

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 4 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293256

研究課題名(和文) ウイルス感染に対する皮膚自然免疫および内因性免疫機構の網羅的解析とワクチン開発

研究課題名(英文) The alarmin IL-33 derived from HSV-2-infected keratinocytes triggers mast cell-mediated antiviral innate immunity

研究代表者

島田 眞路 (SHIMADA, Shinji)

山梨大学・その他部局等・学長

研究者番号：10114505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：単純疱疹ウイルス(HSV)-2の経皮感染において、IL-33がアラミンとして働いて、生体防御に重要な役割を果たしていることを見出した。HSV感染ケラチノサイトからIL-33が放出されることを、免疫染色、ELISA、ウエスタンブロット法により明らかにした。また、WT-BMMCsあるいはST2欠損肥満細胞を肥満細胞欠損マウスに再構築することにより、肥満細胞によるHSV-2侵入感知システムには、IL-33/ST2を介したシグナルが必須であることも明らかとした。これらの実験結果は、宿主防御における肥満細胞上でのIL-33/ST2シグナルの重要性を示している。

研究成果の概要(英文)：Here, we found that, in herpes simplex virus (HSV)-2-infected murine skin, IL-33 protein kinetics paralleled the kinetics of HSV titer, suggesting that productive viral replication promotes IL-33 release in skin. Ex vivo mast cell (MC) activation analysis demonstrated that supernatants of HSV-2-infected epidermis of wild type (WT) mice, but not IL-33<sup>-/-</sup> mice, induced TNF- $\alpha$  production by bone marrow-derived MCs (BMMCs), indicating that IL-33 released from HSV-2-infected epidermis activates BMMCs. To see whether IL-33/ST2 signaling on MCs contributes to antiviral host defense, bone marrow-derived mast cells (BMMCs) generated from WT or ST2<sup>-/-</sup> mice were reconstituted in the skin of MCs deficient (W/W<sup>v</sup>) mice before HSV-2 infection. We found that intradermal reconstitution with WT-BMMCs, but not ST2<sup>-/-</sup> BMMCs, significantly restored the clinical severity and mortality in HSV-2-infected W/W<sup>v</sup> mice, indicating the importance of IL-33/ST2 axis on MCs in host defense.

研究分野：皮膚免疫

キーワード：肥満細胞 ヘルペスウイルス アラミン IL-33

### 1. 研究開始当初の背景

IL-33は、外来病原体や異物の侵入に際して、損害関連の分子パターン(DAMPs)いわゆる「alarmins」として自然免疫を誘導し、炎症やアレルギーの発症にも関与する多機能サイトカインである(Cayrol C et al. 2014; Molofsky et al. 2015)。IL-33はIL-1ファミリー受容体であるST2を受容体とする。ST2は肥満細胞(MC)好酸球、好塩基球、ナチュラルキラー(NK)細胞、ILC2やT細胞などの細胞表面上に発現される(Cayrol C et al. 2014)。IL-33はTh2免疫反応を促進する上皮由来のサイトカインとして知られているが、創傷治癒やTh1、Th17-または細胞障害性リンパ球(CTL)あるいは制御性T細胞(Tregs)などによる免疫応答にも影響を及ぼす(Gajardo Carrasco T et al. 2015; Molofsky et al. 2015)。さらに最近、IL-33/ST2シグナルが、ウイルス感染、例えばインフルエンザウイルスまたはパラインフルエンザウイルスによる気道感染症(Chang YJ et al. 2011) LCMVによる脾臓感染症(Baumann C et al. 2012) マウス・サイトメガロウイルス(MCMV)による腹膜内感染症(Nabekura et al. 2015)に対する反応に関与していることがわかっている。そして、これらの研究の一部はウイルス感染に対する宿主防御の「alarmin」としてIL-33の新しい役割を明らかにしつつあるが、皮膚ウイルス感染におけるその役割はいまだ明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

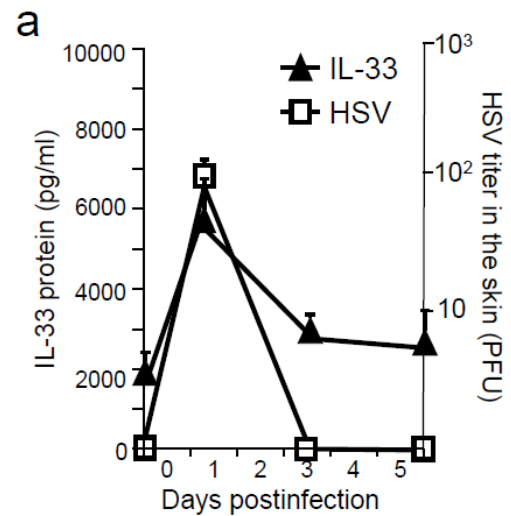
単純ヘルペスウイルス2型(HSV-2)は、世界中で5億人以上を感染させ、陰部ヘルペスの大部分の症例を引き起こす性行為によって伝播する病原菌である。初感染や再発性HSV感染症ではHSV特異的CTLやplasmacytoid樹枝細胞、NK細胞やNKT細胞を含む免疫担当細胞が中心的な役割を果たすことが知られているが、我々は、これらの免疫細胞に加えて、MCがTNF- $\alpha$ とIL-6生産を介してHSV感染皮膚において宿主防御機構にきわめて重要な役割を果たしていることを最近明らかにした(Aoki R et al. 2013)。

### 3. 研究の方法

HSV-2 経皮感染後、感染局所皮膚内IL-33発現を調べるため、HSV-2 皮膚感染症モデル(HSV-2を野生型(WT)マウスに皮内注射)を用いてIL-33の組織濃度を調べた。

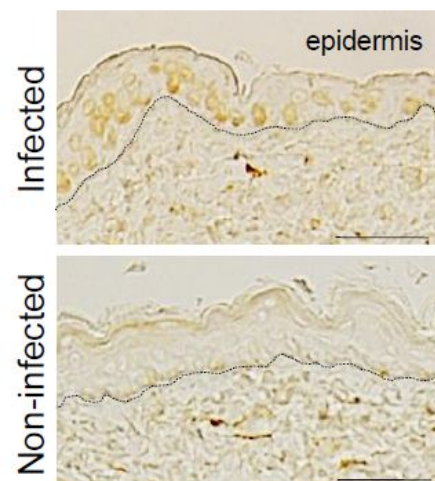
### 4. 研究成果

感染局所皮膚内で観察されたIL-33生産量は皮内HSV-2量のkineticsと連動して変動し、1日後(p.i.)で、ピークに達した(図a)。



また感染局所皮膚の免疫染色ではIL-33が表皮ケラチノサイトの核で有意に発現されることがわかった(図b)。

### b



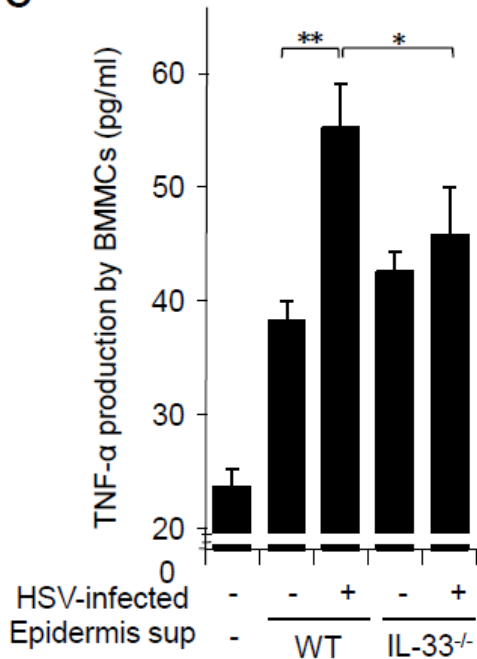
さらに単純ヘルペス患者病変部水疱蓋のケラチノサイトおよびHaCaTケラチノサイト、培養ケラチノサイト(NHEKs)においてもIL-33発現を確認した。

また、IL-33を発現している細胞の頻度はMOI-依存的に増加することもわかった(Data not shown)。

次にIL-33の機能的な役割を調べるために、MC(骨髄由来肥満細胞)(BMMCs)培養系にWTマウスあるいはIL-33<sup>-/-</sup>マウスから得られたHSV-2感染KC培養上清液を加えて刺激した。

WTからのHSV-2感染KC培養上清がBMMCからのTNF $\alpha$ を誘導するものの、IL-33<sup>-/-</sup>マウスから得られたHSV-2感染KC培養上清液の賛成誘導が低いことから、HSV-2感染KC培養上清に含まれるIL-33がMCからのTNF $\alpha$ 産生に重要なことが示唆された(図c)。

C



次に、leathal な HSV 脳炎モデルを用いて、HSV-2 に対する宿主防御における IL-33 の重要性を評価するため、WT または IL-33 レセプター ST2<sup>-/-</sup> マウスに intradermally に HSV-2 を皮下注射し、生存率、麻痺スコア、皮膚症状スコアをモニタリングした。

その結果、下図に示す如く、ST2<sup>-/-</sup> マウスでは WT マウスに比べて生存率が有意に低く、麻痺スコア、皮膚症状スコアともに有意に重症化することがわかった (下図 a)。

HSV 感染に対する宿主防御において MC の活性化の引き金を引くと考えられる IL-33/ST2 の貢献を調査するために、我々は MC 再構築実験を行った。MC を欠失する Kit<sup>W/W-v</sup> マウスに WT または ST2<sup>-/-</sup> マウスに由来する BMMCs の皮内注射によって、再構築。

再構築後これらのマウスに (a) 同様に経皮 HSV 感染実験を行ったところ、生存率の低下が認められた ST2<sup>-/-</sup> マウスに WT マウス由来 BMMCs を再構築することによって生存率の有意な回復を認めたが、ST2<sup>-/-</sup> マウス由来 BMMCs の再構成によっては生存率の改善は認められなかった。

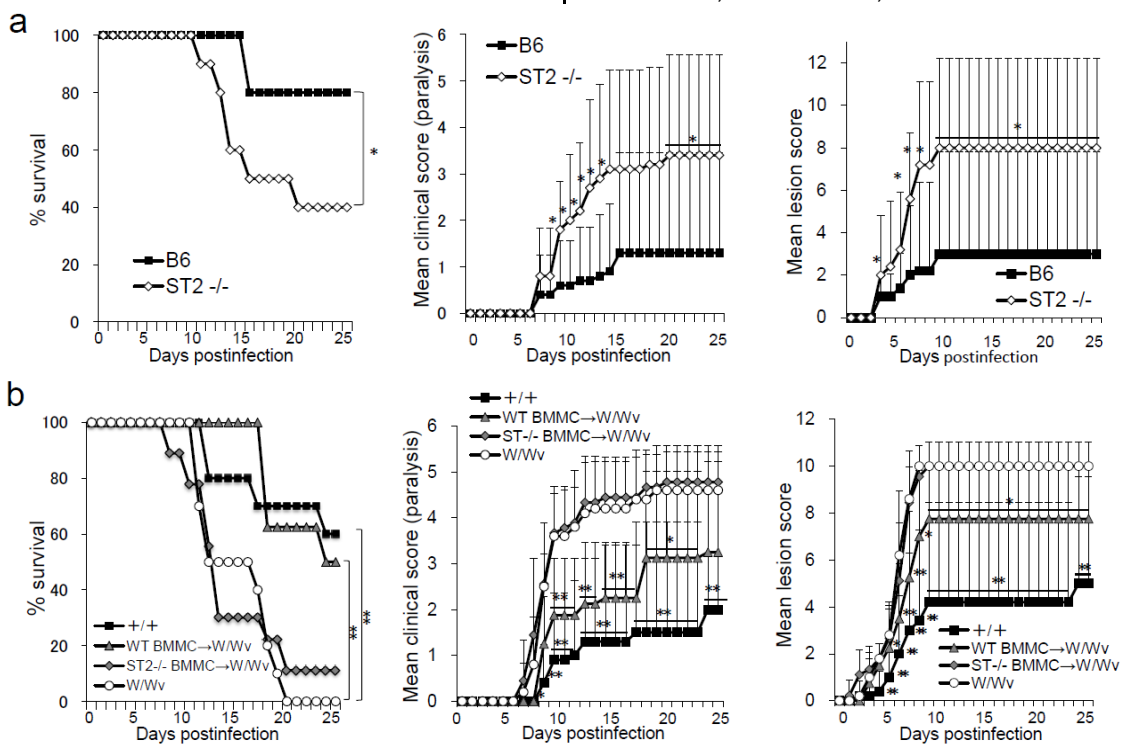
麻痺スコア、皮膚症状スコアも同様に、WT マウス由来 BMMCs を再構築することによってスコアの有意な改善を認めたが、ST2<sup>-/-</sup> マウス由来 BMMCs の再構成によつての改善は認められなかった (下図 b)。

