

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462752

研究課題名(和文)ヘルペスウイルス性ぶどう膜炎におけるウイルス遺伝子型と病態・疾病予後に関する研究

研究課題名(英文)Analysis of genotypes and clinical features of uveitis caused by herpes viruses

研究代表者

高瀬 博 (Takase, Hiroshi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：20451940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)による虹彩炎と急性網膜壊死は、原因ウイルスは同じVZVだが、その病態には明らかな差異がある。そのため、この二つの疾患由来のVZVの遺伝系統学的解析を目的に、VZVのopen reading frame (ORF) 領域の遺伝子配列解析を行った。その結果、両疾患から得られたVZVはいずれもClade 2と呼ばれる系統株群に属することが明らかとなった。引き続き、グライコプロテインE領域の変異株の検索を行っている。また、本研究の過程で微量眼内液検体を用いた新たな網羅的PCRキットの開発、急性網膜壊死に特異性の高い蛍光眼底造影検査所見に新たな知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Varicella-zoster virus (VZV) can cause anterior uveitis or acute retinal necrosis. Although those two disease categories have some common features such as granulomatous uveitis or cause increased intraocular pressure, they are distinctly different diseases because anterior uveitis caused by VZV does not develop acute retinal necrosis, and vice versa. We conducted genotyping analysis by identifying the single nucleotide polymorphism of the open reading frames of VZV from the intraocular fluid of those two different diseases. So far, VZV from the intraocular fluid of both two diseases are classified to be Clade 2. We are continuously analyzing the genotyping of VZV focusing on the gene mutation of glycoprotein E in addition to the open reading frames. Besides the genotyping of VZV, we are developing new comprehensive PCR system to detect VZV and other pathogens simultaneously. We also identified characteristic feature of acute retinal necrosis in fluorescein angiography.

研究分野：眼科学

キーワード：ぶどう膜炎 急性網膜壊死 虹彩炎 水痘帯状疱疹ウイルス

1. 研究開始当初の背景

ヒトヘルペスウイルスは、重篤な眼内感染症を生じる事があり、我が国の感染性ぶどう膜炎の原因微生物として最も上位を占める。これらのヘルペスウイルスが生じる眼内感染症には、主に前眼部と後眼部に二つの異なる病型があり、原因となるヘルペスウイルスの種類や患者の免疫学的背景により、それぞれ異なる病態を呈する事が知られている。単純ヘルペスウイルス 2 型 (HSV-2) は主に免疫健全者の後眼部に急性網膜壊死を起こす原因となり、サイトメガロウイルスは免疫健全者に虹彩炎を生じる一方で免疫不全者の後眼部に日和見感染症であるサイトメガロウイルス網膜炎を生じる。一方、水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) と HSV-1 も重篤な眼内感染症を生じる原因となるが、これらのウイルスは免疫健全者に、前眼部に限局した虹彩炎を起こす事もあれば、網膜に主病巣をもつ急性網膜壊死の原因となる事もある。我々はこれまでに、微量な眼内液検体から多種類の病原微生物を同時に検出できる Multiplex PCR 法と real-time PCR 法の研究を通じて多くのぶどう膜炎患者眼内液を解析し、やはり VZV と HSV-1 が免疫健全者の前眼部にも後眼部にも病変を起こす起因ウイルスである事を明らかにしている。しかしなぜ VZV と HSV-1 が、それぞれ免疫健全者の眼内に二つの異なる病態を形成するかについては、解明されていない。

VZV が免疫健全者の前眼部に限局して感染する VZV 虹彩炎は、片眼性の霧視、充血、眼痛などの症状で急性発症し、重篤な虹彩炎にしばしば治療抵抗性の続発緑内障を併発する。アシクロビルなどの抗ウイルス薬治療に反応は示すものの遷延化する事が多く、最終的に続発緑内障による視力喪失に至る例も少なくないため、治療抵抗性の難治性前ぶどう膜炎の一つに挙げられる。

一方、VZV が免疫健全者の後眼部に感染する急性網膜壊死は、急速な網膜壊死を生じる劇症の疾患であり、放置した場合は数週間うちに網膜全体が壊死を生じ失明に至る。抗ウイルス薬であるアシクロビルの全身投与や、網膜剥離に対する手術などの治療を行っても、多くの症例で裂孔原性網膜剥離や視神経萎縮などによる社会的失明に至っている。

これら、VZV によって生じる急性網膜壊死と VZV 虹彩炎は、どちらも免疫健全者の眼球内において VZV が感染、再活性化して生じるものであるが、この二つの疾患は同一線上に存在するものではない。すなわち、VZV 虹彩炎が急性網膜壊死に進展する事は無い一方で、急性網膜壊死を生じた眼に VZV 虹彩炎に特徴的な限局性虹彩萎縮を生じる事はない。従って、VZV 虹彩炎と急性網膜壊死は、原因ウイルスは同じ VZV であるにもかかわらず、その発症メカニズムと病態には明らかな差異がある。そのため、この二つの疾患を比較検討する事で、それぞれの発症機序

を解明するための手掛かりが得られる事が期待される。

近年、世界各国の水痘患者または帯状疱疹患者より分離された VZV 株の遺伝子配列が解析され、その系統学的解析により、VZV の野生型株は 5 つの遺伝学的な系統群 (Clade 1-5) に分類され、さらに全遺伝子配列が同定されていないものさらに 2 つの系統群 (Clade VI, VII) の存在が推定されている。(Breuer J, et al. *J Gen Virol*. 2010;91:821-8.) これらの系統群の分類は、VZV 遺伝子配列内に存在するいくつかの Open reading frame (ORF) の一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms (SNPs)) を解析する事で識別される。

一方、VZV にはアミノ酸配列の様々な領域における変異株が存在する事が報告されている。例えば、VZV のウイルスエンベロープ表面に発現する糖蛋白のうち、VZV と標的細胞の細胞膜との融合や、感染細胞内における VZV の複製に重要な役割を果たすとされるグライコプロテイン E (gE) の突然変異株の存在が複数のグループから報告されており、gE 領域のアミノ酸配列の変異は、ウイルス感染の伝播速度や、VZV 感染細胞に対する抗体の特異的認識領域に深く関与する事が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究は、VZV によって生じる虹彩炎と急性網膜壊死に焦点を絞り、これら二つの病態がそれぞれ遺伝子型の異なる VZV によって発症しているとの仮説を立て、それを検証するために両疾患の眼内から検出される VZV の遺伝子型の違いを調べた。さらに、本研究が立脚する基盤となる正確に診断された患者眼内液を用いるために、微量な眼内液試料からより効率よく VZV および他のウイルス遺伝子を検出、鑑別する技術、臨床所見より VZV 眼内感染症を鑑別する眼所見についても検証を行った。

3. 研究の方法

VZV によるぶどう膜炎 (虹彩炎または急性網膜壊死) が疑われる患者の眼内液を採取する。この際、虹彩炎患者からは前房水を検査目的で採取する。急性網膜壊死患者では、虹彩炎同様に検査目的に採取した前房水、または治療目的に硝子体手術を施行する際に採取される硝子体液を回収し用いる。これらの中で、眼内液から VZV 遺伝子が検出され、また細隙灯顕微鏡検査、眼底検査、蛍光眼底造影検査などから VZV による虹彩炎または急性網膜壊死として矛盾のない臨床所見が得られた患者から得られた眼内液検体のみを、以後の研究に用いた。また、これまでに VZV 虹彩炎や急性網膜壊死患者から採取、保存されていた眼内液検体のうち、学内倫理審査委員会の承認を得られ、かつ患者の同意が得られた検体も本研究に用いた。

収集された眼内液検体に対して、キットを用いて遺伝子の抽出を行った。診断目的で Multiplex PCR 法および Real-time PCR 法を用いた各種病原微生物の遺伝子検査を行い、このうち VZV 遺伝子が陽性に検出された眼内液検体を以後の研究に用いた。

眼内液検体から得られた VZV 遺伝子におけるオープンリーディングフレーム (ORF) のうち、ORF1, ORF21, ORF22, ORF37, ORF50, ORF54 の各領域を、特異的プライマーを用いて PCR 法により増幅し、2%アガロースゲルにより電気泳動を行なった。ここで同定されたそれぞれの単一バンドに対してアガロースゲルの切り出しを行い、ここから増幅された遺伝子を精製キットを用いて精製し、解析に備えて凍結保存した。

