

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462755

研究課題名(和文) 網羅的分子解析によるウイルス性角膜炎の病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of viral keratitis pathogenesis by comprehensive molecular analyses

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルスの角膜内皮細胞感染に関係した分子を in vitro の系にて、マイクロアレイにより網羅的に解析した。その結果、インターフェロンシグナリング、pattern recognition receptor、抗原提示に関与する分子の重要性が示唆された。中でも、indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) はウイルスに対する抗原特異的制御性T細胞を誘導し、interferon regulatory factor 7(IRF7)はウイルス感染後の自然免疫系及び獲得免疫系誘導に寄与し、RAGEはHSV-1感染刺激によるIFN- $\gamma$  の誘導に関与していた。

研究成果の概要(英文)：Molecules were comprehensively analyzed in corneal endothelial cells infected with herpes simplex virus (HSV) and cytomegalovirus in vitro by microarray technique, and these analyses indicated the importance of molecules related with interferon signaling, pattern recognition receptors, and antigen presentation. Especially, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induced HSV antigen-specific regulatory T cells, and resulted in immune tolerance. Also interferon regulatory factor 7(IRF7) induced both innate and acquired immunity, and receptors for advanced glycation endproducts (RAGE) were related with the induction of interferon- $\gamma$  after HSV infection.

研究分野：医学/眼科学/角膜・眼感染症

キーワード：単純ヘルペスウイルス サイトメガロウイルス 角膜内皮 マイクロアレイ IDO 制御性T細胞 IRF7  
RAGE

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 前眼部のウイルス性の疾患としてもっとも研究がなされているのはヘルペス性角膜炎であるが、その病態にはまだ不明な部分が多い。特に内皮炎はその病態においてウイルス増殖が主体なのか、免疫反応が主体なのかさえわかっていない。ヘルペス性角膜炎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て久しいにもかかわらず、その治療には現在でも苦慮することが多い。その一つの要因として視力への影響が大きい実質型がホストの免疫反応を主体とした病態であり、これを抑制するとかえってウイルス増殖や潜伏状態からの再活性化を招いてしまうということがあげられる。

(2) この潜伏と再活性化、そして角膜実質での免疫反応については、種々の因子が複雑に絡みあっているが、これを明らかにするために多くの研究がなされてきた。特に、視力低下の原因となる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は、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きた。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てきている。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 (IFN- $\gamma$ ), IL-12 の関与が報告されていた。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。また、ケモカインについては、MIP(macrophage inflammatory protein) -1 などの関与が報告されている。我々は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 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ , 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。

(3) しかし、HSK の病態に関与する分子は多数存在しており、個々の分子を個別に解析することは、その分子に焦点をあてることになる一方で、全体像を見ずにさほど重要でない特定の分子を扱うことになる欠点もあった。また、前術したように内皮炎については不明な点が多く、加えて、最近新たに問題となってきているサイトメガロウイルス (cytomegalovirus:CMV)による前眼部感染に関与する分子についてはまったくわかっ

ていなかった。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では、これまでの我々の研究成果を踏まえて、HSV、CMV による前眼部疾患の病態について、それに関連した分子を解析していくが、単一の分子に注目しておこなうのではなく、広く網羅的にマイクロアレイを用いて分子を解析し、多数の分子のネットワークとしてまずとらえ直し、そこから抽出された注目すべき分子の働きを再び個別に調べていくこととした。特にもっともその病態が不明な内皮炎を主体として研究を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) CMV 角膜内皮細胞感染による分子応答の網羅的検索

不死化ヒト角膜内皮細胞 (HCEn) に CMV Towne 株を感染させる系を使用した。CMV 感染 HCEn より、RNA を精製し、マイクロアレイにより取得した transcriptome データを用いて、ネットワーク解析を行い、後述する HSV 感染内皮との共通ネットワークを探索した。

### (2) CMV 感染角膜内皮細胞による CMV タンパク IE1, pp65 タンパクを標的分子とした cytotoxic T lymphocyte(CTL)細胞の誘導

HCEn に CMV TB40/E 株を感染させる系を使用した。CMV 感染内皮の抗ウイルス CTL 活性誘導能を検討するため、A2402 陽性 CMV 既感染者の末梢血より CD8 陽性 T 細胞を採取し、A2402 陽性 CMV 感染角膜内皮が MHC class I 拘束性に CD8 陽性 T 細胞を活性化しえるかを検討した。

