

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390276

研究課題名(和文)ヘルペスウイルスが引き金をひく炎症性疾患におけるパトロール単球の役割

研究課題名(英文)The role of patrolling monocytes in inflammatory dermatoses in which herpesviruses can trigger

研究代表者

塩原 哲夫 (SHIOHARA, TETSUO)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：10118953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：多くの自己免疫疾患の発症では、制御性T細胞(Treg)の機能的及び数的低下が関与している。薬剤性過敏症症候群(DiHS)では急性期にはTregが増大し、様々なヘルペスウイルスが再活性化するが、その軽快とともにTregの数的、機能的低下をきたし、自己免疫疾患が発症する。本研究ではこのTregの機能低下に至る過程に、CD14^{dim}CD16⁺ patrolling monocyte (pMO)が重要な役割をしている可能性を明らかにした。DiHSの急性期には特異的に減少していたpMOが、回復に伴い急速に回復する。この回復期に増大するpMOはIL-6を産生することによりTregをTh17へシフトさせる。

研究成果の概要(英文)：Many autoimmune diseases are characterized by loss of regulatory T cell (Treg) numbers or their function. Drug-induced hypersensitivity syndrome (DiHS), a distinct phenotype of severe drug eruptions, offers a unique opportunity to link impaired Treg function with subsequent development of autoimmune disease. Our longitudinal study demonstrates that selective depletion of CD14^{dim}CD16⁺ patrolling monocytes (pMOs) sensing herpesviruses occurring at the acute stage is associated with Treg expansion. After clinical resolution, however, 'pathogenic' pMOs with potent ability to produce IL-6 are alternatively recruited and contribute to the eventual shift away from a Treg to a Th17 responses that is observed at the resolution stage. pMOs would be the major therapeutic target for inflammatory diseases characterized by the shift from a Treg to a Th17 development.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ヘルペスウイルス 単球 ホーミング 薬疹

1. 研究開始当初の背景

Monocyte は循環血液中に存在するとともに皮膚へも浸潤し、免疫反応に大きな役割をしていると考えられているにもかかわらず、実際の疾患の成立にどのように関与しているかは殆ど明らかにされていない。Monocyte のうちでも大部分を占める CD14⁺ classical monocyte (cMO)に比べ、minor な population である CD14^{dim}CD16 proinflammatory monocyte (pMO)は余り注目されてこなかったが、サイトカイン産生能が高く、ウイルス感染において防御的な役割をしていることが明らかにされつつあり、ウイルス感染に関連して生じる様々な疾患への関与が推測されている。とくに近年、pMO は血管内²局所を循環し、ウイルス感染を検知する一方で、局所の炎症の修復にも関与しているということが明らかになり、疾患の発症だけでなく、その後の経過にも深く関与する可能性が示されつつある。実際、我々はそれらの研究に先じて、アトピー性皮膚炎(AD)ではこの population に機能不全がある結果として、ヘルペスウイルスに対する易感染性が生ずる可能性を明らかにしている(J Allergy Clin Immunol 120:69-75, 2007)。

さらに我々はこの population には単純ヘルペスウイルス(HSV)の糖蛋白 gB と特異的に結合し、HSV 感染の際の膜融合に重要な役割を果たす paired immunoglobulin-like type 2 receptor (PILR α)が選択的に発現していることを明らかにした。これらの事実は、この pMOこそウイルス感染の target になるとともにウイルス感染後に生じてくる様々な疾患の発症の trigger となるばかりでなく、炎症の進展、終息に重要な役割を担っている可能性を考えさせる。

2. 研究の目的

ヘルペス感染が trigger となり生ずる疾患(カボジ水痘様発疹症、Stevens-Johnson 症候群、多形紅斑、固定薬疹、アナフィラクトイド紫斑など)において、pMO がどのような動態を示すか、どのようなサイトカインを産生するか、pMO 自身がヘルペスウイルス感染の target となりうるかを明らかにしたいと考えた。PILR α は抑制化レセプターとして知られており、ウイルスの感染が pMO の機能にどのような影響を与え、それが以後の免疫反応にどのような影響を与えるかも明らかにしたいと考えた。

このような検討と平行して、我々がこれまで病態の解明に力を入れてきた薬剤性過敏症症候群(DiHS)において、その急性期にこの pMO 分画が特異的に失われることを見出したため、この pMO が病態の回復とともにその後どのように変化し、それが他の免疫応答、とくに regulatoryT 細胞(Treg)の動態にどのような影響を与えるかも明らかにしたいと考えた。DiHS においては原因薬剤の中止後もウイルス(とくにヘルペスウイルス)の再活

性を繰り返し、長い経過で自己免疫疾患を発症していく過程に注目し、この過程に pMO が重要な役割を果たしている可能性についても明らかにしようと考えた。とくに我々が注目したのは DiHS において顕著にみられる Treg の経時的変化に対して、pMO がどのような役割をしているか、それを制御している分子機構を明らかにしたいと考えた。

その他、PILR α ノックアウト(KO)マウスを用いて、このマウスに HSV を感染させその抵抗性発現の有無についても明らかにするとともに、この HSV 感染 pMO を wild-type マウスに移入することにより感染抵抗性が獲得されるかについても明らかにしようと考えた。

3. 研究の方法

pMO、Treg 分画についての解析は主に CD14、CD16、CD4、Foxp3、CD45RA などの発現を用いてフローサイトメトリーにより行った。この分画におけるウイルス感染の解析は、HSV、VZV などのヘルペスウイルス感染を中心に real-time PCR 解析を行った。pMO 分画が他の細胞にどのような影響を与えるかに関しては、フローサイトメトリーにて pMO、cMO 分画を sorting し、それと他の細胞(多くは T 細胞)と共培養を行い、得られた細胞分画に関して様々な解析を行った。pMO 分画のサイトカイン産生能は TLR2 刺激後の細胞内サイトカイン産生をフローサイトメトリーで解析する方法を用いた。Treg の機能に関しては CD25 の発現により分離した Treg と effector T (Teff)分画を共培養し、その増殖反応を H³TdR の取り込みの増加により検討するとともに、CD45RA、Foxp3 の発現により Treg 分画を 3 つに分け、どの分画が増加するかについての検討を行った。さらに Treg、Th17 細胞分画における活性化細胞の頻度は、T 細胞を CFSE でラベルした後、様々な共培養を行った後の CFSE^{low} 分画の割合を検討することにより決定した。この分画の皮膚病変における局在は、主に免疫組織化学により検討するとともに、局所に浸潤する pMO 中に HSV が感染しているかを明らかにするため、in situ PCR 法を用いて検討した。

4. 研究成果

まず pMO 分画に HSV 感染が起こっている可能性が最も高いカボジ水痘様発疹症の末梢血を用いて、この分画における HSV 感染の有無を real-time PCR 法を用いて検討した。多くの検討を行ったが唾液中に明らかな HSV DNA load の増加が確認される症例においても pMO 分画に HSV の存在は確認出来なかった。さらに HSV 再活性化を確認した DiHS 症例でも同様の検討を繰り返したが、この分画に対する HSV 感染は確認出来なかった。そのためこの分画における HSV 感染の追求は諦め、研究の主眼を pMO の動態と

機能、他の細胞との相互作用におくことにした。

以下に項目を立てて得られた成果を述べる。

(1) pMO 分画は DiHS 急性期において特異的に消失しており、病変部の皮膚組織においても検出されなかったことにより、この分画が失われることが DiHS に特徴的であることが分かった。この分画の消失と反比例するように Treg 分画が著明に増加しており、中でも最も免疫応答の抑制に關与する induced Treg (iTreg)が増えていることが分かった。この分画の消失と Treg の増大が關連している可能性を考え、両者の動態を DiHS だけでなく他の重症薬疹である Stevens-Johnson 症候群(SJS)/中毒性表皮壊死症(TEN)でも検討することにした。SJS/TEN の急性期にはこの pMO 分画の減少、増大はみられなかったが、組織においてはこの分画が表皮に侵入し、表皮の破壊に關与していることが示唆された。一方、この分画の活性化と反比例して末梢血中の Treg の機能、iTreg の頻度は著明に低下していた。以上のことから、pMO 分画の活性化は Treg の機能低下を導き、表皮障害を示す病変が惹起されること、この分画の消失は Treg の増大を招き、それが潜伏ウイルスの再活性化をきたす可能性が考えられた。

(2) #1 の可能性を明らかにするために、DiHS 急性期末梢血リンパ球(PBMC)から pMO、cMO を分離し、DiHS PBMC、健常人 PBMC から分離した T 細胞分画と共培養を行い、どの MO 分画が Treg を増大させるかを検討した。最も Treg を増大させる力がつよいのが cMO 分画であり、pMO 分画はその能力が低いことが示された。とくに DiHS 急性期 cMO は健常人と比べその能力が最も強く、それは cMO が産生する IL-10 によることが抗体を用いた阻害実験から明らかになった。

(3) DiHS が急性期を過ぎたのち回復期に入ると pMO は急速に回復するとともに Treg は減少し、頻度は正常化していく。しかし、頻度の正常化に反して、その機能は低下するとともに Th17 細胞が増大していく。このような Treg Th17 への移行は DiHS に特異的に認められる現象であり、SJS/TEN では回復後もこのようなシフトはみられなかった。すなわちこのような Treg Th17 へのシフトこそが DiHS の回復期に生ずる自己免疫疾患の原因と考えられた。

(4) この DiHS の回復に一致してみられる pMO の急速な動員(recruitment)が、このような Treg Th17 にどのような影響を与えるか T 細胞、単球の共培養の系で検討した。DiHS 回復期に認められる pMO は、健常人に認められる pMO と異なり、IL-6 産生能が高く、共培養により Treg を減少させ、Th17

