

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17362

研究課題名（和文）蚊刺過敏症に対するEBV由来miRNAの寄与とその分子機構の解明

研究課題名（英文）Contribution of the miRNAs derived from EBV for mosquito bite hypersensitivity

研究代表者

宮竹 佑治（Miyatake, Yuji）

東海大学・医学部・特任助教

研究者番号：30868881

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：EBウイルス感染が関与する蚊刺過敏症とEBウイルスに特有の小分子RNAであるBART遺伝子群との関係を解明するため、BART遺伝子を全身性に発現するマウスを作出したところ、激しい皮膚掻痒と血中IgE濃度の上昇が見られた。次にCre-loxPシステムによりBART遺伝子を血液系細胞特異的に発現するマウスを作出したが、著しい反応は観察できなかった。また蚊唾液腺抽出物の単回投与では激しい反応は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EBウイルス由来因子の中でも小分子RNA群のBARTが免疫反応やアレルギー様症状に対して一定の役割を担っていることを示した本研究は、発症機序が未知であるEBウイルス関連疾患の理解を深めるものである。また、本研究で作出されたBARTを組織特異的に発現するマウスは今後のEBウイルス関連疾患の分子機序を解明するうえで非常に重要なものである。

研究成果の概要（英文）：To reveal the relation between RNA region BART which is unique in EB virus and mosquito bite hypersensitivity, we generated the mouse systemically expressing BART and found out the mouse showed severe skin itching and elevated blood IgE density. Next, though we generated blood lineage specific BART expressing mouse by Cre-loxP system, the mouse did not show conspicuous phenotypes. Also a single injection of mosquito salivary extracts did not cause intense immune reactions to these BART expressing mice.

研究分野：細胞生物学

キーワード：蚊刺過敏症 BART EBV

1. 研究開始当初の背景

(1) EBV は大部分のヒトに潜伏感染しているウイルスであり、腫瘍形成や自己免疫疾患など多様な病態を引き起こすことで注目を集めている。EBV は関与する疾患において特徴的なアレルギー反応(蚊刺過敏症や種痘様水疱症、伝染性単核球症における薬疹など)を誘発することがあり、治療の幅を狭める、罹患者の生活の質を落とすなどの問題を生じさせる。その中でも、EBV が感染した NK 細胞や T 細胞が原因とされる蚊刺過敏症は EBV 感染 NK 細胞の増殖を伴うことが知られており、致死率の高い難病である慢性活動性 EB ウイルス感染症やアグレッシブ NK 細胞白血病などの NK 細胞腫瘍に進展する事例が多く報告されている[Tokura et al., 2001, J Am Acad Dermatol.]. しかし、その発症機序やほぼ全てのヒトに EBV が潜伏感染しているにも関わらず、蚊刺過敏症のような反応がごく一部のヒトにのみ見られる原因は未知のままである。

(2) EBV が産生する因子については古くから発現タンパク質や RNA に関する解析が行われており、エンペロープや不死化因子の他にアポトーシス阻害への関与も報告されている[Caldwell et al., 1998, Immunity]. また近年の研究により、EBV がコードする miRNA が EBV 感染細胞腫瘍などにおいて大量発現することが判明しており [Kawano et al., 2013 J infect Dis.], サイトカイン産生や自然免疫応答を抑制する配列や[Wang et al., 2018 Int J Biol Sci.], 間接的にアレルギー応答を制御する配列も発見されている[Cai et al., 2015 Oncogene][Cai et al., 2015 Nat Commun.]. しかし依然として EBV 由来因子、特に miRNA には未解明の部分が多く、発症機構が未知である EBV 関連疾患において重要な役割を果たしていることが予想される。

2. 研究の目的

上記の背景から本計画では「蚊刺過敏症に対する EBV 由来 miRNA の寄与とその分子機構の解明」を目的とした研究を行った。本研究は、ほとんどの潜伏感染例においてアレルギー反応が見られない EBV に由来する因子から、発症自体が稀である蚊刺過敏症の原因を探索するという点で独自性がある。また、蚊刺過敏症の機序の解明は深い関連が示唆されている各種 NK 細胞腫瘍や他の EBV 関連アレルギー疾患の発症機序解明にも寄与する進展性の高い研究である。さらに EBV がほぼ全てのヒトにおいて潜伏感染していることや、EBV 感染が卵アレルギーを促進しているという報告[Yang et al. 2013 Virol J]を考慮すると、EBV との関連が示されていない疾患を含めた様々なアレルギー症状の解明に貢献する可能性を秘めた非常に創造性に富んだ研究である。

3. 研究の方法

(1) EB ウイルス由来マイクロ RNA である BART 配列を発現する組み換えマウスの作成および解析を行うことにより、蚊刺過敏症のようなアレルギー反応に対する EB ウイルス由来マイクロ RNA の作用を発見した。

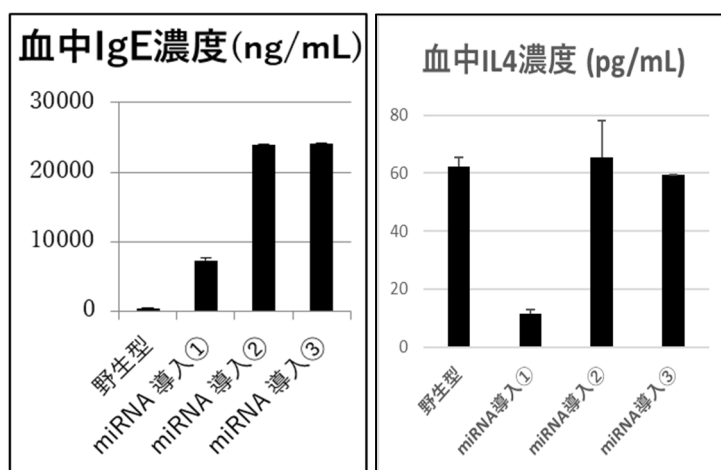
(2) 蚊刺過敏症における主な EBV 感染細胞の一種である NK 細胞の細胞株 NK92 に対して EB ウイルス由来マイクロ RNA である BART の過剰発現を行い、各種サイトカインの発現量の変化を測定した。

(3) 組織特異的に EB ウイルス由来マイクロ RNA である BART 配列を発現する組み換えマウスの作成を行い、血液系細胞に特異的に BART 配列を発現するマウスが激しいアレルギー様症状を呈するか解析した。

(4) これらのマウスに対して蚊唾液腺抽出物を皮内投与した際に激しい免疫反応を呈するか解析した。

4. 研究成果

(1) EB ウイルス由来マイクロ RNA を発現するマウスを作成したところ、若齢時点では特に発現型を示さなかったが、SPF 環境下で一年ほど飼育すると皮膚が剥がれるほど顕著な皮膚搔痒を呈することが明らかとなった。このマウスの血清を解析したところ、EBV 関連アレルギー疾患と同様に血中 IgE 濃度が著しく上昇していた。しかし、B 細胞からの IgE 放出を促進する IL4 の血中濃度は上昇しておらず、非典型的な経路によ



りアレルギー様症状が活性化されていることが示唆された。

(2) 次に EB ウイルス由来マイクロ RNA が血球細胞、特に蚊刺過敏症における EB ウイルスの感染細胞である NK 細胞において発現した場合にどのようなサイトカインの発現変化を促すのかを解析したところ、IL4, IL5, IFN γ の発現量の変化は見られなかったが、IL33 には上昇傾向が見られ、IL13 は有意に発現が上昇していた。

(3) NK 細胞における過剰発現の結果から、EB ウイルス由来マイクロ RNA が血球細胞系において発現することが重要であると考えられたため、EB ウイルス由来マイクロ RNA を組織特異的に発現できるように Cre-loxp システムを用いた BART 配列発現マウスを作出した。始めに、このマウスと CAG-Cre マウスを用いて全身性に BART を発現するマウスがそれまでの全身発現性マウスと同様の発現型を示すか解析しようとしたところ、BART と CAG-Cre を両方持つマウスは誕生しなかった。このことから、EB ウイルス由来マイクロ RNA である BART 領域は発生時の発現の強さによっては胎生致死となってしまう可能性が示唆された。次に、Vav1-Cre マウスとの交配により血液系細胞特異的に BART を発現するマウスを作成したところ、このマウスは誕生して正常に成体になったが、これまで用いてきた BART 全身発現性のマウスのように激しい症状は見られなかった。この結果から、掻痒反応やアレルギー様反応を示す原因に表皮系組織における反応機構が大きな割合を占める可能性が示唆される。

(4) ヒトスジシマカから唾液腺の抽出を行い、その抽出物を全身発現性マウスおよび血液系細胞特異的 BART 発現マウスに対して皮内投与した際に過剰な免疫反応が生じるかを調べたところ、若年期における単回投与においては、どちらのマウスにおいても野生型のマウスと比べて極端な掻痒反応などを示すことはなかった。その結果や、全身発現性マウスが激しい皮膚掻痒を呈するのに一年ほどの期間を要すること、アレルギー等の免疫反応機構などを考えると、外来抗原に暴露する頻度なども重要な素因となる可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|