

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：32669

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22780

研究課題名（和文）単純ヘルペスウイルス感染症の回帰発症予防法の開発

研究課題名（英文）Development of recurrence prevention method for herpes simplex virus infection

研究代表者

高野 貴士（Takano, Takashi）

日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師

研究者番号：20462781

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：単純ヘルペスウイルス（HSV）は、回帰発症した際に種々の疾患を引き起こすが、抗ヘルペスウイルス薬では回帰発症を予防出来ない。本研究では、回帰発症を誘発すると考えられる宿主因子がHSVのLAT遺伝子に直接相互作用し、LAT発現量を減少させるという知見の基、相互作用阻止による回帰発症予防法の基盤確立を目的とした。LAT遺伝子のdeletion mutantによる宿主因子との結合部位を同定した。その後、宿主因子との結合能を消失させたdecoy LATを構築した。decoy LATは宿主因子共存下でも安定的なLAT発現を示し、再活性化阻害効果が示唆された。これより、回帰発症予防の可能性が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまでの発想とは異なる方法で、今まで困難であった単純ヘルペスウイルス感染症を予防出来る可能性を示した。従来、感染症対策は病原体を消滅させる事を目的としていたが、本研究ではウイルスを潜伏させる事で予防を可能にする。さらに、ウイルス因子を標的にしているため、耐性ウイルスの出現も回避できる可能性がある。また、全世界に感染者が多数いる事から、本研究による発症予防で得られる感染者の心理的・身体的負担の軽減効果、治療に使われる経済的負担の軽減効果は非常に大きいと想定出来る。

研究成果の概要（英文）：Herpes simplex virus (HSV) causes various diseases when its recurrence, but anti-herpes virus drugs cannot prevent a recurrence. We have found a host factor that directly binds to the LAT gene in the HSV genome and decreases LAT expression. This study aims to establish a method to prevent recurrence by inhibiting the direct binding of this host factor. First, we identified the binding sites of the host factor and the LAT gene by deletion mutants of the LAT gene. Next, we investigated the decoy LAT gene expression level change under the host factor expression. The decoy LAT expression that lost the ability to bind to host factors suggested a reactivation inhibitory effect because the stable expressed the LAT gene. These results demonstrated the possibility of preventing recurrence.

研究分野：ウイルス学

キーワード：単純ヘルペスウイルス 回帰発症 宿主因子

1. 研究開始当初の背景

単純ヘルペスウイルス (HSV) は、人に脳炎、口唇ヘルペス、性器ヘルペス、皮膚疾患、眼疾患、全身性の新生児ヘルペスウイルスなど種々の疾患を引き起こす。世界保健機構の推計によれば、50 歳以下の人口の 67% (約 37 億人) が HSV-1 型に、15~49 歳の 11% (約 4.2 億人) が HSV-2 型に感染しており、世界人口の半数以上がキャリアとなっている感染症は他に例が無い。一般的に、多くの人々が認識している HSV 感染症の症状は、初感染後、潜伏感染していた HSV が再活性化して回帰発症した際に認められるものである。HSV 初感染時は感染局所である粘膜上皮細胞で HSV が増殖するものの、病態を引き起こす事は稀である。そして、感染者に病態を示さないまま感染局所で増殖した HSV は末梢神経を經由して三叉神経節または仙髄神経節に移動し、ウイルスタンパク質の発現を止め、Latency Associated Transcript (LAT) と呼ばれる転写物だけを発現する「潜伏感染」状態となり不顕性感染化する。しかし、紫外線照射、感冒、月経、免疫抑制ならびにストレス等の多様な因子によって潜伏感染が破綻すると、LAT の発現が消失し、ウイルスタンパク質及び感染性ウイルス粒子の合成を再開する「再活性化」状態となる。通常は 1 週間程度で症状が消失して、再度潜伏感染状態に戻る。以上の様に、HSV 感染症は潜伏感染と再活性化による回帰発症を生涯にわたり繰り返し引き起こす。

ガンシクロビルやアシクロビルなど現行の抗ヘルペスウイルス薬はウイルス複製を阻害する為、再活性化による回帰発症中の HSV に対して著効を示して治癒を促進するが、複製していない潜伏感染状態の HSV を排除できず、HSV の再活性化を予防する手段が無い。HSV 感染症の病態は再活性化に起因する事から、再活性化を予防出来れば HSV 感染症の発症予防が期待出来る。しかし、未だ再活性化機序の全容が明らかになっていないため、実現できずにいる。近年、LAT から派生する microRNA (miR-H2、miR-H6) が HSV 複製の起点となるウイルス遺伝子 ICP4 の発現を負に制御している事が報告 (Umbach J., Nature, 2008; Barrozo E., J. Virol., 2020) され、再活性化予防法の開発に向け、新たな展開が期待出来る状況となった。

2. 研究の目的

申請者らは、宿主因子が HSV ゲノム (LAT 遺伝子領域) に直接相互作用し、潜伏感染時に唯一合成される LAT の発現量を減少させることによって「再活性化の引き金」となる可能性を見出した。そこで、既存の薬剤では不可能であった再活性化阻害による回帰発症予防法の基盤確立を目的とした。神経細胞内での LAT 発現による潜伏感染状態の維持が再活性化抑制に重要であるとの発想の基、本研究では (1) LAT と宿主因子の結合部位を同定し、(2) 見出した宿主因子との結合部位に変異を導入した decoy LAT 発現プラスミドを作製後、(3) decoy LAT 発現により再活性化を抑制できるか否かを培養細胞レベルで LAT 発現量や HSV 複製に関わる microRNA 発現量をリアルタイム PCR で検証して再活性化誘導への影響を解析する。

3. 研究の方法

・プラスミド構築

宿主因子は、ヒト胎児腎臓由来細胞である HEK293 細胞から全 RNA を抽出後、cDNA 合成を経て目的宿主因子をクローニングした。単純ヘルペスウイルス (HSV) の LAT 発現プラスミドは、全長 HSV-1 DNA を組み込んだ BAC クローンから HSV-1 DNA を抽出後、全長 LAT をクローニングした。その後、全長 LAT 発現プラスミドを元に、LAT 遺伝子の長さが異なる LAT 発現プラスミドを

複数構築した。

- ・トランスフェクション

構築した宿主因子および LAT 発現プラスミドは、TransIT-LT1(Mirus 社)の添付書に従い HEK293 細胞に導入した。プラスミド導入後 72 時間で細胞を回収し、サンプルとした。

- ・LAT、microRNA 発現量の定量

LAT 発現量の定量は、発現プラスミドを上記の方法でトランスフェクションしたサンプルから ISOGEN 2 (ニッポンジーン社)で全 RNA を抽出後、LAT 特異的プライマーを用いて逆転写酵素で合成した cDNA を用いた。各サンプルに対し、LAT 特異的プライマーならびに LAT 特異的 Taqman プローブを用いてリアルタイム PCR を実施し、絶対定量でコピー数を算出した。microRNA 発現量の定量は、抽出した全 RNA から各 microRNA に対するプライマーで逆転写して cDNA 合成後、リアルタイム PCR で microRNA 発現量を相対定量で比較解析した。

4 . 研究成果

(1) 宿主因子の LAT 結合部位の同定

LAT 遺伝子中に存在する宿主因子結合配列を決定する為に、LAT 遺伝子を 5 領域に分割し、長さの異なる LAT 遺伝子発現プラスミドを複数構築した。それらの LAT 発現プラスミドと宿主因子発現プラスミドを共発現させた時の LAT 発現量をリアルタイム PCR で定量した。LAT 発現量の減少を指標に宿主因子結合配列の絞り込みを行い、宿主因子共発現時でも LAT 発現量の減少が認められない LAT 遺伝子領域を見出した。本結果を基に、LAT 遺伝子中の宿主因子結合配列の同定を行う為に、宿主因子結合配列を持たない LAT 遺伝子領域から少しずつ LAT 遺伝子を伸ばし、宿主因子共発現下で LAT 発現量が減少する LAT 遺伝子領域、すなわち宿主因子結合配列を見出した。さらに、宿主因子結合配列を確定するために、結合配列に変異を挿入した LAT(decoy LAT) 発現プラスミドを構築して、宿主因子共発現下での LAT 発現量を検討した結果、decoy LAT 発現プラスミドでは LAT 発現量に変動が見られなかった事から、LAT 発現に影響を及ぼす宿主因子の結合配列として同定した。

(2) decoy LAT 発現による再活性化抑制作用効果の検証

同定した宿主因子の結合配列に変異を挿入した decoy LAT が再活性化を抑制するか検証するために、HSV 複製の起点となるウイルス遺伝子 ICP4 の発現を負に制御している microRNA 発現量を解析した。始めに、宿主因子との結合配列を有する野生型 LAT 発現プラスミドを用いて、宿主因子共発現時における microRNA (miR-H2、miR-H6) の発現量を検討した。野生型 LAT では、宿主因子の結合による LAT 発現量の減少に伴い、それぞれの microRNA 発現量も減少した。これらの microRNA は、ICP4 遺伝子の発現を負に制御する事から、本結果は ICP4 遺伝子の発現量増加に繋がる事が示唆され、宿主因子の結合により再活性化が誘導されると考えられた。

次に、宿主因子との結合配列を欠失させた decoy LAT 発現時における宿主因子共発現下での microRNA (miR-H2、miR-H6) 発現量を検討した。decoy LAT 発現時では、それぞれの microRNA 発現量について減少は認められなかった。したがって、decoy LAT の発現は、microRNA の発現量を維持させる事が明らかになり、宿主因子共発現時であっても ICP4 遺伝子発現を抑制する可能性が示唆された。

以上、本研究より decoy LAT は宿主因子共発現時においても LAT および microRNA を安定的に発現する事が明らかとなった。また、microRNA の安定発現により、HSV 複製の起点遺伝子である ICP4 遺伝子の発現阻害効果が期待出来る。したがって、本研究で考案した decoy LAT は、HSV 複

製の阻害効果を有す事が想定され、現行の抗ヘルペスウイルス薬では不可能であった HSV の再活性化ならびに回帰発症の予防効果が期待出来ると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	安井 文彦 (Fumihiko Yasui) (40399473)	公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・プロジェクトリーダー (82609)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関