

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08351

研究課題名(和文)BKウイルス抗原による膵炎への関与、膵炎誘導のメカニズム解明

研究課題名(英文)Elucidation of development of pancreatitis by T antigen on BK virus

研究代表者

池原 早苗 (Ikehara, Sanae)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：50598779

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)：常在性の不顕性感染症とされてきたポリオーマウイルス科のBKウイルスについて、ヒト膵組織への感染と慢性炎症、萎縮・線維化への関与の可能性を見出した。そこで、膵臓特異的かつドキシサイクリン依存的にBKウイルスのLarge T抗原(BK-LT)を発現する遺伝子改変マウスを作製して解析し、BK-LTの発現が膵管障害の原因となることを明らかにするとともに、膵萎縮・線維化への進展を確認したことで、BKウイルス感染は膵炎の原因になると結論している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究成果の学術的意義は、Large T抗原を発現させたマウスの解析から、膵炎発症には家族性膵炎の原因遺伝子として知られるPrss1の発現亢進が存在し、線維化へと至ることを実験的に証明したことにある。これらのことは、BKウイルスに対する感染予防や治療の必要性について科学的エビデンスとなるものである。社会的意義は、得られた成果をもとに重症化に備える「膵炎診療のスキーム」が構築されることで、家族性膵炎をはじめ、飲酒行動や代謝異常などでハイリスクとされる患者に対する予防戦略の一つを提案できたと考えている。

研究成果の概要(英文)：We found a possibility that the subclinical infection of the BK virus manifested as chronic pancreatic inflammation and fibrosis by the analysis of surgically resected pathological specimens. To take a piece of direct evidence, we generated and analyzed genetically engineered mice that express Large T antigen (BK-LT) of the BK virus in a pancreas-specific and doxycycline (DOX)-dependent manner. As a series of results demonstrated that BK-LT expression in the pancreas causes damage in duct cells, leading to pancreatic atrophy and fibrosis, we concluded that BK virus infection is a cause of pancreatitis.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：膵臓の病理 膵炎 BKウイルス感染 遺伝子改変マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

膵炎は重症化して死に至る疾患で、膵壊死を伴う重症例の死亡率は、現在でも15~20%程度と高い(急性膵炎診療ガイドライン)。このため、膵炎の病理へ介入して、その進展を止められる治療法の開発が求められている。また急性膵炎発症のリスクとして、

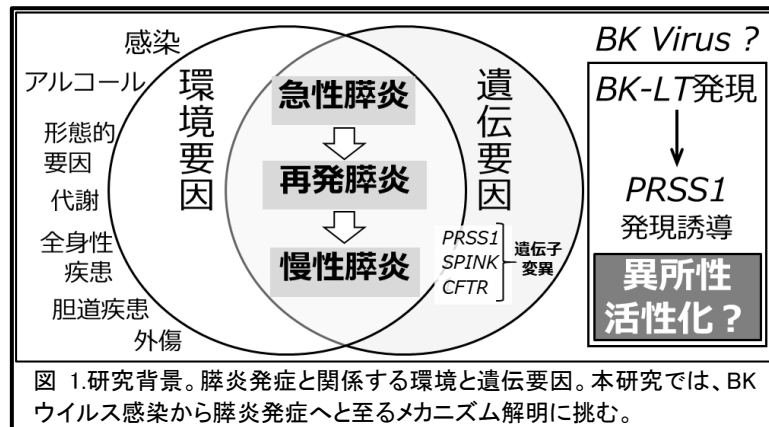


図1.研究背景。膵炎発症と関係する環境と遺伝的要因。本研究では、BKウイルス感染から膵炎発症へと至るメカニズム解明に挑む。

、生活習慣などの環境要因や遺伝的要因との関連が明らかにされているが(図1)、これらを標的とする効果的な治療も実現していない。その理由の一つは、環境や遺伝的要因を背景に発症するモデルマウスが確立されていないためである。膵炎の発症と進展がマウスモデルを使用して系統的に解析できないことが理由となり、膵炎顕在化のトリガーや効果的に介入できる病理は依然として不明なままである。

