

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03496

研究課題名(和文)ヘルペスウイルスの細胞指向性を規定する分子機構の解明

研究課題名(英文)Study on molecular mechanism of herpesvirus tropism

研究代表者

有井 潤 (Arii, Jun)

神戸大学・医学研究科・特命准教授

研究者番号：30704928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：9種存在するヒトヘルペスウイルスは、それぞれ特徴的な病態を引き起こすが、その指向性がどのように決定されているのかはわかっていない。本研究は、ヘルペスウイルスが、それぞれの標的細胞を好む分子機構を解明することを目指した。本研究では、上皮を好むHSV-1が、細胞間を効率よく伝播する分子基盤を明らかにし、さらにウイルス増殖におけるグリセロリン脂質の寄与を明らかにした。さらに、感染サイクルが比較的遅く、T細胞を好むHHV-6Aと細胞シグナルとの相互作用を明らかにした。本研究は多彩なヘルペスウイルスが、それぞれの標的細胞に適応するために必要なウイルス-宿主相互作用の一端を明らかにしたと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトを宿主とするヘルペスウイルスは9種存在するが、その中には抗ウイルス剤がほぼ効果がないものも存在する。本研究では、これらのヘルペスウイルスがそれぞれの標的細胞での増殖に必要な宿主因子を複数取得した。特にグリセロリン脂質であるPEの産生に関わるPcyt2の阻害剤は、マウス病態モデルにおける脳炎発症を抑制可能であった。すなわち、本研究は、さまざまなヘルペスウイルスに効果のある治療・予防薬を創生するための基盤となりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The nine species of human herpesviruses cause their own characteristic pathologies, but it is not known how their tropism is determined. This study aimed to elucidate the molecular mechanisms by which herpesviruses prefer their respective target cells. The study revealed the molecular basis for the efficient cell-to-cell transmission of HSV-1, which prefers epithelia, and the contribution of glycerophospholipids in viral replication. Furthermore, we showed a specific interaction between HHV-6A, which has a relatively slow infection cycle and prefers T cells, and cell signaling. This study may reveal some of the virus-host interactions required for the adaptation of diverse herpesviruses to their respective target cells.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ヘルペスウイルス MEK/ERK 脂質 ウイルス増殖 NF-kB ATF1

## 1. 研究開始当初の背景

ヘルペスウイルスは、我々人類にとってもっとも身近に存在を認識できるウイルスといえるかもしれない。ヒトを宿主とするヘルペスウイルスは 9 種存在が知られているが、いずれもヒトに終生続く潜伏感染を成立させることができる。このため、人類の 90% 以上は複数のヘルペスウイルスと共存関係にあるといえる。潜伏したヘルペスウイルスは、ストレスや免疫抑制など伴って再活性化され、病態を繰り返すことが知られている。この中でも、単純ヘルペスウイルス (HSV) やヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) は、重篤な脳炎の原因として知られている。特に最近、脳内のヘルペスウイルスとアルツハイマー病との因果関係が報告されており、これらの性状を理解する必要性が高まっている。一方、9 種のヒトヘルペスウイルスには、多くの遺伝子が保存され、ゲノム複製や粒子形成といった基本的な増殖機構は、ほぼ同じであるにも関わらず、それぞれの病態や症状が認められる部位はウイルスごとに異なる。これらのヘルペスウイルスの指向性がどのように決定され、それぞれの特徴的な病態を引き起こす原因となっているのかは全くわかっていない。

生体内での指向性とは異なり、多くのヘルペスウイルスは、実際にはほぼ全ての培養細胞で増殖可能である。例えば HSV は、生体内では上皮および神経において病態を引き起こし、上皮および神経由来の細胞で効率よく増殖可能であるが、実際にはほとんど全ての培養細胞において HSV は増殖可能である。一方、9 つあるヒトヘルペスウイルス中で例外的なことに、HHV-6 は、生体内で特徴的な T 細胞指向性を持ち、T 細胞由来の培養細胞においてのみ増殖する。本研究では、これらの違いが生まれる分子基盤に注目した。すなわち、(i) 上皮を好む HSV が細胞間を効率よく伝播する分子基盤、(ii) HSV が上皮で効率よく増殖するために重要なグリセロリン脂質の関与、(iii) HHV-6 特異的因子による細胞内シグナルの活性化、(iv) HHV-6A 感染 T 細胞において特異的に活性化する細胞内シグナルによるウイルス増殖抑制効果の 4 点について、詳細に解析した。

