

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08761

研究課題名(和文)3次元・動物モデルを用いた単純疱疹の小水疱形成時におけるデスモグレインの役割解析

研究課題名(英文)Analyses of the role of desmoglein during vesicle formation in herpes simplex using a three-dimensional and animal model

研究代表者

山本 剛伸 (Yamamoto, Takenobu)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50379799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚表皮に単純ヘルペスウイルス(HSV)が感染すると、感染細胞間の接着蛋白、細胞骨格を構成する蛋白の発現分布に変化を生じ、形態が大きく変わり、最終的に小水疱が形成される。これは隣接する表皮細胞に感染拡大を阻止しようとする宿主の防御反応と考えることができる。一方、炎症性サイトカイン(インターロイキン6など)は、HSV感染に伴いウイルスを排除するために産生されるが、ウイルス複製を亢進させ、感染症の増悪をきたしやすくする側面ももつ。表皮細胞間接着蛋白であるデスモソームの構成蛋白であるデスモグレイン3は表皮細胞間感染拡大に重要な役割を果たしており、皮膚症状の増悪に関与する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単純ヘルペスウイルス感染に対する過剰な免疫防御反応は、かえって感染症の増悪をきたすことが想定されるため、重症感染症の時には、抗ウイルス薬とともに、抗インターロイキン6抗体製剤の併用などにより、早期の症状改善が得られる可能性がある。抗デスモグレイン3に対する自己抗体が誘導される尋常性天疱瘡は、単純ヘルペスウイルス感染が発症の引き金になっていることが想定される。今後の解析で、難病である尋常性天疱瘡の発症予防が確立できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Herpes simplex virus (HSV) infection of the epidermis causes changes in the expression in distribution of adhesion proteins among neighbored cells and cytoskeletal proteins in the cytoplasm, resulting in significant morphological changes and ultimately the formation of vesicles. These phenomena can be considered a host defense response to prevent the spread of infection to neighboring keratinocytes. On the other hand, inflammatory cytokines (e.g., interleukin-6) are produced in response to HSV infection to eliminate the virus, but they also increase viral replication, which can lead to exacerbation of the infection. Desmoglein 3, a component protein of desmosomes, an epidermal intercellular adhesion protein, plays an important role in the spread of epidermal intercellular infection and is involved in the exacerbation of skin symptoms.

研究分野：皮膚ウイルス感染症

キーワード：単純疱疹ウイルス デスモソーム デスモグレイン ケラチノサイト

1. 研究開始当初の背景

(1) 単純疱疹は、単純ヘルペスウイルス(HSV)感染により臨床的に小水疱を認め、病理組織学的にウイルス感染ケラチノサイトが棘融解、ウイルス性多核巨細胞を形成する。免疫不全患者のHSV感染では大型の弛緩性水疱や大型びらんを形成する。基底層でHSVが感染し、感染拡大するが、このHSV感染細胞を排除するための手段として、リンパ球などの免疫担当細胞が病変部を取り囲むようにして、病変の拡大を阻止するために、小水疱を形成すると考えられる。実際に、小水疱周囲に細胞傷害性T細胞の浸潤が報告されているが、メカニズムは不明である。

(2) 表皮細胞間接着分子の一つであるデスモグレイン 3(Dsg3)に対する抗体により引き起こされる尋常性天疱瘡(PV)は、HSV感染症と同様に棘融解が形成される。近年、PVとHSVの関連を示唆する報告が複数ある。例えば、PVの病勢と血清HSV-1抗体価が正の相関を示す¹⁾、一部の症例でPV発症時に、口腔内HSV DNAが著増している、さらに粘膜型PV患者の唾液中にはHSVが高頻度に検出されるにもかかわらず、典型的なヘルペス病変を形成することは少ない²⁾。これらは、HSVが感染しても、抗Dsg抗体により細胞間接触伝播や細胞融合が阻害され、臨床的に病変形成に至らないが、唾液中にHSVが高頻度に検出されるようになると予想される。逆にHSV感染によりDsgなどの細胞間接着分子が露出し、構造変化により抗Dsg抗体形成を惹起することも考えられる。しかし、この関連性は証明されていない。

2. 研究の目的

単純疱疹で惹起される皮膚局所の病態を解析し、HSV感染が表皮に与える影響をDsgに着目して検討することを目的とし、HSVの皮膚疾患における役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) *in vitro*解析:培養ケラチノサイトを用いて、HSVが感染することにより惹起される細胞内骨格蛋白、細胞間接着蛋白の発現変化を様々なカルシウム濃度(低Ca²⁺/高Ca²⁺)培地の条件で比較、検討した。

(2) 動物モデルを用いた解析:C57BL/6J(B6)マウスの大腿にHSV-1を感染させ、帯状疱疹様皮疹、足底の小水疱、足底の発汗、潜伏感染の誘導を確認し、経時的に病態の評価を行った。

(3) ノックアウト動物モデルを用いた解析:Dsg3の発現を欠損させた、Dsg3ノックアウト(KO)マウスを用いて、HSV-1を感染させ、様々な病態について、B6マウスと比較検討した。

(4) 臨床研究:単純疱疹と水痘・帯状疱疹ウイルス(VZV)感染症である帯状疱疹患者を対象にヒトの小水疱内の細胞形態、サイトカインとウイルス複製について解析した。

4. 研究成果

(1) ケラチノサイトの細胞内骨格、細胞間接着蛋白量について、HSV-1感染前後、培地のカルシウム濃度に関わらず、変化がみられなかった。一方、発現分布の解析では、低Ca²⁺の条件において、感染前は細胞質に細線維状の分布をしていた細胞骨格である微小管/アクチン/ケラチンが、感染後は、核周囲に層状分布を示した。高Ca²⁺では、微小管/アクチンは顆粒状、ケラチンは流線形に分布が変化した。細胞間接着蛋白であるDsg3/E-カドヘリンの発現分布は、カルシウム濃度に関わらず、点状から粗大顆粒状に分布が変化した。HSV-1感染により、これらの発現分布変化により棘融解、多核巨細胞の誘導につながるものが想定された。

低Ca²⁺条件でHSV-1が感染した場合は、細胞間接触伝播により隣接する非感染細胞に感染拡大するが、細胞融合は惹起されず、単核の棘融解細胞を形成した。一方、高Ca²⁺条件でHSV-1が感染した場合は、細胞間接触伝播により隣接する細胞に感染拡大し、さらに細胞融合も誘導されることが判明し、これにより多核巨細胞が形成される(図1)。

(2) B6マウスの大腿にHSV-1を経皮感染させると、接種部位に小水疱を形成することなく、びらん、潰瘍の皮膚病変を形成した。一方、接種部位の皮膚病変と離れた同側のマウス足底に丘疹、小水疱の形成を誘導することができ、病理組織学的に真皮に強い炎症性変化を認めた。さらに足底部位にHSV-1の存在が確認され、ウイルスが神経線維を介して伝播し、足底の小水疱形成に関与していることが示唆された。また、小水疱形成はヒトの表皮と同様に、ある程度の重層扁平上皮構造が必要であることが想定された。大腿後面に経皮接種したマウスの脊髄後根神経節を採取したところ、同側の脊髄後根神経節にもHSV-1の存在が確認され、潜伏感染を示唆する所見を得た(図2)。さらに、HSV-1感染により、エクリン汗腺の発汗量が一時的に減少し、本マウス

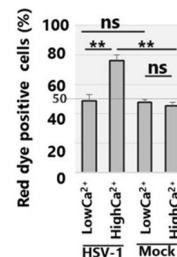


図1 高Ca²⁺条件で多核巨細胞が形成される

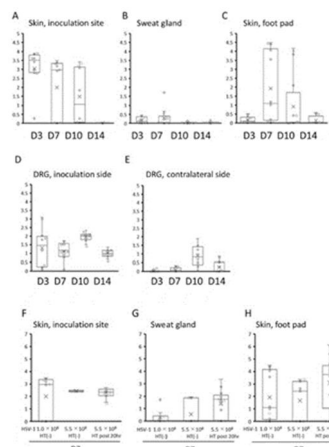


図2 足底、汗腺、脊髄後根神経節にHSV-1が分布する

は、ヘルペス様皮疹/発汗障害誘導モデルマウスとなることが判明した。つまり、接種部位の皮疹の程度(スコア 0-10 に細分類)に応じて、足底の皮疹、発汗低下が関連し、接種するウイルス量が同じでも、ストレス負荷により発汗低下が亢進した(図3)。ウイルスの感染だけではなく、宿主の免疫状態と関連して、様々なヘルペス関連症状が惹起されるマウスモデルであることを確認した。このマウスモデルに HSV-1 を再感染させたときに、皮疹の誘導がほとんど惹起されず、発汗低下も認めなかった。一方、再感染後には血清 HSV-1 抗体が強く誘導されており、皮疹の誘導や発汗抑制を制御する因子として液性免疫(抗 HSV-1 抗体)が関与することが示唆された(図4)。

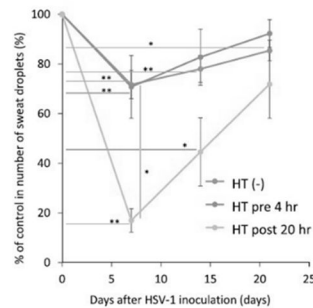


図3 HSV-1 感染と発汗低下

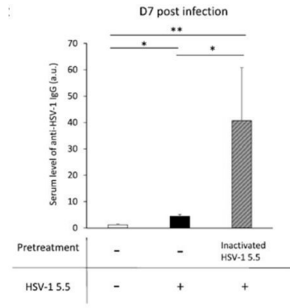


図4 HSV-1 感染と血清抗体価

(3) Dsg3 KO マウスを用いた解析では、大腿部に HSV-1 を感染させたところ、B6 と比較して、皮疹の程度が軽度となった。一方、脊髄後根神経節に移行するウイルス量は両者に差は見られず、発汗障害の程度も両者に差はなかった。つまり、Dsg3 は皮疹部の病変拡大に役割を果たしていると考えられるが、知覚神経への移行に関して、Dsg3 は関連しないということが示唆された。

(4) ヒトの皮膚(表皮)は、基底層でケラチノサイトが分裂増殖し、有棘層、顆粒層、角層へと分化する。培養ケラチノサイトの検討において、高 Ca^{2+} 培地条件(分化した状態)でウイルス性多核巨細胞が形成されることが(1)の研究成果として得られている。これを検証するために、単純疱疹、水痘、帯状疱疹患者の小水疱のうち、水疱蓋(高分化条件に近い条件)と水疱底(低分化に近い条件)の細胞を採取し、Tzanck test で多核巨細胞の発現量を比較検討した。その結果、水疱蓋(高分化条件に近い条件)をサンプルとした方が、水疱底(低分化に近い条件)よりも多数の多核巨細胞が検出された(図5)。つまり、*in vitro* のデータと臨床研究による *in vivo* データが一致し、高分化ケラチノサイトの条件で HSV, VZV 感染で多核巨細胞を形成し、基底層に近い低分化ケラチノサイトの条件で棘融解細胞が形成されることが判明した。

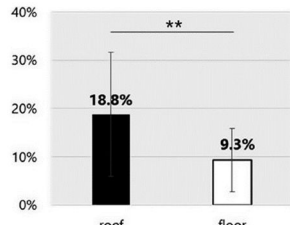


図5 ウイルス性多核巨細胞の発現分布

HSV-1 複製に関するサイトカインの解析を行ったところ、IL-6, TNF- α を添加すると、HSV-1 複製能が亢進することが判明した(図6)。これらは炎症性サイトカインとよばれるものであり、ウイルス感染によりケラチノサイトなどから産生されるため、感染増悪をきたすウイルス側にとって好都合の状態を形成することが判明した。一方、IL-6 添加により *ATP2A2*, *ATP2C1* mRNA 発現量は低下した(図7)。ダリエー病は *ATP2A2* 遺伝子に異常をもつ疾患であり、HSV 感染症を併発しやすい特徴がある。これらを総合すると、ダリエー病患者は、HSV 感染後、ケラチノサイトから IL-6, TNF- α などのサイトカインを産生することにより、ウイルス複製能が亢進し、感染症の増悪をきたしやすくなるとともに、*ATP2A2* mRNA 発現量が低下するため、ダリエー病の皮膚症状の悪化をきたすことが想定される。このメカニズムの悪循環で症状のさらなる増悪をきたすと考えられた。

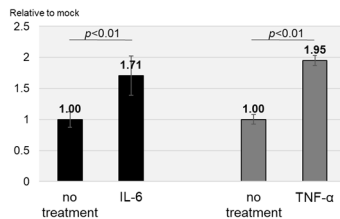


図6 IL-6, TNF- α 添加により HSV-1 複製能が増加する

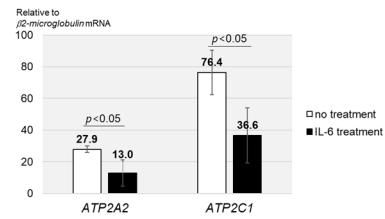


図7 IL-6 添加により *ATP2A2* mRNA 発現が低下する

< 引用文献 >

- 1) Senger P, et al. Eur J Dermatol 2017; 27: 132-138
- 2) Kurata M, et al. Br J Dermatol 2014; 171: 554-560

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Asanuma Yumiko, Ishimaru Hironobu, Sato Tetsuko, Yamamoto Takenobu, Aoyama Yumi	4. 巻 107
2. 論文標題 Herpes simplex virus-induced murine dry skin model through sweating disturbance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 151 ~ 159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2022.09.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Takenobu, Aoyama Yumi	4. 巻 48
2. 論文標題 Role of pro inflammatory cytokines in the pathophysiology of herpes simplex virus superinfection in Darier ' s disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 1607 ~ 1611
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.16097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Takenobu, Aoyama Yumi	4. 巻 48
2. 論文標題 Detection of multinucleated giant cells in differentiated keratinocytes with herpes simplex virus and varicella zoster virus infections by modified Tzanck smear method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 21 ~ 27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.15619	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Takenobu, Aoyama Yumi	4. 巻 37
2. 論文標題 Risk factor specific mortality in herpes zoster in a retrospective cohort study: The neutrophil to lymphocyte ratio is a useful biomarker for predicting late onset complications resulting in death	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology	6. 最初と最後の頁 e191 ~ e193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdv.18602	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Yamamoto T, Aoyama Y
2. 発表標題 Multinucleated giant cell or acantholytic cell with herpes virus infections is determined under differentiated condition of keratinocyte.
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of The Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅沼由美子, 山本剛伸, 佐藤徹子, 青山裕美
2. 発表標題 発汗低下モデルマウス
3. 学会等名 第15回中国研究皮膚科セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asanuma Y, Ishimaru H, Sato T, Yamamoto T, Aoyama Y
2. 発表標題 Herpes simplex virus-induced urine dry skin model through sweating disturbance
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yamamoto T, Asanuma Y, Ishimaru H, Yamane M, Aoyama Y
2. 発表標題 Disturbed epithelial integrity protects against cell-to-cell transmission of HSV-1 in keratinocytes
3. 学会等名 1st International Societies for Investigative Dermatology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yamane M, Ishimaru H, Asanuma Y, Yamamoto T, Aoyama Y
2. 発表標題 Local injection with anti-herpes simplex virus antibodies protects against development of herpes simplex virus-induced sweating disturbance
3. 学会等名 1st International Societies for Investigative Dermatology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yamamoto T, Ohyama T, Yamane M, Aoyama Y
2. 発表標題 Lymphocyte count and neutrophil-to-lymphocyte ratio at the onset of herpes zoster are useful biomarker for predicting life prognosis
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Asanuma Y, Ishimaru H, Sato T, Yamamoto T, Aoyama Y
2. 発表標題 Mouse models of sweating disturbance associated with dry skin induced by cutaneous inoculation of herpes
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	林 宏明 (Hayashi Hiroaki) (60388965)	川崎医科大学・医学部・講師 (35303)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	浅沼 由美子 (Asanuma Yumiko)		
研究協力者	石丸 浩靖 (Ishimaru Hironobu)		
研究協力者	山根 万里子 (Yamane Mariko)		
研究協力者	青山 裕美 (Aoyama Yumi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関