

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07592

研究課題名(和文) ヒトヘルペスウイルス6B新規細胞侵入レセプターの探索

研究課題名(英文) Identification of a novel human herpesvirus 6B entry mediated molecule

研究代表者

小川 寛人(Ogawa, Hirohito)

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：80455237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトヘルペスウイルス6B(HHV-6B)は、乳児期の突発性発疹の原因ウイルスである。HHV-6Bは、主に活性化したT細胞表面に発現するCD134を介して細胞に侵入し、増殖する。その後、唾液腺や神経、肝臓などに感染が拡大する。しかしながら、通常これらの臓器ではCD134は発現していない。それ故、HHV-6Bは異なる細胞表面分子を介して細胞内に侵入していると考えられる。本研究では、唾液腺由来培養細胞を用いて、CD134非依存的細胞侵入機構を解析した。その結果、Nectin-2を介する細胞侵入経路が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HHV-6Bは、突発性発疹回復期にウイルスDNAが唾液で多量に検出されるため、この時期の唾液が感染源になると考えられる。ウイルスの唾液への排出機構を解明することは、乳幼児での突発性発疹および再活性化による合併症を防ぐ上で重要な課題となる。本研究では、唾液腺へのウイルス細胞侵入機構に着目し、これまでと異なる細胞侵入経路を見出した。また、ウイルスがどのようにして唾液に排出されるかを考察した。今後、効果的なウイルス排泄抑制方法を検討する事が可能となり、小児間の水平感染や再活性化による合併症を防ぐ事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Human herpesvirus 6B (HHV-6B) is a T-lymphotropic virus and the etiological agent of exanthem subitum. HHV-6B primarily propagates in T cells because its entry receptor, CD134, is mainly expressed by activated T cells. The virus then spreads to the host's organs, including the salivary glands, nervous system, and liver. However, CD134 expression is not detected in these organs. Therefore, HHV-6B may be entering cells via a currently unidentified cell surface molecule, but the mechanisms for this have not yet been investigated. In this study, we investigated a CD134-independent virus entry mechanism in the parotid-derived cell line. We determined that nectin cell adhesion molecule 2 (nectin-2) mediated virus entry.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ヒトヘルペスウイルス6B 細胞侵入 ウイルス感染メカニズム レセプター

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトヘルペスウイルス (HHV) -6B は、HHV-6A および HHV-7 と共に ヘルペスウイルス 亜科ロゼオウイルスに属する T 細胞親和性の 2 本鎖 DNA ウイルスである。これらは小児の突発性発疹の原因ウイルスであり、患児は突然の発熱後、解熱に伴い全身に紅斑性丘疹を呈する。初感染以降は体内に潜伏感染し、90%以上の成人が抗体を保有しているとされる。潜伏感染したウイルスは断続的に唾液へ排泄され、家庭内や保育所等の乳幼児福祉施設で小児への感染が起こると考えられている。HHV-6B は、再活性化による臓器移植後の脳炎や肺炎、肝障害、薬剤性過敏症候群との関連が近年問題視されており、小児科分野だけでなく多くの臨床分野でも注目されている。

HHV-6B は、活性化 T 細胞表面に発現する CD134 (OX40) を介して細胞に侵入することが知られている。すなわち、HHV-6 が T リンパ球親和性ウイルスである所以である。しかしながら、感染患者では T 細胞のみならず脳、肝臓、唾液腺等の細胞への感染が、遺伝子検出や抗原検出により認められており、T 細胞上の OX40 を細胞侵入受容体 (レセプター) とする HHV-6B がどのように脳や肝臓、唾液腺に感染するのか謎である。異なる細胞表面分子を細胞侵入レセプターとして感染することが予想されるが、この機構に関する研究は進んでいない。全てのヘルペスウイルスのプロトタイプと言われている単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) においては、細胞侵入に必要なウイルス糖蛋白質 (リガンド) とレセプターが複数みとめられているため、HHV-6B においても新規細胞侵入レセプターが発見される事が期待された。

## 2. 研究の目的

我々のこれまでの研究では、突発性発疹回復期にウイルス DNA が唾液から多量に検出されており、この時期の唾液が感染源になると考えている。唾液腺ではウイルス DNA や抗原が検出される事が知られており、HHV-6B の持続感染部位の可能性が示唆されている。そのため、唾液腺細胞に HHV-6B がどのように感染するか明らかにすることは、HHV-6B が唾液へ排出されるメカニズムの解明や、突発性発疹およびウイルス再活性化による合併症を防ぐ上で必要となる。本研究では、唾液腺細胞において HHV-6B の細胞侵入に関与する分子を特定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 唾液腺細胞由来 cDNA ライブラリーの作出