## 2. 研究の目的

本研究計画は、ヘルペスウイルスが引き起こす多彩な病態発現機構をより本質的に理解するために、上皮への指向性の強い HSV および、T 細胞のみで増殖する HHV-6 という対照的なウイルスが、これらの細胞を指向する分子機構を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (i) 上皮を好む HSV が細胞間を効率よく伝播する分子基盤

HSV は細胞株により、細胞間伝播の効率が異なることから、cDNA ライブラリを用いた発現クローニングにより、HSV 細胞間伝播効率を上昇する因子を網羅的に同定した。さらに、具体的な分子機構は不明ながら HSV 細胞間伝播に関与する gE と相互作用する宿主因子を質量解析によって同定した。これらの二つのスクリーニングの結果共通して得られた因子に注目した。

### (ii) HSV が上皮で効率よく増殖するために重要なグリセロリン脂質の関与

エンベロープウイルスである HSV が、上皮細胞においてどのように細胞由来膜を獲得し、効率よく粒子形成を行うのかに注目した。感染細胞において大きく変動する脂質としてグリセロリン脂質の一種であり、膜変性に重要な PE に着目した。PE 合成酵素である Pcyt2 の欠損および阻害剤を用いることで、PE 産生とウイルス増殖との関係を解析した。

#### (iii)HHV-6 特異的因子による細胞内シグナルの活性化

厳密に T 細胞を指向するという HHV-6 の特異的な性状を解析するため、HHV-6 ゲノムに特異的にコードされているウイルス因子 U14 に注目した。U14 と各種のレポータープラスミドを共発現させ、特異的に活性化するシグナルの同定を試みた。

#### (iv)HHV-6A 感染 T 細胞において特異的に活性化する細胞内シグナルによるウイルス増殖抑制

HHV-6A 感染 T 細胞において特異的に活性化する細胞内シグナルを探索した結果、ストレスに応答する cAMP シグナルに注目した。

### 4. 研究成果

#### (i)上皮を好む HSV が細胞間を効率よく伝播する分子基盤

上皮における単純ヘルペスウイルス (HSV) 増殖を増強する因子 PHB1 を、発現クローニングを用いて同定した。CRISPR/Cas9 KO システムを用いてその分子機構を詳細に解析し、PHB1 を介した MEK/ERK シグナルの活性化が、細胞質におけるウイルス粒子の輸送と、細胞間のウイルス伝播に貢献することを示した。MEK/ERK シグナルの阻害は、HSV が属するアルファヘルペスウイルス亜科のウイルスだけでなく、ベータウイルス亜科およびガンマヘルペスウイルス亜科のウイルスにおいても細胞間伝播を阻害することが可能であった。すなわち、今回同定した、PHB1 および MEK/ERK を介した細胞間伝播の促進は、HSV 特異的な現象ではなく、全ヘルペスウイルスに保存された、極めて重要な機構である可能性が示唆された [1]。

#### (ii)HSV が上皮で効率よく増殖するために重要なグリセロリン脂質の関与

HSV 感染細胞および非感染細胞を質量解析に供し、脂質を定量した。さまざまな脂質の中で、特に PE が感染に伴って特異的に減少していたため、PE の産生とウイルス感染との関係を解析した。まず、小胞体における PE 産生システムにおいて律速酵素である Pcyt2 の欠損を作成した。Pcyt2 欠損細胞では、HSV 増殖が有意に低下し、さらに電子顕微鏡解析の結果、細胞質においてウイルス粒子形成が阻害されていることが明らかとなった。さらに Pcyt2 の阻害剤を用いると、同様の現象が観察された。また、マウス脳炎モデルにおいて Pcyt2 阻害剤を用いると、生体内におけるウイルス増殖が低下し、致死率が低下した。すなわち、PE 産生はウイルス粒子形成とウイルス増殖に重要であり、抗ウイルス戦略の標的となりうると考えられた [2]。

#### (iii)HHV-6 特異的因子による細胞内シグナルの活性化

T 細胞において特異的に増殖する HHV-6 のトロピズムを解明するために、HHV-6 特異的遺伝子である U14 に注目した。U14 はウイルス粒子に豊富に含まれ、その増殖に必須であるとされているが、機能の詳細は不明であった。U14 と細胞因子との相互作用を解析したところ、細

