

第六回ウイルス学キャンプ in 湯河原 プログラム

6月29日(月)

13:00 ~ 受付・ポスター貼付け・スライド受付

13:30 頃 開会 開会挨拶：塩田達雄

13:45 Session 1 招待講演(1) 座長：小柳義夫

- インターフェロンによる粘膜免疫系・造血系制御
樗木俊聡(東京医科歯科大学難治疾患研究所)

14:30 Session 2 ポスター発表

16:00 Session 3 一般口頭発表(1) 座長：発表者が交互に行う

- 致死性EBV感染症モデルマウスの確立
佐藤 佳(京都大学ウイルス研究所ウイルス病態研究領域)
- PILR α を介したヘルペスウイルス細胞侵入機構の解析
有井 潤(東京大学医科学研究所 感染症国際研究センター)
- エイズウイルストロピスムを規定する宿主因子の解析
武内寛明(東京大学医科学研究所 感染症国際研究センター)
- インフルエンザウイルスゲノム複製に関与する宿主因子 IREF-1/MCM とウイルス性因子 NP の作用機構
川口敦史(筑波大学大学院 人間総合科学研究科)

17:20 休憩

17:35 Session 4 一般口頭発表(2) 座長：発表者が交互に行う

- SARS-CoV 受容体 ACE2 の細胞内領域における機能的役割
井上雄喜(東北大学大学院医学系研究科 免疫学分野)
- SARS-CoV nsp1 による 40S リボソームサブユニットとの結合を介した翻訳抑制機構
神谷 亘(大阪大学微生物病研究所)
- PSGL-1 はエンテロウイルス 71 の受容体である
西村順裕(国立感染症研究所 ウイルス第二部)

○SCARB2はエンテロウイルス71の感染受容体である
山吉誠也（東京都臨床医学総合研究所 神経ウイルスPT）

19:30 ～ 夕食 挨拶：川口 寧

夜 集中討論

注意：24:00から翌朝5:00までは入浴不可能

6月30日

7:00 ～ 9:00 朝食

9:20 集合・鍵返却

9:30 Session 5 招待講演（2） 座長：五十嵐樹彦

○分節 2本鎖RNA ウイルスにおける遺伝子操作系の確立
小林 剛（京都大学ウイルス研究所 附属感染症モデル研究センター）

10:15 休憩

10:30 Session 6 招待講演（3） 座長：俣野哲朗

○細胞核におけるボルナウイルスの持続感染—RNAウイルスの未知なる動態—
朝長啓造（大阪大学微生物病研究所 ウイルス免疫分野）

11:15 頃 閉会 閉会挨拶：森 康子

招待講演

○インターフェロンによる粘膜免疫系・造血系制御

樗木俊聡（東京医科歯科大学 難治疾患研究所）

I 型インターフェロンは、ウイルス感染の際、免疫細胞を含む宿主細胞から生産され、宿主に抵抗性を付与しウイルスを排除する重要なサイトカインとして知られている。我々は最近、これまでに知られていない意外な I 型インターフェロンの機能を見いだしたので紹介したい。

1つ目は、I 型インターフェロンの造血幹細胞に対する機能です。I 型インターフェロンの刺激が、すべての血液細胞の源である造血幹細胞の運命決定に重要な影響を及ぼす実験的根拠を提示し、その生物学的意義さらには新しい疾患治療法開発の可能性にも言及したい。

2つ目は、I 型インターフェロンの粘膜免疫系に対する機能です。IgA は、感染成立の主たる場である粘膜組織で優位に生産され、感染防御に重要な役割を担うことが知られている。我々は、特に IgA 生産におけるインターフェロンの機能を明らかにしつつあり、こちらも時間があれば紹介したい。

参考文献

Sato T, Onai N, Yoshihara H, Arai F, Suda T, Ohteki T. IRF-2 protects quiescent HSCs from type-I interferon-dependent exhaustion. *Nat Med* **15**, 696-700 (2009)

Passegue E, Ernst P. IFN- γ wakes up sleeping hematopoietic stem cells (News & Views). *Nat Med* **15**, 609-612 (2009)

Tezuka H, Abe Y, Iwata M, Takeuchi H, Ishikawa H, Matsushita M, Shiohara T, Akira S, Ohteki T. Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature* **448**, 929-933 (2007)