### (3) HSV 角膜内皮細胞感染による分子応答の網羅的検索と indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) の役割の解析

HCEn に HSV KOS 株を感染させる系を使用した。HSV 感染 HCEn より、RNA を精製し、マイクロアレイにより取得した transcriptome データを用いて、ネットワーク解析を行った。また、HSV 感染 HCEn における IDO のタンパクレベル、酵素レベルでの変化を検討した。次いで HSV 感染 HCEn 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 陽性 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。以上の系における IDO の関与を IDO 特異的 siRNA やプラスミド transfection による IDO 過剰発現を用いて検討した。

### (4) HSV 感染角膜内皮細胞における interferon regulatory factor 7(IRF7)の役

## 割の解析

HCEn に HSV KOS 株を感染させる系を使用した。感染 HCEn の包括的転写応答のネットワーク解析で、主要制御因子と同定された IRF7 の役割を調べるため、clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) 法による遺伝子編集を用いて IRF7 欠損細胞株を作成し、 $\alpha$  型 IFN に集約される自然免疫応答、獲得免疫系の賦活化への寄与を検証した。

### (5) HSV 感染角膜内皮細胞の炎症応答における receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) の役割の解析

HCEn における RAGE の発現を real-time RT-PCR および FACS を用いて検討した。また、HSV KOS 株感染及び種々の RAGE のリガンドによる HCEn 刺激に対する応答プロフィールを炎症性サイトカインに対する real-time RT-PCR および ELISA で検討した。

## 4. 研究成果

### (1) CMV 角膜内皮細胞感染による分子応答の網羅的検索

【結果】CMV 感染後、2641 遺伝子の有意な変動を示した ( $P < 0.05$ )。多くの遺伝子の変動は発現増大であり、最大発現遺伝子は順に IDO1, IFIT2, RSAD2, IP-10, OASL となった。CMV 感染にもっとも関連づけられた canonical pathway は、インターフェロニンシグナリング ( $p = 2.4 \times 10^{-17}$ )、次に細菌/ウイルス感染に対する pattern recognition receptor 関連 ( $p = 6.1 \times 10^{-14}$ ) となった。CMV 感染に対して誘導された中でもっとも有意なネットワークは、抗原提示、タンパク合成、細胞発達となった ( $p = 1 \times 10^{-48}$ )。また、HSV 感染と共通する canonical pathway を探索した結果、もっとも有意な pathway は同一となった。

【結論】CMV 感染は、角膜内皮に対して HSV と同様、インターフェロン応答に特徴付けられる転写応答を引き起こす。

### (2) CMV 感染角膜内皮細胞による CMV タンパク IE1, pp65 タンパクを標的分子とした CTL 細胞の誘導

【結果】角膜内皮は、CMV 感染に対して CMV タンパクの IE1, pp65 タンパクを発現した。CMV 感染内皮は、class I 拘束性に既感染者由来の CD8 陽性 T 細胞を増殖させることができた。この CD8 陽性 T 細胞は、角膜内皮に提示される IE1 及び pp65 のエピトープペプチド刺激によりインターフェロン  $\gamma$  及びグラナザイム B を誘導した。

【結論】CMV 感染内皮は、IE1 及び pp65 を標的とした CD8 陽性 T 細胞に mediate される獲得免疫系としての抗ウイルス応答を誘導する。

### (3) HSV 角膜内皮細胞感染による分子応答の

## 網羅的検索と IDO の役割の解析

【結果】マイクロアレイの結果、抗原提示機能に関連した分子の増加を認めしたが、その全ゲノム転写解析において IDO がもっとも発現が増強された因子の一つであり、HSV 感染後、IDO 転写のみならず IDO 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 IDO の誘導は toll-like receptor9 (TLR9) 阻害オリゴにて有意に抑制された。一方、HSV 感染角膜内皮と HSV 特異的アロリンパ球との陽性刺激試験では、CD4 陽性 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 陽性 T 細胞は、末梢血由来の抗原提示細胞による HSV 特異的 CD4 陽性 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、抗原特異的制御性 T 細胞 (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 IDO 発現を IDO 特異的 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 IDO 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 CD4Treg の誘導活性が増大した。

【結論】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、CD4Treg 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。

### (4) HSV 感染角膜内皮細胞における IRF7 の役割の解析

【結果】HSV 感染後、HCEn は IRF7 の誘導とともに IFN  $\alpha$  を産生した。しかし、IRF7 欠損細胞株においては、自然免疫応答としての  $\alpha$  型 IFN 応答は高度に障害された。IRF7 をプラスミドの transfection で再度発現させた IRF7 欠損細胞株ではこの経路は回復した。一方、獲得免疫系へのプライミング機能について検証した所、HSV 感染後 HCEn は、HSV 既感染者由来のメモリー CD8 陽性 T 細胞に対して HSV エピトープ特異的かつ MHC クラス I 拘束性に IFN  $\alpha$  産生を誘導した。このプライミング機能は、IRF7 欠損細胞株では消失した。

【結論】角膜内皮細胞において、IRF7 はウイルス感染後の自然免疫系及び獲得免疫系誘導に寄与する重要な制御因子である。

### (5) HSV 感染角膜内皮細胞の炎症応答における RAGE の役割の解析

【結果】RAGE は、HCEn において強発現していた。HCEn は、CpG の刺激により IL-6、IFN- $\alpha$  を誘導した。一方、HSV による感染刺激は、RAGE 発現を誘導した。RAGE の siRNA および RAGE 阻害抗体は、CpG 刺激による IFN- $\alpha$  の誘導を転写レベルで阻害した。また、HSV-1 感染刺激による IFN- $\alpha$  の誘導も同様に RAGE 阻害により抑制された。RAGE の一過性過剰発現系を用いた場合、RAGE の発現量に応じて、リガンドに対する IFN- $\alpha$  の誘導は増強し、HSV 感染刺激においても、RAGE の発現に応じて IL-6、IFN- $\alpha$  発現は増強した。

【結論】角膜内皮に RAGE は強発現し、リガンド刺激、HSV 感染に応答して IFN-誘導に関与する。

#### 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9件)

Koizumi N, Miyazaki D, Inoue T, Ohtani F, Kandori-Inoue M, Inatomi T, Sotozono C, Nakagawa H, Horikiri T, Ueta M, Nakamura T, Inoue Y, Ohashi Y, Kinoshita S: The effect of topical application of 0.15% ganciclovir gel on cytomegalovirus corneal endotheliitis Br J Ophthalmol 査読あり 101: 2017,114-119

DOI10.1136/bjophthalmol-2015-308238

Haruki T, Miyazaki D, Inata K, Sasaki S, Yamamoto Y, Kandori M, Yakura K, Noguchi Y, Touge C, Ishikura R, Touge H, Yamagami S, Inoue Y: Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 in corneal endothelial cells limits herpes simplex virus type 1-induced acquired immune response. Br J Ophthalmol. 査読あり 99: 2015,1435-1442 DOI10.1136/bjophthalmol-2015-306863

Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Shiraishi A, Ohashi Y, Kandori M, Miyazaki D, Inoue Y, Soma T, Nishida K, Takase H, Sugita S, Mochizuki M, Kinoshita S, & Japan Corneal Endotheliitis Study Group: Clinical features and management of cytomegalovirus corneal endotheliitis: analysis of 106 cases from the Japan corneal endotheliitis study. Br J Ophthalmol 査読あり 99: 2015,54-58 DOI10.1136/bjophthalmol-2013-304625

Haruki T, Miyazaki D, Matsuura K, Terasaka Y, Noguchi Y, Inoue Y, Yamagami S: Comparison of toxicities of moxifloxacin, cefuroxime, and levofloxacin to corneal endothelial cells in vitro. J Cataract Refract Surg 査読あり40: 2014,1872-1878 DOI10.1016/j.jcrs.2014.08.027

川口亜佐子、武信二三枝、魚谷瞳、矢倉慶子、宮崎大、井上幸次、中山哲夫、吉川哲史、八田史郎：流行性耳下腺炎を伴わないがムンプスウイルスの関与が疑われた劇症角膜内皮炎の1例。臨床眼科 査読あり 67: 2013,1143-1147

URL:www.igaku-shoin.co.jp/mag/ringan/

唐下千寿、矢倉慶子、寺坂祐樹、宮崎大、井上幸次：輪部移植5年後にヘルペス性角膜炎を発症した1例。あたらしい眼科 査読あり 30: 2013,837-840

URL:www.atagan.jp/

Kandori M, Miyazaki D, Yakura K, Komatsu N, Touge C, Ishikura R, & Inoue

Y: Relationship between the number of cytomegalovirus in anterior chamber and severity of anterior segment inflammation. Jpn J Ophthalmol 査読あり 57: 2013,497-502

DOI10.1007/s10384-013-0268-2

Inoue Y, Shimomura Y, Fukuda M, Miyazaki D, Ohashi Y, Sasaki H, Tagawa Y, Shiota H, Inada N, Okamoto S, Araki-Sasaki K, Kimura T, Hatano H, Nakagawa H, Nakamura S, Hirahara A, Tanaka K, and Sakuma H: Multicenter clinical study of the herpes simplex virus immunochromatographic assay kit for the diagnosis of herpetic epithelial keratitis. Br J Ophthalmol 査読あり 97: 2013,1108-1112

DOI10.1136/bjophthalmol-2012-302254

Sasaki S, Miyazaki D, Haruki T, Yamamoto Y, Kandori M, Yakura K, Suzuki H, & Inoue Y: Efficacy of herpes virus helicase-primase inhibitor, ASP2151, for treating herpes simplex keratitis in mouse model. Br J Ophthalmol 査読あり 97: 2013,498-503

DOI10.1136/bjophthalmol-2012-302062

[学会発表](計23件)

Inoue Y: Viral keratitis: Clinical spectrum and management. Instruction Course 'Paradigm shift in the management of microbial keratitis', The 32<sup>nd</sup> Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress, 2017/3/1-3/5, Suntec (Singapore)

清水大輔、宮崎大、清水由美子、井上幸次、細貝真弓、磯村寛樹：サイトメガロウイルスは線維柱帯細胞に感染するか？ 第33回鳥取県眼科学術講演会・第66回鳥取大学眼科同門会講演会，2016/12/17，米子全日空ホテル（鳥取県・米子市），

Inoue Y: Basic approach to viral corneal endotheliitis. Symposium 'Corneal Infection', XX Biennial Meeting of the International Society for Eye Research, 2016/9/25-9/29, Keio Plaza Hotel 京王プラザホテル（東京都・新宿区），

稲田耕大、矢倉慶子、魚谷竜、清水大輔、宮崎大、井上幸次：前眼部感染症診断における水痘帯状疱疹ウイルス real-time PCR の役割。第30回ヘルペスウイルス研究会，2016/6/16-6/18，セミナーハウス クロス・ウェーブ府中（東京都・府中市）

井上幸次：ウイルス性角膜炎の診断と治療。第86回九州眼科学会・平成28年度九州ブロック眼科講習会，2016/5/29，アクロス福岡（福岡県・福岡市）

Uotani R, Miyazaki D, Inoue Y, & Suzutani T: Activation of cytotoxic T lymphocytes by corneal endothelial cells after infection of human cytomegalovirus.

Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology 2016, 2016/5/1-5/5, Seattle, USA

Shimizu D, Miyazaki D, Inata K, Uotani R, Yakura K, Haruki T, & Inoue Y: Evaluation of effectiveness of real-time PCR for clinical diagnosis of herpes simplex virus keratitis, The 10<sup>th</sup> KPro Study Group Meeting, 2016/4/22-4/23, 京都ホテル大倉(京都府・京都市)

Inoue Y: Viral keratitis: Clinical spectrum and management. Instruction Course CO-SC07 'Paradigm shift in the management of microbial keratitis', The 31<sup>th</sup> Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress, 2016/3/24-3/27, Taipei, Taiwan

Shimizu D, Miyazaki D, Inata K, Uotani R, Yakura K, Haruki T, & Inoue Y: Evaluation of effectiveness of real-time PCR for clinical diagnosis of herpes simplex virus keratitis, 2015/9/3-9/4, Barcelona, Spain

Inoue Y: Typical and atypical presentations of viral keratitis. Plenary Session 6 'Joint Session ICOI, EuCornea, ESCRS', The 7<sup>th</sup> International Conference on Ocular Infections, 2015/9/3-9/4, Barcelona, Spain

Inoue Y: Anti-viral agents. Plenary Session 2 'Advances in ocular anti-infective and anti-inflammatory agents: Update on ophthalmic agents', The 7<sup>th</sup> International Conference on Ocular Infections, 2015/9/3-9/4, Barcelona, Spain

Inoue Y: CMV corneal endotheliitis. Symposium 'Corneal, endothelium: in health, disease, and repair', The 30<sup>th</sup> Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress, 2015/4/1-4/4, Guangzhou, China

Inoue Y: Utility of real-time polymerase chain reaction in the diagnosis of viral keratitis. Symposium 12 'Corneal Infection & Inflammation', The 4<sup>th</sup> Asia Cornea Society Biennial Scientific Meeting, 2014/12/11-12/12, Taipei, Taiwan

Inoue Y: Atypical HSV keratitis. Instruction Course 214 'Atypical Keratitis', American Academy Ophthalmology 2014 Annual Meeting, 2014/10/18-10/21, Chicago, USA

Miyazaki D, Kandori M, Noguchi Y, Yakura K, Otani F, Inoue Y, Yamagami S: Role of RAGE in interferon response of corneal endothelial cells after HSV-1 infection. The 39<sup>th</sup> Annual International Herpesvirus Workshop 2014, 2014/7/19-7/23, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

Kandori M, Miyazaki D, Inoue Y,

Yamagami S, Suzutani T: Inflammatory responses of corneal endothelial cells induced by human cytomegalovirus infection. World Ophthalmology Congress 2014, 2014/4/2-4/6, 東京国際フォーラム・東京帝国ホテル(東京都・千代田区)

神鳥美智子, 宮崎大, 野口由美子, 矢倉慶子, 大谷史江, 井上幸次, 山上聡: 角膜内皮細胞の炎症応答における RAGE(終末糖化産物受容体)の役割. 角膜カンファレンス 2014(第 38 回日本角膜学会総会, 第 30 回日本角膜移植学会), 2014/1/30-2/1, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)

Inoue Y: Current aspects of viral corneal endotheliitis. The 2nd Korean Ocular Infection Society Meeting. 2013/12/21, Seoul, Korea

Inoue Y: Clinical and basic approaches to corneal endotheliitis. The 19<sup>th</sup> Annual Meeting of the Kyoto Cornea Club. 2013/11/29-11/30, ウェスティン都ホテル京都(京都府・京都市)

Inoue Y: Atypical HSV keratitis. Instruction Course 521 'Atypical Keratitis', American Academy Ophthalmology 2013 Annual Meeting, 2013/11/16-11/19, New Orleans, USA,

②宮崎大, 神鳥美智子, 野口由美子, 矢倉慶子, 山上聡, 錫谷達夫, 井上幸次: サイトメガロウイルス感染に対する感染内皮の分子応答. 第 50 回日本眼感染症学会, 2013/7/12-7/14, 大阪国際会議場(大阪府・大阪市),

②宮崎大, 神鳥美智子, 野口由美子, 矢倉慶子, 山上聡, 錫谷達夫, 井上幸次: サイトメガロウイルス感染に対する角膜内皮の分子応答. 第 28 回ヘルペスウイルス研究会, 2013/5/30-6/1, 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県・淡路市)

③Kandori M, Miyazaki D, Yakura K, Noguchi Y, Yamamoto Y, Inoue Y, Suzutani T: Human cytomegalovirus-mediated inflammatory responses of corneal endothelial cells. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology 2013, 2013/5/5-5/9, Seattle, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔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

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

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

春木 智子 (HARUKI, Tomoko)  
神鳥 美智子 (KANDORI, Michiko)  
佐々木 慎一 (SASAKI, Shin-ichi)  
大谷 史江 (OHTANI, Fumie)  
魚谷 竜 (UOTANI, Ryu)  
清水 大輔 (SHIMIZU, Daisuke)  
矢倉 慶子 (YAKURA, Keiko)  
清水 由美子 (SHIMIZU, Yumiko)