

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 15日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21592347

研究課題名(和文) TLRを介したEBウイルスによる唾液腺障害機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of EBV induced salivary gland disorder via TLR

研究代表者

井上裕子 (INOUE HIROKO)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：50367306

研究成果の概要(和文)：EBウイルスによる唾液腺障害の検討を行う目的で、唾液腺上皮細胞株のHSY細胞にCD21発現ベクターを遺伝子導入し、この細胞とEBウイルス陽性B細胞株のAkataを共培養したのち、EBウイルス感染唾液腺上皮細胞株の樹立を試みた。また、TLR3、TLR8、TLR9の発現ベクターを作出し、ウイルス核酸によるBAFFの転写活性化を検討する目的でBAFFプロモータープラスミドを構築し、HSY細胞に遺伝子導入した。EBウイルス感染B細胞株の核抽出液をマウスへ投与し自己免疫応答が誘導できるか否かを評価するため自己抗原(SSB/La)に対する抗体価測定の系を立ち上げた。

研究成果の概要(英文)：The salivary gland epithelial cells, HSY cells, were transfected with CD21-HA plasmid. EBV positive-B cell line, Akata, was cocultured with CD21-HSY cells for establishment of EBV positive salivary gland epithelial cells. The expression plasmids, TLR3, TLR8, and TLR9-HA, were prepared. To study of BAFF transcription, BAFF promoter region was flanked with luciferase coding region, BAFF-Luc. BALB/c mice were immunized with nuclear extract from Akata, and will be evaluated with ELISA for SSB/La, which was established with recombinant SSB/La-GST protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：EBウイルス・シェーグレン症候群・TLR

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、その発症にはEpstein-Barr (EB)ウイルスの再活

性化が関与している事が推測されている。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のみならず、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 (*J. Exp. Med.*, **169:2191-2198**, 1989)、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 (*J. Immunol.*, **162: 2488-2494**, 1999)、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Virus capsid antigenの発現がみられること、さらにSS患者唾液中のサイトカインによりEBウイルスが再活性化する可能性 (*Immunology*, **111:223-229**, 2004)を報告し、新たに特定したSSの病因抗原 (*Science*, **276:604-607**, 1997) 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 (*J. Immunol.*, **166:5801-5809**, 2001)。また、最近ではSS患者唾液中にダイオキシン受容体活性化因子およびEBウイルス再活性化因子が存在し、それらは正の相関を認める事を見いだした。

一方、Toll-like receptor (TLR)は細菌やウイルスを認識し、自然免疫担当細胞の活性化の主要な部分を担っている。脂質・蛋白質は細胞表面に発現されているTLR2、TLR4、TLR5により認識されるが、ウイルスや自己の核酸はエンドソーム内に発現するTLR3、TLR7、TLR8、TLR9に認識される。TLR7、TLR9によるIFN産生誘導の主役はPDC(形質細胞様樹状細胞)という細胞のサブセットであるとされてきたが、最近では上皮細胞もTLRを介した免疫応答を司っていることが報告されている。核酸成分TLRリガンドはIFN- α 、IFN- β の双方を誘導でき、MHC分子の発現増強や、樹状細胞の成熟を誘導することで、Th1を活性化する。また、SS患者由来の唾液腺上皮細胞にもTLR1,2,-3,-7の発現が認められ、その結果局所でのICAM-1、CD40、MHC

クラスI、さらには自己免疫疾患の発症に強く関与することが示唆されるBAFF(B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family)の発現の増強が報告されている (*Eur.J.Immunol.*, 2008)。

BAFFはB細胞上の受容体との結合により未熟B細胞の生存と分化、成熟B細胞の増殖、自己反応性B細胞の生存を制御する。BAFF過剰発現マウスでは全身性エリテマトーデスやSSに類似した症状を呈する。また、SSの患者血清中の高濃度のBAFFが報告されていることから、BAFFは末梢性B細胞の分化・生存に影響し、BAFF/BAFF受容体の異常が末梢性トレランスの破綻を来し、SS発症に関与していることが推測されている。

