

令和元年6月10日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16198

研究課題名(和文) 卵巣を対象としたHTLV1感染動態の解析

研究課題名(英文) Analysis of HTLV1 infection dynamics in the ovaries

研究代表者

平舘 裕希 (Yuki, Hiradate)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号：20649157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：50代女性において男性と比較してHTLV1感染における抗体陽転化率が高いという疫学調査の結果から、閉経との関連性を検証するためマウスおよびHTLV1の近縁ウイルスであるSTLV1に感染したニホンザルをモデルとして卵巣における感染動態を検討した。PCRにより感染した卵巣からはプロウイルスDNAが検出され、感染細胞が含まれていることが明らかとなった。老齢のサルでは免疫染色法により主な感染細胞であるCD3陽性細胞が集簇していることが判明したが、これが感染に伴ったものであるとの結論は得られなかった。またマウスにエストラジオール17β等を投与し感染への影響を検討したが明確な差は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では閉経年齢付近で男性と比較して女性においてHTLV1抗体陽転化率が高いとの疫学調査結果から、動物モデルを用いた卵巣におけるウイルス感染動態の解析を試み、関連性を検討した。卵巣においても感染細胞が存在することを示したことは学術的意義があるが、性ホルモンが感染動態に関与するとの明確な結論には至らなかった。陽転化には免疫等の他の複雑な要因も寄与している可能性もある。

研究成果の概要(英文)：Based on the results of an epidemiological study that the prevalence of seroconversion in HTLV1 infection is higher in women in their 50s than in men, we model Japanese monkeys infected with STLV1, a mouse and HTLV1 related virus, in order to verify the association with menopause. We examined the infection dynamics in the ovaries as Proviral DNA was detected from the infected ovaries by PCR, and it became clear that infected cells were included. In the aged monkeys, immunostaining revealed that CD3 positive cells, which are the main infected cells, were concentrated, but no conclusions were obtained that they were associated with infection. Moreover, the estradiol 17 beta etc. were administered to the mouse and the influence on infection was examined, but a clear difference was not recognized.

研究分野：生殖生物学

キーワード：卵巣 HTLV1 STLV1

1. 研究開始当初の背景

ヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)はATL発症の原因ウイルスであり、わが国は先進国の中でも多くのキャリアを有し、主な感染経路は授乳を介して感染する母子感染と性交渉によって感染する水平感染であることが明らかにされてきた。母子感染に関しては対策が功奏し、キャリア数の減少に貢献したが、一方で水平感染の拡大への対策は急務である。こうした背景の中で近年発表された疫学調査によると、50代女性のキャリアにおいて抗体陽転化率が男性と比較して高いことが明らかにされたことから(Satake et al., 2016)女性特有の原因が推定される。この陽転化率が高い年齢層は卵巣機能の低下によりエストロゲン分泌が低下し、周期的な排卵が停止する年代とも近いことから卵巣ならびに卵巣から分泌される性ホルモンとウイルスの動態との間に関連性があるのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

そこで動物モデルとしてヒト化マウスならびにHTLV1と近縁なレトロウイルスであるSTLV1に感染したニホンザルを使用して解析を行うことで卵巣における感染の有無や、その感染細胞の特性を明らかにし、ヒト女性の抗体陽転化メカニズムの一端を解明することを目的とした。具体的には感染マウスに対する性ホルモン等の投与効果や外科的な卵巣除去による影響、感染したニホンザルの卵巣組織への感染状態を検証することによりHTLV1感染と卵巣、性ホルモンとの関連性について明らかにすることを目的として解析を行った。

3. 研究の方法

マウスは免疫不全マウスであるNOJ(NOD/Scid/Jak3欠損)にヒト臍帯血由来の幹細胞を移植した16週齢のヒト化モデル雌マウスに対して、HTLV1細胞株であるMT2を腹腔投与し感染を誘導させた。その後一定期間の後に卵巣の摘出を行い摘出群と非摘出群の間で細胞100個あたりに存在する感染細胞の比率(PVL)とtaxならびにhbx mRNAの発現量を経時的に測定した。同様に感染させた雄に対しては性ホルモンの影響を解析するため、エストラジオール17を皮下投与し、血中エストラジオール17濃度をELISAで測定し、徐放剤により継続的に高く維持されていることを確認しつつ、1週毎にPVLとmRNA発現量を測定した。さらに卵巣非摘出条件下でエストラジオール17の合成阻害をした条件下での変動を検討するために、アロマトーゼ阻害剤であるレトゾールを感染マウスに3週間連日皮下投与(100ug/50ul)を行い、採血と解析を行った。また主な感染細胞であるリンパ球の卵巣内での局在を明らかにするため、非感染マウスの卵巣組織切片を作製し、免疫染色等を行った。さらに非感染マウスにおいて性周期によるCD3陽性細胞の変動を検討するため各周期の卵巣をサンプリングし、CD3 mRNA発現量を解析した。一方でHTLV1と類似性を有するSTLV1に感染しているニホンザルからは卵巣をはじめ卵管、子宮、膣などの生殖器官をサンプリングし、組織切片の作製、各種抗体による免疫染色の他、核酸の抽出を行い、プロウイルスDNAの検出やmRNA発現解析を試みた。さらに、培養細胞株に対するエストラジオール17またはプロゲステロンの影響を解析するためにそれぞれ10pM~10uMの範囲で上記ホルモンを添加し、24時間の培養を行ったのちに細胞を回収し、核酸の抽出後taxならびにhbx mRNAの発現量を解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト化マウスモデルを用いた解析

