

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591664

研究課題名(和文) アトピー性皮膚炎患者は、なぜヘルペスウイルスに感染しやすいのか？

研究課題名(英文) Why the occurrence of eczema herpeticum caused by an extensive disseminated cutaneous infection with HSV-1 is associated with the exacerbation of atopic dermatitis lesion?

研究代表者

高橋 良 (TAKAHASHI, RYO)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：00317091

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)：カポジ水痘様発疹症は、単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)の感染によって引き起こされるアトピー性皮膚炎患者でみられる重篤なウイルス性合併症であるが、なぜアトピー性皮膚炎患者がHSV-1に感染しやすいのかは解っていない。本研究では、EH急性期の末梢血にみられるCD14dimCD16+ proinflammatory 単球(pMO)が抑制機能を持ったTregを増殖させ、抗ウイルス作用を示すHSV特異的CD8+T細胞のIFN- γ 産生を抑制し、その結果HSVの再活性化をきたす事が判った。実際に、病変部のpMOにHSV抗原が検出され、CD8+T細胞や多数浸潤しているTregに隣接するように分布していた。

研究成果の概要(英文)：It remains unknown why the occurrence of eczema herpeticum (EH) caused by an extensive disseminated cutaneous infection with HSV-1 is associated with the exacerbation of atopic dermatitis lesions. We investigated the frequencies, phenotype, and function of Tregs in the peripheral blood of atopic dermatitis with EH (ADEH) patients at onset and after clinical resolution. Tregs with the skin-homing phenotype and the activated/induced phenotype were expanded at onset and contracted upon resolution. Treg-suppressive capacity was retained in ADEH patients and, the expanded Tregs suppressed IFN- γ production from HSV-1-specific CD8+ T cells. The increased frequency of CD14dimCD16+ proinflammatory monocytes (pMOs) was also observed in the blood and EH skin lesions. Our co-culture study using Tregs and pMOs showed that the pMOs can promote the expansion of inducible Tregs. Tregs were detected frequently in the vicinity of HSV-expressing CD16+ monocytes in the EH lesions.

研究分野：皮膚科学

キーワード：アトピー性皮膚炎 ヘルペスウイルス カポジ水痘様発疹症 単球 制御性T細胞 Treg proinflammatory monocyte Eczema Herpeticum

1. 研究開始当初の背景

(1) アトピー性皮膚炎患者と単純ヘルペスウイルス感染症

アトピー性皮膚炎 (AD) 患者は、様々な病原微生物による感染症を合併することが知られており、しばしば、播種性の皮膚ウイルス感染症を発病する。Eczema Herpeticum (EH)・カポジ水痘様発疹症は、単純ヘルペスウイルス I 型 (herpes simplex virus; HSV-1) の感染によって引き起こされる、AD 患者ではよく知られている重篤なウイルス性合併症である。HSV-1 は成人の約 70% が感染しており、初感染後に潜伏感染し、疲労やストレス、悪性腫瘍・抗癌剤・ステロイド剤の服用等の免疫機能が低下している状態等で HSV-1 が再活性化するとされているが、AD 患者で HSV-1 の再活性化がなぜ発生しやすいのかはよく解っていない。

(2) 単純ヘルペスウイルス感染症と制御性 T 細胞

ヒトにおける HSV に対する感染防御免疫は、ウイルス抗原を認識する CD4⁺ と CD8⁺ T 細胞によって担われる。制御性 T (regulatory T cell: Treg) 細胞は、T 細胞の HSV に対する過剰な免疫応答を抑制することが知られており、Treg 細胞とエフェクター T 細胞のアンバランスが EH 発症の原因となる可能性があると推測される。これまでの研究報告によると、AD 患者末梢血液では、健常人と比較して CD4⁺ Treg 細胞が増加していると報告している。しかし、一方では、活動性病変を有する AD 患者では、血清 IFN- γ 、血清 IgE 値、好酸球数が類似する無症候性の対象被験者よりも末梢血液中の Treg 細胞数が低く、さらに Treg 細胞の頻度は疾患の重症度と逆相関している報告があり、両者の報告は矛盾している。また、これまでの研究の報告では、主に臨床重症度と Treg 細胞との関連だけが調べられており、HSV 等のウイルス感染との関わりに関しては全く研究がされていない状況である。

