

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 5 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09675

研究課題名(和文) 薬剤耐性単純ヘルペスウイルスによる新生児ヘルペスの病態解明と治療戦略に関する研究

研究課題名(英文) Research on the pathophysiology and treatment for neonate with drug-resistant herpes simplex virus infections

研究代表者

西條 政幸 (SAIJO, MASAYUKI)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・部長

研究者番号：50300926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アシクロビル(ACV)耐性単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)によるヘルペス脳炎(Kakiuchi S, et al. JCM, 2013)の脳脊髄液中に認められたHSV-1のチミジンリン酸化酵素(vTK)遺伝子中のQ125H変異を有する組換えHSV-1を作出した。この変異は実際にACVに耐性を誘導することを証明した。そのACV耐性HSV-1のマウス脳内接種による神経病原性を調べたところ、比較的高い病原性が維持されていることが明らかになった。また、ACVへの感受性とマウスにおける神経病原性には、負の相関があることが証明された。ウイルス学的検査と適切な治療法の選択の重要性が確認された。

研究成果の概要(英文)：In our previous study, the amino acid substitution of H from Q at the 125th position of viral thymidine kinase (vTK) gene amplified from the central spinal fluid (CSF) of neonatal HSV-1 infection was confirmed to confer acyclovir (ACV)-resistance. In this study, recombinant HSV-1 with the mutation in vTK gene was generated artificially by using BAC system. The recombinant HSV-1 showed ACV-resistance in vitro, but maintained neurovirulence in mouse infection model. The sensitivity of ACV-resistant HSV-1 to ACV was confirmed to be associated significantly with the neurovirulence in mouse infection model, being that the higher the resistance, lower the neurovirulence in mice. The present study indicates that virological test of and selection of proper treatment for the patients, who showed intractable HSV-1 disease against ACV-therapy, are required,

研究分野：ウイルス学, 小児科学, 感染症学

キーワード：単純ヘルペスウイルス1型 新生児ヘルペス ヘルペス脳炎 アシクロビル 薬剤耐性 神経病原性 チミジンリン酸化酵素

1. 研究開始当初の背景

申請者らは脳炎を合併した新生児ヘルペスの患者に対する ACV 治療中に脳脊髄液 (CSF) 中 HSV-1 ゲノム量が治療開始後に低下したものの第4週目から増加に転じ、CSF 中にアシクロビル (ACV) 耐性 HSV-1 が出現していることをウイルス学的に証明し、世界で初めて ACV 耐性 HSV-1 による脳炎患者の経過を報告した (Kakiuchi S, JCM, 2013). ACV 耐性 HSV-1 による新生児ヘルペス (脳炎を合併することが多い) のウイルス学的検査の整備と治療法の選択のあり方を検討することが必要であった。

2. 研究の目的

この患者の CSF から増幅された HSV-1 のウイルス性チミジンリン酸化酵素 (vTK) 遺伝子の塩基配列で ACV 耐性を誘導すると考えら得る Q125H 変異が真に ACV 耐性を誘導するか否かをウイルス学的に証明すること、また、ACV 耐性 HSV-1 の ACV への感受性と神経病原性の関連を調べることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

- 1) vTK 遺伝子に目的のアミノ酸変異を導入させた組換え HSV-1 の作製  
BAC システムを用いて、ウイルス学的に証明された新生児ヘルペス脳炎患者の CSF 中から増幅された vTK 遺伝子に認められた変異 (Q125H, 1245 番目のアミノ酸が Q から H に変異) を挿入させた bacHSV-1 Q125H を作製した。親株 bacHSV-1 および vTK 欠損高度 ACV 耐性組換え HSV-1 を作出し、これらのウイルスのそのウイルスの ACV を含む各種薬剤に対する感受性を調べるとともに、マウスにおける神経病原性を評価した。
- 2) ACV 耐性 HSV-1 の ACV に対する感受性と神経病原性の関連の評価  
既に作製済みのアミノ酸変異による vTK 関連 ACV 耐性 HSV-1 株 (5 株) のマウスにおける神経病原性を、親株を陽性コントロールとして、また、フレームシフトによる vTK 活性欠損高度 ACV 耐性 HSV-1 を 1 株の神経病原性を評価した。それぞれのウイルス株をマウスの脳内に直接接種する経路および角膜接種経路で感染させた場合の神経病原性 (50% lethal dose) を決定し、それと HSV-1 の vTK 活性の程度、ACV に対する感受性との関連を解析した。
- 3) HSV-1 の vTK 遺伝子を削除し、水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) の vTK を挿入させた組換えウイルスの作製  
HSV-1 の vTK 遺伝子を削除し、水痘・