胞生存に關与する細胞内シグナルである NF- $\kappa$ B の構成因子 p65 と会合することが明らかになった。実際に U14 発現細胞または HHV-6 感染細胞では、NF- $\kappa$ B シグナルを活性化させていた。また、NF- $\kappa$ B の阻害は、HHV-6 の遺伝子発現およびウイルス増殖を著しく低下させた。これらの結果から、U14 は NF- $\kappa$ B 構成因子 p65 を会合することで活性化し、ウイルス遺伝子発現を亢進することでウイルス増殖を促進していると考えられる [3]。

(iv)HHV-6A 感染 T 細胞において特異的に活性化する細胞内シグナルによるウイルス増殖抑制

HHV-6A 感染 T 細胞において、ストレスにตอบสนองする cAMP シグナルが特異的に活性化し、転写因子 CREB1 および ATF1 を活性化していた。CREB1 の欠損は、HHV-6 増殖に有意な影響を与えなかったものの、ATF1 の欠損は HHV-6 増殖を著しく上昇させた。RNA-seq を行ったところ、ATF1 欠損細胞では IFN- $\beta$  応答を惹き超す TLR3 などの発現が減弱していた。ATF1 欠損細胞において IFN- $\beta$  処理を行ったところ、ATF1 欠損に伴う HHV-6A 増殖の亢進はキャンセルされた。すなわち、HHV-6 感染に伴う ATF1 の活性化は、IFN- $\beta$  応答を誘導することでウイルス増殖を抑制していると考えられた。興味深いことに、HSV 感染に伴う IFN- $\beta$  応答は ATF1 に依存していなかった。すなわち本システムは、T 細胞において比較的穏やかに増殖する HHV-6 の性質を形作る原因の一つとなっている可能性が考えられた [4]。