ヒト化感染モデルマウスを用いた雌マウスの卵巣摘出効果に関しては、一週間毎に採血、末梢血単核細胞(PBMC)の分離を行い核酸の抽出後PVLとmRNA発現量の測定を行い摘出群と非摘出群との間で比較を行ったが、両群の間に有意な差は認められなかった。また感染雄マウスに対して行ったエストラジオール17の皮下投与についてはタブレット型徐放剤(0.5mg/21日間)の埋没により行ったが、非投与群との間に有意差は認められず、徐放剤用量をさらに増加(1.0mg/21日間)させた条件下であっても有意な差は認められなかった。逆に内在性のエストラジオール17の産生を抑制する目的で投与したレトゾールの存在下でも投与群、並びに非投与群との間で個体間のばらつきが大きく、有意な差を見出すに至らなかった。一方で卵巣を免疫組織染色したところ、主な感染細胞と思われるCD3陽性細胞が分布していたことから、性周期の変動によってCD3陽性細胞が如何に変動するかを検討するため、非感染モデルマウスを用いて各周期の卵巣をサンプリングしCD3 mRNAの発現量解析を行った。その結果hCG投与によりCD3 mRNA発現量は増加し、性周期の変動に伴い卵巣内のCD3陽性細胞が増加することが示唆さ

れ、これはラットにおける報告(Oakley et al., 2010)と一致するものであった。

(2) ニホンザルモデルを用いた解析

Stlv1 キャリアニホンザルを用いた検討では卵巣を解析することにより HTLV1 感染に外挿し得る知見が得られることを期待してサンプリング後各種解析を行った。感染個体の卵巣からは PVL が検出され、子宮や膣などの他の生殖器官からも PVL が検出された。CD3 抗体を使用した免疫染色では CD3 陽性細胞は血管周辺部に認められ集簇が観察された。この細胞集団の中には HTLV1 感染細胞においてマーカーとして使用される Ki67 や CD30 抗体に対して陽性を示すものも観察された。しかしながらこの集簇が感染によるものであるのか、或いは感染に依らず加齢による卵巣の間質化が進行した結果、浸潤が生じやすくなり起こった事象であるのか、本研究期間では明確にはならなかった。しかしながら末梢血から単離した PBMC をフローサイトメトリーにより CD3 抗体で分取すると、CD3⁺細胞集団では CD3⁻細胞集団よりも高い PVL を示した。上記の結果から、組織切片上で示される CD3 陽性細胞の分布はある程度感染細胞の局在と一致していると考えられた。そこでさらに感染細胞の局在を特定するために、ウイルス mRNA を組織切片上で検出するための probe を設計、合成を行った。

(3) 培養細胞株に対するホルモン添加の影響

培養細胞株は SLB1 もしくは MT2 を使用し、エストラジオール 17 もしくはプロゲステロン添加 24 時間後の tax および hbz の mRNA 発現を検討したが、濃度依存的な発現量の変化は認められなかった。

【総括】

動物モデルを用いた解析により、卵巣においても CD3 陽性細胞に一定の割合で含まれると考えられる感染細胞が存在することがわかり、CD3 の免疫染色による発現パターンは組織における感染細胞の局在の一部を示していると考えられた。一方で卵巣中の感染細胞が循環血液中から浸潤したものである可能性も否定できない。また培養細胞に対してホルモンを添加した検討ではウイルスに由来する mRNA 発現に対して影響は見られなかった。すなわち卵巣由来のホルモンが感染細胞の集簇、活性化に関与するとの明確な結論には至らなかった。

< 引用文献 >

- Satake M, et al., Incidence of human t-lymphotropic virus 1 infection in adolescent and adult blood donors in Japan, Lancet infectious disease, vol.16, 2016, 1246-1254.
- Oakley R, et al., Periovarial leukocyte infiltration in the rat ovary, Endocrinology, vol.151, 2010, 4551-4559.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) 平舘 裕希, 水上 拓郎, 関洋平, 村田めぐみ, 鷲崎彩夏, 手塚健太, 鈴木樹理, 兼子明久, 石上暁代, 安永純一郎, 蔵田潔, 松岡雅雄, 明里宏文, 浜口功 「閉経期雌ニホンザルの生殖器官における STLV-1 感染動態の解析」第 160 回日本獣医学会, 2017 年 9 月 15 日, 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)
- (2) 平舘 裕希, 水上 拓郎, 関洋平, 村田めぐみ, 鷲崎彩夏, 手塚健太, 鈴木樹理, 兼子明久, 石上暁代, 安永純一郎, 蔵田潔, 松岡雅雄, 明里宏文, 浜口功 「閉経期雌ニホンザルの生殖器官における STLV-1 感染動態の解析」第 4 回日本 HTLV1 学会, 2017 年 8 月 19 日, 関西医科大学(大阪府・枚方市)

〔その他〕

ホームページ等

<https://researchmap.jp/7000022400>

6. 研究組織

研究分担者なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。