

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32425

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592783

研究課題名(和文) EBウイルス由来小RNA EBERを介した自己免疫応答誘導の可能性の検討

研究課題名(英文) Study of autoimmune reaction induced by Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA (EBER)

研究代表者

井上 裕子 (INOUE, HIROKO)

日本薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50367306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：シェーグレン症候群(SS)は乾燥性角結膜炎や口腔乾燥症などの症状を呈する自己免疫疾患であり、その発症にはEpstein-Barr (EB)ウイルスの再活性化が関与している事が推測されている。今回本研究ではEBウイルス感染細胞が持つnon-coding RNAであるEBERが、ヒト唾液腺上皮細胞において、TLRを介して様々なサイトカインを産生する事を確認した。また、マウスにEBウイルス感染細胞の核抽出液を投与し、自己抗体の発現を増強することを見だし、さらにin vitroで作成したEBERでは、一般的なTLR3のリガンドであるpoly(I:C)に比べて高い抗体活性が認められた。

研究成果の概要(英文)：Sjogren's syndrome (SS) is an organ-specific autoimmune disease caused by the progressive loss of exocrine glands and is associated with several autoimmune phenomena. Several reports have suggested that reactivation of Epstein-Barr virus (EBV) may be a cause of SS. In this study, we revealed that EBV noncoding RNA, EBER, induced various cytokine in human salivary gland epithelial cell lines. In C57/B6 mice, nuclear extract (NE) from EBV infected B cell line induced expression of autoantibody, anti-SSB/La. Moreover, in NZW/NZB F1 mice, recombinant EBER induced anti-SSB/La antibody more efficiently than poly(I:C), TLR ligand.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Epstein-Barr virus シェーグレン症候群 自己抗体 TLR

1. 研究開始当初の背景

臓器特異的自己免疫疾患であるシェーグレン症候群(SS)は乾燥性角結膜炎や口腔乾燥症などの外分泌腺特異的に症状を呈する疾患であり、その発症には Epstein-Barr (EB)ウイルスの再活性化が関与している事が推測されている。EBウイルスは大半の成人に潜伏感染しており、その再活性化はSSのみならず、関節リウマチ(RA)や全身性エリテマトーデス(SLE)などの自己免疫疾患、伝染性単核症、慢性疲労症候群などの病態形成に関与していることが報告されている。従来より、SS患者血清中にEBウイルスに関連した抗体価の上昇を認めた報告、EBウイルスに起因する伝染性単核球症からSSに移行した例等多くの報告があり、研究代表者や分担者らはSS患者末梢血中、唾液中および口唇腺組織でのウイルスコピー数の上昇を報告し(*J.Exp.Med.* 169:2191-2198, 1989)、EBウイルスのホモログであるIL-10遺伝子導入マウスで本症に類似した病態が形成されること(*J.Immunol.*, 162:2488-2494, 1999)、SS患者由来B細胞株が無刺激下で高率にEBウイルスを産生することやVirus capsid antigenの発現がみられること、さらにSS患者唾液中のサイトカインによりEBウイルスが再活性化する可能性(*Immunology*,111:223-229, 2004)を報告し、新たに特定したSSの病因抗原(*Science*, 276:604-607, 1997)がEBウイルスの再活性化に伴うアポトーシスにより発現する機構を明らかにした(*J.Immunol.*, 166:5801-5809, 2001)。また、最近ではSS患者唾液中にダイオキシン受容体活性化因子およびEBウイルス再活性化因子が存在し、それらは正の相関を認められる事を見だし、さらに患者唾液のEBウイルス再活性化能と血清中の自己抗体価を解析したところ、EBウイルス再活性化能は抗Ro/SSA抗体とは相関は認められなかったものの(図1)、よりSSに特異性が高い抗La/SSB抗体の間に正の相関を認めた。これらの結果をまとめ、*Journal of Immunology* に掲載された(2012、

188:4654-62)た。

EBウイルス感染細胞にはポリAを持たないnon-coding RNAである Epstein - Barr virus-encoded small RNA (EBER)が存在する。EBERはRNAポリメラーゼIIIにより転写され、それぞれ167および173塩基からなるEBER-1およびEBER-2の2種類が存在する。EBERは複数のステムループ構造を含む高度な2次構造を形成すると推測されており(右図)、細胞内小RNAであるU6小RNAと高い類似性を示す事が知られている。TLR3やRIG-1はウイルスの二本鎖RNAを認識し自然免疫で重要な役割を示す分子として知られるが、EBERはこれらの分子と結合する事が報告され(*EMBO J* 2006, *J Exp Med* 2009)、EBERによるIL-10やIL-6、IFNなどのサイトカインの産生に寄与している可能性が考えられている。また、EBERは細胞内蛋白質のLa/SSB抗原と結合し複合体を形成する事がSLE患者末梢血中で検出された事で明らかとなり(*Proc. Natl. Acad. Sci.* 1981)、最近ではEBウイルス感染細胞から放出されるEBERはLa蛋白と複合体を形成していることも報告された(*J Exp Med* 2009)。La/SSBおよびRo/SSAはリボ核蛋白(RNP)複合体に含まれる蛋白質で、SS患者の血清中にこれらに対する自己抗体が認められ、抗La抗体や抗Ro抗体の存在はSSの診断基準の一つにもなっている。このうちでも特に抗La/SSB抗体はSSで特異性が高い自己抗体として知られている。しかしながら、EBERがSSを始めとする自己免疫疾患の病態形成にどの様に関与しているかは未だ不明の点が多く残されている。

2. 研究の目的

EBウイルスはSSを始めとする自己免疫疾患の発症に関与する事が報告されているが、その発症機構への関与は不明の点が多い。またSSでは血清中に核蛋白であるLa/SSBやRo/SSAに対する自己抗体の出現が認められ、この自己抗体がSSの診断基準の一つともなっている。特にLa/SSBに対する抗体はSSとの特性が高く認

められており、EB ウイルスがコードする小 RNA の EBER と複合体を形成する事が報告されているが、SS の病態形成にどの様に関わっているかは不明である。本研究では、EBER による自己抗原の修飾により、自己免疫応答が誘導もしくは増強されるか否かをマウスに直接免疫することにより検討を行う。自己免疫応答の有無は、血清中の自己抗体を経時的にスクリーニングする事により確認をし、また唾液腺局所の病態は免疫組織学的手法にて検討を行う。また、唾液腺機能障害の有無は唾液分泌量を測定することで確認する。さらにこれらの反応が La/SSB 抗原特異的なものであるかは唾液腺局所に浸潤しているリンパ球の機能を解析して確認をする。

3. 研究の方法

EB ウイルスの non-coding RNA である EBER とリボ蛋白の一つである La/SSB 蛋白複合体が正常マウスに SS 様の自己免疫疾患を誘導出来るか否かを検討する。平成 23 年度は、La/SSB 蛋白および EBER の発現プラスミドを作成する。また La に対する自己抗体を検出するための手法としての ELISA 法の確立を行う。平成 24 年度以降は作成した La-EBER 複合体を正常マウスへ投与し、経時的に採取した血清中の抗 La 抗体の出現を解析する。また、同時にピロカルピン刺激による唾液分泌能も検討する。4 ヶ月後にマウス唾液腺を摘出し、リンパ球浸潤等の自己免疫病変の有無を免疫組織学的な解析を行い、さらに浸潤リンパ球を抗原と培養し抗原特異的リンパ球の存在を確認する。

La/SSB 蛋白、EBER の発現プラスミドを作成し、抗 La 自己抗体を検出するための、ELISA の系を立ち上げる。La/SSB 蛋白と EBER の複合体は 1) それぞれを *in vitro* で発現させて複合体を形成させる、2) それぞれの発現プラスミドを細胞に遺伝子導入して複合体を形成させる、2 種類の方法で行う。マウス La/SSB はマウスの唾液腺組織由来

RNA より、ヒト La/SSB はヒト唾液腺上皮細胞株の HSY 由来 RNA から cDNA を合成し PCR 法で増幅する。増幅した PCR 産物は T ベクターの pGEM-T easy vector (PROMEGA) に組み込み、シーケンスを確認しておく。細胞への遺伝子導入には pCI-neo(Promega) を、大腸菌での発現には Glutathione-S transferase (GST) を連結できる pGEX-2T(GE ヘルスクエア・ジャパン) それぞれのベクターを用い、pGEM-T easy vector から La をコードする領域を切り出し、それぞれのベクターに連結させる。

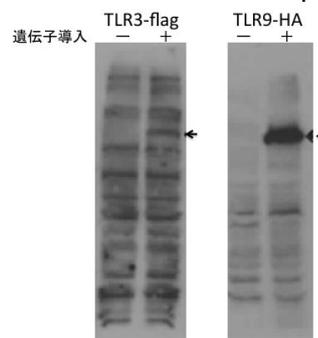
EBER は EB ウイルス感染細胞の Akata 細胞から RNA を抽出し、cDNA を合成後 PCR 法にて EBER1 および EBER2 を増幅し pGEM-T easy vector に組み込み、シーケンスを確認しておく。細胞内で発現させる際にはヒト U6 promoter から small RNA を効率良く転写できるプラスミドである RNAi-Ready pSIREN-Shuttle(Takara) に、*in vitro* で転写させるには T7 RNA polymerase promoter を有する pCMVTnT Vector (Promega) に EBER のコード領域を pGEM-T easy vector から切り出して、それぞれのベクターに連結させる。

4. 研究成果

1) TLR-9 プラスミドの作成

TL-9 プラスミドを作成するため、HSY 細胞の RNA より cDNA を作成後、TLR-9 特異的なプライマー - 3' gctagcagcatgggtttct5'、3' tctagattcggccgtgggtccc5' を用いて ORF 領域を増幅し、T-vector に組み込んだ後、さらに HA をすでに組み込んである pCI

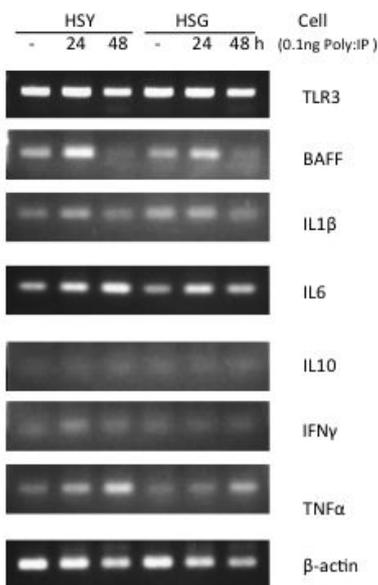
neo プラスミドに組み替えて発現プラスミドを得た。作成した TLR9-HA プラスミドおよび、Addgene より購入した TLR3-flag の発現を HeLa 細胞に遺伝子導入し、ウエスタンブロット法にて確認した。



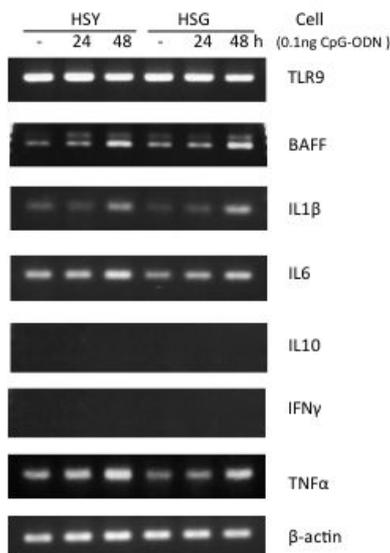
2) ヒト唾液腺細胞を用いた、TLR3、TLR8、TLR9 刺激を介したサイトカイン産生に関する検討

ヒト唾液腺上皮細胞の HSG、ならびに HSY に TLR3、TLR8、TLR9 の発現プラスミドをそれぞれ遺伝子導入し、それぞれのリガンドである poly(I:C)、CpG、R848 で刺激をしたのちに、サイトカインの遺伝子発現について検討を行った。その結果、TLR8 を介した刺激では HSG、HSY 細胞ともサイトカイン発現に変化は認められなかった。

一方、TLR3 を介した刺激では、IL-6、TNF は刺激 48 時間後に発現増強が認められ、BAFF に関しては、24 時間後に増強後 48 時間後には減少する傾向が認められた。

