

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591104

研究課題名（和文） 単純ヘルペスウイルスの母子感染におけるトロピズムを決定する遺伝子の解析

研究課題名（英文） Tropism determined by gene product of Herpes Simplex Virus is a natural barrier in mother-to-infant transmission

研究代表者

大黒 徹（DAIKOKU TOHRU）

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・准教授

研究者番号：80291409

研究成果の概要（和文）：単純ヘルペスウイルス（HSV）の母子感染例から分離されたウイルスは母の外陰部、子宮頸部、子の順に有意に温度感受性で、温度感受性が選択的な感染に関わることが示唆された。ヒト肝癌由来（HepG2）細胞で頸部由来の HSV の増殖性がよく、37℃培養下における HepG2 と Vero 細胞でのブラック形成の割合を HepG2/Vero として表現し比較検討を行ったところ、温度感受性と相関関係が認められた。

母子を含め同一症例から分離したウイルスを比較検討したところ、分離されたペア間での制限酵素断片と温度感受性の差異が認められ、分離部位によりウイルスの遺伝子型が異なることが示唆された。そこで HSV の遺伝子の同定を目標に遺伝子配列の解析を進めた結果、HSV のある遺伝子に変異が生じ、アミノ酸変異があることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Mother-to-infant transmission of herpes simplex virus (HSV) is rare but has serious consequences. In two cases of paired HSV isolates from mother and infant, infantile isolates showed significantly better HepG2 hepatoblastoma cell-tropism and temperature adaptation in Vero cells than maternal isolates, and they had a mutation in common, which might have altered the characters of the infantile virus compared to the maternal virus. Generation of a mutation in the HSV infecting infants conferred altered cell tropisms, indicating that tropism acquisition by generation of the mutation for infecting viruses is a natural barrier to protect infants from mother-to-infant transmission of HSV.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
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：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：感染症防御学・母子感染・単純ヘルペスウイルス

1. 研究開始当初の背景

母子感染 2 例の母と児のウイルスを比較すると、母子のウイルスは、ミドリザル腎由来 Vero 細胞では増殖に差はないが、肝癌由来 HepG2 細胞では 8～12 倍異なり、母由来のウイルスは児での増殖能が低いことを明らかにした。この貴重な 2 例の母子間の HSV のトロピズムの差は、生物学的に重要な母子感染を回避する機構で、母子感染の自然界で形成された児を守るための障壁、すなわち、HSV のトロピズムがこの母子感染の回避する可能性が示唆された。さらに、本研究では同一患者の外陰部、子宮頸部からペアで採取した HSV-1 株 6 組と HSV-2 株 6 組についても 5 年間の検討の結果、HSV は分離部位に依存したトロピズムを有し (Vero 細胞の温度感受性と HepG2 細胞の感受性)、分離部位特異的性状が確認できた。

HSV が感染する際には、特定部位のウイルスが感染して、感染した体内で増殖する間に、感染増殖する各部位特異的(トロピズムを有する)なウイルスが選択されると考えられた。したがって、母子感染においては、外陰部で特異的に選択されたウイルスは、児体内での増殖能に劣るため、母のウイルスは、児への感染・増殖能に乏しいと考えられた。そこで、本研究では母子で得られたトロピズムの異なる母子のウイルス株間の Vero 細胞での温度感受性と HepG2 細胞の増殖能・トロピズムを決定する遺伝子を同定し、その遺伝子変異を特定することを目的としている。

2. 研究の目的

母子感染するウイルス感染症のなかで、風疹、B 型肝炎に関しては、わが国では母子感染予防対策が実施されている。単純ヘルペスウイルス (HSV) による母子感染は、わが国では 14000 から 20000 件の出生に 1 件の頻度で生ずるとされ、アシクロビルによる治療が行われるまでは悲惨な状況であった。海外の 4 万人規模の研究から、出産時に外陰部からウイルスが分離された場合の 5% にのみ母子感染が発生したという低い感染率が報告され、ウイルスの存在にも関わらずなぜか母子感染が起りにくいとされている。しかしながら、世界的にも HSV の母子感染例で母子のウイルスをペアで分離して解析を行ったという報告はない。本申請研究では HSV の母子感染に焦点を当て、HSV の母子感染のメカニズムに関連する因子を明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

外陰部と子宮頸部に病変がある患者 6 人から同時にペアで採取したウイルスを用いて、これらのウイルスの性状について解析した。

ウイルスの疫学的な背景を探るために分離ウイルス DNA の制限酵素断片を用いて、各ウイルスの遺伝学的な相同性を比較した。外陰部型と子宮頸部型では、Vero 細胞での増殖性で温度感受性に差が認められるので、種々の細胞での増殖性を Vero 細胞でのそれと比較した。遺伝子配列の解析を行い、各ペア間で差異のある遺伝子を検索した。

4. 研究成果

[結果]

母子感染例から分離されたウイルスは母の外陰部、子宮頸部、子の順に有意に温度感受性で ($P < 0.05$)、温度感受性が選択的な感染に関わることが示唆された。また、性器ヘルペス患者からの例では、外陰部から分離されたウイルスは子宮頸部のウイルスに比べ有意に温度感受性であり、この性状は 1 型、2 型ともに共通であった。母子を含め同一症例から分離したウイルスを比較検討したところ、分離されたペア間での制限酵素断片と温度感受性の差異が認められ、分離部位によりウイルスの遺伝子型が異なることが示唆された。

ヒト肝癌由来 (HepG2) 細胞で頸部由来の HSV の増殖性がよく、37°C 培養下における HepG2 と Vero 細胞でのプラック形成の割合を HepG2/Vero として表現し比較検討を行ったところ、温度感受性と相関関係が認められた。HepG2 細胞では外陰部由来の HSV に比べ、頸部由来のウイルスの増殖性がよく、温度感受性と同様に外陰部型、頸部型ウイルスの判別の指標に有効であると考えられた。

母子感染症例から母由来、児由来のペアでウイルスを分離後、ゲノム DNA を抽出し、ほとんどの ORF 領域を含む約 150Kbp の 90% 以上の塩基配列の比較を行った結果、2 つのウイルス間での明確な差異を見出すことができなかった。そこで、母のクローンと児の 2 つのクローン群 (母型表現型と児特異表現型) の各 2 クローンの計 6 クローンを選択して、新たに塩基配列の比較を行ったところ、HSV-2 の母子感染の症例で、児特異表現型の HSV-2 のタンパク質リン酸化酵素の open reading frame (ORF) 中にフレームシフトがみられ、この遺伝子産物は N 末端から約 1/5 しか発現していないことがわかった。また、児のウイルスは、母型表現型と児特異表現型から構成されていることから、児由来 HSV-2 の塩基配列では、mixture で存在していたことが判明した。そして、母のクローンと児の母型表現型の 4 クローンは同じ塩基配列だが、児特異的表現型の 2 クローンは異なっていた。そして、各表現型の各 10 クローンの塩基配列も、児特異的表現型のみが、共通して同じ遺伝子に変異が確認できた。

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 10 件)

① Daikoku T, Saito K, Aihara T, Ikeda M, Takahashi Y, Hosoi H, Takemoto M, Shiraki K.

Rapid detection of human cytomegalovirus UL97 and UL54 mutations for antiviral resistance in clinical specimens. *Microbiology and Immunology*. (査読有り) In press 2013. doi: 10.1111/j.1348-0421.12043.

② Sasivimolphan P, Lipipun V, Ritthidej G, Chitphet K, Yoshida Y, Daikoku T, Sritularak B, Likhitwitayawuid K, Pramyothin P, Hattori M, Shiraki K. Microemulsion-Based Oxyresveratrol for Topical Treatment of Herpes Simplex Virus (HSV) Infection: Physicochemical Properties and Efficacy in Cutaneous HSV-1 Infection in Mice.

AAPS Pharmacological Science Technology. (査読有り) 13(4):1266-1275, 2012. doi: 10.1208/s12249-012-9828-x.

③ Himaki T, Masui Y, Chono K, Daikoku T, Takemoto M, Haixia B, Okuda T, Suzuki H, Shiraki K.

Efficacy of ASP2151, a helicase-primase inhibitor, against thymidine kinase-deficient herpes simplex virus type 2 infection in vitro and in vivo. *Antiviral Research*. (査読有り) 93(2):301-304, 2012 doi: 10.1016/j.antiviral.2011.11.015.