代表者は、マウス膵臓特異的にポリオーマ属のSV40ウイルスに由来するtsA58 T抗原(SV-LT)とKras^{G12D}を共発現するTKCマウスを作製して解析し、急速に進行する膵管癌の発生を報告している(Yamaguchi, Ikehara *et al.*, *J Pathol.* 2014)。膵臓にSV40ウイルスのSV-LTのみを発現させたマウスは、膵管癌を発生するTKCマウスのコントロールとしていたものであるが、生後3か月程度で出血性膵炎を自然発症することに気付いた。ポリオーマ属ウイルスでは、SV40ウイルスのほかに、常在性であるが80%以上のヒトが不顕性に感染しているBKウイルスが知られている。BKウイルスと膵炎との関係性を指摘した報告はないが、膵炎の発症と関係する可能性を着想し、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、BKウイルスの膵炎発症への関与を明らかにすることである。そのためにBKウイルスのLarge T抗原(BK-LT)を膵臓特異的に発現するトランスジェニックマウス(BK-LTマウス)を作製して解析を進めた。また、BKウイルスは成人するまでに感染し、不顕性で推移するとされてきたことを鑑み、作製したマウスのBK-LTの発現は、ドキシサイクリン(DOX)依存的となるよう設計しており(図2)、DOX投与後にBK-LTが発現誘導されることを確認している。なお、膵炎はDOX投与により、すべてのBK-LTマウスで、週齢や雄雌に関わらず発症する。そしてRNA-seq解析により、膵炎組織には家族性膵炎の原因遺伝子として知られているカチオニックトリプシノーゲン遺伝子(*Prss1*)の発現上昇を見出したことから、本研究が始まる。特に、BKウイルス感染は、環境要因と遺伝的要因をつなげる膵炎の病理になると着想しており(図1)、このために本研究では、過剰発現が膵炎発症に関与するPRSS1を介する膵炎発症の病理メカニズム解明を目指すとともに、環境要因の一つとして高脂肪食による膵炎の増強効果を明らかにすることを目的に定めた。

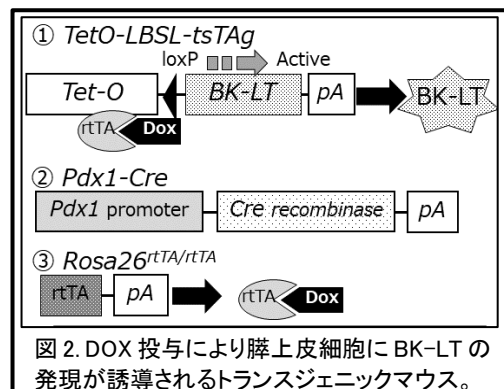


図2. DOX投与により膵上皮細胞にBK-LTの発現が誘導されるトランスジェニックマウス。

3. 研究の方法

確立した BK-LT マウスは、スピードコンジェニック法を利用した C57BL/6 系への戻し交配を進めることで、すべての染色体が B6 由来となるまでコンジェニック化した。本研究では、前述の予備検討を元に、以下(1)～(3)の研究を実施した。

(1)DOX 誘導 BK-LT 膵炎マウスの病理学的解析

DOX 誘導 BK-LT 膵炎とヒト膵炎との類似性を明らかにするために、DOX 誘導 BK-LT 膵炎マウスの病理学的解析を行った。さらに高脂肪食による膵炎の顕在化を病理学的にとらえるために、高脂肪食での DOX 投与により発症した膵炎を解析した。解析方法は、膵組織のトリプシン活性や Hydroxyproline 量、CD45 および CD69 抗体を用いた炎症細胞浸潤を炎症の活動性指標として評価し、腺房細胞の消失と脂肪組織への置換の程度、マッソントリクローム染色などで可視化される線維化の進行から病理組織学的特徴を明らかにした。

(2)DOX 誘導 BK-LT 膵炎マウスの免疫学的解析

DOX 誘導 BK-LT 膵炎マウスの病理学的解析結果をもとに、DOX 投与開始から 14 日目、21 日目に出現する炎症細胞を回収して single cell RNA-seq 解析により検討し、BK-LT 膵炎を惹起する免疫応答を明らかにした。

(3)ヒト膵組織と細胞を対象にした BK-LT 抗原の検出と炎症応答の検討

ヒト膵組織において BK-LT 抗原と炎症応答を検討するため、BK-LT と PRSS1 発現との関連に着目し、病理学・免疫学的解析手法によって膵炎の病理に迫った。BK-LT 抗原を特異的に検出できるモノクローナル抗体を作製して使用し、BK-LT とその標的分子と考える PRSS1 との共発現を検出評価して、臨床病理学的なエビデンスの取得をめざした。

4. 研究成果

代表者は(1)～(3)に示した研究の実施を通じて、BK ウイルス感染は膵炎の発症と関係すると結論している。

その根拠は、BK-LT を膵臓特異的かつ DOX 依存的に発現する BK-LT マウス作製と解析結果より、膵管周囲から始まる炎症の進展と膵萎縮、ならびに膵線維化が確認されたことによる。具体的なエビデンスは、マッソントリクローム染色や鍍銀染色などの病理組織学的な解析と、トリプシン活性ならびに膵組織の破壊に伴う Hydroxyproline の増加が BK-LT の誘導による膵炎とともに確認

されたためである。さらに BK-LT マウスへ高脂肪食を与えると、膵壊死を伴う炎症像は周囲脂肪組織へと広がり、膵炎の増悪が確認された。

RNA-seq 解析は、マウス膵組織の凍結保存検体とホルマリン固定パラフィン包埋標本それぞれより RNA を抽出して行った。この実験は、これまでの再現性を確認する位置づけであるが、いず

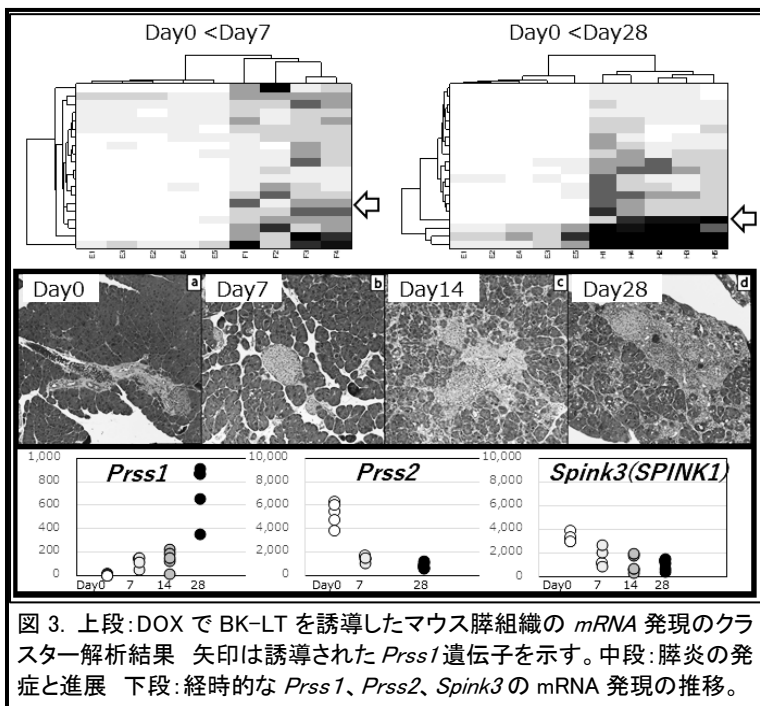


図 3. 上段:DOX で BK-LT を誘導したマウス膵組織の mRNA 発現のクラスタ解析結果 矢印は誘導された *Prss1* 遺伝子を示す。中段:膵炎の発症と進展 下段:経時的な *Prss1*, *Prss2*, *Spink3* の mRNA 発現の推移。

