

令和元年6月3日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11322

研究課題名(和文) サイトメガロウイルス前眼部感染症マネージメントの標準化と戦略的病態解明

研究課題名(英文) Immunopathological analysis of ocular anterior segment infection of cytomegalovirus and standardization for diagnosis

研究代表者

宮崎 大 (MIYAZAKI, Dai)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：30346358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：前眼部サイトメガロウイルス(CMV)感染症の診断技術評価のため、国内5施設における定量PCR法の検査品質の評価及び標準化を行った。CMV感染後角膜内皮では、I型インターフェロン応答、さらに抗原提示機能経路の活性化により獲得免疫系の抗ウイルス作用が発動されていた。前眼部CMV感染症においては、眼圧上昇が特徴的であり、高眼圧には、前房水におけるIL-8上昇の関連示唆された。さらに眼圧上昇の想定機序として、CMVは線維柱帯細胞に効率的に感染すること、角膜内皮と同様強いインターフェロン反応を誘導すること、さらにIL-8誘導や線維柱帯のリモデリングを誘導することを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般人口におけるヒトサイトメガロウイルス(CMV)の抗体価の陽性率の高さと比べ、前眼部サイトメガロウイルス(CMV)感染症の頻度は比較的まれである。しかし、前眼部CMV感染症は、健常成人に発症し、難治かつ遷延性の長期経過をたどる。その結果、水疱性角膜症や二次性緑内障を発症し、視機能の喪失にいたる。前眼部CMV感染症を適切にマネージするには、適切な診断とその病態の解明が必要である。本研究は、まず、前眼部CMV感染症の診断技術の標準化の提案を行った。次に、分子免疫学的にその病態解明を行うことにより、適切なマネージメントや新たな治療法の提案につながる知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：For diagnosis of ocular human cytomegalovirus (CMV) infection, performance of quantitative PCR was evaluated and validated in five major facilities.

When human corneal endothelial cells were infected with CMV, the global transcriptional responses indicated type I interferon as well as antigen presenting function which will activate anti-viral acquired immunity. Anterior segment infection of CMV was strongly associated with IOP elevation. Using aqueous humor of 101 glaucoma patients, high IOP was significantly associated with aqueous humor IL-8. Moreover, CMV strains were capable of infecting trabecular meshwork cells, and induce viral proteins of IE1, glycoprotein B(gB), and pp65 as well as actin stress fiber formation. Collectively, trabecular meshwork cells support the replication of CMV, and their infection may cause prolonged or recurrent IOP elevation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：サイトメガロウイルス 角膜内皮炎

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

新生児の1 - 3%はヒトサイトメガロウイルス(CMV)の垂直感染をおこすことが知られている。また、CMVは感染者1人が1.7人に感染させることが知られており、中年期をこえるとほとんどのヒトは既感染となる。しかし、多くの場合症状はない。一般に、CMV眼感染症は、免疫不全や臓器移植の折の合併症として網膜炎の病型としてみられる。近年、CMVは、網膜炎のみならず、前眼部感染症も引き起こすことが認識されるようになってきた。CMV前眼部感染症は、非常に長期の経過をたどることがわかってきている。その結果、二次性緑内障による視野障害や角膜内皮障害による水疱性角膜症をきたす。また、CMV前眼部感染症患者は免疫不全者ではない健康なヒトの初老期に発症する。しかし、CMV前眼部感染症がいったいなぜこのような病像となるのかの詳細は不明であった。

CMV前眼部感染症はまれな病態と考えられてきた。しかし、角膜内皮炎や眼圧上昇を伴う再発性虹彩炎の数割近くがCMV感染に関連していることを我々は明らかにしてきた。このことは、本疾患の病態や治療法の解明が多くの患者を救う重要な臨床的意義を有することを示している。

CMVは、cell tropismが強く、株により細胞種への感染性は異なるという特徴がある。また、CMVの増殖力は弱く、ヒトにしか感染しない。このため、病態解析のための動物モデルの使用も妥当性が低く、CMVの前眼部感染の病態解明には困難が伴う。一方、CMVと同じく、虹彩炎や内皮炎や眼圧上昇をきたす代表的なウイルスとして単純ヘルペスウイルス(HSV)がよく知られている。HSVは同じヘルペスウイルス科に属し、HSV眼感染の分子病態はCMV前眼部感染症の分子病態にオーバーラップすると想定される。このため、HSV感染の分子病態を解析することは、前眼部のCMV感染の分子病理の理解につながると考えられる。

CMV感染の診断や治療を考える上で、CMV感染に伴う角膜内皮細胞の障害や、房水流出路の炎症や組織障害の機序は十分理解されていない。また、獲得免疫系を介したCMVの排除が健常者において、なに故機能しないのかの理由も不明である。そこで、これらの解析を通じて、診断のみならず新たな治療ストラテジーの創出につながる知見がえられると考えられた。

### 2. 研究の目的

CMV前眼部感染症は、慢性かつ再発性であり、発症後は長期にわたる注意深い管理を必要とする。そこで、診断のみならず、治療に対する反応性を評価するうえで、正確かつ標準的なCMV感染の診断法の作成が望まれる。本邦における診断の標準化をはかるため、正確かつ再現性の高いCMV診断法の提案、評価、標準化の手法を見いだすことを目的とした。とくにreal-time PCR法をもちいたCMVウイルス検査及び臨床所見群の評価システムの構築及び発症、予後に関する臨床因子群の解析は重要と考えられる。

CMV感染後の角膜内皮の分子免疫的病理像を、天然免疫系の賦活化に加えて獲得免疫系の賦活化の二つの観点から角膜内皮細胞の障害機序を探索することをさらなる目的とした。とくに、角膜内皮炎の病態は、以下の二つにしばられると考えている。この作業仮説にもとづき、病態解明が可能と考えている。

獲得免疫系の抗ウイルス機能が十分でないため、CMVの再発性の増殖を抑制できず、宿主としての角膜内皮が損傷をうける。

抗ウイルス機能によりウイルスは排除されるが、過剰な炎症反応や感染内皮細胞の破壊により角膜内皮の顕著な障害を来す。

この作業仮説にもとづき、角膜内皮傷害の病態解明を試みる。

CMV前眼部感染症において、慢性の眼圧上昇の機序の詳細は明らかではない。そこで、眼圧上昇の分子マーカーを緑内障患者の前房水を用いて探索を行う。一方、CMVが実際にヒトの線維柱帯に感染し、増殖しえるかどうかは明らかではない。このため、ヒト線維柱帯細胞が実際にCMVに感染しえるのかを検証する。感染しえる場合、眼圧上昇につながる分子マーカーや包括的分子応答を誘導するのかを検討する。これらの解析により眼圧上昇の分子病態解明及び新規治療標的分子の導出を試みる。

### 3. 研究の方法

CMV前眼部感染症の診断手法の確立のため、検査システムの標準化、至適化を計る。標準化のために本邦でCMV real time PCRを施行している主要5施設に呼びかけ、WHOによるCMV標準化検体を発送し各施設のシステムの校正、および標準化を試みる。感度・特異度の至適化はReceiver operating characteristic(ROC)解析により施行し、理論的推奨カットオフ値を算出する。

CMV 内皮炎や CMV 虹彩炎患者を対象に、発症、予後に関する前房内 CMV DNA 量や臨床因子群のリスク評価、予後の予測解析を試みる。これらの変数群の選択には主成分分析を用いる。次に最高のパフォーマンスをえることのできた組み合わせを用いて、一般化線形混合モデルにより診断や病態、予後予測因子群の寄与を評価する。

CMV 感染ヒト角膜内皮細胞を用いた獲得免疫系制御機構の解明を行う。まず、不死化ヒト角膜内皮細胞に CMV 株を感染させる。感染後、ウイルスタンパク (immediate early, early, late gene) が経時的に誘導されるか否かを real-time RT PCR、Western blot、免疫染色の手法で検証する。これにより実際に角膜内皮で発現され宿主獲得免疫系の標的となりえるタンパクを同定する。次に、感染後の CMV 増殖を titration 及び real-time PCR により評価する。

宿主側としての角膜内皮の感染応答の評価のため、CMV 感染後、角膜内皮がいかに CMV を排除しようとしているかの詳細を明らかにする。CMV の排除戦略は、まず天然免疫系を介した排除に着目して解析する。天然免疫系を介した排除は、CMV 由来の double strand RNAなどを介したパターン認識経路の活性化を介する。これによりインターフェロンシグナリング活性化、インフラマゾームの活性化を含め CMV を排除する経路を評価する。

次に獲得免疫系の賦活化に着目して評価を行う。日本人には HLA class I A24 保有者がもっとも多いため、A24 陽性のヒト角膜内皮細胞を用い、CMV を感染させる。この CMV 感染内皮は、既感染者由来の A24 陽性 CD8 T 細胞を MHC class I 拘束性に活性化させるため、獲得免疫系の寄与を詳細に解析可能である。具体的には、アロのドナーとして、A24 陽性の正常既感染者および A24 陽性の CMV 内皮炎患者を対象に末梢血リンパ球を採取し解析する。

ヒト線維柱帯細胞を用いた炎症による機能障害機構を探索する。緑内障患者の前房水を用いてプロテオーム解析をおこない、眼圧や視野と有意に相関するサイトカインの作用機序をモデル化する。次に、CMV をヒト角膜内皮及び、線維柱帯細胞に感染させ、その眼圧上昇に直接関わるタンパクの同定を試みる。検証には、該当シグナリングの阻害アッセイを用い、まず包括的転写応答面からその責任経路の抽出をはかる。これにより、角膜内皮や線維柱帯細胞の障害機序にせまり、その治療標的候補の抽出をめざす。

#### 4. 研究成果

前眼部 CMV 感染症の診断には、前房水における CMV DNA 量の測定が必須の検査となっており病状の評価や予後予測にとって重要な役割をもつ。CMV コピー数の絶対値の正確さを評価するため CMV 感染に対する前房水 Real-time PCR を施行している 5 施設の協力のもと標準検体の検出レベルを評価した。その結果、CMV 検出値の変動は、施設間の数値は数倍程度以内にとどまり、標準検体を用いることにより、より正確な標準化が達成できることが判明した。CMV 感染における診断ツールとしては、前房水 Real-time PCR が多施設間の比較においてもすぐれており、いずれの施設においても十分な感度、特異度がえられることが判明した。

次に、197 眼の CMV 感染が疑われ、CMV PCR を施行した症例を解析した結果、前房内における CMV DNA 量は網膜炎型で多く、内皮炎型では CMV DNA 量は有意に少なくなった。角膜内皮炎型および虹彩炎型の病型においては、診断効率がもっともすぐれる検査あるいは臨床的特徴を評価した。Receiver Operating Characteristic 解析の結果、定量 PCR が診断精度上もっともすぐれており、頻回の再発と眼圧上昇がそれに続いた。とくに CMV 内皮炎の病型においては、CMV 虹彩炎病型よりも経過が非常に長いこと、断続的な眼圧上昇と角膜内皮口スをくりかえし、最終的な視力予後が不良になることが判明した。

CMV の角膜内皮への感染性及び病原性の評価を培養不死化ヒト角膜内皮細胞を用いて行った。その結果、角膜内皮細胞における CMV の増殖、さらに、角膜内皮における重要な免疫原性エピトープとして pp65 の発現を確認した。さらに、CMV 及び単純ヘルペスを角膜内皮細胞に感染させたときにえられたトランスクリプトーム解析を行い、細胞死を引き起こしえる経路の候補同定を行った。CMV ウイルス感染後において強い型インターフェロン応答が誘導されることから、これを介した細胞死経路の発動を想定した。次に、この経路の制御に中心的に関わる候補因子として IRF7 を同定した。遺伝子編集技術により IRF7 欠損角膜内皮細胞の作成を試みた。まず、IRF7 CRISPR プラスミドをデザインし、不死化ヒト角膜内皮細胞へ導入した。次にクローニングを行い候補細胞株を確立しそのスクリーニング作業を行った。以上により IRF7 欠損角膜内皮細胞株を樹立し、CMV 感染後の炎症動態の制御にいかにかかわるかの解析に着手した。

CMV 感染後角膜内皮細胞の包括的転写解析を行った。ネットワーク解析の結果、主要な感染内皮細胞の機能として自然免疫系に集約される I 型インターフェロン応答に加え、パターン認識レセプターシグナリングが高度に関連していた。さらに、獲得免疫系への寄与を示唆する抗原提示機能経路の活性化が判明した。このため、CMV 感染角膜内皮が実際に抗原提示機能を発揮しているかを検証した。その結果、感染角膜内皮細胞は CMV の主要エピトープタンパク pp65 を介した CMV 特異的 CD8 メモリー T 細胞の活性化を誘導した。つまり、角膜内皮細胞は、CMV

感染後、自然免疫系のみならず獲得免疫系の抗ウイルス作用を発動させ、CMV 感染細胞を除去しようとする機能を有していることが判明した。

臨床病態の解析より、前眼部 CMV 感染症においては、眼圧上昇が特徴的であることが判明している。そこで、眼圧上昇に関わるマーカーを探索するため、開放隅角緑内障の患者 101 名より得られた前房水を用いてプロテオーム解析を行った。OAG 69 例、新生血管緑内障 32 例、さらに正常者（白内障患者）100 例を対象にサイトカインプロファイルの探索を行った結果、緑内障眼においては interleukin (IL) -1 , IL-1 , IL-2, IL-4, IL-8, IL-23 など多くの炎症性サイトカイン群の有意な増大を認めた。

とくに緑内障が正常者であるかの判別をロジスティック回帰で行ったところ IL-8 上昇が最も高いオッズ比を示し、これに IL-2, IL-10, IL-4, MCP-1 が続いた。次に眼圧の上昇機序を探るため 術前眼圧と相関するサイトカイン群を調べたところ、IL-1 , IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IFN- , TNF- , MCP-1, VEGF など多くのサイトカインが術前眼圧との高度な相関を認めた。次に視野障害と相関するサイトカインを検証した結果 IL-8 上昇が有意な相関を示した。以上の結果より、眼圧上昇や視野障害に関連するマーカーあるいは治療標的候補としてのケモカインとして IL-8 およびケモカインシグナルの重要性がつかびあがってきた。そこで緑内障手術前の IL-8 およびその他のサイトカインレベルが緑内障手術の予後に影響するかをコックス比例ハザードモデルで検証した。その結果、IL-8 は緑内障手術後の予後不良に有意に寄与していることが判明した。以上の結果より、眼圧上昇や緑内障予後不良にかかわる候補分子マーカー群を同定することができた。

以上をまとめると CMV が角膜内皮のみならずおそらく線維柱帯に慢性に感染していることを示唆している。そこで、CMV の線維柱帯細胞への感染性を検証した。その結果、CMV の Towne 株や TB40/E 株のいずれもが線維柱帯細胞に感染し、その後効率的に増殖し、成熟ウイルス粒子を放出することを見いだした。以上の結果は、難治化する症例においては、まず CMV と線維柱帯細胞との相互作用がきっかけになる可能性を示唆していた。そこで、CMV が線維柱帯細胞に感染していかなる分子応答を誘導するのかを RNA sequencing を用いて検証した。その結果、CMV 感染後、角膜内皮と同様強いインターフェロン反応を誘導すること、さらに IL-8 を含めたケモカイン群の誘導より線維柱帯のリモデリングあるいは抗ウイルス応答を誘導する可能性が示唆された。次にこれらの誘導にかかわる分子機序をネットワーク解析により検討した。その結果、これらのシグナリングを制御しえる標的分子群を同定し、候補治療薬の検証へとすすめてつづける。

#### < 引用文献 >

Miyazaki D, Shimizu D, Shimizu Y, Inoue Y, Inoue T, Higaki S, Ueta M, Sugita S; Real-time PCR for ocular cytomegalovirus infection study group. Diagnostic efficacy of real-time PCR for ocular cytomegalovirus infections. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2018 doi: 10.1007/s00417-018-4111-9.

