

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591486

研究課題名(和文) ヒトヘルペスウイルス6増殖におけるS100A8/S100A9の役割

研究課題名(英文) Role of S100A8/S100A9 in Human Herpesvirus 6 Replication

研究代表者

林 周平(鄒平)(HAYASHI, SHUHEI)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：40322185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：S100A8、S100A9が、HHV-6増殖を制御するか否かについて解析した。その結果、S100A8やS100A9の発現がHHV-6感染により誘導されることを明らかにした。また、S100A9がHHV-6BにコードされるU83タンパク質と相互作用することが確認された。さらに、ヒト肝ガン由来細胞株HepG2では、S100A9が発現し、HHV-6Aが感染増殖することを見いだした。最後に、S100A9が直接CD4陽性T細胞に作用し、HHV-6Bの増殖を有意に増加させることが明らかになった。これらの結果は、S100A8とS100A9がHHV-6増殖や病態において重要であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Human herpesvirus 6 (HHV-6) replicates predominantly in CD4-positive lymphocytes *in vivo* and *in vitro* and may establish latent infection in the monocyte/macrophage-lineage cells. It has been proved that HHV-6B is the etiologic agent of exanthem subitum, whereas HHV-6A has not yet been associated with any human diseases. Here, we showed that HHV-6 induced the expression of S100A8 and S100A9 in HHV-6 infected CD4+ T cells. Furthermore, we found that S100A9 interacted with HHV-6B U83. S100A9 significantly enhanced the HHV-6 replication. These findings suggest the S100A8/S100A9 may have an important role in the HHV-6 replication and pathogenesis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：ヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6) S100A8 S100A9 ウイルス増殖

1. 研究開始当初の背景

HHV-6はHHV-6AとHHV-6Bに分けられている。HHV-6Aの初感染は不明であるが、HHV-6Bの初感染は突発性発疹を発症し、乳幼児が多く、一般に軽症で自然軽快する。いずれも病原性があまり強くないが、その後、マクロファージに潜伏する。臓器や骨髄移植後、あるいはAIDSなどが原因で免疫不全状態に陥ると、ウイルスが再活性化し、脳炎、間質性肺炎などの重篤な疾患を引き起こす。HHV-6は免疫細胞を標的として感染するが、健康人がHHV-6に感染しても、HIVのように免疫不全状態にならない。その機構についての研究はほとんど報告されていない。ウイルスの増殖や病原性発現は宿主由来のさまざまなタンパク質により正または負に制御される。一般的に、ウイルス感染症には、ウイルスの病原因子だけではなく、宿主応答も強く関与する。しかしながら、HHV-6と宿主との関係についてはいまだに十分に理解されていない。

S100A8とS100A9はS100 protein familyに属し、EF-handモチーフを有するカルシウム結合性蛋白質である。S100A8とS100A9は好中球や活性化マクロファージに発現しているが、T細胞には発現していない。これらのヘテロダイマーであるS100A8/S100A9は活性化した貪食細胞から分泌される。S100A8とS100A9は、さまざまな炎症疾患で発現が大幅に増加する damage associated molecular pattern molecules (DAMPs) に属する分子として知られている。また、S100A8はTLR4の内因性リガンドで、S100A9はS100A8の制御分子であることが明らかになった。さらに、自己免疫病のマウスモデルで、S100A8およびS100A9の局所的産生が自己反応性CD8陽性T細胞の誘導と全身性自己免疫の発症に不可欠であり、これらの分子がTLR4を介して、インターロイキン17(IL-17)発現の増加をもたらすため、DAMP分子の局所的発現と全身性自己免疫疾患発症とのつながりが指摘されている。我々がHHV-6感染における宿主の免疫応答に関わる宿主因子の発現を調べたところ、HHV-6B感染したMT4細胞にS100A8とS100A9の発現が誘導されることを発見した。これらのことから、HHV-6感染により誘導されるS100A8、S100A9がウイルス増殖に何らかの働きかけをする可能性を着想するに至った。