④ Lipipun V, Sasivimolphan P, Yoshida Y, Daikoku T, Sritularak B, Ritthidej G, Likhitwitayawuid K, Pramyothin P, Hattori M, Shiraki K.

Topical cream-based oxyresveratrol in the treatment of cutaneous HSV-1 infection in mice.

Antiviral Research. (査読有り) 91(2):154-160, 2011. doi: 10.1016/j.antiviral.05.013.

⑤ Shiraki K, Daikoku T, Takemoto M, Yoshida Y, Suzuki K, Akahori Y, Okuno T, Kurosawa Y, Asano Y.

Neutralizing anti-gH antibody of Varicella-zoster virus modulates distribution of gH and induces gene regulation, mimicking latency.

Journal of Virology. (査読有り) 85(16): 8172-8180, 2011. doi: 10.1128/JVI.00435-11.

⑥ Daikoku T, Horiba K, Miyata K, Takemoto M, Okuda T, Yoshida Y, Sawamura R, Imakita M, Okubo T, Nagaura Y, Kurokawa M, Shiraki K.

Polyphenols including catechin from green tea with in vitro antiviral activity exhibited anti-herpes simplex virus activity but not anti-influenza virus. *Journal of Traditional Medicines*. (査読有り) 28 (1) No. 2, 63-72, 2011.

⑦ Abaitua F, Daikoku T, Crump CM, Bolstad M, O'Hare P.

A single mutation responsible for temperature-sensitive entry and assembly defects in the VP1-2 protein of herpes simplex virus.

Journal of Virology. (査読有り) 85(5): 2024-2036, 2011. doi: 10.1128/JVI.01895-10.

⑧ Iwai M, Yoshida H, Obara M, Horimoto E, Nakamura K, Takizawa T, Kurata T, Mizuguchi M, Daikoku T, Shiraki K.

Widespread circulation of echovirus type 13 demonstrated by increased seroprevalence in Toyama, Japan, between 2000 and 2003.

Clinical Vaccine Immunology. (査読有り) 17(5):764-770, 2010. doi: 10.1128/CVI.00239-09.

⑨ Kuramoto T, Daikoku T, Yoshida Y, Takemoto M, Oshima K, Eizuru Y, Kanda Y, Shiraki K.

Novel anti-cytomegalovirus activity of immunosuppressant mizoribine and its synergism with ganciclovir.

The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. (査読有り) 333(3):816-821, 2010. doi: 10.1124/jpet.109.160630.

⑩ Hama Y, Shiraki K, Yoshida Y, Maruyama A, Yasuda M, Tsuda M, Honda M, Takahashi M, Higuchi H, Takasaki I, Daikoku T, Tsumoto T.

Antibody to Varicella-Zoster Virus Immediate Early 62 Augments Allodynia in Zoster via Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF).

Journal of Virology. (査読有り) 84(3): 1616-1624, 2010. doi: 10.1128/JVI.02061-

09.

〔学会発表〕(計 20 件)

- ①大黒 徹、武本眞清、白木公康
抗 gH 抗体による VZV 潜伏感染誘導時の転写産物の解析
第 60 回日本ウイルス学会(大阪) 2012 年 11 月 13~15 日
- ②武本眞清、大黒 徹、吉田与志博、浅野喜造、白木公康
水痘帯状疱疹ウイルスの糖蛋白 gH に対する抗体が引き起こす抗原変調作用の解析
第 60 回日本ウイルス学会(大阪) 2012 年 11 月 13~15 日
- ③相原隆充、大黒 徹、白木公康
CMV の薬剤感受性にかかわる UL97 と UL54 の塩基配列の早期決定
第 60 回日本ウイルス学会(大阪) 2012 年 11 月 13~15 日
- ④粥川貴文、丹内秀典、奥川慶子、程ろ霏、山崎優華、大黒 徹、奥田智子、白木公康
抑制療法中の性器ヘルペス患者から分離された単純ヘルペス 2 型の TK 塩基配列および薬剤耐性
第 60 回日本ウイルス学会(大阪) 2012 年 11 月 13~15 日
- ⑤Daikoku T, Aihara T, Takemoto M, Shiraki K.
Rapid detection of HCMV UL97 and UL54 mutations for antiviral resistance in clinical specimens
37th Annual International Herpesvirus workshop (Calgary, Alberta, Canada) August 4-9, 2012
- ⑥Takemoto M, Daikoku T, Asano Y, Shiraki K.
The fate of VZV gH in the infected cells treated with anti-gH-MAb
37th Annual International Herpesvirus workshop (Calgary, Alberta, Canada) August 4-9, 2012
- ⑦Daikoku T, Horiba K, Kawana T, Hirano M, Shiraki K.
A novel deletion in glycoprotein G causes epidemiologic spread and immune evasion in herpes simplex virus type 2 infection.
36th annual international herpesvirus workshop. Gdansk, Poland. July 24-28, 2011
- ⑧Takemoto M, Daikoku T, Suzuki K, Akahori