れも膵炎の発生と進展を確認する結果が得られている。特に、家族性膵炎の原因遺伝子として知られる *Prss1* は、BK-LT の誘導により発現が誘導され、膵炎が進展して萎縮する状況となってもその発現は高かったのに対し、*Prss2* や *Spink3* の発現は低下していた(図 3)。

膵炎を誘導させたマウス膵組織を対象に実施した single cell RNA-seq 解析において、DOX 投与開始から 2 週間目までの膵炎では NK 細胞や好中球などの自然免疫応答が主になること、3 週間目以降では T 細胞や B 細胞による獲得免疫優位な応答へと変化していることが明らかになっている。BK-LT マウスに生じる膵炎の病理組織学的な特徴は、膵管周囲より始まる炎症である。このことから推察すると、異所性に膵管上皮へ誘導された *Prss1* が原因となり、膵液の漏れによる組織障害を引き金に、NK 細胞や好中球など自然免疫応答が活性化されていると推察される。そこで、ヒト膵組織における BK ウイルス感染について、BK-LT を特異的に検出できるモノクローナル抗体を新たに作製して使用し、市販の膵疾患組織マイクロアレイ (TMA) の解析を行った。結果、BK-LT の陽性率は 20~30% (総数 352spot) で、BK-LT 陽性のヒト膵管上皮に PRSS1 タンパク質の発現が確認された。

以上より、代表者の作製した BK-LT マウス膵炎の解析から、BK-LT タンパク質には膵炎誘発能があり、またヒトの膵組織に BK ウイルス感染の痕跡を見出せることから、BK ウイルスがヒト膵炎の原因になっている可能性を明らかにできたと考えている。

今後の展望

急性膵炎発症の瞬間を再現してその病理を解析できるマウスモデルは確立されていなかった。遺伝性膵炎の原因となるカチオニックトリプシノーゲンの変異遺伝子 *PRSS1*^{R122H} (Whitcomb, *Nat Genet.* 1996) を発現させたマウスでは、膵炎の自然発症が報告されているが (Haug, *Gastroenterology* 2019, Gui, *J. Clin. Invest.* 2020, Geiz & Sahin-Toth, *Nature Comm.* 2018)、同マウスでは膵炎の発症時期が個体ごとに異なるため、膵炎の発症と進展が系統的に解析されておらず、顕在化のトリガーや効果的に介入できる病理は依然不明なままである (Gui, *J. Clin. Invest.* 2020, Haug, *Gastroenterology* 2019)。これまでは遺伝性膵炎が急速に憎悪する理由も不明であったが、代表者の作製したマウスとその解析から BK ウイルス感染の関与を想定する説明が付けられるように思う。