唾液腺由来培養細胞である HSY 細胞の OX40 遺伝子を CRISPR/Cas9 システムで改変し、細胞表面に OX40 を発現しない細胞 (ex6 C7 細胞) を作出した。本細胞からレトロウイルスベクタープラスミド (pMX) を用いた cDNA ライブラリーを構築した。

### (2) cDNA ライブラリー由来遺伝子発現細胞の作出、およびウイルス感染に関与する細胞分子のスクリーニング

T 細胞由来細胞のうち、これまでに HHV-6B 感受性の報告がない CCRF-HSB-2 細胞に上記(1)で構築した cDNA ライブラリーを導入し、恒常的に cDNA ライブラリー由来遺伝子を発現する細胞 (lib-CCRF-HSB-2 細胞) を作出した。lib-CCRF-HSB-2 細胞に HHV-6B を接種し、ウイルス感染が認められた細胞のみをセルソーターでソーティングした。ソーティングを数回繰り返した後、細胞から DNA を抽出して PCR で候補遺伝子の検出およびシーケンサーで塩基配列解析を行った。

### (3) 候補遺伝子恒常発現細胞の作出およびウイルス感受性の確認

上記(2)で検出された候補遺伝子の cDNA を pMX にクローニングし、CCRF-HSB-2 細胞で恒常的に発現させた。この細胞に HHV-6B を接種しウイルス感染の有無を確認した。

### (4) 哺乳類細胞発現プラスミドの作出と共免疫沈降法

ウイルス糖タンパク質および上記(2)で検出された候補遺伝子の cDNA を FLAG および HA タグ配列と共に pCAGGS プラスミドにクローニングし、293T 細胞に導入した。72 時間後、細胞を Triton-X100 を含む細胞溶解液で溶解し、発現蛋白質を回収した。発現蛋白質は、抗 FLAG および抗 HA 抗体が結合した magnetic agarose と結合させ、共免疫沈降に供した。

## 4. 研究成果

HSY 細胞に HHV-6B 接種後 48 時間で RNA を抽出し、RT-PCR 法にてウイルス mRNA の検出を試みたところ、最初期遺伝子 (IE) である U91 と後期遺伝子 (L) である U100 mRNA が検出された。ま

た、間接蛍光抗体法で、p41 抗原も検出されたため、HSY 細胞が HHV-6B 感受性であることが明らかになった (図 1)。OX40 を介したウイルス感染を除外するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて HSY 細胞の OX40 遺伝子を改変し、細胞表面に OX40 を発現しない HSY 細胞 (ex6 C7 細胞) を作成した。HSY 細胞と同様に ex6 C7 細胞においてもウイルス感受性を確認したところ、ウイルス接種細胞において、U91 および U100 mRNA、また p41 抗原が検出された。このことから OX40 を介さないウイルスの細胞侵入経路が存在する事が示唆された。そこで、ex6 C7 細胞から cDNA ライブラリーを構築し、本ライブラリーを用いて lib-CCRF-HSB-2 細胞を作成し、lib-CCRF-HSB-2 細胞に HHV-6B を接種して感染細胞をソーティングした。複数世代後、感染細胞から DNA を抽出し、遺伝子増幅および塩基配列解析を行い、候補遺伝子配列を獲得した。これらの候補遺伝子を CCRF-HSB-2 細胞で恒常的に発現させ、ウイルス接種したところ Nectin-2 発現細胞 (HSB2-nec2 細胞) で、p41 抗原が検出された (図 2)。Nectin-2 は免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、カドヘリンと協調して上皮細胞におけるアドヘレンスジャンクション (AJ) の形成などに関わる接着分子である。HSB2-nec2 細胞の Nectin-2 は高発現であったが、OX40 高発現細胞 (HSB2-OX40 細胞) に比べて、ウイルス感染細胞数は少なかったため、親細胞である CCRF-HSB-2 細胞の内因性の問題、またはウイルスと Nectin-2 の結合力が非常に弱いことが示唆された。CRISPR/Cas9 システムを用いて ex6 C7 細胞細胞の Nectin-2 遺伝子をノックアウトした ex6-4 C7-nec2-KO 細胞 (OX40 改変、かつ Nectin-2 ノックアウト細胞) を作成し、ウイルス接種したところ、HSY 細胞 (OX40 微発現) や ex6-4 C7 細胞 (OX40 改変) と比較して、p41 抗原陽性細胞数が有意に減少したため、Nectin-2 が唾液腺細胞において、HHV-6B の細胞侵入を介する分子であることが示唆された。

