

# ヘルペス性角膜炎発症における CCL20-CCR6 ケモカイン系の役割

坂本万寿夫

近畿大学医学部眼科学教室

Significance of CCR6-positive cells on herpetic epithelial keratitis in mice

Masuo Sakamoto

Department of Ophthalmology at Kindai University Faculty of Medicine

## 抄 録

単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)は角結膜より感染し,三叉神経節内に潜伏感染する。その後 HSV-1 は様々な誘因で再活性化され,ヘルペス性角膜炎を呈する。本疾患は重篤な視力障害を来たしうが,いまだ根本的治療法・予防法は確立されていない。HSV-1 感染症を含む急性ウイルス感染症では,樹状細胞(DC)およびCD4陽性T細胞がCD8陽性T細胞を刺激して細胞障害性T細胞(CTL)を誘導し,これらが感染細胞を除去する(1型ヘルパーT細胞型免疫反応/Th1反応)。また近年の研究により,ヘルペス性角膜炎病変部ではCCL20ケモカインおよびその受容体CCR6が高発現していることが明らかとなった。CCR6発現細胞としては未熟DCやIL-17サイトカイン高産生型ヘルパーT細胞(Th17)等があり,これらの細胞がCCL20-CCR6ケモカイン系を介して本病変に集積し病態形成に関与している可能性がある。特にTh17反応はTh1に対して抑制的に作用しうるため,本疾患の症状顕在化に対して抑制的に働きうることが示唆される。そこで本研究では,ヘルペス性角膜炎の病態におけるCCL20-CCR6ケモカイン系の役割を明らかにすべく,Ccr6遺伝子欠損マウス(Ccr6-KOマウス)を用いた実験を行った。まずC57BL6/J野生型マウス(WTマウス)および同系Ccr6-KOマウスにHSV-1を経角膜的感染させたところ,Ccr6-KOマウスでは角膜炎出現頻度が亢進していた。またCcr6-KOマウス炎症角膜では組織破壊的免疫反応亢進がみられた。角膜および三叉神経節内のウイルス感染率には著変なかつたものの,Ccr6-KOマウスではTh1型およびTh17型免疫反応関連ケモカインの発現亢進がみられた。またCcr6-KOマウスでは三叉神経節へのTh17細胞浸潤が低下していた。以上の結果より,難治性ヘルペス性角膜炎ではTh1亢進がみられ,同時にTh1反応に対し抑制的に働くTh17反応が減弱し,HSV-1感染細胞の過剰破壊がみられるものと考えられた。

**Key words:** 単純ヘルペスウイルス, ヘルペス角膜炎, ケモカイン, CCR6, ヘルパーT細胞, 樹状細胞

## 緒 言

単純ヘルペスウイルス1型(herpes simplex virus type1/HSV-1)は角結膜に初感染の後,三叉神経に潜伏感染する<sup>1</sup>。その後HSV-1はストレス・紫外線・免疫抑制など様々な誘因で再活性化され,眼病変としてヘルペス性角膜炎を呈する<sup>2</sup>。ヘルペス性角膜炎は再発により角膜混濁や瘢痕形成を生じ,過去には重篤な視力障害さらには失明に至ることが見られ

た<sup>3</sup>。近年では抗HSV-1薬の登場により角膜混濁や瘢痕形成の頻度は減少したものの,いったん発症した場合にはいまだ根治困難である。またヘルペス性角膜炎の病態抑制や潜伏感染部位である三叉神経節における免疫反応について未だに解明されていない部分も多い。

HSV-1感染症を含む急性ウイルス感染症では1型ヘルパーTリンパ球(type-1 helper T lymphocyte/Th1)型免疫反応と呼ばれる免疫反応

がみられる<sup>4</sup>。この Th1 型免疫反応の最初期イベントは、貪食細胞の一種である未熟な樹状細胞 (dendritic cell/DC) がウイルス感染細胞由来の物質 (感染性異物) を貪食することである<sup>5</sup>。これらの感染性異物を貪食した DC は活性化型 DC へと分化し、自身の遊走能を変化させて所属リンパ節へと遊走する。所属リンパ節内で活性化 DC はナイーブ CD4 陽性 T リンパ球を刺激し、これらの T リンパ球の多くはいわゆる Th1 型 T リンパ球へと分化する。その後 Th1 リンパ球は活性化 DC とともにナイーブ CD8 陽性 T リンパ球を刺激し、これらの CD8 陽性 T リンパ球は細胞障害性 T リンパ球 (cytotoxic T lymphocyte/CTL) へと分化する。これらの CTL が感染部位へと遊走し、感染細胞は抗原特異的に除去される<sup>1</sup>。

