

令和 4 年 9 月 7 日現在

機関番号：34439

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07597

研究課題名(和文) 垂直感染する単純ヘルペスウイルスのトロピズムの分子機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of vertical transmission of herpes simplex virus.

研究代表者

白木 公康 (Shiraki, Kimiyasu)

千里金蘭大学・看護学部・教授

研究者番号：50135745

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)：単純ヘルペスウイルス(HSV)母子感染は、出産時に外陰部にHSVが存在して5%しか感染しない。母の外陰部株と新生児株の2セットを得て、母株と児株ではUL13遺伝子の変異を確認し、細胞トロピズムと温度感受性に差異が共通で米国株も含め19株のうち、出産後8日以内の5株中4株ではUL13の変異を認め、それ以降の14株中12株や性器ヘルペス27株ではUL13の変異を認めなかった。UL13の野生型と変異型UL13をHepG2細胞に発現させ、プロテオーム解析により、標的蛋白はelongation factor 1 deltaを同定した。以上のように、HSVの母子感染にUL13の関与を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単純ヘルペスウイルス(HSV)母子感染は新生児の致命的感染症になるため、帝王切開によりそのリスクは回避されている。本研究では、出産時に母体外陰部にウイルスが存在しても、容易に感染しないで、UL13に変異があるウイルスが選択された場合にだけ、母子感染が成立していることを明らかにした。そして、そのUL13は、細胞のトロピズムと温度感受性にかかわり、外陰部の温度と新生児の体温が外陰部株と新生児株と相関しており、生物学的特性と合致する事、および、そのUL13がelongation factor 1を標的としていることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Herpes simplex virus (HSV) mother-to-child transmission is only 5% even in the presence of HSV in vulva at birth. We obtained two sets of mother's genital and neonatal isolates, confirmed the UL13 gene mutation in the mother strain and the infant strain, and had a common difference in cell tropism and temperature sensitivity. UL13 mutations were found in 4 of the 5 strains within 8 days of birth, and no UL13 mutations were found in 12 of the 14 strains thereafter and 27 mothers' genital isolates. Wild-type and mutant UL13 proteins were expressed in HepG2 cells, and proteome analysis identified an elongation factor 1 delta alone as the target protein. As described above, the involvement of UL13 in the mother-to-child transmission of HSV was clarified.

研究分野：ウイルス学

キーワード：単純ヘルペスウイルス 母子感染 細胞トロピズム 温度感受性

## 1. 研究の背景

単純ヘルペスウイルス(HSV-2)による母子感染は、帝王切開等によって悲惨な新生児ヘルペスは回避されているが、14,000~20,000件の出産に1件の頻度で生ずる。海外の4万人規模の研究から、出産時に外陰部からHSVが分離された症例の中で、5%にのみ母子感染が発生した。この低い感染率から、母子感染を防ぐ機構の存在が考えられる。HSVの母子感染2例から、母の外陰部からと児からの分離株のペアの分離株を得た。そして、その2セットの生物学的性状の違いを解析した。母の外陰部株と新生児株の2セットを得て、母株と児株では、Vero細胞に対する感受性と肝細胞癌由来HepG2細胞のトロピズムと温度感受性(33度、37度、39度でのブラック形成能:細胞種によっては39度は致死性なので38度)に差異が共通で、15代継代しても安定であった。それで、この性状は遺伝子変異によるもので、安定な変異であることから、母子株の遺伝子の違いをほぼ全量域の遺伝子配列を比較して、その性状変化は児株のHSV-2 UL13の変異を有する事により、正常UL13を母株のように産生することができないことを見出した。

## 2. 研究の目的

本研究ではUL13変異による母子感染の臨床的評価とその基盤となるEEF1Dのリン酸化の増加あるいは抑制が、細胞内で、どのように温度感受性と細胞トロピズムに関与するかを解析する研究を目的としている。その結果より、変異型UL13 HSV-2が、EEF1Dを介して、どのように細胞トロピズムを変化させ、温度感受性を示すか?野生型UL13 HSV-2にとっての垂直感染バリアを、変異型UL13がどのようにEEF1Dを介し、バリアを乗り越え、垂直感染できる細胞内機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1)母と児から分離されたウイルスの解析は、以下のように実施した。母の株としては、第3セメスターの性器ヘルペス出産直前の妊婦の外陰部から分離したHSV-2の27株と日本の新生児分離株2株と米国アラバマ大学(UAB:Whitley博士)単純ヘルペスウイルスの母子感染した株を、米国に行きHSV-2株を得て、ウイルスをクローニングして、クローン化した株の培養液に含まれるDNAを濾紙に吸着し持ち帰った。濾紙からウイルスDNAを抽出した。これらを合わせて、UL13の変異の有無について検討した。