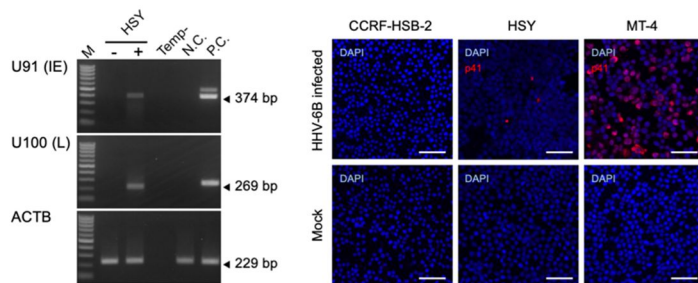


図 1. HSY 細胞における HHV-6B 感受性

そこで、Nectin-2 が結合するウイルス側の分子を検索した。ヘルペスウイルスの細胞侵入は、ウイルスエンベロープ上にある糖タンパク質が細胞表面のレセプターに作用することによって開始される。HSV の細胞侵入には、これまでに 4 つの糖タンパク質 (gB、gD、gH および gL) が知られており、これらが細胞表面のレセプター (ヘパラン硫酸や Nectin-1、Nectin-2、HVEM、PILR、MAG、NM-) に作用する。糖タンパク質とレセプターの組み合わせは細胞の種類によって異なっており、これによりウイルスが様々な細胞 (組織) に感染することが可能となっている。HHV-6B では、8 つの糖タンパク質 (gH、gL、gM、gN、gB、gO、gQ1 および gQ2) がエンベロープ上にある事が知られており、そのうちの gH/gL/gQ1/gQ2 複合体がレセプターである OX40 に作用して、細胞へ侵入することができる。gH/gL/gO 複合体や gB モリグランド候補として考えられており、本研究では gB に着目した。293T 細胞に HHV-6B gB 発現プラスミドと Nectin-2 発現プラスミドを導入し、両組換え蛋白質発現後に共免疫沈降を行ったところ、gB と Nectin-2 は共沈した。Nectin-2 は、一回膜貫通ドメインを持ち細胞外領域と細胞内領域がある (図 3A)。細胞外領域には免疫グロブリン様ドメインとして、V 領域 (可変領域) に類似する V セ

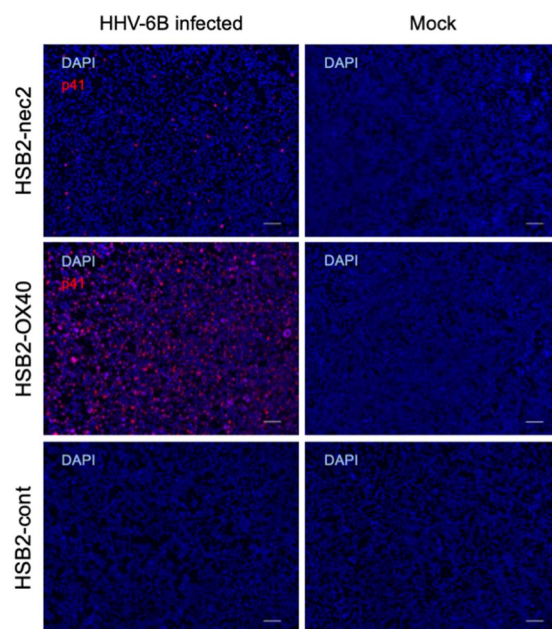


図 2. HSB2-nec2 細胞における HHV-6B 感受性

そこで、Nectin-2 が結合するウイルス側の分子を検索した。ヘルペスウイルスの細胞侵入は、ウイルスエンベロープ上にある糖タンパク質が細胞表面のレセプターに作用することによって開始される。HSV の細胞侵入には、これまでに 4 つの糖タンパク質 (gB、gD、gH および gL) が知られており、これらが細胞表面のレセプター (ヘパラン硫酸や Nectin-1、Nectin-2、HVEM、PILR、MAG、NM-) に作用する。糖タンパク質とレセプターの組み合わせは細胞の種類によって異なっており、これによりウイルスが様々な細胞 (組織) に感染することが可能となっている。HHV-6B では、8 つの糖タンパク質 (gH、gL、gM、gN、gB、gO、gQ1 および gQ2) がエンベロープ上にある事が知られており、そのうちの gH/gL/gQ1/gQ2 複合体がレセプターである OX40 に作用して、細胞へ侵入することができる。gH/gL/gO 複合体や gB モリグランド候補として考えられており、本研究では gB に着目した。293T 細胞に HHV-6B gB 発現プラスミドと Nectin-2 発現プラスミドを導入し、両組換え蛋白質発現後に共免疫沈降を行ったところ、gB と Nectin-2 は共沈した。Nectin-2 は、一回膜貫通ドメインを持ち細胞外領域と細胞内領域がある (図 3A)。細胞外領域には免疫グロブリン様ドメインとして、V 領域 (可変領域) に類似する V セ

