

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461508

研究課題名(和文)単純ヘルペスウイルスの母子感染に関わる遺伝子変異と宿主因子の解明

研究課題名(英文) Tropism determined by gene product of Herpes Simplex Virus and host cell 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：米国の新生児ヘルペス患者26名から分離されたHSVのUL13に遺伝子変異を検出した。フレームシフトの変異株3株と、アミノ酸置換の1株を、マウス側腹部に各濃度(500,000、100,000、10,000 PFU / 5uL)で感染させ病原性を解析した。いずれも10,000 PFU では殆ど病変を生じさせなかった。しかし、100,000 PFU 以上のウイルス量を感染させた場合、UL13遺伝子の変異株(G96A fsX5, A142P fsX25, Y162V fsX141)の3株は、変異のない株に比べて病原性の低下が認められた。一方でアミノ酸置換の1株(V165M)は病原性低下が認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Genetic mutations were detected on UL13 open reading frame of HSV-2 (17 cases) isolated in total 26 cases of neonatal herpes patients from the United States, the virulence and pathogenicity of these mutant viruses was investigated in mice infection model. All kinds of variant virus did not have pathogenicity in 10,000 (PFU/5uL). When the amount of 100,000 PFU or 500,000 of the virus was infected to mice, the pathogens of frame shift mutants (HSV-2 UL13 G96A fsX5, A142P fsX25, Y162V fsX141) were reduced as compared to without the mutation. On the other hand, the amino acid substitution strain (V165M) was not observed pathogenic decline.

研究分野：医歯薬学

キーワード：感染防御学 母子感染 単純ヘルペスウイルス

1. 研究開始当初の背景

(1) 単純ヘルペスウイルス (HSV) 2 型の母子感染は重篤な新生児ヘルペスを引き起こすが、これに関わる因子は明らかになっていない。我々は、これまで、母子双方から分離したウイルスの性状を比較解析することにより、児由来ウイルスの方が肝癌由来 HepG2 細胞での増殖がよいことと、39 での Vero 細胞における増殖性と HepG2 細胞での増殖性に相関がみられることを明らかにしてきた。さらに、前年度までの本事業による支援を得て研究を進めた結果、児由来ウイルスはある遺伝子に欠損があることを明らかにした。また、この遺伝子について児由来の遺伝子型と母体由来の遺伝子型を発現させる細胞系において、発現量に違いの見られる宿主蛋白質を合計 9 つ同定することに成功した。これらの知見から、例えば、HSV-2 は当該宿主蛋白質の発現量に影響を及ぼすことによって自らの増殖を制御していることが考えられる。本研究の最終目的は母子感染における HSV の病原性発現機構を明らかにすることである。

(2) 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

(1) 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こ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。

(2) HSV-2 の臨床分離株で、UL13 遺伝子にフレームシフトを引き起こす変異 (G96AfsX5, W30X, A142PfsX25, Y162VfsX141) を有する株と、アミノ酸置換 (V165M, V175M, D231Y, Y384C) を有する株を網羅的塩基配列解析の結果見いだした。そこでこれらの変異株の内、フレームシフトの株 (G96AfsX5, A142PfsX25, Y162VfsX141) と、アミノ酸置換の V165M について、マウス側腹部感染系における病原性発現について解析を行い、UL13 遺伝子産物の生体内での病原性発現について検討を行う。

3. 研究の方法

(1) アメリカの新生児ヘルペス患者 26 名から分離された HSV の遺伝子についても変異の有無を解析した。

(2) 母体由来 HSV-2 と児由来 HSV-2 の遺伝子変異がこれまで同定した遺伝子以外にも存在するか否かを、次世代シーケンサーを使ってゲノム全体を網羅的に検討した。

(3) マウス BALB/c 8 週令の側腹部を除毛後、両方の腹部に注射針による擦過傷後、種々の濃度の HSV-2 (5×10^5 , 1×10^5 , 1×10^4 PFU / 5 μ L)

を感染させ、病変の進行を観察し、病変スコアにより評価した。さらに、UL13遺伝子変異株でフレームシフト3種(G96A fsX5, A142P fsX25, Y162V fsX141)、アミノ酸置換1種(V165M)について、片側の腹部に接種し、病原性を検討した。