2. 研究の目的

ヒトヘルペスウイルス6(HHV-6)はHIV-1と同様にCD4陽性T細胞やマクロファージに感染し、感染細胞を死滅させる。しかし、HHV-6感染症患者はCD4陽性T細胞が減少せず、免疫不全状態にならない。これは生体内でHHV-6に対する何らかの宿主免疫防御が働くからであるが、その機構についてはまだ解明されていない。宿主細胞分子である

S100A8とS100A9はさまざまな炎症疾患で発現が大幅に増加する。本研究では、HHV-6感染におけるS100A8、S100A9の役割を解析し、ウイルス増殖機構や病態解明にどのように関連するか、明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) HHV-6の増殖に関与している宿主遺伝子の発現を明らかにするため、ヒトCD4陽性T細胞株SupT1細胞とMolt3細胞にそれぞれHHV-6A(U1102株)とHHV-6B(HST株)を感染させ、感染72時間後に細胞を回収し、Total RNAをRNeasy Mini Kitによって精製し、遺伝子発現をreal-time RT-PCR法によって測定した。

(2) S100A9とHHV-6 U83との相互作用を確認するため、HHV-6A U83、HHV-6B IEU83またはHHV-6B U83遺伝子とFcを結合させた発現プラスミドを作成し、それらとS100A9発現プラスミドを293T細胞にコトランスフェクションし、タンパク質相互作用をpull-down法を用いて解析を行った。

(3) S100A8とS100A9のHHV-6B(HST株)の増殖に対する影響を明らかにするため、ヒトCD4陽性T細胞株Molt3細胞をこれらのタンパク質で処理し、HHV-6Bを感染させた。感染48時間後に培養細胞内のHHV-6 DNA量をreal-time TaqMan PCR法によって測定した。

4. 研究成果

(1) HHV-6はCD4陽性T細胞のS100A8とS100A9発現を誘導

S100A8とS100A9は好中球や活性化マクロファージに発現しているが、T細胞には発現していない。CD4陽性T細胞株であるSupT1細胞とMolt3細胞を用いて*in vitro*でSupT1細胞にHHV-6Aを、Molt3細胞にHHV-6Bを感染させたところ、S100A8とS100A9の発現がリアルタイムRT-PCRにより検出された(図1)。

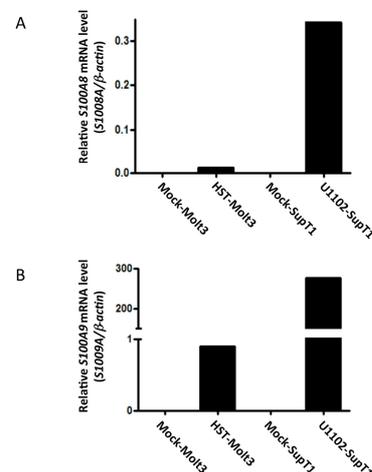


図1 リアルタイム RT-PCR 法による HHV-6 感染細胞における S100A8 (A) と S100A9 (B) の発現量

(2) S100A9 が HHV-6B U83 タンパク質と相互作用

U83 は HHV-6 にコードされたケモカインであり、ナイーブなリンパ球系の細胞を活性化し、HHV-6 の細胞から細胞への感染に寄与していることが示唆されている。HHV-6A U83、HHV-6B-IEU83 と HHV-6B U83 遺伝子をクローニングし、293 細胞に発現させ、これらの蛋白質と S100A9 との結合について検討した。この結果、S100A9 が HHV-6B U83 タンパク質と相互作用することが確認されたが、HHV-6A U83 タンパク質とは結合しないことが判明した(図2)。

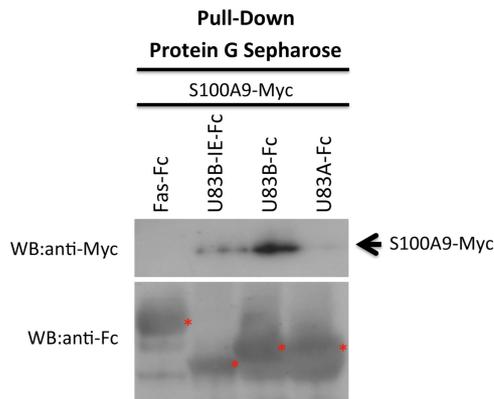


図2 Protein G プルダウン法による S100A9 と HHV6B U83 との相互作用

(3) ヒト肝ガン由来細胞株 HepG2 では、S100A9 が発現し、HHV-6A が感染

HHV-6 は、主に CD4 陽性 T 細胞に感染増殖する。その後、単球/マクロファージ系統の細胞に潜伏感染する。ヒト免疫不全ウイルス (HIV) に感染している患者、あるいは臓器移植後の患者に対しては、HHV-6 再活性により、脳、肝臓あるいは肺などの組織に損傷が生じる可能性があるなど、重篤な症状を顕すことが確認されている。ヒト胎児腎由来 293T 細胞、ヒト神経芽細胞腫由来細胞株 SK-N-SH やヒト肝ガン由来細胞株 HepG2 細胞を用いて HHV-6A と HHV-6B が感染増殖するかどうか検討した。その結果、HHV-6A は HepG2 細胞に感染したが、HHV-6B は感染増殖できなかった(図3)。また両ウイルスとも 293T 細胞と

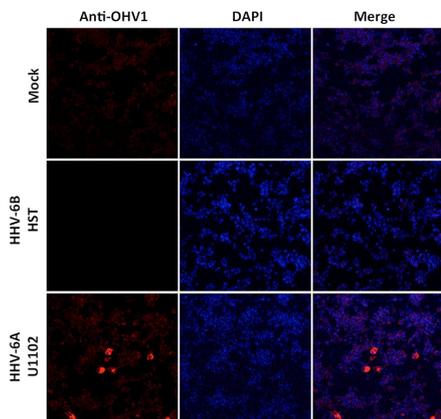


図3 HHV-6A 感染 HepG2 細胞の共焦点顕微鏡観察

SH-N-SH 細胞での感染増殖が確認できなかった。S100A8、S100A9 の機能を明らかにするために、S100A8、S100A9 発現細胞をリアルタイム RT-PCR により検討した結果、HepG2 では S100A9 を発現していた。一方、SK-N-SH、293T 細胞では S100A8、S100A9 を発現していなかった(図4)。

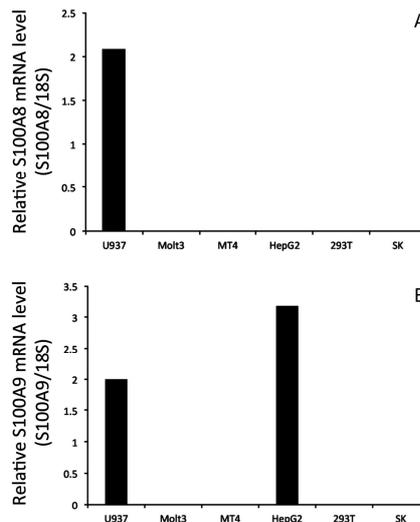


図4 リアルタイム RT-PCR 法による各細胞株における S100A8 (A) と S100A9(B)の発現量

(4) S100A9 は HHV-6 増殖を促進

S100A8 は TLR4 の内因性リガンドで、S100A9 は S100A8 の制御分子である。S100A8、S100A9 がマクロファージを介することなく直接 CD4 陽性 T 細胞に作用し、HHV-6 の増殖を制御するか否かを検討したところ、S100A9 は直接 CD4 陽性 T 細胞に作用し、HHV-6B の増殖を有意に増加させることが明らかになった(図5)。S100A8 と S100A9 が HHV-6 の増殖に重要な役割を果たしていることを示唆するものである。

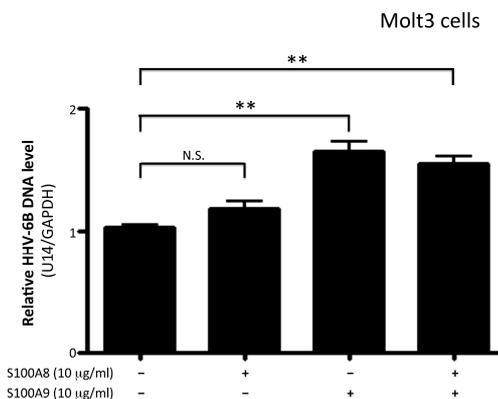


図5 S100A8 と S100A9 が HHV-6 増殖に及ぼす影響

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 3 件)

Watanabe D, Otani N, Suzuki S, Dohi H,

Hirota K, Yonemoto H, Koizumi Y, Otera H, Yajima K, Nishida Y, Uehira T, Shima M, Shirasaka T, Okuno T. Evaluation of VZV-Specific Cell-Mediated Immunity in Adults Infected With HIV-1 by Using a Simple IFN- Release Assay. J Med Virol. 85: 1313-1320, 2013. 査読有
doi: 10.1002/jmv.23611.

Hayashi K, Hooper LC, Okuno T, Takada Y, Hooks JJ. Inhibition of HSV-1 by chemoattracted neutrophils; supernatants of corneal epithelial cells (HCE) and macrophage (THP-1) treated with virus components chemoattract neutrophils (PMN), and supernatants of PMN treated with these conditioned media inhibit viral growth. Arch Virol. 157: 1377-1381, 2012. 査読有
doi: 10.1007/s00705-012-1306-y.

Otani N, Yamanishi K, Sakaguchi Y, Imai Y, Shima M, Okuno T. Varicella-zoster virus-specific cell-mediated immunity in subjects with herpes zoster. J. Immunol. Methods. 377: 53-55, 2012. 査読有
doi: 10.1016/j.jim.2012.01.003.

〔学会発表〕(計5件)

大谷成人、土田敏恵、田中茂美、奥野寿臣、植田貴史、小松美雪、一木薫、中嶋一彦、竹末芳生、島正之：兵庫県下にある看護系学生に対するワクチン接種の現状。第86回日本産業衛生学会、松山、2013年5月15-17日。

渡邊大、大谷成人、廣田和之、米本仁史、小泉祐介、大寺博、矢嶋敬史郎、西田恭治、上平朝子、島正之、白阪琢磨、奥野寿臣：HIV感染者における水痘・带状疱疹ウイルスに対する細胞性免疫の評価。第87回日本感染症学会学術講演会、横浜、2013年6月5-6日。

Hayashi K., Hooper L.C., Okuno T. and Hooks J.J. HCMV infected retinal endothelial cells (REC) release cytokine, chemokine and adhesion molecules. The 37th International Herpesvirus Workshop, Calgary, Canada. August 4-9, 2012.

Okuno T., Otani N., Yamanishi K., Sakaguchi Y., Imai Y., Baba K., Shima M. Quantification of varicella-zoster virus (VZV)-specific cell-mediated immunity in patients with varicella or zoster. The 37th International Herpesvirus Workshop, Calgary, Canada. August 4-9, 2012.

大谷成人、島正之、奥野寿臣。带状疱疹患者における細胞性免疫の評価。第86回日本感染症学会、長崎、2012年4月25-26日。

〔図書〕(計1件)

奥野壽臣：水痘・带状疱疹の免疫学。水痘・带状疱疹のすべて (All-in-one varicella and herpes zoster)。MEDICAL VIEW, 東京, 2012, 78-89.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 周平 (HATASHI, SHUHEI)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：40322185

(2) 研究分担者

奥野 寿臣 (OKUNO, TOSHIOMI)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：10221152