

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：32425

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11750

研究課題名(和文) ヘルペスウイルスを介した慢性疲労の発症機構の解明とその制御因子の検索

研究課題名(英文) Elucidation of the onset mechanism of chronic fatigue mediated by herpes virus and search for its regulator

研究代表者

井上 裕子 (Inoue, Hiroko)

日本薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50367306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Epstein-Barrウイルス(EBウイルス)再活性化の指標となる、BZLF-1遺伝子の転写活性化を指標にその遺伝子改変マウスについて検討を行った結果、加齢と共にいくつかの組織ではEBウイルスは再活性化を誘導されやすいことを確認した。さらに、著しく活性が高かった脳では、何らかの液性因子がEBウイルスを再活性化させる事が推測され、このことがEBウイルス感染者における慢性疲労、多発性硬化症の発症に関与している可能性が示唆された。また、レスベラトロールは*in vitro*でEBウイルスの再活性化を抑制する事から、レスベラトロールがEB再活性化に関わる様々な疾患の予防的に作用する可能性を見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Epstein-Barrウイルス(EBウイルス)は何らかの原因で再活性化されると多発性硬化症を初めとする自己免疫疾患、慢性疲労症候群の発症と関連がある。今回の研究結果より、加齢とともにEBウイルスは再活性化されやすくなり、特に脳における活性が高く、またレスベラトロールよりその活性を抑制することが明らかとなった。EBウイルス関連の慢性疲労症候群がレスベラトロールなどの食因子で制御できることは、健康増進の意味から有意義な研究成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：As a result of investigating the genetically modified mice using the transcriptional activation of the BZLF-1 gene, which is an index of Epstein-Barr virus (EB virus) reactivation, the EB virus reactivates in some tissues with aging. It was confirmed that activation was easily induced. Furthermore, in the highly active brain, it is speculated that some humoral factor reactivates the EB virus, which may be involved in the development of chronic fatigue and multiple sclerosis in EB virus-infected individuals. In addition, since resveratrol suppresses the reactivation of EB virus *in vitro*, we found that resveratrol may act prophylactically on various diseases related to EB reactivation.

研究分野：抗加齢医学

キーワード：Epstein-Barr virus fatigue レスベラトロール

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ストレスには「精神的なストレス」「身体的ストレス」「物理的ストレス」「化学的ストレス」「生物的ストレス」などがある。その中でも、「生物的ストレス」は発熱、咽頭痛、リンパ節の腫れなどの風邪の様な症状の急な発症が認められること、集団発生の報告があるなどから、感染症の関与が考えられている。その代表的なウイルスとして Epstein-Barr ウイルス (EB ウイルス)、エンテロウイルス、単純ヘルペスウイルス、帯状疱疹ヘルペス、インフルエンザウイルスなどがある。慢性疲労症候群に関わるとされているウイルスの中でも、EB ウイルスに関する報告は多数ある。(Lerner AM et.al 2004, Lerner AM et.al 2012, Kawai K et.al 1992, Sairenji T et.al 1995) 慢性疲労症候群の発症にはストレスを介した免疫機能低下によりウイルスの再活性化が誘導されることが推測されているが、ストレスにより直接ウイルスの再活性化が誘導される可能性については不明である。また、これらウイルスの再活性化が慢性疲労症候群の病態にどの様に関わっているかについても不明な点が残っている。

2. 研究の目的

本研究ではストレスそのものが、ウイルスの再活性化を誘導する可能性について、EB ウイルスの再活性化に必須である BZLF1 遺伝子のプロモーター領域にルシフェラーゼ遺伝子を連結させたプラスミドを組み込んだ遺伝子改変マウスを用いて検討する。また、慢性疲労の患者血清中に EB ウイルスをはじめとしたヘルペスウイルスの抗体価が上昇していることから、その病態とウイルスの関係が推測されているが、その病態形成機序にどの様に関わっているかは不明の点が多く残されている。本研究では EB ウイルスの再活性化が加齢、ストレスにより増強されるのか、また、それらに対し食物因子が制御出来るが否かを検討し、慢性疲労の治療、予防につながる可能性を探索する。

3. 研究の方法

(1) EB ウイルス再活性化評価モデルマウス (Zp マウス) を用いた検討

EB ウイルスは主にヒト B 細胞に感染するヘルペスウイルスである。感染細胞には種特異性があることから、EB ウイルス感染モデルマウスの代わりに EB ウイルス再活性化の検索を目的としたモデルマウスを使用する。EB ウイルスの再活性化に必須である BZLF1 遺伝子のプロモーター領域にルシフェラーゼ遺伝子を連結させたプラスミドを組み込んだ遺伝子改変マウスを用いて検討する。これらのモデルマウスを用いて、加齢、種々のストレスによる EB ウイルス再活性化が誘導されているか否かについて、各臓器を摘出後、組織溶解液を用いてルシフェラーゼ活性を測定し、検討を行った。マウスは 17L、47L の 2 系統のマウスが作出できた。これらのマウスへの導入遺伝子の確認はマウス組織から DNA を抽出後、PCR 法にて行った。

① 水浸拘束短時間ストレス負荷

17L 4 匹、47L 4 匹 雄・雌のコントロール(CTL)群 1 匹、ストレス(STR)群 1 匹ずつを使用した。CTL 群は通常飼育後無処理で、STR 群は通常飼育後穴を空けた 50 mL チューブ内に顔以外を水没させ 3 時間拘束した。

② 水浸拘束長時間ストレス負荷

17L 10 匹 雄・雌のコントロール(CTL)群 2 匹、ストレス(STR)群 3 匹ずつを使用した。

CTL 群は通常飼育後 1 日 6 時間絶食・断水 5 日間継続を行い、STR 群は通常飼育後穴を空けた 50 mL チューブ内に 1 日 6 時間拘束を 5 日間継続で拘束した。

③ 運動負荷ストレス

マウス用ドラム式トレッドミルでホイール内歩行を 8m/min の速さで 1 時間/日を 10 日間行った。コントロールでは、特に運動負荷を与えていない。

④ EB ウイルス再活性化細胞の確認

臓器抽出液において高い活性を認めた脳、唾液腺組織について抗ルシフェラーゼ抗体を用いて免疫染色を行った。パラフィン包埋された組織より切り出した 17L と 47L のマウスそれぞれについてヘマトキシジン・エオジン染色 (HE 染色) と間接免疫染色を比較することで再活性化誘導分布の確認を行った。

(2) ヒト唾液腺由来上皮細胞 (HSY) を用いた、EB ウイルス再活性化を制御する因子の探索 HSY 細胞に pZP-Luc を遺伝子導入しその活性を指標に検討を行った。また、レポータープラスミドは長さの違う pZp221-Luc 又は pZp552-Luc を用い、Estrogen receptor (ER) も同時に遺伝子導入した。再活性化誘導は、100 ng/mL TPA 及び 3 mM n-butyrate になるように添加し、10 μ M Resveratrol、100 μ M Resveratrol、10 μ M Daidzein、10 μ M Genistein を添加をのルシフェラーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

1) 各系統マウスに Zp が遺伝子導入されているかの各位人

PCR 法

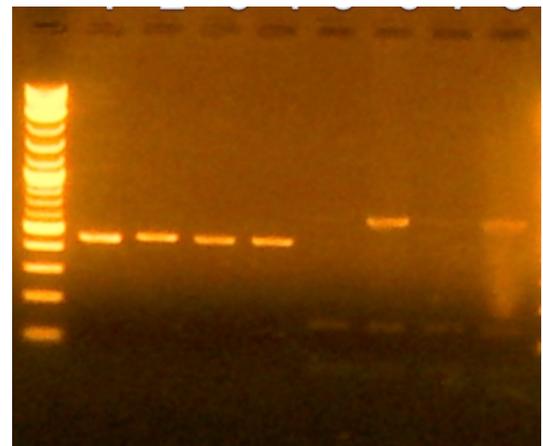
各系統マウスに遺伝子導入されているかの

系統を行うために、組織から DNA を抽出

後、 β -actin および luciferase のプライマー

を用いて PCR 法にて確認を行った。

その結果 17L、47L 両系統のマウスでルシフェラーゼ遺伝子の導入が確認された。



脳	精巢	脳	精巢	脳	精巢	脳	精巢
47L		17L		47L		17L	
Luciferase				β -actin			

1) 加齢に伴う Zp 活性の変化

17L, 47L 両系統のマウスについて、20、26、30

週齢時に各臓器を摘出後、その蛋白抽出液について検討を行った。その結果 47L マウスでは脳と

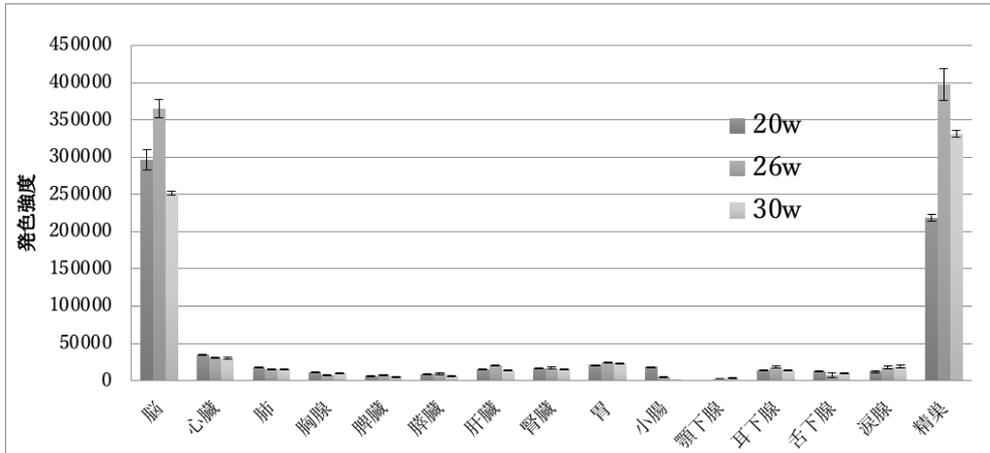
精巢が最も高い活性を認め、脳については 26 週で、精巢については 26 週、30 週で活性増強を

認めた。スコアとしては低いものの、顎下腺、耳下腺、涙腺で 26 週齢以降で活性増強を認めた。

また、17LL は 47L と同様に脳と精巢で高い活性を認め、30 週齢で最も高い活性が認められた。

しかしながらそのほかの臓器においてはほとんど活性がみられなかった。以後、検討は 47L を用いて行う事とした。

47L マウスの週齢別によるルシフェラーゼ活性

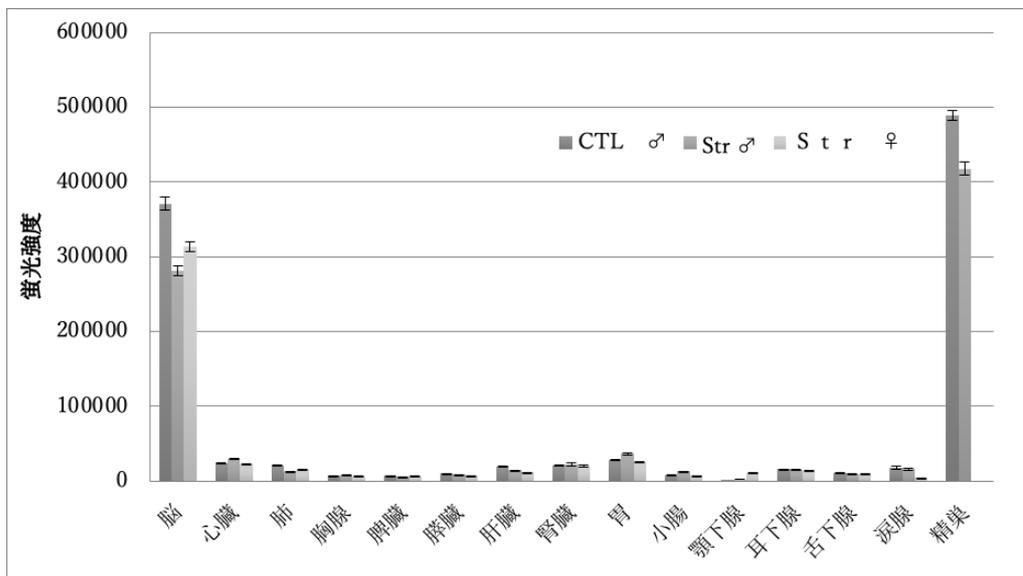


2) 運動負荷時の Zp 活性の変化

47L マウスにトレッドミルによる運動負荷を行った後に Zp 活性を測定した。

その結果、顎下腺、胃や小腸などの消化器系の組織で増加傾向を認めたものの、ほとんどの組織において、運動負荷をかけたマウスの方が活性は低くなった。これは、運動負荷時にトレッドミルで走らせ続けることが難しく、疲れるとすぐにトレッドミルから外れてしまったため、運動負荷がストレスにまでは至らなかった可能性も考えられた。

運動負荷マウスのルシフェラーゼ活性比較



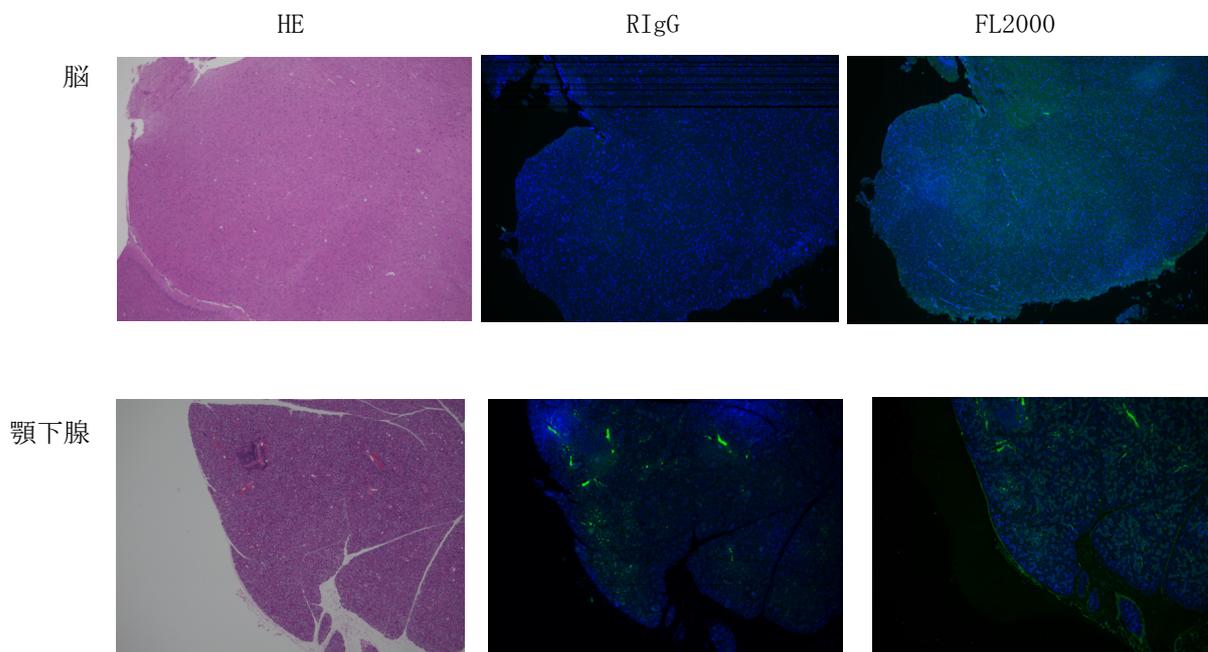
3) 水浸拘束ストレスによる Zp 活性の変化

短時間拘束、長時間拘束について拘束後のマウス個体から各臓器を摘出し、Zp 活性を測定比較した。その結果拘束時間に関わらず、多くの臓器で活性低下傾向を認めた。雌の 1 個体で拘束後に小腸で増加傾向を認めたが、個体差が大きい参考値程度と考える。

4) 脳、顎下腺における Zp 活性分布の確認

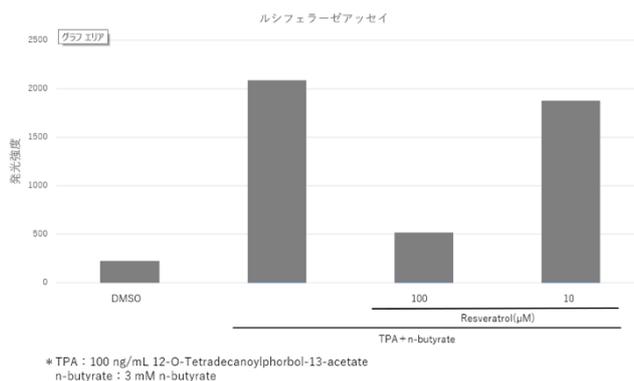
各臓器由来の蛋白抽出液で脳に顕著な Zp 活性が認められたため、Zp の活性化は臓器により異なる可能性が考えられた。そのため、どの細胞が Zp 活性化を誘導しやすいのかを検討するため

に、パラフィン切片を抗ルシフェラーゼ抗体を用いて免疫組織学的検討を加えた。その結果、脳では細胞内でのルシフェラーゼの発現は明らかではなく、脳全体に染色像が認められたことから、脳内の何らかの因子が Zp を活性化している可能性が示唆された。一方、顎下腺では腺房細胞にルシフェラーゼの発現が認められたことから、顎下腺においては腺房細胞に EB ウイルスが感染すると再活性化を誘導しやすい可能性が考えられた。



5) 培養細胞を用いた Zp 活性制御因子の探索

唾液腺上皮細胞 HSY に p Zp-Luc を遺伝子導入し、TPA および n-butyl により活性を誘導したものに、レスベラトロール、イソフラボンのダイゼイン、ゲネステインを加え、それぞれの活性を測定した。その結果、レスベラトロール 100 μ g/mL で有意な活性低下を認めたが、ダイゼイン、ゲネステインでは変化は認められなかった。



以上のことから、加齢と共にいくつかの組織では EB ウイルスは再活性化を誘導されやすく、それはストレスではあまり変化を認めなかった。さらに、著しく活性が高かった脳では、何らかの液性因子が EB ウイルスを再活性させる事が推測され、このことが EB ウイルス感染者における慢性疲労、多発性硬化症の発症に関与している可能性が示された。また、ポリフェノールのレスベラトロールは in vitro で EB ウイルスの再活性化を抑制する事から、レスベラトロールが EB 再活性化に関わる様々な疾患の予防的に作用する可能性を見いだした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsumoto Naoyuki, Omagari Daisuke, Ushikoshi-Nakayama Ryoko, Yamazaki Tomoe, Inoue Hiroko, Saito Ichiro	4. 巻 88
2. 論文標題 Hyperglycemia Induces Generation of Reactive Oxygen Species and Accelerates Apoptotic Cell Death in Salivary Gland Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathobiology	6. 最初と最後の頁 234 ~ 241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000512639	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 該当する

1. 著者名 Yoshino Yoko, Imamura Takahiro, Yamachika Shigeo, Ohshima Tomoko, Ushikoshi-Nakayama Ryoko, Inoue Hiroko, Saito Ichiro, Nakagawa Yoichi	4. 巻 157
2. 論文標題 Endoplasmic reticulum stress affects mouse salivary protein secretion induced by chronic administration of an α -1-adrenergic agonist	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 443 ~ 457
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00418-021-02047-z	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 該当する

1. 著者名 Yamazaki Tomoe, Ushikoshi-Nakayama Ryoko, Shakya Supriya, Omagari Daisuke, Matsumoto Naoyuki, Nukuzuma Chiyoko, Komatsu Tomoko, Lee Masaichi Chang-il, Inoue Hiroko, Saito Ichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 The effects of bathing in neutral bicarbonate ion water	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-01285-4	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	松本 直行 (Matsumoto Naoyuki) (20386080)	鶴見大学・歯学部・准教授 (32710)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	岡田 直子 (Okada Naoko) (50636165)	日本薬科大学・薬学部・講師 (32425)	
研究分担者	中山 亮子 (Nakayama Ryoko) (50749843)	鶴見大学・歯学部・助教 (32710)	
研究分担者	斎藤 一郎 (Saito Ichiro) (60147634)	鶴見大学・歯学部・教授 (32710)	
研究分担者	山崎 智恵 (Yamazaki Chie) (80817122)	鶴見大学・歯学部・学部助手 (32710)	

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