

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659205

研究課題名（和文） ウイルス誘発上皮性腫瘍を許容する生体内微小環境とその制御

研究課題名（英文） Preferable biological milieu for the growth of viral epithelial neoplasms and its regulation

研究代表者

岩月 啓氏 (IWATSUKI KEIJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：80126797

研究成果の概要（和文）：ヒト乳頭腫ウイルス(HPV)と伝染性軟属腫ウイルス(MCV)による疣贅状病変、Bowen 病や種々の上皮系腫瘍における樹状細胞(DC)サブセットと宿主免疫応答を制御する機序を解析した。非炎症性疣贅、伝染性軟属腫および HPV 誘発 Bowen 病では Langerin 陽性 DC(Langerhans 細胞：LC)数は著減していた。疣贅および伝染性軟属腫病変部の MIP-3 α 発現が低下し、E-cadherin 分子は発現低下と不規則な分布がみられた。TSLP (thymic stromal lymphopoietin) は HPV 疣贅や日光角化症では高発現していたが、伝染性軟属腫では一部の MCV 感染細胞のみに陽性で、病変部での高発現は認められなかった。伝染性軟属腫では、MCV がコードする炎症制御因子である MCV148 と MCV159 の発現が認められた。炎症を起こした疣贅では MIP-3 α が発現し、真皮に浸潤細胞に種々の DC サブセットと CD8 陽性 T 細胞がみられた。すなわち、疣贅と伝染性軟属腫においては、LC/DC が病変部に欠落し、宿主免疫応答を回避する。加えて、疣贅では TSLP 発現による免疫制御と Th2 優位の炎症が働き、伝染性軟属腫では MCV 由来分子が病態に関与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Dendritic cell (DC) subsets and regulatory mechanisms of host immune responses were studied in human papilloma virus (HPV)- and molluscum contagiosum virus (MCV)-associated warty lesions, Bowen disease, and various epithelial neoplasms. The depletion of Langerin+ DCs (LCs) was obvious in the non-inflammatory HPV-warts, MC, and HPV-Bowen. The lesional epidermis revealed diminished MIP-3 α expression and irregular distribution of E-cadherin. TSLP (thymic stromal lymphopoietin) was highly expressed in HPV-warts and solar keratosis, while a few MCV+ cells were positive for TSLP in MC. MCV-encoded immunoregulatory molecules such as MCV148 and MCV159 were expressed in MC. MIP-3 α expression is up-regulated in inflammatory warts, with the subsequent recruitment of various DC subsets and CD8+ cells. TSLP expression might be associated with immune suppression and Th2 type inflammation in HPV-warts, while MCV-encoded molecules possess a pivotal role in the persistence of MC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	0	1,800,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	2,900,000	330,000	3,230,000

研究分野：一般皮膚科学、ウイルス性皮膚疾患、上皮系腫瘍、皮膚リンパ腫、水疱症

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：ヒト乳頭腫ウイルス、伝染性軟属腫、樹状細胞、TSLP、日光角化症、Bowen 病

1. 研究開始当初の背景

疣贅や伝染性軟属腫は、ウイルス抗原が生体内に存在するにもかかわらず、宿主免疫応答を回避しつつ病変を保持する。しかし、炎症反応を伴って疣贅や伝染性軟属腫が一斉に消退する現象が起きる。われわれは、その反応にはCD8陽性Tリンパ球が重要であることを報告した (Iwatsuki K et al. Arch Dermatol, 1986)。疣贅病変部には樹状細胞が欠落しており、そのため、炎症反応を回避していると考えられてきたが、詳細は不明であった。

2. 研究の目的

われわれは、ウイルス性腫瘍である疣贅と伝染性軟属腫における免疫回避を、病変部の免疫学的微小環境という観点から研究し、他の上皮系腫瘍と比較した。また、炎症を起こした疣贅の解析により、宿主免疫応答を解析した。さらに、病変部の免疫学的微小環境に加えて、化学物質や分子標的薬によって誘導される多発性上皮系腫瘍をモデルに、細胞増殖・接着関連分子や細胞内シグナルからみた構造的表皮リモデリングとしての乳頭腫形成の組織病因論へと研究を展開した。