1. Watanabe, M.; Arii, J.; Takeshima, K.; Fukui, A.; Shimojima, M.; Kozuka-Hata, H.; Oyama, M.; Minamitani, T.; Yasui, T.; Kubota, Y., et al. Prohibitin-1 Contributes to Cell-to-Cell Transmission of Herpes Simplex Virus 1 via the MAPK/ERK Signaling Pathway. *Journal of virology* **2021**, *95*, doi:10.1128/JVI.01413-20.
2. Arii, J.; Fukui, A.; Shimanaka, Y.; Kono, N.; Arai, H.; Maruzuru, Y.; Koyanagi, N.; Kato, A.; Mori, Y.; Kawaguchi, Y. Role of Phosphatidylethanolamine Biosynthesis in Herpes Simplex Virus 1-Infected Cells in Progeny Virus Morphogenesis in the Cytoplasm and in Viral Pathogenicity In Vivo. *Journal of virology* **2020**, *94*, doi:10.1128/JVI.01572-20.
3. Aktar, S.; Arii, J.; Tjan, L.H.; Nishimura, M.; Mori, Y. Human Herpesvirus 6A Tegument Protein U14 Induces NF-kappaB Signaling by Interacting with p65. *Journal of virology* **2021**, *95*, e0126921, doi:10.1128/JVI.01269-21.
4. Aktar, S.; Arii, J.; Nguyen, T.T.H.; Huang, J.R.; Nishimura, M.; Mori, Y. ATF1 Restricts Human Herpesvirus 6A Replication via Beta Interferon Induction. *Journal of virology* **2022**, *96*, e0126422, doi:10.1128/jvi.01264-22.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Arii J, Fukui A, Shimanaka Y, Kono N, Arai H, Maruzuru Y, Koyanagi N, Kato A, Mori Y, Kawaguchi Y.	4. 巻 94
2. 論文標題 Role of Phosphatidylethanolamine Biosynthesis in Herpes Simplex Virus 1-Infected Cells in Progeny Virus Morphogenesis in the Cytoplasm and in Viral Pathogenicity In Vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Virol	6. 最初と最後の頁 e01572-20.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01572-20.	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 Arii J, Maeda F, Maruzuru Y, Koyanagi N, Kato A, Mori Y, Kawaguchi Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 ESCRT-III controls nuclear envelope deformation induced by progerin.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 18877
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-75852-6.	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 Watanabe M, Arii J, Takeshima K, Fukui A, Shimojima M, Kozuka-Hata H, Oyama M, Minamitani T, Yasui T, Kubota Y, Takekawa M, Kosugi I, Maruzuru Y, Koyanagi N, Kato A, Mori Y, Kawaguchi Y.	4. 巻 95
2. 論文標題 Prohibitin-1 Contributes to Cell-to-Cell Transmission of Herpes Simplex Virus 1 via the MAPK/ERK Signaling Pathway.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Virol.	6. 最初と最後の頁 e01413-20.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01413-20.	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 Aktar S, Arii J, Nguyen TTH, Huang JR, Nishimura M, Mori Y.	4. 巻 96
2. 論文標題 Human Herpesvirus 6A Replication via Beta Interferon Induction.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Virol.	6. 最初と最後の頁 e0126422
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/jvi.01264-22.	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 F. Maeda, A. Kato, K. Takeshima, M. Shibasaki, R. Sato, T. Shibata, K. Miyake, H. Kozuka- Hata, M. Oyama, E. Shimizu, S. Imoto, S. Miyano, S. Adachi, T. Natsume, K. Takeuchi, Y. Maruzuru, N. Koyanagi, J. Arii, Y. Kawaguchi	4. 巻 96
2. 論文標題 Role of the Orphan Transporter SLC35E1 in the Nuclear Egress of Herpes Simplex Virus 1.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Virol.	6. 最初と最後の頁 e0030622.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.00306-22.	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 Arii J, Takeshima K, Maruzuru Y, Koyanagi N, Nakayama Y, Kato A, Mori Y, Kawaguchi Y	4. 巻 96
2. 論文標題 Role of the arginine cluster in the disordered domain of Herpes Simplex Virus 1 UL34 for the recruitment of ESCRT-III for viral primary envelopment.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Virol.	6. 最初と最後の頁 e0170421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01704-21.	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 Aktar S, Arii J*, Tjan LH, Nishimura M, Mori Y	4. 巻 95
2. 論文標題 Human Herpesvirus 6A Tegument Protein U14 Induces NF- B Signaling by Interacting with p65.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Virol.	6. 最初と最後の頁 e0126921
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01269-21.	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7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 S Aktar, J Arii, N Huong, J Huang, M Nishimura and Y Mori
2. 発表標題 ATF1 restricts human herpesvirus 6A replication via IFN-beta induction
3. 学会等名 46th ANNUAL INTERNATIONAL HERPESVIRUS WORKSHOP (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 有井 潤、S Aktar、T Nguyen、J Huang、西村光広、森 康子
2. 発表標題 ATF1はIFN応答を介してHHV-6Aの増殖を抑制する
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 有井 潤、S Aktar、T Nguyen、J Huang、西村光広、森 康子
2. 発表標題 転写因子ATF1 はHHV-6A の増殖を抑制する
3. 学会等名 第35回ヘルペスウイルス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 有井 潤
2. 発表標題 ヘルペスウイルス治療薬開発を目指したウイルス粒子形成機構の解析
3. 学会等名 第63回日本臨床ウイルス学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Salma Aktar, Jun Arii (Presenter), Lidya Handayani Tjan, Mitsuhiro Nishimura, and Yasuko Mori
2. 発表標題 Human herpesvirus 6A tegument protein U14 induces NF- B signaling by interacting with p65
3. 学会等名 The 19th Awaji international forum on infection and immunity (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 有井 潤
2. 発表標題 HHV-6Bのウイルス学
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Salma Aktar, Jun Arii, Lidiya Handayani Tjan, Mitsuhiro Nishimura, Yasuko Mo
2. 発表標題 Human herpesvirus 6A tegument protein U14 induces NF- B signaling by interacting with p65
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

〔図書〕 計2件

1. 著者名 森 康子、有井 潤	4. 発行年 2020年
2. 出版社 日本医師会	5. 総ページ数 1
3. 書名 日本医師会雑誌 HHV-6	

1. 著者名 有井 潤	4. 発行年 2022年
2. 出版社 春恒社	5. 総ページ数 5
3. 書名 臨床とウイルス ヘルペスウイルス治療薬開発を目指したウイルス粒子形成機構の解析	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 新規ウイルス増殖阻害剤	発明者 川口 寧、有井 潤	権利者 国立大学法人東京大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-158247	出願年 2020年	国内・外国の別 国内



〔取得〕 計0件

〔その他〕

research map  
https://researchmap.jp/junarii  
homepage  
https://www.med.kobe-u.ac.jp/virol/index.html

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