

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07577

研究課題名(和文) マウスヘルペスウイルス68初感染マウスに生じる肝炎における腸内細菌の役割の解析

研究課題名(英文) Analysis of the role of intestinal bacteria in hepatitis caused by murine herpesvirus 68 primary infection in mice.

研究代表者

金井 亨輔 (KANAI, Kyosuke)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：20596621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：EBウイルスは初感染した成人に肝炎を伴う伝染性単核球症を起こすがその発症機序はよく分かっていない。我々はこれまでにMHV68感染マウスを用いた解析から腸内細菌産物が肝炎に関与している可能性を示した。本研究において、MHV68肝炎を引き起こす腸内細菌産物の候補としてLyopolysaccharide (LPS) 及びPeptideglycan (PDG) の影響を評価した。LPS受容体TLR4の中和抗体は肝炎を抑制した。一方でPDG受容体TLR2中和抗体は抑制しなかった。さらに、TLR4阻害剤C34は肝炎を抑制した。これらの結果はIM時に生じる肝炎にLPS-TLR4系が関与する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はこれまで未知であったEBV肝炎の発症機構において、腸内細菌由来産物であるLPSによるTLR4を介したシグナル誘導がEBV肝炎の発症に関与している可能性を初めて示した。LPSは主にグラム陰性菌の細胞壁に由来するため、腸内細菌叢におけるグラム陰性菌の寄与が強く示唆され、腸内細菌叢を制御することでEBV肝炎を予防できる可能性が示された。また、TLR4阻害剤C34がMHV68感染マウスに生じる肝炎を抑制したことから、TLR4阻害剤を用いることでEBV肝炎が治療できる可能性を初めて示した。本研究で得られた知見はEBV肝炎の予防法や治療法の開発につながる可能性を示す。

研究成果の概要(英文)：EB virus causes infectious mononucleosis (IM) with hepatitis in primary infected adults, but the mechanism of pathogenesis is not well understood. We have previously shown that intestinal bacterial products may be associated with the hepatitis using MHV68-infected mice. In the present study, we evaluated the impact of lyopolysaccharide (LPS) and peptideglycan (PDG) as candidates of intestinal bacterial products. As the result, Neutralizing antibodies to TLR4, LPS receptor, suppressed hepatitis. However, neutralizing antibodies to TLR2, PDG receptor, did not inhibit. Furthermore, the TLR4 inhibitor C34 suppressed hepatitis. These results suggest that the LPS-TLR4 pathway may be associated with the hepatitis in IM.

研究分野：ウイルス学

キーワード：Epstein-Barr virus Herpesvirus Infectious mononucleosis Murine herpesvirus 68

### 1. 研究開始当初の背景

EBV は世界中の成人の 90%以上が感染しているヒトヘルペスウイルスの一種である。成人が EBV に初感染した場合、発熱・咽頭痛・肝脾腫を三主徴とする伝染性単核球症 (Infectious Mononucleosis: IM) を高頻度に発症する。IM は肝機能障害を伴うが、稀に重篤化する (Drebber et al., J Hepatol. 2006)。また、原因不明で予後不良の EBV 関連疾患である慢性活動性 EBV 感染症の 47%の症例でも肝炎が見られる (Cohen et al., Blood. 2011)。これら EBV 肝炎はウイルス肝炎のうち A・B・C 型肝炎ウイルス肝炎に次いで高頻度にみられる。EBV 肝炎は肝組織への CD8 陽性 T 細胞の集積を示すが、EBV は肝細胞には感染しないことから、EBV 肝炎は免疫応答による副次的影響によると考えられている (Kimura et al., Human pathol. 2001)。しかし、EBV 肝炎の発症機序の詳細及び治療法・予防法は未だ不明である。

EBV は一部の霊長類にしか感染しないことから EBV に対する免疫応答の解析が困難であることから、申請者らは Murine herpesvirus 68 (MHV68)に着目した。MHV68 は EBV と同じヘルペスウイルス亜科に属しマウスを自然宿主とする。MHV68 初感染マウスは気道炎症・肝脾腫を起こし自然治癒することから IM の動物モデルとして用いられている (Barton et al., Annu Rev Immunol. 2011)。申請者らはこれまでに EBV 初感染の動物実験モデル系として MHV68 初感染マウスを解析し、MHV68 初感染マウスが肝炎を発症すること、肝炎発症に腸内細菌が関与する可能性を示した (Kanai et al., J Immunol. 2018)。

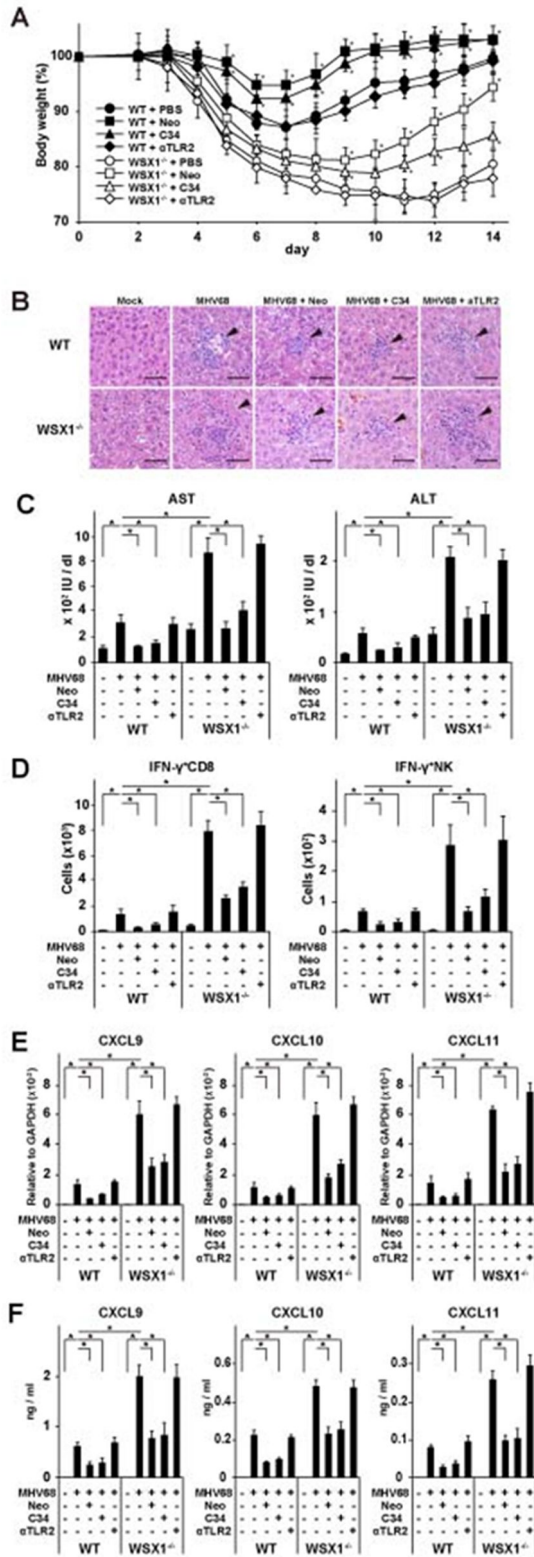
### 2. 研究の目的

本研究はこれまでの我々の研究をさらに発展させ、MHV68 初感染マウスに生じる肝炎のより詳細な解析を行い、肝炎の発症に関与する腸内細菌産物の探索を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

8 週例から 12 週例の成 C57BL/6 マウスを用い、 $1 \times 10^6$  pfu の Murine herpesvirus 68 を経機動的に接種した。抗菌薬を用いた実験では、接種 1 日前から 1mg/ml Neomycin を含む滅菌蒸留水を飲水として用い、実験終了まで自由飲水とした。中和抗体を用いた実験では、一回の投与あたり 100  $\mu$ g の抗 Toll-like receptor- (TLR-) 2 中和抗体 (Clone: QA16A01, Biolegend) または抗 TLR4 中和抗体 (Clone: MTS510, Biolegend) を MHV68 接種後 4 日後から 2 日おきに腹腔内投与した。阻害剤を用いた実験では、PBS に溶解した C34 (Bio-technique) を MHV68 接種後 4 日後から 2 日おきに腹腔内投与した。それぞれの処置を施した MHV68 感染マウスは指定日に炭酸ガスにより安楽殺し、肝臓に生じる炎症を次に示す方法により解析した。MHV68 接種後の体重変化の推移を毎日測定し各群の平均値と標準偏差を算出した。接種後 14 日後の肝臓を取り出し、4%パラホルムアルデヒド溶液 (Fujifilm wako) により固定後、パラフィンブロックから薄切標本を作製し HE 染色を行った。接種後 14 日後の抹消血清中における肝逸脱酵素 (AST/ALT) 量をトランスアミナーゼ CII-テストワコー (Fujifilm Wako) を用いて測定した。接種後 14 日後の肝臓における IFN 産生 CD8 陽性 T 及び NK 細胞数を ICS-FCM により定量した。接種後 7 日後の肝臓における CXCL9, 10, 及び 11 の mRNA 発現量を qPCR による定量した。接種後 7 日後の抹消血清中の CXCL9, 10, 及び 11 量を ELISA により定量した。

#### 4. 研究成果



**Fig. 1**

抗菌薬の飲水, TLR4 阻害剤及び抗 TLR2 中和抗体投与により生じる MHV68 感染マウスに生じる肝炎の変化。(A) MHV68 接種後の体重変化の推移。(B) 接種後 14 日後の肝臓の HE 染色像。(C) 接種後 14 日後の抹消血清における肝逸脱酵素 (AST/ALT) 量。(D) 接種後 14 日後の肝臓における IFN $\gamma$  産生 CD8<sup>陽性</sup> T 及び NK 細胞数の ICS-FCM による定量結果。(E) 接種後 7 日後の肝臓における CXCL9, 10, 及び 11 の mRNA 発現量の qPCR による定量結果。(F) 接種後 7 日後の抹消血清中の CXCL9, 10, 及び 11 の ELISA による定量結果。

これまでの我々の研究で MHV68 感染マウスでは CD8<sup>+</sup>T 細胞の遊走を制御するケモカインである CXCL9, CXCL10, CXCL11 産生が亢進した (Kanai et al, J Immunol. 2018)。これらのケモカインは IFN 及びリポポリサッカライド (LPS) またはペプチドグリカン (PDG) による共刺激により産生が亢進することが示されている (Proost, J Leukoc Biol. 2004)。このことから, 腸内細菌産物の中でも LPS 及び PDG を有力な候補として解析を行った。MHV68 感染マウスに LPS の受容体である TLR4 の阻害剤である C34, または PDG の受容体である TLR2 の中和抗体を腹腔内に接種した。その結果 (Fig.1), 体重の変化 (Fig.1A), 感染後 14 日後の肝組織像 (Fig.1B), 末梢血中の肝逸脱酵素量 (AST, ALT) (Fig.1C), 肝臓組織中への CD8 陽性 T 細胞及び NK 細胞の浸潤 (Fig.1D), CXCL9, CXCL10, CXCL11 の mRNA 産生量 (Fig.1E), 及び抹消血清中における濃度 (Fig.1F) のいずれの項目においても TLR2 中和抗体による変化は見られなかった。一方で C34 投与によって肝炎の症状が抑制されることが示された。この結果は PDG ではなく LPS が MHV68 感染マウスにおける肝炎の発症に関与している可能性を示した。さらに, MHV68 感染マウスに発症する肝炎は TLR4 阻害剤によって抑制される可能性が示された。

本研究はこれまで不明であった EBV 肝炎の発症機構において, 腸内細菌由来産物である LPS が関与している可能性を初めて示した。さらに, LPS の受容体である TLR4 の阻害剤 C34 を用いることで EBV 肝炎が治療できる可能性を初めて示した。現在これらの成果をまとめた論文を作成し投稿準備中である。LPS は主にグラム陰性菌の細胞壁に由来するため, 腸内細菌叢におけるグラム陰性菌の寄与が強く示唆される。今後腸内細菌叢のグラム陰性菌に着目した研究を行っていく予定である。本研究で得られた知見は EBV 肝炎の治療法の開発につながる可能性を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金井 亨輔, 景山 誠二
2. 発表標題 マウス ヘルペスウイルス初感染マウス肝炎を引き起こす腸内細菌産物の解析
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金井 亨輔, 景山誠二
2. 発表標題 マウス ヘルペスウイルス初感染マウス肝炎の発症に関わる腸内細菌由来産物の解析
3. 学会等名 第35回中国四国ウイルス研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金井亨輔、景山誠二
2. 発表標題 EBウイルス肝炎のモデルとしてのマウス ヘルペスウイルス初感染マウスに生じる肝炎の発症における腸内細菌産物の関与の解析
3. 学会等名 第34回中国四国ウイルス研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鳥取大学医学部 > 研究情報 > この人に注目！ > 金井亨輔先生  
<https://www.med.tottori-u.ac.jp/researchers/pickup/29774.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------