(4) 児由来と母体由来ウイルスをVero細胞またはHepG2細胞に感染させ、これまで同定した宿主遺伝子の内、発現量に差異の遺伝子産物の検出を試みた。

4. 研究成果

(1) 米国で新生児ヘルペスから分離されたHSV(26例)中17例がHSV-2によるもので、遺伝子変異を解析したところ、日本での母子感染例と同じタンパク質をコードしている遺伝子での変異が17患者中少なくとも3患者で検出された。

(2) 次世代シーケンサーによる網羅的ゲノム解析においては、これまで判明している遺伝子の変異以外にはUL5遺伝子に一カ所塩基置換が検出されたが、これはアミノ酸変異を伴わない変異であった。

(3) HSV母子感染の2つの症例で、児由来ウイルスは、UL13遺伝子に特定の変異があることを見出したので、マウスでの感染実験で両ウイルス株の病原性の比較を行った。

臨床分離されたHSV-2でUL13遺伝子にフレームシフトを引き起こす変異(G96AfsX5、W30X、A142PfsX25、Y162VfsX141)を有する株と、アミノ酸置換(V165M、V175M、D231Y、Y384C)を有する株を網羅的塩基配列解析の結果見出した。それらの内、フレームシフトの株(G96AfsX5、A142PfsX25、Y162VfsX141)と、アミノ酸置換のV165Mの病原性をマウス皮膚病変モデルで検討した。マウスBALB/c 8週令の側腹部を除毛後、注射針による擦過傷に各濃度のHSV-2(5×10^5 、 1×10^5 、 1×10^4 PFU / $5 \mu\text{L}$)を感染させ、病変の進行を観察した。いずれのウイルス株も 1×10^4 PFUでは殆ど病変を生じさせなかった。しかしながら、 1×10^5 PFU以上のウイルス量を感染させた場合では、UL13遺伝子の変異株(G96AfsX5を3株、A142PfsX25を1株、Y162VfsX141を1株)の3種類のフ

レームシフトの株はいずれも変異のない株に比べて病原性が有意に低下していた。一方でアミノ酸置換のあった1株(V165M)は病原性低下が認められなかった。

(4) プロテオーム解析により、母由来ウイルスと児由来ウイルスの感染細胞で発現量に違いがある宿主蛋白質を複数個同定し、これらの蛋白質のHSV感染細胞内での発現と修飾について解析を行い、HSVの増殖における役割について検討した。培養細胞のウエスタンブロットティングで、eukaryotic elongation factor 1 delta (elf-1)は2つの異なる分子量のバンドが検出された。UL13遺伝子に変異を有するHSV-2株と変異のない株をそれぞれ培養細胞に感染させelf-1の発現を検討したところ、感染後3~6時間では、変異の有無で差は認められなかった。しかしながら、感染後9~12時間では変異のない株の感染細胞で、2つのバンドの分子量の増大を確認し、リン酸化の修飾によるものと考えられた。他の同定された蛋白質については、HSVの感染による発現量の減少が見られたが、リン酸化の修飾による分子量の変動については確認できなかった。これらの結果から、HSVのリン酸化酵素が、感染細胞内で転写に関する酵素に影響を与えている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Daikoku T, Tannai H, Honda M, Onoe T, Matsuo K, Onoye Y, Nishizawa M, Kawana T, Okuda T, Hasegawa T, Shiraki K.

Subclinical generation of acyclovir-resistant herpes simplex virus with mutation of homopolymeric guanosine strings during acyclovir therapy. *J Dermatol Sci*. 査読有, Vol. 82, No.3, 2016, 60-65.

doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.02.006.

Daikoku T, Oyama Y, Yajima M, Sekizuka T, Kuroda M, Shimada Y, Takehara K, Miwa N, Okuda T, Sata T, Shiraki K. Identification of ribonucleotide reductase mutation causing temperature-sensitivity of herpes

simplex virus isolates from whitlow by deep sequencing. Clin Case Rep. 査読有, Vol 3, No.6, 2015, 461-467.
doi: 10.1002/ccr3.270.

Nakamura T, Daikoku T, Shiraki K, Hayashi A. Detection of cytomegalovirus in an immunocompetent adult presenting with acute retinal necrosis due to varicella-zoster virus: a case report. Clin Ophthalmol. 査読有, Vol.13, No.9, 2015, 853-858.
doi: 10.2147/OPHT.S81020.