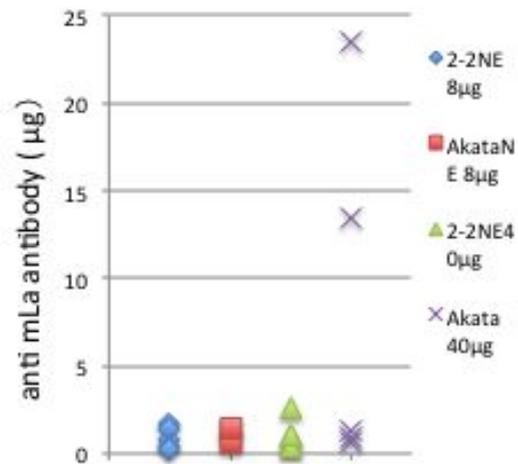


また、TLR9 を介した刺激では、BAFF、IL-1、IL-6、TNF に発現増強が認められた。



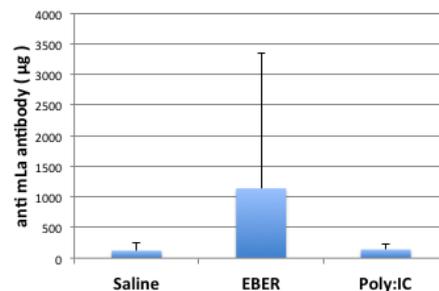
3) EB 感染細胞核抽出液の自己抗体産生に及ぼす影響の検討

EB 感染 B 細胞株である Akata 細胞の核抽出液をメスの C57BL/B マウスに投与後、唾液分泌量ならびに抗 SSB/La 抗体について、検討を行った。コントロールに EB ウイルスに感染していない、Akata2-2 細胞を用いた。その結果、核抽出液 40 μg を投与した群では、抗 SSB/La 抗体の産生増強が認められた。



4) EBER による NZB/NZW F1 マウスにおける自己抗体産生の産生の検討

リコンビナントの EBER は B95-8 細胞から抽出した RNA を元に、EBER を取り出し、T7 を持つプラスミドに組み込んだ後、in vitro transcription により得た。NZB/NZW F1 マウスに EBER もしくは poly(I:C)を投与し、経時的に抗 SSSB/La 抗体の定量を行った。



その結果、EBER ではコントロールに TLR3 リガンドのコントロールとして用いた poly(I:C)に比べて、高い抗体価が認められた。

これらのことから、EBER は TLR 3 のみならず、複数の経路を経て、自己抗体の産生に参与している可能性が示唆された。

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 10 件)

1. Takahashi A, Inoue H, Mishima K, Ide F, Nakayama R, Hasaka A, Ryo K, Ito Y, Sakurai T, Hasegawa Y, Saito I. Evaluation of the effects of quercetin on damaged salivary secretion. *PLoS one*.10:e0116008, 2015. 査読有り
2. Tsuboi H, Asashima H, Takai C, Hagiwara S, Hagiya C, Yokosawa M, Hirota T, Umehara H, Kawakami A, Nakamura H, Sano H, Tsubota K, Ogawa Y, Takamura E, Saito I, Inoue H, Nakamura S, Moriyama M, Takeuchi T, Tanaka Y, Hirata S, Mimori T, Yoshifuji H, Ohta A, Matsumoto I, Sumida T. Primary and secondary surveys on epidemiology of Sjogren's syndrome in Japan. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*.24:464-470, 2014. 査読有り
3. Ryo K, Takahashi A, Tamaki Y, Ohnishi-Kameyama M, Inoue H, Saito I. Therapeutic effects of isoflavones on impaired salivary secretion. *J Clin Biochem Nutr*.55:168-173, 2014. 査読有り
4. Imai K, Kamio N, Cueno ME, Saito Y, Inoue H, Saito I, Ochiai K. Role of the histone H3 lysine 9 methyltransferase Suv39 h1 in maintaining Epstein-Barr virus latency in B95-8 cells. *The FEBS journal*.281:2148-2158, 2014. 査読有り
5. Yamamura Y, Yamada H, Sakurai T, Ide F, Inoue H, Muramatsu T, Mishima K, Hamada Y, Saito I. Treatment of salivary gland hypofunction by transplantation with dental pulp cells. *Archives of oral biology*.58:935-942, 2013. 査読有り
6. Tsuboi H, Hagiwara S, Asashima H, Umehara H, Kawakami A, Nakamura H, Sano H, Tsubota K, Ogawa Y, Takamura E, Saito I, Inoue H, Nakamura S, Moriyama M, Takeuchi T, Tanaka Y, Hirata S, Mimori T, Matsumoto

I, Sumida T. Validation of different sets of criteria for the diagnosis of Sjogren's syndrome in Japanese patients. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*.23:219-225, 2013. 査読有り

7. Mishima K, Inoue H, Nishiyama T, Mabuchi Y, Amano Y, Ide F, Matsui M, Yamada H, Yamamoto G, Tanaka J, Yasuhara R, Sakurai T, Lee MC, Chiba K, Sumimoto H, Kawakami Y, Matsuzaki Y, Tsubota K, Saito I. Transplantation of side population cells restores the function of damaged exocrine glands through clusterin. *Stem Cells*.30:1925-1937, 2012. 査読有り
8. Inoue H, Mishima K, Yamamoto-Yoshida S, Ushikoshi-Nakayama R, Nakagawa Y, Yamamoto K, Ryo K, Ide F, Saito I. Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Induction of EBV Reactivation as a Risk Factor for Sjogren's Syndrome. *J Immunol*.188:4654-4662, 2012. 査読有り
9. Imamura TK, Yoshino Y, Yamachika S, Ishii H, Watanabe NY, Inoue H, Nakagawa Y. Inhibition of pilocarpine-induced saliva secretion by adrenergic agonists in ICR mice. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*.39:1038-1043, 2012. 査読有り
10. Imai K, Inoue H, Tamura M, Cueno ME, Takeichi O, Kusama K, Saito I, Ochiai K. The periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* induces the Epstein-Barr virus lytic switch transactivator ZEBRA by histone modification. *Biochimie*.94:839-846, 2012. 査読有り

〔学会発表〕(計 19 件)

井上裕子、シェーグレン症候群における aryl hydrocarbon 受容体を介した EB ウィルス再活性化機構の解明、第 21 回日本シェーグレン症候群学会学術集会 シンポジウム、ウェスティン都ホテル京都、2012.9.7-9.8
吉野陽子、井上裕子、他 長期フェニレフ

リン刺激によるカリクレイン分泌抑制と顎下腺細胞内 Ca²⁺濃度の関与、第 66 回口腔科学会、広島国際会議場、2012.5.17-18

新美愛、井上裕子、他 イソフラボンによる唾液分泌促進効果の検討、第 5 回口腔検査学会、日本大学法学部、2012.8.25-8.26

山村優花、井上裕子、他 唾液分泌改善を目的とした歯髄細胞から血管内皮細胞への分化誘導の検討、第 12 回日本抗加齢医学会、パシフィコ横浜、2012.6.22-6.24

井上裕子、カロリー制限による唾液分泌能改善効果の分子機構の解明、唾液腺学会、文京学院大学、2012.12.01-12.01

井上裕子、カロリー制限による唾液分泌能改善効果の分子機構の解明、日本分子生物学会、マリンメッセ福岡、2012.12.11-12.13

Hiroko Inoue、Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Induction of Epstein-Barr Virus Reactivation as a Risk Factor for Sjogren's Syndrome、International SS meeting Workshop、Kyoto Hotel Okura、2013.10.09-10.12

吉野陽子、井上裕子、他 長期フェニレフリン刺激によるカリクレイン分泌抑制と PKC 活性化の関与、第 67 回口腔科学会、栃木県総合文化センター、2013.5.22-5.24

高橋絢子、井上裕子、他 ケルセチンによる唾液分泌機能亢進の可能性の検討、第 13 回日本抗加齢医学会、パシフィコ横浜、2013.6.28-6.30

梁 洪淵、井上裕子、他 ドライマウス(口腔乾燥症)に対するイソフラボンの唾液分泌促進効果の検討、第 13 回日本抗加齢医学会、パシフィコ横浜、2013.6.28-6.30

井上裕子、カロリー制限による唾液分泌能改善効果の分子機構の解明、第 102 回日本病理学会総会、ロイトン札幌、2013.6.6-6.8

Hiroko Inoue、The molecular mechanism of salivary dysfunction amelioration by calorie restriction、SFRR、京都国際会議場、2014.3.23-3.26

高橋絢子、井上裕子、他 唾液分泌障害に対するケルセチンの効果の検討、第 103 回日本病理学会、広島国際会議場、2014.4.24-4.26

井上裕子、カロリー制限による唾液分泌機序の解明、第 14 回日本抗加齢医学会 シンポジウム、大阪国際会議場、2014.6.6-6.8

井上裕子、EBV の再活性化とシェーグレン症候群、第 23 回日本シェーグレン症候群学会学術集会 シンポジウム、ホテルニュー長崎、2014.9.12-9.13

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 裕子 (INOUE, Hiroko)
日本薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号: 52367306

(2) 研究分担者

斎藤 一郎 (SAITO, Ichiro)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号: 60147634

(3) 研究分担者

村松 敬 (MURAMATSU, Takashi)
東京歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 00276982

(4) 研究分担者

梁 洪淵 (RYO, Kofuchi)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号: 10298268