これまでの実験結果から、HSV 感染局所皮膚における MC を中心とした生体防御機構において、IL-33/ST2 軸が抗ウイルス自然免疫および宿主防御の中心的な役割を担うことえお示唆していると考えられた。

<参考文献>

Aoki R, Kawamura T, Goshima F et al. (2013) Mast cells play a key role in host defense against herpes simplex virus infection through TNF-alpha and IL-6 production. *J Invest Dermatol* 133:2170-9.

Baumann C, Bonilla WV, Frohlich A et al.



(2015) T-bet- and STAT4-dependent IL-33 receptor expression directly promotes antiviral Th1 cell responses. Proc Natl Acad Sci U S A 112:4056-61.

Bonilla WV, Frohlich A, Senn K et al. (2012) The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8(+) T cell responses. Science 335:984-9.

Byers DE, Alexander-Brett J, Patel AC et al. (2013) Long-term IL-33-producing epithelial progenitor cells in chronic obstructive lung disease. J Clin Invest 123:3967-82.

Cayrol C, Girard JP (2014) IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. Curr Opin Immunol 31:31-7.

Chang YJ, Kim HY, Albacker LA et al. (2011) Innate lymphoid cells mediate influenza-induced airway hyper-reactivity independently of adaptive immunity. Nat Immunol 12:631-8.

Chew T, Taylor KE, Mossman KL (2009) Innate and adaptive immune responses to herpes simplex virus. Viruses 1:979-1002.

Corey L, Spear PG (1986) Infections with herpes simplex viruses (1). N Engl J Med 314:686-91.

Gajardo Carrasco T, Morales RA, Perez F et al. (2015) Alarmin' Immunologists: IL-33 as a Putative Target for Modulating T Cell-Dependent Responses. Front Immunol 6:232.

Kawamura T, Ogawa Y, Aoki R et al. (2014) Innate and intrinsic antiviral immunity in skin. J Dermatol Sci 75:159-66.

Looker KJ, Garnett GP, Schmid GP (2008) An estimate of the global prevalence and incidence of herpes simplex virus type 2 infection. Bull World Health Organ 86:805-12, A.

Molofsky AB, Savage AK, Locksley RM (2015) Interleukin-33 in Tissue Homeostasis, Injury, and Inflammation. Immunity 42:1005-19.

Monticelli LA, Sonnenberg GF, Abt MC et al. (2011) Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. Nat Immunol

12:1045-54.

Nabekura T, Girard JP, Lanier LL (2015) IL-33 receptor ST2 amplifies the expansion of NK cells and enhances host defense during mouse cytomegalovirus infection. J Immunol 194:5948-52.

Rostan O, Arshad MI, Piquet-Pellorce C (2015) Crucial and diverse role of the interleukin-33/ST2 axis in infectious diseases. Infect Immun 83:1738-48.

## 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. Aoki R, Kawamura T, Goshima F, Ogawa Y, Nakae S, Moriishi K, Nakao A, Shimada S. The Alarmin IL-33 Derived from HSV-2-Infected Keratinocytes Triggers Mast Cell-Mediated Antiviral Innate Immunity. 査読あり J Invest Dermatol. 2016 Jun;136(6):1290-2

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

島田 眞路 (SHIMADA, Shinji)  
山梨大学・その他部局等・学長  
研究者番号：10114505

### (2)研究分担者

川村 龍吉 (KAWAMURA, Tatsuyoshi)  
山梨大学・総合研究部 教授  
研究者番号：70262657

柴垣 直孝 (Shibagaki, Naotaka)  
山梨大学・総合研究部 准教授  
研究者番号：40262662