

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05967

研究課題名（和文）Bウイルス遺伝子搭載組換えHSVによるBウイルス解析ツール構築と神経病原性解析

研究課題名（英文）Construction of the system to analyze vaccine and drug efficacy using recombinant HSV carrying B virus genes, and analysis of neuropathogenicity

研究代表者

山田 壮一（Yamada, Souichi）

国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官

研究者番号：10514119

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：Bウイルス(BV)のTK遺伝子を保持した組換えHSV-1/BVTKを用いて、薬剤存在下(アシクロピル、ACV)での継代により、薬剤に対する感受性が低下した数十のクローンを獲得した。薬剤耐性に関わるTK遺伝子及びDNApoly遺伝子をシーケンスしたところ、ACV耐性HSV-1/BVTKクローンは全てのクローンでTK遺伝子には全く変異が検出されず、DNApoly遺伝子にのみ耐性変異が検出された。このことから、BVは、ACV投与において、TK変異による耐性を獲得しにくいことが示唆された。また、BVTK搭載組換えHSV-1を用いることにより薬剤感受性試験をBSL2で行える系が構築された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Bウイルスは、ヒトに感染すると致死的な神経症状を引き起こすことがある。これまで稀な感染症と認識されていたが、近年、日本や中国でBウイルス症例が相次いで報告された。BウイルスはBSL4施設での取り扱いが必要なため、その研究は進んでいない。今回、薬剤に対する感受性評価をBSL2レベルで行える系を構築し、更にアシクロピルに対するBVの薬剤耐性機序の解析を行った。本研究結果は、ヒトに重篤な神経症状を引き起こすBウイルスに対する抗ウイルス薬の開発を容易にし、Bウイルス病治療に貢献できる。

研究成果の概要（英文）： We constructed recombinant HSV-1/BVTK carrying the TK gene of B virus. In the presence of drugs (ACV), we isolated in dozens of clones that were less-susceptibility to ACV. We sequenced the TK gene and DNApoly gene involved in drug resistance in an attempt to identify the site of mutation of the genes involved in drug resistance in the genomes of these clones, and found that no mutation was detected in the BVTK gene in all of the ACV-resistant HSV-1/BVTK clones, and only the DNApoly gene. This suggests that BV is unlikely to acquire resistance to ACV administration due to TK mutations. In addition, a system that allows drug susceptibility test with BSL2 was established by using BVTK-recombinant HSV-1.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ヘルペスウイルス Bウイルス 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

B ウイルス (Macacine alphaherpesvirus 1) は、主にアジアに生息するマカク属サル (アカゲザル、カニクイザル、ニホンザル等) を宿主とするヘルペスウイルスである。B ウイルスはヒト単純ヘルペスウイルス (HSV) と密接に関連しており、宿主のマカクザルにおける B ウイルス感染は、ヒトにおける HSV 感染と非常によく似ており、ほとんどが不顕性感染である。一方で、ヒトに感染すると致死的な神経症状を引き起こし、適切な治療が施されない場合、致死率は 70 ~ 80% にもなる (Hilliard J. Human herpesviruses 2007)。アシクロビルによる治療が導入されたのちは、致死率は 50% ぐらいとなっているが、回復しても神経学的後遺症が残ることがほとんどである。感染は、主にサルを用いた研究の従事者に起こり、咬傷や針刺し事故等により感染する。また、潜伏感染によるものと考えられる事例も報告されている (Calvo CM et al. iOVS 2011)。世界中でこれまでに約 50 例近くが確認されている (報告されているのは 26 例) が、すべて北米における報告である。しかしながら、2019 年、鹿児島県のサルを取扱う施設の従業員において、2 例の B ウイルス病を疑う事例が報告された。申請者が所属する国立感染症研究所ウイルス第一部において B ウイルスの検査 (PCR 及びシーケンス) を行ったところ、2 例共に B ウイルス陽性が確認された。本症例は、日本国内においてまた北米以外で初めての B ウイルス病発生であった。

B ウイルス病は、1998 年までに頻繁にその発生が認められていたが、サルの取扱いや PPE の改良等もあり、それ以降は日本症例が確認されるまでその発生は報告されていなかった。しかしながら、これまで B ウイルス病発生の報告はないが、野生のマカクザルは、高い確率で B ウイルスを保持しており、また研究・試験に用いるマカクザルにおいても B ウイルスに対する抗体を保有するサルが確認される。そして、サルの咬傷事故等は絶えず、実際にある病院施設での数年間の調査 (Barkati S et al. EID 2019) においては、サルによる傷害 (n = 251) のうち、40.6% が高リスク (予防を推奨) 44.2% が中リスク (予防を検討) 15.1% が低リスク (予防を推奨) に分類され、低リスクの傷害の 10% と高リスクの傷害の 98% が予防 (acyclovir の投与等) を受けており、その潜在的脅威は存在したままである。実際、日本における症例では、発症から 1 年以上経って、B ウイルス病との診断に至った経緯から考えると、B ウイルス病に罹患していながら正確に診断されていない患者がいる可能性が高い。従って、その脅威と発症後の致死率の高さ、神経学的後遺症を考えると、B ウイルス病の病態解析、治療、予防、診断法開発は急務である。

