

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007 年度～2008 年度
 課題番号：19592137
 研究課題名（和文）EB ウイルス感染モデルマウスを用いた臓器特異的自己免疫疾患発症機構の解明
 研究課題名（英文）Pathogenesis of Epstein-Barr virus on tissue specific autoimmune disease in humanized mice

研究代表者
 井上 裕子 (INOUE HIROKO)
 鶴見大学・歯学部・講師
 研究者番号 50367306

研究成果の概要：

ヒト化マウスの作出の為に諸条件を決定した。生後 1 日齢のマウスに放射照射し、50%生存率の至適線量を決定した。また、雌マウスでのエストロゲン量は放射線照射による著明な変化は認められなかった。その後、6 週齢で EB ウイルスの感染を試みたが、8 週齢時に採取した単核球への EB ウイルスの感染は認められなかった。一方、MHHV-68 をマウスへ感染させ、そのマウスの卵巣摘出後の唾液腺の炎症の有無を検討したが、卵巣摘出マウスと正常マウスでの唾液腺組織像の変化は認められなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔病理学・EB ウイルス・自己免疫疾患・エストロゲン

1. 研究開始当初の背景

臓器特異的自己免疫疾患であるシェーグレン症候群 (SS) は乾燥性角結膜炎や口腔乾燥症などの外分泌腺特異的に症状を呈する疾患であり、SS を始めとする自己免疫疾患は女性優位の性差が存在

することも周知である。エストロゲン等の性ホルモンは免疫応答や生体の恒常性を変化させ、病態形成に重要な役割を果たしていることが、数々の実験モデルで明らかにされている。加えて SS 発症のエストロゲンなどの女性ホルモンの

関与も示唆されているが、その発症機序については明らかではない。一方、Epstein-Barr (EB)ウイルスは大半の成人に潜伏感染しており、その再活性化はSS、関節リウマチ(RA)や全身性エリテマトーデス(SLE)などの自己免疫疾患、伝染性単核症、慢性疲労症候群などの病態形成に関与していることが報告されている。従来より、SS患者血清中にEBウイルスに関連した抗体価の上昇を認められた報告、EBウイルスに起因する伝染性単核球症からSSに移行した例等多くの報告があり、研究代表者や分担者らはSS患者末梢血中、唾液中および口唇腺組織でのウイルスコピー数の上昇を報告し、EBウイルスのホモログであるIL-10遺伝子導入マウスで本症に類似した病態が形成されること、SS患者由来B細胞株が無刺激下で高率にEBウイルスを産生することや再活性化後期に発現するVirus capsid antigenの発現がみられること、さらにSS患者唾液に含まれるサイトカインによりEBウイルスが再活性化する可能性を報告し、新たに特定したSSの病因抗原がEBウイルスの再活性化に伴うアポトーシスにより発現する機構を明らかにした。

このようにEBウイルスの再活性化により病態が形成される可能性が示唆されているものの、生体内でその再活性化を誘導する機序は不明であった。研究代表者は新規のクロマチン再構築因子をクローニングし、これらの因子がエストロゲン受容体等の核内受容体による標的遺伝子のプロモータ活性をリガンド依存的に強く誘導することを報告した経験を活かし (J. Biol. Chem., 277:41674-41685, 2002)、エストロゲ

ン欠乏を介したEBウイルス再活性化による腺組織破壊機構の解明を行い、in vitroでエストロゲンがEBウイルスの再活性化を抑制する検討を進めている。

2. 研究の目的

本研究ではエストロゲンの生体内におけるEBウイルス再活性化の制御機構を解明するために、ヒト免疫システムを構築したマウスを作出し、卵巣摘出、エストロゲン投与などによるEBウイルスの感染様式の変化を検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒトの免疫システムを保有するヒト化マウスの樹立:

