

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590471
 研究課題名（和文） 単純ヘルペスウイルスのトロピズムは母子感染の生物学的予防機構
 研究課題名（英文） Natural defense of feto-maternal infection by tropism of herpes simplex virus
 研究代表者
 白木 公康（SHIRAKI KIMIYASU）
 富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・教授
 研究者番号：50135745

研究成果の概要：単純ヘルペスウイルスの母子感染例から、母子のウイルスの温度感受性と細胞トロピズムに差異を見出したので、その解析を行い、遺伝子変異を見出した。母子のそれぞれの株のクローンについても、同一の変異を認め、トロピズムと遺伝子変異の一致を認めた。このように、母子間で変異を生じていることから、母のウイルスが変異することで、感染が可能となる、すなわち、母子感染の障壁があると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：単純ヘルペスウイルス、トロピズム、遺伝子変異、温度感受性、塩基配列

1. 研究開始当初の背景

単純ヘルペスウイルス（HSV）の分離された場所による性状の違いを検討してきた結果、外陰部、子宮頸部、新生児から分離されたウイルスを、セットとして比較した場合に、Vero細胞での温度感受性と肝細胞由来株 HepG2細胞での増殖能に違いがあることを見出した。そこで、このトロピズムの差異が、母子感染の際の障壁、自然に児を感染から守る機構に相当することを考え、「トロピズムは母子感染の生物学的予防機構」に関する研究を始めた。しかし、これまで、HSVのトロピズムの存在さえ報告されておらず、その分子レベルでの解析は行われていなかった。

2. 研究の目的

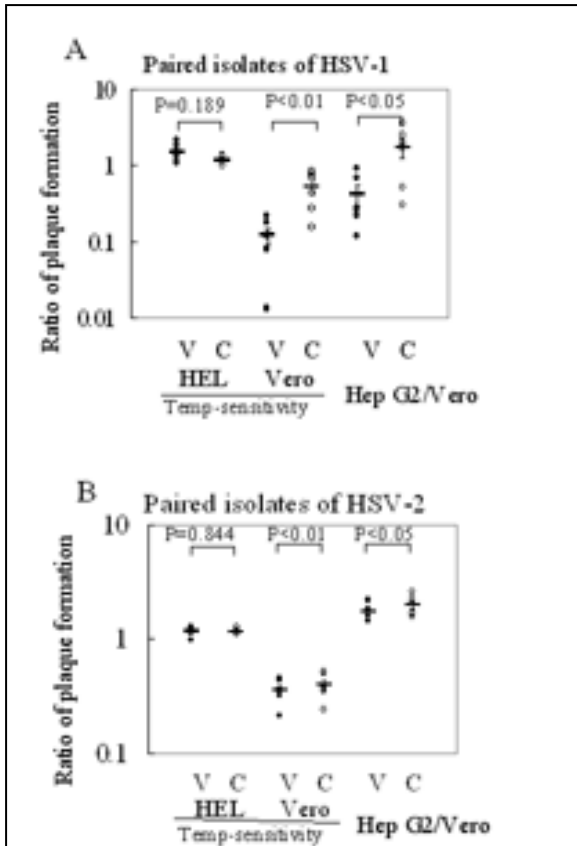
HSVのトロピズムが、母子感染を決定する因子であり、この増殖性状が、逆に母子感染を予防する手段になっている点を明らかにすることを目指した。そのため、母子で分離されたウイルス間の差異を見出すことを当面の目標とした。

3. 研究の方法

母子感染したペアのウイルスの塩基配列を決定し、比較して、トロピズムを決定する遺伝子を同定する。また、母子から得られたウイルスのクローンをを用いて、同様に塩基配列の決定と温度感受性・細胞トロピズムの相関を確認する。また、変異遺伝子を導入した細胞でのウイルスの感受性とトロピズムの確認により、トロピズム決定遺伝子を決定する。

4. 研究成果

単純ヘルペスウイルスの母子感染例から、母子のウイルスの温度感受性と細胞トロピズムに差異を見出したので、その解析を行い、遺伝子変異を見出した。母子のそれぞれの株のクローンについても同一の変異を認め、トロピズムと遺伝子変異の一致を認めた。このように母子間で変異を生じていることから、母のウイルスが変異することで感染が可能となる、すなわち、母子感染の障壁があると考えられた。