帯状疱疹ウイルス (VZV) の vTK を挿入させた組換えウイルス (recHSV-1-VZV-vTK) を、相同組換え技術を用いて作出した。

- 4) ACV 耐性 recHSV-1-VZV-vTK の作出と耐性誘導遺伝子変異の解析  
ACV 存在下で recHSV-1-VZV-vTK を培養することにより、ACV 耐性 recHSV-1-VZV-vTK を独立して 38 株以上作出した。DNA 合成酵素遺伝子と vTK 遺伝子の塩基配列を決定した。

4. 研究成果

- 1) vTK 遺伝子に目的のアミノ酸変異を導入させた組換え HSV-1 の作製  
vTK 遺伝子における変異 (Q125H) を挿入させた bacHSV-1 Q125H を作製した。このウイルスの vTK を親株のそれと同じアミノ酸配列を有する組換えウイルスも作出した。vTK の Q125H は ACV 耐性を誘導することが証明された。
- 2) bacHSV-1 Q125H のマウスにおける神経病原性  
bacHSV-1 Q125H のマウスにおける神経病原性は、親株のそれと比較して約 6 倍程度低下しているだけ (vTK 活性欠損 ACV 高度耐性株は約 300 倍の低下) で、神経病原性が維持されていたウイルスであったことが確認された。
- 3) ACV 耐性 HSV-1 の ACV に対する感受性と神経病原性の関連の評価  
vTK におけるアミノ酸変異に基づく ACV 耐性 HSV-1 の神経病原性 (脳内接種による病原性) と末梢病原性 (鼻腔内接種による病原性) は、ともに ACV への感受性と負の相関が認められた。
- 4) HSV-1 の vTK 遺伝子を欠損させ、HSV-1 UL50-UL51 領域に水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) の TK 遺伝子を挿入させたキメラウイルス recHSV-1-VZV-vTK と ACV 耐性 recHSV-1-VZV-vTK の作製  
recHSV-1-VZV-vTK を作製した。目的のキメラウイルスであることが確認された。ACV に感受性を示した。その感受性は VZV の ACV に対する感受性と同等であった。38 株の ACV 耐性 recHSV-1-VZV-vTK が得られた。DNA 合成酵素遺伝子と vTK 遺伝子の塩基配列を決定したところ、すべての株で DNA 合成酵素遺伝子のみアミノ酸変異が確認され、vTK 遺伝子には認められなかった。VZV の vTK 遺伝子には ACV 耐性を誘導する変異が生じにくいことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

- 1) Omura N, Fujii H, Yoshikawa T, Yamada S, Harada S, Inagaki T, Shibamura M, Takeyama H, Saijo M. Association between sensitivity of viral thymidine kinase-associated acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 and virulence. *Virology Journal* 14(1):59, 2017
- 2) Kakiuchi S, Tsuji M, Nishimura H, Yoshikawa T, Wang LX, Takayama-Ito M, Kinoshita H, Lim CK, Fujii H, Yamada S, Harada S, Oka A, Mizuguchi M, Taniguchi S, Saijo M. The association of the emergence of acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 with the prognosis in hematopoietic stem cell transplantation patients. *Journal of Infectious Diseases* 215(6):865-873, 2017
- 3) Fujii H, Kakiuchi S, Tsuji M, Nishimura H, Yoshikawa T, Yamada S, Omura N, Inagaki T, Shibamura M, Harada S, Taniguchi S, Saijo M. Application of next-generation sequencing to detect acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 variants at low frequency in thymidine kinase gene of the isolates recovered from patients with hematopoietic stem cell transplantation. *J Virol Methods* 251:123-128, 2018
- 4) 三上真充, 梅田雄嗣, 松田浩一, 才田聡, 平松英文, 藤野寿典, 山田壮一, 柴村美帆, 西條政幸, 平家俊男, 足立壮一. HLA 半合致血縁者間骨髓移植後にアシクロビル耐性単純ヘルペスウイルス 1 型感染症を発症した一例. *日本小児血液・がん学会雑誌* 54:408-411, 2017
- 5) Inagaki T, Satoh M, Fujii H, Yamada S, Shibamura M, Yoshikawa T, Harada S, Takeyama H, Saijo M. Acyclovir sensitivity and neurovirulence of herpes simplex virus type 1 with amino acid substitutions in the viral thymidine kinase gene, which were detected in the patients with intractable herpes simplex encephalitis previously reported. *Jpn J Infect Dis* (in press)

