

骨びらんを引き起こす破骨細胞の異常分化・活性化への Epstein-Barr ウイルスの関与; EBV による破骨細胞の分化・活性化に必須となる receptor activator nuclear factor- κ B ligand(RANKL)発現誘導

The Effect of Epstein-Barr Virus on Aberrant Osteoclastogenesis Causing Bone Erosion: induction of Receptor Activator Nuclear Factor- κ B Ligand (RANKL) Essential for Osteoclastogenesis by Epstein-Barr Virus

岩田光浩^{1),2)}、長澤洋介¹⁾、北村 登¹⁾、野崎高正¹⁾、都築 広¹⁾、長塚靖子¹⁾、水野瑛子¹⁾、渡邊美遥¹⁾、今留謙一³⁾、藤原成悦^{1),4)}、武井正美¹⁾

Mitsuhiro IWATA^{1),2)}, Yosuke NAGASAWA¹⁾, Noboru KITAMURA¹⁾, Takamasa NOZAKI¹⁾, Hiroshi TSUZUKI¹⁾, Yasuko NAGATSUKA¹⁾, Eiko ISHIZUKA-MIZUNO¹⁾, Miharu WATANABE¹⁾, Ken-ichi IMADOME³⁾, Shigeyoshi FUJIWARA^{1),4)}, Masami TAKEI¹⁾

¹⁾日本大学医学部 内科学系血液膠原病内科学分野、²⁾日本大学医学部 免疫アレルギー学プロジェクトチーム、³⁾国立成育医療研究センター研究所 免疫アレルギー・感染研究部

[要旨]

ヒト化 nonobese diabetic/Shi-scid/ γ c^{null} (NOG)マウスで Epstein-Barr ウイルス(EBV)感染により関節リウマチ(RA)類似びらん性関節炎が発症する。本マウスで骨びらん形成の主役と考えられるヒト破骨細胞の異常分化・活性化の機序を解明するため、破骨細胞の分化・活性化に必須となるヒト receptor activator nuclear factor- κ B ligand(RANKL)発現誘導への EBV の関与について検討した。過去の報告に準じてヒト化マウスを作製し、EBV(B95-8 産生、Akata 株産生)を感染させた。感染後 8–10 週でマウス末梢血を採取し、RANKL 発現と発現細胞の解析を flow cytometry により行った。また、EBV 未感染の臍帯血ならびに B-cell line Ramos 細胞を EBV 含有培養液で培養し、マウス末梢血と同様手法により RANKL 発現を解析した。EBV 感染の有無は real-time PCR 法により EBV DNA 定量で行った。結果は、EBV 感染ヒト化 NOG マウスの末梢血にヒト RANKL 発現を認め、発現細胞は EBV の第一標的である B 細胞であった。EBV 未感染マウス末梢血には RANKL 陽性細胞は認められなかった。EBV は臍帯血 B 細胞および Ramos 細胞に *in vitro* で感染し、RANKL 発現を誘導した。両細胞からは高レベルの EBV DNA が検出され、EBV 感染が確認された。以上の結果から、EBV は、感染により B 細胞に破骨細胞の分化・活性化に必須な RANKL の発現を誘導し、関節に骨びらんと伴う関節炎を引き起こすことが示唆された。

[背景]

Epstein-Barr ウイルス(EBV)の関節リウマチ(RA)への関与は、1970 年後半から始まった多くの研究報告から強く示唆されている。我々の研究グループでも、これまでに EBV と RA に関し多くの研究報告を行ってきた。¹⁾ EBV はヒト以外では新世界ザルにしか感染しないため、長らく動物を使用した実験で検討を行うことが困難であった。近年、重度免疫不全(SCID)マウスを用い免疫系をヒト化したマウスが開発され、²⁾ EBV 感染実験が本マウスで可能となった^{3),4)}。我々は nonobese diabetic/Shi-scid/ γ c^{null} (NOG)マウスにヒト臍帯血由来 CD34⁺の造血幹細胞を移植し、免疫系をヒト化したヒト化 NOG マウスに EBV を感染させ、RA 類似の骨びらんを伴う関節炎を発症する実験動物モデルを作製し、2011 年に報告した⁵⁾。さらに、本マウスで観察される骨びらんの形成は、ヒト破骨細胞が主役である可能性が高いこと、そして、マウス骨髄に生着したヒト造血幹細胞から分化したヒト破骨細胞前駆細胞が、骨吸収能を持つ成熟ヒト破骨細胞へと分化することを明らかにした⁶⁾。正常個体では、骨を作る骨芽細胞と骨を吸収する破骨細胞とが相互作用しながら骨代謝のバランスをとっている。しかし、何らかの原因で破骨細胞の分化・活性化が異常に亢進しバランスが崩れると、過剰な骨吸収により骨びらんや骨損失を生じるようになる⁷⁾。これまでの我々の研究結果と考え合わせると、EBV 感染が破骨細胞の異常分化・活性化を引き起こし、骨びらんに形成する可能性が示唆された。

[目的]

骨びらんに引き起こす破骨細胞異常分化・活性化への EBV の関与について検討する目的で、本研究では破骨細胞の分化・活性化に必須となる receptor activator nuclear factor- κ B (RANK) signal を誘導する RANK ligand (RANKL, CD254)⁷⁾ 発現への EBV の関与について検討する。

[方法]

(1) 倫理的考慮

生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会に研究倫理および臨床研究審査研究申請書を提出し、当委員会の承認を得ている(日本大学医学部倫理委員会承認番号: 211-3、日本大学医学部付属板橋病院臨床研究審査委員会承認番号: RK-140613-11)。

(2) NOG マウスの免疫系ヒト化と EBV 感染

既報⁶⁾ に準じて行った。簡潔に以下に記す。7 週齢 NOG マウスにヒト CD34⁺造血幹細胞を移植し約 3 か月経過後、ヒト免疫系細胞の構築が十分であることを、flow cytometry(FCM)でマウス末梢血単核球のヒト CD45、CD3 および CD19 各マーカー

陽性細胞率を調べ評価した。EBV は、B-95-8 EBV 産生株(JCRB9123, Japanese Collection of Research Bioresources, Osaka)あるいは Akata 産生株から産生された EBV を精製し、 $1.0\text{--}2.0 \times 10^1 \text{ TD}_{50}/100 \mu\text{L}$ でマウス尾静脈から投与した。

(日本大学動物実験委員会承認番号：AP18MED010、AP18ME009-3)

(日本大学医学部遺伝子組換え実験安全委員会承認番号：2016 医、2018 医 7)

(3) 臍帯血単核球と B-cell line の EBV 感染

臍帯血提供者の両親から同意を得、日大医学部産婦人科学教室の協力のもとに取得した臍帯血から単核球を分離した。臍帯血単核球および Ramos (EBV-negative B-cell lymphoma cell line, ATCC) 細胞を EBV (Akata 株産生あるいは B95-8 細胞産生： $5.0 \times 10^1\text{--}2.0 \times 10^3 \text{ TD}_{50}$) 含有培養液(10–20% FBS 加 RPMI1640)で 5% CO₂ 下 37°C で感染培養した。

(4) RANKL 発現ならびに RANKL 発現細胞の解析

EBV 感染後 8-10 週(この時期に解剖し関節組織を検討するとほとんどの感染マウスでびらん性関節炎が確認されることを過去に報告)のマウス末梢血を採取し、溶血操作後に得られた白血球を抗ヒト RANKL モノクローナル抗体ほか各種リンパ球マーカーに対するモノクローナル抗体で染色し、multicolor FCM で解析した。同時に、同週齢未感染ヒト化 NOG マウスの末梢血も採取し同様解析を行った。EBV 含有培養液で培養開始した臍帯血単核球および Ramos 細胞は、経時的に RANKL 発現の推移を FCM で解析した。

(5) EBV DNA 定量

EBV 感染培養臍帯血単核球および Ramos 細胞から DNA を抽出し、EBV ウイルス DNA を real-time PCR で測定した。

[結果]

B95-8 EBV、Akata EBV で各 4 頭ずつ感染させたヒト化 NOG マウスの末梢血を FCM で解析した結果、どちらの EBV 感染でもすべての感染マウスでヒト RANKL 陽性細胞が認められ、RANKL 発現細胞は、B-cell marker である CD19、CD20 陽性細胞がほとんどであった。EBV 未感染マウス末梢血では、ヒト RANKL 陽性細胞は認められなかった。次に、B 細胞は EBV の第一標的であり、EBV による感染で B 細胞に RANKL 発現が誘導される可能性を考え、EBV 未感染新鮮臍帯血から単核球を分離し B95-8 EBV 含有培養液で培養し、FCM で RANKL 発現を経時的に調べた。その結果、EBV 感染後 2 週前後で RANKL 陽性細胞が出現しはじめ、4 週目では大半の細胞が RANKL 陽性 B 細胞となった。培養を続け感染後 8 週目でも RANKL 陽性 B 細胞は認

められた。異なる donor から得られた臍帯血単核球を、B95-8 EBV あるいは Akata EBV で感染させ同様に調べてみたが、結果は類似していた。感染 8 週後の両 donor の感染細胞からは、高レベルの EBV DNA が real time PCR で検出された。続いて、pure な B 細胞培養系で EBV 感染 RANKL 発現誘導を確認するため、EBV-negative B-cell lymphoma cell line Ramos を用いて検討した。EBV 未感染 Ramos 細胞では RANKL 発現はほとんど認められなかったが、B95-8 EBV 感染後 2 週間後で臍帯血同様に RANKL 陽性細胞が出現し始め、3-4 週で RANKL 陽性 Ramos 細胞が 30% を超えた。同細胞からは、高レベルの EBV DNA が real time-PCR で検出された。

[考察]

本研究で、骨びらんの主役である破骨細胞の分化・活性化に必須となる RANKL 発現への EBV の関与について検討した結果、RA 類似骨びらんを伴う関節炎が発症する EBV 感染ヒト化 NOG マウスの末梢血にヒト RANKL 発現が認められ、発現細胞のほとんどが EBV の第一標的である B 細胞であること、骨びらんを発症しない EBV 未感染マウス末梢血ではヒト RANKL 発現は認められないこと、さらに、in vitro で EBV に感染させた臍帯血 B 細胞ならびに B-cell line Ramos 細胞に RANKL 発現が誘導されることを明らかにした。その後の実験で、破骨細胞分化・活性化に必要な RANKL 以外の因子の発現も EBV が誘導すること、EBV 感染臍帯血 B 細胞が実際に破骨細胞を分化誘導するポテンシャルを有することを示唆する結果を得ており、現在検討を進めている。以上から、EBV は、破骨細胞の異常分化・活性化を引き起こし関節に骨びらんを形成することが強く示唆された。

[結論]

EBV は、感染により B 細胞に破骨細胞の分化・活性化に必須な signal 誘導分子の発現を誘導し、関節に骨びらんを伴う関節炎を引き起こすことが示唆された。

[参考文献]

- ¹⁾Takei M, Mitamura K, Fujiwara S, et al: Detection of Epstein-Barr virus-encoded small RNA 1 and latent membrane protein 1 in synovial lining cells from rheumatoid arthritis patients. *Int Immunol.* 1997; 9: 739-743.
- ²⁾Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood.* 2002; 100: 3175-3182.
- ³⁾Fujiwara S, Matsuda G, Imadome K. Humanized mouse models of Epstein-Barr virus infection and associated diseases. *Pathogens.* 2013; 2: 153-176.

- ⁴Yajima M, Imadome K, Nakagawa A, et al. A new humanized mouse model of Epstein-Barr virus infection that reproduces persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses. *J infect Dis.* 2008; 198: 673-682.
- ⁵Kuwana Y, Takei M, Yajima M, et al: Epstein-Barr virus induces erosive arthritis in humanized mice. *PLoS One.* 2011; 6: e26630.
- ⁶Nagasawa Y, Ikumi N, Nozaki T, et al: Human osteoclasts are mobilized in erosive arthritis of Epstein-Barr virus-infected humanized NOD/Shi-Scid/IL-2R γ^{null} mice. *American College of Rheumatology.* 2014; 66 (Suppl 1020).
- ⁷Leibbrandt A, Penninger J.M. RANK/RANKL: Regulator of immune responses and bone physiology. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008; 1143: 123-150.