

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(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461685

研究課題名(和文) ウイルス感染症における概日時計の役割の解明

研究課題名(英文) Differential Day & Night outcome to cutaneous viral infection

研究代表者

川村 龍吉 (KAWAMURA, Tatsuyoshi)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：70262657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：これまでHSVの経皮感染の時間がHSV-2感染症の臨床や病理に影響するか否かについては不明であった。我々はHSVの経皮感染モデルを用いて、活動期(ヒトにおける昼、マウスにおける夜)では休息期(ヒトにおける夜、マウスにおける昼)に比べて経皮HSV感染症状がより重症化することや死亡率がより高くなることを見出した。また、この差は皮膚ケラチノサイトにおけるHSV-2レセプターNectin1発現の日内変動によることを明らかにした。これらの結果は、今まで知られていなかったHSV-2感染症の概日リズムを明らかにするとともに、同感染症に対する新たな予防戦略に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) is a sexually transmitted pathogen that is widely prevalent around the world. To date, it is not fully understood whether the time of infection is a variable influencing the outcome of HSV-2 pathology. To address the issues, wild-type mice housed under 12-hour light/12-hour dark conditions (the light was turned on at Zeitgeber time [ZT] 0, and the light was turned off at ZT12) were intradermally infected with HSV-2 either at ZT6 (rest phase) or at ZT18 (active phase). We found that the clinical severity and mortality were higher in mice infected at active phase than at rest phase, depending on circadian expression of HSV-2 receptor Nectin1 in the skin that is likely controlled by the molecular clock. In addition, the degree of the host innate immune response was also less severe in the skin of mice infected at ZT6 than at ZT18. These findings provide new insight into previously unknown aspects of HSV-2 infection and prevention of the disease.

研究分野：皮膚免疫学

キーワード：HSV-2感染症 概日リズム 時計遺伝子

1. 研究開始当初の背景

単純ヘルペスウイルス 2 型 (HSV-2) は、世界で最も多い STD (性感染症) である陰部ヘルペスの原因病原体であり、主に性行為によって伝播する。現在まで、宿主に感染を起こす時間 (帯) が HSV-2 感染症の病態病理に影響しているか否かは全く不明である。

2. 研究の目的

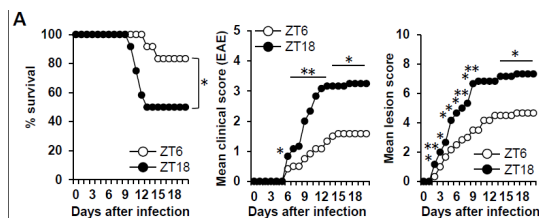
感染時間 (帯) が HSV-2 感染の病態病理に影響を及ぼすか調べるため、我々は HSV-2 皮膚感染症モデル (Aoki, R et al. 2013) を用いて HSV 感染の概日リズムを検討した。

3. 研究の方法

室内灯を午前 6 時 (Zeitgeber time [ZT] 0) につけ、午後 6 時 (ZT12) に消灯した。まず、野生型マウスの背部に、午前 12 時 00 分 (rest phase, ZT) または午後 12 時 00 分に (active phase, ZT18) に、HSV-2 を皮内注射した。

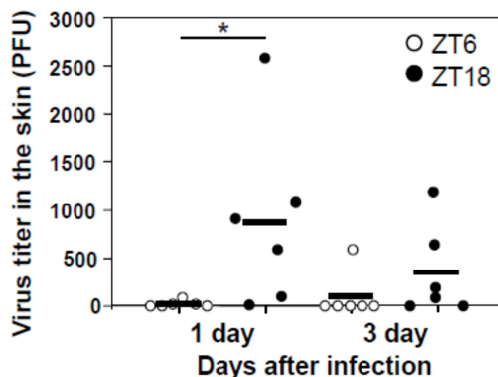
4. 研究成果

生存率、皮疹スコア、麻痺スコアいずれも ZT18 (図 A) で、ZT6 で感染させたマウスに比べて、より重症化することがわかった。



(図 B: 下図) に示す如く、ZT18 と比較すると ZT6 で感染させたマウスで、皮内のウイルス量は有意に低値であった。

また、皮膚 HSV-2 感染症の重症度の経時的变化は RAG2 欠損マウス (Shinkai Y et al. 1992) でも同様に観察されたことから、獲得免疫の日内変動が上述の実験結果をもたらしているわけではないことが示唆された (Data not shown)。