〔学会発表〕(計7件)

- 1) 大村夏美, 藤井ひかる, 吉川智城, 山田壮一, 原田志津子, 竹山春子, 西條政幸. チミジンキナーゼ変異関連アシクロビル耐性単純ヘルペスウイルス 1 型の病原性解析. 第 25 回抗ウイルス療法研究会総会, 東京, 2015 年 5 月
- 2) 大村夏美, 藤井ひかる, 吉川智城, 山田

壮一, 原田志津子, 竹山春子, 西條政幸. チミジンキナーゼ変異関連アシクロビル耐性単純ヘルペスウイルス 1 型の病原性. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 福岡, 2015 年 11 月

- 3) 西條政幸. 単純ヘルペス脳炎の診断におけるアシクロビル耐性株の検出. 第 21 回日本神経感染症学会総会・学術集会, 金沢, 2016 年 10 月
- 4) Fujii H, Kakiuchi S, Omura N, Shibamura M, Yoshikawa T, Yamada S, Harada S, Saijo M. Analysis of acyclovir resistant herpes simplex virus 1 variants, emergence in patients with stem cell transplantation. The 64<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Virology, Sapporo, October 2016
- 5) 原田志津子, 藤井ひかる, 吉河智城, 大村夏美, 稲垣拓也, 柴村美帆, 加藤博史, 山田壮一, 西條政幸. DNA ポリメラーゼ変異によるアシクロビル耐性 HSV-1 を特異的に誘導するためのシステム開発. 第 27 回抗ウイルス療法学会学術集会・総会, 熊本, 2017 年 5 月
- 6) 藤井ひかる, 垣内五月, 大村夏美, 柴村美帆, 吉河智城, 山田壮一, 原田志津子, 西條政幸. 造血幹細胞移植患者におけるアシクロビル耐性単純ヘルペスウイルス 1 型の遺伝子変異の経時的な解析. 第 27 回抗ウイルス療法学会学術集会・総会, 熊本, 2017 年 5 月
- 7) 藤井ひかる, 原田志津子, 吉河智城, 大村夏美, 稲垣拓也, 柴村美帆, 加藤博史, 山田壮一, 西條政幸. DNA ポリメラーゼ変異によるアシクロビル耐性 HSV-1 を特異的に誘導するためのシステム開発. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2017 年 10 月

〔図書〕(計1件)

- 1) 西條政幸. 単純ヘルペス脳炎における単純ヘルペスウイルスの遺伝子診断, アシクロビル耐性株の検出において現在どのようなことがわかっているのか. 胆汁ヘルペス脳炎診療ガイドライン, 「単純ヘルペス脳炎診療ガイドライン」作成委員会, 南光堂, 東京, pp41-45

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

西條政幸 (Masayuki Saijo), 国立感染症研究所ウイルス第一部・部長

研究者番号：50300926

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4)研究協力者

藤井ひかる (Hikaru Fujii), 国立感染症研究所ウイルス第一部・流動研究員

山田壮一 (Souichi Yamada), 国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官

原田志津子 (Shizuko Harada), 国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官

大村夏美 (Natsumi Omura), 国立感染症研究所ウイルス第一部・実習生

吉河智城 (Tomoki Yoshikawa), 国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官