現在、膵管や膵腺房細胞の障害を超微形態学的に明らかにするために、病理標本や免疫染色したウイルス粒子を走査電子顕微鏡によって観察する方法の確立を進めている。次年度以降の科研費基盤 C の継続研究では、これらの技術を用いて膵管細胞の障害の解析を進める予定である。独自開発した『抗体染色と組み合わせた超微形態解析』により、膵管細胞の障害を微小構造の変化として捉え、分泌輸送過程の異常と膵管上皮の小胞輸送に生じる細胞障害や、引続いて起こる炎症・線維化の関連について解明したいと考えている。また、BK ウイルス感染を膵炎顕在化のトリガーとするエビデンスを明らかにして、膵炎の重症化や顕在化におけるウイルス感染のインパクトも明らかにし、さらには SEM と免疫染色を組み合わせた超微形態解析技術を深化させ、他の感染症研究での利用展開に繋げたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yamada Hiromasa, Kato Susumu, Shimizu Tetsuji, Fujiwara Masanori, Fujiwara Yutaka, Kim Jaeho, Ikehara Sanae, Shimizu Nobuyuki, Ikehara Yuzuru, Sakakita Hajime	4. 巻 27
2. 論文標題 Striation phenomena in a low temperature atmospheric pressure neon plasma jet by optical emission spectroscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physics of Plasmas	6. 最初と最後の頁 022107 ~ 022107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5124122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ogata Hideyuki, Akita Shinsuke, Ikehara Sanae, Azuma Kazuhiko, Yamaguchi Takashi, Maimaiti Maihulan, Maezawa Yoshiro, Kubota Yoshitaka, Yokote Koutaro, Mitsukawa Nobuyuki, Ikehara Yuzuru	4. 巻 13
2. 論文標題 Calcification in Werner syndrome associated with lymphatic vessels aging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aging	6. 最初と最後の頁 25717 ~ 25728
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/aging.203789	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sakakita H, Yamada H, Shimizu T, Fujiwara M, Kato S, Kim J, Ikehara S, Shimizu N, and Ikehara Y.	4. 巻 54
2. 論文標題 Effects of electric charges on serum protein aggregation induced by a low temperature atmospheric pressure plasma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Phys. D: Appl. Phys	6. 最初と最後の頁 215201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wakai Ken, Azuma Kazuhiko, Iwamura Chiaki, Maimaiti Maihulan, Mikami Kosuke, Yoneda Kei, Sakamoto Shinichi, Ikehara Sanae, Yamaguchi Takashi, Hirahara Kiyoshi, Ichikawa Tomohiko, Nakayama Toshinori, Ikehara Yuzuru	4. 巻 12
2. 論文標題 The new preparation method for paraffin-embedded samples applying scanning electron microscopy revealed characteristic features in asthma-induced mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-12666-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Chiaki Iwamura, Kiyoshi Hirahara, Masahiro Kiuchi, Sanae Ikehara, Kazuhiko Azuma, Tadanaga Shimada, Sachiko Kuriyama, Syota Ohki, Emiri Yamamoto, 他37名, Yuzuru Ikehara, Koutaro Yokote, and Toshinori Nakayama	4. 巻 119
2. 論文標題 Elevated MyI9 reflects the MyI9-containing microthrombi in SARS-CoV-2-induced lung exudative vasculitis and predicts COVID-19 severity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2203437119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Murakami Karin, Tamura Ryo, Ikehara Sanae, Ota Hayato, Ichimiya Tomomi, Matsumoto Naoki, Matsubara Hisahiro, Nishihara Shoko, Ikehara Yuzuru, Yamamoto Kazuo	4. 巻 480
2. 論文標題 Construction of mouse cochlin mutants with different GAG-binding specificities and their use for immunohistochemistry	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 41 ~ 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20220339	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Ikehara Y, Yamaguchi T, Ikehara S, Hashimoto M, Kusano T, Azuma K
2. 発表標題 Development of a new mouse model and imaging sensor technology to elucidate the emergence of pancreatic duct carcinoma
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池原 謙、榊田 創、池原早苗、馬場恒明、堀 勝
2. 発表標題 生体組織と構成分子の荷電(帯電)をプラズマ技術で制御する
3. 学会等名 第39回プラズマ・核融合学会 年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koumei BABA, Sanae IKEHARA, Minoru TOBIUME, Kazuhiko AZUMA, Shota OHKI, Yoshio SUZUKI, Yuzuru IKEHARA
2. 発表標題 High Resolution Scanning Electron Microscope Observation of SARS-CoV-2 with Conductive Carbon Film Coatings
3. 学会等名 The 32th The Material Research Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Emiri Yamamoto, Shinsuke Akita, Sanae Ikehara, Ikumi Nomata, Shigehito Sakai, Takashi Yamaguchi, Kazuo Yamamoto, Nobuyuki Mitsukawa, Yuzuru Ikehara
2. 発表標題 Plasma treatment effectively diminished the accumulation of Bone Marrow derived Cells on bleeding control
3. 学会等名 ISPlasma2023 / IC-PLANT2023 (国際学会)
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山口 高志 (Yamaguchi Takashi) (60626563)	千葉大学・大学院医学研究院・講師 (12501)	
研究分担者	東 和彦 (Azuma Kazuhiko) (80422260)	千葉大学・大学院医学研究院・技術専門職員 (12501)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	吉富 秀幸 (Yoshitomi Hideyuki) (60375631)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	平原 潔 (Hirahara Kiyoshi) (00707193)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関