

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 11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） Analyses of molecular target 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

研究成果の概要（和文）：角膜ヘルペスの病態を解明するために、in vitro で不死化角膜上皮細胞、角膜内皮細胞に HSV-1 を感染させた際の分子を網羅的に検索した。それらの分子の中で、上皮では IL-6・VEGF、内皮では toll-like receptor 9 (TLR9)・indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) の役割を解析し、特に角膜内皮はこれらの分子を介して HSV-1 に対する免疫を抑制する調節性 T リンパ球 (Treg) を誘導することを見いだした。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the pathogenesis of herpetic keratitis, microarray analyses were preformed using HSV-1-infected immortalized corneal epithelial and endothelial cells. Among various molecules related with HSV infection, the roles of IL-6 and VEGF in the epithelial cells and toll-like receptor 9 (TLR9) and indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) in the endothelial cells were analyzed. Especially it was found that corneal endothelial cells can induce HSV-1-specific regulatory T cells via these molecules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：眼微生物学・感染症学・単純ヘルペスウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

ヘルペス性角膜炎(角膜ヘルペス)は単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus:HSV) による感染によって生じるが、安全性と効果にすぐれたアシクロビルが臨床に導入されたことにより、以前に比べてその治療成績は良好となった。現在上皮型角膜ヘルペスはアシクロビルによってウイルス増殖を抑制し、実質型角膜ヘルペスではそれに加えてステロイドを投与して免疫反応を抑

えることで行われている、しかし、現在でもその治療に苦慮することが多い。

その要因として次ぎのようなことがあげられる。一点目はアシクロビルもしくはそれに類似した薬剤に頼っているために、それに耐性のウイルスに対してはうまく治療できないこと、二点目はステロイドによる治療が逆にウイルス増殖を促してしまうという大きな矛盾をかかえていること、3点目は内皮炎については治療どころかその病態も不明

なこと、4点目は角膜ヘルペスは三叉神経節に潜伏感染しているHSVの再活性化によって生じてくるが、これを遮断するあるいは潜伏感染を根治させる方法がないことである。

4点目についてはその解決にはまだ遠いと思われるが、他の3点については様々なアプローチが可能であり、実際今までも我々を含めて少なからぬ研究が成されている。

1点目についてはまったく新しい系統の抗ウイルス薬と開発とその角膜炎への応用がのぞまれ、実際に臨床応用の手前まできている薬剤がある。

2点目については、ステロイドに頼らない治療を考えるために、ウイルス増殖をきたさず角膜混濁の原因となる免疫を抑制する方法の開発が望まれる。

そのためにはヘルペス性実質角膜炎 (herpetic stromal keratitis: HSK) で生じる免疫反応について、その病態を十分に把握することが重要だが、細胞性免疫を助けるヘルパーT細胞であるTh1細胞による遅延型過敏反応が重要であることが基本的な病態として理解されている。そして、それを基盤として種々の分子の働きが明らかにされつつある。

まず、サイトカインについては、Th1が産生するサイトカインである interleukin 2 (IL-2) や interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) が HSK を悪化させることが報告されている (Hendricks RL et al: J Immunol 149:3023-3028, 1992)。また、Th1誘導に重要な IL-12 の mRNA が感染初期から角膜・所属リンパ節で誘導されることがわかってきている (Kanangat S et al: J Immunol 156:1110-1116, 1996)。我々も、ヒトの角膜ヘルペスにおいて、患者末梢血 T 細胞のヘルペス抗原刺激に対する反応性をみており、実質型の再発をよく起こす患者と上皮型の再発をよく起こす患者において Th1 サイトカインと Th2 サイトカインの比を比較すると、実質型の方が有意に Th1 サイトカインの高値を示すことを報告している (Yoshida A et al: Invest Ophthalmol Vis Sci 41:S56, 2000)。

また、ケモカインについては、マウス HSK で、感染後の各時期において角膜においてその出現を認める。中でも MIP (macrophage inflammatory protein) -1 $\alpha$  の抗体投与によって HSK が軽減されることが報告されている (Tumpey TM et al: J Leukoc Biol 63:486-492, 1998)。また、我々は逆にケモカインのレセプターに注目し、Th1細胞の表面に表現されている CCR5 (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-2, RANTES のレセプター) と CXCR3 (MIG, IP-10, I-TAC のレセプター) の double knockout mouse で、HSK が軽減することを見出した。