2. 研究の目的

本研究ではTLRを介したEBウイルス由来核酸による細胞応答の詳細を検討し、SSの病態発生機構の解明を目的とする。さらに、SSを始め多くの自己免疫疾患の発症に女性優位の性差が認められ、研究代表者がエストロゲン受容体の転写活性化に関わる新規クロマチン再構築因子の機能解析を報告してきた経験を活かし (*J. Biol. Chem.*, **277:41674-41685**, 2002)、これらの細胞応答に関わるエストロゲンの作用解析も併せて行う。

3. 研究の方法

<細胞>ヒト唾液腺上皮細胞株(HSY)およびEBウイルス陽性B細胞株のAkata細胞を用いる。コントロールとして用いるEBウイルス陰性Akata細胞は当教室で既に樹立済みである。

<EBウイルス感染HSY細胞の樹立>HSY細胞はEBウイルス陰性なのでEBウイルス感染細胞を樹立する。EBウイルスの受容体であるCD21を発現させたHSY細胞を樹立したのち、このCD21陽性HSY細胞にB95-8細胞由来のEBウイルス液を添加培養後、EBウイルス感染HSY細胞を得る。また、EBウイルス陽性Akata

細胞と共培養し、CD21 陽性 HSY 細胞への EB ウイルスの感染を試みる。

＜プラスミドの構築＞BAFFの転写活性を確認するためのレポーターコンストラクトを作成する。BAFFのプロモーター領域をPCRで増幅し、Tベクターに組み込む。Tベクターに組み込んだBAFFのプロモーター領域をルシフェラーゼに連結させるためにpGEMベクター (Promega) に組み込んでレポータープラスミドとする。また、各TLRの作用を確認するために、TLR3、TLR8、およびTLR9の発現プラスミドを構築する。TLRのcDNAはヒト唾液腺上皮細胞株であるHSY細胞からRNAを抽出後、cDNAを合成し、これを鋳型としてRT-PCR法を用いて増幅し、Tベクターに移入後、発現ベクターであるpCI-neo (Promega) に組換え、FlagもしくはHAタグを連結させる。

EBウイルス由来のshRNAであるEBERの発現プラスミドはRNAポリメラーゼIII依存性のU6プロモーターを持つプラスミドにEBERをコードする遺伝子を導入して作出する。

＜アデノウイルスベクターの構築＞

既に作成済みのpCI-neo-CD21プラスミドからCD21のcDNAを切り出し、コスミドベクターのpAxCAwtitベクターに組み換えた。このコスミドベクターを293細胞に遺伝子導入し、ウイルスベクターのAd-CD21ベクターを得た。

＜EBウイルス刺激＞最近の報告で、感染を伴わないEBウイルスによる刺激による樹状細胞からのサイトカイン産生が認められることから、UV照射により不活性化したEBウイルスによるEB陰性Akata細胞およびEBウイルスに感染していないHSY細胞の活性化の有無を検討する。

＜プロモーターアッセイ＞

BAFFのレポータープラスミドであるBAFF-LucをLipofectamin reagentを用いて細胞に遺伝子導入する。この遺伝子導入した細胞に各種刺激を施し、48時間培養後細胞溶解液を得る。細胞内で発現したルシフェラーゼの活性をルシフェリンを基質として蛍光強度計を用いて定量する。

＜TLRリガンド刺激＞

EBウイルス由来のsnRNAであるEBERあるいは、ウイルス由来非メチル化二本差CpGによりTLRを介した刺激応答が誘導されるか否かを確認するためにHSY細胞およびAkata細胞にTRL8あるいはTLR9を強制発現させ、それぞれのリガンドで刺激をし、細胞応答を確認する。

＜SSB/LaのELISA＞

EBERと細胞核内抗原のSSB/La蛋白は結合能を持つことが知られているので自己抗体である抗SSB/La抗体の発現を検討するためにSSB/LaのELISAを行う。

＜マウスへの免疫＞

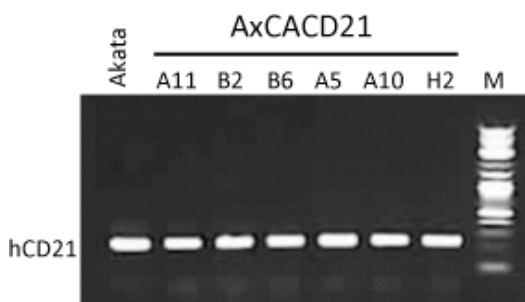
EBウイルス由来核酸が免疫応答を誘導出来るか否かについて、BALB/CあるいはC57BL/6マウスを用いて検討を行う。EBウイルス陽性、および陰性Akata細胞をIgGで架橋することでEBウイルスの複製を誘導し、その核抽出液を、マウスに投与しその後の免疫応答を確認する。

