

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791068

研究課題名(和文) HSV感染防御における皮膚由来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

研究成果の概要(和文)：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、マスト細胞が細菌の排除に寄与していることが報告されているが、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明らかにされていない。我々は、Herpes simplex virus (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、研究を行った。マスト細胞欠損マウス(W/W<sup>v</sup>)とコントロールマウス(+/+)の背部皮内にHSVを接種したところ、W/W<sup>v</sup>では皮疹や麻痺が重症化し、死亡率が有意に高かった。HSV接種皮膚におけるHSV感染価はW/W<sup>v</sup>で高値であり、病理組織学的にW/W<sup>v</sup>では激しい炎症細胞浸潤を認めた。HSV感染させたW/W<sup>v</sup>の生存率は、皮膚局所への+/+由来の骨髄由来マスト細胞(BMMC)再構成により完全に回復したが、TNF<sup>-/-</sup>、IL-6<sup>-/-</sup>マウス由来のBMMCの再構成では完全には回復しなかった。また、BMMCにHSVを感染させてもTNF- $\alpha$ 、IL-6等の炎症性サイトカインの産生は誘導されなかったが、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、TNF- $\alpha$ 、IL-6の産生を認めた。以上より、皮膚感染局所のマスト細胞由来のTNFとIL-6が、致死的なHSV感染において生体防御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mast cells are not only effector cells in allergic responses, but are also initiator and regulator cells in both innate and adaptive immune responses. They are known as important players in host defense against bacteria, however, their role in viral infections is largely unknown. We have reported that intradermal injection with herpes simplex virus 2 (HSV-2) into mast cell deficient Kit<sup>W/W<sup>v</sup></sup> mice lead to increased clinical severity and mortality with elevated levels of virus titers in HSV-infected skins. Moreover, the severe mortality in Kit<sup>W/W<sup>v</sup></sup> mice was completely recovered by intradermal reconstitution with bone marrow-derived mast cells (BMMCs) which were derived from wild-type (WT), but not TNF<sup>-/-</sup> or IL-6<sup>-/-</sup> mice. Here, we show that HSV did not directly induce these cytokines production, whereas supernatants from HSV-infected keratinocytes, Pam 212, induced TNF- $\alpha$  and IL-6 production by BMMCs. Thus, our findings suggest that mast cells are involved in host defense at HSV-infected sites through TNF- $\alpha$  and IL-6 production.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：皮膚感染症

## 1. 研究開始当初の背景

従来よりマスト細胞はI型アレルギー反応のエフェクター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TNF- $\alpha$ やプロテアーゼなど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報告されているが、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明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

我々は、人体にとって重要な病原体であるHerpes simplex virus (HSV)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、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、炎症細胞浸潤の評価、所属リンパ節のDCについての検討

**HSV皮膚感染モデル:** HSV2(186株)  $7.5 \times 10^5$  PFU/mouseをマスト細胞欠損(W/W<sup>v</sup>)マウス(10 mice/group)とコントロール(+/+)マウス(10 mice/group)の剃毛した背部に皮内接種し、皮膚病変(zosteriform blisters)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<sup>v</sup>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。

**HSV感染皮膚の炎症細胞浸潤、HSV抗原の評価:** HSV接種より1, 3, 5日後にW/W<sup>v</sup>マウス、+/+マウス各々の接種部位の皮膚を切除し、HE染色、HSV染色により炎症細胞浸潤とHSV抗原につき検討する。

**樹状細胞(DC)の所属リンパ節への遊走に対する影響の検討:** HSV接種より2, 5日後のW/W<sup>v</sup>マウス、+/+マウス各々の所属リンパ節を回収し、HSV特異的CD8細胞を活性化するDCのpopulation(CD8<sup>+</sup> DC, CD103<sup>+</sup> DC)につきflowcytometryにて解析する。

(2) W/W<sup>v</sup>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<sup>v</sup>マウスに+/+マウス、TNF<sup>-/-</sup>マウス、IL-6<sup>-/-</sup>マウス由来の骨髄由来マスト細胞(bone marrow-derived mast cell, BMMC)  $2 \times 10^6$ /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。BMMC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の脱顆粒、サイトカイン、ケモカイン産生(HSVのBMMCへの直接的影響)についての検討

**BMMCの脱顆粒:** BMMC  $1 \times 10^5$ にHSV (MOI 0.1, 1, 10), Vero細胞培養液(陰性コントロール)を曝露させ、37°Cで1時間培養感染させた上清を用いて、脱顆粒につき $\beta$ -hexosaminidase assayにて検討する。

**BMMCのサイトカイン、ケモカイン産生:** BMMC  $2 \times 10^5$ にHSV (MOI 0.1, 1, 10, 30)を感染させ、24時間後の各種サイトカイン、ケモカイン産生につきELISAにて検討する。

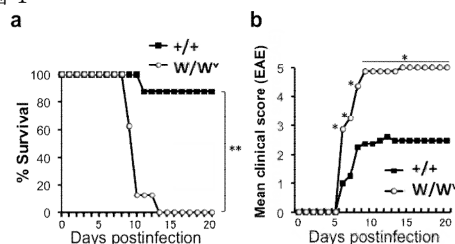
(4) HSV感染ケラチノサイトを介したBMMCのサイトカイン、ケモカイン産生(HSV感染のBMMCへの間接的影響)についての検討

Pam  $1 \times 10^5$ にHSV (MOI 30)を感染させ、24時間後の上清を回収し、その上清をBMMC  $2 \times 10^5$ に曝露し、24時間後にサイトカイン、ケモカイン産生につきELISAにて検討する。

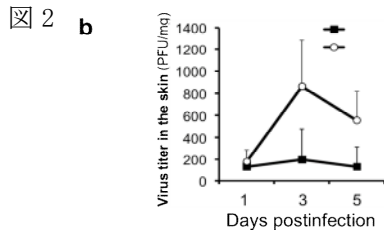
## 4. 研究成果

(1) W/W<sup>v</sup>は+/+と比較して皮疹や麻痺が重症化し、死亡率が有意に高かった(図1)。

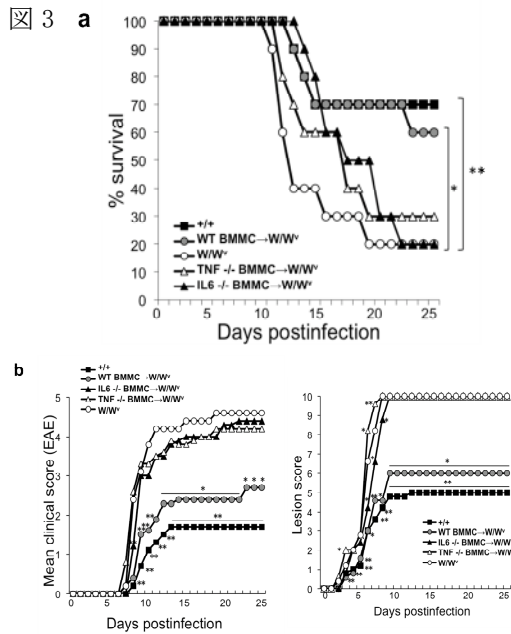
図1



(2) HSVを接種した皮膚におけるHSV感染価はW/Wvの方が+/+より高値であり(図2)、病理組織学的にW/Wvでは+/+より激しい炎症細胞浸潤を認めた。



(3) HSV皮膚感染モデルにおけるW/Wvの生存率は、皮膚局所へのコントロールマウス由来の骨髄由来マスト細胞(BMMC)再構成により完全に回復したが、TNF-/-、IL-6-/-マウス由来のBMMCの再構成では完全には回復しなかった(



(4) BMMCにHSVを感染させてもTNF- $\alpha$ 、IL-6等の炎症性サイトカインの産生、脱顆粒ともに誘導されなかったが(図4)、HSV感染させたケラチノサイト(Pam)の上清をBMMCに曝露したところ、TNF- $\alpha$ 、IL-6の産生を認めた(図5)。

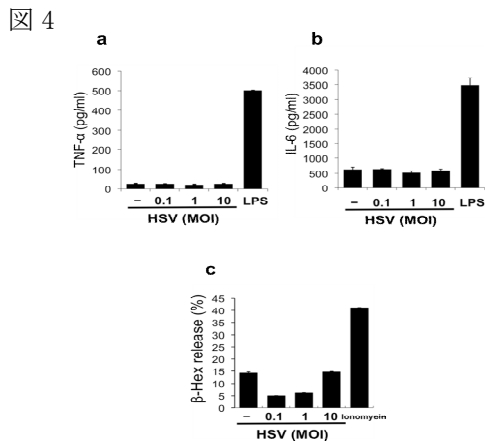
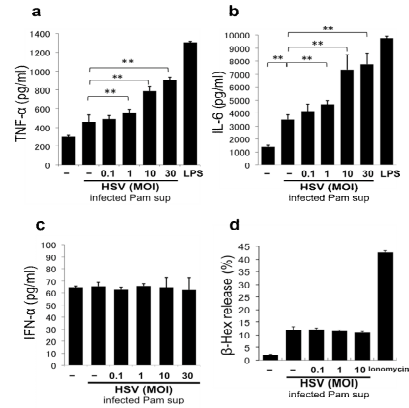
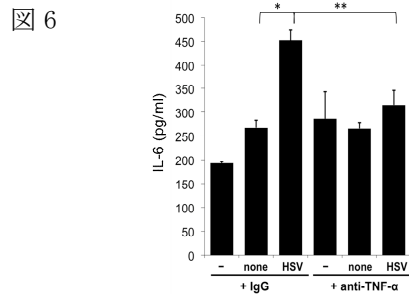


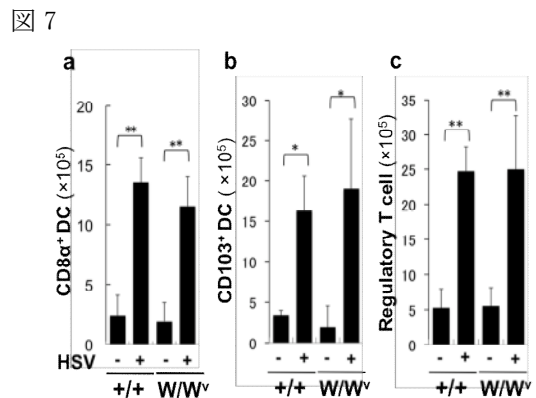
図5



(5) BMMCから産生されるIL-6は、HSV感染ケラチノサイトの上清中のTNFの中和により、抑制された(図6)。



(6) HSV接種したマウスの所属リンパ節のHSV特異的CD8陽性細胞(CTL)の活性に重要とされるCD8 $\alpha^+$ CD205 $^+$  dendritic cellsとregulatory T cellsの数を検討したところ、W/Wvと+/+マウスとで差はみられなかった(図7)。



以上より、皮膚感染局所のマスト細胞由来のTNFとIL-6が、致命的なHSV感染において生体防御に重要な役割を果たしていると考えられた。また、これらのマスト細胞由来のサイトカインは、ケラチノサイトから分泌されるTNFにより誘導されている可能性が示唆された。

## 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 CD70 is Selectively Expressed on Th1 but Not on Th2 Cells and Is Required for Th1-Type Immune Responses: Kawamura T, Ogawa Y, Shimozato O, Ando T, Nakao A, Kobata T, Okumura K, Yagita H, Shimada S: J Invest Dermatol. 2011 Jun; 131(6):1252-61. 査読あり
- ② A case of Lymphoepithelioma-like Carcinoma of the Skin associated with Epstein-Barr virus infection: Rui Aoki, Hiroshi Mitsui, Kazutoshi Harada, Tatsuyoshi Kawamura, Naotaka Shibagaki, Katsuhiko Tsukamoto, Shin-ichi Murata, Shinji Shimada: Journal of the American Academy of Dermatology. 2010;62(4):681-84. 査読あり
- ③ Gram-positive bacteria enhance HIV-1 susceptibility in Langerhans cells, but not in dendritic cells, via Toll-like receptor activation: Ogawa Y, Kawamura T, Kimura T, Ito M, Blauvelt A, and Shimada S: Blood. 2009 May 21; 113(21):5157-66. 査読あり

[学会発表] (計5件)

- ① 青木類, Mast cells play a key role in host defense against lethal herpes simplex virus infection, The 35<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology, 2010年12月4日, 和歌山
- ② 青木類, Mast cells play a key role in host defense against lethal herpes simplex virus infection, 40<sup>th</sup> Annual European Society for Dermatological Research (ESDR) meeting, 2010年9月11日, ヘルシンキ
- ③ 青木類, Mast cells play a key role in host defense against lethal herpes simplex virus infection, 14<sup>th</sup>

International Congress of Immunology, 2010年8月24日, 神戸

- ④ 青木類, Mast cells regulate the cytokine microenvironment of the skin in herpes simplex virus infection, The 34<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology, 2009年12月4日, 福岡
- ⑤ 青木類, Mast cells regulate the cytokine microenvironment of the skin in herpes simplex virus infection, 39<sup>th</sup> Annual European Society for Dermatological Research (ESDR) meeting, 2009年9月12日, ブダペスト

## 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) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 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・医学部附属病院・教授

研究者番号: 10114505