我々は以前、重症薬疹におけるウイルスの再活性化と Treg 細胞に関連する研究を報告している。重症薬疹の一つである薬剤性過敏症候群 (Drug-induced Hypersensitivity Syndrome: DIHS) の患者末梢血液中において、Treg 細胞の質的・量的な異常が見られることを見いだした (研究業績論文: The Journal of Immunology, 8071-79, 2009、高橋 良:平成 20~21 年度科学研究費補助金・若手研究(B)

研究課題、第 11 回ガルデルマ賞受賞論文)。この研究論文では、DIHS の急性期では抑制機能を有した Treg 細胞の増加が認められ、回復期になると Treg 細胞数は健常人と変わらない値に戻ったことを見出した。DIHS ではヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) の再活性化が見られるが、DIHS 急性期では増加した機能的 Treg 細胞がウイルス特異的エフェクター T 細胞を抑制した結果、HHV-6 の再活性化が発生したと考えられた。本研究でも同様に、EH を発症した AD 患者では、抑制機能を有した Treg 細胞の増加によって HSV-1 の再活性化が考えられる。

(3) 単純ヘルペス感染症と CD14^{dim} proinflammatory monocyte

一方、自然免疫を担う単球も体内に侵入したウイルスを排除する機能を有している。我々は以前、Toll-like receptor 2 (TLR2) を介した CD14^{dim} 単球 (proinflammatory monocyte) からの炎症惹起性サイトカインの産生が、AD 患者では低下している事を見出した (研究業績論文: Journal of Allergy and Clinical Immunology, 69-75, 2007)。CD14^{dim} 単球は、HSV-1 を TLR2 によって認識・活性化し、TNF- α 等のサイトカインを産生しウイルス排除機能を担っているが、AD 患者ではその機能が低下しているため、HSV-1 に感染しやすくなっていると考えられた。しかしながら実際に EH を合併した AD 患者の CD14^{dim} 単球の機能については、まだ解っていない。

2. 研究の目的

研究の背景および最近の知見から、AD 患者が EH を発症するストーリーを以下のように描くことが可能である。

- (1) 単球に HSV-1 が感染し、AD 患者における CD14^{dim} 単球の TLR2 刺激によって惹起される炎症性サイトカインの産生が低下し、HSV-1 の排除に失敗する。
- (2) なんらかの原因で抑制機能を有する Treg 細胞が増加し、エフェクター T 細胞の活動を抑制する。獲得免疫系のエフェクター T 細胞の活動が抑制され、HSV-1 の排除に失敗する。
- (3) また、単球が皮膚病変部位へ遊走するとによって HSV-1 をデリバリーする？

(4) その結果、HSV-1 の再活性化 (HSV-1 の初感染では重篤化) し、その結果 EH を発症する。

実際、我々は EH を合併した AD 患者の急性期の Treg 細胞を調べたところ、Treg 細胞数が増加していること、そしてその Treg 細胞は抑制機能を健常人と同様に維持している事を、事前実験で見出した。一方、回復期では Treg 細胞の数が健常人と同様のレベルまで回復し、抑制機能は変動が見られなかった。ところが、対象疾患として調べた EH を合併していない HSV-1 感染の既往がある AD 患者では、Treg 細胞は増殖していなかった。また、別の事前実験では、EH を合併した AD 患者の急性期の CD14^{dim} 単球からの TLR2 刺激によるサイトカイン産生が健常人と比較して低下しており、回復期になるとサイトカイン産生は健常人と同様のレベルまで回復することを見出した。

このように、事前実験から得られた結果から、Treg 細胞と CD14^{dim} 単球の質的・量的異常が、どうやら EH 発症に深く関与していることが想像できるが、なぜ Treg 細胞が増加しているのか、なぜ CD14^{dim} 単球のサイトカイン産生が低下しているのか、また、単球のどのポピュレーションに HSV-1 が感染しているのかは、まったく判っていない。

以上のように、HSV-1 の再活性化と Treg/CD14^{dim} 単球の機能には深い関係があり、EH 発症のメカニズムを解明できる可能性が高い。そこで我々は、EH を合併した AD 患者の急性期・回復期、および比較対象として EH を合併していない AD 患者それぞれの末梢血に存在する獲得免疫の活性を抑制する Treg 細胞と、自然免疫の単球を中心とした機能解析を行うことによって、AD 患者においてどのようにヘルペスウイルスが再活性化し、EH を発症するのかを解明する。

3. 研究の方法

EH を合併した AD 患者の急性期・回復期、および比較対象として EH を発症していない血清 HSV IgG 陽性の AD 患者、そして健常人における Treg 細胞の末梢血中における割合の計測、皮膚ホーミングレセプタやケモカインレセプタ発現の頻度を解析する。そして Treg 細胞の細胞増殖抑制機能を解析する。

(1) EH を合併した AD 患者、比較対象患者、ボランティア健常人からのリンパ球の採取・保存

杏林大学医学部付属病院皮膚科の医師の協力の元、十分なインフォームドコンセントを行い、サンプル採取の協力を得られた急性期・回復期の EH を発症した AD 患者、HSV IgG 陽性の AD 患者、健常人より採血し、リンフォプレップを用いて PBMC を分離し、解析時まで細胞凍結保存液 (セルバンカー) と -80°C ディープフリーザーにて凍結保存する。

(2) PBMC 中の Treg 細胞の頻度の解析
anti-human CD25、Foxp3、CD4、CD127、CD39、CTLA-4 モノクローナル抗体を使用し、当教室現有設備のフローサイトメトリー (FCM: BD 社 FACSCanto 2) を用いて、凍結保存した各症例患者・健常人の PBMC 中の Treg 細胞の割合を計測する。

(3) Treg 細胞に発現している皮膚ホーミングレセプタおよびケモカインレセプタの解析

同様に、皮膚ホーミングレセプタ (CLA)、CCR4、CCR6 の発現を抗体で染色し、FCM を用いて Treg 細胞上のそれらの発現を個々の細胞レベルで解析する。

(4) Treg 細胞の抑制機能の解析 (その1)

Treg 細胞の細胞増殖抑制機能を計測するために、凍結保存した各患者の急性期および回復期、健常人の PBMC から Treg 細胞 (CD4⁺ CD25⁺ CD127^{mid-low} 分画) を当教室現有設備のセルソーター (BD 社 FACSAria) を用いて分離後、CD4⁺ CD25⁻ effector T 細胞とともに培養し、anti-human CD3 と anti-CD28 モノクローナル抗体にて活性化培養を行う。培養終了1日前に 3H-サイミジンを添加し、培養を行う。その後、本大学現有設備のセルハーベスターにて固体シンチレーターに吸着させる。そして本大学現有設備のプレートカウンターで増殖した細胞内に取り込まれたトリチウムサイミジン量を cpm 数で計測し、細胞増殖率を測定する。正常な細胞増殖抑制機能を持っている場合は、Treg 細胞は effector T 細胞の増殖を著明に抑制する。

(5) Treg 細胞の抑制機能の解析 (その2)

抑制機能を有した Treg 細胞の増殖によって、患者末梢血中の CD4/CD8/ TCR- γ/δ T 細胞、CD56 NK 細胞からのサイトカイン産生が抑えられている可能性がある。そこで各細胞

からのサイトカイン産生を調査する。患者 PBMC を PMA とイオノマイシン、および Breferrin A を添加して培養後、細胞内サイトカイン (IFN- γ 、TNF- α 等) をフローサイトメトリーで解析する。

(6) 単球の解析は、Treg 細胞の解析と同様に主に FCM を使用して解析を行う

対象患者の PBMC を anti-CD14、CD16、IgE レセプタの Fc ϵ RI モノクローナル抗体で染色し、我々が注目している CD14^{dim} 分画の割合を測定する。さらに CD14^{dim} 分画は、Fc ϵ RI または CD16 によって大きく 2 つに分画に分けることが可能である。実は AD では Fc ϵ RI の発現が高まっており、注目すべき点である。

さらに、それぞれの分画からのサイトカイン産生を測定するために、TLR2 (HSV-1 を認識) リガンドの Pam3Cys-SKKKK、TLR9 (HSV を認識) リガンドの CpG、比較対象として TLR4 リガンドの LPS で PBMC を刺激し、Breferrin A を添加して培養後、細胞内サイトカイン (TNF- α 、IL-6、IL-10、IL-1 β 等) を FCM で解析する。なお、細胞内サイトカインで評価出来ない場合は、培養液中のサイトカインを Cytometric Beads Array (CBA) と FCM を用いて測定する。

(7) CD14^{dim} 単球における TLR 発現の解析

単球からのサイトカイン産生に際して、各 TLR の発現が変化している可能性がある。そこで、anti-1/2/4/6/7/8/9 モノクローナル抗体で染色し、FCM にてそれらの発現を調べる。なお、蛍光強度の変化が大変わかりにくい TLR があるので、その場合の評価は、陽性率だけではなく、平均蛍光強度 (Mean Fluorescence Intensity : MFI) で評価する。そうして得られたサイトカイン産生のデータと TLR 発現のデータから、どの TLR の発現が低下し、サイトカイン産生の低下につながっているのかを評価する。

(8) 皮膚病変部位における Treg 細胞の確認

EH 発症の AD 患者から得られた病変部位の組織切片を anti-Foxp3 モノクローナル抗体を使用した免疫組織化学染色を施行し、Treg 細胞が実際の皮膚病変部位に存在するのかを確認する。

(9) 単球上の HSV-1 感染レセプタの解析

対象患者の PBMC を anti-CD14、CD16、IgE レセプタの Fc ϵ RI、HVEM、PILR α モノクロー

ナル抗体で染色し、HVEM、PILR α 発現が単球でどのように発現しているのかを調査する。

さらに、HVEM、PILR α と TLR1/2/4/6/7/8/9 を同時に染色し、HVEM⁺ PILR α ⁺ 単球における TLR の発現を調査する。また、各 TLR リガンドで単球を刺激し、HVEM⁺ PILR α ⁺ 単球からのサイトカイン産生を調査する。

(10) 実際に HSV-1 が単球に感染しているのか？

実際に単球に HSV-1 が感染しているのかを確認するために、単球をセルソーターで分離後、PCR 法にてウィルス DNA を検出する。

(11) HSV-1 に感染した単球が Treg 細胞を増殖させる？

近年の研究結果に IL-10 を産生する単球が、ナイーブ CD4⁺ T 細胞を Treg 細胞へ分化誘導させる報告がある。本研究で Treg 細胞がなぜ増加しているのかは、いまだ不明な点であるが、HSV-1 感染をした単球が Treg 細胞を増殖させている可能性が十分に考えられる。特に PILR α は「抑制化レセプタ」であるが、未だその抑制化作用機序はよく判っていない。もし単球への PILR α を介した HSV-1 感染が、刺激として単球からの IL-10 産生の増加につながり、それが最終的に機能を有する Treg 細胞の増殖を誘導すれば、「間接的な免疫抑制機序」となり、ウィルス感染機序にとってみれば、より都合が良くなると考えられる。そこで単球をセルソーターで分離後、ナイーブ CD4⁺ T 細胞と約 2 週間程度共培養し、FCM にて Foxp3 等の Treg 細胞の解析を行う。

4. 研究成果

概要：カポジ水痘様発疹症の急性期では、CD14^{dim}CD16⁺ proinflammatory 単球 (pMO) に異常な機能を示し、この pMO は抑制機能を持った Treg を増殖させ、抗ウィルス作用を示す HSV 特異的 CD8⁺ T 細胞の IFN- γ 産生を抑制し、HSV の再活性化を来すことが判った。

(1) EH を合併した AD 患者の急性期・回復期、および比較対象として EH を発症していない血清 HSV IgG 陽性の AD 患者、そして健康人における Treg 細胞の末梢血中における割合の計測、皮膚ホーミングレセプタやケ

モカインレセプタ発現の頻度、及び Treg 細胞の細胞増殖抑制機能の解析を行った。ADEH 急性期の末梢血液中には、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺の制御性 T 細胞が著明に増加している事を明らかにした。Treg の表面マーカーを調べると皮膚指向性の CLA やケモカインレセプタの CCR4 を発現しており、極めて皮膚へホーミングしやすい Treg が増加していることがわかった。ADEH 急性期で増加していた Treg は、CTLA-4⁺ CD127^{dim/} CD39⁺ HELIOS⁺の典型的な Treg の表現形を示した。また CD45RA と Foxp3 の発現様式から、この Treg は induced Treg であることが判った。

一方、ADEH 回復期になると増加していた Treg が健常人レベルまでに戻った。なお、EH を発症していない AD 患者では Treg の増加は認められなかった。Treg のエフェクター T 細胞の増殖抑制機能を調べたところ、ADEH 急性期・回復期、そして EH を発症していない AD 患者と健常人との比較では優位な差は見られなかった。これは、「正常」な抑制機能を保有した皮膚指向性の Treg が ADEH 急性期の末梢血中で増加していることになり、免疫抑制状態になっていることが示唆され、故にヘルペスウイルスが再活性化しやすい状態である事がわかった。

(2) PMA 刺激で CD4、CD8、CD56 NK 細胞のサイトカイン産生を測定した結果、IFN- γ 及び TNF- α が ADEH 急性期で優位に低下していた。HSV 特異的 CD8⁺ T 細胞を測定した所、ADEH 急性期では PBMC から Treg を除去した場合 IFN- γ 産生が優位に増加した。さらに中和抗体を用いた実験では、IL-10 が IFN- γ 産生を抑制していたことを解明した。

(3) pMO は、Toll-like receptor (TLR)-2 を介して HSV を認識し、サイトカインを産生してウイルス排除を担う事がわかっている。そこで TLR-2 アゴニストの Pam3Cys で刺激し、pMO からのサイトカイン産生を調べた所、ADEH 急性期では TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 の産生が低下し、IL-10 の産生が優位に上昇していた。この pMO が末梢血 Treg の増殖に深く関与している事が近年報告されているので、ADEH 急性期と健常人の pMO の Treg 増殖への影響を比較したところ、ADEH 急性期の pMO は induced Treg を優位に増殖させる事を見出した。

(4) 皮膚組織の染色から、病変部の pMO に HSV 抗原が検出され、CD8⁺T 細胞や多数

浸潤している Treg に隣接するように分布していた。

(5) HSV-1 が循環血液中の pMO に感染しているのかを確認するために、急性期 ADEH 患者の血液からセルソーターを用いて各種の白血球分画を分取し DNA を分離後、栄研化学株式会社の Loopamp 単純ヘルペスウイルス(HSV-1/2)検出試薬キット及びリアルタイム PCR 法にて HSV-1 または HSV-2 DNA の検出を試みた。しかしながら、今回得られた約 30 検体からは HSV DNA を検出することができなかった。これは、検体採取をするタイミングが適切ではない時期だった事が考えられた。すなわち、急性期といえども患者がすでにアシクロビル等の抗ウイルス剤を投与していた場合や、病院に来院し採血するタイミングが遅れた場合等は HSV DNA を検出する事が難しい事が考えられた。今後は、より適切な時期に採血を行い、サンプルの解析を進めたい。

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 1 件)

1. Takahashi R, Sato Y, Kurata M, Yamazaki Y, Kimishima M, and Shiohara T: Pathological role of regulatory T cells in the initiation and maintenance of eczema herpeticum lesions. *The Journal of Immunology* 192: 969-978. 2014. doi: 10.4049/jimmunol.1300102 (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

1. Yukiko Ushigome, Ryo Takahashi, Testuo Shiohara: Patrolling monocytes sensing herpes simplex virus in severe drug eruption, The 6th drug hypersensitivity meeting (DHM6), Bern, Switzerland, April 9-12, 2014.
2. 高橋 良: アトピー性皮膚炎患者におけるヘルペスウイルスの再活性化と制御性 T 細胞の動態. 第 23 回日本サイトメトリー学会 シンポジウム, 東京, 2013 年 6 月 22 日.
3. Takahashi R and Shiohara T: Suppressive CD14^{dim}CD16⁺ monocytes contribute defective anti-viral immune responses in eczema herpeticum, *International*

- Investigative Dermatology 2013, Edinburgh, Scotland, May 8-11, 2013.
4. Ushigome Y, Takahashi R, Shiohara T: CD16⁺ patrolling monocytes (pMO) sensing HSV negatively control regulatory T cell (Treg) responses in severe drug eruptions, International Investigative Dermatology 2013, Edinburgh, Scotland, May 8-11, 2013.
5. Takahashi R and Shiohara T: Increased expression of PILR α on patrolling monocytes sensing HSV is the mechanism by which HSV evades immune attack, The International Investigative Dermatology 2012, Okinawa, Dec 7-8, 2012.
6. Ushigome Y, Takahashi R, Shiohara T: Preferential elimination of patrolling monocytes sensing herpesvirus in drug-induced hypersensitivity syndrome, The International Investigative Dermatology 2012, Okinawa, Dec 7-8, 2012.

〔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：
出願年月日：
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

高橋 良 (TAKAHASHI RYO)
杏林大学・医学部・助教
研究者番号：00317091

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：