

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05195

研究課題名(和文)ヘルペスウイルスのエントリートロピズム機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of the mechanism of herpesvirus entry tropism

研究代表者

末永 忠広 (Suenaga, Tadahiro)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：20396675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトヘルペスウイルスファミリーに属する単純ヘルペスウイルス・水痘帯状疱疹ウイルスの宿主細胞侵入(エントリー)、及びウイルスエンベロープと宿主膜の融合を引き起こす宿主側受容体を発見した。このエントリーと膜融合には、ウイルスエンベロープ分子上の糖鎖修飾が必要であり、修飾糖鎖の種類に依存して、ウイルスの組織侵入(エントリートロピズム)が制御されていることが判明した。一方、免疫細胞を正・負に制御するペア型レセプターが、ヒトヘルペスウイルス6型のエントリーを阻害する機能をもつこと、逆にマラリア病原虫では免疫逃避に利用されていることなど、ペア型レセプターをめぐる様々な病原体と宿主との攻防が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、主にヘルペスウイルスファミリーのウイルス粒子が宿主細胞へ侵入する機構を解析したものである。ウイルスがヒトなどの宿主に感染するためには、宿主の細胞内に侵入しなければならない。細胞侵入のための宿主側の受容体分子や侵入阻害分子、逆に侵入を惹起するウイルス側のエンベロープ分子とそれらの糖鎖修飾を明らかにすることによって、各ヘルペスウイルスファミリーのウイルスが、どの臓器や組織に侵入しやすいかのメカニズムを解明した。本研究の知見は、ウイルス侵入を阻害して、ヘルペスウイルスの感染予防や感染拡大の制御に役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We identified entry receptors of herpes simplex virus and varicella-zoster virus that are included in human herpesvirus family. These receptors induce the fusion between the viral envelope and host membrane during the viral entry into host cells. Glycosylation of the certain molecules on herpesvirus is required for the virus entry and membrane fusion mediated with the identified receptors. Furthermore, it is elucidated that the tissue, which these viruses preferentially entry (entry tropism), depends on the type of glycans. Paired receptor family is known to regulate immune cells positively and negatively. We clarified that certain paired receptor family molecules inhibit the entry of human herpesvirus-6 and the other paired receptor family molecule, LILRB1, is utilized for immune evasion by malaria parasites. These results suggested that paired receptor family molecules play an important role in the offense and defense between host and pathogens.

研究分野：ウイルス学、免疫学

キーワード：ヘルペスウイルス エントリー 膜融合(fusion) ペア型レセプター 免疫逃避 糖鎖修飾 マラリア病原虫

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトヘルペスウイルスファミリーに属する9種類のウイルスは、エンベロープを有し、宿主細胞への侵入(エントリー)は、エンベロープと宿主細胞膜の融合(fusion)を介して行われる。エンベロープと宿主細胞膜のfusionは、ウイルスのエントリーに必須であり、エンベロープ分子 glycoprotein B (gB)、gH/gL 複合体と各々のレセプターとの結合の共役をベースとして、単純ヘルペスウイルス(HSV)では、それらに加え gD と gD レセプター分子 HVEM、Nectin-1、-2 の結合が共役する。研究代表者らは、HSV の fusion を起こせる gB レセプターとして Paired Immunoglobulin-Like type2 Receptor α (PILR α) (*Cell* 2008)、Non-muscle myosin heavy chain-IIA (NMHC-IIA) (*Nature* 2010)、Myelin-Associated Glycoprotein (MAG) (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010)を報告した。

水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)は、血球細胞にエントリー後、全身に運ばれ、初感染時の水痘だけでなく、知覚神経節に潜伏感染した後、免疫低下時に発症する帯状疱疹を発症させ、また脳脊髄炎の原因ともなる。代表者らは、VZV の fusion が gB、gH/gL 複合体のみで起こることを示し、gB レセプターとして、神経組織特異的な分子 MAG を同定し、VZV の神経組織指向性の一因を明らかにした(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010)。さらに、代表者らは、血球細胞特異的に発現する VgBR、VgHR が、それぞれ、VZV gB、gH と結合することを見出した。これらのエントリーレセプターの組織分布は、ヘルペスウイルスがエントリーする組織特異性(トロピズム)を説明する上で重要な因子である。