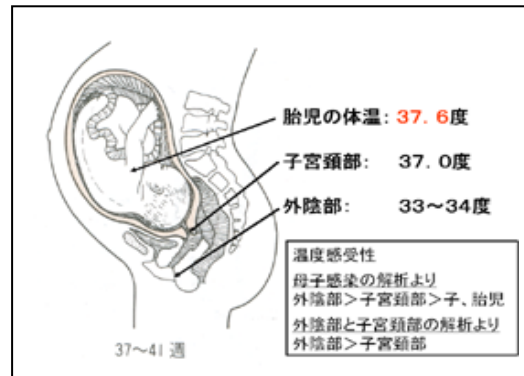


上の図は、V=vulva (外陰部)、C=cervix(子宮頸部)温度感受性は33度と39度のプラック形成(高温での増殖能低下)率で表示

これまでに母子感染し、直接比較したウイルスとしては、B型肝炎、HIVなどがある。clusterとしての同一性はあがるが、性状の比較は行われていない。これらのウイルスでは、母には多くのウイルスが存在し、直接感染したウイルスの特定は困難である。しかし、HSVのように急性感染するウイルスでは、それぞれからのウイルス分離により、このような比較は今回の研究が世界的にも初めてである。

また、トロピズムを決定する細胞側の因子として、麻疹のCD150とCD46、HIVのCD4、コレセプターCCR5とCXCR4、インフルエンザ

やパラミクソウイルスのプロテアーゼ感受性などが知られているが、全く新しいトロピズムの形式である。また、Vero細胞での温度感受性は、外陰部、子宮頸部、児のウイルスの順であった。すなわち、高温での増殖の良さからすると、児のウイルス、子宮頸部、外陰部の順になる。このことは、下図のような母体の体温と胎児の体温から、高温順から胎児、子宮頸部、外陰部となり、分離されたウイルスの増殖能の温度に関する性状と一致している。



温度感受性からも、細胞因子によるウイルスの棲み分けと関連づけることができる初めての報告となるとして始めた。しかし、HSV-2のゲノムは、GCが約80%と塩基配列の決定に困難さがあった。さらに、90%を終えた時点で、変異が同定できず、平行して、母子のウイルスのクローンを用いて比較を開始した。クローンを用いることによって、これまでの母子のウイルスを用いたことで見いだせなかった変異を見つけることができた。

HSV-2は、GC比が80%以上の部分が多く、塩基配列が非常に困難であるとされていたので、困難を極めたが、何とか時間をかけて条件を検討しながら進めた。

当初、母子から分離されたウイルスで、塩基配列に差異があると考え、直接、両株間の塩基配列の比較を行ったが、90%終了した時点で見いだせなかった。そこで、児のウイルスは、2種のウイルスの混在が考えられたため、これらをクローン化し、混在のないウイルスとして塩基配列の決定を並行して進めた。その結果、母子間のウイルスの塩基配列に差異を認めた。そして、母子のウイルスのクローンについて同様に変異を確認し、母子のウイルスでの差異を確認した。この差異は、Vero細胞での温度感受性、HepG2細胞のトロピズムとも一致していた。

2組目の母子感染例から、同一の遺伝子変異を見出した。母子のそれぞれの株のクロー

ンについても同一の変異を認め、トロピズムと遺伝子変異の一致を認めた。

以上のように、2年をかけ、やっと2例の母子感染例の母子間に共通する遺伝子変異を見つけた。今後、その解析を開始する予定である。

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8件)

1. Akahori Y., Suzuki K., Daikoku T., Iwai M., Yoshida Y., Asano Y., Kurosawa Y., and Shiraki K. : Characterization of neutralizing epitopes of varicella-zoster virus glycoprotein H. *Journal of Virology*, 83 : 2020-2024, 2009, 査読有.
2. Oshima K., Kanda Y., Kako S., Asano-Mori Y., Watanabe T., Motokura T., Chiba S., Shiraki K., and Kurokawa M. : Case report : persistent cytomegalovirus (CMV) infection after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation using in vivo alemtuzumab: emergence of resistant CMV due to mutations in the UL97 and UL54 genes. *Journal of Medical Virology*, 80 : 1769-1775, 2008, 査読有.
3. Chuanasa T., Phromjai J., Lipipun V., Likhitwitayawuid K., Suzuki M., Pramyothin P., Hattori M., and Shiraki K. : Anti-herpes simplex virus (HSV-1) activity of oxyresveratrol derived from Thai medicinal plant : mechanism of action and therapeutic efficacy on cutaneous HSV-1 infection in mice. *Antiviral Research*, 80 : 62-70, 2008, 査読有.
4. Sasaki A., Nakashima Y., Takasaki I., Andoh T., Shiraki K., and Kuraishi Y. : Morphine inhibits herpetic allodynia through mu-opioid receptors induced in Abeta-fiber neurons. *Neuroreport*, 19 : 975-979, 2008, 査読有.
5. Sasaki A., Serizawa K., Andoh T., Shiraki K., Takahata H., and Kuraishi Y. : Pharmacological differences between static and dynamic allodynia in mice with herpetic or postherpetic pain. *Journal of Pharmacological Sciences*, 108 : 266-273, 2008, 査読有.
6. Phromjai J., Aiba N., Suzuki M., Sato H., Takahara T., Kondo S., and

Shiraki K. : Infection and direct injury in human hepatocyte explants and a hepato-blastoma cell line due to hepatiticomimetic (Non-hepatitis) viruses. *Journal of Medical Virology*, 79 : 413-425, 2007, 査読有.

7. Shimada Y., Suzuki M., Shirasaki F., Saito E., Sogo K., Hasegawa M., Takehara K., Phromjai J., Chuhjo T., and Shiraki K. : Genital herpes due to acyclovir-sensitive herpes simplex virus caused secondary and recurrent herpetic whitlows due to thymidine kinase-deficient/temperature-sensitive virus. *Journal of Medical Virology*, 2007, 査読有.
8. Suzuki K., Akahori Y., Asano Y., Kurosawa Y., and Shiraki K. : Isolation of therapeutic human monoclonal antibodies for varicella-zoster virus and the effect of light chains on the neutralizing activity. *Journal of Medical Virology*, 79 : 852-862, 2007, 査読有.

[学会発表] (計13件)

1. Shiraki K., Hama Y., Yoshida Y., and Daikoku T. : Immune response to varicella-zoster virus may cause neurological complications. 9th annual VZV Satellite Workshop, 2008年7月27日, Estoril, Portugal.
2. Shiraki K., Hama Y., Yoshida Y., and Daikoku T. : Immune response to varicella-zoster virus may cause neurological complication. The 33rd International Herpesvirus Workshop, 2008年7月27日-8月1日, Estoril, Portugal.
3. Daikoku T., Horiba K., Kawana T., and Shiraki K. : Twenty-one amino acids deletion in glycoprotein G of herpes simplex virus type 2 clinical isolates. The 33rd International Herpesvirus Workshop 2008年7月27日-8月1日, Estoril, Portugal.
4. 白木公康 : 性器ヘルペス再発抑制療法について. 第49回日本臨床ウイルス学会, 2008年6月13日-15日, 犬山, 愛知.
5. 大黒 徹, 川名 尚, 白木公康 : HSV-2臨床分離株のglycoprotein Gにおける21アミノ酸欠失, 第49回日本臨床ウイルス学会, 2008年6月13日-15日, 犬山, 愛知.

6. 白木公康：新規抗ヘルペスウイルス薬
ファムシクロビルの基礎と臨床－基
礎－. 第59回日本皮膚科学会中部支部
学術大会, 2008年10月12日-13日, 名古
屋.
7. Shiraki K., Horiba K., Daikoku T.,
and Kawana T. : Clinical relevance
of 21 amino acids deletion in
glycoprotein G of herpes simplex
virus II. 32nd Annual International
Herpesvirus Workshop, 2007年7月6日-14
日, Asheville, USA.
8. Shiraki K., Hama Y., Yoshida Y.,
and Daikoku T. : Immune response to
varicella-zoster virus may cause
neurological complication. 13th
International Conference on
Immunobiology and Prophylaxis of
Human Herpesvirus Infections, 2007
年11月3日-9日, Orvieto, Italy.
9. 熊谷卓司, 吉川哲史, 山田雅夫,
井平 勝, 白木公康, 浅野喜造 : 麻疹
罹患経過中におけるHHV-6特異的細胞性
免疫の動態. 第48回日本臨床ウイルス
学会, 2007年6月2日-3日, 富山.
10. 浜 結香, 吉田与志博, 大黒 徹,
本田まりこ, 白木公康 : 水痘帯状疱疹
ウイルス (VZV) の前初期蛋白とIE62と神
経因子との関連. について. 第48回日本
臨床ウイルス学会, 2007年6月2日-3日,
富山.
11. 白木公康 : ミゾリピンの抗サイトメガ
ロウイルス効果. 第19回ミゾリピン移
植検討会, 2007年10月13日, 大阪.
12. 大黒 徹, 白木公康 : 肺炎患者より分
離されたヒトライノウイルスの遺伝子
解析. 第55回日本ウイルス学会学術集
会, 2007年10月21日-23日, 札幌.
13. 赤堀 泰, 鈴木和弘, 浅野喜造, 吉田
与志博, 大黒 徹, 鈴木美輝子, 白木
公康 : 水痘ウイルスgH糖タンパク抗原
に対する中和抗体のエピトープ解析.
第55回日本ウイルス学会学術集会, 200
7年10月21日-23日, 札幌.

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

〔その他〕 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白木 公康 (SHIRAKI KIMIYASU)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・
教授
研究者番号 : 50135745

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし