

平成23年9月

# 武田佐智子 学位論文審査要旨

主 査 景 山 誠 二  
副主査 佐 藤 建 三  
同 井 上 幸 次

## 主論文

Roles played by Toll-like Receptor-9 in Corneal Endothelial Cells after Herpes Simplex Virus Type 1 infection

(ヒト角膜内皮細胞の単純ヘルペスウイルス感染応答機構におけるTLR9の役割)

(著者：武田佐智子、宮崎大、佐々木慎一、山本由紀美、寺坂祐樹、矢倉慶子、山上聡、海老原伸行、井上幸次)

平成23年 Investigative Ophthalmology & Visual Science 掲載予定

# 学 位 論 文 要 旨

## Roles played by Toll-like Receptor-9 in Corneal Endothelial Cells after Herpes Simplex Virus Type 1 infection

(ヒト角膜内皮細胞の単純ヘルペスウイルス感染応答機構におけるTLR9の役割)

単純ヘルペスウイルス I 型 (HSV-1) は三叉神経節に潜伏感染しており、再活性化によって角膜の感染を生じ視力を障害する。角膜ヘルペスによる病型は、上皮型、実質型、内皮型の3つに大別され、上皮型は角膜上皮におけるHSV-1の増殖により、実質型は角膜実質に蓄積した抗原に対する免疫反応により引き起こされる。内皮型の病態の詳細は不明であるが、角膜の透明性を保つために重要な働きをしている内皮が障害されると重度の視力障害を生じる。近年、innate immunityを担う分子としてtoll-like receptor (TLR) が注目されているが、その角膜ヘルペスにおける役割は不明である。そこで、角膜内皮におけるHSV-1感染の病態を解明するため、ヒト培養角膜内皮細胞 (human corneal endothelial cells : HCEncells) を用いて、HSV-1感染におけるTLR9の役割とTLR9が介在する抗ウイルス反応について検証した。

### 方 法

不活化ヒト角膜内皮細胞を用いてTLRの発現を調べた。HSV-1感染後の炎症性サイトカインの発現レベルは、real-time RT-PCRとプロテインアレイアナリシスにより測定した。HSV-1の複製へのTLR9の関与については、real-time PCRとプラークアッセイにより検証した。TLR9阻害の検証には、TLR9阻害オリゴヌクレオチドまたはTLR9 siRNAを用いた。シグナル伝達経路活性化の検証のために、経路特異的転写因子レポーターを誘導したHCEncellで、プロモーター活性を測定した。

### 結 果

HCEncell内において、TLR9が強く発現していた。TLR9のリガンドであるCpGオリゴヌクレオチドは、HCEncellにおいてNF $\kappa$ B活性を刺激した。HSV感染もNF $\kappa$ Bを刺激し、同時にRANTES、IP-10、MCP-2、MIF、MCP-4、MDC、MIP-3 $\alpha$ 、IL-5、TARC、MCP-1、IL-6などのNF $\kappa$ B関連炎症性サイトカインを誘導した。これらのサイトカインの誘導はTLR9活性の遮断により著しく減少した、さらに、HCEncell内でのウイルスの複製はTLR9の阻害により減少したものの、

NF $\kappa$ Bカスケードの同時活性化により回復した。異なるHSV-1誘導性炎症カスケードに関連する転写因子のうち、TLR9は、NF $\kappa$ B、サイクリックAMP応答エレメント (CRE)、及びCCAATエンハンサー結合蛋白質 (C/EBP) を活性化することがわかった。

## 考 察

実験結果より、HCEn細胞においてTLR9が強く発現しており、TLR9はHSV-1感染後の初期炎症応答に利用されていることが示された。また、HSV-1は自身のウイルス複製のためにTLR9誘導性NF $\kappa$ Bの活性化を利用することも示された。

HCEn細胞は、ウイルス侵襲に抵抗するために様々な炎症プログラムの転写を開始し、その中でTLR9の活性化はとくにNF $\kappa$ B、CRE、C/EBPを介する炎症性サイトカインのシグナル伝達カスケードの活性化を引き起こす。

HSV-1の複製のためには、ウイルス由来のICP0が重要な役割を果たしていることが知られているが、ICP0はそのプロモーター上にNF $\kappa$ B結合エレメントを有しており、ICP0の転写はp65/RelAの動員により引き起こされるホストのNF $\kappa$ B活性化に依存している。本実験では、I $\kappa$ Bキナーゼ (IKK) 活性を抑制するなど、NF $\kappa$ Bカスケードを阻害することにより有意にウイルスの複製が抑制されることが示された。

一方で、ウイルスの複製が完成すると、ICP0はユビキチン特異的ペプチダーゼ7 (USP7) 転座により炎症反応を抑制し、NF- $\kappa$ BおよびJNKの阻害を起こす。このように、HSV-1は、TLR9やNF $\kappa$ Bなどホストの免疫システムの重要なコンポーネントを自分自身のために利用している。

本実験に用いたHCEn細胞は、代表的なサイトカインの誘導において角膜内皮の初代培養細胞および器官培養細胞と同様の機能を持っている。しかしながら、不死化したHCEn細胞がin vivoでの角膜内皮細胞の特性、HSV-1感染による角膜内皮炎などを本当に反映しているのかは疑問が残る。ヘルペスウイルス感染時の内皮細胞の生理的役割の理解を得るためには、今後in vivoでの解析が必要であろうと思われる。

## 結 論

角膜内皮細胞は、TLR9を介してNF $\kappa$ B、CRE、C/EBPにより誘導される一連の炎症性サイトカインの発現を介してHSV-1感染に対抗する炎症性プログラムを開始する。その一方で、HSV-1はTLR9を介したNF $\kappa$ Bの活性化をウイルス自身の複製に利用する。