

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390282

研究課題名(和文) HSV/HIV 経皮感染初期の免疫機構の解明と侵入阻害法の開発

研究課題名(英文) The elucidation of the early immune system in percutaneous infection of HSV and HIV and the development of novel methods to prevent their cutaneous infection

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円、(間接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：粘膜・皮膚ランゲルハンス細胞(LC)は性行為HIV感染における最初の標的細胞であるため、我々はHSV-2がLCのHIV感染に影響を及ぼすかどうかについて検討した。ヒト表皮内LCにHSV-2、次いでHIVを曝露すると、HSV-2はLCのHIV感染性を有意に増加させた。また、HSV-2は表皮細胞からのLL-37の生産を誘導し、LL-37はLCでHIV感染性を有意に増強した。これらの研究結果から、HSV-2は表皮細胞からのLL-37の産生を誘導し、このLL-37がLCのHIV感染性を増加させることによって、性行為HIV感染リスクを高めることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：HSV-2 shedding is associated with increased risk for sexually acquiring HIV. Because Langerhans cells (LCs) are suspected to be the initial target cells infected by HIV following sexual exposure, we studied whether HSV-2 affects HIV infection of LCs. HSV-2 enhanced HIV susceptibility in LCs within skin explants, even though relatively few HSV-2/HIV co-infected LCs were detected, suggesting that HSV-2 enhances HIV infection of LCs through indirect mechanisms. Indeed, HSV-2 stimulated production of antimicrobial peptides (AMPs) by epithelial cells, including human defensins and LL-37, and the latter strongly enhanced HIV susceptibility in LCs by up-regulating HIV receptors. Culture supernatants of epithelial cells infected with HSV-2 enhanced HIV susceptibility in LCs, and this effect was abrogated by blocking LL-37 production. These data suggest that HSV-2 enhances sexual transmission of HIV by increasing HIV susceptibility of LCs via epithelial cell production of LL-37.

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：HSV HIV 経皮感染 ランゲルハンス細胞 抗菌ペプチド

1. 研究開始当初の背景

かつて“死の病”であった HIV (Human immunodeficiency virus) 感染症は、近年の抗ウイルス薬併用療法 (Highly Active Anti-Retroviral Therapy: HAART) の急速な進歩により、現在では慢性疾患の一つとしてとらえられつつある。その一方で、HIV に対する有効なワクチンが未だ存在せず、現在でも世界全体で約 3500 万人が HIV に感染しており、年間約 230 万人もの人新たに HIV に感染している (UNAIDS report on global AIDS epidemic 2013)。

Herpes simplex virus (HSV) および HIV は人体にとって重要な病原体であり、ともに皮膚・粘膜より侵入する。一回の異性間性交渉による HIV 感染リスクは 0.01-0.40% と非常に低いものの、同感染経路は世界における新規 HIV 感染原因の約 8 割を占める。HIV 感染者の精液や膣分泌液などの体液中のウイルスが非感染パートナーの粘膜・皮膚に曝露されると、HIV は粘膜・皮膚局所から生体内侵入し、その後所属リンパ節に運ばれて宿主での永久的な感染を成立させる。性行為 HIV 感染初期において、HIV は粘膜・皮膚の上皮内ランゲルハンス細胞 (LCs) への感染を足がかりとして、上皮内のタイトジャンクションや細胞間デスモゾームといった強固なバリアをすり抜けて生体内に侵入し、さらに LCs をまるで“トロイの木馬”のように巧みに利用しながら生体内に播種していく。

異性間性交渉 HIV 感染における HIV の主な侵入門戸は、男性では包皮 (特に inner foreskin) の、女性では膣腔内の重層扁平上皮と考えられている。しかし、重層扁平上皮細胞 (ケラチノサイト) は HIV に感染しないため、上皮そのものが HIV の侵入に対する最大のバリアであり、加えて KCs 間に存在するタイトジャンクションや細胞間デスモゾームも HIV の侵入を防ぐ強力な物理的バリアとして機能する。また、KCs は toll-like receptors (TLRs) を介して HIV を認識し、-defensin-2 (HBD2) や HBD3 を中心とした様々な抗菌ペプチドを産生して二次的に HIV の侵入を妨げている。このように重層扁平上皮 (表皮) 内には HIV の侵入を防ぐ様々なバリア機構・自然免疫機構が存在するが、HIV は表皮内の LCs に感染することでこれらのバリア機構を回避して生体内に侵入すると考えられている。

一方、HIV 以外の性感染症 (sexually transmitted disease; STD) 保有者の性行為 HIV 感染リスクが数倍~数十倍高くなるという疫学的調査結果に基づき、HIV 以外の STD の治療戦略は現在米国における HIV 感染拡大予防戦略の主軸となっている。この STD による HIV 感染リスク増加は、潰瘍性 STD (梅毒、軟性下疳、性器ヘルペスなど) のみならず、非潰瘍性 STD (淋菌感染症、性器クラミジア感染症、トリコモナス症など)

でも認められることから、この感染促進は単なる表皮バリア傷害が原因ではないと考えられる。STD による HIV 感染促進メカニズムの詳細は未だ解明されていないが、最近我々は TLR2 ligands を有する STD 病原体 (グラム陽性菌や梅毒、淋菌、クラミジア、トリコモナスなど) が LCs に発現される TLR2/TLR1 および TLR2/TLR6 を介して LCs の CD4 の発現増強および APOBEC3G (レトロウイルス感染抑制宿主因子の一つ) の発現低下を誘導し、LCs の HIV 感染性を促進する可能性が明らかとした (Ogawa, Y, et al. Blood 113, 5157-5166, 2009)。

2. 研究の目的

上述の如く、グラム陽性菌や梅毒、淋菌、クラミジア、トリコモナスなどの STD 病原体が性行為 HIV 感染リスクを増加させるメカニズムは明らかとなったが、ヘルペスなどのウイルスがなぜ性行為 HIV 感染リスクを増加させるのかについては未だ不明である。そこで HSV 感染による LCs の HIV 感染への影響を検討した。

3. 研究の方法

HSV-2 が LC の HIV 感染に影響を及ぼすか否かについて検討するため、ヒト表皮内 LCs に HSV-2、次いで HIV を曝露し、三日後の LCs の HIV 感染率をフローサイトメトリーにて検討した。また HSV-2 感染ケラチノサイトからの抗菌ペプチド (AMP) 産生を網羅的に RT-PCR 法を用いて検討した。さらに、HSV-2 感染ケラチノサイトから産生される AMP を LCs に曝露後 HIV に曝露し、AMP による LCs の HIV 感染性に対する影響を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト表皮内 LCs に HSV-2、次いで HIV を曝露すると、HSV-2 は LCs の HIV 感染性を有意に増加させた。

(2) さらに、HSV-2 感染ケラチノサイトの培養上清を LCs に前処置すると LCs の HIV 感染性を有意に増加させたことから、HSV-2 による LCs の HIV 感染増強は、HSV-2 が LCs に感染する直接的作用によるものではなく、HSV-2 感染ケラチノサイトより産生される何らかの液性因子による間接的な機序によるものと考えられた。

(3) また、HSV-2 は表皮細胞からの HBD-2, HBD-3, HBD-4 および LL-37 などの AMP を産生することがわかったため、実際にこれらの AMPs を LCs に前処置後 HIV に曝露したところ、LL-37 のみが LCs の HIV 感染性を有意に増強した。

これらの研究結果から、HSV-2 は表皮細胞からの LL-37 の産生を誘導し、この LL-37 が LC の HIV 感染性を増加させることによって、性行為 HIV 感染リスクを高めることが示唆された。

この仮説を検証するため、siRNA で LL-37

を knockdown したケラチノサイトに HSV-2 を感染させて、その培養上清を LCs に前処置した後に HIV を曝露して LCs の感染率を調べたところ、LCs の HIV 感染性に変化は認められなかった。この結果により、HSV-2 感染ケラチノサイト培養上清による LC の HIV 感染率の増加は、ケラチノサイト由来 LL-37 によるものであることが確認された。

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 13 件)

Inozume T, Nakazawa R, Tanaka K, Harada K, Kawamura T, Shibagaki N, Shimada S. A case of oral mucosal fixed eruption caused by methacrylate. Contact Dermatitis. 2014 70(6):387-8. 査読有
DOI: 10.1111/cod.12183

Takaki M, Inozume T, Matsuzawa T, Ando N, Yamaguchi M, Harada K, Kawamura T, Shibagaki N, Shimada S. Case of primary cutaneous peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified, with characteristics of follicular helper T cells. J Dermatol. 2014 In press
DOI: 10.1111/1346-8138.12493. 査読有

Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Maeda K, Nakata H, Moriishi K, Koyanagi Y, Gatanaga H, Shimada S, Mitsuya H. EFdA, a reverse transcriptase inhibitor, potently blocks HIV-1 ex vivo infection of Langerhans cells within epithelium. J Invest Dermatol. 2014 134(4):1158-61.
DOI: 10.1038/jid.2013.467. 査読有

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 133(12):2803-5.
DOI: 10.1038/jid.2013.215. 査読有

Harada K, Inozume T, Kawamura T, Shibagaki N, Kinoshita T, Deguchi N, Shimada S. Two cases of autosomal recessive woolly hair with LIPH gene mutations. Int J Dermatol. 2013 52(5):572-4.
DOI: 10.1111/j.1365-4632. 査読有

Aoki R, Kawamura T, Goshima F,

Ogawa Y, Nakae S, Nakao A, Moriishi K, Nishiyama Y, Shimada S. Mast cells play a key role in host defense against herpes simplex virus infection through TNF- α and IL-6 production. J Invest Dermatol. 2013;133(9):2170-9.
DOI: 10.1038/jid.2013.150 査読有

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 16:13(1):77-86.
DOI: 10.1016/j.chom.2012.12.002. 査読有

Hanawa F, Inozume T, Harada K, Andou N, Kawamura T, Shibagaki N, Shimada S. A case of dermatomyositis accompanied by spontaneous intramuscular hemorrhage despite normal coagulability. Rheumatol Int. 2013 33(11):2949-50.
DOI: 10.1007/s00296-012-2492-3. 査読有

Inozume T, Ando N, Sano S, Harada K, Kawamura T, Shibagaki N, Shimada S. Case of rheumatoid papules: is this a link between vasculitis and rheumatoid nodules? J Dermatol. 2012 39(12):1091-2.
DOI: 10.1111/j.1346-8138.2012.01597. 査読有

Ogawa Y, Aoki R, Harada K, Matsuzawa T, Inozume T, Shibagaki N, Kawamura T, Shimada S. Neutrophilic panniculitis with non-caseating granulomas in a Crohn's disease patient. Eur J Dermatol. 2012 22(3):404-5.
査読有
DOI: 10.1684/ejd.2012.1737. 査読有

Harada K, Yamaguchi M, Miyajima S, Kawamura T, Shibagaki S, Shimada S. Gutter method: noninvasive management of ingrown nails caused by epidermal growth factor inhibitor treatment. Clin Exp Dermatol. 2012;37(6):703-4.
DOI: 10.1111/j.1365-2230.2012.04358 査読有

Hanawa F, Harada K, Andou N, Kawamura T, Shibagaki N, Fukuda S, Hashimoto T, Shimada S. Case of mucous membrane pemphigoid characterized by circulating immunoglobulin A and immunoglobulin G autoantibodies to the gamma-2 subunit of laminin-332. J

Dermatol. 2012 39(11):962-3.
DOI: 10.1111/j.1346-8138.2011.01501. 査
読有

Kawamura T, Ogawa Y, Nakamura Y,
Nakamizo S, Ohta Y, Nakano H,
Kabashima K, Katayama I, Koizumi S,
Kodama T, Nakao A, Shimada S. Severe
dermatitis with loss of epidermal
Langerhans cells in human and mouse zinc
deficiency. J Clin Invest. 2012
1;122(2):722-32.
DOI: 10.1172/JCI58618. 査読有

6 . 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

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

柴垣 直孝 (SHIBAGAKI Naotaka)
山梨大学・医学工学総合研究部・准教授
研究者番号：40262662

原田 和俊 (HARADA Kazutoshi)
山梨大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20324197