

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 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：35303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890238

研究課題名（和文） ヘルペスウイルス感染に伴う宿主への影響の評価

研究課題名（英文） Analyses of host defense mechanism with herpes virus infections

研究代表者

山本 剛伸 (YAMAMOTO TAKENOBU)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：50379799

研究成果の概要（和文）：ヘルペスウイルス感染症の皮膚病変部ではウイルスは複製しやすい環境の維持と発現する抗原を最小限にするなど宿主に認識されにくい環境を形成している。一方、宿主はウイルスを排除するために細胞傷害性 T 細胞を中心とした炎症細胞の浸潤・ウイルス感染細胞の細胞死（アポトーシス）の誘導をきたす。健康人では両者のバランスにより、限局した小水疱を形成している。免疫抑制状態では宿主側の反応が弱くなり、大型の水疱など重症化をきたす。

研究成果の概要（英文）：Herpes virus makes the condition which the virus grow efficiently. Herpes virus evades the host defence by minimal expression of viral antigens. On the other hand, host immune system induces cytotoxic T cell-infiltration to the skin lesions and viral infected cells apoptosis. Small vesicles are induced by herpes virus infection in health human because of the relationship between viral and host defence factors. Large vesicles are induced in the immune suppressed condition that is more predominant in viral factors than in host defence factors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード：ヘルペスウイルス，アポトーシス，細胞傷害性 T 細胞，ウイルス複製

1. 研究開始当初の背景

単純ヘルペスウイルス(HSV)，水痘・帯状疱疹ウイルス(VZV)感染症は皮膚に水疱を形成する代表的な疾患である。病変部ではウイルス感染による syncytia 形成(巨細胞)がみられ，その周囲に多数の炎症細胞浸潤をきたす。つまり，ウイルス側要因と宿主側要因の絶妙

なバランスにより病変が形成されることが考えられる。ウイルス側要因（どのようにしてウイルスが宿主に認識されにくいようにしているか），宿主側要因(どのようにしてウイルスを排除しようとしているか)についてのメカニズムについてはまだ一定の見解を得るには至っていない。

2. 研究の目的

ヘルペスウイルス感染症においてウイルス側要因と宿主側要因の解析を行い、総合的評価を行うことで皮膚病変部の病態解明を行う。

3. 研究の方法

(1) Epstein-Barr virus (EBV) の免疫回避機構の解析

①皮膚病変部における EBV 感染細胞の証明：病理組織より EBER in situ hybridization 法または EBER RT-PCR 法で確認する。

②EBV 発現遺伝子の解析：皮膚病変部の組織を用いて、RT-PCR 法で確認を行う。潜伏感染関連遺伝子として LMP1, 溶解感染関連遺伝子として BZLF1, BDRF1 の発現を確認する。

(2) ヘルペスウイルス感染と皮膚局所における樹状細胞の動態の解析

組織サンプルを用いて病変部における樹状細胞の確認を行う。具体的には、サブタイプとして存在するランゲルハンス細胞, プラズマサイトイド樹状細胞, 成熟樹状細胞, さらに単球(組織球)の区別を免疫染色で確認する。

(3) HSV と VZV の免疫回避機構の解析

①ウイルス感染による細胞内 DNA ダメージシグナルの解析を行う。具体的には培養細胞を用いて HSV または VZV を感染させ、DNA ダメージシグナルの検出をウエスタンブロット法で行う。またさまざまなウイルス変異株を用いてウイルス増殖と DNA ダメージシグナルの関連を確認する。

②宿主側の防御反応の解析：組織サンプルを用いて細胞傷害性 T 細胞(CTL), NK 細胞などの浸潤細胞の確認・同定を行う。具体的には細胞特異的抗体を用いた免疫染色を行い、確認する。また、免疫染色から得られた陽性細胞数を定量し、健康人, 免疫抑制患者間で比較検討を行う。

