

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 18 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22591915

研究課題名（和文） EBウイルス関連リンパ腫発症・進展に与える宿主自然免疫の影響

研究課題名（英文） Impact of TLR triggering on gamma-herpesvirus lytic replication

研究代表者

山内 一真 (YAMAUCHI KAZUMA)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：80336891

研究成果の概要（和文）：EBV に相当しマウスに感染するガンマヘルペスウイルスである MHV-68 感染において Toll 様受容体のうち、エンドソームに存在する TLR7 あるいは TLR9 を刺激することにより NF- κ B が活性化され MHV-68 の融解感染が抑制されることが示された。つまり TLR7 あるいは TLR9 刺激により MHV-68 の潜伏感染が促進されガンマヘルペスウイルス関連悪性リンパ腫発症のリスクファクターとなることが示唆される。

研究成果の概要（英文）：Triggering of TLR7 or TLR9 suppresses initiation of MHV-68 lytic replication by the activation of NF- κ B, which leads to promotion of gamma-herpes virus latency and lymphomagenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：MHV-68、TLR7、TLR9、NF- κ B、融解感染、ガンマヘルペスウイルス、S11細胞、リアルタイム PCR

1. 研究開始当初の背景

(1) Epstein-Barr virus (EBV) はガンマヘルペスウイルスに属し成人の 90% 以上に認められる最もありふれた病原体の一つである。青年期以降で EBV に諸感染した場合には伝染性単核球症を発症するが、多くの健常者においては小児期に不顕性感染を起こし、宿主 B 細胞内に EBV が終生潜伏感染しているにもかかわらず何ら病状を示すことはない。しかし、EBV は感染した B 細胞を形質転換（癌化）し不死化する能力を持つ腫瘍ウイルスとしても知られており、バーキットリ

ンパ腫もしくはホジキンリンパ腫の発症に深く関与していることが示されているが、これらリンパ腫の発症機序に関しては未だ不明な点が多い。

(2) バーキットリンパ腫はアフリカを中心とした赤道直下の地域に多発すること知られており、これらはマラリア感染の多発地帯と一致するため、マラリア感染とバーキットリンパ腫発症との関連性が報告されている。さらにマラリア感染により宿主内で産生される hemozoin という物質は宿主の自然免疫、

なかでも Toll-like receptor (TLR) 9 を持続的に刺激する作用を有することがわかっている。以上より EBV 感染に持続的な自然免疫刺激が加わることでリンパ腫を発症するのではないかと我々は仮説を立てた。

2. 研究の目的

EBV をはじめガンマヘルペスウイルスは融解感染、潜伏感染という二つの感染相を呈するが、宿主の自然免疫刺激がガンマヘルペスウイルスの融解感染を抑制し潜伏感染を促進することでリンパ腫発症および腫瘍増殖に関わっていることを証明する。

3. 研究の方法

EBV に相当するマウスに感染するガンマヘルペスウイルスである MHV-68 を用いた実験を行った。

1) MHV-68 が潜伏感染したマウス B 細胞系である S11 細胞を用い、自然免疫刺激により活性化される NF- κ B を抑制する薬剤あるいは TLR リガンドで刺激し、融解感染の変化を遺伝子レベル、ウイルス粒子レベルで検討した。

2) S11 細胞を各種試薬で刺激し、NF- κ B の活性化を検討した。

3) 野生型マウス、各種ノックアウトマウスから脾細胞および脾 B 細胞を抽出し MHV-68 に感染させ自然免疫リガンドで刺激した後、上述と同様に融解感染の変化を検討した。

4. 研究成果

1) S11 細胞を NF- κ B 抑制剤である Bay 11-7082 を作用させた場合、コントロールと比較して MHV-68 の融解感染で発現する遺伝子 (ORF50, PRF21, M7) が有意に増加し、ブランクアッセイによるウイルス粒子も有意に増加した (Fig. 1)。これにより NF- κ B 抑制により MHV-68 の融解感染が抑制されることが示された。

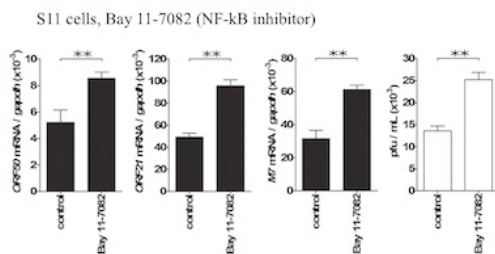


Fig.1

2) S11 細胞を各種 TLR リガンドで刺激、あるいは MHV-68 の融解感染を促進する薬剤 TPA を加えた後に TLR リガンドで刺激し、上述と

同様に MHV-68 の融解感染を検討した。Fig. 2 に示すとおり TLR7 リガンドである R848、TLR9 リガンドである CpG ODN で刺激した場合に MHV-68 の融解感染が抑制された。

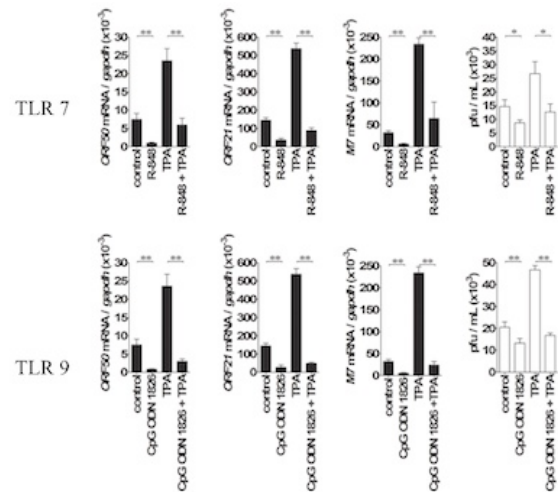


Fig.2

3) S11 細胞を TLR3 リガンドである Poly(I:C)、TLR7 リガンドである R848、TLR9 リガンドである CpG ODN、NF- κ B 抑制剤である Bay 11-7082 で刺激し、NF- κ B 活性化の指標となる核内 p65 蛋白をウエスタンブロット法で検出し (Fig. 3A)、バンド濃度を数値化し検討した (Fig. 3B)。

TLR3 刺激では核内 p65 は変化なく、TLR7、TLR9 刺激では核内 p65 が増加し、NF- κ B 抑制では核内 p65 の現象を認めた。これより S11 細胞において TLR7 あるいは TLR9 刺激により NF- κ B が活性化されることが示された。



Fig.3A

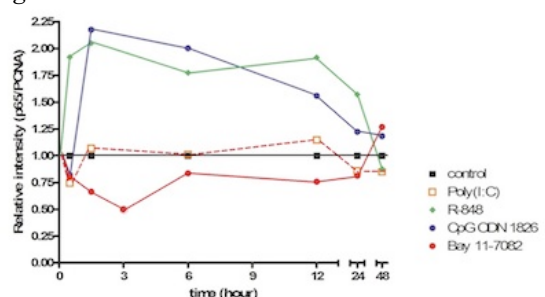


Fig.3B

4) 野生型マウスから脾細胞および脾 B 細胞を抽出し、MHV-68 に感染させ TLR3、TLR7、TLR9 刺激を行い MHV-68 の融解感染を検討した。

S11 細胞の場合と同様、TLR3 刺激では MHV-68 の融解感染は影響を受けなかったが、TLR7 および TLR9 刺激により MHV-68 の融解感染は有意に抑制された。

