

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791144

研究課題名(和文)単純ヘルペスウイルス感染防御におけるマスト細胞の役割の解明

研究課題名(英文)The role of mast cells on host defense against lethal herpes simplex virus infection

研究代表者

青木 類 (AOKI, Rui)

山梨大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10377541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：近年、自然免疫におけるマスト細胞の重要性が明らかにされてきている。細菌感染ではマスト細胞が細菌の排除に寄与することが示されているが、ウイルス感染における生体防御への関与については不明であった。我々は、代表的な病原性ウイルスである単純ヘルペスウイルス(HSV-2)を用いて、HSV感染防御におけるマスト細胞(特にマスト細胞由来のTNF- α とIL-6)の重要性を初めて明らかにした。さらにHSVが経皮感染すると、自然免疫応答を活性化するalarminとしてIL-33がケラチノサイトから放出され、このIL-33によりマスト細胞からTNF- α とIL-6の産生が誘導され、生体防御反応を示すことが判明した。

研究成果の概要(英文)：Mast cells are known as important players in innate immune responses. The essential contribution of mast cells to bacterial host defense has been well established; however, little is known about their role in viral infections. We have reported that mast cells were critically involved in host defense at herpes simplex virus 2 (HSV-2)-infected sites through TNF- α and IL-6 production. HSV did not directly induce TNF- α or IL-6 production by mast cells, whereas supernatants from HSV-infected keratinocytes induced production of these cytokines by mast cells. Therefore, we examined which factor derived from HSV-infected keratinocytes activated mast cells. We found that IL-33, known as an alarmin in innate immune responses, was elevated in HSV-infected skin and triggered TNF- α and IL-6 production by mast cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：マスト細胞 単純ヘルペスウイルス 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

従来よりマスト細胞は型アレルギーを惹起する細胞として知られているが、近年、自然免疫や獲得免疫の誘導や調節におけるマスト細胞の重要性が明らかにされてきている。細菌感染においては、マスト細胞由来の様々な生理活性物質が細菌の排除に寄与していることが示されているが、ウイルス感染におけるマスト細胞の生体防御への関与についてはごく少数の報告があるのみである。

2. 研究の目的

人体にとって重要な病原体である単純ヘルペスウイルス(HSV-2)を用いて、HSV感染におけるマスト細胞の役割を解明することを目的とし、特に生体防御に関わるマスト細胞由来因子と、ケラチノサイトとの相互作用について明らかにするべく、研究を行った。

3. 研究の方法

(1) HSV皮膚感染モデルにおける生存率、皮膚中のウイルス量についての検討

HSV皮膚感染モデル : HSV2(186株) 7.5×10^4 PFU/mouseをマスト細胞欠損(W/W^o)マウス(10 mice/group)とコントロールの野生型(+/+)マウス(10 mice/group)の剃毛した背部に皮内接種し、皮膚病変の形成、脳炎による麻痺、生存率につき観察する。

HSV感染皮膚のウイルス量の測定 : HSV接種より1,3,5日後にW/W^oマウス、+/+マウス各々の接種部位の皮膚を切除し、skin lysatesを作成し、上清中のウイルス量をplaque assay法により測定する。

(2) W/W^oマウスへのマスト細胞再構成によるHSV感受性への影響

マスト細胞再構成実験 : W/W^oマウスに+/+マウス、TNF^{-/-}マウス、IL-6^{-/-}マウス由来の骨髓由来マスト細胞(BMMC) 2×10^6 /mouseを各々皮内接種により移入し、9週間後に皮膚局所にマスト細胞が再構成されることを確認する。B

MMC接種部位(再構成された部位)に同様にHSVを皮内接種し、皮膚病変、麻痺、生存率につき観察を行い、HSV感受性回復の有無につき検討する。

(3) HSV感染におけるBMMCのサイトカイン産生についての検討

BMMCのサイトカイン産生(HSVの直接的影響) : BMMC 2×10^5 にHSV (MOI 0.1,1,10,30)を曝露し、24時間後の各種サイトカイン産生につきELISAで測定する。

HSV感染ケラチノサイトを介したBMMCのサイトカイン産生(HSVのBMMCへの間接的影響) : Pam 212細胞 1×10^5 にHSV (MOI 0.1,1,10,30)を感染させ、24時間後の上清を回収し、その上清をBMMC 2×10^5 に曝露し、24時間後にサイトカイン産生につきELISAで測定する。

(4) HSV感染ケラチノサイト由来の液性因子についての検討

ELISAによるサイトカイン測定 : Pam 212細胞 1×10^5 にHSV (MOI 0.1,1)を感染させ、24時間後の上清を回収し、その上清中のサイトカインにつき各種ELISAで測定する。

IL-33免疫染色による評価 : Pam 212細胞 1×10^5 にHSV (MOI 0.1,1)を感染させ、24時間後にIL-33染色を行い、IL-33陽性細胞を数え、各々陽性率を算出する。

BMMCのST2ブロック : BMMCをT1/ST2抗体で30分間処理した後、HSV感染Pam 212細胞の上清で刺激し、24時間後にBMMCのサイトカイン産生につきELISAで測定する。

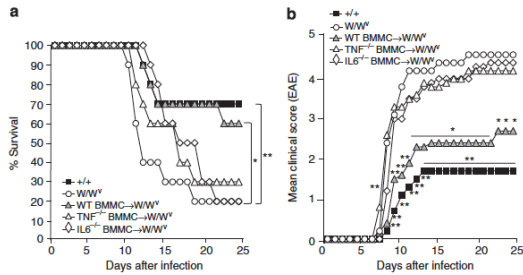
4. 研究成果

我々は、HSVに対する生体防御反応におけるマスト細胞の重要性を *in vivo*の実験系で初めて明らかにした(論文1)。

(1) マスト細胞欠損マウス(W/W^o)マウスにHSV-2の強毒株を皮内接種すると、野生型(+/+)マウスと比較し、皮疹や麻痺が重症化し、死亡率が有意に高くなることを見

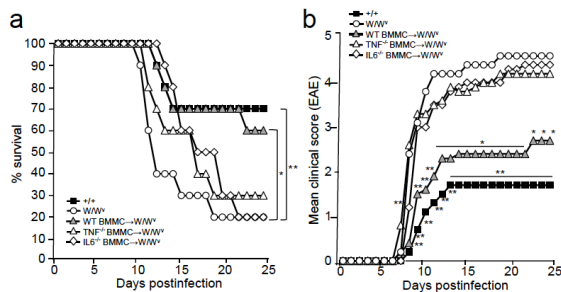
出した(図1)。また、HSV感染皮膚におけるウイルス感染価はW/W⁺マウスで高く、マスト細胞がウイルスの排除に関与していることが示唆された。

図1



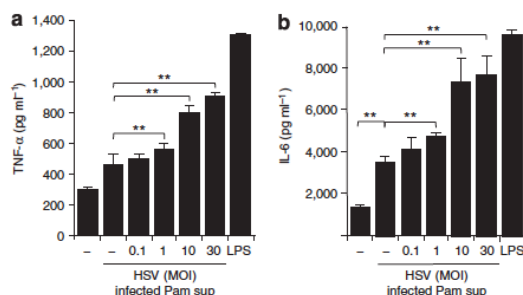
(2) HSV皮膚感染モデルにおいて、W/W⁺マウスで低下した生存率は、皮膚局所への+/+由来の骨髄由来マスト細胞(BMMC)の再構成で回復するのにに対し、TNF^{-/-}、IL-6^{-/-}マウス由来BMMCの再構成では完全には回復せず、マスト細胞のTNF⁻、IL-6が生体防御に重要であることが示された(図2)

図2



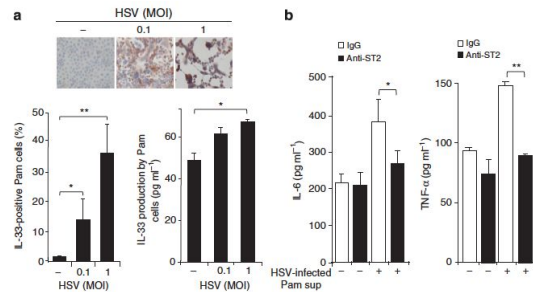
(3) BMMCをHSVで直接刺激してもTNF⁻、IL-6は産生されず、HSV感染させたケラチノサイトの上清をBMMCに曝露したところ、これらの炎症生サイトカインの産生を認めた(図3)。

図3



(4) HSV感染ケラチノサイトよりIL-33の産生が認められ、BMMCのIL-33受容体(T1/ST2)のブロックにより、BMMCから産生されるTNF⁻、IL-6は有意に抑制された(図4)。

図4

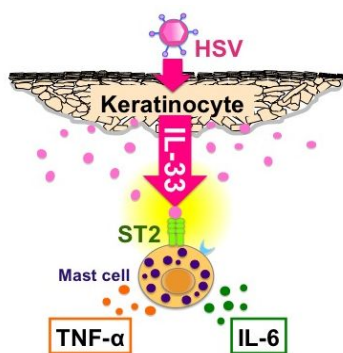


以上より、HSVが経皮的に感染すると、ケラチノサイトからIL-33が“alarmin”として放出されてマスト細胞に作用し、マスト細胞からTNF⁻とIL-6の産生が誘導されることにより、生体防御反応を示すことが判明した(図5)。

IL-33は喘息やアトピー性皮膚炎等慢性の炎症性疾患の病態に関わるサイトカインであるが、一方で、細胞に障害が加わったときに放出され自然免疫応答を活性化する

“alarmin”としての役割が新たに注目されている。最近、寄生虫感染や細菌感染においてIL-33がそれぞれTh2系へのシフト、好中球の誘導を介して病原体の排除に関与していることが報告されている。ウイルス感染ではIL-33が脾臓におけるCTLの誘導に関与することがごく最近Science誌に報告されているが、皮膚ウイルス感染におけるIL-33の役割に関しては我々の報告しかなく、今後はIL-33^{-/-}マウスや、ST2^{-/-}マウス由来BMMCを再構成したW/W⁺マウスにHSV接種を行い、皮膚HSV感染防御におけるIL-33/ST2受容体経路の*in vivo*での重要性について明らかにしていきたい。また、HSV以外の他のウイルスの皮膚感染におけるIL-33の宿主生体防御への関与についても検討していきたい。

図5



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)

- (1) Aoki R, Kawamura T, Goshima F, Ogawa Y, Nakae S, Nakao A, Moriishi K, Nishiyama Y and Shimada S. Mast cells play a key role in host defense against herpes simplex virus infection through TNF- and IL-6 production. J Invest Dermatol. 2013 Sep;133(9): 2170-9, 査読有
DOI: 10.1038/jid.2013.150.
- (2) Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Takahashi M, Aoki R, Moriishi K, Koyanagi Y, Gatanaga H, Blauvelt A, Shimada S. Oral Administration of the CCR5 Inhibitor, Maraviroc, Blocks HIV Ex Vivo Infection of Langerhans Cells within the Epithelium. J Invest Dermatol. 2013. 査読有
DOI: 10.1038/jid.2013.215.
- (3) Ogawa Y, Kawamura T, Matsuzawa T, Aoki R, Gee P, Yamashita A, Moriishi K, Yamasaki K, Koyanagi Y, Blauvelt A, Shimada S. Antimicrobial peptide LL-37 produced by HSV-2-infected keratinocytes enhances HIV infection of Langerhans cells. Cell Host Microbe. 2013 Jan 16;13(1):77-86. 査読有
DOI: 10.1016/j.chom.2012.12.002.

[学会発表](計 3 件)

- (1) 青木 類, The alarmin IL-33 derived from HSV-2-infected keratinocytes triggers mast cell-mediated antiviral innate immunity, International Investigative Dermatology, 2013年5月10日, Edinburgh (Scotland)
- (2) 青木 類, IL-33 triggers mast cell-mediated innate immunity against lethal herpes simplex virus infection through TNF- and IL-6, The 37th Annual Meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology, 2012年12月8日, 沖縄
- (3) 青木 類, IL-33 triggers mast cell-mediated innate immunity against lethal herpes simplex virus infection through TNF- and IL-6, The 42th Annual European Society for Dermatological Research meeting, 2012年9月21日, Venice(Italy)

6. 研究組織

(1)研究代表者

青木 類 (AOKI Rui)
山梨大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 10377541

(2)研究協力者

川村 龍吉 (KAWAMURA Tatsuyoshi)
山梨大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 70262657

島田 眞路 (SHIMADA Shinji)
山梨大学・医学工学総合研究部・教授
研究者番号: 10114505