

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08671

研究課題名(和文)新規HPVワクチン関連神経免疫異常症候群モデルマウスを用いた病態発症機構の解析

研究課題名(英文)Improvement of vaccines against human papilloma viruses and evaluation of treatments of human papillomavirus vaccination-associated neuro-immunopathic syndrome with pathological model mice

研究代表者

荒谷 聡子(Aratani, Satoko)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：40387064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトパピローマウイルス(HPV)の持続感染は妊娠を妨げ、若い女性の死因の上位である子宮頸がんの病因である。HPVワクチンが開発され感染予防に効果を示す一方で、有害な副反応が報告されており、我々は同症候群をHANSと名付けた。HANSの病因・病態を明らかにするため、HPVワクチンを用いてHANSモデルマウスを作製し、同マウスはHANS様表現型として運動機能および脳の組織学的異常を示した。さらにワクチン作用機序および宿主反応メカニズムを明らかにするため、同マウスの脳、血液中の発現因子の変化を検討した。その結果HANS患者と同様に自己免疫疾患関連因子の活性化が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HPVワクチンは子宮頸がん予防に対して効果的である一方で、各国より慢性の有害な副反応が報告されている。健康であった若い女性が後遺症に悩まされるなど社会的に大きな問題となっており、病因・病態の解明が急務とされている。その症状は疼痛、運動障害、高次機能障害、内分泌異常など多岐にわたり、現在ワクチン投与による侵襲的な障害は検出されておらずHANSの発症機構、なぜ同ワクチンでのみ高頻度で発症するのかなどほとんど明らかになっていない。そこでHANSモデルマウスの樹立、病因解析を行うことは、ワクチンの改良や同疾患の予防・治療に関して多くの知見を与えるものであると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Cervical cancer is the most common type of cancer in women and is associated with the most death in young women. Because infection with human papilloma viruses (HPVs) is necessary for the occurrence of cervical cancer, protection from HPV is effective in avoiding the disease. Vaccines against HPVs were developed. However, adverse reactions related to the vaccination, such as myalgia, chronic fatigue, and neurological manifestations were reported. We have coined these reactions as human papillomavirus vaccination-associated neuro-immunopathic syndrome (HANS). This syndrome is the important problem that we have to take initiative to elucidate. To elucidate the mechanism of HANS, we established an animal model of the syndrome with HPV vaccine. The mice indicated HANS like phenotypes such as tail reflex, decrease of motor coordination. We analyzed the changes of gene expression level in the model mice. It was suggested that expression of autoimmune disease-related factors were activated.

研究分野：病態生理学、分子細胞生物学、リウマチ学、タンパク質分解、遺伝子発現、遺伝子改変動物

キーワード：HANS モデルマウス 視床下部

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトパピローマウイルス (HPV) の持続感染は妊娠を妨げ、若い女性の死因の上位に挙げられている子宮頸がんの病因であることが明らかにされている。そのため HPV 感染撲滅を目指して HPV ワクチンが開発され、2009 年に本国においても接種が開始された。一方で、ワクチンは目的外の免疫応答を惹起することにより有害な副反応をもたらすことがある。HPV ワクチンに関しては副反応として通常の発熱・局所痛といった一時的な反応だけでなく慢性疼痛や疲労感、痙攣および不随意運動・高次機能障害、内分泌異常などの可能性が各国より報告されている。我々はこれをヒトパピローマウイルスワクチン関連神経免疫異常症候群 (HPV vaccination-associated neuro-immunopathic syndrome : HANS) と名付けた。同症候群は全身の慢性疼痛を主訴とする原因不明の難治性疾患である線維筋痛症と類似する症状を呈する。さらに中枢神経系特に視床下部における血流の変化や内分泌系の機能低下などが示唆されており、器質的な中枢神経、自律神経障害と考えられている。ワクチンによる副反応は接種した抗原だけでなくワクチン製造時に含まれるタンパク質やアジュバントに対しても起こりうるということが知られており、HANS はアジュバント誘発自己免疫症候群 (ASIA) との関連も示唆されている。しかし線維筋痛症と同様に、現在ワクチン投与による侵襲的な障害は検出されておらず HANS の発症機構、またなぜ同ワクチンでのみ高頻度で発症するのかなど、ほとんど明らかになっていない。そのためワクチン接種事業の対象となった若い女性が同症候群に苦しんでおり、同症候群は我が国が早急に対処すべき社会問題となっている。