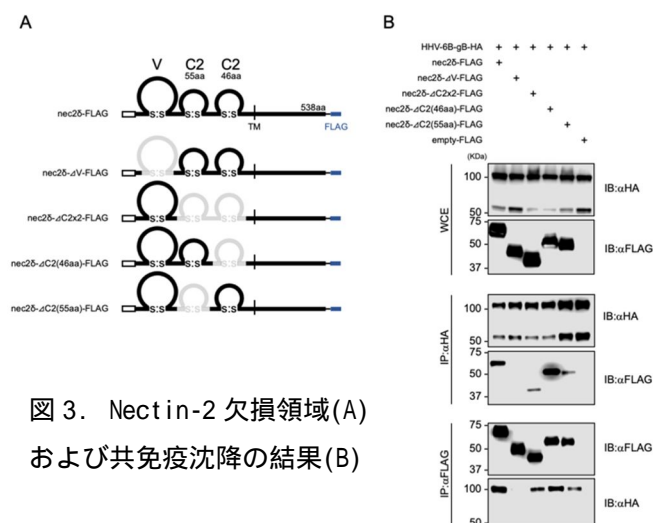


図 3. Nectin-2 欠損領域 (A) および共免疫沈降の結果 (B)

ット1個、またC領域(定常領域)に類似するCセット(そのなかでも、V領域に類似の配列を持つC2)を2個持つ。VセットとC2セットを欠損したNectin-2を発現するプラスミドを作出し、HHV-6B gB発現プラスミドとともに293T細胞に導入し、両組換え蛋白質発現後に共免疫沈降を行ったところ、gBはVセット欠損Nectin-2とは共沈しなかったため、gBはVセット領域と相互作用する事が示唆された(図3B)。

HHV-6BとNectin-2の結合力は非常に弱いことが考えられるが、HHV-6BはNectin-2(Vセット領域)を介して唾液腺細胞に侵入する事が示唆された。HHV-6Bによる疾病は突発性発疹だけで無く、ウイルス再活性化による臓器移植後の脳炎や肺炎、肝障害、薬剤性過敏症候群との関連が近年問題視されている。しかしながら、これらの病態の多くはウイルスのリンパ球への感染だけでは解明できてない。HHV-6Bの非リンパ球への細胞侵入機構が更に解明されることで、これまで明らかにされていない病態解明が進むと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 6件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Ogawa Hirohito, Fujikura Daisuke, Namba Hikaru, Yamashita Nobuko, Honda Tomoyuki, Yamada Masao	4. 巻 14
2. 論文標題 Nectin-2 Acts as a Viral Entry Mediated Molecule That Binds to Human Herpesvirus 6B Glycoprotein B	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 160 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v14010160	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa Hirohito, Honda Tomoyuki	4. 巻 In press
2. 論文標題 Viral sequences are repurposed for controlling antiviral responses as non-retroviral endogenous viral elements	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Medica Okayama	6. 最初と最後の頁 -
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 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小川 寛人, 藤倉 大輔, 難波ひかる, 山下 信子, 本田 知之, 山田 雅夫
2. 発表標題 ヒトヘルペスウイルス6Bの新規細胞侵入レセプターの探索
3. 学会等名 第68回 日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Li Haokun, 難波ひかる, 小川 寛人, 本田 知之
2. 発表標題 Regulation of the major immediate early gene promoter by tegument proteins of human herpesvirus-6
3. 学会等名 第68回 日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 難波ひかる, 小川寛人, 山下信子, 山田雅夫
2. 発表標題 HHV6Bテグメント蛋白質間相互作用の網羅的解析
3. 学会等名 第67回 日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鳥越 貞義, 渡辺 正博, 難波 ひかる, 山下 信子, 小川 寛人, 山田 雅夫, 菅 秀, 根来 麻奈美
2. 発表標題 唾液からのHHV6とHHV7のDNA検出率の前方視的検討 保育園入園半年と非就園半年の比較
3. 学会等名 第60回 日本臨床ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 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	山田 雅夫  (Yamada Masao)  (40166731)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授   (15301)	
研究 分担者	藤倉 大輔  (Fujikura Daisuke)  (70547794)	北里大学・獣医学部・特任准教授   (32607)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------