

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3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：22600003

研究課題名（和文）水痘ウイルス IE62 は脳由来神経栄養因子と免疫交差し帯状疱疹の痛覚過敏を起こす

研究課題名（英文）Varicella-zoster virus IE62 immunologically cross-reacts with Brain-derived nerve growth factor and causes allodynia of herpes zoster

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（和文）：水痘帯状疱疹ウイルス前初期抗原 62（IE62）は、ウイルスの主要転写因子である。IE62 に対する抗 IE62 抗体の中には、BDNF と免疫交差して、その生理活性を高めることが、神経損傷を伴う帯状疱疹の痛覚過敏やアロディニアを誘導することを確認した。そして、帯状疱疹様の皮膚病変を生じるマウスの単純ヘルペスウイルスの皮膚病変の重症化に従い、病変周辺の皮膚の神経終末数が増加していることを確認した。このように皮膚病変自体がケラチノサイトに神経成長因子を誘導して、神経終末数を増加させている。このように神経終末数増加は、痛点数の増加による痛覚過敏という現象を明らかにできた。

研究成果の概要（英文）：Varicella-zoster virus (VZV) immediate early protein 62 (IE62) is a major transcriptional activator and anti-IE62 monoclonal antibody among three monoclonal antibodies recognized brain-derived nerve growth factor (BDNF). BDNF causes hyperesthesia and allodynia. This antibody augmented the BDNF activity and its intrathecal injection induced allodynia in the nerve-injured mice. Histological study of the skin of mice infected cutaneously revealed that nerve ending around herpes simplex virus (HSV) lesion increased 10 times in the number of nerve endings. Keratinocytes around HSV lesion induced nerve growth factor and this may have increased the number of nerve endings. Thus the increase in the number of nerve endings indicated the increase in the number of pain spots and this may cause the pain in the skin lesions of herpes zoster.

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	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
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：ウイルス、帯状疱疹、疼痛

1. 研究開始当初の背景

水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）は約 70 の蛋

白をコードしており、感染初期に転写調節因子として 4 種の前初期抗原（IE）を産生する。

その中で IE62 は最も重要な転写調節因子であり、潜伏感染時に神経細胞内で IE62 蛋白を発現する特徴を持つ。一方、脳由来神経栄養因子 (BDNF) は、神経突起の伸長や神経ネットワークの形成や痛覚形成に関係する神経系にとって重要な因子である。

IE62 に対するモノクローナル抗体を作成し、性状解析の中で BDNF と免疫交差すること、さらに、この抗体は BDNF 活性を中和するのではなく、BDNF 活性を増強するという特異な活性を見出した。帯状疱疹後神経痛 (帯状疱疹後神経痛) の患者血清にも BDNF を認識する抗体の存在を認め、BDNF 活性を増強し、脊髄後根神経細胞の dendrite 形成を促進することを確認した。さらに、このモノクローナル抗体をマウスの髄液内に投与して、座骨神経結紮による神経傷害を起こすと傷害側の痛覚閾値を有意に低下 (痛覚過敏) させることを確認した。また、免疫交差する IE62 融合 GST 蛋白の免疫によっても痛覚過敏の誘導を確認した。以上のことから、帯状疱疹発症後に IE62 に対する抗体が産生され、これが BDNF の活性を高めて帯状疱疹領域の損傷された神経の痛覚過敏を引き起こし、帯状疱疹後神経痛を発症することを示唆した (J Virol 84, 1616-1624, 2010, 特許公開:2002-330666, 特願:2008-131325)。

単純ヘルペスウイルス (HSV) も皮膚に水疱など帯状疱疹と同様な病変を形成するが、帯状疱疹のような痛覚過敏はおこさない。これは上記のような IE62 の存在があるためと考えられる。これまでに、HSV 皮膚感染マウスモデルで、痛覚に対する影響を検討してきた。しかし、BDNF と免疫交差する抗 IE62 抗体投与により、マウスのモデルでも痛覚過敏を生じることが可能であることを確認した。以上の結果から、BDNF 活性を高める抗 IE62 抗体の産生が、帯状疱疹特有の痛覚過敏や疼痛を生じることが示唆された。VZV-IE62 は、VZV の増殖や潜伏感染に対して重要な役割を果たしており、免疫原性も高い。その IE62 の中の 1 エピトープが BDNF の 2 量体形成部位と免疫交差し、BDNF の生理活性を増強し、帯状疱疹患者の痛覚過敏を生ずる。さらに、増強された BDNF 活性により、痛覚過敏ネットワークが形成され、その痛覚過敏が引き続き帯状疱疹後神経痛へ移行する可能性も示唆した。

わが国の帯状疱疹患者 48,833 人の疫学調査からも帯状疱疹は増加しており (J Med Virol 81, 2053-2058, 2009)、ペインクリニックの患者で最も多いとされ、QOL に大きくかわる帯状疱疹後神経痛の病因を明らか

にできる研究である。

2. 研究の目的

水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) の前初期抗原 (IE) 62 はウイルス蛋白の中で最も重要な転写調節因子であり、免疫原性も高い。それに対するモノクローナル抗体が脳由来神経栄養因子 (BDNF) と免疫交差し、BDNF 活性を増強、脊髄後根細胞の dendrite の形成を促進し、動物モデルで痛覚過敏を起こすことを見出した (J Virol, 84, 1616-1624, 2010)。BDNF は神経ネットワーク形成や痛覚に関係する。帯状疱疹後神経痛の患者血清にも BDNF を認識する抗体の存在を認め、BDNF 活性を増強を確認した。帯状疱疹発症後に抗 IE62 抗体が産生され、これが BDNF の活性を高めて痛覚過敏し、さらに痛覚ネットワークの形成促進を引き起こし、帯状疱疹後神経痛を発症することを示唆した。以上のように、VZV-IE62 に対する抗体が BDNF と免疫交差し、VZV 関連神経疾患の病因の可能性を示唆した。本研究は、帯状疱疹経過中・その後に誘導される IE62 に対する感染免疫・免疫応答により、帯状疱疹関連痛や帯状疱疹後神経痛の可能性が示唆されたので、それを解析することを目的とする。

3. 研究の方法

実際の帯状疱疹患者に関して、10 名程度の確認は行った (J Virol 84, 1616-1624, 2010)。帯状疱疹患者および帯状疱疹後神経痛患者の帯状疱疹の急性期と回復期のペア血清約 40 例を準備できたので、これらの症例で IE62 や BDNF に対する抗体だけでなくその他の水痘ウイルス蛋白に対する抗体と比較して、IE62 抗体や BDNF 抗体の特異性・選択性を検討し、帯状疱疹後神経痛との相関を明らかにする。また、実験系では、抗 IE62 抗体の BDNF の活性増強による帯状疱疹後神経痛モデル確立し、神経節内での BDNF 発現の様式など痛覚過敏発症のメカニズムを明らかにする。したがって、本研究計画は、IE62 に対する抗体による帯状疱疹後神経痛のモデルを主とした研究を行う。

4. 研究成果

IE62 に対する抗 IE62 抗体の中には、BDNF と免疫交差して、その生理活性を高めることが、神経損傷を伴う帯状疱疹の痛覚過敏やアロディニアを誘導することを確認した。そして、帯状疱疹様の皮膚病変を生じるマウスの単純ヘルペスウイルスの皮膚病変の重症化に従い、病変周辺の皮膚の神経終末数が増加していることを確認した。このように皮膚病変自体がケラチノサイトに神経成長因子を誘導して、神経終末数を増加させている。こ

のように神経終末数増加は、痛点数の増加による痛覚過敏という現象を明らかにできた。

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 16 件)