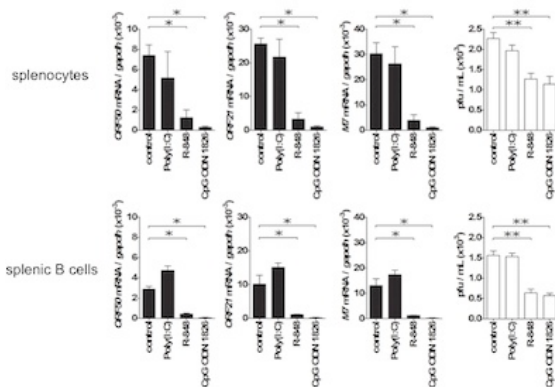


Fig.4

5) TLR7、TLR9 をノックアウトしたマウスから脾細胞および脾 B 細胞を抽出し 4) と同様の実験を行った。TLR7 ノックアウトマウスでは TLR9 刺激で MHV-68 融解感染抑制が認められたが、TLR7 刺激ではその抑制が認められなかった。TLR9 ノックアウトマウスでは逆に TLR7 刺激で MHV-68 融解感染抑制が認められたが、TLR9 刺激ではその抑制が認められなかった。つまり R848 は TLR7 を介して、CpG-ODN は TLR9 を介して MHV-68 の融解感染を抑制していることを示唆している。

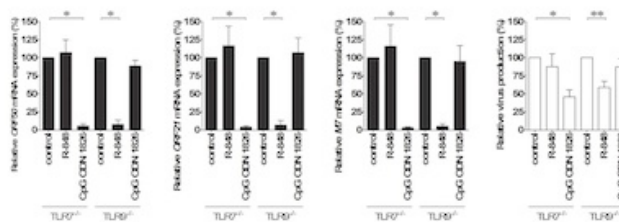


Fig.5

6) Myd88 は TLR7 および TLR9 のアダプター蛋白であり、IRF7 は TLR7 および TLR9 刺激により活性化される NF- κ B 以外の転写因子である。これらをノックアウトしたマウスの細胞

を用い、上述の 4) 5) と同様の実験を行った。この結果、TLR7、TLR9 刺激により MHV-68 を抑制する作用には Myd88 は必須で、IRF7 は必須ではないことが示された。つまり NF- κ B の活性化によるものと考えられる。

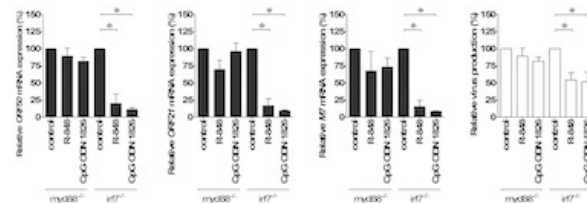


Fig.6

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) 山内一真、扁桃と Epstein-Barr virus (EBV) 感染 小児耳鼻咽喉科 31 巻 238-243, 2010 査読無し

(2) 山内一真、日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会グラクソスミスクライン国際交流基金 中間報告 Impact of Toll-like receptor triggering on murine γ -herpesvirus 68 (MHV-68) lytic replication 耳鼻免疫アレルギー(JJIAO) 28 巻 309-310, 2010 査読無し

[学会発表] (計 3 件)

(1) 山内一真、保富宗城、戸川彰久、山中昇 EB ウイルスの潜伏感染と TLR の関与 第 60 回日本化学療法学会西日本支部総会、第 55 回日本感染症学会中日本地方会学術集会、第 82 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、共同開催 福岡 2012 年 11 月 7 日

(2) 山内一真 ガンマヘルペスウイルスの感染相転移に対する Toll 様受容体刺激効果 帰国報告 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 滋賀県大津市 2012 年 2 月 16

日

(3) 山内一真、山中昇「扁桃と Epstein-Barr virus (EBV)感染」第5回日本小児耳鼻咽喉科学会 ワークショップ「扁桃の免疫機構と病態」札幌、2010年6月26日

〔図書〕(計2件)

(1) 山内一真、ウイルス性鼻副鼻腔炎の症状は、鼻副鼻腔炎のマネジメント、山中昇・工藤典代編著、40～41頁、医薬ジャーナル社、大阪、2011年

(2) 山内一真、アレルギーと感染との関連は、鼻副鼻腔炎のマネジメント、山中昇・工藤典代編著、160～162頁、医薬ジャーナル社、大阪、2011年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 一真 (YAMAUCHI KAZUMA)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：80336891

(2) 研究分担者

山中 昇 (YAMANAKA NOBORU)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：10136963

研究分担者

保富 宗城 (HOTOMI MUNEKI)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90336892

研究分担者

戸川 彰久 (TOGAWA AKIHISA)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：70305762

: