

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：17501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06512

研究課題名(和文) TRAF6シグナルが制御する樹状細胞のデングウイルス感染に対する防御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the protective mechanism of dendritic cells regulated by TRAF6 signaling against Dengue virus infection

研究代表者

神山 長慶 (Kamiyama, Naganori)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：50756830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：TRAF6によって分化・機能が制御される樹状細胞サブセットのアルボウイルス感染時における役割を樹状細胞特異的にTRAF6を欠損する遺伝子改変マウスを用いて解析した。樹状細胞特異的TRAF6欠損マウスはチクングニアウイルス、ジカウイルス感染時に野生型マウスより高いウイルス血症を認めた。TRAF6欠損樹状細胞では野生型樹状細胞に比べてIFN- γ の発現が低下しており、これがアルボウイルス感染に高感受性である原因の1つだと考えられた。一方、TRAF6に結合し、Toll様受容体、RIG-I様受容体のシグナルを抑制するFLN29が欠損したマウスはウイルス抵抗性が亢進することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Using dendritic cell-specific TRAF6-deficient mice, we analyzed the role of dendritic cell subsets whose differentiation and function are controlled by TRAF6 signaling during arbovirus infection. The mutant mice showed higher viremia during Chikungunya and Zika virus infection. TRAF6-deficient dendritic cells produced lower amount of IFN- γ , which may be one of causes of high susceptibility to arboviruses. Reversely, mice lacking FLN29, which binds to TRAF6 and inhibits TRAF6 signals from Toll-like receptor and RIG-I like receptor, were resistant to arbovirus infection compare to wild type mice. These findings demonstrate the important role of TRAF6 signaling in dendritic cells during arbovirus infection.

研究分野：免疫学、ウイルス学

キーワード：TRAF6 樹状細胞 FLN29 チクングニアウイルス ジカウイルス IFN-

1. 研究開始当初の背景

2014年、デングウイルスの国内再興感染症が話題となったが、デングウイルスやチクングニアウイルス等の蚊が媒介するアルボウイルスは、ほ乳類では樹状細胞に感染することが知られている。我々は、ほ乳類ではシグナル伝達分子 TRAF6 が、NF- κ B や MAPキナーゼ経路の活性化を通じて樹状細胞の機能や分化を制御していることを明らかにしてきた(*Immunity* 2003)。即ち、樹状細胞における TRAF6 の欠損は、Toll 様受容体のシグナルを障害し、樹状細胞の機能低下を招くだけでなく、特定の樹状細胞サブセットの分化にも影響を及ぼすことを見出した。マウスの脾臓に存在する樹状細胞は CD4 陽性、CD8 陽性、CD4・CD8 両陰性の 3 サブセットに分類することができるが、全身性 TRAF6 欠損マウスでは、CD4 陽性のサブセットがほとんど消失する (*Immunity* 2003)。しかし、全身性 TRAF6 欠損マウスは T 細胞の自然活性化による全身性の炎症により、生後 2~3 週間で死亡するため、感染免疫における各樹状細胞の生理的機能は未だ不明である。そこで、CD11c-Cre マウスと TRAF6^{fllox/fllox} マウスを交配し、樹状細胞特異的に TRAF6 を欠損させたマウスを作製したところ、脾臓における CD4 陽性樹状細胞サブセットは野生型マウスに比べて有意に減少するが、個体は長期生存可能であることが明らかになった (図 1)。

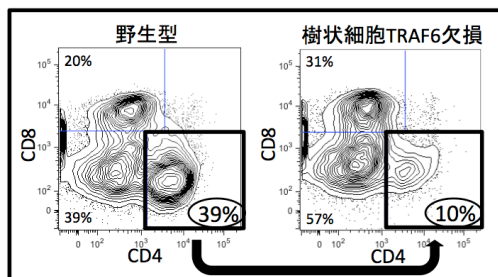


図1.脾臓における樹状細胞サブセットの割合
野生型マウスに比べて樹状細胞特異的TRAF6欠損マウスではCD4陽性樹状細胞サブセットが減少している。

一方、我々はミエロイド系細胞を LPS と IFN で刺激したときに誘導される遺伝子を網羅的に探索し、TRAF6 に結合することで Toll 様受容体、RIG-I 様受容体のシグナルを負に制御する遺伝子 FLN29 を同定し(*J Bio Chem.* 2005)、そのノックアウトマウスを作製した(*J Bio Chem.* 2014)。

