

自己評価報告書

平成23年 5月 9日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2011

課題番号：20592076

研究課題名 (和文) 角膜ヘルペス治療における分子標的の解明

研究課題名 (英文) The analyses of molecular targets in the treatment of herpetic keratitis

研究代表者

井上 幸次 (INOUE YOSHITSUGU)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：10213183

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：角膜ヘルペス、マイクロアレイ、角膜上皮、角膜内皮、IL-6, VEGF, helicase-primase, TLR-9

1. 研究計画の概要

角膜ヘルペス治療のターゲットになりうる新たな分子を検索することを目的として、*in vitro* のヒト角膜細胞、*in vivo* のマウス感染モデルにおいて、発現分子を網羅的に解析し、感染制御や角膜炎症における役割を解明し、それらの分子の抑制による効果を検討する。また、合わせてウイルス側の治療ターゲットについても検討する。

(1) ヒト角膜上皮の単純ヘルペスウイルス(HSV) 感染に対する分子応答について、マイクロアレイを用いた検索をおこなう。

(2) ヒト角膜内皮の HSV 感染に対する分子応答について、マイクロアレイを用いた検索をおこなう。

(3) ヒト角膜内皮の HSV 感染における TLR の役割を検討する。

(4) ウイルス側の治療ターゲットとして、helicase-primase 阻害作用をもつ新しい抗ウイルス薬の効果のマウスヘルペス性角膜炎モデルを用いて検討する。

(5) マウスヘルペス性角膜炎における分子応答について、マイクロアレイを用いた検索をおこなう。

2. 研究の進捗状況

(1) 不死化ヒト角膜上皮細胞(HCE)にHSV 1型KOS株を感染させ、経時的にRNAを採取した。対象には、非感染細胞及びUV不活化HSV感染HCEを用いた。採取したRNAについてGeneSpring GX7.3.1を用いて包括的トランスクリプトーム解析を行った。

その結果、分散分析において有意な変動 ($P<0.05$) を示し、かつ2倍以上発現が変動あるいは減少を示した遺伝子は、412個であつ

た。次にこれらの遺伝子群を用いてKyoto Encyclopedia of Genes and Genomesを用いてシグナル伝達経路との関連を検討した。関連づけられた経路として、MAP kinase, 細胞接着、サイトカインシグナル、細胞周期、renal cell carcinoma, VEGFシグナルがあげられた。またUV不活化HSV感染では、大きな遺伝子変動は認められなかった。更にIngenuity pathway analysisを用いて解析すると、シグナル伝達の中心となっているのはIL-6とVEGFであると考えられた。

(2) 上皮同様に、不死化ヒト角膜内皮細胞にHSV-1(KOS 株)を感染させて作成したTranscriptome ネットワークを用い、種々の統計解析をおこなうとともに、プロテインアレイによる確認も行った。その結果、HSV 感染応答 transcriptome の primary associated function が抗原呈示であることが判明した。また、プロテインアレイにおいても抗原呈示に関与する分子、すなわち、IL-6, IP-10, HVEM, IFN- γ が上昇していた。

(3) 不死化ヒト角膜内皮細胞を用いて、TLR 関連分子について FACS を用いてスクリーニングしたところ、角膜内皮はTLR-9をほぼ選択的に強発現していた。TLR9の角膜内皮感染における役割を阻害 oligoあるいはsiRNAを用いて検討したところTLR9阻害により上清中および細胞中のHSVはtitration、real-time PCRとも有意 ($p<0.01$) に減少するとともにIL-6の誘導を転写レベルから減少させた。以上より角膜内皮細胞におけるHSV感染応答において、TLR-9は重要な位置を占め、IL-6誘導を介してinflammation形

成に寄与することが示された。

(4) helicase-primase 阻害薬について、内服・眼軟膏・点眼投与にて、検討した。その有効性は涙液の HSV real-time PCR, 上皮病変臨床スコア、眼球・三叉神経節の HSV 力価測定にて調べた。その結果、感染後 2 日に樹枝状病変を確認してからの投与で、内服ではバラシクロビルを、眼軟膏ではアシクロビル眼軟膏を上回る効果を確認した。点眼では、3mg/ml 群では開始翌日、0.3mg/ml 群ではその翌々日から有意に涙液中の HSV-DNA と上皮病変臨床スコアを抑制し、感染後 7 日目（治療後 5 日目）の眼球のウイルス力価を両群とも有意に抑制した。

3. 現在までの達成度

③ やや遅れている

In vitro での細胞を用いた研究はかなりの進展を見ており、in vivo では新しいターゲットとして helicase-primase を阻害する抗ウイルス薬の効果をマウスの角膜炎モデルで検討できたが、in vitro のアレイの結果で得られた分子について、in vivo でその役割を検討するところまではできていない。in vivo での分子の網羅的解析もまだ施行していない。

4. 今後の研究の推進方策

従来の網羅的な検索ではあまりに多数の分子の関与が示唆され、焦点がしぼりこみにくい欠点がある。In vitro でのこのような経験から、マウスヘルペス性角膜炎モデルを用いた in vivo での分子の網羅的解析を行うよりもむしろ、研究の焦点を、HSV の角膜内皮における抗原呈示に関与する分子にしぼり、in vitro で mixed lymphocyte reaction assay などを用いて機能的検索をおこなっていくことに力をいれていく方針である。

5. 代表的な研究成果

（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 9 件）

① Terasaka Y, Miyazaki D, Inoue Y et al: Induction of IL-6 in transcriptional networks in corneal epithelial cells after herpes simplex virus type 1 infection. Invest Ophthalmol Vis Sci 51:2441-2449, 2010. 査読あり

② Komatsu K, Miyazaki D, Inoue Y: et al: Pathogenesis of herpetic stromal keratitis in CCR5- and/or CXCR3-deficient mice. Curr Eye Res 33: 736-749, 2008 査読あり

③ 池田欣史、宮崎大、井上幸次 ほか：角膜穿孔をきたしたヘルペス性角膜炎に対し

て塩酸バラシクロビル内服が奏効した 1 例。あたらしい眼科 25:365-369, 2008 査読あり

④ Inoue Y: Immunological Aspects of Herpetic Stromal Keratitis. Seminars in Ophthalmology 23:221-227, 2008 査読なし

⑤ Higaki S, Inoue Y, et al: Case of bilateral multiple herpetic epithelial keratitis manifested as dendriform epithelial edema during primary Kaposi's varicelliform eruption. Jpn J Ophthalmol 52:127-129, 2008. 査読あり

〔学会発表〕（計 19 件）

① 佐々木慎一、宮崎大、井上幸次ほか：抗ヘルペスウイルス薬 ASP2151 のマウス角膜ヘルペスモデルにおける効果。第 47 回日本眼感染症学会，東京，2010/7/9-7/11

② Takeda S, Miyazaki D, Inoue Y et al: Roles of toll-like receptor-9 in transcriptional networks in corneal endothelial cells after herpes simplex type 1 infection. ARVO 2010 annual meeting. Fort Lauderdale, Florida, 2010/5/2-5/6

③ 井上幸次：特別講演「眼感染症における微生物の起因性について考える」。第 63 回日本臨床眼科学会，福岡，2009/10/9-10/12

④ Terasaka Y, Miyazaki D, Inoue Y et al: Transcriptional profiling of herpes simplex virus-infected human corneal epithelium. ARVO 2009 annual meeting. Fort Lauderdale, Florida, 2009/5/3-5/7

⑤ 井上幸次：特別講演「角膜ヘルペス～基礎から臨床へ～」，第 45 回日本眼感染症学会，福岡，2008/7/4-7/6

〔図書〕（計 2 件）

① 井上幸次：角膜ヘルペスの診断と治療。日本眼科学会専門医制度・生涯教育講座〔総説〕合本（平成 18 年～20 年）財団法人日本眼科学会専門医制度委員会編 p129-139，財団法人日本眼科学会，東京，2009

② 井上幸次：アシクロビル眼軟膏の使い方。「眼科診療のコツと落とし穴 4 薬物療法」樋田哲夫、江口秀一郎編 p30，中山書店，東京，2008。