B ウイルスは、ヒトにおける HSV-1 や HSV-2 に近縁なウイルスであり、そのゲノム構造や遺伝子は高い相同性を示す。一方で、ヒトまた稀に宿主であるマカクザルに強い神経病原性を示すにも関わらず、HSV-1 や HSV-2 が保持している神経病原性遺伝子 RL1 (34.5) および ORFP 遺伝子をゲノムに保持していない。また、HSV には無い 16 種類の miRNA と 4 種類の moRNA がコードされていることが報告されており (Melanie A et al. JV 2011)、病原性等に関与している可能性が示唆されている。そのため、HSV-1 や HSV-2 による神経病原性発現機序とはその機構が異なると考えられる。しかしながら、B ウイルスに対する実験的または分子的研究はほとんど行われておらず、ヒトに対する B ウイルスの強い神経毒性の要因は不明である。

B ウイルスを研究する上で、一番の問題点は、BSL4 でしかウイルスを扱えない (少量培養 (ウイルス分離等) は BSL3) という点である。そのため、ある遺伝子の機能を解析するために組換えウイルスを作製することや、薬の効果を見るための感受性試験やワクチン開発におけるチャレンジ実験を行うには、BSL4 施設を利用しなければならず、その研究のハードルは高く、日本においてはもちろん世界的にもその研究は進んでいない。

2. 研究の目的

本研究では、BSL4 のウイルスである B ウイルスの遺伝子を、HSV-1 及び HSV-2 に組換えることにより、BSL2 での解析を可能にする。この組換え体を用いて、B ウイルス病の治療 (薬剤開発) 及び予防 (ワクチン開発) に関わる薬剤感受性試験やチャレンジ試験の系の確立を図る。また、これまでほとんど明らかにされてこなかった B ウイルスのヒトにおける神経病原性の機序を明らかにするものである。

3. 研究の方法

本研究では、B ウイルス遺伝子を HSV に組み込んだ組換え HSV を作製し、その有用性 (in vitro 及び in vivo での増殖性、蛋白質発現、病原性及び免疫誘導能) を確認する。その後、薬剤感受性試験 (TK 及び DNApoly 遺伝子の組換え) 及びチャレンジ試験 (膜糖蛋白質遺伝子 (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM, gN) の組換え) の系を構築する。それを用いて薬剤耐性変異の解析及び B ウイルスワクチンの効果を解析する。更に、B ウイルスの神経病原性機序 (膜糖蛋白質遺伝子の組換え、miRNA 及び moRNA の影響) を iPS 由来ヒト感覚神経細胞及びマウスを用いた解析により明らかにする。

4. 研究成果

B ウイルスの gH 及び TK 遺伝子を搭載した組換え HSV-1/BVgH 及び TK を構築した。また、B ウイルスワクチンとして、LC16m8 をベクターとした BVgL、gI、gB、gD タンパク質発現ワクチンシニア ウイルスを構築した。組換え HSV-1/BVTK は、野生株と同等の増殖能を示し、薬剤感受性試験では、HSV-1 よりも ACV 及び GCV への感受性が低かった。また搭載された BVTK の発現が確認された。薬剤存在下 (ACV 及び GCV) での継代により、元株 (HSV-1/BVTK) と比較して薬剤に対する感受性が低下した (耐性を示した) 数十のクローンを獲得した。これらのクローンのゲノム上における薬剤耐性に関わる遺伝子変異部位の同定を試み、薬剤耐性に関わる TK 遺伝子及び DNApoly 遺伝子をシーケンスしたところ、ACV 耐性 HSV-1/BVTK クローンは全てのクローンで TK 遺伝子には全く変異が検出されず、DNApoly 遺伝子にのみ耐性変異が検出された。一方で、GCV 耐性 HSV-1/BVTK クローンは全て、TK 遺伝子にも DNApoly 遺伝子にも変異が検出されなかった。このことから、BV は、ACV 及び GCV 投与において、TK 変異による耐性を獲得しにくいことが示唆された。また、BVTK 搭載組換え HSV-1 を用いることにより薬剤感受性試験を BSL2 で行える系が構築された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nguyen Phu Hoang Anh, Fukushi Shuetsu, Yamada Souichi, Harada Shizuko, Yoshikawa Tomoki, Kinoshita Hitomi, Kawahara Madoka, Ogawa Takuma, Ebihara Hideki, Moi Meng Ling, Saijo Masayuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Analysis of antiviral drug properties of thymidine kinase of herpes B virus using recombinant herpes simplex virus 1	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.03091-23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Phu Hoang Anh Nguyen, Shuetsu Fukushi, Souichi Yamada, Shizuko Harada, Tomoki Yoshikawa, Hitomi Kinoshita, Madoka Kawahara, Takuma Ogawa, Hideki Ebihara Meng Ling Moi, Masayuki Saijo
2. 発表標題 Analysis of antiviral drug properties of thymidine kinase of herpes B virus by using recombinant herpes simplex virus 1
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------