それぞれの眼内液検体から抽出した VZV 遺伝子から増幅、精製した 5 つの ORF の遺伝子配列について、遺伝子解析装置を用いて遺伝子配列を解析し、ここで得られた遺伝子配列における一塩基多型 (SNP) を解析した。ここで得られた SNP の結果に基づき、VZV 虹彩炎と急性網膜壊死の眼内から得られた VZV の遺伝子型を、既知の系統株 (Clade 1-5, VI, VII) に分類した。

また、VZV による虹彩炎または急性網膜壊死の診断過程において、眼内液から VZV を検出するための新規 PCR キットについて検討した。また、急性網膜壊死の診断における蛍光眼底検査所見についても、他のぶどう膜炎と比較検討し、急性網膜壊死に特徴的な所見についての検討を行った。

4. 研究成果

VZV による虹彩炎または急性網膜壊死患者の眼内に感染している VZV の遺伝学的差異を明らかにするため、それぞれの確定診断患者の眼内液から VZV 遺伝子を抽出した。これに対して、各 ORF 遺伝子領域を効率よく増幅させる PCR 条件を検討し、その結果としてまずは ORF21, ORF22, ORF50 について nested-PCR の系を最適化し、これらを用いて虹彩炎および急性網膜壊死患者の眼内液から得られた VZV の系統株解析を行なった。

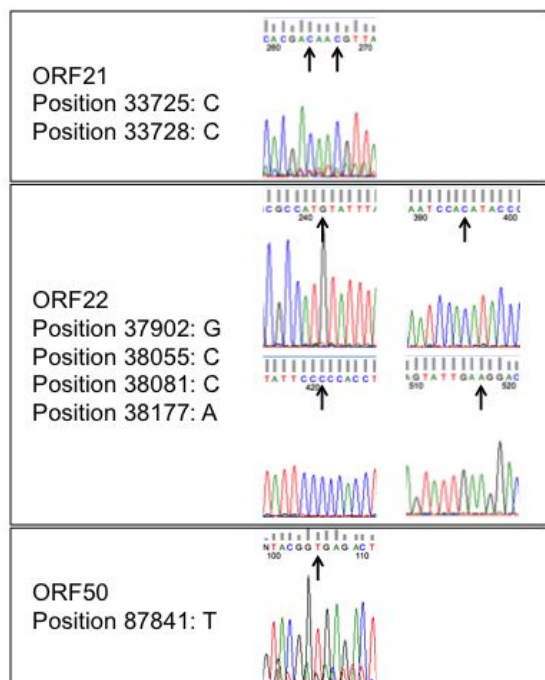
図 1. ORF 遺伝子領域増幅のために設計した Nested-PCR プライマーシーケンス

ORF21	
1 st primer CAACAGCTTGTAGGCATGCC GCACGTGTAGCTCCAAAAACC 562bp	2 nd primer CAACAGCTTGTAGGCATGCC ACTTGTATTCCCGGTACGC 422bp
ORF22	
1 st primer AGCATGCTGTGAGGCAATGG TCTGTAAGTTTAGCCCGGC 549bp	2 nd primer AGCATGCTGTGAGGCAATGG CAACATACCCAGCCAATGCG 449bp
ORF50	
1 st primer TCCAAAAACAAAACCGGGGC GTTCCAGGCTAATTCCTCCGG 433bp	2 nd primer TCCAAAAACAAAACCGGGGC CACGAAACAGATCCCCTCC 398bp

その結果、ORF21 の position 33725 と 33728、ORF22 の position 37902, 38055, 38081, 38177、ORF50 の position 87841 における SNP はそれぞれ C, C, G, C, C, A, T である事が判明した。既知のデータベースとの比較によりこれらの VZV は Clade 2 の遺伝的系統群に属する事を明らかとする事ができた。

現在までの検討の結果では、調べたかぎりの検体で遺伝系統群が Clade 2 に属する事が明らかとなっている。引き続き、両疾患における VZV の系統群の解析を継続するとともに、VZV とその感染細胞の細胞膜との融合や感染細胞内における VZV の複製に重要な役割を果たすとされるグライコプロテイン E 領域の変異株の検索を行なっている。

図 2. 急性網膜壊死患者硝子体液由来の VZV-DNA を用いた ORF 領域の遺伝子配列

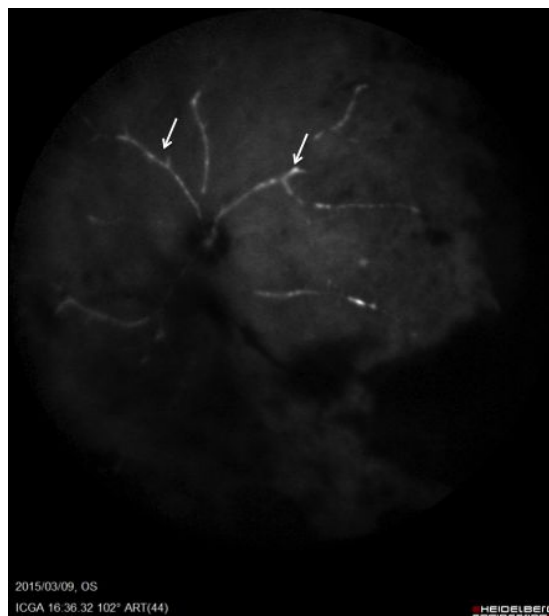


また、本研究の遂行は正確かつ迅速な確定診断に基づき、それらの患者眼内液を用いる事で初めて行われるものであった。そのため我々はこれまでに確立した網羅的 PCR システムにより VZV 遺伝子が検出された症例に対して定量 PCR を施行し、細隙灯顕微鏡検査、眼底検査、蛍光眼底造影検査などの臨床所見と合わせてその診断を確定してきた。虹彩炎や急性網膜壊死は、VZV 以外に単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルスなどの他のヒトヘルペスウイルスを原因とする事があるため、微量な眼内液検体からのこれら全ての検出をより簡便かつ迅速に同定する事を目的とした、新たな網羅的 PCR キットの開発に至っており、現在その有効性、感度、特異度の検証を行なっている。

さらに、本研究を遂行する過程において、急性網膜壊死患者に対するインドシアニング

リーン赤外蛍光眼底造影検査の後期像で特異な血管壁染色像が存在する事を同定した。これは他の後部ぶどう膜炎と比較して急性網膜壊死に特異性の高い所見である事が分かり、急性網膜壊死の診断に有用であった。

図3. 急性網膜壊死患者の赤外蛍光眼底造影検査後期像における動脈壁の組織染色像



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0件)

〔学会発表〕(計6件)

Satoko Nakano, Sunao Sugita, Yasuhiro Tomaru, Takako Nakamuro, Toshiaki Kubota, Hiroshi Takase, Manabu Mochizuki, Norio Shimizu, Establishment of a new comprehends polymerase chain reaction (PCR) strip kit for diagnosing infections eye diseases. ARVO 2016 Annual Meeting. 2016年5月1日 Seattle (USA).

中野聡子、外丸靖浩、杉田直、高瀬博、中室隆子、久保田敏昭、清水則夫. DNA精製操作不要の眼感染症網羅的迅速検査「Direct strip PCR」の開発. 第50回日本眼炎症学会. 2016年7月1日、東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

赤池さやか、高瀬博、大野京子. 急性網膜壊死の網膜動脈炎検出における蛍光眼底造影検査の比較検討. 第120回日本眼科学会総会. 2016年4月7日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

高瀬博. 急性網膜壊死の診断基準および治療指針. 第70回日本臨床眼科学会. 2016年11月3日、京都国際会議場(京都府・京都市)

杉田直、竇野阿佑美、高橋政代、外丸靖

浩、清水則夫、高瀬博、中野聡子. 眼局所検体を用いた眼感染症の新しいPCR網羅的検査の開発. 第69回日本臨床眼科学会. 2015年10月22日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

中野聡子、外丸靖浩、中室隆子、横山勝彦、高瀬博、杉田直、清水則夫、久保田俊昭. 新規眼感染症網羅的PCR検査ストリップを用いた眼感染症診断. 第69回日本臨床眼科学会. 2015年10月22日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

〔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：
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

高瀬 博 (TAKASE, Hiroshi)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師
研究者番号：20451940

(2) 研究分担者

望月 學 (MOCHIZUKI, Manabu)
東京医科歯科大学・医学部附属病院・非常勤講師
研究者番号：10010464

清水 則夫 (SHIMIZU, Norio)
東京医科歯科大学・再生医療研究センター・准教授
研究者番号：30226245

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

鴨居 功樹 (KAMOI, Koju)

東京医科歯科大学・眼科・講師

研究者番号：40451942