Y, Kurosawa Y, Asano Y, Shiraki K.
Aberrant VZV glycoprotein traffic modulated by neutralizing anti-gH-mab
36th annual international herpesvirus workshop. Gdansk, Poland. July 24-28, 2011

⑨ Shiraki K, Toyama N, Daikoku T.
Epidemiology of the second episode of herpes zoster (II)
36th annual international herpesvirus workshop. Gdansk, Poland. July 24-28, 2011

⑩Daikoku T, Horiba K, Takemoto M, Himaki T, Kawana T, Hirano M, Shiraki K.
CLINICAL AND EPIDEMIOLOGIC RELEVANCE OF A NOVEL 21 AMINO ACID DELETION IN GLYCOPROTEIN G OF CLINICAL HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 2 ISOLATES
International Union of Microbiological Societies 2011 congress, Sapporo September 11-16, 2011

⑪Takemoto M, Daikoku T, Suzuki K, Akahori Y, Kurosawa Y, Asano Y, Shiraki K.
ABERRANT VZV GLYCOPROTEINS TRAFFIC MODULATED BY NEUTRALIZING ANTI-GH MAB
International Union of Microbiological Societies 2011 congress, Sapporo September 11-16, 2011

⑫大黒 徹、白木公康
新型インフルエンザの血中抗体価と症状調査
第 14 回日本ワクチン学会(東京) 2010 年 12 月 11~12 日

⑬白木公康、大黒 徹
带状疱疹の疼痛メカニズムと带状疱疹予防ワクチンの必要性
第 14 回日本ワクチン学会(東京) 2010 年 12 月 11~12 日

⑭大黒 徹、武本眞清、倉本 崇、吉田与志博、松井祥子、長谷川ともみ、白木公康
新型インフルエンザの血中抗体価と症状調査
第 58 回日本ウイルス学会(徳島) 2010 年 11 月 7~9 日

⑮吉田与志博、大黒 徹、武本眞清、倉本 崇、白木公康
浮遊(エアゾール)インフルエンザの感染性とその不活化
第 58 回日本ウイルス学会(徳島) 2010 年 11 月 7~9 日

⑯武本眞清、大黒 徹、吉田与志博、浅野喜

蔵、白木公康

水痘・带状疱疹ウイルス glycoprotein H に対する中和抗体による、細胞内ウイルス感染性消失過程の解析

第 58 回日本ウイルス学会(徳島) 2010 年 11 月 7～9 日

⑰ Daikoku T, Takemoto M, Suzuki K, Akahori Y, Kurosawa Y, Asano Y, Shiraki K.

VZV gene transcription in cells treated with anti-gH antibody during the quiescent state

35th Annual International Herpesvirus workshop (Salt Lake City, Utah, USA) July 24-29, 2010

⑱ 2010 Abaitua F, Daikoku T, Bolstad M, O' Hare P

Mutation in tsB7 VP1/2 responsible for defective entry and assembly of HSV

35th Annual International Herpesvirus workshop (Salt Lake City, Utah, USA) July 24-29, 2010

⑲ Takemoto M, Daikoku T, Suzuki K, Akahori Y, Kurosawa Y, Asano Y, Shiraki K.

Anti-gH neutralizing antibody alters localization of VZV glycoprotein B and E

35th Annual International Herpesvirus workshop (Salt Lake City, Utah, USA) July 24-29, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大黒 徹 (DAIKOKU TOHRU)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学) ・
准教授

研究者番号 : 80291409

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :