

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09928

研究課題名(和文) EBウイルス遺伝子導入マウスによるシェーグレン症候群発症機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of Sjogren's syndrome pathogenesis by EBV reactivation promoter gene transgenic mice

研究代表者

中山 亮子 (Nakayama, Ryoko)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：50749843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Epstein-Barrウイルス(EBウイルス)再活性化因子BZFL1プロモーター領域下流にルシフェラーゼを連結した遺伝子を導入したTgマウスを用いて、女性ホルモン低下がEBウイルスの再活性化を引き起こすかを検討した。  
卵巣摘出(OVX)処置を施す週齢や処置後の観察期間などの検討を繰り返したところ、10週齢までにOVX処置をして10週以降で唾液分泌量の有意な低下と唾液中のアミラーゼ活性の低下の低下傾向、および唾液腺組織でのBZFL1プロモーター活性の増加傾向を認めた。  
このことから、エストロゲン量の低下、あるいは低下に伴う生体の恒常性の変化によりEBウイルスが再活性化しうる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シェーグレン症候群は本邦ではおよそ50万人の患者が想定されている。本症では、唾液腺の組織障害を起因とした口腔乾燥症により食事が困難となり、口腔内の疼痛、味覚障害、歯周病のリスク、口臭などから日常生活のQOLを著しく低下するほか、約3割の患者には間質性肺炎・腎炎・中枢神経障害など重度の臓器傷害を発症し、一部は悪性リンパ腫などの腫瘍性疾患に進展する疾患である。  
本研究課題の遂行により得られた成果は、中高年の女性に発症することの多い難病である本症についてその病態成立機序解明の一助となりうる。これは、高齢化社会において女性が長く健康で社会で活躍するために重要であり、社会的意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We previously established transgenic mice with a luciferase gene linked downstream of the promoter region of BZFL1, an Epstein-Barr virus (EB virus) reactivation factor. This study was conducted to determine whether the reduction of female hormones by ovariectomy (OVX) causes EB virus reactivation.

Examinations were repeated at various ages, such as weeks of OVX treatment and observation period after OVX treatment. Resulted significant decrease in salivary secretion and a decreasing trend of -amylase activity in saliva and an increasing trend of BZFL1 promoter activity in salivary gland tissues were observed after 10 weeks of OVX treatment.

This suggests that the EB virus may be reactivated by a decrease in estrogen levels or by changes in homeostasis of the body associated with a decrease in estrogen levels.

研究分野：分子病理学 病態生化学

キーワード：EBウイルス シェーグレン症候群 エストロゲン 自己免疫疾患 唾液分泌障害

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群 (SS) は、免疫学的寛容の破綻を介し活性化した自己反応性リンパ球により唾液腺や涙腺などに慢性炎症を生じ、外分泌腺の機能低下等を呈する自己免疫疾患であるが、発症は更年期の女性に著しく多いことが知られている。SS ではヒトの大半に潜伏感染している Epstein Barr ウイルス (EB ウイルス) が再活性化していることや (Saito I. *et al.*, *J Exp Med.* 1989, Nagata Y, Saito I *et al.* *Immunol.* 2004, Igoe A *et al.* *Curr Opin Rheumatol.* 2013)、EB ウイルスの再活性化によるアポトーシスが自己抗原の成立に作用している事などが報告されてきたが (Inoue H, Saito I. *et al.* *J Immunol.* 2001)、年齢差や性差なく広範囲に潜伏感染しているこの EB ウイルスがどのような機序で中高年の女性に偏って活性化するのかは明らかではない。

### 2. 研究の目的

従来の知見から BZLF1 遺伝子のプロモーター活性は EB ウイルス活性化の指標と考えられており、研究代表者らは BZLF1 プロモーター領域の下流にホタルルシフェラーゼを連結した遺伝子を導入したマウス (Zp-Luc マウス) を作出した。そして本研究では、女性ホルモン低下による EB ウイルスの再活性化を介した SS の病態形成について検討を行うものとした。

### 3. 研究の方法

まずはメスの野生型 C57BL/6 マウスに卵巣摘出处置 (OVX) または偽手術 (Sham) を施し、ピロカルピン (1mg/kg) 刺激時 30 分間の唾液分泌量を経時的に測定し、OVX 群で唾液分泌量の低下を認めた段階でマウスを解剖し、唾液腺と血清の試料を保存した。

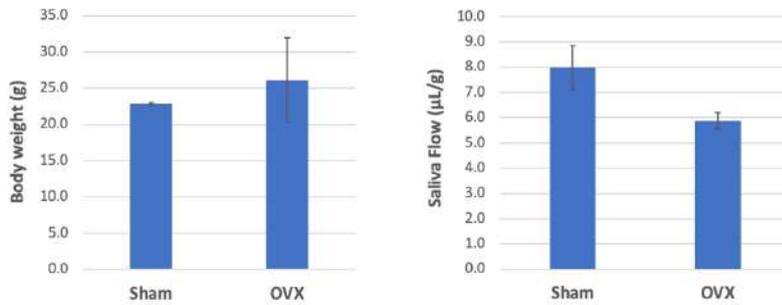
次に、10 週齢の Zp-Luc マウスに対し同様に処置 (OVX: n=4, sham: n=3) をし、2 週間毎に唾液分泌量の測定を行い 10 週後に解剖し唾液腺と唾液と血清を保存した。唾液腺は顎下腺と耳下腺に分けホモジナイズした遠心上清をプロモーターアッセイの試料とした。

マウスに人工的に唾液腺特異的自己免疫応答を誘発するために、抗原として野生型マウスの顎下腺より組織破砕液を調整した。4 週齢のメスの C57BL/6 マウスに OVX または Sham 処置を施した。その後 8 週齢まで飼育しそれらを 2 群に分けた。一方には上記の抗原 (SMG) をもう一方には生理食塩水 (CTL) をアジュバントと共に皮下注射で免疫した。初回免疫の後、追加免疫を 2 回実施しながら、唾液分泌量を経時的に測定した。マウスは 30 週齢で解剖し唾液腺と脾臓の組織を摘出し、パラフィン包埋組織切片、タンパク、あるいは RNA 試料として保存した。

### 4. 研究成果

#### 【野生型マウスによる検討】

7 週から 15 週までのメスの C57BL/6 マウスに Sham または OVX 処置を施したところ、処置後 4 週で体重の増加と唾液分泌量の低下を認めた。



その後マウスを解剖して解析した結果、OVX 処置により摘出した卵巣は顕著な萎縮を認め、LC-MS/MS 法により測定した血清中のエストロゲン (E2) 量は検出限界値以下まで低下しており、実験者の処置の適切さが確認された。



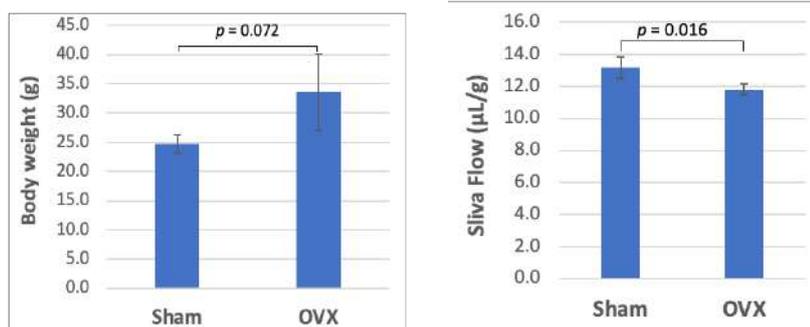
マウス血清中超高感度E2濃度

| No. | 検体名  | E2     |
|-----|------|--------|
|     |      | pg/mL  |
| 1   | OVX  | 0.024  |
| 2   | Sham | 10.506 |
| 3   | ♂    | 0.104  |

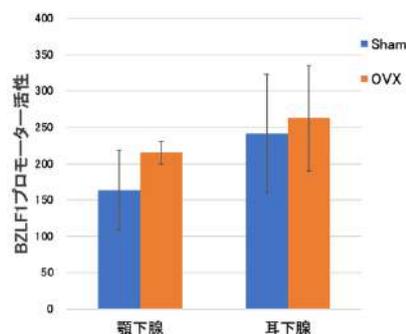
また、摘出した唾液腺組織でパラフィン切片を作製し HE 染色を行ったが、組織形態学的には OVX 群と Sham 群に明らかな差異は認められなかった。また、アポトーシスマーカーである TUNEL 染色でも比較したが、OVX 群での顕著な TUNEL 陽性細胞の増加はみられなかった。

【Zp-Luc マウスによる検討】

10 週齢で OVX 処置を施された Zp-Luc マウスでは 10 週後すなわち 20 週齢で体重の有意な増加とともに、唾液分泌量の有意な低下が認められた。



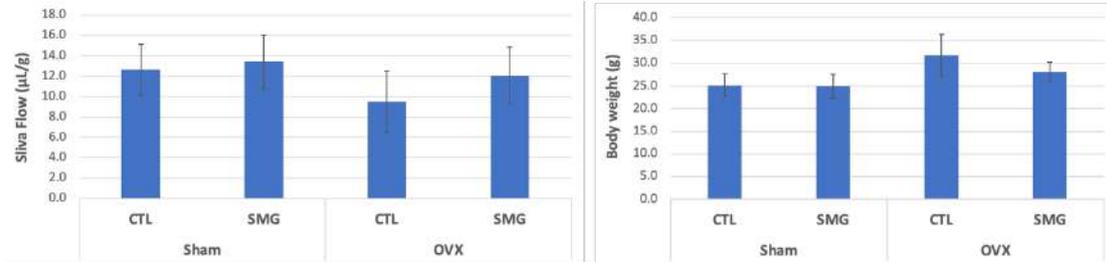
唾液腺組織のルシフェラーゼ活性は有意ではなかったが OVX で増加の傾向を認めた。



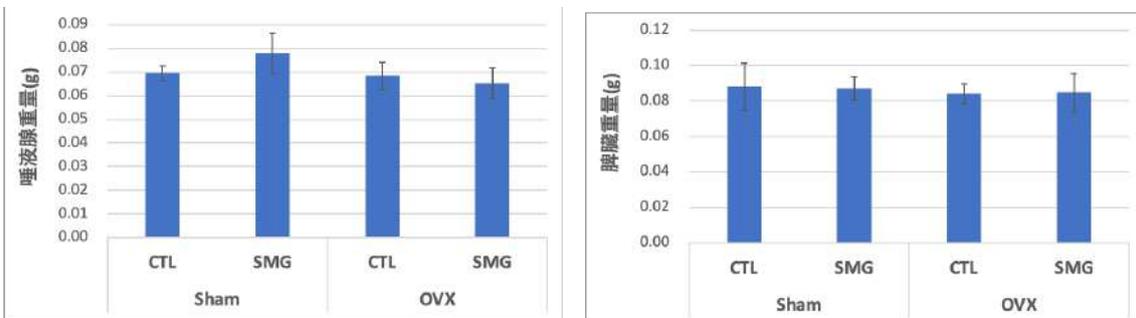
【唾液腺特異的自己免疫応答誘導試験】

OVX 処置および顎下腺組織破碎液の免疫開始より 18 週後の 26 週齢では既報の論文やこれまでに実施してきた予備試験と同様に OVX(CTL) 群で顕著な唾液分泌量の低下を認めたが、さらに 4 週後の 30 週齢の頃には Sham(CTL) においてもそれまでより唾液分泌量が低下し、OVX(CTL) 群との明瞭な差異が認められなくなった。

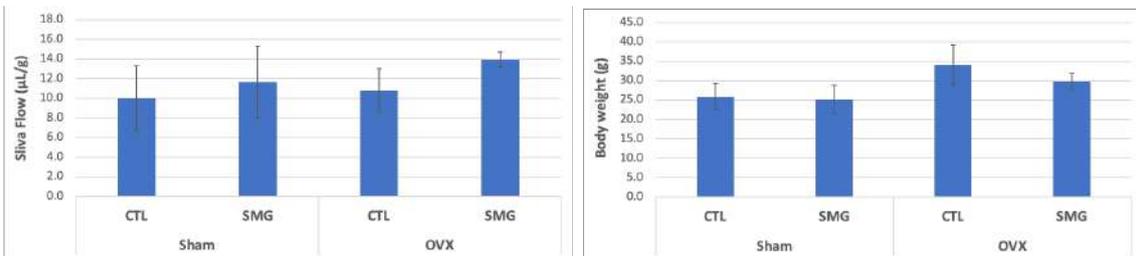
(26 週齢での唾液分泌量と体重)