Yajima M, Shiraki A, Daikoku T, Oyama Y, Yoshida Y, Shiraki K. Functional differences between antiviral activities of sulfonated and intact intravenous immunoglobulin preparations toward varicella-zoster virus and cytomegalovirus. J Infect Chemother. 査読有, Vol.21, No.6, 2015, 427-433.
doi: 10.1016/j.jiac.2015.01.012.

Daikoku T, Yoshida Y, Okuda T, Shiraki K. Characterization of susceptibility variants of influenza virus grown in the presence of T-705. J Pharmacol Sci. 査読有, Vol.126, No.3, 2014, 281-284.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25296868>

Daikoku T, Horiba K, Kawana T, Hirano M, Shiraki K. Novel deletion in glycoprotein G forms a cluster and causes epidemiologic spread of herpes simplex virus type 2 infection. J Med Virol. 査読有, Vol.85, No.10, 2013, 1818-1828.
doi: 10.1002/jmv.23668.

Daikoku T, Saito K, Aihara T, Ikeda M, Takahashi Y, Hosoi H, Nishida T, Takemoto M, Shiraki K. Rapid detection of human cytomegalovirus UL97 and UL54 mutations for antiviral resistance in clinical specimens. Microbiol Immunol. 査読有, Vol.57, No.5, 2013, 396-399.
doi: 10.1111/1348-0421.12043.

[学会発表](計10件)

Tohru Daikoku, Masaya Takemoto, Yoshihiro Yoshida, Tomoko Okuda, Kimiyasu Shiraki, Characterization of susceptibility variants of influenza virus and poliovirus grown in the favipiravir. 第63回日本ウイルス学会学術集会(福岡)2015年11月22日~24日

矢島美彩子, 大黒 徹, 武本眞清, 白木公康, 免疫グロブリン製剤の抗CMV及びVZV効果に関する検討. 第63回日本ウイルス学会学術集会(福岡)2015年11月22日~24日

Misako Yajima, Tohru Daikoku, Masaya Takemoto, Kimiyasu Shiraki, The profile of initiation and disappearance of anti-herpetic action of ASP2151 (amenamevir). 40th Annual international Herpesvirus Workshop, (Boise, Idaho, USA) 2015年7月25日~29日

Daikoku T, Honda M, Onoe T, Matuo K, Onoe Y, Okuda T, Kayukawa T, Tannai H, Shiraki K, Subclinical generation of acyclovir-resistant herpes simplex virus during suppressive therapy. The 39th Annual International Herpesvirus workshop, (Kobe, Japan) 2014年7月19日~23日

Yajima M, Daikoku T, Oyama Y, Shiraki K, Characterization of interaction of polyvalent intravenous immunoglobulin with CMV or CMV-infected cells. The 39th Annual International Herpesvirus workshop, (Kobe, Japan) 2014年7月19日~23日

Takemoto M, Daikoku T, Yajima M, Asano Y, Shiraki K, Neutralizing antibody against VZV gH modulates localization of IE62, IE63 and Sp1 during termination of productive infection. The 39th Annual International Herpesvirus workshop, (Kobe, Japan) 2014年7月19日~23日

大黒 徹, 雄山由香利, 奥田智子, 矢島美彩子, 武本眞清, 白木公康, 臨床分離単純ヘル

ペスウイルス2型UL13 遺伝子変異株のマウス
病原性の低下. 第 62 回日本ウイルス学会学術
集会 (横浜) 2014 年 11 月 10 日～12 日

矢島美彩子, 大黒 徹, 武本眞清, 白木公康,
免疫グロブリン製剤の抗 CMV 及び VZV 効果に
関する検討. 第 62 回日本ウイルス学会学術集
会 (横浜) 2014 年 11 月 10 日～12 日

Daikoku T, Oyama Y, Sekizuka T, Kuroda M,
Sata T, Shiraki K, Identification of
rebonucleotide reductase mutation causing
temperature-sensitive of herpes simplex
virus isolates from recurrent whitlow by
genome wide sequence. The 38th Annual
International Herpesvirus workshop,
(Grand Rapids, USA) 2013年7月20日～24日

大黒 徹, 雄山由香利, 奥田智子, 矢島美彩
子, 武本眞清, 白木公康, 単純ヘルペスウイ
ルス臨床分離株の次世代シーケンサーによ
る変異部位の網羅的解析. 第 61 回日本ウイル
ス学会学術集会 (神戸) 2013 年 11 月 10 日～
12 日

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