を増加させること、それは IL-6 依存性であることが分かった。このような“異常” pMO は SJS/TEN の急性期や、マイコプラズマ感染の回復期にもみられ、この異常 pMO が Treg 減少、Th17 増加をきたす重要な細胞と考えられた。

(5) このような異常 pMO が出現することに対し、治療として用いられるステロイドは抑制的に作用することが分かった。すなわちステロイドは pMO 分画に対して抑制的に作用することにより、間接的に Treg を増加させ、Th17 への分化を阻害することにより、自己免疫疾患の発症を抑える可能性が示された。実際、in vitro においてもステロイドはこの pMO 分画の出現を阻害する一方で、Treg を増大させ、Th17 を減少させることが示された。pMO/cMO のバランスを決めている因子についての解析はまだ出来ておらず、この分画のバランスこそ、次の治療のターゲットになりうると考えている。

(6) 以上の結果は、pMO の消失から始まった DiHS の動態は、pMO の急速な回復、それに伴う Treg の抑制、Th17 へのシフトが關与して、病態は Th17 主体の自己免疫疾患の発症へと進展していく可能性を示している。つまり、pMO と cMO のバランスが T 細胞免疫のパターンを決めていると思われ、これを制御することこそ DiHS の様々な時期における最適な Tx ということになる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Ishida T, Kano Y, Mizukawa Y, Shiohara T: The dynamics of herpesvirus reactivations during and after severe drug eruptions: their relation to the clinical phenotype and therapeutic outcome. *Allergy* 69:798-805, 2014. (査読有)
DOI: 10.1111/all.12410
2. Kurata M, Mizukawa Y, Aoyama Y, Shiohara T: Herpes simplex virus reactivation as a trigger of mucous lesions in pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 171:554-560, 2014. (査読有)
DOI: 10.1111/bjd.12961
3. Ogawa K, Morito H, Shiohara T (15 人、11 番目): Elevated serum thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) relates to reactivation of human herpesvirus 6 in drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS)/drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS). *Br J Dermatol* 171: 425-427, 2014. (査読有)
DOI: 10.1111/bjd.12948
4. Takahashi R, Sato Y, Kurata M, Yamazaki Y, Kimishima M, Shiohara T: Pathological

role of regulatory T cells in the initiation and maintenance of eczema herpeticum lesions. *J Immunol* 192:969-978, 2014. (査読有)

DOI: 10.4049/jimmunol.1300102

5. Hirahara K, Kano Y, Sato Y, Horie C, Okazaki A, Ishida T, Aoyama Y, Shiohara T: Methyprednisolone pulse therapy for Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis: clinical evaluation and analysis of biomarkers. *J Am Acad Dermatol* 69:496-498, 2013. (査読有)
DOI: 10.1016/j.jaad.2013.04.007
6. Hayakawa J, Mizukawa Y, Kurata M, Shiohara T: A syringotropic variant of cutaneous sarcoidosis: presentation of 3 cases exhibiting defective sweating responses. *J Am Acad Dermatol* 68:1016-1021, 2013. (査読有)
DOI: 10.1016/j.jaad.2012.11.039
7. Ushigome Y, Kano Y, Ishida T, Hirahara K, Shiohara T: Short- and long-term outcomes of 34 patients with drug-induced hypersensitivity syndrome in a single institution. *J Am Acad Dermatol* 68:721-728, 2013. (査読有)
DOI: 10.1016/j.jaad.2012.10.017
8. Mizukawa Y, Horie C, Yamazaki Y, Shiohara T: Detection of varicella-zoster virus antigens in lesional skin of zosteriform lichen planus but not in that of linear lichen planus. *Dermatology* 225: 22-26, 2012. (査読有)
DOI: 10.1159/000339771
9. Ushigome Y, Kano Y, Hirahara K, Shiohara T: Human herpesvirus 6 reactivation in drug-induced hypersensitivity syndrome and DRESS validation score. *Am J Med* 125:e9-10, 2012. (査読有)
DOI: 10.1016/j.amjmed.2011.10.027
10. Shiohara T, Kano Y, Takahashi R, Ishida T, Mizukawa Y: Drug-induced hypersensitivity syndrome: recent advances in the diagnosis, pathogenesis and management. *Chem Immunol Allergy* 97:122-138, 2012. (査読有)
DOI: 10.1159/000335624
11. Shiohara T, Mizukawa Y: Fixed drug eruption: the dark side of activation of intraepidermal CD8⁺ T cells uniquely specialized to mediate protective immunity. *Chem Immunol Allergy* 97:106-121, 2012. (査読有)
DOI: 10.1159/000335623

〔図書〕(計1件)

1. Shiohara T, Mizukawa Y: Lichen planus and lichenoid dermatoses. In *Dermatology 4th Editar* (Bologna JL et al., eds) Elsevier in press

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩原 哲夫 (SHIOHARA TETSUO)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号: 10118953

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

水川 良子 (MIZUKAWA YOSHIKO)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号: 50301479

高橋 良 (TAKAHASHI RYO)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号: 00317091