このように角膜ヘルペスにおける実質で

の炎症反応に、多くの分子の関与が判明してきており、そのキーとなるT細胞とケモカインの交点となる上記レセプターのノックアウトマウスの結果から、分子標的として、ケモカインレセプターは有望と考えられる。しかし、完全な抑制をめざす点からはそれだけではまだまだ不十分と考えられ、角膜ヘルペスの複雑な分子機構において、いまだ我々の知らない分子の関与も推定され、それを見出すのにDNAマイクロアレイを用いた解析が役立つと考えられる。

3点目についてはほとんど研究がなされておらず、ヘルペス性角膜内皮炎 (herpetic corneal endotheliitis) の分子機構はまったく解明されていない。内皮でのHSV増殖の様態さえわかっていない。内皮の障害は実質以上にただちに重篤な視力低下につながるため、その解明は大変重要である。

## 2. 研究の目的

(1) 新しい作用機序の抗ウイルス薬の角膜ヘルペスへの応用

(2) 角膜ヘルペスの治療においてウイルス増殖をきたさず、炎症を抑制できるようなピンポイントの分子標的治療を考えるのが理想的であるが、ヘルペス感染によって細胞あるいは生物個体に生じる反応はきわめて複雑であり、個々の分子を狙いうちにしたストラテジーとともに、さまざまな分子について網羅的に解析するストラテジーも必要と考えられる。今回の研究では、新しい標的分子をさぐるという、臨床への道は遠いが将来へつながる研究を *in vitro* でマイクロアレイによる解析によっておこなっていく。

(3) 特にその病態が不明でかつ *in vivo* のアプローチが難しい角膜内皮のHSV感染についての分子解析を *in vitro* で行う。また、角膜内皮のHSV特異免疫に果たす役割を解析する。

## 3. 研究の方法

(1) **helicase-primase 阻害薬 ASP2151 のマウスヘルペス性角膜炎における有効性の検討**

helicase-primase 阻害という新しい作用機序をもつ抗ウイルス薬 ASP2151 がヘルペス性角膜炎に有効かどうかをマウスモデルで検証する。

BALB/c マウスの片眼角膜に HSV-1 CHR-3 株 ( $2.3 \times 10^5$  pfu/eye) を感染させ、2日後に角膜上皮病変の出現を確認した後、ASP2151 内服 (100mg/kg, 1日1回)、点眼 (0.3 mg/ml, 3 mg/ml, 1日5回)、眼軟膏 (2%, 1日3回) を使用し、バラシクロビル内服、アシクロビル眼軟膏、vehicle 内服、点眼、眼軟膏とその効果を比較した。治療は5日間行い、いずれの群も経時的に顕微鏡観察を行い、角膜上皮病変をスコアリングし、real-time PCR により涙液中の HSV-DNA 量を定量した。また観察

終了時に眼球および三叉神経節を摘出し、real-time PCRにて組織中のHSV-DNA量を定量し、一部は plaque assayでも組織中のウイルス力価を測定した。

## (2)HSV-1 角膜上皮・内皮感染における分子の網羅的解析

不死化ヒト角膜上皮細胞(HCE)、不死化ヒト角膜内皮細胞(HCEn)にHSV 1型 KOS株を感染させ、経時的にRNAを採取した。対照には、非感染細胞及び紫外線不活化HSV感染HCE、HCEnを用いた。採取したRNAを用いて、Agilent社のGeneSpring GX7.3を用いて包括的トランスクリプトーム解析を行った。

### (3)角膜内皮HSV-1感染におけるTLRの関与

HCEnを用いて toll-like receptor (TLR)の発現をFACSにて調べた。HSV-1感染後の炎症性サイトカインの発現レベルは、real-time RT-PCRと protein array analysisにより測定した。HSV-1の複製へのTLR9の関与については、real-time RT-PCRと plaque assayにより検証した。TLR9阻害の検証には、TLR9阻害オリゴヌクレオチドまたはTLR9 siRNAを用いた。シグナル伝達経路活性化の検証のために、経路特異的転写因子レポーターを誘導したHCEnで、プロモーター活性を測定した。

### (4)角膜内皮HSV-1感染における調節性Tリンパ球(Treg)誘導と indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1)の関与

HCEnにHSV1型 KOS株を感染させ、IDO1の酵素レベルでの変化を検討した。HSV感染ヒト角膜内皮により誘導されるリンパ球としてHSV感染既往ドナーのT細胞を使用して、リンパ球刺激試験を行い、BrdU化学発光キットを用いてT細胞の増殖、および分泌されるサイトカインを検討した。さらに、末梢血由来の抗原提示細胞とHSV特異的CD4+T細胞の混合リンパ球刺激試験に、HSV感染ヒト角膜内皮によって誘導されたT細胞を添加し、その調節活性につき検討した。

## 4. 研究成果

### (1) helicase-primase 阻害薬ASP2151のマウスヘルペス性角膜炎における有効性の検討

ASP2151は内服のみならず、点眼・眼軟膏のような局所投与でも、ヘルペス角膜上皮病変スコアを有意に改善し、涙液中HSV-DNA量を有意に減少させ、マウス生存率を上昇させた。眼球・三叉神経節でのウイルス量も減少させた。これらの効果はアシクロビル、バラシクロビルと同等あるいはそれを上回っていた。

ASP2151のヘルペス性角膜炎臨床応用の可能性が示唆された。

### (2)HSV-1 角膜上皮・内皮感染における分子の網羅的解析

#### ①角膜上皮

HSV感染群と非感染群および紫外線不活化HSV感染群において、ANOVAで有意な変動を示し(P<0.05)かつ2倍以上発現が変動した遺伝子は412個であった。その内、365個の遺伝子の発現が増加し、47個の遺伝子の発現が減少していた。なお、紫外線不活化HSV感染群と非感染群では発現レベルに有意差を認めなかった。クラスタリング解析では、HSV感染群は、非感染群・紫外線不活化HSV感染群と全く異なるパターンを示した。

412個の遺伝子群について ingenuity pathway analysis (IPA)を用いてネットワーク解析した結果、HSV感染により誘導されたシグナル伝達経路は、MAP kinase、JUN kinase、p38、ERK、NF- $\kappa$ B 経路に関連づけられた。更に、IL-6がその中心的分子であることと、VEGFへの直接的な関与が示唆された。

IL-6がHSV感染HCEにおいてmRNAレベルで発現していることをreal-time RT-PCRを用いて検討し、更に、蛋白質レベルで発現していることを、HSV感染HCEから得られた上清を用いてELISAで確認した。その結果、IL-6は、mRNAレベルでは感染3時間後から上昇し、12時間後にピークとなった(MOI0.1)。また、培養上清中のIL-6はMOI依存性に増加し、24時間後まで検出された。

IL-6がVEGFを誘導するかどうかについて、抗IL-6抗体でIL-6を阻害したHSV感染HCEとコントロールIgGを加えたHSV感染HCEの2群間で検討した。その結果、IL-6を阻害することにより、VEGFは有意に抑制された。また、IL-6の阻害はHSVのウイルス増殖に影響しないことをreal-time RT-PCRと plaque assayで検証し、IL-6阻害によるVEGFの抑制が、ウイルス増殖の阻害によって生じているのではないことを確認した。IL-6に制御されているVEGF以外のサイトカインをprotein array analysisで検証したところ、CCL7、CCL8、CXCL6、TGF- $\beta$ 2を含む多くのサイトカインが抗IL-6抗体によるIL-6阻害に対して感受性を示した。

#### ②角膜内皮

HSV感染群と非感染群において、ANOVAで有意な変動を示し(P<0.01)かつ4倍以上発現が変動した遺伝子は461個であった。その内、453個の遺伝子の発現が増加し、8個の遺伝子の発現が減少していた。

そのうち330個の遺伝子群についてIPAを用いてネットワーク解析した結果、HSV感染により誘導された分子は antigen presentation, interferon-related responses, cellular development に関与しており、シグナル伝達経路は、ERK、NF- $\kappa$ B 経

路に関連づけられた。特に抗原提示との関連がもっとも深く、protein array analysis でも IL-6, IP-10, HVEM, IFN- $\gamma$  が上昇し、加えて IL-8, MCP-1, TIMP-1, RANTES, I-309, MIF, MCP-2, IL-10, SDF-1 が上昇していた。混合リンパ球刺激試験では HSV-1 感染角膜内皮が抗原特異的なアロ T 細胞の増殖を促した。

### (3) 角膜内皮 HSV-1 感染における TLR の関与

HCEc 細胞内において、TLR9 が強く発現していた。TLR9 のリガンドである CpG オリゴヌクレオチドは、HCEc 細胞において NF $\kappa$ B 活性を刺激した。HSV 感染も NF $\kappa$ B を刺激し、同時に RANTES, IP-10, MCP-2 などの NF $\kappa$ B 関連炎症性サイトカインを誘導した。これらのサイトカインの誘導は TLR9 活性の遮断により著しく減少した、さらに、HCEc 細胞内でのウイルスの複製は TLR9 の阻害により減少したものの、NF $\kappa$ B カスケードの同時活性化により回復した。異なる HSV-1 誘導性炎症カスケードに関連する転写因子のうち、TLR9 は、NF $\kappa$ B, サイクリック AMP 応答エレメント (CRE)、及び CCAAT エンハンサー結合蛋白質 (C/EBP) を活性化することがわかった。

このように角膜内皮細胞が、HSV-1 感染に際して TLR9 を介して NF $\kappa$ B, CRE, C/EBP により誘導される一連の炎症性サイトカインの発現を介して HSV-1 感染に対抗する炎症性プログラムを開始する一方、HSV-1 の方では TLR9 を介した NF $\kappa$ B の活性化をウイルス自身の複製に利用していることが判明した。

角膜内皮炎がこのようなウイルス側とホストの微妙なバランスの上に成立していることから、その治療が単純にはいかないことが推察された。

### (4) 角膜内皮 HSV-1 感染における調節性 T リンパ球 (Treg) と IDO1 の関与

HSV 感染後、IDO1 転写のみならず IDO1 タンパクおよび酵素活性の顕著な増大を感染 12 時間後から認めた。この IDO1 の誘導は TLR9 阻害オリゴヌクレオチドにて有意に抑制された。一方、HSV 感染角膜内皮と HSV 特異的なアロリンパ球との刺激試験では、CD4<sup>+</sup>T 細胞が増殖し IL-10 を産生した。HSV 感染角膜内皮と 72 時間混合培養したアロ CD4<sup>+</sup>T 細胞は、末梢血由来の抗原提示細胞による HSV 特異的な CD4<sup>+</sup>T 細胞の増殖反応を抑制することができ、HSV 感染角膜内皮は、抗原特異的な Treg 誘導活性を持つことが判明した。この作用は、角膜内皮の IDO1 発現を IDO1 特異的な siRNA transfection により抑制すると減弱した。さらに、プラスミドの transfection により IDO1 を過剰発現させたヒト角膜内皮では、HSV 特異的な IL-10 産生性 CD4<sup>+</sup>Treg の誘導活性が増大した。

このことから、ヒト角膜内皮は、HSV が感染

すると TLR9 を介して酵素発現レベルにおいて IDO を発現し、CD4<sup>+</sup>Treg を誘導することで、免疫寛容の状態を導いていると考えられた。

### 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 12 件)

- ① Takeda S, Miyazaki D, Sasaki S, Yamamoto Y, Terasaka Y, Yakura K, Yamagami S, Ebihara N, & Inoue Y: Roles played by toll-like receptor-9 in corneal endothelial cells after herpes simplex virus type 1 infection. Invest Ophthalmol Vis Sci 査読有、52:6729-6736, 2011.  
DOI: 10.1167/iov.11-7805
- ② Miyazaki D, Haruki T, Takeda S, Sasaki S, Yakura K, Terasaka Y, Komatsu N, Yamagami S, Touge H, Touge C & Inoue Y: Herpes simplex virus type 1-induced transcriptional networks of corneal endothelial cells indicate antigen presentation function. Invest Ophthalmol Vis Sci 査読有、52:4282-4293, 2011.  
DOI: 10.1167/iov.10-6911
- ③ 井上幸次: 全身疾患に関連したヒトヘルペスウイルス眼感染症 鳥取医学雑誌、査読無、39:1-5, 2011  
<http://www.tottori.med.or.jp/>
- ④ Terasaka Y, Miyazaki D, Yakura K, Haruki T, & Inoue Y: Induction of IL-6 in transcriptional networks in corneal epithelial cells after herpes simplex virus type 1 infection. Invest Ophthalmol Vis Sci 査読有、51:2441-2449, 2010.  
DOI: 10.1167/iov.09-4624
- ⑤ 井上幸次: 特集 眼感染症と臨床検査「1. 微生物検査が必要不可欠な眼感染症 3) ウイルス」MEDICAL TECHNOLOGY、査読無、38:550-555, 2010  
[www.ishiyaku.co.jp/magazines/mt.html](http://www.ishiyaku.co.jp/magazines/mt.html)
- ⑥ 井上幸次: 特集 全身疾患と眼所見「単純ヘルペスウイルス感染症」カレントセラピー、査読無、27:916-920, 2009  
<http://www.lifemedicom.co.jp>
- ⑦ 井上幸次: 眼感染症アレルギーセミナー—感染症と生体防御—「周辺部角膜ヘルペス Marginal herpes」あたらしい眼科、査読無、26:793-794, 2009  
<http://www.medical-aoi.co.jp>
- ⑧ Komatsu K, Miyazaki D, Morohoshi K, Kuo C-H, Kakimaru-Hasegawa A, Komatsu N, Namba S, Haino M, Matsushima K, & Inoue

Y: Pathogenesis of herpetic stromal keratitis in CCR5- and/or CXCR3-deficient mice. *Curr Eye Res* 査読有、33: 736-749, 2008

DOI: 10.1080/02713680802344716

- ⑨Higaki S, Inoue Y, Yoshida A, Maeda N, Watanabe H, & Shimomura Y: Case of bilateral multiple herpetic epithelial keratitis manifested as dendriform epithelial edema during primary Kaposi's varicelliform eruption. *Jpn J Ophthalmol* 査読有、52:127-129, 2008.

DOI: 10.1007/s10384-007-0514-6

- ⑩Kakimaru-Hasegawa A, Kuo C-H, Komatsu N, Komatsu K, Miyazaki D, & Inoue Y: Clinical application of real-time polymerase chain reaction for diagnosis of herpetic diseases of the anterior segment of the eye. *Jpn J Ophthalmol* 査読有、52:24-31, 2008.

DOI: 10.1007/s10384-007-0485-7

- ⑪池田欣史、稲田耕大、郭權慧、長谷川晶子、宮崎大、井上幸次: 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、査読有、25:365-369, 2008

<http://www.medical-aoi.co.jp>

- ⑫井上幸次: 日本眼科学会専門医制度・生涯教育講座 [総説33] 角膜ヘルペスの診断と治療. *日眼会誌*、査読無、112:83-93, 2008

<http://www.nichigan.or.jp>

[学会発表] (計24件)

- ① 春木智子、宮崎大、稲田耕大、佐々木慎一、山本由紀美、矢倉慶子、唐下千寿、唐下泰一、井上幸次、山上聡: Indoleamine 2,3-dioxygenase による角膜内皮の免疫制御作用. 角膜カンファレンス2012(第36回日本角膜学会総会・第28回日本角膜移植学会), 東京2012/2/23-2/25
- ② Sasaki S, Haruki T, Yamamoto Y, Kandori M, Yakura K, Miyazaki D, Suzuki H, & Inoue Y: Efficacy of ASP2151, a novel herpes virus helicase-primase inhibitor, in the mouse model of herpes simplex keratitis. ARVO meeting, Fort Lauderdale, 2011/5/1-5/5
- ③佐々木慎一、春木智子、矢倉慶子、宮崎大、鈴木弘、井上幸次: 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
- ④Takeda S, Miyazaki D, Terasaka Y, Yakura K, Yamagami S, Inoue Y: 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

- ⑤矢倉慶子、宮崎大、寺坂祐樹、春木智子、井上幸次: 角膜上皮の単純ヘルペスウイルス感染に対する分子応答における IL-6 の役割. 第34回角膜カンファレンス・第26回日本角膜移植学会, 仙台2010/2/11-2/13

- ⑥武田佐智子、矢倉慶子、寺坂祐樹、宮崎大、井上幸次、山上聡: ヒト角膜内皮細胞の単純ヘルペスウイルス感染応答機構における TLR9 の役割. 第34回角膜カンファレンス・第26回日本角膜移植学会, 仙台2010/2/11-2/13

- ⑦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

- ⑧Terasaka Y, Miyazaki D, Yakura K, Inoue Y: Transcriptional profiling of herpes simplex virus-infected human corneal epithelium. ARVO 2009 annual meeting. Fort Lauderdale, Florida, 2009/5/3-5/7

- ⑨寺坂祐樹、矢倉慶子、武田佐智子、宮崎大、井上幸次、山上聡: 単純ヘルペスウイルス感染により誘導されるヒト角膜内皮細胞のトランスクリプトーム. 第33回角膜カンファレンス・第25回日本角膜移植学会, 大阪2009/2/19-2/21

- ⑩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

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

宮崎 大 (MIYAZAKI DAI)  
鳥取大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 30346358  
池田 欣史 (IKEDA YOSHIFUMI)  
鳥取大学・医学部・助教  
研究者番号: 10444639

### (3) 研究協力者

寺坂祐樹 (TERASAKA YUKI)  
鳥取大学・大学院医学系研究科・大学院生  
武田佐智子 (TAKEDA SACHIKO)  
鳥取大学・大学院医学系研究科・大学院生  
春木智子 (HARUKI TOMOKO)  
鳥取大学・大学院医学系研究科・大学院生  
佐々木慎一 (SASAKI SHIN-ICHI)  
鳥取大学・大学院医学系研究科・大学院生  
矢倉慶子 (YAKURA KEIKO)  
鳥取大学・医学部医学科・技術補佐員