③健康者, 免疫抑制患者間での宿主免疫応答の解析：健康人と免疫抑制患者におけるヘルペス病巣部のアポトーシスにかかわる分子を RT-PCR 法, 免疫染色法で調べる。

4. 研究成果

(1) Epstein-Barr virus (EBV) の免疫回避機構の解析

EBV の潜伏感染からの再活性化(溶解感染)は予後不良の疾患群の病変部組織で誘導される(図 1, 図 2)。最早期遺伝子である BZLF1 が陽性であった例での検討において、後期遺伝子である BDRF1 は上皮系腫瘍では全例陽性であった。リンパ球系疾患では BDRF1 陽性例は少数であった。このことはリンパ球系疾患で再活性化過程が途中で阻止されるためウイルス粒子として産生されない(図 3)。患者血清中のウイルス粒子の存在を確認したとこ

ろ、ウイルス粒子の存在が確認できた例は少数であった(図 4)。強い抗原性をもつ溶解感染関連蛋白に対する細胞傷害性 T 細胞(CTL)が病変部に浸潤してくることが一つの要因である。また、CTL 浸潤に関連したサイトカインにより伝染性単核症類似の全身症状を引き起こす。

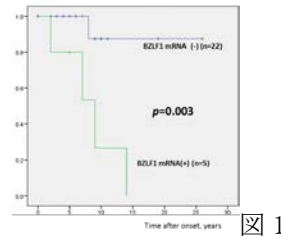


図 1

BZLF1 RT-PCR	PBMC	Lesional specimen
CAEBV (HMB, sHV)	0%	6/14cases 43%
Lymphoma	0%	17/24cases 71%
NPC/Gastric carcinoma	0%	5/6cases 83%
IM	29%	—
cHV	0%	0/17cases 0%
Control	0%	0/6cases 0%

p<0.01

図 2

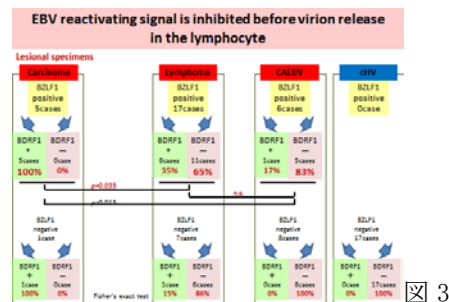


図 3

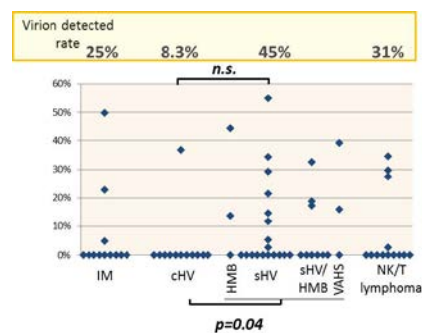


図 4

潜伏感染の維持に関して、LMP-1 発現を確認したところ、末梢血, 皮膚組織を同時に採取した例であってもいずれか一方のみ陽性となる例がかなりの割合で認められた。つまり LMP1 発現の on/off を同一個体の中で調節されており、宿主免疫に認識されにくいメカニズムを形成している(図 5)。

LMP1 mRNA is induced in the HV lesions, and in PBMC with CAEBV

cutaneous	IM	cHV		(CAEBV)		NK/T lymphoma	NPC
		sHV, HMB	6/79	sHV, HMB	7/79		
		5/11	50.0%	28.6%	70.0%	4/4	100%
PBMC	3/4	75.0%	2/9	22.2%	10/27	48.1%	0

Latency	EBNA 1	EBNA 2, 3A-C LP	LMP1	LMP2B	BART	EBERs	cHV		(CAEBV)		NK/T lymphoma		
							sHV, HMB	6/79	sHV, HMB	7/79			
cutaneous +	PBMC +	1/4	25.0%	3/5	12.5%	0/2	0	cutaneous +	PBMC +	3/4	50.0%	18.8%	50.0%
cutaneous -	PBMC -	0/4	0	0/4	0	0/2	0	cutaneous -	PBMC -	1/4	25.0%	37.5%	50.0%
							100	100	100	100	100	50.0%	