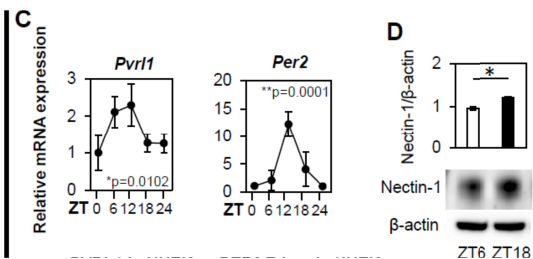


< 図 B : 皮内感染後のウイルス量の比較 >

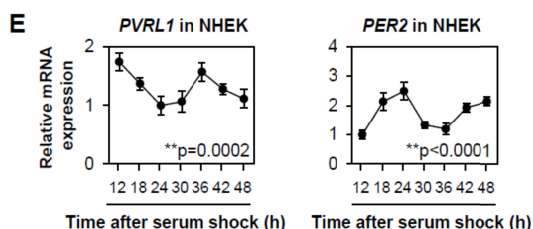
これらの実験結果から、HSV-2 感染は active phase で rest phase より重症化することが明らかとなった。

いくつかの時計遺伝子のフィードバックループからなる 24 時間周期の体内時計は、皮膚を含むいろいろな臓器または組織の中に存在し、生理的なプロセスにおける概日リズムを形成する (Dibner C et al. 2010; Partch CL et al. 2014; Plikus MV et al. 2015)。また、細胞レベルで、CLOCK と BMAL1 は、Period1/2 (PER)、Cryptochrome1/2 (CRY) などの時計遺伝子の発現を調節し、PER と CRY は、CLOCK/BMAL1 を抑制する (Dibner et al. 2010; Partch CL et al. 2014)。そこで次に、感染時間 (帯) が HSV-2 感染の病態病理に影響を及ぼすか調べるため、我々は通常マウス皮膚における時計遺伝子の発現と HSV-2 レセプターである Pvr11 (Taylor JM et al. 2007) の発現の概日リズムを調べた。

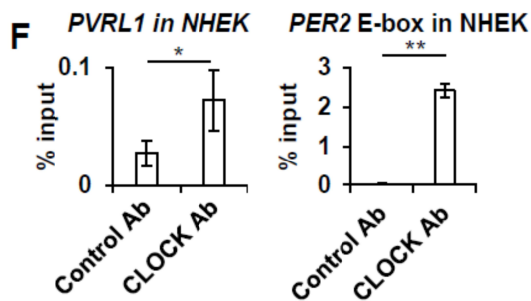
Pvr11 の mRNA 濃度は、野生のタイプ・マウス (図 C) の皮膚における 24 時間周期の変化を示し、ZT6 より ZT18 で高かった。さらに興味深いことに Nectin1 (Pvr11) のタンパクレベルでの発現レベルも ZT6 より ZT18 で高かった (図 D)。



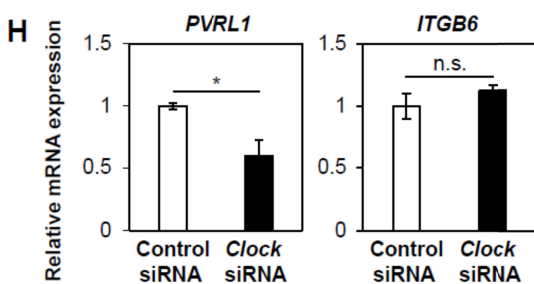
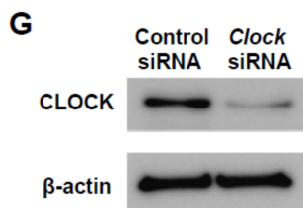
野生型マウスの皮膚における Per1-3、Cry1 と Bmal1 の mRNA 発現量も同様の 24 時間周期の発現変化が観察された (Data not shown)。したがって、皮膚における Nectin1 (Pvr11) 発現に時刻依存的な変化があることは、図 A で見られた感染症状の差が HSV の経皮的感染量による可能性が示唆された。次に、Pvr11 の発現の概日リズムが in vitro のケラチノサイト培養系でも見られるかについて検討した。血清ショックの処置によって同期した後、Pvr11 ならびに時計遺伝子 Per、Cry と Bmal1 の mRNA 量をヒトケラチノサイト (NHEK) で検討したところ、同様の 24 時間周期の発現変化が観察された (図 E)。



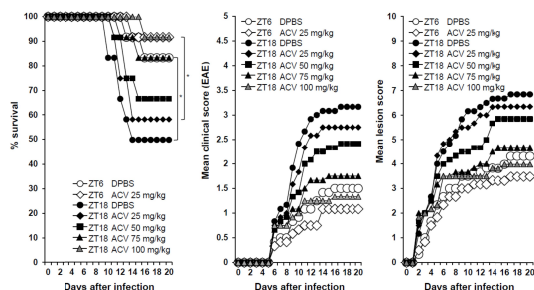
さらに、NHEK を用いた ChIP 分析により CLOCK が Pvr1 のプロモーター領域と結合することがわかった (図 F)。



また、NHEK の siRNA による Clock ノックダウンは Pvr1 の発現を抑制した (図 G、H)。



これまでの実験結果が HSV-2 感染症の予防に 関与するかを検討するため、ZT5.5 または ZT17.5 で 25、50、75 と 100mg/kg のアシクロビルでマウスを前処理し、30 分後に、マウス 背部に HSV-2 に感染させた (ZT6 または ZT18)。 25mg/kg のアシクロビルで前処理された ZT6 感染マウスの生存率、皮疹スコア、麻痺スコアを得るためには、ZT18 感染マウス 4 倍量に 相当する 100mg/kg のアシクロビルが必要であ った。この結果から、active phase でより 多量のアシクロビルが HSV-2 感染防止に必要 ながことが示唆された (下図)。



以上の実験結果から、時計遺伝子によってコ ントロールされている皮膚の HSV-2 レセプター Nectin1 の 24 時間周期の発現によって、 経皮感染における HSV 感染量、皮膚感染症 状、麻痺症状、生存率などが規定されている 可能性が示唆された。

また最近、ウイルス複製にも概日リズムが存 在することが報告されており (Edgar RS et al. 2016; Kalamvoki, 2011) HSV レセプターの変動に加えて、細胞に感染した HSV のそ の後の複製の概日リズムも宿主の感染症状を 規定している可能性が考えられる。また今回 の実験で、この HSV の感染症状の概日リズム は感染予防の観点からも考慮すべき現象 であることが示唆された。

<参考文献>

Aoki R, Kawamura T, Goshima F, Ogawa Y, Nakae S, Nakao A, et al. (2013) Mast cells play a key role in host defense against herpes simplex virus infection through TNF-alpha and IL-6 production. *The Journal of investigative dermatology* 133:2170-9.

Dibner C, Schibler U, Albrecht U (2010) The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annual review of physiology* 72:517-49.

Edgar RS, Stangherlin A, Nagy AD, Nicoll MP, Efsthathiou S, O'Neill JS, et al. (2016) Cell autonomous regulation of herpes and influenza virus infection by the circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113:10085-90.

Hardin PE (2004) Transcription regulation within the circadian clock: the E-box and beyond. *Journal of biological rhythms* 19:348-60.

Kalamvoki M, Roizman B (2011) The histone acetyltransferase CLOCK is an essential component of the herpes simplex virus 1 transcriptome that includes TFIIID, ICP4, ICP27, and ICP22. *Journal of virology* 85:9472-7.

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

Partch CL, Green CB, Takahashi JS (2014)

Molecular architecture of the mammalian circadian clock. Trends in cell biology 24:90-9.

Plikus MV, Van Spyk EN, Pham K, Geyfman M, Kumar V, Takahashi JS, et al. (2015) The circadian clock in skin: implications for adult stem cells, tissue regeneration, cancer, aging, and immunity. Journal of biological rhythms 30:163-82.

Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, et al. (1992) RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. Cell 68:855-67.

Tanioka M, Yamada H, Doi M, Bando H, Yamaguchi Y, Nishigori C, et al. (2009) Molecular clocks in mouse skin. The Journal of investigative dermatology 129:1225-31.

Taylor JM, Lin E, Susmarski N, Yoon M, Zago A, Ware CF, et al. (2007) Alternative entry receptors for herpes simplex virus and their roles in disease. Cell host & microbe 2:19-28.

Yoo SH, Ko CH, Lowrey PL, Buhr ED, Song EJ, Chang S, et al. (2005) A noncanonical E-box enhancer drives mouse Period2 circadian oscillations in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102:2608-13.

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)

〔学会発表〕(計 1件)

1. Takamitsu Matsuzawa, Yuki Nakamura, Youichi Ogawa, 1 Kayoko Ishimaru, Fumi Goshima, Shinji Shimada, Atsuhito Nakao, and Tatsuyoshi Kawamura. Differential Day-Night Outcome to HSV-2 Cutaneous Infection. The society for Investigative Dermatology Annual meeting 2017, Portland. USA

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/dermatol/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

川村 龍吉 (KAWAMURA, Tatsuyoshi)

山梨大学・総合研究部 教授

研究者番号 : 70262657

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

(4)研究協力者

()