- 1) Miyakoshi A, Takemoto M, Shiarki K, Hayashi A : Varicella-zoster virus keratitis with asymptomatic conjunctival viral shedding in the contralateral eye. *Cornea* in press. (査読有)
- 2) Daikoku T, Horiba K, Kawana T, Hirano M, Shiraki K: A novel deletion in glycoprotein G forms a cluster and causes immune evasion in herpes simplex virus type 2 infection. *Journal of Medical Virology* in press. (査読有)
- 3) Chono K, Katsumata K, Kontani T, Shiraki K, Suzuki H: Characterization of virus strains resistant to the herpes virus helicase-primase inhibitor ASP2151 (Amenamevir). *Biochemical Pharmacology*, 84: 459-467, DOI : 10.1016/j.bcp.2012.05.020, 2012. (査読有)
- 4) Takasaki I, Taniguchi K, Komatsu F, Sasaki A, Andoh T, Nojima H, Shiraki K, Hsu DK, Liu FT, Kato I, Hiraga K, Kuraishi Y: Contribution of spinal galectin-3 to acute herpetic allodynia in mice. *Pain*, 153:585-592, DOI:10.1016/j.pain.2011.11.022, 2012. (査読有)
- 5) Miyakoshi A, Takemoto M, Shiraki K, Hayashi A: Varicella-zoster virus keratitis with asymptomatic conjunctival viral shedding in the contralateral eye. *Case Reports in Ophthalmology*, 3:343-348, DOI : 10.1159/000343463, 2012. (査読有)
- 6) 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*, 93:301-304, DOI : 10.1016/j.antiviral.2011.11.015, 2012. (査読有)
- 7) 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*, 85: 8172-8180, DOI: 10.1128/JVI.00435-11, 2011. (査読有)
- 8) Sato H, Kageyama S, Yamamoto H, Kurokawa M, Aoki E, Shiraki K: Glycyrrhizin renders cells resistant to apoptosis induced by human and feline immunodeficiency virus. *Journal of Traditional Medicines*, 28: 139-148, 2011. (査読有)
- 9) Shimizu T, Sawamura R, Kim KH, Kim KH, Lee SH, Lee YS, Kim TG, Kai H, Yoshida H, Watanabe W, Matsuno K, Shiraki K, and Kurokawa M: Efficacy of Korean traditional medicines against influenza virus infection in mice and their modes of anti-influenza virus action. *Journal of Traditional*

- Medicines, 28 : 115-127, 2011. (査読有)
- 10) Shimizu T, Takeshita Y, Takamori Y, Kai H, Sawamura R, Yoshida H, Watanabe W, Tsutsumi A, Park YK, Yasukawa K, Matsuno K, Shiraki K, Kurokawa K: Efficacy of brazilian propolis against herpes simplex virus type 1 infection in mice and their modes of antiherpetic efficacies. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, ID 976196, 9pages, DOI: 10.1155/2011/976196, 2011. (査読有)
- 11) Ozawa T, Jin A, Tajiri K, Takemoto M, Okuda T, Shiraki K, Kishi H, Muraguchi A: Characterization of a fully human monoclonal antibody against extracellular domain of matrix protein 2 of influenza A virus. Antiviral Research, 91:283-287, DOI: 10.1016/j.antiviral.2011.06.012, 2011. (査読有)
- 12) 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, 91:154-160, DOI: 10.1016/j.antiviral.2011.05.013, 2011. (査読有)
- 13) Daikoku T, Horiba K, Miyata K, Takemoto M, Okuda T, Yoshida Y, Sawamura R, 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 activity in mice. Journal of Traditional Medicines, 28:63-72, 2011. (査読有)
- 14) Yoshimura Y, Asami K, Imamichi T, Okuda T, Shiraki K, Takahata H: Design and synthesis of isonucleosides constructed on a 2-Oxa-6-thiabicyclo [3.2.0] heptane scaffold. Journal of Organic Chemistry, 75:4161-4171, DOI: 10.1021/jo100556u, 2010. (査読有)
- 15) 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. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 333:816-821, DOI: 10.1124/jpet.109.160630, 2010. (査読有)
- 16) 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 and Vaccine Immunology, 17:764-770, DOI: 10.1128 /CVI.00239-09, 2010. (査読有)
- [学会発表] (計 22 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学術集会, 2012, 11, 13-15, 大阪.
- 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学術集会, 2012, 11, 13-15, 大阪.
- 3) Takemoto 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, 2012, 8, 4-9, Calgary, Canada.
- 4) 白木公康, 大黒 徹: 帯状疱疹の 2 回発症. 第 53 回日本臨床ウイルス学会, 2012, 6, 16-17, 豊中.
- 5) 白木公康, 大黒 徹: 帯状疱疹の 2 回発症. 第 15 回日本ワクチン学会学術集会, 2011, 12, 10-11, 東京.
- 6) 尾崎隆男, 西村直子, 中根一匡, 舟橋恵二, 白木公康, 浅野章造, 前田一洋, 奥野良信: 水痘ワクチンの抗体測定における IAHA 法の有用性. 第 15 回日本ワクチン学会学術集会, 2011, 12, 10-11, 東京.
- 7) 白木公康: 単純ヘルペスウイルス 2 型 glycoprotein G に欠失の認められた性器ヘルペス患者の血清学的解析. 日本性感感染症学会第 24 回学術大会, 2011, 12, 3-4, 東京.
- 8) Shiraki K: Neutralizing anti-gH antibody of varicella-zoster virus modulated distribution of gH and induced gene regulation mimicking latency. 15th International Conference on the Immunobiology and Prophylaxis of Herpesvirus Infections, 2011, 10, 12-15, San Servolo, Venice.
- 9) Daikoku 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, 2011, 9, 11-16, Sapporo.
- 10) Takemoto 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, 2011, 9, 11-16, Sapporo.
- 11) 武本眞清, 薄 海霞, 大黒 徹, 邵 輝, 白木公康: タンポポによる単純ヘルペスウイルス 1 型およびインフルエンザウイルスの増殖抑制. 第 28 回和漢医薬学会学術大会, 2011, 8, 27-28, 富山.
- 12) Shiraki K, Toyama N, Daikoku T: Epidemiology of the second episode of herpes zoster (II). 36th Annual International Herpesvirus Workshop, 2011, 7, 24-28, Gdansk, Poland.
- 13) Daikoku 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. 336th Annual International Herpesvirus Workshop, 2011, 7, 24-28, Gdansk, Poland.
- 14) Takemoto 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, 2011, 7, 24-28, Gdansk, Poland.
- 15) 白木公康, 大黒 徹, 武本眞清: 帯状疱疹特有の疼痛の発症メカニズム. 第 52 回日本臨床ウイルス学会, 2011, 6, 11-12, 津.
 - 16) 白木公康: 帯状疱疹と帯状疱疹予防ワクチン. 第 11 回日本抗加齢医学会総会, 2011, 5, 27-29, 京都.
 - 17) 白木公康, 大黒 徹: 帯状疱疹の疼痛メカニズムと帯状疱疹予防ワクチンの必要性. 第 14 回日本ワクチン学会学術集会, 2010, 12, 11-12, 東京.
 - 18) Shiraki K, Toyama N: Epidemiology of the second episode of herpes zoster. 35th Annual International Herpesvirus Workshop, 2010, 7, 24-29, Salt Lake City, USA.
 - 19) 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, 2010, 7, 24-29, Salt Lake City, USA.
 - 20) 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, 2010, 7, 24-29, Salt Lake City, USA.
 - 21) 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 glycoprotein H に対する中和抗体による、細胞内ウイルスの感染性消失過程の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集

会, 2010, 11, 7-9, 徳島.

- 22) Shiraki K: Role of anti-gH neutralizing antibody in varicella-zoster virus. The 8th China-Japan International Conference of Virology, 2010, 7, 4-6, Harbin, China.

[図書] (計 4 件)

- 17) 白木公康, 大黒 徹, 武本眞清: 水痘帯状疱疹ウイルスの基礎. 「水痘・帯状疱疹のすべて」, 浅野喜造 編集, 26-45, メジカルビュー社, 東京, 2012.
- 18) 白木公康: 帯状疱疹の痛みはなぜ強い? 「水痘・帯状疱疹のすべて」, 浅野喜造 編集, 201, メジカルビュー社, 東京, 2012.
- 19) 白木公康: 水痘ワクチンの定期接種化で帯状疱疹はどうなる? 「水痘・帯状疱疹のすべて」, 浅野喜造 編集, 225, メジカルビュー社, 東京, 2012.
- 20) 白木公康: 帯状疱疹はなぜ片側にしか生じないのか? 「眼のサイエンス 眼疾患の謎」 根木 昭 他編, 18-21, 文光堂, 東京, 2010.

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