(2)母子感染にかかわるHSV-2 UL13(protein kinase)蛋白の標的蛋白の同定は、以下のように実施した。UL13(Protein kinase)がelongation factor 1 delta (EEF1D)をリン酸化することは、東大医科研川口らが報告していた。そのEEF1Dの機能としては、アミノ酸をリボソームへ運ぶ蛋白である。そこで、HepG2細胞に、野生型と変異型UL13を組み込んで、それぞれの蛋白を蛍光色素で標識して、2次元ゲルによる解析を行い。両者で差異のある蛋白を3回の実験で確認するプロテオーム解析をした。そして、この解析を通して、EEF1Dと数種の細胞性蛋白の複数の候補蛋白を同定した。それらについて、野生型と変異型UL13株の感染細胞でそれぞれの蛋白のリン酸化量をウエスタン法で比較した。そして、最終的にUL13発現細胞で特異的に変化が認められた標的蛋白はEEF1Dのみであることを確認した。

## 4. 研究成果

(1)UL13の変異と新生児株との特異性については以下の結果を得た。新生児ヘルペス由来HSV-2株を合わせ、19株のうち、出産後8日以内の5株中4株ではUL13の変異を認め、それ以降の14株中12株や第3セメスターの性器ヘルペス27株(1株を除き)ではUL13の有意な変異を認めなかった( $P<0.01$ )。

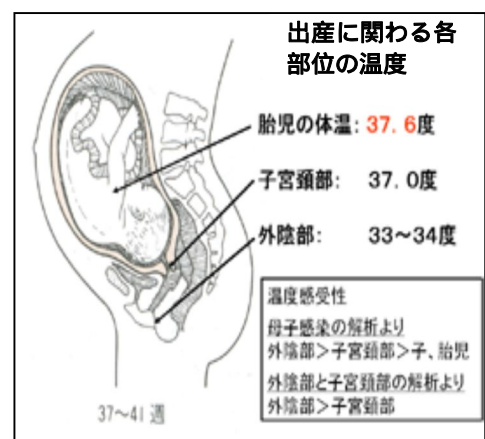
それらの株のHSV遺伝子でUL13遺伝子と、ほぼ同じ大きさの1.6kbで非必須遺伝子であるUL21の遺伝子変異(variation)の有無の頻度の比較のため、UL21の塩基配列の決定を行った。UL21にはVariationがなく、児の株ではUL13は変異を持つが、UL21では変異を持たないことが明らかになった。この同じ新生児から分離した株内で、遺伝子変異の比較で、UL13では、UL21

に比べ遺伝子変異が有意に高いことが明らかになった。以上のことから、新生児からのウイルス分離HSVの温度感受性と細胞トロピズムの特性と、それらのウイルスのUL21の遺伝子変異の統計学的比較から、UL13のみに遺伝子変異があることが確定された。

(2) UL13のprotein kinaseの酵素の標的蛋白は、プロテオーム解析から、これまでに報告されていたのと同じ蛋白であるEEF1Dのみであることが確認できた。しかし、残念ながら、UL13の標的蛋白が同定されても、UL13の変異が細胞トロピズムとどのように関係するかのメカニズムに関しては、明らかにできなかった。

(3) これまでにトロピズムは、インフルエンザウイルスとシアル酸(2-3、2-6)のように細胞表面の細胞レセプターによるトロピズム、プロテアーゼ等の酵素によるトロピズムに加えて、新しいトロピズムの概念を確立することになる。またこれが実際にHSV-2の垂直感染の回避に関与しているという新しい感染の概念になる。

(4) 本研究で明らかになったHSV母子感染に関わるウイルスの温度感受性と細胞トロピズムのなかで、温度感受性の臨床的意義については、右図のような外陰部の温度は33-34度で、胎児の体温は37.6度と、それぞれの特徴的な温度環境を理解する必要がある。そして、今回明らかにしたように、母の外陰部の温度は33度で、母のウイルスは、33度での増殖は良いが、温度感受性であるため、高温での増殖は悪い。したがって、母の温度感受性ウイルスが、直接感染するのではなく、母のウイルスの中で、UL13に変異を得て、37.6度で高い増殖能を獲得することによって、母児感染が成立することが考えられる。したがって、外陰部にHSVが存在しても5%しか感染できないような感染予防機構があり、UL13の変異が感染に必要であることが、本研究で明らかになった。



そして、UL13は、肝臓細胞由来 HepG2 とサル腎細胞由来 Vero 細胞で認められた細胞親和性にも関与していることから、児の体内での増殖に適する変異を獲得していることが、児の各組織での増殖性に関わっていると思われる。UL13がEEF1Dを標的としていることによって、母子感染を防ぐ、自然の新生児保護システムと思われる。逆に、UL13の機能が低下したウイルスが、温度感受性と細胞トロピズムの性状を児での感染が可能となる。

以上のように、HSV-2の母子感染・垂直感染の防御機構として、細胞側のEEF1Dを標的とするHSV-2のUL13(Protein kinase)の変異が必要というバリアが存在することで、HSV-2が容易に感染できないように、UL13変異株のみを感染可能とすることによって、容易に外陰部に存在する野生株が感染できないNatural barrierとなっていることが明らかになった。

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 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shiraki K, Sato N, Sakai K, Matsumoto S, Kaszynski RH, Takemoto M.	4. 巻 235
2. 論文標題 Derivation of optimal strategy based on past antiviral and favipiravir experiences.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmacology & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 108121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pharmthera.2022.108121.	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 Shiraki K, Toyama N, Tanaka K, Ito A, Yamamoto J	4. 巻 104
2. 論文標題 Effect of universal varicella vaccination and behavioral changes against coronavirus disease 2019 pandemic on the incidence of herpes zoster.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci.	6. 最初と最後の頁 185-192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2021.10.007. Epub 2021 Nov 9.	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 Oka T, Hishizawa M, Yamashita K, Shiraki K, Takaori-Kondo A.	4. 巻 27
2. 論文標題 Successful treatment with famciclovir for varicella zoster virus infection resistant to acyclovir.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Infect Chemother	6. 最初と最後の頁 755-758
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2020.12.013. Epub 2020 Dec 25	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 Shiraki K, Takemoto M, Daikoku T.	4. 巻 19
2. 論文標題 Emergence of varicella-zoster virus resistance to acyclovir: epidemiology, prevention, and treatment.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Expert Rev Anti Infect Ther.	6. 最初と最後の頁 1415-1425
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14787210.2021.1917992. Epub 2021 Apr 28	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 Onaka T, Shiraki K, Yonezawa A.	4. 巻 48
2. 論文標題 Improvement of acyclovir-resistant herpes zoster infection by amenamevir.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 e478-e479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.16027. Epub 2021 Jun 16	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 Shiraki K, Yasumoto S, Toyama N, Fukuda H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Amenamevir, a Helicase-Primase Inhibitor, for the Optimal Treatment of Herpes Zoster.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13081547.	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 Shiraki K, Tan L, Daikoku T, Takemoto M, Sato N, Yoshida Y.	4. 巻 180
2. 論文標題 Viral ribonucleotide reductase attenuates the anti-herpes activity of acyclovir in contrast to amenamevir.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antiviral Research	6. 最初と最後の頁 104829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.antiviral.2020.104829. Epub 2020 Jun 20.	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 Shiraki K, Daikoku T.	4. 巻 209
2. 論文標題 Favipiravir, an anti-influenza drug against life-threatening RNA virus infections.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmacology & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 107512
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pharmthera.2020.107512	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 Tan L, Sato N, Shiraki A, Yanagita M, Yoshida Y, Takemura Y, Shiraki K.	4. 巻 162
2. 論文標題 Everolimus delayed and suppressed cytomegalovirus DNA synthesis and the spread of infection and alleviated cytomegalovirus infection.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antiviral Research	6. 最初と最後の頁 30-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.antiviral.2018.12.004	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 Ikawa Y, Fujiki T, Nishimura R, Noguchi K, Koshino E, Fujiki A, Fukuda M, Kuroda R, Mase S, Araki R, Maeba H, Shiraki K, Yachie A.	4. 巻 25
2. 論文標題 Improvement of refractory acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 infection by continuous acyclovir administration.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Infect Chemother	6. 最初と最後の頁 65-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2018.07.004. Epub 2018 Jul 29	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------