一方、代表者らは、VZV の MAG を介した fusion・エントリーに、gB 上の特定の糖鎖が必須であることを報告した(*J. Biol. Chem.* 2015)。さらに、HSV gB と PILR α や MAG の結合においても、gB 上の特定の糖鎖修飾が必須であることがあきらかとなってきた。すなわち、宿主側だけではなく、ウイルス側にもエントリーを規定する要因があることが示唆された。

ヒトヘルペスウイルス 6A、6B 型(HHV-6A、-6B)は、T 細胞にエントリー後、乳幼児の突発性発疹や主に骨髄移植患者での脳症を起こす。さらに、HHV-6A、-6B は骨髄系細胞に潜伏感染する。しかし、HHV-6A、-6B のエントリーレセプターとして報告されていた CD46 はユビキタスに、HHV-6B のエントリーレセプターである CD134 は活性化 T 細胞にだけ発現するものなので、CD46、CD134 だけでエントリートロピズムを説明できない。代表者らは、以前 HHV-6A、-6B の fusion に gB、gH/gL/gQ1/gQ2 複合体が必須であることを報告した(*J. Virol.* 2013)。新たに、代表者らは、HHV-6A、-6B の gH/gL/gQ1/gQ2 複合体に結合する骨髄系細胞特異的なペア型レセプター分子 H6IR を同定した。H6IR がこの複合体と結合することから、HHV-6A、-6B のエントリーに関与する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

ウイルスが種を保存するためには、ウイルスのみでは自己複製ができないため、宿主細胞にエントリーし、宿主の核酸合成やタンパク合成機能を利用する。また、ウイルスが引き起こす症状の多くが、エントリーした細胞を障害したり、がん化など宿主細胞形質を変化させることによる。すなわち、ウイルスの生活環の上でも、ウイルスが疾患を引き起こす第一段階としても、どの組織の細胞に侵入するかというエントリートロピズムは極めて重要である。

本研究では、上記の9種あるヒトヘルペスウイルスの中でも、1) VZV のエントリーのトロピズムを決定する細胞毎に異なる受容体 MAG、VgBR、VgHR、2) HSV のエントリーにおいて、糖鎖がどのようにエントリーする細胞の決定に関与しているのか、3) HHV-6 が骨髄系細胞にエントリーする際、ペア型レセプター分子 H6IR がどのように関与しているかを中心に、それぞれ解析し、各ウイルスのトロピズムを規定するメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

- 1) VgBR、VgHR を発現していない細胞に、これらをそれぞれ強制発現させた細胞、あるいは、VgBR を CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトした細胞を作出する。これらの細胞に、VZV を感染させ、感染効率を解析する。
- 2) gB の糖鎖修飾が異なる HSV を作出し、MAG あるいは PILR α 発現細胞に感染させる。さらに、この糖鎖修飾が異なる HSV の感染を *in vivo* にて解析する。
- 3) H6IR を発現していない細胞に、H6IR を強制発現させた細胞、あるいは、H6IR を CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトした細胞を作出する。これらの細胞に、HHV-6 を感染させ、感染効率を解析する。

4. 研究成果

- 1) VgBR、VgHR 強制発現細胞は、それぞれ VZV gB、VZV gH 可溶性タンパク質と結合した。逆に VZVgB、VZV gH を培養細胞に強制発現した場合、あるいは VZV 感染細胞上でも、gB、gH はそれぞれ特異的に VgBR、VgHR 可溶性タンパク質と結合した。また、gB と VgBR、gH と VgHR の結合は fusion を惹起した。抗 VgBR あるいは抗 VgHR 抗体は、VgBR、VgHR 強制発現細胞への VZV 感染を阻害し、VgBR をノックアウトした細胞では VZV 感染効率は低下した。VZV は、宿主体内では、血球細胞に感染した状態で全身に運ばれ、水痘や脳炎、知覚神経節への潜伏感染などを引き起こすと考えられている。以上のことから、VZV は VgBR、VgHR を介して血球細胞にエントリーし、神経組織に運ばれ、血球細胞から神経組織に移行する際に、神経組織に発現し

ている MAG を介してエンタリーすることが判明した (Suenaga et. al 論文投稿中)。さらに、gB と VgBR の結合においても gB 上の糖鎖が必要であること、また VgBR が発現する宿主細胞膜の糖鎖も、VgBR と gB との結合さらには、fusion やエンタリーに関与することが明らかとなった。

- 2) 代表者らが以前報告した通り、MAG あるいは PILR α の可溶性タンパク質は、HSV gB 発現細胞、HSV 感染細胞上の gB と特異的に結合する (*Cell* 2008, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010)。糖鎖を認識できない変異 MAG、変異 PILR α 可溶性タンパク質は gB と結合できず、逆に変異 MAG、変異 PILR α 発現細胞は、可溶性 gB に認識されなかった。また、変異 MAG、変異 PILR α は HSV における fusion を惹起できず、変異 MAG、変異 PILR α 発現細胞は、HSV 感染に抵抗性であった。このことから、MAG-gB 間の結合、PILR α -gB 間の結合を介した HSV のエンタリーは、gB 上の糖鎖修飾依存的であることが判明した。次に、異なる糖鎖修飾酵素 ST-A あるいは ST-B を安定発現させた細胞に HSV を感染させ、その培養上清から、HSV^{ST-A}、HSV^{ST-B} を産生させた。HSV^{ST-A} は、MAG 発現細胞に、HSV^{ST-B} は PILR α 発現細胞に効率よくエンタリーした。さらに、野生型 HSV (HSV^{WT}) に対して、MAG ノックアウトマウスは、野生型マウスよりも抵抗性であったが、HSV^{ST-A} に対して、MAG ノックアウトマウスは抵抗性が增強した。一方、PILR α ノックアウトマウスは、HSV^{ST-B} に対しては野生型マウスに比較して抵抗性であった。以上のことから、HSV のトロピズムは受容体の発現組織のみならず、ウイルス側の糖鎖修飾にも依存することが考えられた。本仮説を明らかにするために、さらに、糖鎖修飾酵素をノックアウトした細胞を用いて HSV の糖鎖修飾を変化させることで、同様に感染効率を *in vitro*, *in vivo* で検討する必要がある。
- 3) H6IR は、骨髄系細胞に発現するペア型レセプターである。ペア型レセプターは、細胞外領域は高度に相同性を有し、細胞内領域に免疫細胞を活性化する ITAM モチーフもしくは抑制する ITIM モチーフを有する分子群である。このことから、H6IR は HHV-6 gH/gL/gQ1/gQ2 複合体と結合し、免疫細胞の活性を制御することが考えられた。H6IR の活性を測定するレポーター細胞は、gH/gL/gQ1/gQ2 複合体によって活性化した。しかし、H6IR を発現する培養細胞でいくつかのサイトカイン産生等を測定したが、コントロール刺激と gH/gL/gQ1/gQ2 複合体での刺激で明らかな差を認めることはできなかった。現時点では、gH/gL/gQ1/gQ2 複合体と H6IR の結合を介した免疫細胞機能を制御するメカニズムは明らかになっていない。一方、gH/gL/gQ1/gQ2 複合体は fusion に関与するので、H6IR が HHV-6 の fusion に関与するかを検討したところ、驚くべきことに、H6IR 発現によって、HHV-6 の fusion を促進するのではなく阻害した。さらに H6IR 強制発現細胞は、HHV-6 のエンタリーに抵抗性を示した。逆に H6IR ノックアウト細胞では、野生型細胞に比較して、HHV-6 感受性となった。以上のことから、H6IR は、HHV-6 gH/gL/gQ1/gQ2 複合体とその受容体 CD46 との結合による fusion と HHV-6 のエンタリーを阻害することが考えられた。阻害のメカニズムとして、gH/gL/gQ1/gQ2 複合体との結合において、H6IR が CD46 と競合することが考えられた。しかし、結合阻害実験において、H6IR は両者の結合を阻害しなかった。実際、CD46 と H6IR では、gH/gL/gQ1/gQ2 複合体上の結合箇所が異なることが判明し、H6IR 結合によって、gH/gL/gQ1/gQ2 複合体の立体構造変化が起こり、CD46 と結合しても fusion 活性を発揮できないことが想定された。一方で、gH/gL/gQ1/gQ2 複合体と結合し、骨髄系細胞に発現する別のペア型レセプター H6IR2 も見いだした。H6IR2 も、HHV-6 の fusion を阻害し、H6IR2 強制発現細胞は、HHV-6 のエンタリーに抵抗性を示し、H6IR2 ノックアウト細胞は、HHV-6 感受性となった。このことから、H6IR2 も H6IR と同様に、HHV-6 からのエンタリーに防御的に作用することが考えられるが、初代培養細胞もしくはヒト血液中では、H6IR、H6IR2 は同一の細胞に発現していることがわかった。よって、より生理的条件下で、H6IR、H6IR2 の HHV-6 エンタリーにおける機能を明らかにするためには、この 2 分子が gB と CD46 との結合によるエンタリーに作用するメカニズムを同時に解析する必要性が課題として残されている。