近年の研究により、マウスヘルペス性角膜炎モデルでは角膜炎病変部に CCL20 ケモカインおよびその受容体である CCR6 が高発現することが報告されている<sup>6</sup>。同様にヒトヘルペス性角膜炎においても CCL20 と CCR6 が高発現することが明らかとなった<sup>7</sup>。CCR6 を発現する細胞としては前述の未熟 DC および IL-17 サイトカイン高産生型ヘルパー T リンパ球 (IL-17-producing helper T lymphocyte/Th17) 等が知られている<sup>8,9</sup>。これらの CCR6 発現細胞は CCL20 の濃度勾配にしたがい炎症部位へと遊走する。そこで未熟 DC は炎症部位で抗原貪食し、それをトリガーに成熟 DC へと分化・活性化して所属リンパ節へ遊走する<sup>5</sup>。また Th17 は関節リウマチなどの自己免疫疾患の発症に関与することが知られている<sup>10</sup>。しかしながらヘルペス性角膜炎におけるこれら CCR6 発現細胞の働きについては十分解明されていない。

以上の知見を元に、ヘルペス性角膜炎の病態に上記 CCL20-CCR6 ケモカイン系が関与していると推測し、特に CCR6 発現細胞の病態形成における役割を明らかにすべく以下の実験を行った。まず C57BL/6/J 野生型マウス (WT マウス) および同系 *Ccr6* 遺伝子欠損マウス (*Ccr6*-KO マウス) を用い、これらのマウスに HSV-1 McKrae 株を経角膜的に感染させ、角膜炎出現頻度を評価した。同時にこれらの感染マウス角膜の病理的評価を行った。さらにこれらのマウスから角膜および三叉神経節を採取し、ウイルス感染率および各種ケモカイン発現量を測定した。併せて同組織における CCR6 を発現しうる細胞 (未熟 DC および Th17) の浸潤頻度をフローサイトメトリーにて評価した。これらの実験結果より、ヘルペス性角膜炎の症状顕在化には従来通り Th1 反応が生じ、それには Th17 反応が抑制的に作

用している可能性が示唆された。

## 方 法

### ヘルペス角膜炎動物実験モデル

すべての動物実験は近畿大学医学部動物実験委員会規定に基づいて行った<sup>11</sup>。C57BL/6/J-WT マウスは日本クレアより、同系 *Ccr6*-KO マウスは The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) より購入し、SPF 環境下に系統維持した。それぞれ生後 6-8 週の雌マウスを実験に使用した。ヘルペス性角膜炎の誘導には、宿主マウスをペントバルビタール (共立製薬, 東京) で全身麻酔し、痛覚刺激除去を確認した後に角膜上皮を 27G 針にて 5 回擦過した。その後両眼に HSV-1 (McKrae 株) 溶液を 5  $\mu$ l 滴下し、眼瞼マッサージを行った。角膜炎発現のため細隙灯顕微鏡による前眼部観察を定期的に行った。検体採取時には頸椎脱臼によりマウスを安楽死させ、角膜および三叉神経節を摘出した。

### 組織染色

組織染色による病理学的評価は以前の報告に沿って行われた<sup>12</sup>。摘出した角膜および三叉神経節は 10%ホルマリンにて固定し、パラフィン包埋した後、パラフィン用滑走式ミクロトーム (LEICA SM2000R) にて厚さ約 5  $\mu$ m の連続切片とした。これらの切片は脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin/HE) 染色に供した。ウイルス力価測定

本実験系は以前の報告に沿って行われた<sup>11</sup>。摘出した各組織はポリトロンホモジナイザー (Kinematica, Luzern, Switzerland) を用いて物理的破碎した。これら破碎検体保存液のうち 1 ml をエッペンドルフチューブに取り 5,000 rpm にて 5 分間遠心し、上清を別チューブに移しさらに 5,000 rpm で 5 分間遠心した。この上清から 200  $\mu$ l をとり、2% 仔牛血清入 MEM で 10 倍ずつ段階希釈し、Vero 細胞を単層培養した径 6 cm 円形シャーレにこれらの連続希釈液を 200  $\mu$ l ずつ接種した。1 時間吸着後、0.8%メチルセルロース 2%仔牛血清入 MEM 5 ml を重層し、37°C 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにて 2 日間培養した。5%ホルマリン溶液で 1 時間以上固定し、0.03%メチレンブルー溶液にて染色した後、各シャーレに形成されたプラーク数からウイルス力価を算出した。

### 定量的リアルタイム PCR

遺伝子発現評価系は以前の報告に沿って行われた<sup>12</sup>。採取された各組織をポリトロンホモジナイザーにて物理的破碎し、RNeasy Mini Prep Kit (Invitrogen) にて全 RNA を抽出した。それらの全