Miyazaki D, Uotani R, Inoue M, Haruki T, Shimizu Y, Yakura K, Yamagami S, Suzutani T, Hosogai M, Isomura H, Inoue Y: Corneal endothelial cells activate innate and acquired arm of anti-viral responses after cytomegalovirus infection. Exp Eye Res. Jun 23;161:143-152. 2017

Chono I, Miyazaki D, Miyake H, Komatsu N, Ehara F, Nagase D, Kawamoto Y, Shimizu Y, Ideta R, Inoue Y. High interleukin-8 level in aqueous humor is associated with poor prognosis in eyes with open angle glaucoma and neovascular glaucoma. Sci Rep. 2018 Sep 28;8(1):14533. doi: 10.1038/s41598-018-32725-3

Shimizu D, Miyazaki D, Shimizu Y, Hosogai M, Kosugi I, Inoue Y. Infection of endotheliotropic human cytomegalovirus of trabecular meshwork cells. Jpn J Ophthalmol. 2018 Sep 6. doi: 10.1007/s10384-018-0618-1.

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Miyazaki D, Shimizu D, Shimizu Y, Inoue Y, Inoue T, Higaki S, Ueta M, Sugita S; Real-time PCR for ocular cytomegalovirus infection study group. Diagnostic efficacy of real-time PCR for ocular cytomegalovirus infections. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2018 doi: 10.1007/s00417-018-4111-9. 査読有り

Chono I, Miyazaki D, Miyake H, Komatsu N, Ehara F, Nagase D, Kawamoto Y, Shimizu Y,

Ideta R, Inoue Y. High interleukin-8 level in aqueous humor is associated with poor prognosis in eyes with open angle glaucoma and neovascular glaucoma. *Sci Rep*. 2018 Sep 28;8(1):14533. doi: 10.1038/s41598-018-32725-3 査読有り

Shimizu D, Miyazaki D, Shimizu Y, Hosogai M, Kosugi I, Inoue Y. Infection of endotheliotropic human cytomegalovirus of trabecular meshwork cells. *Jpn J Ophthalmol*. 2018 Sep 6. doi: 10.1007/s10384-018-0618-1. 査読有り

Inata K, Miyazaki D, Uotani R, Shimizu D, Miyake A, Shimizu Y, Inoue Y. Effectiveness of real-time PCR for diagnosis and prognosis of varicella-zoster virus keratitis. *Jpn J Ophthalmol*. Jul;62(4):425-431. 2018 査読有り

Miyazaki D, Uotani R, Inoue M, Haruki T, Shimizu Y, Yakura K, Yamagami S, Suzutani T, Hosogai M, Isomura H, Inoue Y. Corneal endothelial cells activate innate and acquired arm of anti-viral responses after cytomegalovirus infection. *Exp Eye Res*. Jun 23;161:143-152. 2017 査読有り

[学会発表](計 5件)

Miyazaki D. Pathogenesis of viral endotheliitis. (Symposium) 122th Annual Meeting of the Japanese Ophthalmological Society, Osaka 2018

宮崎大: 全身投与と抗ウイルス薬 (シンポジウム) 大阪国際会議場 第54回眼感染症学会 7/14. 2017

宮崎大: Herpes virus 属による角膜炎 内皮炎を中心に サイトメガロウイルスの前眼部感染症 (特別講演) シャングリラホテル東京 第2回 Ocular Surface & Glaucoma symposium 5/26. 2017

Miyazaki D, Inata K, Uotani R, Shimizu D, Miyake A, Shimizu Y, Inoue Y: Effectiveness of real-time PCR assessment for varicella-zoster virus-associated keratitis. Annual meeting of the association for research in vision and ophthalmology. (Symposium) Baltimore Convention Center, Baltimore, USA. 5/9. 2017

宮崎大: 炎症性前眼部疾患と眼圧上昇 (特別講演) 大阪グランピアホテル 第5回 GON研究会 7/9. 2016

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 井上 幸次

ローマ字氏名: INOUE, yoshitsugu

所属研究機関名: 鳥取大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 10213183

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。