4. 研究成果

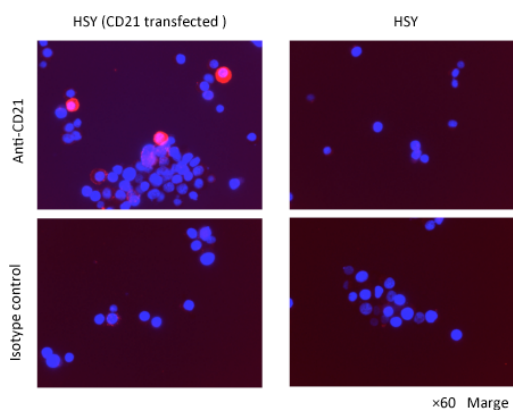
＜EBウイルス感染唾液腺上皮細胞株の樹立＞

CD21発現HSY細胞を用いて、EBウイルス感染唾液腺上皮細胞株の作成を試みた。樹立したCD21発現HSY細胞を、抗IgG抗体で刺激して溶解感染状態を誘導したAkata細胞を共培養し、5日間培養した後、浮遊しているAkata細胞を洗浄、除去した。その後、HSY細胞を一部回収し、DNAを抽出後、LMP1を認識するプライマーを用いてPCR法にて確認した。その結果、HSY細胞内のEBウイルスは殆ど認められなかった。このCD21-HAのプラスミドの発現をウェスタンブロッティング法で確認したところCD21の発現量も少なかった事から、CD21発現HSY細胞について、抗HA抗体で染色後、FACSを用いてHA陽性細胞をソーティング、回収後培養してCD21高発現細胞株の樹立を試みた。細胞を十分増殖させたのち、再度FACSにてCD21陽性細胞を確認したが、殆ど陽性細胞を認めることは出来なかった。CD21発現について様々な条件下でその蛋白発

現を試みたが、十分な発現が得られなかったため、遺伝子導入方法をアデノウイルスベクターを用いた方法に切り替えた。pCIneo-CD21からCD21のcDNAを切り出し、pAxCawtitベクターに組み込んだ。現在293細胞に遺伝子導入し、アデノウイルスを作製し、PCR法にて確認を行った(Ad-CD21)(下図)。



このAd-CD21ベクターを唾液腺上皮細胞株のHSY細胞に感染させ、EBウイルスの受容体として作用するCD21分子をHSY細胞膜上に発現させ、免疫染色法、ウェスタンブロット法を用いて確認を行った。CD21発現HSY細胞にEBウイルスを感染させるために、EBウイルス陽性B細胞株のAkata細胞と共培養を行った。

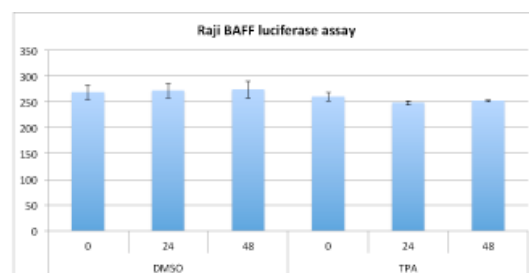


一方、B95-8 や P3HR1 細胞など、他の EB ウイルス感染 B 細胞の培養上清を回収し、超遠心により EB ウイルス液を濃縮し、これらについても HSY 細胞へ感染するか否かを検討している。ウイルス遺伝子の定量は EB ウイルスの構造遺伝子である BALF5 について、TaqMan プローブを作成して、real time PCR 法で行った。スタンダードには BALF5 を PCR で増幅した後、ゲル精製を行い、分子量からコピー数を割り出して計算した。

その結果、B95-8 ウイルスは 3.7×10^5 コピー/ μl 、P3HR1 は 12×10^6 コピー/ μl と高い濃度のウイルス溶液を作成する事ができた。EB ウイルス陽性の唾液腺上皮細胞株が得られれば、唾液腺局所でのウイルス複製に重要な役割を担っている唾液腺上皮細胞での EB ウイルスの感染形態を変化させる因子の解析に有効であると考えられるため、引き続き EB ウイルス感染唾液腺上皮細胞の樹立を試みる。