RNA から SuperScript II Reverse Transcriptase system (Life Technologies, Carlsbad, CA) を用いて相補的 DNA (complementary deoxyribonucleic acid/cDNA) を合成した。cDNA 40 ng と TaqMan プローブ (Applied Biosystems) を THUNDER-BIRD Probe qPCR Mix (TOYOBO, 大阪) に混合し, StepOne Plus リアルタイム PCR システム (Life Technologies) にて定量的リアルタイム PCR を行った。TaqMan Gene Expression Assay プローブは *Cxcl10* (Mm99999072\_g1), *Ccl17* (Mm01244826\_g1), *Ccl20* (Mm01268754\_m1), *Ccl22* (Mm00436439\_m1), *Gapdh* (Mm99999915\_g1) を用いた。全ての検体は重複して定量し, それぞれのデータ解析は  $2\Delta\Delta CT$  法によって行った。

#### フローサイトメトリー

本評価系は以前の報告に沿って行われた<sup>13,14</sup>。予備実験により角膜・三叉神経節から抽出しうる浸潤免疫細胞は極めて少ないことが分かっていたため, 摘出組織は各群よりマウス 3 匹分 (左右含め計 6 検体) をあわせて使用した。これらの検体を手術用ハサミで微細切削し, 組織懸濁液を 18G および 20G 注射針にてさらに微細に物理的破碎した。これらの組織懸濁液より 35%–70% パーコール (Sigma, St. Louis, MO) 比重分離法にて免疫細胞を抽出し, 抽出した細胞を以下のフローサイトメトリー評価系に供した。まず単離された細胞を 96 穴丸底マイクロプレートに  $1 \times 10^4$  個ずつに分け, 5% FBS 含有リン酸緩衝液 (PBS) で洗浄した。次に蛍光標識抗体を加え, 室温にて 15 分間静置した。一部の実験ではこの表面抗原標識処理後, BD Cytofix/Cytoperm キット (BD Biosciences) を用いて固定・穿孔させ, 蛍光標識抗体にて細胞内分子を染色し, 室温にて 30 分間静置した。染色された細胞は 5% FBS 含有 PBS で洗浄した後に以下の測定系に供した。各細胞の蛍光強度は Attune アコースティックフローサイトメーター (Life Technologies, Waltham, MA) を用いて測定し, 測定データは WinList ソフトウェア (Verity Software House, Topsham, ME) で解析した。蛍光標識抗体である抗マウス CD11c 抗体 (HL3), 抗マウス CD4 抗体 (VH129.19), 抗マウス IFN- $\gamma$  抗体 (XMG1.2), 抗マウス IL-4 抗体 (11B11), 抗マウス H2-Kb 抗体 (AF6-88.5), 抗マウス CCR6 抗体 (29-2L17), アイソタイプコントロールは BD Biosciences (San Jose, CA) より購入した。

#### 統計解析

統計学的有意差は, 2 グループ間比較に対しては Student t 検定, 3 グループ以上に対しては一元配置

分散分析 (one-way analysis of variance; one-way ANOVA) および Holm 後検定で判定した。生存時間解析は Log-Lank 検定で判定した。データ解析処理には R Environment (R Project) および EZR プラグインを用い<sup>15</sup>,  $P < 0.05$  で有意差ありと判定した。

## 結 果

### HSV-1 角膜炎マウスモデルの角膜炎発症率における CCR6 の影響

これまでの報告から, ヘルペス性角膜炎発症には CCR6-CCL20 ケモカイン系の関与が示唆されている<sup>6</sup>。そこで我々は *Ccr6*-KO マウスを用い, ヘルペス性角膜炎における CCR6-CCL20 ケモカイン系の役割を明らかにすべく, 以下の実験を行った。最初に C57BL/6/J-WT マウスと同系 *Ccr6*-KO マウスとで角膜炎発症率にどのような違いがあるかを検討した (図 1)。WT マウスでは各眼あたり  $1 \times 10^3$ – $1 \times 10^5$  PFU 程度のウイルス粒子投与により角膜炎発症することが既知である<sup>11</sup>。そこでこの濃度を含むさまざまなウイルス濃度を用い, 各マウス群での角膜炎発症率の違いを検討した (図 1 A)。その結果, *Ccr6*-KO マウスではウイルス投与量  $1 \times 10^2$  PFU から  $1 \times 10^6$  PFU までのすべての群において WT マウスより発症率が高かった ( $P = 0.0231$ )。また *Ccr6*-KO マウスではウイルス投与数  $1 \times 10^4$  PFU で発症率 100% に達するのに対し WT マウスでは  $1 \times 10^8$  PFU で角膜炎発症率 100% となった。またそれぞれの  $EC_{90}$  を計算すると, *Ccr6*-KO マウスでは  $5.0 \times 10^3$  PFU, WT マウスでは  $1 \times 10^7$  PFU となった。次にウイルス投与量を *Ccr6*-KO マウスの  $EC_{90}$  である  $5 \times 10^3$  PFU に固定し, 各群のマウスが発症に至るまでの時間経過を評価した (図 1 B)。その結果, *Ccr6*-KO マウスでは WT マウスと比較してより早期に発症し ( $P = 0.00901$ ), 発症までの日数中央値は *Ccr6*-KO マウスは 3 日, WT マウスは 7 日であった。さらに 40% の WT マウスでは症状顕在化しなかった。以上の結果より *Ccr6*-KO マウスは WT マウスと比較して少ないウイルス量でより高率に角膜炎を発症することが明らかになった。