最終的には免疫不全マウスのRA2KOマウスにヒト臍帯血由来CD34陽性細胞を移入することで、ヒト化マウスを作出する。予備的検討として1) 臍帯血由来CD34陽性細胞の分離法の確立を行う。具体的には臍帯血を比重遠心分離法にて単核球層を回収し、その後、Dyna磁気分離法でCD34陽性細胞のみを分離回収する。フローサイトメトリーによりその陽性率を確認する。2) 生後3日齢マウス肝への細胞移入法の確立。ヒトPBMCもしくはGFPマウスのPBMCを3日齢マウス肝へ移植後、末梢血中のヒトリンパ球もしくはGFP陽性細胞の割合をフローサイトメトリーにより確認する。3) sublethalな放射線照射量の検討。3日齢マウスに照射し、半数が死亡するsublethalな放射線の線量を観察し決定する。また、放射線照射による卵巣への影響も併せて観察する。

(2) EBウイルスの調整

EBウイルス陽性B細胞株であるB98-5細胞をTPAの存在下で培養し、その培養上清からEBウイルス液を調整し、臍帯血由来B細胞に感染させてタイターチェックを行う。

(3) 卵巣摘出

エストロゲン欠乏状態を誘導するために雌のマウスについて卵巣を外科的に摘出する。

(4) MHV-68 の調整

比と化マウスの作出が難航した場合に備え、EB ウイルスと良く似た作用を持つマウスヘルペスウイルスの MHV-68 を入手し調整を行う。宿主細胞として BHK21, NIH3T3, STO 細胞を用いる。ウイルスのタイターチェックはメチルセルロースを用いたプラークアッセイにて行う。

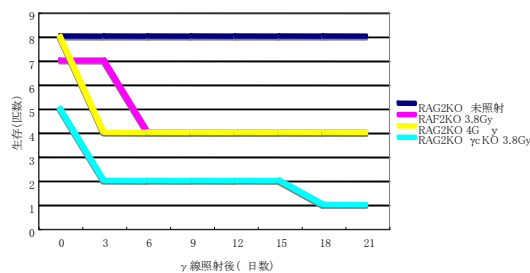
(5) ウイルス、あるいは細菌の構成成分による唾液腺炎発症の可能性の検討

生後 3 日齢で胸腺摘出を施すことにより、SS 様の病態を示す NFS マウスに各種の成分を投与し、SS 様の症状を呈するか否かを検討する。

4. 研究成果

(1) ヒト化マウスの作出

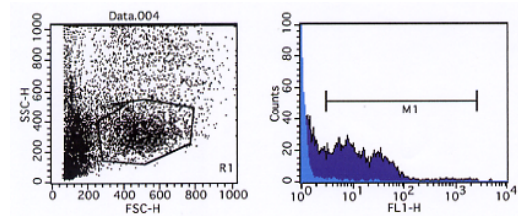
T、B 細胞を欠失する RAG2KO マウスが半数死亡するような放射線量の検討を行った結果、RAG2KO マウスでは 4 Gy 照射時にも 21 日後の生存率は約 50% となったものの、RAG2KOgcKO マウスでは、それよりも少ない 3.8 Gy 照射時に 21 日後の生存率は 10% まで低くなっていた。このことから、この後の検討から、RAG2gcKO マウス仔マウスへの放射線照射量は 2.5Gy で行う事にした。



(2) CD34 陽性細胞の分離、精製

ヒト臍帯血をリンパ球比重分離法を用いて

単核球層を得、引き続き CD34 抗体標識磁気ビーズを用いて CD34 陽性細胞を分離した。マウスへの投与に備えるため、8 ラインの CD34 陽性細胞を準備し、陽性率をリストにまとめた。



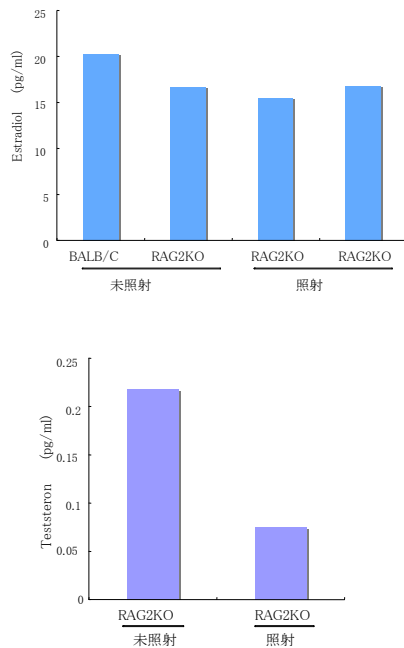
No.	臍帯血量 (mL)	MNL	CD34 ⁺ Cell
1	33	3.76x10 ⁷	1x10 ⁵
2	24	5.04x10 ⁷	1.6x10 ⁵
3	31	7.08x10 ⁷	2x10 ⁵
4	30	14x10 ⁷	1.6x10 ⁶
5	43	16.8x10 ⁷	2.9x10 ⁶
6	38	1.78x10 ⁵	9.5x10 ⁵
7	45	20.3x10 ⁷	1x10 ⁶
8	28	6.54x10 ⁷	7x10 ⁵