2. 研究の目的

本研究は、蚊が媒介するアルボウイルスに感染した際の生体反応において、シグナル伝達

分子 TRAF6 によって分化・機能が制御される樹状細胞サブセットの役割を樹状細胞特異的に TRAF6 を欠損する遺伝子改変マウスを用いて生体レベルで明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

(1) 樹状細胞特異的 TRAF6 欠損マウスにチクングニアウイルスおよびジカウイルスの感染実験を行い、TRAF6 によって制御される樹状細胞の役割を明らかにする。樹状細胞特異的 TRAF6 欠損マウスにチクングニアウイルスおよびジカウイルスを皮下投与にて感染させる。経目的に血清を回収し、ウイルス力価の解析を行った。

(2) FLN29 欠損マウスにチクングニアウイルスの感染実験を行い、アルボウイルス感染に対する TRAF6 シグナルの役割を明らかにする。FLN29 欠損マウスにチクングニアウイルスを皮下投与にて感染させ、ウイルス血症の有無を解析した。

(3) チクングニアウイルス感染時における TRAF6 欠損樹状細胞の Type I インターフェロン誘導能を明らかにする。樹状細胞特異的 TRAF6 欠損マウスの骨髄細胞より樹状細胞を分化誘導させ、チクングニアウイルスを感染させる。感染時における IFN- β の発現レベルを real-time PCR 法にて解析した。

4. 研究成果

(1) 樹状細胞特異的 TRAF6 欠損マウスへチクングニアウイルスを皮下投与により感染させた。感染 3 日後に回収した血清中のウイルスゲノムを RT-PCR 法にて解析したところ、野生型マウスに比べて樹状細胞特異的 TRAF6 欠損マウスでは、血中のウイルスゲノムがより多くの個体で検出され、ウイルス排除能が低いことが明らかになった (図 2)。

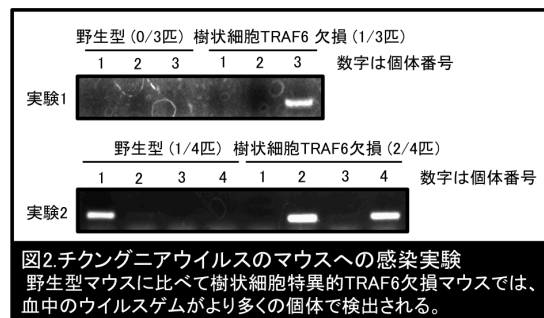
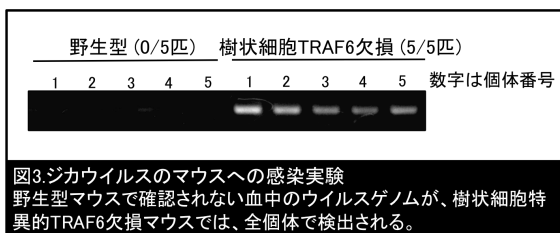


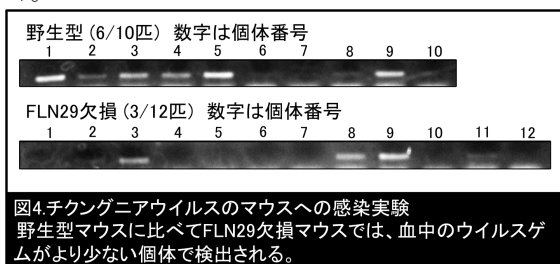
図2.チクングニアウイルスの Maus への感染実験
野生型マウスに比べて樹状細胞特異的TRAF6欠損マウスでは、血中のウイルスゲノムがより多くの個体で検出される。

また、同様の実験を、ジカウイルスを用いて実施したところ、野生型マウスではウイルス血症が全く確認されなかったのに対し、樹状細胞特異的 TRAF6 欠損マウスでは、全個体

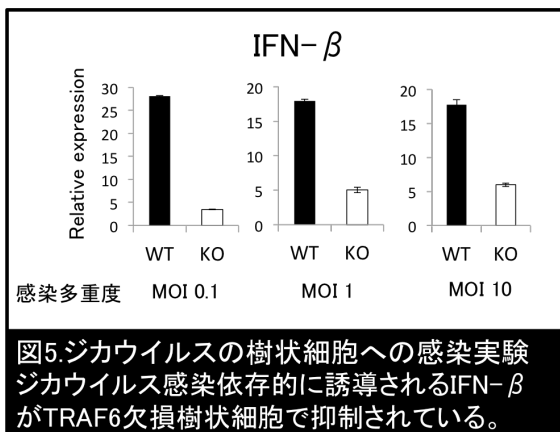
にてウイルス血症が確認された(図3)。



(2)一方、FLN29 欠損マウスにチクングニアウイルスを感染させたところ、FLN29 欠損マウスは野生型マウスに比べてウイルス排除能が高いことが明らかになった(図4)。



