

令和元年6月24日現在

機関番号：32425

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01830

研究課題名(和文) 加齢に伴うヘルペスウイルス関連疾患の成立機序とその制御に関する検討

研究課題名(英文) Pathogenesis and regulation of herpes virus related diseases

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Epstein-Barr virus(EBV)は成人の9割以上が潜伏感染しているが、その再活性化は各種の自己免疫疾患や慢性疲労の発症に関与していることが推測されている。本課題では、EBVの再活性化の指標となるウイルス遺伝子BZLF1のプロモーター領域の下流にルシフェラーゼの遺伝子を連結させたpZp-552-Lucというプラスミドをマウスへ遺伝子導入してEBVの再活性化を評価できるモデルマウスの作出に成功した。さらに唾液腺上皮細胞HSGにpZp-552-Lucを遺伝子導入し、ポリフェノール類によるEBV再活性化の抑制効果を検討し、レスベラトロールが顕著にEBVの再活性化を抑制する事を確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Epstein-Barr virus (EBV) は成人の9割以上に潜伏感染しているヘルペスウイルスの一種であるが、何らかの原因により再活性化が誘導されてウイルス複製が誘導される。ウイルス複製が盛んになると、自己免疫疾患や慢性疲労などの発症しやすくなることが知られている。よってEBVの再活性化の抑制が可能になれば、ウイルス関連疾患を予防できる。本課題ではレスベラトロールがEBVの再活性化を制御する可能性を見いだした。これらの成果より、レスベラトロールの摂取がEBVが関与する疾患の発症予防として有効であることを示唆し、国民の健康維持に寄与する可能性が認められた。

研究成果の概要(英文)：Epstein-Barr virus (EBV) is one of the most common human viruses. Reactivated EBV infection may play pathogenetic role in some autoimmune diseases and chronic fatigue. In this study, we used a reporter plasmid, which connected BZLF1 promoter and luciferase gene (pZp-Luc). We established stable transfected cell lines. In this cell line pZp552Luc HSG cell, Resveratrol, antioxidant polyphenol, inhibited BZLF1 transactivation. Moreover, we succeed in generating mice transgenic for pZp-Luc. The highest pZp-luc activity detected in brain and testis in the mice. This result indicated if EBV infection to brain or testis, it might easily switch into lytic cycle.

研究分野：複合領域

キーワード：Epstein-Barr virus レスベラトロール

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴う疾患として、慢性疲労症候群は広く知られており、その発症には Epstein-Barr virus (EB ウイルス) や human herpesvirus6 (HHV6) などのヘルペスウイルスの関与が推測されている(PLOS ONE 2014,9:e85387)。EB ウイルスは成人の9割以上が感染しているヘルペスウイルスで、初感染は主に唾液を介して口腔咽頭領域で成立することが知られており、通常は潜伏感染状態で終生維持されるが、慢性疲労症候群をはじめ、各種の癌、自己免疫疾患などの発症に関与する事が報告されている。ヘルペスウイルスは潜伏感染と再活性化を繰り返すが、健常人では、宿主の免疫監視機構により恒常性が保たれている。しかしながら、何らかの原因により宿主の免疫能の低下をきたすと、ウイルスの再活性化や感染細胞の異常増殖が誘導され、種々の EB ウイルス関連悪性腫瘍やシェーグレン症候群(SS)を始めとした各種自己免疫疾患や慢性疲労の発症を誘導する。そのため、特に免疫能の低下をきたしている高齢者の健康維持に、ウイルス再活性化の制御は重要であると考えられる。

一方、国民の健康寿命の延長のみならず医療費の削減の一助として「食」は重要な要因と考えられている。医食同源となる、体によい食べ物はプラスの「フードファクター」と呼ばれており、薬物のようにピンポイントで効果が得られたり、速効性があるものではないものの、逆に多数の作用点があることから長期に摂取することで総合的に健康維持に作用すると考えられている。最近の科学技術の進歩により細胞や動物実験とともに、ヒトでもさまざまなパラメータを用いることにより、これまで医学的な検証は困難であった評価が可能となってきた。研究代表者や分担者らは長年 EB ウイルスの再活性化に関する研究に従事しており、SS 患者末梢血中、唾液中および口唇腺組織にウイルスが存在すること、EB ウイルスのホモログである IL-10 は SS 様の病態を示すこと、SS 患者唾液中にはダイオキシン受容体(AhR)を活性化する因子が存在し、AhR 活性化を介して EB ウイルスの再活性化が誘導されることなどを報告してきた。

2. 研究の目的

加齢に伴い慢性疲労症候群の発症率が高くなることが知られており、その発症機序としてヘルペスウイルスの関与が示唆されている。ヘルペスウイルスの再活性化は、他にも癌や自己免疫疾患などの発症にも関与している事が報告されているが、このヘルペスウイルスの再活性化は主に宿主の免疫力の低下によるものと考えられている。本研究では、免疫力の低下した高齢者において、ウイルスの再活性化を制御可能な食品、栄養素を検索することを目的とする。この研究の成果により、これからさらに進む超高齢化社会において、慢性疲労症候群をはじめとしたヘルペスウイルス関連疾患を予防、もしくは緩和出来るような食生活を提案できる有意義な研究である。

3. 研究の方法

1) EB ウイルス再活性化評価モデルマウスの作出

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作出する。

EB ウイルスは再活性化のシグナルを受けて、最初に EBV 前初期遺伝子 BZLF1 が活性化して ZEBRA タンパクが合成される。ZEBRA は転写因子としても働き、自己および他の EBV 前初期、後期遺伝子の発現を活性化し、潜伏感染状態を脱する。この様に、BZLF1 の転写活性化が EB ウイルスの再活性化を単独で誘導することが出来る事から、BZLF1 遺伝子の転写活性を測定することで、EB ウイルス再活性化の有無を確認することができる。

最初に EB ウイルス再活性化をモニタリングするモデルマウスを作出する。研究代表者はすでにルシフェラーゼレポ-タープラスミド (pGL3、Promega) に BZLF1 プロモーターを組み込んだプラスミド (pZp-Luc) を所有している。この pZp-Luc-pGL3 から pZp-Luc の部分のみを切り出し、pBluescript に組換え、十分量増幅後再度切り出して導入遺伝子とする。遺伝子導入マウスの作出は、理化学研究所 発生・再生科学総合研究センターへ委託し、共同で開発する。

2) pZp-221 遺伝子導入細胞株の樹立

in vitro での BZLF1 遺伝子転写活性の確認を行うための、遺伝子導入細胞株を樹立する。唾液腺上皮細胞株 HSY 細胞に pZp221-Luc プラスミドおよび、ネオマイシン耐性遺伝子を有する pCI-neo Vector (Promega) を Lipofectamin2000 reagent を用いて遺伝子導入を行う。neo' 遺伝子により発現するアミノグリコシドリン酸転移酵素によりアミノグリコシド系抗生物質の G418 耐性を獲得するため、引き続き G418 を含む増殖培地にて培養し、薬剤選択を行ったのち pZp221-Luc を恒常的に発現する細胞株を得る。

3) BZLF1 遺伝子転写活性の確認

細胞内に潜伏する EBV ゲノムは、プラスミドとして細胞周期に同調して S 期の直前に 2 倍となり分裂期を経て娘細胞へと正しく分配される。ここへ、何らかの刺激が入る事により潜伏状態が破綻し、BZLF1 遺伝子が転写され EB ウイルスの再活性化が誘導される。EBV ウイルスの再活性化は炎症、酸化ストレス、NO、他のウイルスの重感染などで誘導されることが報告されているが、in vitro で EB ウイルスを再活性化する因子としてプロテインキナーゼ C 活性化因子の 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)、n-butyrate、TGF、5-azacytidine、trichostatin A などが知られている。また研究代表者らは近年、アリル炭化水素レセプター (AhR) を介してダイオキシンが BZLF1 遺伝子の転写を活性化し、EB ウイルスの再活性化を誘導することを報告してきた。このことから、これらの因子をモデルマウスに投与し、BZLF1 遺伝子転写活性化能を確認する。対象とする組織細胞は、B リンパ球および唾液腺上皮細胞とする。

それぞれの因子を投与後、脾臓を摘出したのち、リンパ球を分離する。唾液腺あるいは涙腺を摘出し、唾液腺上皮細胞を分離する。それぞれの細胞から細胞溶解液を抽出し、ルシフェラーゼ測定キット (Promega) を用いてプロモーター活性を測定する。具体的には、ウイルス再活性化の刺激をしていない群と刺激をした群、それぞれの細胞溶解液についてたんぱく質の定量を行い、同量の細胞溶解液についてルシフェラーゼアッセイを行う。BZLF1 プロモーターが活性化することで転写、発現したルシフェラーゼは ATP の存在下でルシフェリンを基質とし、発光する。この発光強度を測定することにより、BZLF1 遺伝子の転写の程度を確認できる。

4) BZLF1 遺伝子転写活性制御可能なフードファクターの検索

あらかじめ in vivo での BZLF1 転写活性化能が認められた因子について、フードファクター摂取による影響を確認する。フードファクターの候補としては、代表的な抗酸化作用をもつ植物成分のポリフェノールがあげられる。ポリフェノールは抗酸化作用のみならず、ダイオキシンの作用を受容体レベルで抑制することが知られている。ポリフェノールにはレスベラトロール、イソフラボンなどの成分が知られており、これらの成分について検討を行う。

4. 研究成果

1) EB ウイルス再活性化評価モデルマウスの作出

EB ウイルス再活性化評価モデルマウスは pZp-Luc-pGL3 から pZp-Luc の部分を切り出し、C57BL/6N マウスへ遺伝子導入した。(理化学研究所 発生・再生科学総合研究センターに委託) 作出された 47line の Zp-Luc マウス F1 の尾から DNA を抽出し、BZLF1 プロモーター領域に位置するプライマーを用いて PCR を行った。その結果 5、 17、 47 の 3 line に導入遺伝子が確認された(右図)。

さらにこれら 3 line について、ルシフェラーゼの遺伝子内にセットされたプライマーを用いて確認をしたところ、3 line ともにルシフェラーゼ遺伝子の導入を認めた。

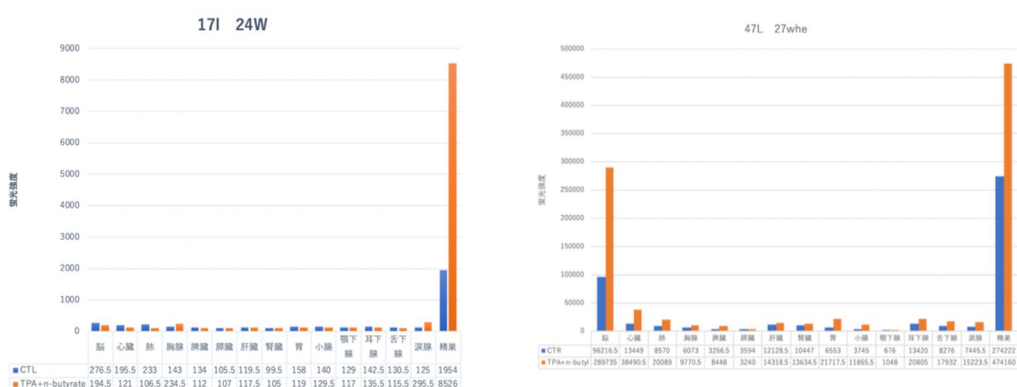
2) pZp-552Luc 遺伝子導入細胞株の樹立

pZp552-luc およびネオマイシン耐性遺伝子を有する pCI-neo 各プラスミドを HSG 細胞に遺伝子導入し、G418 に対する薬剤耐性をもつ HSG 細胞株を 11 株得た。全ての細胞株について、遺伝子導入されているかを確認するために、Zp を活性化することが知られている TPA と Na butyrate で刺激をして確認を行った。その結果、3 つの細胞株にルシフェラーゼ活性増強が認められた(下図)。TPA、Na butyrate 存在下の細胞株は、非存在下の細胞株に比べ、ルシフェラーゼ活性値が、NO.3 では約 3 倍、NO.4 では約 50 倍、NO.6 では約 4 倍高かった

3) BZLF1 遺伝子転写活性の確認

pZpLuc マウスにおける BZLF1 転写活性

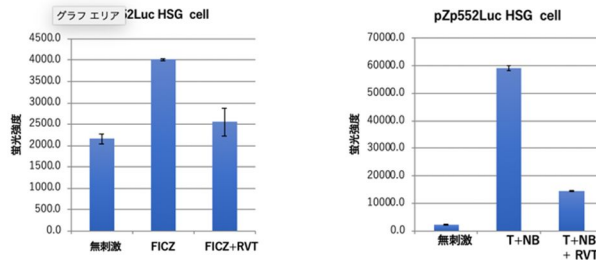
作出された遺伝子導入マウスについて、各臓器を摘出し、ルシフェラーゼ活性の測定を行った。その結果、2 つのラインのマウスでルシフェラーゼ活性を検出できた。また、これらのマウスについて、in vivo で活性化が誘導出来るか否かを確認するために、in vitro でその活性化を誘導することが知られている TPA 及び Na butyrate を投与後、それぞれの活性を測定した。その結果、17L では精巣において著明に活性増強が認められ、47L では、脳、心臓、肺、胃、小腸、耳下腺、舌下腺、涙腺、精巣の各組織でルシフェラーゼ活性の増強が認められた(下図)。



4) BZLF1 遺伝子転写活性制御可能なフードファクターの検索

4-1) pZp552Luc HSG 細胞を用いた検討

pZp552Luc HSG 細胞を用いて、BZLF1 活性化に対するレスベラトロールの作用に関する検討を行った。その結果、レスベラトロールは TPA 及び Na butyrate による BZLF1 活性化のみならず、AhR のリガンドである FICZ による活性化も抑制した (下図)。



4-2) pZp-552-Luc の一過性遺伝子導入細胞を用いた検討

唾液腺上皮細胞の HSY 細胞に pZp-552-Luc を一過性に遺伝子導入し、BZLF1 活性化に対するレスベラトロールやイソフラボンの作用に関する検討を行った。その結果、レスベラトロールは TPA 及び Na butyrate による BZLF1 活性化を抑制したが、イソフラボンであるダイゼインとゲネステインは影響を与えなかった。

5. 主な発表論文等

- 1) Makino K., Takeichi O., Imai K., Inoue H., Hatori K., Himi K., Saito I., Ochiai K., and Ogiso B., *Porphyromonas endodontalis* reactivates latent Epstein-Barr virus. ***Int Endod J*, 51**, 1410-1419 (2018)
- 2) Inoue H., Kishimoto A, Ushikoshi-Nakayama R, Hasaka A, Takahashi A, Ryo K, Muramatsu T, Ide F, Mishima K, Saito I. Resveratrol improves salivary dysfunction in a non-obese diabetic (NOD) mouse model of Sjogren's syndrome. ***J Clin Biochem Nutr*.59:107-112**, 2016

[雑誌論文](計 2 件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 齋藤一郎

ローマ字氏名: Saito Ichiro

所属研究機関名: 鶴見大学

部局名: 歯学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 60147634

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 中山亮子

ローマ字氏名: Nakayama Ryoko

所属研究機関名: 鶴見大学

部局名: 歯学部

職名: 学部助手

研究者番号(8桁): 50749843