代表者はこれまで関節リウマチの解析を行っており、滑膜細胞増殖を制御する因子として小胞体ストレスに関与する E3 ユビキチン化酵素シノビオリンをクローニングした。遺伝子改変動物や関節炎モデルマウスを用いた解析から、シノビオリンおよびシノビオリンを介したユビキチン化シグナルが関節リウマチの発症、病態に重要な因子であることを見出した。さらに時期、組織特異的マウスを用いた解析からシノビオリンがエネルギー代謝・ミトコンドリア制御において重要な役割を果たすこと、線維化モデルマウスを用いて組織の線維化に関与することを報告してきた。また前述した線維筋痛症の病因・病態メカニズムの解明を目指して、同症候群が疼痛に加えて炎症症状やミトコンドリア不全といった病態を呈すること、シノビオリンが慢性炎症を基礎とする疾患に関与しミトコンドリア制御に関与することから、シノビオリンと線維筋痛症の病態との関与に着目して線維筋痛症病態モデルマウスの樹立、解析を行ってきた (図 1)。これらの技術を生かし、HPV ワクチンをマウスに投与し HANS モデルマウスの構築を試み運動協調性の低下がみられるマウスを得ていた。

HANS 症例	HANS モデルマウス
<p>代表的な病態</p> <p>(1) 運動・ロコモーション症候 歩行困難、脱力 痙攣、不随意運動</p> <p>(2) 感覚症候 (1) 痛み (2) 視覚・聴覚・味覚・体性感覚症候 感覚障害、しびれ、ドライアイ、ドライマウス</p> <p>(3) 認知・情動症候 (1) 認知諸候 記憶障害、高次機能障害、性格変化 (2) 情動諸候 疲労感、倦怠感、うつ、パニック</p> <p>(4) ホメオスタシス症候 (1) 自律神経症候 起立調節困難、失神、めまい、熱、過呼吸、下痢 (2) 睡眠・内分泌・炎症症候 月経異常、睡眠障害、摂食障害 蕁麻疹、口内炎 など</p>	<p>表現型</p> <p>(1) 運動機能の低下 尾の緊張低下 </p> <p>(2) 運動協調性の低下 </p> <p>(3) 脳の組織構造学的異常 第三脳室狭小 </p> <p>(4) アポトーシスの亢進 視床下部、血管内皮細胞 </p> <p>(5) 弓状核の介在ニューロンの変化 ドーパミン作動性↑ GABA作動性↓ </p>

図 1 HANS の病態とモデルマウス

2. 研究の目的

HPV ワクチンによる中枢神経系への作用メカニズムの解明を目指して、C57BL6 マウスに HPV ワクチンを投与し HANS 病態モデルマウスの構築を行っている。本研究では HANS 病態モデルマウスを用いてワクチン作用機序の解析および宿主反応メカニズムの解析を行い、HANS 発症メカニズムの解明および安全性の高いワクチンの開発へとつなげる。

3. 研究の方法

実験的自己免疫性脳脊髄炎モデル (EAE) に対して高い感受性を示す C57BL6 メスマウスに HPV ワクチン 100 μl を 2 週間おきに投与した。その際に血液脳関門を変性させることから EAE を高確率で発症するために用いられている百日咳毒素 (Ptx) を 1 ヶ月おきに腹腔投与し、運動機能に対する影響を検討した。投与開始から 3 ヶ月後マウスから組織を採取した。脳をホルマリンで固定後、パラフィンで包埋し薄切した。組織切片を免疫染色し発現因子の違いを検討した。また脾臓より末梢血リンパ球を単離、さらに大脳を皮質、海馬を含む領域、視床下部を含む領域に分けて採取し、これらの組織から RNA を精製しリアルタイム PCR により発現因子の違いを検討した。これらの動物実験は東京医科大学 動物実験委員会に承認されており (承認番号 H290062)、動物実

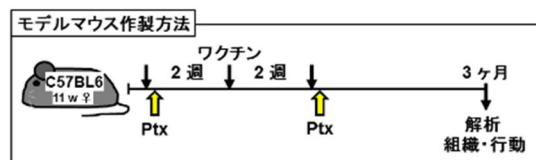


図 2 モデルマウスの作製

験の実施にあたっては動物実験委員会の講習・認可 (H27-1087 号) のもと動物実験規定に則り、動物を適切に利用することに配慮するとともに、動物に苦痛を与えない方法によって実施した。

4. 研究成果

C57BL6 マウスに HPV ワクチン、Ptx を投与したところ、軽度であるが約 50% の個体において尾の脱力、運動協調性の低下等がみられた。同マウスは第三脳室の狭小化や弓状核におけるドーパミン作動性ニューロンの増加と、GABA 作動性ニューロンの減少が明らかになっている。HANS 患者における発現因子、シグナル伝達の解析としては、脳脊髄液において IL-4、IL-13 といった Th2 を活性化に關与するサイトカインや自己免疫に深く關与するサイトカイン IL-17 の活性化が報告されている。モデルマウスより脳の組織切片を採取し IL-17 の発現を免疫染色にて発現を調べたところ ワクチン+百日咳毒素投与群ではコントロール群と比較して IL-17 を発現する細胞の増加が示唆された。さらにモデルマウスの末梢血リンパ球および脳における遺伝子発現をリアルタイム PCR を用いて検討した。末梢血および神経伝達物質の発現尾変化が認められていた視床下部を含む領域において IL-4, 13 の発現が高く、IL-1 β が低い傾向にあった。IL-1 は炎症に加えて神経伝達物質制御への關与が報告されておりこの点からも神経伝達系への影響が示唆された。また HNAS 同様に慢性疼痛を主訴とする線維筋痛症では脳内炎症とミトコンドリアの機能の關連が示唆されており、当研究室でも遺伝子改変マウスの解析においてミトコンドリア制御不全と痙攣・炎症の關与を明らかにしている。この点からミトコンドリアの機能調節に關連する小胞体ストレス因子についても検討したが変化が認められなかった。個体数を増やして解析する必要があるが病態モデルマウスの解析により HANS の病態、発症に關与するシグナル伝達系を明らかにできると期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ishida Y, Fujita H, Aratani S, Chijiwa M, Taniguchi N, Yokota M, Ogihara Y, Uoshima N, Nagashima F, Uchino H, Nakajima T.	4. 巻 18(2)
2. 論文標題 The NRF2-PGC-1 pathway activates kynurenine aminotransferase 4 via attenuation of an E3 ubiquitin ligase, Synviolin, in a cecal ligation/perforation -induced septic mouse model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol. Med. Rep.	6. 最初と最後の頁 2467-2475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892 / mmr.2018.9175	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fujita H, Aratani S, Yagishita N, Nishioka K, Nakajima T.	4. 巻 8(6)
2. 論文標題 Identification of the inhibitory activity of E3 ligase Syvn1 in walnut extract.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol. Med. Rep	6. 最初と最後の頁 5701-5708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892 / mmr.2018.9576	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 荒谷 聡子、中島 利博	4. 巻 76 (11)
2. 論文標題 線維筋痛症の病態・病因	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本臨牀	6. 最初と最後の頁 1921-1926
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aratani S, Kuroiwa Y, Fujita H, Usui C, Yokota S, Nakamura I, Nishioka K, Nakajima T	4. 巻 55
2. 論文標題 What occurs in human papilloma virus vaccination-associated neuro-immunopathic syndrome (HANS)? : implications of previous animal model studies	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Autonomic Nervous System	6. 最初と最後の頁 915-919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aratani S, Fujita H, Yagishita N, Yamano, Okubo Y, Nishioka K, Nakajima T	4. 巻 16
2. 論文標題 Inhibitory effects of ubiquitination of synoviolin by PAD14	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 9203 ~ 9209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2017.7764	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 藤田 英俊、石田 裕介、荒谷 聡子、横田 真穂、内野 博之、中島 利博
2. 発表標題 脳内炎症に関わるキヌレニンの代謝機構の解明
3. 学会等名 日本線維筋痛症学会 第 10 回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西森 美佐子、中平 律子、山口 結花、梅原由加里、荒谷 聡子、中島 若巳、北川 中行、中谷 孝、中島 利博
2. 発表標題 線維筋痛症における当院での関節超音波検査の取り組み
3. 学会等名 日本線維筋痛症学会 第 10 回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakajima T, Aratani S, Fujita H, Kuroiwa Y, Usui C, Yokota S, Nakamura I, Nishioka K
2. 発表標題 A study on our novel murine model of Humanpapillomavirus-associated Neuroimmunopathic Syndrome (HANS)
3. 学会等名 国際自律神経学会 ISAN2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 荒谷 聡子
2. 発表標題 新規ヒトパピローマウイルスワクチン関連神経免疫異常症候群モデルマウスの樹立とその病態解析
3. 学会等名 第 18 回 運動器科学研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 荒谷 聡子、藤田 英俊、黒岩 義之、白井 千恵、横田 俊平、中村 郁郎、西岡久寿樹、中島 利博
2. 発表標題 モデルマウスを用いたヒトパピローマウイルスワクチン関連神経免疫異常症候群の病態解析
3. 学会等名 日本線維筋痛症学会 第 9 回学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西森美佐子、中平 律子、山口 結花、梅原由加里、荒谷 聡子、中島 若巳、北川 中行、中谷 孝、中島 利博
2. 発表標題 線維筋痛症における関節超音波検査の活用法
3. 学会等名 日本線維筋痛症学会 第 9 回学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Fujita H, Aratani S, Yokota M, Nakajima T
2. 発表標題 Development of novel regulatory methods of mitochondrial functions
3. 学会等名 The 16th International Symposium on Advanced Technology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 荒谷 聡子、宮川 聡美、藤田 英俊、中島 利博
2. 発表標題 シノビオリンを介した全身性エリテマトーデスの病因・病態制御メカニズムの解析
3. 学会等名 第 6 回 JCRベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田 英俊、荒谷 聡子、横田 真穂、中島 利博
2. 発表標題 リウマチ滑膜細胞の新規増殖機構の解明
3. 学会等名 第 6 回 JCRベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京医科大学 医学総合研究所 運動器科学研究部門 http://toshinakajima2014.wixsite.com/tokyomed

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考