(3)次に、樹状細胞特異的 TRAF6 欠損マウスが野生型マウスに比べてアルボウイルスの排除能が低くなる原因調べるため、マウスの骨髄細胞より樹状細胞を分化誘導し、感染力価を3段階に振ってチクングニアウイルスを感染させた。感染3日後に real-time PCR 法を用いてウイルス排除に重要な役割を果たすことが知られる IFN- β の発現を解析した。3通りの感染力価群のいずれにおいても、TRAF6 欠損樹状細胞では野生型に比べて IFN- β の誘導が低いことが明らかになった(図5)。また、サンプル中のウイルスゲノム量は TRAF6 欠損樹状細胞で高くなっていった。



以上の結果より、樹状細胞特異的 TRAF6 欠損マウスはアルボウイルス感染時に樹状細胞からの Type I インターフェロンの産生が障害されているため、ウイルス排除能が低下していることが示唆された。

今後は、TRAF6 によって分化や機能を制御されており、Type I インターフェロンの産生に大きく関わる樹状細胞のサブセットを

同定する予定である。

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 2件)

1. Ryu Okumura, Tkashi Kurakawa, Takashi Nakano, Hisako Kayama, Makoto Kinoshita, Daisuke Motooka, Kazuyoshi Gotoh, Taishi Kimura, Naganori Kamiyama, Takashi Kusu, Yoshiyasu Ueda, Hong Wu, Hideki Iijima, Soumik Barman, Hideki Osawa, Hiroshi Matsuno, Junichi Nishimura, Yusuke Ohba, Shota Nakamura, Tetsuya Iida, Masahiro Yamamoto, Eiji Umemoto, Koichi Sano & Kiyoshi Takeda. (2016) Lypd8 promotes the segregation of flagellated microbiota and colonic epithelia. *Nature*. 7;532(7597):117-21. doi: 10.1038/nature17406. (査読有)
2. Raweewan Srisawat, Thipruethai Phanichat, Narumon Komalamisra, Naoki Tamori, Lucky Runtuwene, Kaori Noguchi, Kyoko Hayashida, Shinya Hidano, Naganori Kamiyama, Ikuo Takashima, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurae, Narihiro Narita, Takashi Kobayashi, Yuki Eshita. (2016) Susceptibility of Aedes Flavopictus Miyarai and Aedes galloisi mosquito species in Japan to dengue type 2 virus. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine J.* 6(5):446-450. (査読有)

[学会発表] (計 5件)

1. Naganori Kamiyama, Investigation of the susceptibility of mosquitoes and mice to Zika virus (ZIKV) and evaluation of drug efficacy for ZIKV infection、第10回寄生虫感染免疫研究会、2017.2.9-10. 徳島大学 藤井節郎記念医科学センター藤井節郎記念ホール、徳島県徳島市
2. Naganori Kamiyama, TRAF6 enhances migration of Th17 cells to the CNS by regulating the expression of chemokine receptor CCR6. 第45回 日本免疫学会総会、2016.12.7.ラグナガーデンホテル、沖縄県宜野湾市

3. 神山長慶、脳脊髄炎の病態を制御する、Th17細胞の TRAF6 シグナルの役割、第7回 癌・炎症と抗酸化研究会 2016.11.26. ホテル別府パストラル、大分県別府市
4. 神山長慶、TRAF6によるTh17細胞遊走能の新規制御機構が多発性硬化症の病態を規定する、第81回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2016.5.13 長崎大学(坂本キャンパス)良順会館・ボンペ会館、長崎県長崎市
5. 神山長慶、The role of NOD-like receptors and TRAF6 that control the pathogenesis of multiple sclerosis. 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会合同大会 2015.12.1-4. 神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市

[図書] (計 2件)

1. 神山長慶、小林隆志 他、科学評論社、臨床免疫・アレルギー科、蚊媒介性ウイルス感染症、2017 予定
2. 江下優樹、神山長慶 他、医学書院、生体の科学、迫り来る蚊媒介性感染症、2015.352-355.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称：ジカウイルス感染症治療用医薬組成物
発明者：小林隆志、神山長慶、相馬颯介、飛弾野真也
権利者：同上
種類：特許、特願
番号：2016-211655
出願年月日：2016年10月28日
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神山 長慶 (KAMIYAMA, Naganori)
大分大学・医学部・助教
研究者番号：50756830

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()