All cases of PBMC and the cutaneous specimen were positive for EBER1 RNA

図 5

(2) ヘルペスウイルス感染と皮膚局所における樹状細胞の動態の解析

単純疱疹 (HSV 感染症), 帯状疱疹 (VZV 感染症) の皮膚病変部の組織を用いて, 検討した結果, 病変部のランゲルハンス細胞は単純疱疹・帯状疱疹ともに正常皮膚より減少していることが分かった (図 6). つまりウイルスが宿主の免疫に認識されにくいメカニズムを局所的に作り上げていることが考えられた.

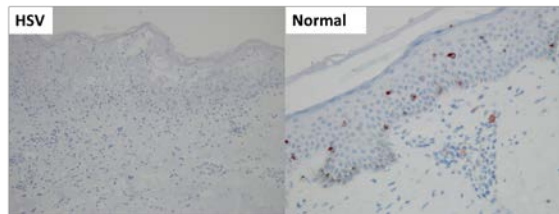


図 6 Langerin

(3) HSV と VZV の免疫回避機構の解析

① ウイルス感染による細胞内 DNA ダメージシグナルの解析

HSV 感染により ATM と H2AX のリン酸化が惹起され, DNA ダメージシグナルが誘導される. ATM 阻害剤の添加で HSV 複製が抑制された. つまり DNA ダメージシグナルが HSV 複製に必要なが, 途中でシグナルが阻害されるためアポトーシスに至らない.

VZV 感染では効率的なウイルス複製を得るために DNA ダメージシグナルの誘導自体を阻害し, アポトーシスを抑制する (図 7, 図 8). ウイルス複製能が抑制されるウイルス変異株を用いて DNA ダメージシグナルを確認すると野生株より強いシグナルが確認された.

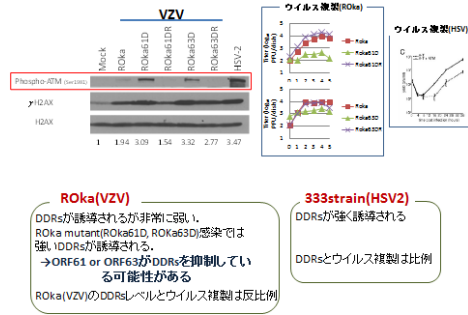


図 7

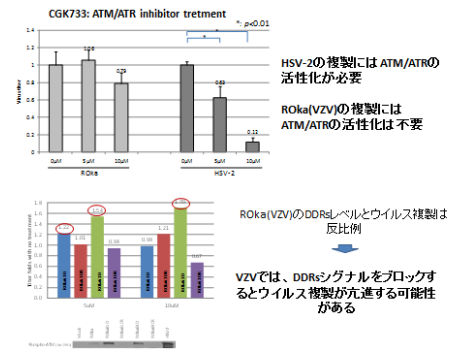
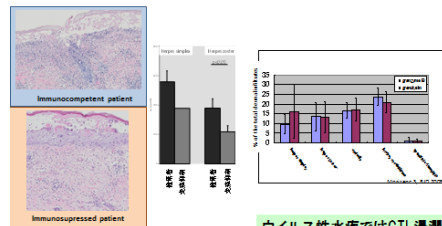


図 8

② 宿主側の防御反応の解析

病理組織を用いた病変部における CTL 浸潤を確認したところ, CTL 浸潤の程度は宿主免疫状態と比例した (図 9).

病変部において浸潤している炎症細胞の解析



免疫抑制患者は炎症細胞浸潤をきたしにくい

ウイルス性水疱ではCTL浸潤が顕著でNK細胞はほとんど見られない

図 9

③ 健常者, 免疫抑制患者間での宿主免疫応答の解析

遺伝子発現解析で, 免疫不全者はアポトーシスの機構不全 (特に Bax/Bcl-2・Fas/FasL) をきたすことが確認された (図 10).