○分節 2本鎖RNA ウイルスにおける遺伝子操作系の確立

小林 剛（京都大学ウイルス研究所 附属感染症モデル研究センター）

哺乳類オルソレオウイルス（レオウイルス）は、10本の2本鎖RNA（dsRNA）をゲノムとして保有し、他のレオウイルス科に属するウイルスの複製機構ならびに病原性を理解する上で優れたモデルである。10～12本のdsRNA分節をゲノムとするレオウイルス科においては、ウイルスゲノム内に任意の変異を導入できる遺伝子操作系（リバーシジェネティクス系）の開発が遅れており、全ての分節ゲノムが完全なcDNAに由来するリバーシジェネティクス系の開発はこれまで困難を極めていた。最近、我々はレオウイルスにおける完全なcDNAに由来するリバーシジェネティクス系の開発に成功した。このリバーシジェネティクス系は、レオウイルス遺伝子の機能や病原性を理解する上で非常に強力な手法であり、レオウイルスの基礎研究に寄与するだけでなく、新規ワクチンベクター開発への応用も期待される。

○細胞核におけるボルナウイルスの持続感染—RNA ウイルスの未知なる動態—
朝長啓造（大阪大学微生物病研究所 ウイルス免疫分野）

ボルナウイルスは非分節の一本鎖マイナス鎖の RNA をゲノムに持つモノネガウイルス目に属するウイルスである。現在、ボルナウイルス科には、主に哺乳類に感染するボルナ病ウイルス (Borna disease virus: BDV) と鳥類に感染する鳥ボルナウイルス (avian bornavirus: ABV) の 2 種が同定されている。これらボルナウイルス科のウイルスは、神経系組織に好んで感染し、感染宿主は遅発性の神経疾患を発症することが知られている。わが国においても感染個体は確認しているが、その伝播機構や保有動物などについてはいまだ多くの謎が残されている。

BDV を対象にしたこれまでの研究から、ボルナウイルスは他の RNA ウイルスでは見られない多くの特徴を持つことが明らかとなってきた。なかでも、最大の特徴は、細胞核における持続感染である。ボルナウイルスは核内で転写・複製し、非細胞傷害性に増殖する。一方、感染細胞からの子孫ウイルスの放出は微量である。細胞核に高く依存したこのような独特な感染形態からは、ボルナウイルスが独自の機構により生活環をつくりあげていることが示唆される。私たちの研究室では、ボルナウイルスのユニークな感染特性を明らかにすることで、未知なる感染現象の理解を目指すとともに、それらを利用した新たなウイルステクノロジーの開発を試みている。今回の発表では、これまでに明らかとなった細胞核での BDV の感染維持戦略とゲノム解析から見つかったボルナウイルスと宿主染色体との新たな相互作用を中心に紹介する。

一般演題

○致死性EBV感染症モデルマウスの確立

佐藤 佳 (京都大学ウイルス研究所 ウイルス病態研究領域)

Epstein-Barr virus (EBV)は、ヒトにのみ特異的に感染するヘルペスウイルスである。小児におけるEBV初感染では、ウイルスはほとんどの場合不顕性感染し、潜伏感染が成立する。一方、成人におけるEBV初感染では、EBV抗原に特異的なCD8+T細胞の異常活性化に起因する伝染性単核球症 (IM)が引き起こされる。IMはほとんどの場合、発熱などを示すのみの一過的な良性疾患である。しかし稀に、EBVの溶解性感染をコントロールできず、肝炎や骨髄障害に起因する致死的な病変に進展する場合がある (致死性EBV感染症)。致死性EBV感染症については、EBVの宿主域がヒトに限られることから、モデル動物を用いてその病態を解析することは不可能であり、いまだに不明な点が多い。そこで我々は、ヒト臍帯血より分離したヒトCD34+造血幹細胞をNOD/SCID/cgamma null (NOG)マウスに移植し、ヒト免疫系を再構築したマウス (NOG-hCD34) を作製し、EBVを感染させ、(i) ウイルス学的解析、(ii) 免疫学的・病理学的解析を行った。

(i) EBV 感染 NOG-hCD34 マウスの末梢血を経時的に採取し、ウイルス DNA 量を測定した。その結果、感染後4週以降、きわめて高レベルのウイルス DNA ($>10^6$ コピー/ml) が末梢血および血漿中に確認された。また、感染マウスの脾臓切片を作製し、EBV 抗原に対する免疫染色を行ったところ、溶解性 EBV 抗原である BZLF1, gp110 陽性細胞の存在が確認された。これらの結果は、EBV が NOG-hCD34 マウス内において、活発な溶解性感染を引き起こすことを示唆している。

(ii) EBV 感染 NOG-hCD34 マウスの PBMC プロファイルを解析した結果、CD45RO+CD38+HLA-DR+の活性化ヒト CD8+T 細胞の劇的な増加が確認された。また、感染マウスの血漿中における炎症性サイトカイン量を定量したところ、ヒト IFN γ の急激な上昇が確認された。さらに、このマウスの臓器からヒト細胞を回収したところ、肝臓、腎臓、肺、骨髄という広範な臓器において、CD45RO+CD38+HLA-DR+活性化ヒト CD8+T 細胞の浸潤が確認された。そして、肝臓においては、致死性 EBV 感染症で確認される、組織球の増加および活発な血球貪食が確認された。

これらの結果から、EBV は溶解性感染により血球貪食症を誘発する原因ウイルスとなりうるということが明らかとなった。このモデル動物は、致死性 EBV 感染症の発症機序を明らかにする上で有用なツールとなると考える。

○PILR α を介したヘルペスウイルス細胞侵入機構の解析

有井 潤 (東京大学医科学研究所 感染症国際研究センター)

最近、新しいヘルペスウイルスのレセプターとして PILR α が同定された。しかし PILR α を介したウイルス侵入機構や、病態への貢献ははっきりしていない。我々は、PILR α の発現によってウイルス侵入経路が、endocytosis を介したものから細胞膜表面での direct fusion に変化すること、ブタを自然宿主とするヘルペスウイルスである PRV もまた PILR α を用いることができるものの、HSV-2 は用いることができないことを明らかにした。さらに、PILR α 依存的な細胞侵入能力のみを失った組換えウイルスを用いた動物実験を行うことで、PILR α の病態への関与を解析した。

○エイズウイルストロピズムを規定する宿主因子の解析

武内寛明 (東京大学医科学研究所 感染症国際研究センター)

ヒトエイズウイルス (HIV) と宿主との攻防において、宿主細胞側はウイルス感染効率を維持または促進するメカニズムだけでなく、ウイルス感染を阻止するメカニズムをも備えていることが明らかとなってきている。しかし、サルエイズウイルス (SIV) が「種の壁」を乗り越えてヒトに感染伝播してきたメカニズムの詳細については不明な点が多い。我々は、サルエイズウイルス (SIV) が宿主域を乗り越えて、ヒトに感染伝播してきた機構を明らかにすることを目的として研究を進めた結果、分子シャペロンである、Cyclophilin A および Cyclophilin B が、SIV のトロピズムを規定するヒト細胞内因子であることを示唆する結果が得られたので報告させていただきます。

○インフルエンザウイルスゲノム複製に関する宿主因子 IREF-1/MCM とウイルス性因子 NP の作用機構

川口敦史（筑波大学大学院 人間総合科学研究科）

インフルエンザウイルスゲノム複製の開始反応は転写反応とは異なり、プライマー非依存的である。複製過程では、vRNA を鋳型として複製中間体である cRNA が合成され、次いで cRNA を鋳型として vRNA が増幅される。精製ウイルス粒子より調製した viral ribonucleoprotein (vRNP) 複合体を酵素源とした試験管内ウイルス RNA 合成反応では、プライマー非依存的な完全鎖長の cRNA 合成活性は検出できず、vRNP 複合体に加えて宿主因子および更なるウイルス性因子を添加する必要があることが示唆されていた。本研究では、インフルエンザウイルスゲノム複製機構を明らかにするため、宿主およびウイルス性因子を添加してプライマー非依存的な試験管内ウイルスゲノム複製反応を再構成し、その反応機構の解明を目的とした。

非感染 HeLa 細胞核抽出液より、ウイルスゲノム複製反応を促進する宿主因子として IREF-1/MCM 複合体を同定した。vRNP 複合体のみでは、ウイルスポリメラーゼは開始反応から伸長反応への移行ができず、全長のウイルスゲノムを複製できないが、IREF-1/MCM を添加することでウイルスポリメラーゼは Processive な RNA 合成反応を行い、全長のウイルスゲノムを複製することが明らかになった。さらに、ウイルスゲノム非結合性の NP を添加することによっても、試験管内ウイルスゲノム複製反応は促進された。また、IREF-1/MCM と NP は相加的に作用することが明らかになった。ドメイン解析の結果、NP によるウイルスゲノム複製促進活性には、NP の RNA 結合能は不要であり、NP はウイルスポリメラーゼに作用してゲノム複製反応を促進することが示唆された。現在、IREF-1/MCM およびウイルスゲノム非結合性の NP によるウイルスゲノム複製促進機構について、生化学的な解析を進めているところである。

○SARS-CoV 受容体 ACE2 の細胞内領域における機能的役割

井上雄喜（東北大学大学院医学系研究科 免疫学分野）

ウイルスは宿主細胞の特異的受容体に結合し、直接膜融合あるいはエンドサイトーシスを経て感染を成立させる。これまで、我々は SARS-CoV がクラスリン依存性エンドサイトーシスを主に利用して感染を成立させることを明らかにした (J. Virol. 2007)。クラスリン形成には受容体の細胞内領域の YXXΦ (Φ:疎水性アミノ酸)モチーフにアダプター蛋白質 (AP2) が結合することが必須である。そこで、このモチーフを有する SARS-CoV 受容体 (ACE2) の感染における機能的役割について検討を行った。その結果 SARS-CoV 感染には、ACE2 の細胞内領域は必須ではないことが分かった。さらに ACE2 の膜貫通領域の種特異性はみられず、感染にはウイルスと結合する細胞外領域が細胞膜上に局在することが重要であることが分かった。

以上の結果から SARS-CoV 感染において ACE2 の他にクラスリンと会合する共受容体の存在が示唆される。

○SARS-CoV nsp1 による 40S リボゾームサブユニットとの結合を介した翻訳抑制機構

神谷 亘（大阪大学微生物病研究所）

SARS ウイルス (SARS-CoV) は重症急性呼吸器症候群の原因ウイルスであり、そのウイルスゲノムの 5' 末端に非構造タンパク質の一つである nsp1 タンパク質がコードされている。我々は nsp1 タンパク質が、感染細胞内で IFN-beta mRNA を含む宿主 mRNA の分解を促進し、さらに宿主のタンパク質合成を抑制することを報告した。今回、我々は nsp1 タンパク質による RNA 分解と翻訳抑制の関係を詳細に解析するために、組み換え nsp1 タンパク質を用いて翻訳阻害機構の解析をおこなった。その結果、nsp1 タンパク質は 40S リボゾームとの結合を介して 80S リボゾーム複合体の形成を阻害することによりタンパク質の翻訳を抑制することを明らかにした。

○PSGL-1 はエンテロウイルス 71 の受容体である

西村順裕（国立感染症研究所 ウイルス第二部）

エンテロウイルス 71 (EV71) は、手足口病の主要な病原体である。手足口病は主に幼児にみられ、四肢末端の発疹、口内の水疱・潰瘍が特徴である。これらの症状は一般に軽く、予後も良好である。しかし、時として EV71 は重篤な中枢神経疾患を引き起こすことが知られている。

我々は EV71 の受容体として、P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) を同定した。PSGL-1 はシアロムチンファミリーに属する蛋白質で、主に白血球に発現し、初期炎症反応に重要と報告されている。

我々は PSGL-1 のアミノ末端領域が EV71 との相互作用に重要であることを明らかにした。また、EV71 が感染しないマウス L929 細胞に PSGL-1 を発現させると、EV71 が感染するようになった。EV71 分離株 8 株について PSGL-1 結合性を解析したところ、5 株が結合したが、3 株は結合しなかった。さらに、PSGL-1 を発現していない非白血球系細胞においても、EV71 が複製することを明らかにした。したがって、EV71 は PSGL-1 以外の受容体も使用することが示唆された。

今後、EV71 が起こす手足口病や中枢神経疾患における、PSGL-1 陽性白血球機能の解明が期待される。

○SCARB2 はエンテロウイルス 71 の感染受容体である

山吉誠也（東京都臨床医学総合研究所 神経ウイルス PT）

エンテロウイルス 71 (EV71) は手足口病の原因ウイルスであり、稀に重篤な無菌性髄膜炎および脳炎を引き起こすことがある。我々は EV71 の神経病原性発現機構を詳細に解明することを最終目的として、先ず初めに EV71 の感染受容体 (EV71R) の同定を試みた。

EV71 高感受性であるヒト RD 細胞のゲノム DNA を低感受性であるマウス L929 細胞に導入することで、EV71 感受性を持つ L929 細胞 (Ltr051 細胞) を樹立した。この Ltr051 細胞に感受性をもたらしているヒト由来遺伝子を同定することにより EV71R の検索を行った。Ltr051 細胞と L929 細胞を比較したトランスクリプトーム解析から、SCARB2 が EV71R の候補として同定された。SCARB2 の EV71R としての機能を確認するため、SCARB2 を L929 細胞に安定発現させ、EV71 のいくつかの株をそれぞれ感染させた。供試した全ての株で効率良い増殖が確認された。また、EV71 は SCARB2 と直接結合し、その結合は抗 SCARB2 抗体で阻害された。そして、EV71 の感染は、抗 SCARB2 抗体で細胞を前処理すること、または SCARB2 蛋白質を感染前に EV71 と混合させることにより阻害された。以上より、EV71 の感染受容体を同定したと結論した。また、EV71 の感染成立にはこの分子一つを L929 細胞に導入するだけで十分であると考えられる。