本研究では、H6IR、H6IR2 以外のいくつかのペア型レセプターと各ヒトヘルペスウイルスの相互作用を解析してきた。実際、ペア型レセプターのひとつ LILRB1 はヒトサイトメガロウイルス UL18 と結合することが知られている。UL18 は LILRB1 を介してヒトの NK 細胞を負に制御し、宿主免疫から逃避している。本研究でも LILRB1 と他のヘルペスウイルスをはじめとする病原体との相互作用を解析したが、LILRB1 は熱帯熱マラリア病原虫の感染赤血球分子 LIFIN と結合し、マラリア病原虫は、サイトメガロウイルスと同様に、LILRB1 を介して NK 細胞や B 細胞を負に制御することによって宿主免疫から逃避することが明らかとなった (Saito et al. *Nature* 2017)。このことから、ペア型レセプターによる免疫との相互作用は、ヘルペスウイルスだけでなく、様々な病原体と宿主であるヒトとの攻防の舞台となっていることが判明した。

以上の結果をまとめると、ヘルペスウイルスをはじめとする病原体のトロピズムは以下のように規定されると考えられる (図)。すなわち、glycoprotein のようなエンタリーに必須な分子とそのレセプターとの結合が必須であるが、(i) 宿主側のレセプターがどの組織に発現しているか、(ii) レセプターと結合するための glycoprotein の糖鎖修飾が適切

か、(iii) glycoprotein とレセプターの結合を阻害する細胞表面の糖鎖あるいは(iv) H6IRのようなタンパク質分子がエンタリーする細胞に発現しているかどうか、エンタリートロボリズムに強く影響を及ぼすと考えられる。これらに加え生体内では、病原体が、例えばペア型レセプターを介して免疫を負に制御することによって、免疫機構から逃避できるかどうか、病原体のエンタリーの可否に影響することが明らかとなった。

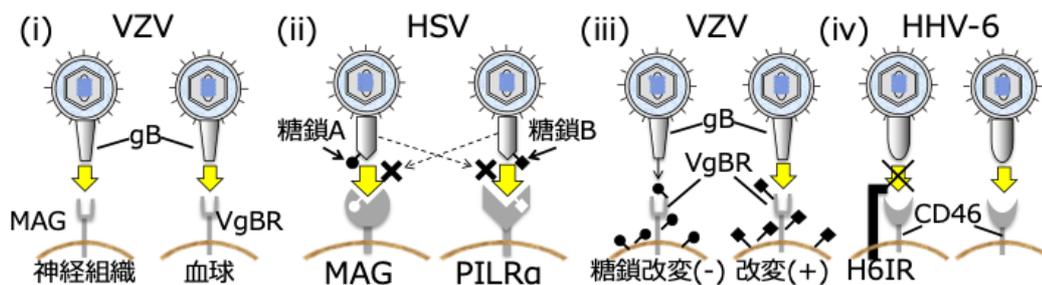


図 (i) VZVは神経組織にはMAGを介して、血球細胞にはVgBRを介してエンタリーする
(ii) MAG発現細胞は糖鎖AをもつHSV、PILRa発現細胞は糖鎖BをもつHSVに感受性となる
(iii) VgBR発現細胞は糖鎖変化によって、VZVへの感受性が高まる
(iv) H6IRはCD46を介するHHV-6エンタリーを阻害する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimizu Y, Kohyama M, Yorifuji H, Jin H, Arase N, Suenaga T, Arase H.	4. 巻 31
2. 論文標題 Fc RIIIA-mediated activation of NK cells by IgG heavy chain complexed with MHC class II molecules.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. Immunol.	6. 最初と最後の頁 2019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saito F, Hirayasu K, Satoh T, Wang CW, Lusingu J, Arimori T, Shida K, Palacpac NMQ, Itagaki S, Iwanaga S, Takashima E, Tsuboi T, Kohyama M, Suenaga T, Colonna M, Takagi J, Lavstsen T, Horii T, Arase H	4. 巻 552
2. 論文標題 Immune evasion of Plasmodium falciparum by RIFIN via inhibitory receptors.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 101-105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nature24994	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Dai HS, Griffin N, Bolyard C, Mao HC, Zhang J, Cripe TP, Suenaga T, Arase H, Nakano I, Chiocca EA, Kaur B, Yu J, Caligiuri MA	4. 巻 47
2. 論文標題 The Fc Domain of Immunoglobulin Is Sufficient to Bridge NK Cells with Virally Infected Cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 159-170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2017.06.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hirayasu K, Saito F, Suenaga T, Shida K, Arase N, Oikawa K, Yamaoka T, Murota H, Chibana H, Nakagawa I, Kubori T, Nagai H, Nakamaru Y, Katayama I, Colonna M, Arase H	4. 巻 1
2. 論文標題 Microbially cleaved immunoglobulins are sensed by the innate immune receptor LILRA2.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Nature Microbiol.	6. 最初と最後の頁 16054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nmicrobiol.2016.54	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 末永忠広、荒瀬尚	4. 巻 22
2. 論文標題 神経指向性ヘルペスウイルスに対する糖鎖を利用した新規感染制御法	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 NEUROINFECTION 神経感染症	6. 最初と最後の頁 117-125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 迫口 瑛史、末永 忠広、川口 寧、荒瀬 尚
2. 発表標題 ヘルペスウイルスの指向性に関わるglycoprotein Bの糖鎖修飾
3. 学会等名 第32回ヘルペスウイルス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tadahiro Suenaga
2. 発表標題 Misfolded proteins as the neo-self targets of autoantibodies
3. 学会等名 The 1st International Symposium on NEO-SELF (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuriko Muramatsu, Tadahiro Suenaga, Masako Kohyama, Hisashi Arase
2. 発表標題 Host Molecules Associating with Human Herpesvirus 6(HHV-6)
3. 学会等名 17th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akihito Sakoguchi, Tadahiro Suenaga, Yasushi Kawaguchi, Hisashi Arase
2. 発表標題 Glycosylation of glycoprotein B is involved in tropism of herpes simplex virus
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 末永 忠広
2. 発表標題 自己免疫疾患の抗体標的としてのネオ・セルフ
3. 学会等名 第17回 LEGEND Seminar 2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akihito Sakoguchi, Fumiji Saito, Kouyuki Hirayasu, Kyoko Shida, Masako Kohyama, Tadahiro Suenaga, Shiroh Iwanaga, Toshihiro Horii, Hisashi Arase
2. 発表標題 RIFINs of Plasmodium falciparum target multiple inhibitory receptors for immune evasion
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 末永 忠広, 川口 寧, 荒瀬 尚
2. 発表標題 ヘルペスウイルスの糖鎖修飾と組織指向性
3. 学会等名 第31回ヘルペスウイルス研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tadahiro Suenaga, Hisashi Arase
2. 発表標題 Regulation of Neurotropic Herpesvirus Infection Using Sialic-acid Bound Carbohydrates
3. 学会等名 XX World Congress of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tadahiro Suenaga, Akihito Sakoguchi, Yasushi Kawaguchi, Hisashi Arase
2. 発表標題 Analysis of glycan chains of herpes simplex virus during entry of the host cells
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 末永 忠広
2. 発表標題 Siglec 分子を介したヘルペスウイルス感染
3. 学会等名 糖鎖免疫 Glyco-Immunology 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tadahiro Suenaga, Yuriko Muramatsu, Yasuko Mori, Hisashi Arase
2. 発表標題 ヒトヘルペスウイルス6型に結合する新規宿主分子の同定と機能解析
3. 学会等名 第64回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 末永忠広、荒瀬尚
2. 発表標題 糖鎖を利用した単純ヘルペスウイルス、水痘帯状疱疹ウイルスの神経組織感染制御法の開発
3. 学会等名 第21回日本神経感染症学会総会・学術大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Tadahiro Suenaga
2. 発表標題 Structure of Varicella-Zoster Virus and Herpes Simplex Virus Glycoproteins B (gB) and gH Required for Membrane Fusion
3. 学会等名 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

免疫化学分野ホームページ http://immchem.biken.osaka-u.ac.jp 大阪大学微生物病研究所ホームページ http://immchem.biken.osaka-u.ac.jp

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
研究分担者	荒瀬 尚 (Arase Hisashi) (10261900)	大阪大学・微生物病研究所・教授 (14401)	