### HSV-1 感染角膜の病理所見

次に各マウスの炎症角膜の病理的变化を検討した (図 2)。角膜炎発症したマウスは肉眼的に明らかな角膜混濁を示していた (図 2 A)。前述の通り, HSV-1 投与後 7 日目においては *Ccr6*-KO マウスではほぼ全例発症したのに対し, WT マウスではわずかな角膜混濁を示すか, あるいは肉眼的には判別できない程度であった。これらのマウスから角膜を摘出

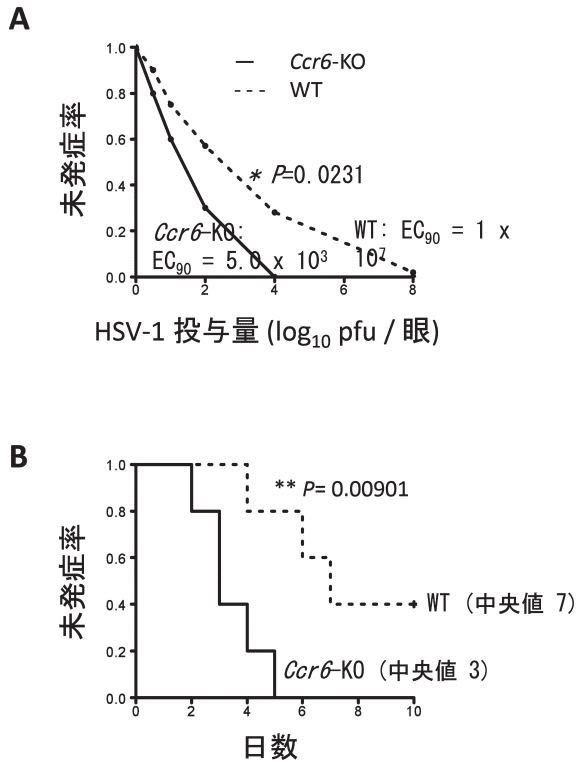


図1 HSV-1 角膜炎マウスモデルの角膜炎発症率におけるCCR6の影響

A) C57BL/6/J 野生型マウス (WT マウス) および同系 *Ccr6* 遺伝子欠損マウス (*Ccr6*-KO マウス) に HSV-1 McKrae 株を表記のウイルス濃度で経角膜感染させ、角膜炎出現頻度を評価した。あわせ各群における  $EC_{90}$  を計算した。各群  $n=3$ 。P 値は Mann-Whitney U 検定にて算出。B) マウス各眼あたり  $5 \times 10^3$  PFU の HSV-1 を感染させ (*Ccr6*-KO マウスにおける  $EC_{90}$  に準拠)、角膜炎出現までの経時変化を評価した。P 値は Log-rank 検定にて算出。

し、HE 染色にて評価した(図 2 B)。その結果、*Ccr6*-KO マウスでは角膜上皮および実質上層に細胞浸潤をともなう組織破壊がみられ(図 2 B左上)、一方で WT マウスでは角膜上皮の軽度菲薄化が主たる所見であった(図 2 B右下)。以上の結果より、*Ccr6*-KO マウスではヘルペス性角膜炎による角膜損傷が亢進することが明らかとなった。

角膜および三叉神経節に感染した HSV-1 力価測定

以上の結果より、CCR6 発現細胞がヘルペス性角膜炎顕在化に防御的に作用している可能性が示唆された。最初に CCR6 発現細胞が HSV-1 の細胞内侵入そのものを抑制している可能性が考えられたため、角膜での HSV-1 力価を測定することとした(図 3)。またヘルペス性角膜炎では角膜そのものの感染に加え、HSV-1 が三叉神経節へ逆行性感染し、そこで潜伏感染することが知られている<sup>1</sup>。そこで以後の

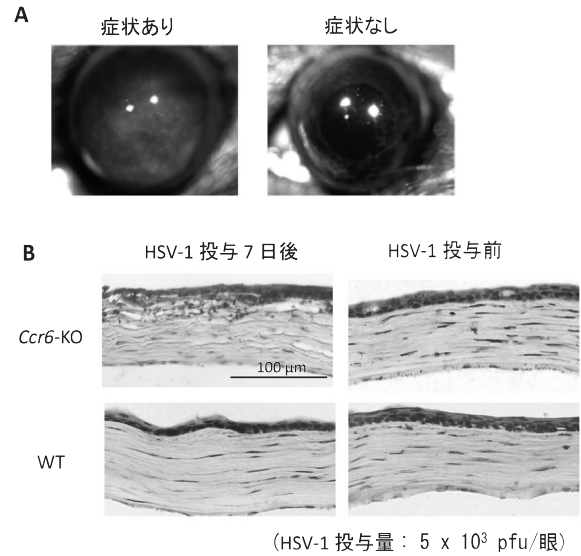


図2 角膜病理所見

A) HSV-1 感染による角膜混濁の典型的肉眼所見。B) HSV-1 感染 7 日後の角膜を採取し、HE 染色による組織学的検討を行った。

実験系では角膜に加え三叉神経節も各実験系に供した。角膜に存在する HSV-1 ウイルス力価については、*Ccr6*-KO マウス・WT マウスともに未感染の状態では HSV-1 ウイルスは検出されなかった(図 3 A)。一方、感染後角膜では *Ccr6*-KO マウス・WT マウスとも同程度に HSV-1 が検出された ( $P=0.9021$ )。次に三叉神経節内に存在する HSV-1 ウイルス力価を測定した(図 3 B)。三叉神経節においても未感染の状態では HSV-1 ウイルスは検出されなかった。また感染マウスにおいては、*Ccr6*-KO マウス・WT マウスとも HSV-1 力価に有意差はみられなかった ( $P=0.1623$ )。また三叉神経節で検出されたウイルス力価は角膜に比して低かった(図 3 A および図 3 B)。以上の結果より、CCR6 発現細胞は HSV-1 の細胞内侵入に対する抑制的作用は著明でないと考えられた。

角膜および三叉神経節における各種ケモカイン発現の評価

上記結果より、CCR6 発現細胞は HSV-1 の細胞内侵入を直接抑制するのではなく、感染後に惹起される抗ウイルス免疫反応の抑制に関与していると推測された。ヘルペス性角膜炎発症時に病変に集積する細胞内に関連細胞群がありうると推測し、免疫細胞遊走に関わる各種ケモカインの発現を各組織内で評価することとした。そこで HSV-1 感染 7 日後の角膜および三叉神経節より mRNA を抽出し、ケモカイン発現を定量的 PCR で解析した(図 4)。その結果、角膜において Th1 関連ケモカインである *Cxcl10* および Th17 関連ケモカインである *Ccl20*

の発現がWT マウスに比し有意な上昇していた ( $P=0.021$ および $P=0.037$ ; 図4 A). 一方Th2 関連ケモカインである *Ccl17* および *Ccl22* には有意

差はみられなかった. また *Ccl17* は非感染時いずれのマウスにおいてもわずかながらの発現がみられた. 三叉神経節内も角膜と同様の傾向を示し (図4 B), 特にヘルペス性角膜炎発症時の *Ccl20* 発現亢進が顕著であった ( $P=0.00013$ ). 以上の結果から, ヘルペス性角膜炎では従来のTh1 型免疫反応のみならず, Th17 型免疫反応も関与しており, 特に三叉神経節内でのTh17 型免疫反応が顕著であると考えられた.

#### 三叉神経節への免疫細胞浸潤の評価

前述のケモカイン評価系より, 角膜および三叉神経節内でTh1 およびTh17 反応が亢進していることが示された. そこで次に各組織内の関連免疫細胞の分布を評価することとした(図5). 炎症角膜からの免疫細胞抽出は困難であったが, *Ccr6*-KO マウス角膜ではWT マウスに比し細胞浸潤増加がみられた ( $P=0.0139$ ; 図5 A). しかし細胞数が極めて限られていたため, フローサイトメリー解析では有効なデータは得られなかった. 一方, 三叉神経節内の浸潤細胞数は角膜と同様に *Ccr6*-KO マウスで亢進していた ( $P=0.0069$ ; 図5 B). 続いてフローサイトメリーによる三叉神経節内浸潤細胞の解析を行ったところ(図5 C), *Ccr6*-KO マウスではWT マウスに比べ, CD4 陽性IFN- $\gamma$  産生Tリンパ球(Th1) がCxcl10 ケモカイン発現上昇と比例して増加する傾向にあった(9.73%対6.81%). 一方でCD4 陽性IL-17 産生Tリンパ球(Th17) (1.02%対6.70%) およびCCR6 陽性となることが知られる未熟DC (1.02%対3.43%) では, 集積が低下する傾向がみられた. 正常WT マウス脾細胞から誘導されるTh17 細胞はCCR6 陽性であることが知られ<sup>16</sup>, 我々

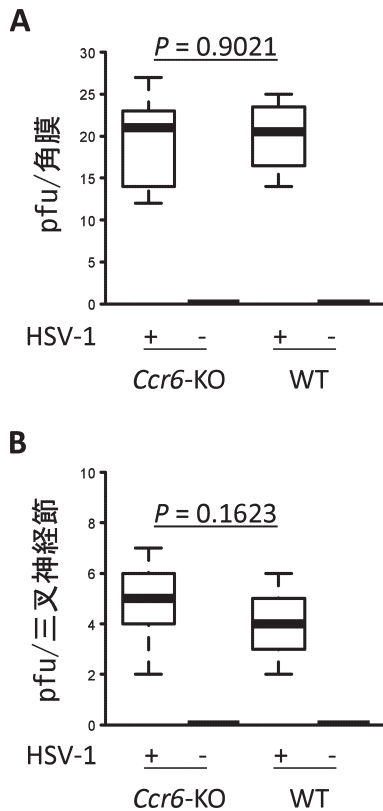


図3 角膜および三叉神経節に感染したHSV-1 力価測定  
HSV-1 感染7日後の角膜(A)および三叉神経節(B)を機械的に破砕し, Vero 細胞評価計にてHSV-1 ウイルス力価を測定した. 各群n=6. P 値はANOVA およびHolm 検定にて算出.

