzai, and H. Kikutani: Generation of autoreactive and poly-reactive antibody producing cells during gamma-herpesvirus infection. The 15th International Congress of Immunology, イタリア ミラノ、2013 年 8 月 22 - 27 日 (ポスター)
  3. Sakakibara, S., T. Yasui, T. Minamitani, and H. Kikutani: Generation and selection of virus- and self-reactive B cells during herpesvirus infection. 第 41 回日本免疫学会、神戸市、2013 年 12 月 5 日~12 月 7 日。(口頭)
  4. 榊原修平、安居輝人、南谷武春、菊谷仁：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、大阪市、2012 年 11 月 13 日~15 日(口頭)
  5. Sakakibara, S., T. Yasui, T. Minamitani, H. Kikutani: Generation of virus- and self-reactive B cells during herpesvirus infection. The 12th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 兵庫県淡路市、2012 年 9 月 11 日~14 日 (ポスター)
6. 研究組織  
(1)研究代表者  
榊原 修平 (SAKAKIBARA, Shuhei)  
大阪大学・微生物病研究所・助教  
研究者番号：10618838