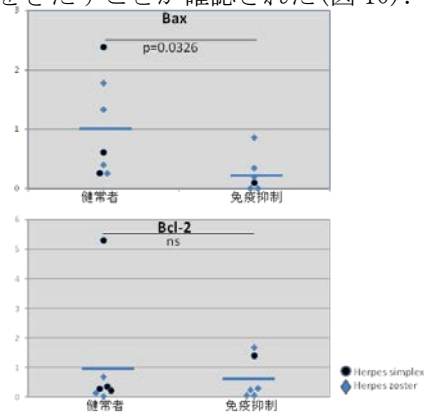


図 10

つまり、HSV、VZVはウイルス複製を効率よく行うために、ウイルス粒子を産生するまではアポトーシスを起こさないようにDNAダメージシグナルをうまく調節している。免疫不全状態では、アポトーシス誘導因子およびCTL関連細胞傷害性分子の発現低下により病変の拡大や難治性をきたす。

まとめ

ウイルス側

EBV: 発現するウイルス遺伝子が最小限になっており、必要時のみ一時的にLMP1などの発現をきたす。また再活性化はごく一部の細胞で短期間のみ認められ、大半は潜伏感染状態を維持している。この状態は宿主細胞の細胞増殖と同調して共存する形で維持されていく。

HSV: ATMを活性化してDNAダメージシグナル誘導して効率的なウイルス複製を行う環境を形成している。しかしDNAダメージシグナル下流において阻害するメカニズムが備わっているため、アポトーシスを起こさない。VZV: ATMの活性化を阻害するためDNAダメージシグナルを誘導しないようにして、アポトーシスをおこさないようにしている。

宿主側

・免疫不全者では、Bax/Bcl-2・Fas/FasLの系でアポトーシスの機構不全が示唆され、免疫不全患者では炎症細胞浸潤の絶対数が少ない上に、CTL陽性細胞の割合は健常人に比し低い。

・免疫不全状態では、アポトーシス誘導因子およびCTL関連細胞傷害性分子の発現低下が病変の拡大や難治性の理由であると考えられる。

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16件)

①平井陽至, 山本剛伸, 三宅智子, 山内晶子, 鈴木大介, 藤井一恭, 岩月啓氏, EBV関連皮膚リンパ球増殖症, 血液内科, 査読無, 66巻, 2013, 219-225

②渡邊友也, 蒲原毅, 松倉節子, 山本剛伸, 岩月啓氏, 池澤善郎, 鼻部に生じたメトトレキサート関連リンパ増殖性疾患の1例, 皮膚科の臨床, 査読有, 54巻, 2012, 1835-1839

③三宅智子, 平井陽至, 岩月啓氏, 山本剛伸, 伝染性単核球症 おとなとこどもの症状は同じ? Gianotti症候群もEBV?, Visual Dermatology, 査読無, 11巻, 2012, 1264-1266

④山本剛伸, 皮膚病変におけるウイルス感染検査と読み方, 日本皮膚科学会誌, 査読無, 122巻, 2012, 3405-3408

⑤Yamamoto T, Iwatsuki K, Diversity of Epstein-Barr virus BamHI-A rightward transcripts and their expression patterns in the lytic and latent infections, J Med Microbiol, 査読有, 61巻, 2012, 1445-1453, DOI: 10.1099/jmm.0.044727-0.

⑥Fujii K, Suzuki N, Yamamoto T, Duzuki D, Iwatsuki K, Valproic acid inhibits proliferation of EB virus-infected natural killer cells, Hematology, 査読有, 17巻, 2012, 163-169, DOI: 10.1179/102453312X13376952196494.

⑦Yamamoto T, Hirai Y, Miyake T, Yamasaki O, Morizane S, Iwatsuki K, Oculomucosal and gastrointestinal involvement in Epstein-Barr virus-associated hydroa vacciniforme, Eur J Dermatol, 査読有, 22巻, 2012, 380-383, DOI: 10.1684/ejd.2012.1665.

⑧Hirai Y, Yamamoto T, Kimura H, Ito Y, Tsuji K, Miyake T, Morizane S, Suzuki D, Fujii K, Iwatsuki K, Hydroa vacciniforme is pathogenically associated with circulating Epstein-Barr virus-infected $\gamma\delta$ T-cells, J Invest Dermatol, 査読有, 132巻, 2012, 1401-1408, DOI: 10.1038/jid.2011.461.

⑨鈴木薫, 竹中祐子, 石黒直子, 川島眞, 平井陽至, 山本剛伸, 岩月啓氏, 種痘様水疱症の1例, 臨床皮膚科, 査読有, 66巻, 2012, 295-298

⑩平井陽至, 山本剛伸, 三宅智子, 山内晶子, 藤井一恭, 森実真, 岩月啓氏, Epstein-Barrウイルス感染症と種痘様水疱症, MB Derma, 査読無, 191巻, 2012, 295-298

⑪山本剛伸, グラム染色・Tzanck試験 -コツと落とし穴-, Visual Dermatology, 査読無, 11巻, 2012, 378-381

⑫Fujii K, Suzuki N, Ikeda K, Hamada T, Yamamoto T, Kondo T, Iwatsuki K, Proteomic study identified HSP 70kDa protein 1A as a possible therapeutic target, in combination with histone deacetylase inhibitors, for lymphoid neoplasms, J Proteomics, 査読有, 75巻, 2012, 1401-1410, DOI: 10.1016/j.jprot.2011.11.010.

⑬Tanaka C, Hasegawa M, Fujimoto M, Iwatsuki K, Yamamoto T, Yamada K, Kawa K, Saikawa Y, Toga A, Wada T, Takehara K, Yachie A, Phenotypic analysis in a case of hydroa vacciniforme-like eruptions associated with chronic active Epstein-Barr virus disease of $\gamma\delta$ T cells, Br J Dermatol, 査読有, 166巻, 2012,

216-218, DOI: 10.1111/j.1365-2133.2011.10512.x.

⑭山本剛伸, 皮膚病変のウイルス感染検査, 日本皮膚科学会誌, 査読無, 121 巻, 2011, 2930-2933

⑮平井陽至, 山本剛伸, 三宅智子, 山内晶子, 藤井一恭, 岩月啓氏, Epstein-Barr ウィルス関連 T/NK リンパ球増殖症と診断した 63 症例の検討, 皮膚病診療, 査読無, 33 巻, 2011, 1174-1178

⑯ Nakayama Y, Asagoe K, Yamauchi A, Yamamoto T, Shirafuji Y, Morizane S, Nakanishi G, Iwatsuki K, Dendritic cell subsets and immunological milieu in inflammatory human papilloma virus-related skin lesions, J Dermatol Sci, 査読有, 63 巻, 2011, 173-183, DOI: 10.1016/j.jdermsci.2011.05.006.

[学会発表] (計 16 件)

① Iwatsuki K, Pathogenic cell types, molecular mechanisms and prognostic factors in EB virus-associated cutaneous T/NK lymphoproliferative disorders, International Investigative Dermatology, 2013 年 05 月 08 日~2013

年 05 月 11 日, Edinburgh International Conference Centre (EICC) (Edinburgh, Scotland)

② Hirai Y, Eradication of cutaneous herpesvirus infections by nucleic acid sensors and cytotoxic T lymphocyte mediated apoptotic processes, International Investigative Dermatology, 2013 年 05 月 08 日~2013 年 05 月 11 日, Edinburgh International Conference Centre (EICC) (Edinburgh, Scotland)

③山本剛伸, EBV 関連疾患の病変部における潜伏感染の維持・再活性化メカニズムの解析, 第 22 回 EB ウィルス感染症研究会, 2013 年 03 月 16 日~2013 年 03 月 16 日, ベルサール八重洲 (東京)

④ Iwatsuki K, Immediate-early (IE) gene reactivation signal, BZLF1, is a molecular marker for a poor prognosis of EBV-associated T/NK lymphoproliferative skin diseases, 2nd World Congress of Cutaneous Lymphomas, 2013 年 02 月 06 日~2013 年 02 月 06 日, MCI Deutschland GmbH (Berlin)

⑤山本剛伸, VZV・HSV 感染に伴う多彩な皮膚臨床像について, 第 5 回 HZ・S 研究会, 2013 年 02 月 02 日~2013 年 02 月 02 日, ストリングスホテル東京インターコンチネンタル (東京)

⑥ Takiguchi T, Cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 augments anti-viral

activity induced by double-stranded RNA in keratinocytes, The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2012 年 12 月 07 日~2012 年 12 月 08 日, ロワジュールホテル那覇 (那覇市)

⑦ Kamiya K, Pemphigus IgG treated keratinocytes are susceptible to herpes simplex virus induced cell dissociation, but protective to virus replication, The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2012 年 12 月 07 日~2012 年 12 月 08 日, ロワジュールホテル那覇 (那覇市)

⑧ Kajita A, Interferon gamma enhances anti-viral activity induced by double-stranded RNA in keratinocytes, The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2012 年 12 月 07 日~2012 年 12 月 08 日, ロワジュールホテル那覇 (那覇市)

⑨ Miyake T, A reactivation signal, BZLF1 expression, is a prognostic marker for severe hydroa vacciniforme and hypersensitivity to mosquito bites, The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2012 年 12 月 07 日~2012 年 12 月 08 日, ロワジュールホテル那覇 (那覇市)

⑩ Yamamoto T, Ataxia telangiectasia patients cannot cause severe Herpes Simplex because of disturbed Herpes simplex virus replication by ATM mutation, The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2012 年 12 月 07 日~2012 年 12 月 08 日, ロワジュールホテル那覇 (那覇市)

⑪ 山本剛伸, ヘルペスウイルス感染に伴うウイルス側・宿主側からみた免疫回避・誘導のメカニズム, 第 8 回中国研究皮膚科セミナー, 2012 年 11 月 17 日~2012 年 11 月 17 日, 岡山コンベンションセンター (岡山市)

⑫ 神谷浩二, 天疱瘡に合併するヘルペスウイルス感染症とその病態への関与, 第 64 回日本皮膚科学会西部支部学術大会, 2012 年 10 月 27 日~2012 年 10 月 27 日, 広島国際会議場 (広島市)

⑬ 平井陽至, EBV 関連 T/NK リンパ球増殖症における皮膚病変と末梢血リンパ球サブセットについて, 第 19 回ヘルペス感染症フォーラム, 2012 年 08 月 24 日~2012 年 08 月 25 日, 京王プラザホテル札幌 (札幌市)

⑭ 三宅智子, EB ウィルス関連疾患の予後に関する追跡調査, 第 111 回日本皮膚科学会総会・学術大会, 2012 年 06 月 01 日~2012 年 06 月 03 日, 京都国際会館 (京都市)

⑮ 山本剛伸, 皮膚病変におけるウイルス感染検査と読み方, 第 111 回日本皮膚科学会

総会・学術大会, 2012年06月01日～2012年06月03日, 京都国際会館(京都市)

⑩Iwatsuki K, Clues for Epstein-Barr virus reactivation with the subsequent outbreak of immune responses in skin lesions of hypersensitivity to mosquito bites, SID 72th Annual Meeting, 2012年05月09日～2012年05月12日, Raleigh Convention Center (Raleigh, North Carolina)

[図書] (計1件)

①山本剛伸, 中山書店, 皮膚科臨床アセット
13 皮膚のリンパ腫, 2012, 137-140

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 剛伸 (YAMAMOTO TAKENOBU)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号: 50379799

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: