

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 25 年 6 月 25 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300140

研究課題名（和文） ウイルス因子による自己免疫疾患発症モデルの開発

研究課題名（英文） Development of autoimmune mouse model by viral factors

研究代表者

八神 健一（YAGAMI KENICHI）

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：40166476

研究成果の概要（和文）：

本研究では、パルボウイルス非構造タンパク（NS）が T リンパ球に DNA メチル化を誘導し、アポトーシス抵抗性や細胞増殖性等の形質変化を起こすことを明らかにし、in vivo において NS の発現によりコラーゲン誘導性関節炎の発症率への影響を検討した。NS を発現させたマウス T リンパ球は大半の細胞がアポトーシスにより死滅したが、生存細胞では DNA メチル化の亢進により Bmp^{er} の発現が抑制され、ウイルス再感染抵抗性を獲得することが明らかとなった。また、NS 発現ベクターを接種した DBA/1 マウスにコラーゲン関節炎を誘導したが、その発症率は対照群との間に有意な差は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, it was elucidated that parvoviral nonstructure (NS) protein induced DNA methylation in T lymphocytes and caused change of apoptosis resistancy and cell proliferation. Moreover, a possible effect of NS for incidence of collagen-induced arthritis was examined in vivo. The most of mouse T lymphocytes infected with NS-EGFP expression vector caused apoptosis, and the survived cells suppressed Bmp^{er} expression by DNA methylation. These cells acquired to be resistant for parvoviral re-infection. DBA/1 mice infected with NS-EGFP expression vector developed collagen-induced arthritis, though there was no significant difference on incidence of them to that of the control.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2011 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2012 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：パルボウイルス、NS、Bmp^{er}、DNA メチル化、コラーゲン関節炎、マウス

1. 研究開始当初の背景

アデノウイルスやレトロウイルス等のウイルス感染において、様々なウイルス因子が

発癌を誘導することが知られている。一方、発癌抑制というユニークな特性を持つのがパルボウイルスである。パルボウイルスは

ずか約 5Kb の 1 本鎖 DNA をゲノムとする最少ウイルスで、各種動物種に固有のバルボウイルスが存在する。多くは不顕性感染し、まれに胎児死亡、先天奇形、造血障害等を起こす他、関節リウマチ（ヒトバルボウイルス B19）や自己免疫性糖尿病（げっ歯類バルボウイルス）等の自己免疫疾患との関連も疑われている。本ウイルスの非構造タンパク NS はバルボウイルス間で相同性が極めて高く、宿主細胞に転写因子として作用するほか、CBP や SP1 等の核内因子と複合体を形成し宿主細胞の遺伝子発現を調節するとともに、過剰な発現では細胞にアポトーシスを誘導する (Ohshima T, *Int. J. Mol. Med.*, 2001)。申請者は、新規に分離したバルボウイルス (RPV) が、ラット T リンパ腫細胞 (C58NT/D) に感染し、感染した C58NT/D の一部が形質を変化させ耐過細胞 (C58NT/DR) となること、耐過細胞は親細胞に比較し造腫瘍性の低下、接着性の亢進、細胞増殖性の低下、アポトーシス感受性の低下、ウイルス再感染に対する抵抗性の獲得などの形質変化を示し、この変化はウイルスゲノムをもたない子孫細胞にも受け継がれることを明らかにした (Ueno Y, *J. Virol.*, 2001)。

さらに、C58NT/R で発現が亢進する遺伝子として、CNTFR など数種の既知遺伝子、新規遺伝子を同定し、NS が宿主ゲノムの脱メチル化やヒストンのアセチル化を介して CNTFR の発現を修飾していることを明らかにした (Iseki H, *J. Virol.*, 2005)。このことはウイルス感染によるエピジェネティック修飾が様々な細胞機能の異常の原因となり得ることを示唆している。

一連の研究の過程で、自己免疫疾患との関連が疑われる本ウイルス感染により T リンパ球がアポトーシスを起こし一過性のリンパ球減少を来すこと、ウイルスが排除された後も一部の T リンパ球がアポトーシス抵抗性を獲得することから、次の仮説が考えられる。①バルボウイルス感染により自己反応性 T 細胞の活性化を抑制する制御性 T 細胞集団が細胞死を起こし排除される、あるいは、②感染耐過した自己反応性の T 細胞が排除されることなく生残することにより自己免疫疾患を発症する。

そこで、バルボウイルス感染、特に NS の発現によるリンパ球の DNA メチル化と形質変化のメカニズムを詳細に検討し、NS の自己免疫病発症への関与を明らかにすることを着想した。

2. 研究の目的

バルボウイルス感染、特にバルボウイルス NS タンパクの発現によるリンパ系細胞の DNA メチル化状況とアポトーシス抵抗性等

の表現型の変化の関連を明らかにし、NS の発現による自己免疫病の発症モデルマウスの開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) バルボウイルス感染細胞の DNA メチル化状況と表現型の検討

バルボウイルス感染耐過 T リンパ細胞株 (C58NT/DR) での Bmper 遺伝子制御領域の DNA メチル化状況を Bisulfite 法で解析し、アポトーシス抵抗性を MTS assay および FACS 解析により、感染抵抗性を PRV-UT 感染および PCR 解析等で検討した。また、Bmper-shRNA 発現レンチウイルスベクターにより Bmper の発現をノックダウンし同様に細胞の性状を比較検討した。

(2) バルボウイルス NS-EGFP 発現レンチウイルスベクターの作製

NS を目的の細胞に確実に導入するため、レンチウイルスベクターを用い、NS およびレポーター遺伝子である EGFP を発現させるためのベクターを作製した。その基本構造は図 1 のとおりである。

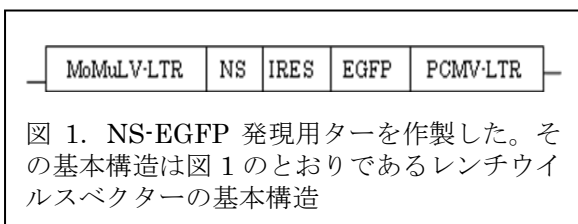


図 1. NS-EGFP 発現用ターを作製した。その基本構造は図 1 のとおりであるレンチウイルスベクターの基本構造

(3) NS 発現によるマウス T リンパ球サブセットの検討

DBA/1 マウス胸腺に NS-EGFP 発現ベクター (100 μ l) を接種し、2 週間後に胸腺を摘出し、胸腺細胞の T 細胞レセプター (TCR) レパトアアッセイを行った。

(4) NS 発現によるコラーゲン誘導性関節炎発症の検討

DBA/1 マウス (各群 10 匹) の胸腺に NS-EGFP 発現ベクターあるいは対照ベクターを接種し、1 週間後にウシ 2 型コラーゲンを Freund's Complete Adjuvant (FCA) と混合し尾根部皮下に 100 μ l (200 μ g コラーゲン/マウス) ずつ接種した。コラーゲン接種後 8 週間にわたり、四肢関節の腫脹および発赤を観察し、2 型コラーゲン抗体価および抗核抗体価を ELISA により測定した。

4. 研究成果

(1) バルボウイルス感染細胞の DNA メチル化状況と表現型の検討

バルボウイルス (RPV-UT) 感染 T リンパ

腫細胞株 C58(NT)D/R と未感染細胞株 C58(NT)D について、これまでの研究で明らかになっていた Bmper 発現状況の違いが同遺伝子制御領域の DNA メチル化に起因することを明らかにするため、両細胞株由来 DNA の Bisulfite 解析を行った。その結果、C58(NT)D/R で同領域の DNA メチル化が亢進し (図 2A)、さらに C58(NT)D メチル化阻害剤 (5-azacytidine) 処理により Bmper 発現が回復した (図 2B)。また、C58(NT)D/R では、C58(NT)D に比較して、アポトーシス抵抗性、RPV 感染性の亢進が認められた。

さらに、Bmper のノックダウンにより RPV 感染性は回復した (図 3) が、アポトーシス抵抗性に変化は認められなかった。このことからパルボウイルス感染により感染細胞の Bmper 遺伝子制御領域がメチル化されることにより Bmper の発現が抑制され、このことはウイルス感染性に強く関連するが、アポトーシス抵抗性への関連は薄いことが明らかとなった。Bmper がパルボウイルス感染性に関与することは知られておらず、Bmper 下流の Smad 経路を介したウイルス複製の阻害を示すデータも得られており、論文として発表準備中である。

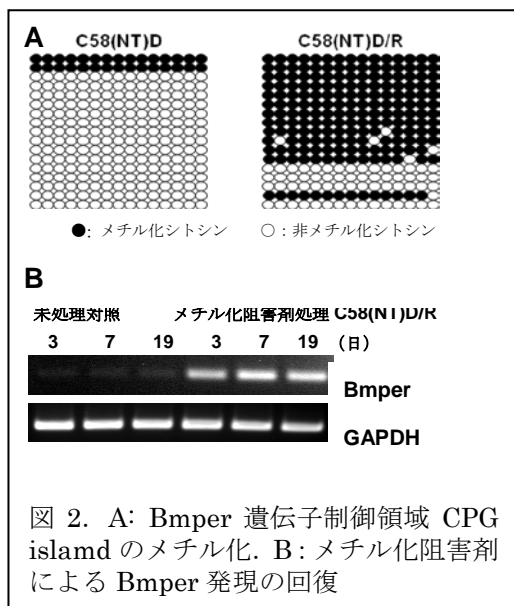


図 2. A: Bmper 遺伝子制御領域 CPG island のメチル化。B: メチル化阻害剤による Bmper 発現の回復

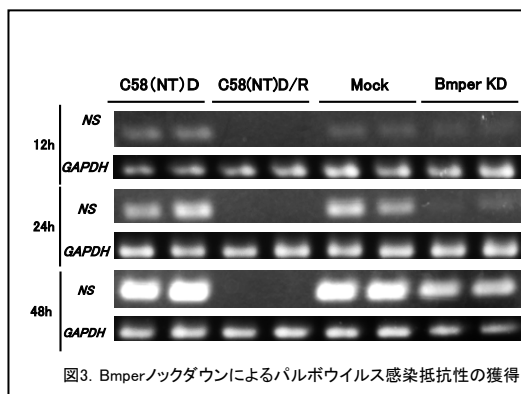


図 3. Bmperノックダウンによるパルボウイルス感染抵抗性の獲得

(2) NS 発現によるマウス T リンパ球サブセットの検討

まず、パルボウイルス NS-EGFP 発現レンチウイルスベクターを作製し、これを DBA/1 マウス胸腺に接種し、NS の発現により特定の T 細胞集団にアポトーシス誘導が起こるかどうかを TCR レポトア解析で検討した。しかし、対照ベクター感染群との間に明瞭な差は認められなかった。このことは NS の発現が特定の TCR をもつ T 細胞のクローナル増殖を誘導しない可能性を示している。一方で、作製した NS-EGFP 発現ベクターの力価が低く、*in vitro* では 90% 以上の導入効率を示したが、*in vivo* では NS と共に導入された EGFP 陽性の細胞は胸腺細胞中の数% しかみられなかったことが原因とも考えられる。

(3) NS 発現によるコラーゲン誘導性関節炎発症の検討

コラーゲン誘導性関節炎好発系である DBA/1 雌マウス (5 週齢) の胸腺に NS-EGFP 発現ウイルスベクターを感染させ、その 1 週間後にウシ 2 型コラーゲンを尾根部皮下に接種することで抗原性、関節炎の発症経過を観察した。観察終了までに関節炎を発症した個体は NS 発現群で 8/10、非発現群で 7/10 で有意な差は認められず、四肢関節の腫脹および発赤をスコア化して比較も行った、両者に明確な差は認められなかった。

また、抗 2 型コラーゲン抗体はコラーゲン接種後 2 週間後に検出され、6 週間後にはピークに達したが、両群に差は認められなかった。抗核抗体価はわずかに NS 発現群で高い傾向が見られたが、有意な差はなかった。

以上のように、パルボウイルス感染により感染細胞の DNA メチル化が亢進し、その中でメチル化による Bmper の発現抑制とそれによるウイルス再感染への抵抗性が、BMP/Smad 経路を介して獲得されることが明らかとなった。DNA メチル化による Bmper 発現抑制が細胞のアポトーシスや増殖能に関連することを予想していたが、残念ながら予想外の結果となった。しかし、本研究の結果はウイルス因子である NS が宿主細胞の DNA メチル化を介して NS の発現を負にフィードバックさせる可能性を示したもので、ウイルス因子による宿主細胞のエピジェネシス誘導が宿主対ウイルス相互作用を理解するうえで重要なことを示している。また、宿主側から見れば、ウイルス因子である NS に反応して BMP/Smad 経路を介してウイルス複製を途中で停止させるとも見なせる興味深い現象である。ウイルス因子による感染細胞の DNA メチル化についての報告は少ないが、ウイルス感染後の慢性疾患に広く関連する可能性がある。

一方、当初の目標であった T 細胞の特定クローンを死滅あるいは耐過させることを証明するには至らず、NS の発現と自己免疫性疾患発症との関連も明確に示すことはできなかった。これは、NS-EGFP 発現ウイルスベクターの力価や収量の技術的問題で、in vivo 実験系で十分な数を実施できなかったことが原因と考えられる。発現ベクターの再作製により、実験群の例数を増やした解析が可能である。

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)

[学会発表] (計 2 件)

①今野裕士・小林謙介・伊関大敬・國田智・杉山文博・八神健一、パルボウイルス感染細胞における DNA メチル化を介した再感染抵抗性の獲得、第 57 回日本実験動物学会総会、2010 年 5 月 14 日、京都

②國田智・加藤花名子・亀田周子・石田智子・高倉彰・後藤一雄・池郁生・有川二郎・大沢一貴・杉山文博・八神健一、蛍光マイクロビーズ法によるマウス・ラット感染症のマルチプレックス抗体検査、第 57 回日本実験動物学会総会、2010 年 5 月 14 日、京都

6. 研究組織

(1)研究代表者

八神 健一 (YAGAMI KENICHI)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：40166476