(3) 放射線照射により性ホルモンの産生量に変化を認めるか否かについて検討を行った。

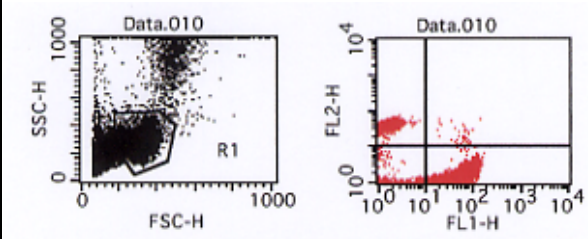
雌雄のマウスについて放射線照射群、非照射群の血中性ホルモン量を ELISA 法を用いて測定を行った。

その結果、雌の血中エストラジオール量は、放射線未照射群においても BALB/C マウスと比べて RAG2KO マウスでは若干低い値が得られたが、RAG2KO マウスに放射線照射後の血中エストラジオール量は未照射 RAG2KO マウス血中エストラジオール量と比べて明らかな変化は認められなかった。これに対し、雄のテストステロン量は RAG2KO マウスの未照射群と照射群を比較すると、放射照射群で著しいテストステロン量の低下が認められた。これらの事から、テストステロン産生能は放射線への感受性が高いが、エストラジオールは放射線照射による影響は殆どなく、今後のエ

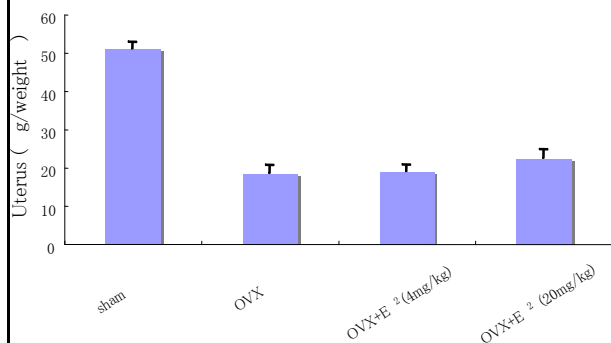
エストロゲンの作用の検討に利用しうる事が示唆された。



(4) 上記の種々の条件設定の後、実際に RAG2^{-/-}gc^{-/-}に CD34 陽性細胞を移入し、約 6 週間後 EB ウイルスを感染させ、さらに 2 週間後の EB ウイルスの感染の有無を PCR 法にて調べたが、感染は認められなかった。このときのヒト由来のリンパ球を CD3, CD19 陽性細胞として検討を行ったところ、それぞれの要請細胞数は 1% 以下となり、移植した CD34 陽性細胞の定着、増殖は確認できなかった。その原因として、実中研から入手した RAG2^{-/-}gc^{-/-}マウスが異なるラインのマウスの可能性を考え、PCR 法にて確認を行ったところ、KO マウスで得られるべきバンドが得られなかったことから、今回使用したマウスが十分な免疫抑制を有していないために、移植されたヒト CD34 細胞が排除されてしまった可能性が考えられた。



(5) 次にマウスの B 細胞への感染が知られているマウス γ ヘルペスウイルスの MHV-68 を BALB/C マウスへ感染させ、その後卵巣摘出することで、エストロゲン欠乏状態を誘導させたマウスでの MHV-68 ウイルスの感染状況の有無、ならびに唾液腺局所の炎症反応を検討した。その結果卵巣摘出、非摘出マウスで MHV-68 ウイルスの再活性化は認められず、また唾液腺局所での炎症像は認められなかった。



(6) 次に計画を若干変更し、菌体、ウイルス成分が SS 様病態形成に関与するか否かについて、予備的検討を行った。生後 3 日齢に胸腺を摘出することで、SS 様の唾液腺炎を認める NFS マウスに各種成分を投与し、胸腺摘出を行う事無く SS 様の唾液腺炎を誘導するか否かについて検討を行った。投与成分として、ZymosanA, Poly(I:C), LPS, Cyclophosphamide, ConA, pristine, PTX 等を用いた。その結果、ウイルス由来の二本鎖 RNA を模倣した poly(I:C) 投与群で唾液腺局所へのリンパ球浸潤を認めた。現在これらの結果の再現性、さらに詳細な病態成立機序について検討を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Mishima K, Inoue H, Obara K, Nishiyama T, Ide F, Yamada H, Watanabe M, Chiba K, Tsubota K, Saito I: Transplantation of side population cells restores the functions of damaged exocrine glands. **Nat. Cell Biol.** (in revision) (査読有り)
- ② Tai, Y., Inoue, H., Sakurai, T., Yamada, H., Morito, M., Ide, F., Mishima, K., Saito, I.: Protective effect of lecithinized SOD on reactive oxygen species-induced xerostomia. *Radiat. Res.* In press. 2009 (査読有り)
- ③ Matsumoto, Y., Dogru, M., Goto, E., Sasaki, Y., Inoue, H., Saito, I., Shimazaki, J., Tsubota, K.: Alterations of the tear film and ocular surface health in chronic smokers. *Eye* 22: 961-968, 2008 (査読有り)
- ④ Rummenie, V. T., Matsumoto, Y., Dogru, M., Wang, Y., Hu, Y., Ward, S. K., Igarashi, A. Wakamatsu, T., Ibrahim, O., Goto, E., Luyten, G., Inoue, H., Saito, I., Shimazaki, J., Tsubota, K: Tear cytokine and ocular surface alterations following brief passive cigarette smoke exposure. *Cytokine* 43: 200-208, 2008 (査読有り)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 井上裕子、山本沙知、小原久美、美島健二、齋藤一郎 シェーグレン症候群におけるダイオキシン類を介したEBウイルス再活性化機構の検討 第17回日本シェーグレン症候群研究会 岐阜グランドホテル、2008、9、19
- ② 井上裕子、山本沙知、小原久美、美島健二、齋藤一郎 Aryl hydrocarbon

receptorの活性化を介したEBウイルス前早期遺伝子BZLF1 プロモーターの転写制御とシェーグレン症候群の病態形成への関与 第31階日本分子生物学会年会・第81回日本生化学大会合同大会、神戸ポートアイランド 2008. 12. 9-12

- ③ 山田浩之、梁洪淵、中川洋一、小原久美、井上裕子、美島健二、齋藤一郎 シェーグレン症候群における酸化ストレスを介した腺組織障害の解析 第16回シェーグレン症候群研究会、京都大学医学部内芝蘭会館、2007. 9.21-22
- ④ H.Yamada, K.Ryo, Y.Nakagawa, K.Obara, H.Inoue, K.Mishiima, I.Saito Possible involvement of oxidative stress in salivary gland of patients with Sjogren's syndrome. 第37回日本免疫学会総会、グランドプリンスホテル新高輪、2007.11.20-22
- ⑤ H.Inoue, S.Yamamoto, H.Yamada, K.Obara, Y.Nakagawa, K.Mishima, I.Saito Role of aryl hydrocarbon receptor (AhR) for Epstein-Barr virus reactivation of pathogenesis in Sjogren's syndrome. (第37回日本免疫学会総会、グランドプリンスホテル新高輪、2007.11.20-22

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 裕子 (INOUE HIROKO)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：50367306

(2) 研究分担者

齋藤 一郎 (SAITO ICHIRO)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：60147634

美島 健二 (MISHIMA KENJI)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：50275343

山田 浩之 (YAMADA HIROYUKI)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：90267542

(3) 連携研究者

なし