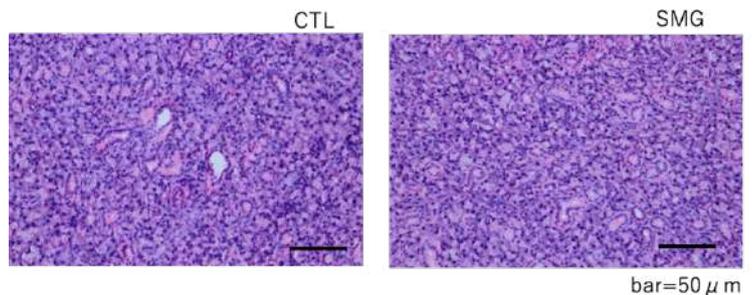
(30 週齢での唾液分泌量と体重)



(唾液腺と脾臓の重量)



Sham 処置における自己免疫応答誘導モデルで唾液腺重量の増加傾向を認めたが、それ以外は臓器重量に大きな変化は認められなかった。唾液腺組織の病理組織標本の観察では顎下腺組織破碎液の免疫によって生じると予想されたリンパ球浸潤などの病変を認めることができなかった。



その他、RNA や唾液の試料などの解析は助成期間終了後も引き続き継続して成果を積み重ねる予定であるが、自己免疫応答モデルとしては、組織破碎液の免疫でなく NZB/W F1 マウスなど自己免疫疾患モデルとして確立された系統の動物の使用を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Yamazaki Tomoe, Ushikoshi-Nakayama Ryoko, Shakya Supriya, Omagari Daisuke, Matsumoto Naoyuki, Nukuzuma Chiyoko, Komatsu Tomoko, Lee Masaichi Chang-il, Inoue Hiroko, Saito Ichiro | 4. 巻<br>11          |
| 2. 論文標題<br>The effects of bathing in neutral bicarbonate ion water  | 5. 発行年<br>2021年     |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>21789 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41598-021-01285-4   | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Supriya Shakya, Ushikoshi-Nakayama Ryoko, Yamazaki Tomoe, Omagari Daisuke, Aota Keiko, Inoue Hiroko, Matsumoto Naoyuki, Saito Ichiro          | 4. 巻<br>72              |
| 2. 論文標題<br>Effects of polyphenols in non-centrifugal cane sugar on saliva secretion: in vitro and in vivo experiments and a randomized controlled trial | 5. 発行年<br>2023年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition  | 6. 最初と最後の頁<br>171 ~ 182 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3164/jcbrn.22-114   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>中山亮子、山崎智恵、シャッキヤ・スプリヤ、尾曲大輔、松本直行、奴久妻智代子、小松知子、李昌一、井上裕子、斎藤一郎 |
| 2. 発表標題<br>中性重炭酸イオン水の温浴効果   |
| 3. 学会等名<br>第22回抗加齢医学会総会   |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>シャッキヤ・スプリヤ、中山亮子、山崎智恵、尾曲大輔、松本直行、井上裕子、斎藤一郎                        |
| 2. 発表標題<br>Possible effects of brown sugar polyphenols on saliva secretion |
| 3. 学会等名<br>第22回抗加齢医学会総会  |
| 4. 発表年<br>2022年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                  | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)        | 備考            |
|-------|--|------------------------------|---------------|
| 研究分担者 | 松本 直行<br>(Matsumoto Naoyuki)<br>(20386080) | 鶴見大学・歯学部・准教授<br><br>(32710)  |               |
| 研究分担者 | 井上 裕子<br>(Inoue Hiroko)<br>(50367306)      | 日本薬科大学・薬学部・教授<br><br>(32425) |               |
| 研究分担者 | 斎藤 一郎<br>(Saito Ichiro)<br>(60147634)      | 鶴見大学・歯学部・教授<br><br>(32710)   | 削除:2022年3月15日 |
| 研究分担者 | 山崎 智恵<br>(Yamazaki Tomoe)<br>(80817122)    | 鶴見大学・歯学部・学部助手<br><br>(32710) |               |
| 研究分担者 | 尾曲 大輔<br>(Omagari Daisuke)<br>(10608699)   | 鶴見大学・歯学部・助教<br><br>(32710)   |               |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|