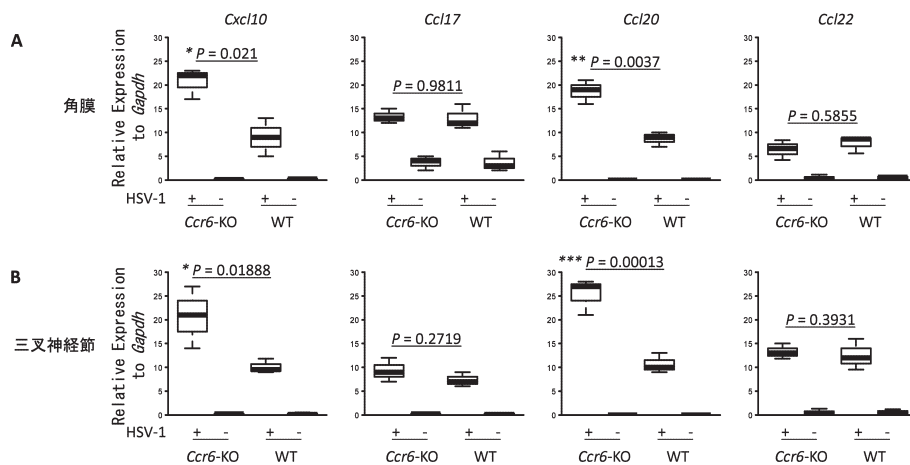


図4 角膜および三叉神経節における各種ケモカイン発現の評価  
HSV-1 感染7日後の角膜(A)および三叉神経節(B)より mRNA を抽出し, 各種ケモカインの発現を定量的PCR法で解析した. 数値は *Gapdh* に対する相対値. 各群n=3. P 値はANOVA およびHolm 検定にて算出.

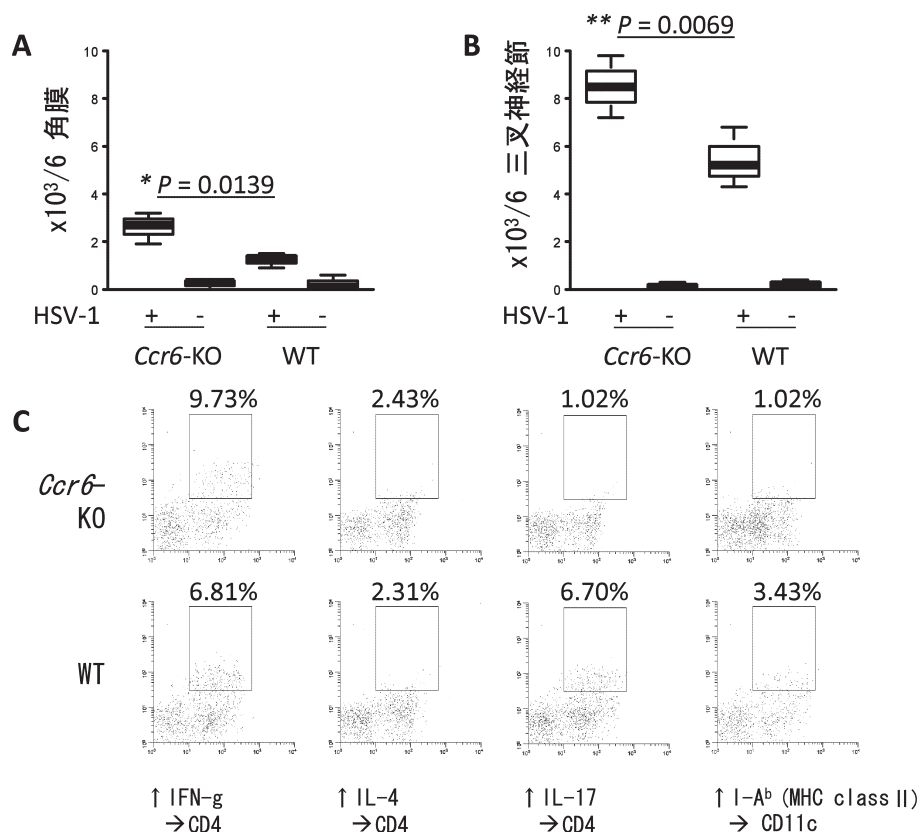


図5 角膜および三叉神経節への免疫細胞浸潤の評価  
A, B) HSV-1 感染7日後マウス各群3匹から角膜(A)および三叉神経節(B)を摘出し, 比重分離法を用いて免疫細胞を抽出した。C) フローサイトメトリーを用いて三叉神経節内に浸潤する免疫細胞を評価した。

の予備実験でも同様の結果が得られていることを考慮すると, *Ccr6*-KO マウスでは三叉神経節内でのCCR6 陽性 Th17 細胞および未熟 DC の浸潤が低下し, この現象がヘルペス性角膜炎の症状顕在化に関与しているものと考えられた。

### 考 察

角膜は上皮層・Bowman 膜・実質層・Descemet 層・内皮細胞の5層からなり, 規則正しい微細構造により透明性が保たれる臓器である。ヘルペス性角膜炎は主に上皮型と実質型に分類され, 上皮型では Th1 型免疫反応が生じることが知られる<sup>17</sup>。そして再発を繰り返すことで上皮・実質層に角膜混濁や瘢痕形成を来し透明性が低下し, 不可逆的視力障害をもたらす。近年の研究により, ヘルペス性角膜炎における CCL20-CCR6 系ケモカインの関与が示されたが<sup>6,7</sup>, その病理学的・免疫学的役割については詳細不明であった。そこで本研究では *Ccr6*-KO マウスを用い, ヘルペス性角膜炎における CCL20-CCR6 系ケモカイン発の役割について検討した。各種実験結果より, 難治性ヘルペス性角膜炎では Th1 亢進が

みられ, 同時に Th1 反応に対し抑制的に働く Th17 反応が减弱し, HSV-1 感染細胞の過剰破壊がみられるものと考えられた。

Th17 型免疫反応は主に自己免疫疾患で観察される<sup>10</sup>。Th17 細胞は当初は多発性硬化症の発症因子として発見され, その後は関節リウマチ, 乾癬などさまざまな自己免疫疾患の発症に関与していることが示されている。一方, 抗腫瘍免疫など特定の免疫反応においては Th17 が免疫抑制的に作用することも報告されている<sup>18</sup>。すなわち, 従来から言われる Th1/Th2 バランスに加え<sup>4</sup>, Th17 型免疫反応も Th1 および Th2 に対して排他的に作用しうる<sup>18</sup>。よって今回の実験結果が示すように (図1および図5), ヘルペス性角膜炎のように Th1 が主体となる免疫反応の時には Th17 は抑制的に作用していると考えられる。今後ヘルペス性角膜炎における CCR6 発現細胞の関与をより詳細に明らかにすべく, *Ccr6*-KO マウスに WT マウス由来の CCR6 発現 Th17 細胞あるいは未熟 DC を移入し, 角膜炎の発症抑制効果について検討する方針である。

*Ccr6*-KO マウスは WT マウスと比較し, HSV-1

感染による角膜損傷の程度が強かった (図 1 および図 2)。しかしながら角膜へと浸潤する免疫細胞の分布については *Ccr6*-KO マウスと WT マウス間で大きな違いはみられなかった (図 5)。これは一般にケモカインの効果が一部重複することに起因すると考えられ、特に Th17 細胞は CCR6 以外のケモカイン受容体を介して病変へと浸潤したものと考えられる。また角膜は中枢神経系・生殖系と並んで免疫学的特権部位とされている<sup>19</sup>。今回の実験結果より、角膜内では CCL17 が少量ではあるが恒常的に発現していることが明らかとなった (図 4)。CCL17 は CCL22 と並び Th2 および免疫抑制性 T リンパ球 (regulatory T lymphocytes/Treg) の遊走に関わるため<sup>20</sup>、この恒常的 CCL17 発現は Treg を介した免疫学的特権性の維持に関与していると推測された。角膜における Treg の動態および各種ケモカインの経時的変化の評価については今後の課題である。

今回の実験結果より、Th17 誘導により角膜炎発症が抑制されることが示唆された (図 1 および図 5)。よって IL-17 産生ないしは Th17 そのものを炎症部位に誘導することで、ヘルペス性角膜炎の症状顕在化を予防しようと考えられる。しかしながら現在までのところ薬剤として Th17 を誘導できる物質は明らかとなっておらず<sup>10</sup>、これは今後の課題である。さらに本実験結果より Th17 は HSV-1 潜伏感染への直接的防御機構への寄与は少ないと考えられるため (図 3)、Th17 誘導はあくまでも対症療法の一手段に留まる可能性が高い。一方で HSV-1 潜伏感染および増殖感染に関するメカニズム解明も進んでいる<sup>1</sup>。また近年ではメモリー T リンパ球を誘導することでヘルペス再発予防しようすることも示されている<sup>21</sup>。ヘルペス感染症の感染制御には未だ決定打と言えるものはなく、本分野における今後の研究課題である。

ヒトでは HSV-1 初感染時よりも再活性化時に角膜炎を発症することが多い。これは HSV-1 が潜伏感染する際には多量のウイルスを要しないためと考えられる<sup>22</sup>。また頻回の角膜炎再発により角膜移植適応となったヒトヘルペス角膜炎による最近の研究では、本研究結果と同様に Th1 および Th17 型ケモカインの発現上昇が観察された<sup>7</sup>。すなわち、再活性化型角膜炎に関しても Th1 および Th17 免疫反応の関与が示唆される。今後は免疫抑制薬<sup>23</sup> や熱ストレス<sup>24</sup> によるヘルペス再活性化マウスモデルを用い、本病態における Th1 および Th17 免疫反応の関与についても検討していく方針である。

## 謝 辞

本論文の一部は第119回日本眼科学会総会 (札幌市, 2015年4月)において発表済。本稿を終えるにあたり、ご指導・ご校閲を賜りました眼科学教室・下村嘉一教授、細菌学教室・義江修教授、同教室・藤田貢准教授に深甚な謝意を捧げます。また各種実験系をサポートして下さった眼科学教室および細菌学教室の実験技師の皆様方にも感謝申し上げます。開示すべき利益相反はありません。

## 文 献

1. Knipe DM, Cliffe A (2008) Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nat Rev Microbiol* 6: 211-221
2. Hamrah P, et al (2012) Cellular changes of the corneal epithelium and stroma in herpes simplex keratitis: an in vivo confocal microscopy study. *Ophthalmology* 119: 1791-1797
3. Liesegang TJ, Melton LJ 3rd, Daly PJ, Ilstrup DM (1989) Epidemiology of ocular herpes simplex. Incidence in Rochester, Minn, 1950 through 1982. *Arch Ophthalmol* 107: 1155-1159
4. Swain SL, McKinsty KK, Strutt TM (2012) Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol* 12: 136-148
5. Tacke PJ, de Vries IJ, Torensma R, Figdor CG (2007) Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat Rev Immunol* 7: 790-802
6. Shirane J, et al (2004) Corneal epithelial cells and stromal keratocytes efficiently produce CC chemokine-ligand 20 (CCL20) and attract cells expressing its receptor CCR6 in mouse herpetic stromal keratitis. *Curr Eye Res* 28: 297-306
7. Shimomura Y (2015) [Battle with herpes for 37 years]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 119: 145-166; discussion 167
8. Schutyser E, Struyf S, Van Damme J (2003) The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 409-426
9. Weyand CM, Goronzy JJ (2013) Immune mechanisms in medium and large-vessel vasculitis. *Nat Rev Rheumatol* 9: 731-740
10. Miossec P, Kolls JK (2012) Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov* 11: 763-776
11. Komoto S, Higaki S, Fukuda M, Shimomura Y (2015) Effects of antiviral medications on herpetic epithelial keratitis in mice. *Jpn J Ophthalmol* 59: 194-200
12. Yoshioka H, et al (2014) Inhibition of ABCG2 enhances chemo-sensitivity of murine glioma stem cell-like cells to temozolomide and reduces spheroid-forming capability. *Acta Med Kinki Univ* 39: 105-113
13. Fujita M, et al (2011) COX-2 blockade suppresses gliomagenesis by inhibiting myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 71: 2664-2674

14. Otsubo D, et al (2015) Early-phase Treatment by Low-dose 5-Fluorouracil or Primary Tumor Resection Inhibits MDSC-mediated Lung Metastasis Formation. *Anticancer Res* 35 : 4425-4431
15. Kanda Y (2013) Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 48 : 452-458
16. Sisirak V, et al (2011) CCR6/CCR10-mediated plasmacytoid dendritic cell recruitment to inflamed epithelia after instruction in lymphoid tissues. *Blood* 118 : 5130-5140
17. Rolinski J, Hus I (2014) Immunological aspects of acute and recurrent herpes simplex keratitis. *J Immunol Res* 2014 : 513560
18. Lazarevic V, Glimcher LH (2011) T-bet in disease. *Nat Immunol* 12 : 597-606
19. Streilein JW (2003) Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nat Rev Immunol* 3 : 879-889
20. Islam SA, Luster AD (2012) T cell homing to epithelial barriers in allergic disease. *Nat Med* 18 : 705-715
21. Shin H, Iwasaki A (2012) A vaccine strategy that protects against genital herpes by establishing local memory T cells. *Nature* 491 : 463-467
22. Slifer CM, Jennings SR (2015) Battling the spread: Herpes simplex virus and encephalitis. *Immunol Cell Biol* .
23. Haruta Y, Rootman DS, Xie LX, Kiritoshi A, Hill JM (1989) Recurrent HSV-1 corneal lesions in rabbits induced by cyclophosphamide and dexamethasone. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30 : 371-376
24. Sawtell NM, Thompson RL (1992) Rapid in vivo reactivation of herpes simplex virus in latently infected murine ganglionic neurons after transient hyperthermia. *J Virol* 66 : 2150-2156