3. 研究の方法

1) 疣贅病変部の細胞生物学的微小環境の解析：樹状細胞 (DC) の数、分布や、DCの遊走にかかわるMIP-3 α と表皮内定着に関わるE-cadherinや、その他のサイトカイン、TLR細胞内リガンドなどを分子生物学的手法で解析した。伝染性軟属腫においては、MCVがコードする炎症制御分子について解析した。
 2) 宿主免疫応答の解析：炎症を起こした疣贅・伝染性軟属腫における免疫応答 (炎症細胞サブセット、ケモカインとその受容体発現など) を解析し、他のウイルス性疾患や上皮系腫瘍である脂漏性角化症や日光角化症と比較した。
 3) 表皮リモデリングとしての乳頭腫・上皮系腫瘍：多剤併用化学療法後や分子標的薬によって生じる二次性腫瘍の症例を集積し検討した。本研究では、細胞接着や増殖に関わるE-cadherinの発現と分布を調べた。Th2型免疫応答を誘導するTSLPの発現を、疣贅、伝染性軟属腫と他の上皮系腫瘍と比較した。

4. 研究成果

1) 疣贅の細胞生物学的微小環境解析

炎症性および非炎症性疣贅、伝染性軟属腫、Bowen病、種々の上皮系腫瘍における樹状細胞 (DC) サブセットとアポトーシスを解析した。ウイルス性疣贅および伝染性軟属腫病変部ではLangerin陽性DC (LC)数は欠落ないし著減していた (図1)。

In situ hybridization と定量的 RT-PCR

法では、疣贅および伝染性軟属腫病変部のMIP-3 α 発現が低下し (図2)、E-cadherin分子は発現低下と不規則な分布がみられた。伝染性軟属腫では、MCVがコードする炎症制御因子であるMCV148とMCV159 mRNAの発現

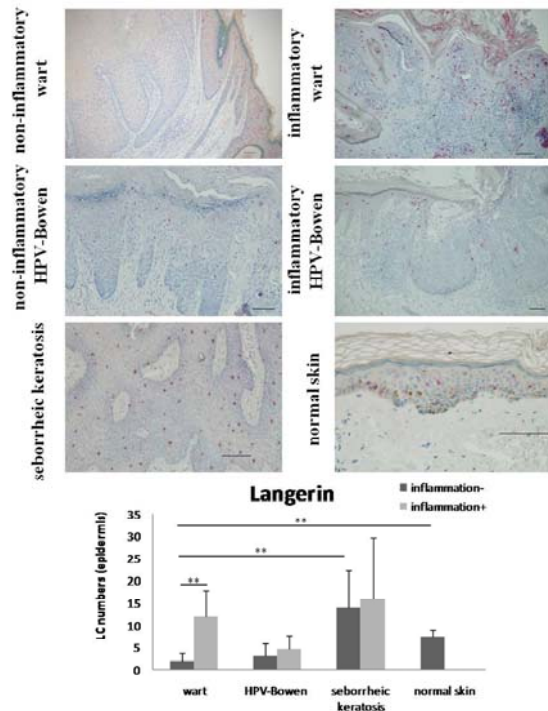


図1. Langerin 陽性細胞分布と密度

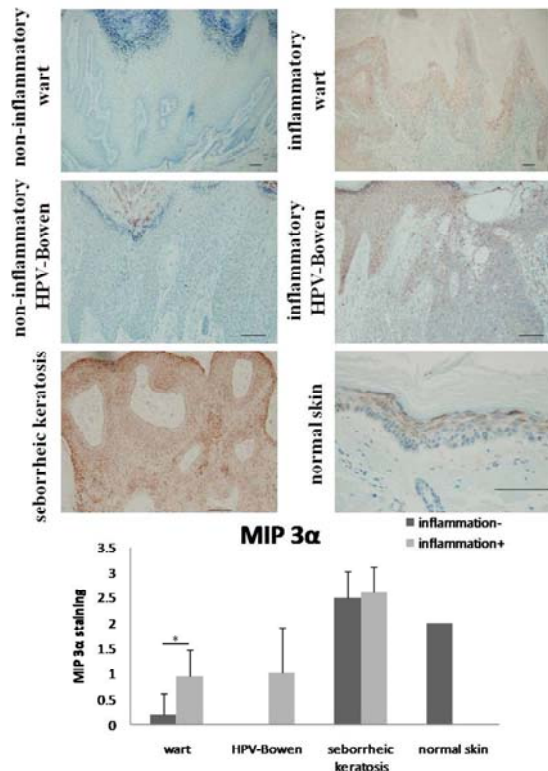


図2. MIP-3a 発現分布と強度

2) 宿主免疫応答の解析

炎症性疣贅では真皮浸潤細胞に種々の DC サブセットが浸潤していた。炎症反応は、多くの CD8+細胞傷害性 T 細胞 (CTL) と少数の CD4+T 細胞、B 細胞がみられた。しかし、Bowen 病の炎症反応には、B 細胞と形質細胞浸潤が多く、疣贅における炎症反応とは質的に異なる細胞浸潤を示した。

すなわち、疣贅と伝染性軟属腫においては、LC/DC が病変部に欠落し、宿主免疫応答を回避するが、炎症誘導には種々の LC/DC の浸潤と CTL 浸潤 (Th1/Th17 環境) が認められ、悪性化した Bowen 病では Th2 環境の免疫応答が誘導されると考えられた。

3) 表皮リモデリングとしての乳頭腫

疣贅、Bowen、伝染性軟属腫と他の上皮系腫瘍について、Th2 免疫応答誘導の候補分子として TSLP の発現を調べた。TSLP は、HPV 関連疣贅では、非 HPV 性脂漏性角化症などと比べて高発現であった。表皮内癌である日光角化症においても TSLP 発現が強く認められ、病変部表皮の免疫学的環境のリモデリングが示唆された (図 3)。一方、MCV 関連伝染性軟属腫においては、一部のウイルス感染細胞表面に TSLP 発現が見られるのみで、病変部全体の発現はほとんど認められなかった。

HPV 感染細胞は、日光角化症と同様に TSLP 高発現を示し、細胞性免疫応答を抑え、Th2 型免疫応答を誘導する環境を構築している。一方、伝染性軟属腫においては TSLP を介さず、MCV 自体がコードしている MCV148 や、MCV 159 などの分子を介して宿主炎症反応を制御している可能性が考えられた (図 4)。

多剤併用化学療法後、数年から十数年を経て生じる二次的腫瘍として多発性汗腫が重要であることを見出し、論文報告した。その原因として化学療法薬による表皮・付属器のリモデリング、de novo の遺伝子変異、細胞内シグナル異常を考えて、さらに検討中である。

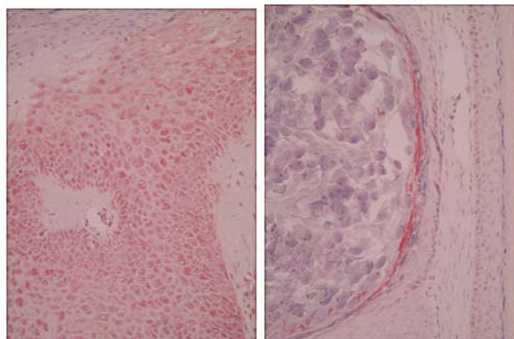


図 3. 疣贅 (左) と伝染性軟属腫 (右) 病変部の TSLP 発現

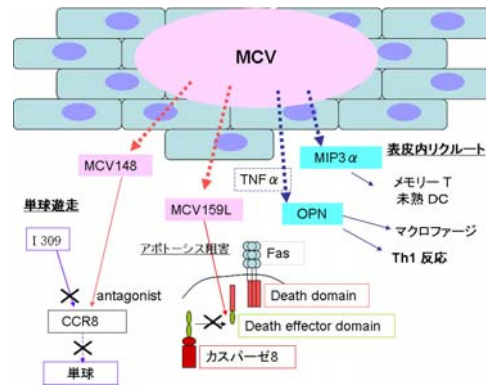


図 4. 伝染性軟属腫における MC148 と MC159 発現と免疫応答制御機序 (仮説)

4) 結論と考察

疣贅と伝染性軟属腫においては、MIP-3α の発現低下によって LC/DC が病変部へ遊走するのが抑えられ、E-cadherin の発現低下によって表皮内定着が阻害されている。加えて、疣贅では TSLP 発現による Th2 環境が免疫制御的に働き、一方、伝染性軟属腫では、MCV がコードする分子が宿主免疫応答を制御している可能性がある。これらの機序によって疣贅や伝染性軟属腫は、宿主免疫反応を回避しつつ持続する。一方、疣贅排除の効果的免疫応答では、CD8 陽性 T 細胞と DC/LC 浸潤が顕著であるが、HPV 誘発 Bowen 病や日光角化症では B 細胞や形質細胞の浸潤を伴う異質の炎症反応がみられた。

本研究中に、化学療法薬後に生じる多発性汗孔腫症の解析を行った。最近、分子標的薬による多発性疣贅やケラトアカントーマ発症が注目されるようになった。これらの現象は、表皮リモデリングと同時に、subclinical な変異をもとに、細胞内シグナルの異常・偏向が加わって生じる可能性があり、今後の研究に新たな示唆を与えるものである。

E-cadherin や細胞内裏打ち蛋白の発現異常は、表皮増殖・構築に影響を及ぼすが、今回の研究では細胞周期との明らかな関係は見いだせなかった。乳頭腫性増殖の解析には細胞増殖活性の三次元的解析と、明確な分子標的のもとで細胞内シグナル解析が必要となり、miRNAarray 解析を含めて今後の検討課題とした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Hirai Y, Yamamoto T, Kimura H, Ito Y, Tsuji K, Miyake T, Morizane S, Suzuki D, Fujii K, Iwatsuki K. Hydroa vacciniforme is associated with increased numbers of Epstein-Barr virus-infected T-cells. J Invest Dermatol, 査読有 2012; [Epub ahead of

- print]
- ② Fujii K, Aochi S, Takeshima C, Ohtsuka M, Hamada T, Asagoe K, Aoyama Y, Morizane S, Iwatsuki K. Eccrine poromatosis associated with polychemotherapy, *Acta Derm Venereol* 査読有 2012; [Epub ahead of print]
 - ③ Fujii K, Suzuki N, Ikeda K, Hamada T, Yamamoto T, Kondo T, Iwatsuki K. Proteomic study identified HSP 70 kDa protein 1A as a possible therapeutic target, in combination with histone deacetylase inhibitors, for lymphoid neoplasms. *J Proteomics* 査読有 2012; 75: 1401-1410.
 - ④ Morizane S, Yamasaki K, Mühleisen B, Kotol PF, Murakami M, Aoyama Y, Iwatsuki K, Hata T, Gallo RL. Cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 in psoriasis enables keratinocyte reactivity against TLR9 ligands. *J Invest Dermatol*. 査読有 2012; 132: 135-143.
 - ⑤ Yamamoto T, Hirai Y, Miyake T, Yamasaki O, Morizane S, Iwatsuki K. Oculomucosal and gastrointestinal involvement in Epstein-Barr virus-associated hydroa vacciniforme. *Eur J Dermatol* 査読有 2012; [Epub ahead of print]
 - ⑥ Nakayama Y, Asagoe K, Yamauchi A, Yamamoto T, Shirafuji Y, Morizane S, Nakanishi G, Iwatsuki K. Dendritic cell subsets and immunological milieu in inflammatory human papilloma virus-related skin lesions. *J Dermatol Sci* 査読有 2011; 63: 173-183

[学会発表] (計4件)

- ① Hirai Fujii K, Morizane S, Iwatsuki K et al. Hydroa vacciniforme is pathogenically associated with circulating Epstein-Barr virus-infected gammadelta T-cells. 第36回日本研究皮膚科学会年次学術大会、2011, 12. 9-11, 京都
- ② Iwatsuki K. The spectrum of cutaneous NK cell lymphomas and their prognoses. 22nd World Congress of Dermatology: Symposium 22; Cutaneous lymphomas: Classification, 2011. 5. 26-28, Seoul.
- ③ Fujii K, Aoyama Y, Iwatsuki K et al. Eccrine poromatosis associated with polychemotherapy. 22nd World Congress of Dermatology, 2011, 5. 26-28, Seoul.
- ④ Iwatsuki K. Epstein-Barr virus and neoplasms. 22nd World Congress of

Dermatology: Symposium 73; Herpesvirus infections 2011. 3. 26-28, Seoul

[図書] (計3件)

- ① Iwatsuki K. Histiocytoses. ed. Dummer R, Pittelkow MR, Iwatsuki K, Green A, Elwan NM (ed): *Skin Cancer - A World-wide Perspective*. Springer, Heidelberg, 2011, p233-240.
- ② Iwatsuki K. ed. Other therapies: histiocytoses. ed. Dummer R, Pittelkow MR, Iwatsuki K, Green A, Elwan NM (ed): *Skin Cancer - A World-wide Perspective*. Springer, Heidelberg, 2011, p355-357.
- ③ Iwatsuki K. Adult T-cell leukemia/lymphoma. In *Asian Skin and Skin Disease*, edn. Eun HC, Kim SC, Lee WS, Medrang Inc. Seoul, 2011, pp409-414.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩月 啓氏 (IWATSUKI KEIJI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：80126797

(2) 研究分担者

青山 裕美 (AOYAMA YUMI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：90291393

白藤 宜紀 (SHIRAFUJI YOSHINORI)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：90423285

藤井 一恭 (FUJII KAZUYASU)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：70452571

森実 真 (MORIZANA SHIN)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：80423333

(3) 連携研究者