<BAFF プロモータープラスミドの作出>

TLR を介した EB ウイルス核酸のシグナルによる BAFF の発現増強を検出するため、ウイルス RNA の受容体である TLR3、ウイルス DNA の受容体である TLR7 および TLR9 について発現ベクターの作製を行っている。さらに BAFF の遺伝子発現をモニター出来るような、BAFF プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込み、BAFF-Luc プラスミドを得、Raji 細胞に遺伝子導入後、その活性を確認した。その結果、TPA 刺激下では有意な BAFF の転写活性化は認められなかった。今後、TLR を強発現させたのち、種々のウイルス由来核酸で刺激後、BAFF の転写活性化について検討を重ねる。



<TLR 発現ベクターの構築>

EB ウイルス由来の DNA あるいは RNA が自然免疫系を活性化し、シェーグレン症候群などの自己免疫疾患の病態形成に直接関与しているか否かを検討する目的で、ウイルス由来核酸の受容体として働く TLR3, TLR8, TLR9 のクローニングを行った。TLR3 および TLR8 に関しては、cDNA を PCR で増幅するのが困難だったため、バンクから購入し、発現ベクターの pCIneo に組み込み直した。TLR9はその cDNA 領域を PCR

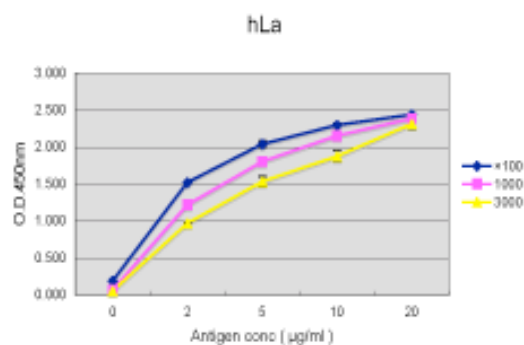
で増幅し、T ベクターに組み込み塩基配列の確認を行ったところ数カ所のエラーが見つかり、組換えにより完全ベクターの作出を行った。

<マウスへの免疫実験>

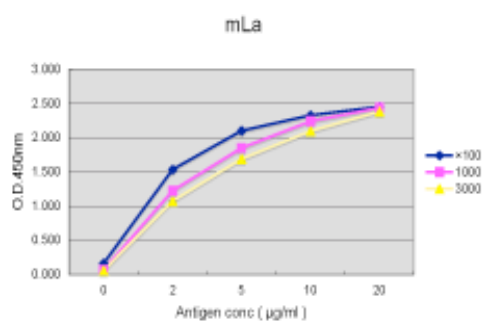
EB ウイルス由来の核酸と細胞内のタンパク質による複合体が自己免疫応答を惹起する可能性について検討する目的で、EB ウイルス陽性 Akata 細胞の核抽出液を BALB/c マウスへ腹腔内投与し検討を行っている。免疫前後で唾液分泌量を測定し、唾液腺機能障害の有無を確認する。EB ウイルスが発現する小 RNA の EBER は核内蛋白の SSB/La と複合体を形成する事が知られており、シェーグレン症候群などの自己免疫疾患ではこの SSB/La に対する自己抗体の出現が認められていることから、SSB/La 抗体について検討を行う予定である。

<ELISA 法の確立>

抗 SSB/La 抗体の有無を確認するために、ELISA 法を立ち上げた。SSB/La を大腸菌内で発現させ、これを ELISA プレートに固相化した。市販の抗ヒト SSB/La 抗体を用いて固相化蛋白



等、至適条件を検討した。



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 5 件)

1. Inoue, H., S. Giannakopoulos, C. N. Parkhurst, T. Matsumura, E. A. Kono, T. Furukawa, and N. Tanese. 2011. Target genes of the largest human SWI/SNF complex subunit control cell growth. *Biochem J* 434:83-92.
2. Yamada, T., K. Ryo, Y. Tai, Y. Tamaki, H. Inoue, K. Mishima, K. Tsubota, and I. Saito. 2010. Evaluation of therapeutic effects of astaxanthin on impairments in salivary secretion. *J Clin Biochem Nutr* 47:130-137.
3. Miyamoto, S., L. Cooper, K. Watanabe, S. Yamamoto, H. Inoue, K. Mishima, and I. Saito. 2010. Role of Retinoic Acid-Related Orphan Receptor- α in Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells along with Osteoblastic Lineage. *Pathobiology* 77:28-37.
4. Tsubota, K., T. Nishiyama, K. Mishima, H. Inoue, T. Doi, Y. Hattori, T. Kodama, A. Higuchi, Y. Hayashi, and I. Saito. 2009. The role of fractalkine as accelerating factor on the autoimmune exocrinopathy in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:4753-4760. .
5. Tai, Y., H. Inoue, T. Sakurai, H. Yamada, M. Morito, F. Ide, K. Mishima, and I. Saito. 2009. Protective Effect of Lecithinized SOD on Reactive Oxygen Species-Induced Xerostomia. *Radiat Res* 172:331-338.

[学会発表] (計 11 件)

1. 美島健二、檜枝洋記、伊藤正孝、吉田哲、

- 川北哲也、井上裕子、坪田一男、斎藤一郎 マウス胎児唾液腺由来フィーダー細胞の樹立 第10回再生医療学会、京王プラザホテル、2011.3.1-3.2
2. 山村優花、美島健二、山田浩之、井上裕子、濱田良樹、斎藤一郎 マウス歯髄細胞の血管への分化誘導の検討 第10回再生医療学会、京王プラザホテル、2011.3.1-3.2
3. 美島健二、井上裕子、天野雄介、井出文雄、斎藤一郎 マウス胎児唾液腺由来フィーダー細胞の樹立 第100回日本病理学会総会、パシフィコ横浜、2011.4.28-30
4. 美島健二、鎌谷宇明、山田浩之、井出文雄、井上裕子、斎藤一郎 side population細胞が発現するクラステリンの分泌細胞機能回復の検討 第99回日本病理学会総会、京王プラザホテル 2010.4.27-29
5. 井上裕子、鎌谷宇明、山田浩之、美島健二、斎藤一郎 ダイオキシシンによる Epstein-Barr ウイルス再活性化とシェーグレン症候群への関与 第99回日本病理学会総会、京王プラザホテル 2010.4.27-29
6. 美島健二、井上裕子、住本秀敏、河上裕、坪田一男、斎藤一郎 クラステリンを用いた唾液分泌障害抑制の検討 第19回日本シェーグレン症候群学会、ホテルオークラ東京ベイ、2010.9.9-9.10
7. 井上裕子、中山亮子、天野雄介、美島健二、斎藤一郎 ダイオキシシンによる Epstein-Barr ウイルス再活性化を介したシェーグレン症候群病態形成への関与 第19回日本シェーグレン症候群学会、ホテルオークラ東京ベイ、2010.9.9-9.10
8. 天野雄介、徳永淳二、井上裕子、美島健二、斎藤一郎 レスベラトロールによる NOD マウス唾液分泌障害の制御 第19回日本シェーグレン症候群学会、ホテルオークラ東京ベイ、2010.9.9-9.10
9. 井上裕子、山本沙知、梁洪淵、美島健二、斎藤一郎 シェーグレン症候群におけるダイオキシシン類を介した EB ウイルス再活性化機構の検討 第9回日本抗加齢医学会、ホテル日航東京 2009.5.28-29
10. 田井良憲、井上裕子、梁洪淵、森戸光彦、美島健二、斎藤一郎 活性酸素種を介した唾液腺分泌障害機序の解析とSODによる効果の検討 第9回日本抗加齢医学会、ホテル日航東京 2009.5.28-29
11. 美島健二、井上裕子、坪田一男、斎藤一郎 クラステリン蛋白における酸化ストレス障害抑制機能の検討 第9回日本抗加齢医学会、ホテル日航東京 2009.5.28-29
6. 研究組織
- (1)研究代表者
井上裕子 (INOUE HIROKO)
鶴見大学・歯学部・准教授
研究者番号：50367306
- (2)研究分担者
斎藤一郎 (SAITO ICHIRO)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：60147634
- 美島健二 (MISHIMA KENJI)
昭和大学・歯学部・教授
研究者番号：50275343
- 梁洪淵 (RYO KOFUCHI)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号：10298268
- (3)連携研究者
なし