

令和元年6月18日現在

機関番号：34424

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08749

研究課題名(和文)レトロウイルス誘発がん制御におけるB細胞TLR7シグナルの重要性

研究課題名(英文)The requirement of B cell-intrinsic TLR7 for the protection of retrovirus-induced leukemia

研究代表者

河原 佐智代 (Sachiyo, Kawahara)

梅花女子大学・食文化学部・教授

研究者番号：60297629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：レトロウイルス感染に対する生体防御反応に関して、本研究では特にB細胞に発現するTLR7(ウイルスの核酸等を認識する受容体)の働きを解析した。B細胞に発現するTLR7のみを欠いても、ウイルス特異的濾胞T細胞の活性化があればウイルスを中和するに十分な抗体が産生される。しかし、レトロウイルス誘発白血病の発症を制御するには、B細胞特異的TLR7の発現が必須であり、またその発症に内在性レトロウイルス(細胞ゲノムに存在するレトロウイルス)の発現が関係することがわかった。つまり、B細胞特異的TLR7は内在性レトロウイルスの発現、あるいは外来性と内在性レトロウイルスとの組換えの制御に必須であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、B細胞に発現する自然免疫センサーであるウイルス核酸受容体TLR7が、レトロウイルス感染誘発白血病の発症を制御すること、またその白血病発症に内在性レトロウイルスが関与している可能性を示唆した。自然免疫センサーは自己成分の内因性物質にも応答するポテンシャルがあることから、本研究結果は、ウイルス感染の新たな制御・予防法の開発だけでなく自己免疫疾患等の発症機序を考える上でも有用な情報になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：TLR7 is expressed on several types of cell including dendritic cells and B cells. In this study, we analyzed the requirement of B-cell intrinsic TLR7 for the protection of retrovirus-induced leukemia. Mice lacking of B cell-intrinsic TLR7 produced virus-neutralizing antibodies as efficiently as the wild-type mice by priming of T helper cells, and rapid elimination of exogenous retroviruses were observed. Nevertheless, the B cell-intrinsic TLR7 lacking mice later died of leukemia. These results suggest that B cell-intrinsic TLR7 is essential to regulate the appearance of endogenous and/or recombinant retroviruses even when the virus-specific Th cells are efficiently activated.

研究分野：生体防御

キーワード：B細胞 中和抗体 レトロウイルス TLR7 ウイルス誘発がん

1. 研究開始当初の背景

一般的な急性ウイルス感染症では、感染成立後に獲得免疫応答の誘導によってウイルス複製が阻止され、自然治癒する。しかしヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染症では、ウイルス増殖が十分に阻止されずに慢性持続感染が成立してしまうため、最終的にエイズ発症に至る。さらにプロウイルスの組込みが生殖細胞に起これば、それは内在性レトロウイルスとして子孫にまで伝わることとなる。よって感染早期にウイルスを逸早く中和し、プロウイルスのゲノムへの組込みをいかに早く食い止めるかがレトロウイルス持続感染症の制御には重要であるといえる。

我々の研究グループは、持続感染ののちに白血病を誘発するマウスレトロウイルスであるフレンドウイルス (FV) を用いて、ウイルス持続感染を制御する免疫応答とそれに関わる宿主因子を解明し、さらに持続感染阻止に有効なワクチン条件を明らかにしてきた。これまでに、FV 持続感染の阻止には感染細胞を殺傷する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の活性化より中和抗体の迅速な誘導が有効かつ重要であることを明らかにした。実際、持続感染が成立してしまうレトロウイルス感受性の全てのマウス系統で、感染急性期の中和抗体産生の遅延と低下が認められる。また HIV-1 感染者でも感染早期に免疫防御能をうまく獲得できたケースでは、後に出現する変異ウイルスに対しても抵抗性が獲得されているという報告が多い。

レトロウイルスのゲノム RNA は、パターン認識受容体の中でも一本鎖 RNA センサーである Toll-like receptor (TLR7) により感知される。この受容体は樹状細胞だけでなく B 細胞や CD4 陽性 T 細胞にも発現していることから、パターン認識受容体を介する細胞反応は細胞種により多様であると推測される。レトロウイルス感染時の抗ウイルス抗体の誘導は、この TLR7 を起点とする細胞反応に大きく依存している。B 細胞でのみ TLR 蛋白群を欠失させたマウスでは、樹状細胞のそれらを欠く個体より中和抗体の産生が著しく低下するという報告があることから、B 細胞に発現する TLR7 シグナルが抗レトロウイルス抗体誘導の起点となっている可能性が高いと考えられる。

我々は B 細胞特異的 TLR7 に注目し、レトロウイルス感染制御におけるその役割について解析した：(1) FV の Th 認識エピトープを含むペプチドを用いた免疫により、野生型マウスではウイルス特異的濾胞 T 細胞が高効率に誘導され、中和抗体の産生及びそれらの抗体のクラススイッチが感染早期に誘導される。それに相関して、感染細胞はウイルス接種 2 週目には検出限界以下となり、ペプチド免疫個体は白血病発症に至ることはない。(2) 次に、このペプチド免疫による抗体誘導に TLR7 が必要であるかを調べたところ、非免疫の TLR7 欠損マウスではレトロウイルス中和抗体は全く誘導されず、ウイルス複製が爆発的に起こる。しかしそれら個体をペプチドで予め免疫することで TLR7 欠損マウスでも野生型と同様に感染早期に中和抗体が誘導され、血中ウイルスは感染早期に検出限界以下となった。これは、B 細胞の TLR7 のみを欠失させたマウスでも同様の結果であった。予めウイルス抗原に特異的な記憶濾胞 T 細胞を高頻度に誘導しておけば、どの細胞種の TLR7 もレトロウイルス中和抗体産生誘導に関らずしも必要ではないことがわかった。(3) しかし、この Th エピトープペプチドで免疫し FV を感染させた B 細胞特異的 TLR7 欠損個体では、FV 複製は阻止されているものの、それらは後に脾腫を発症し、ほぼ全てが死に至った。その発症メカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

近年、自然免疫センサーであるパターン認識受容体は、病原体ばかりでなく「自己成分の内因性物質」にも応答するポテンシャルがあり、パターン認識受容体が自己免疫疾患などの発症にも複雑に関わっていることの理解が進んできた。パターン認識受容体からのシグナルがそれぞれの細胞種でどのような役割を担っているかを解明することは、感染症の治療・予防薬の開発だけでなく、自己免疫疾患の病態解明と治療法の確立に向けても取り組むべき重要な課題である。

本研究では、上記の研究背景、ならびに既に取得している実験結果を踏まえ「レトロウイルス誘発がんを制御するためにどうしてB細胞のTLR7が必要なのか」という疑問への解明に焦点を絞った。特に「Thペプチドワクチン接種により外来性レトロウイルスを中和するに十分な抗体が誘導できているにもかかわらず、白血病の発症を阻止するためにはB細胞特異的TLR7が必須である」という事実から、組換え型レトロウイルス誘発がんの発症制御という側面からB細胞特異的TLR7の新たな役割を明らかにすることを本実験の目的とした。

3. 研究の方法

(1) ペプチドワクチン接種B細胞TLR7欠損マウスにおけるレトロウイルス誘発白血病の発症過程とその病態の詳細解析、ならびにがん化細胞の分離と同定：

B細胞特異的TLR7欠損マウスは、B細胞欠損個体とTLR7欠損個体のキメラマウスとして作製した。B細胞特異的TLR7欠損マウスでは、Thエピートープペプチド免疫により中和抗体産生が誘導され、血中ウイルスは感染早期に検出できなくなるにもかかわらず、その個体はいずれ脾腫を発症し、死に至る。その白血病発症過程を詳細に解析することで、どの時期にFVが検出されなくなるのか、がん化はFV感染後のいつ発症するのか、どの細胞種ががん化するのかを調べた。さらに、発症個体からがん化細胞を採取し、その株化を試みた。またB細胞TLR7欠損マウスにおいてB細胞以外の免疫担当細胞の機能に変化がないかを解析した。

(2) B細胞TLR7欠損下での白血病発症における組換え型レトロウイルス発現の関与についての検討

外来性のFV(病原性をもつSFFVとヘルパーウイルスであるF-MuLVから成る)と内在性レトロウイルスとの組換え体が白血病を誘発していると推測される。FV感染後の組換え型レトロウイルスの出現を、内在性レトロウイルス抗原を検出する複数の抗体を用いたinfectious focus assayならびにFACS解析、またウイルス特異的プライマーを用いたRT-PCR法により検討した。また上記(1)で樹立したがん細胞株からウイルス分離を試みた。

4. 研究成果

B細胞TLR7欠損個体ではFV感染時に中和抗体産生は誘導できないが、B細胞のTLR3、TLR9を欠く個体ではFV中和抗体が誘導されることから、B細胞に発現するTLR7がレトロウイルス中和抗体産生に必須分子であることが分かった。ただし、エピートープペプチド接種によりウイルス特異的濾胞Th細胞を予め高効率に誘導しておけば、B細胞発現TLR7を欠いても中和抗体は誘導され、感染2週目にはFVウイルス(FVのヘルパーウイルスF-MuLVを指標とする)は検出限界以下となった。しかしながら、エピートープペプチド免疫で中和抗体が十分に誘導されたにも関わらず、B細胞発現TLR7個体のほぼ全てが感染8-12週間後には死に至った。その発症経過を観察したところ、感染4-6週間後に脾腫、ヘマトクリット値の上昇を認め、その後ヘマトクリット値の低下を示した。それら個体の血液・脾臓細胞の観察から、主に赤白血病の発症を認めた。ただし、これらの個体のTh細胞の数や機能、CTL機能、DC抗原提示能は、ペプチド免疫した野生型個体と同様であった。これらの結果は、B細胞TLR7欠損がレトロウイルス感染誘発がんの発症制御に重要であること、またそれはT細胞やDCを介した影響ではないことを示唆した。

脾臓、骨髄細胞の培養により複数のがん化細胞株を樹立した。それらのがん化細胞と白血病発症個体の脾臓細胞について、レトロウイルス産生の有無を調べたところ、感染性のレトロウイルス産生は、外来性、内在性レトロウイルスともに認められなかった。それら細胞のB細胞特異的TLR7欠損個体への移入実験では、感染細胞は検出されず、また白血病発症も認められなかったことから、FV感染から白血病発症に至る過程でB細胞特異的TLR7がその制御に必須であるが、白血病細胞の排除にはそれは関与しないことがわかった。がん化細胞についてプロウイルスの解析を行ったところ、FVのSFFV pseudotypeまたは内在性レトロウイルス(SFFVとの組み換え体の可能性あり)のゲノム内挿入を認めた(詳細解析中)。これらの結果から、外来性レ

トロウイルスの侵入が内在性レトロウイルスの発現を誘導する可能性があること、また B 細胞特異的 TLR7 がその内在性レトロウイルスのエピトープ認識、つまりそれらの発現制御に必須であり、それは他の細胞種の TLR7 では代替できないことが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

宮澤正顕、博多義之、武田英里、李君、河原佐智代. マウス APOBEC3 の生理機能と分子進化. 生化学, 査読無, Vol.88, pp.582-592. 2016. DOI:10.14952/SEIKAGAKU.2016.880582.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Shigeki Kato, Chihiro Motozono, Sachiyo Kawahara, Masaaki Miyazawa. Fate determination with a selected epitope facilitates follicular helper T cell differentiation and protection against acute retroviral infection. The 30th international workshop on retroviral pathogenesis. 2018.
2. Sachiyo Kawahara, Masaaki Miyazawa. The requirement of B cell-intrinsic TLR7 for the production of retrovirus-neutralizing antibodies is overcome by T helper cells in an epitope-specific manner. The 30th international workshop on retroviral pathogenesis. 2018.

〔図書〕(計 1 件)

Tetsuya Tsukamoto, Sachiyo Kawahara, Masaaki Miyazawa. 北隆館, Bio Clinica, Vol 34 p67-73, 2019.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：宮澤 正顕

ローマ字氏名：Masaaki Miyazawa

所属研究機関名：近畿大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：60167757

研究分担者氏名：本園 千尋 (平成 28 年度のみ)

ローマ字氏名：Chihiro Motozono

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：10642910

(2)研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。