

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25293108

研究課題名(和文)水痘ウイルスのAntigenic modulationによる潜伏感染の解析

研究課題名(英文)Analysis of VZV latency induced by antigenic modulation

研究代表者

白木 公康 (Shiraki, Kimiyasu)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：50135745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：水痘帯状疱疹ウイルスに対する中和抗体による感染細胞処理で、抗原変調をきたし、感染性は消失し、神経細胞における状況と同じで、培養細胞での潜伏感染系を確立した。そして、前初期抗原の発現は認められるが転写因子Sp1との共局在状態が修飾され通常の感染細胞では認められない分布を示した。Buthionine sulfoximine (BSO)処理により、核からの共局在の消失が遅れ、潜伏感染化を阻止していた。さらに、DNAは潜伏感染化に伴いクロマチン結合性に移行するが、BSO処理では遊離型のDNAが多いことも確認された。

研究成果の概要(英文)：Treatment with neutralizing antibody against varicella-zoster virus of infected cell induced antigenic modulation leading to latent state similar to the latency in neurons. Colocalization of the immediate early proteins and the transcription factor SP1 in untrated infected cells was altered by the antigenic modulation. Buthionine sulfoximine (BSO) treatment slowed the disappearance of their colocalization from the nucleus and prevented latent infection. Furthermore, Viral DNA become chromatin-associated status in latent infection, but BSO increased the amounts of chromainted free viral DNA.

研究分野：ウイルス学

キーワード：水痘帯状疱疹ウイルス 抗原変調 潜伏感染

1. 研究開始当初の背景

水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) は、細胞溶解性の強いウイルスであるが、生体内では神経細胞に感染するとその細胞溶解性を失い、一部の遺伝子のみを発現するが、増殖しない潜伏感染状態となる。そして、この潜伏感染状態を脱して再増殖・再活性化して、帯状疱疹を発症する。このように通常の細胞では細胞溶解性が強い VZV がどのようにして、潜伏感染し、再活性化するかは全く明らかでなく、その解析モデルもなかった。

本研究では、細胞溶解性を制御して、遺伝子発現が神経細胞と同様な状況を作り出す細胞培養系で、世界で初めて、実験モデル系を樹立した。このモデル系は、VZV の感染性と感染の広がりを阻止する抗 gH 抗体を感染細胞培養系に添加することによって、感染性を制御する方法によって実施した。この実験はヒトの免疫グロブリン製剤では確立できず、抗 gH 抗体を使用するということによって可能となった実験系である。

2. 研究の目的

上記のように、細胞溶解性の強い VZV の感染を制御する過程、細胞内のウイルス蛋白の発現状況と局在、遺伝子制御等、ウイルスの感染精製過程の解明、さらに、潜伏感染化したゲノムを再活性化、すなわち、溶解感染系へ導く因子や過程を明らかにする。この過程を通して、体内で起こっている神経細胞での潜伏感染化の機構と再活性化の機構を、明らかにすること、さらに、それらの潜伏感染化と再活性化の過程を修飾する薬剤の検索と、その化合物の作用部位と作用様式を明らかにする実験を行う。このように、この実験系を用いて、潜伏感染のメカニズムの解明とそれに作用する薬剤により、ヒトでの VZV の潜伏感染化の阻止や再活性化の阻止につながる基礎研究となることを目的とした。

3. 研究の方法

Human embryonic lung (HEL) 細胞は、7% ウシ胎児血清 (FCS) 含有 MEM 培地で培養した。HEL 細胞に VZV Oka 株の cell-free ストックを室温・1時間吸着させて感染させ、2% FCS/MEM で1回洗浄後、Lytic 細胞は2% FCS/MEM で培養し、抗体処理細胞は洗浄後2時間、2% FCS/MEM で培養した後、抗 gH 抗体を終濃度 15 μ g/ml となるように添加した。また種々薬剤処理により、buthionine sulfoximine (BSO) を選択し、その処理については、抗体と同時に 10 μ g/ml

となるように BSO を添加した。

ウイルス抗原の発現と局在について

感染細胞を種々な時期に固定し、種々な抗体、特に転写にかかわる細胞因子とウイルス蛋白に対する抗体で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。そして、通常の感染細胞と比較して、抗 gH 抗体処理細胞で特異的に生じている現象を経時的に解析した。感染細胞はそれぞれ独特に発現様式をとるようで、抗原の分布や発現量によって、パターン分けして、それぞれの染色パターンの細胞を数量化して、抗原発現と細胞内局在のパターンと細胞数の時間的推移から、ウイルス蛋白や細胞由来転写因子の発現の推移を推測した。

ウイルス蛋白発現

ウイルス蛋白発現に関しては、抗 gH 抗体処理細胞を感染後経時的に融解し、SDS-PAE によって、タンパク質を SDS-PAGE で展開して、filter に転写後、各種抗体で染色し、ウエスタンブロット法で発現を確認した。

Chromatin immunoprecipitation

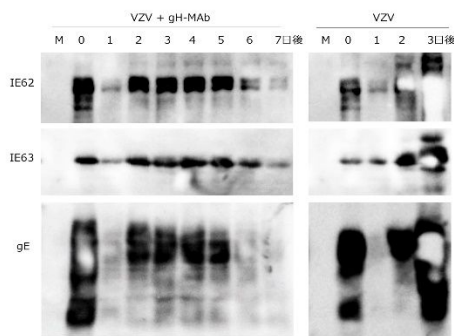
HEL 細胞 (6cm dish) に VZV を感染させ、(a) Lytic (1, 3 日後) (b) 抗 gH 抗体処理 (1, 3, 5, 7, 14 日後) (c) 抗体+BSO 処理 (1, 3, 5, 7, 14 日後) の各時点で、dish を PBS(-) で1回洗浄し1%ホルマリンで固定した(37度・10分間) glycine を終濃度 0.125M となるように加えて中和し(室温・5分間) PBS(-) で3回洗浄後、lysis buffer (1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl [pH 8.1]) を加えて溶解(氷上・10分間)した細胞を、スクレイパーで剥がしマイクロチューブに回収した。超音波処理(10 pulses, 20秒間, 80%) により、DNA のサイズを 300-2,000 bp に調整した後、遠心して上清を以下の免疫沈降に供した。抗ヒストン H4 抗体 (Millipore, cat. no. 07-108: rabbit polyclonal IgG recognizing unmodified human 10 Kd H4 histone) で、4度、14-16時間、反応させた後、Salmon sperm DNA-conjugated protein A agarose を加え、Low Salt, High Salt, LiCl wash buffers で各1回、TE で2回洗浄し、250 μ l の溶出 buffer で溶出した(室温・15分間) 20 μ l の 5M NaCl を添加し、65度・4時間反応させた(架橋の解除)後、10 μ l 0.5M EDTA, 20 μ l 1M Tris-HCl (pH 6.5), 2 μ l Proteinase K を添加し、45度・1時間反応させタンパクを分解した。PCI 抽出、エタノール沈殿を行い、100 μ l TE に溶解したサンプルを用いて、PCR (or

real-time PCR) を行った。

4. 研究成果

Western blot(図 1)の結果からは、IE62, IE63, gE とも、感染 0 日後は持ち込みのタンパクが多く検出されるが、1 日後には一旦タンパク量が減少する。その後、IE62 と gE は 2~5 日後、IE63 は 2~6 日後の間、タンパク量が一定レベルで推移した後、減少していく傾向であった。

C. Western Blot

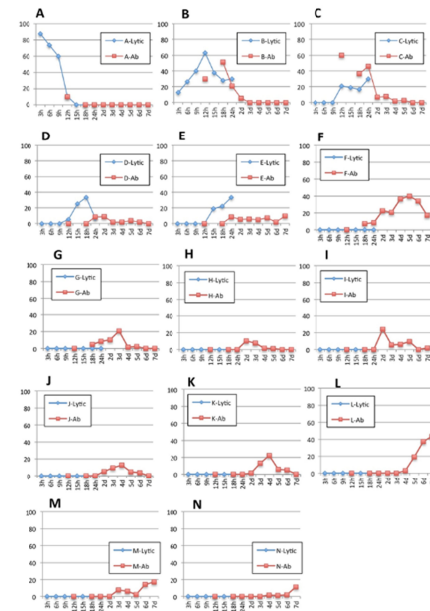


蛍光抗体法により、VZV の lytic 感染と抗体処理感染 (3, 6, 9, 12, 15, 18, 24 時間) の IE62 と IE63, Sp1 の発現・局在関係から、A~N に分類した

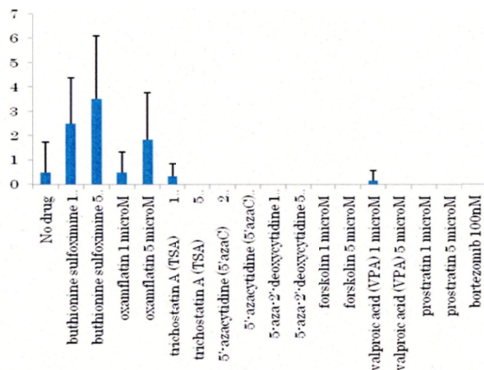
- (A) IE62 のみ発現し核内で Sp1 と共局在
 - (B) IE62 が核内で dot & diffuse を呈し、IE63 も核内で発現する
 - (C) IE62 の核内 dot でも Sp1 と共局在し、IE63 は核内および細胞質の両方に局在
 - (D) IE62 が核内で球状に拡大し、そこで Sp1 と IE63 も共局在
 - (E) IE62 が replication compartment (RC) 様の大きく不規則な形状を示し、そこで Sp1 と IE63 も共局在する、
という 5 パターンが認められた。(A)~(E) の割合の経時変化からは、(A)→(B)→(C)→(D)→(E)の流れて移行していると考えられた。
- 一方、抗 gH 抗体処理細胞を感染 12 時間後~7 日後に観察したところ、非処理感染細胞と同様の(A)~(E)に加えて、抗体処理細胞に特異的な以下のパターンが観察された。
- (F) IE62 と IE63, Sp1 が細胞質にも共局在して認められる
 - (G) IE62, IE63, Sp1 が細胞膜にも共局在して認められる
 - (H) IE62, IE63, Sp1 が細胞膜から出芽する小胞にも共局在して認められる
 - (I) IE62 と Sp1 は核内にも局在を残しているが IE63 の核内局在が認められない
 - (J) IE62 は核内に局在を残すが、S1 がリング状 (核膜様) に局在する
 - (K) IE62 は核内に局在を残すが、Sp1 の核内

- 局在が低下もしくは認められない
- (L) IE62, IE63, Sp1 共に細胞破片様の共局在を示す
- (M) IE63 が核内で diffuse、IE62 が核内で小さな dot を形成するが Sp1 は共局在しない

図3. (A)~(N)の経時的な割合の変化

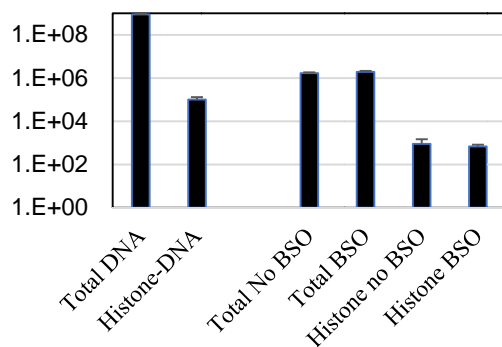
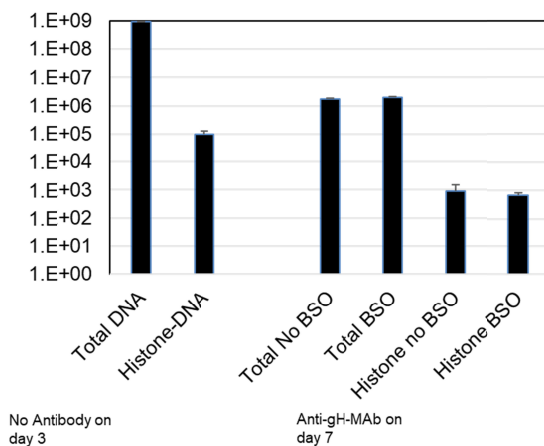


- (N) IE63 が核内で diffuse、IE62 が核内で小さな dot を形成し Sp1 も共局在する。
- 水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) の糖タンパク (gH) に対する中和抗体により VZV 感染細胞を潜伏感染へと誘導した。本研究では、強い溶解感染がいかにかに制御され、潜伏感染へと誘導されるか (抗原変調機構) を明かにするために、非処理感染細胞と抗 gH 抗体処理感染細胞との間で、主要転写制御因子 (ORF62 と ORF63) と細胞性転写因子 Sp1 との共局在を解析した。ウイルス感染後の非処理細胞に比べ、抗 gH 抗体処理細胞では、初期には非処理細胞と同様な分布を認めたが、ORF62 と Sp1 との核内共局在だけでなく、ORF62 と Sp1 は細胞質にも局在し、転写制御が異なることが示唆された。また、ORF63 が細胞質内のみ認められた。抗体処理による潜伏感染化の誘導に拮抗的に作用し、



7日間の抗体処理後に感染性を保持できる薬剤として、BSOを見出した。

そこで抗体処理細胞とBSO添加細胞とで、ORF62, ORF63, Sp1の局在のパターンを比較した結果、複数のパターンで有意に割合が変化していた。



上記の転写因子の細胞内局在だけでなく、エピジェネティックな遺伝子発現制御を解析した。Lyticな感染細胞と、抗体処理細胞、さらにBSO添加細胞において、抗ヒストンH4抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行った結果、クロマチン形成率は抗体処理細胞 > BSO添加細胞 > Lytic感染細胞の順となり、抗体処理細胞ではクロマチン形成が促進され、BSOはそれを阻害し感染性を保持できることが示された。以上の結果から、抗gH中和抗体処理による潜伏感染誘導時のウイルス遺伝子発現抑制のメカニズムとして、個別の転写因子であるORF62, ORF63,

およびSp1の局在変化に加えて、ウイルスDNAのクロマチン形成促進によるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の介在が明らかになった。

得られた結果の公表準備をしている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計17件)

Shiraki K. Helicase-primase inhibitor, Amenamevir, for herpesvirus infection. Toward practical application for treating herpes zoster. *Drugs of Today - Clarivate Analytics*. in press
Shiraki K., Toyama N, Shiraki A, Yajima M, and the Miyazaki Dermatologist Society. Age-dependent trigeminal and female-specific lumbosacral increase in herpes zoster distribution in the elderly. *J Dermatol Sci* in press.

Aiba N, Shiraki A, Yajima M, Oyama Y, Yoshida Y, Ohno A, Yamada H, Takemoto M, Daikoku T, Shiraki K. Interaction of Immunoglobulin with Cytomegalovirus-Infected Cells. *Viral Immunol* 2017 Jun 9. doi: 10.1089/vim.2016.0151.

Shiraki K., Toyama N, Daikoku T, Yajima M, the Miyazaki Dermatologist Society. Herpes zoster and recurrent herpes zoster. *Open Forum Infect Dis* (2017) 4 (1): ofx007. DOI: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx007>

Akahoshi, Y, Kanda J, Ohno A, Komiya Y, Gomyo A, Hyakawa J, Harada N, Kameda K, Ugai T, Wada H, Ishihara Y, Kawamura K, Sakamoto K, Sato M, Terasako-Saito K, Kimura S, Kikuchi M, Nakasone H, Kako S, Shiraki K., Kanda Y. Acyclovir-resistant herpes simplex virus 1 infection early after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with T-cell depletion. *J Infect Chemother*. 2017 Jul;23(7):485-487. doi: 10.1016/j.jiac.2017.02.001. Epub 2017 Mar 2.

Yajima M, Yamada H, Takemoto M, Daikoku T, Yoshida Y, Long T, Okuda T, Shiraki K. Profile of anti-herpetic action of ASP2151 (amenamevir) as a helicase-primase inhibitor. *Antiviral Res*. 2016 Dec 24;139:95-101.

Daikoku T, Tannai H, Honda M, Onoe T, Matsuo K, Onoye Y, Nishizawa M, Kawana T, Okuda T, Hasegawa T, Shiraki K. Subclinical generation of acyclovir-resistant herpes simplex virus with mutation of homopolymeric guanosine strings during acyclovir therapy. *J Dermatol Sci*. 2016 Jun;82(3):160-5.

Yajima M, Shiraki A, Daikoku T, Oyama Y, Yoshida Y, Shiraki K. Functional differences between antiviral activities of sulfonated and intact intravenous immunoglobulin preparations toward varicella-zoster virus and cytomegalovirus. *J Infect Chemother*. 2015 6:427-33.

Daikoku T, Oyama Y, Yajima M, Sekizuka T, Kuroda M, Shimada Y, Takehara K, Miwa N, Okuda T, Sata T, Shiraki K. Identification of ribonucleotide reductase mutation causing temperature-sensitivity of herpes simplex virus isolates from whitlow by deep sequencing. *Clin Case Rep*. 2015 Jun;3(6):461-7.

Chono K, Katsumata K, Suzuki H, Shiraki K. Synergistic activity of amenamevir (ASP2151) with nucleoside analogs against herpes simplex virus types 1 and 2 and varicella-zoster virus. *Antiviral Res.* 2013 Feb;97(2):154-60.

Daikoku T, Saito K, Aihara T, Ikeda M, Takahashi Y, Hosoi H, Nishida T, Takemoto M, Shiraki K. Rapid detection of human cytomegalovirus UL97 and UL54 mutations for antiviral resistance in clinical specimens. *Microbiol Immunol.* 2013 May;57(5):396-9.

Daikoku T, Horiba K, Kawana T, Hirano M, Shiraki K. Novel deletion in glycoprotein G forms a cluster and causes epidemiologic spread of herpes simplex virus type 2 infection. *J Med Virol.* 2013 Oct;85(10):1818-28.

Himaki T, Masui Y, Chono K, Daikoku T, Takemoto M, Haixia B, Okuda T, Suzuki H, Shiraki K. Efficacy of ASP2151, a helicase-primase inhibitor, against thymidine kinase-deficient herpes simplex virus type 2 infection in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* 2012 Feb;93(2):301-4.

Takasaki I, Taniguchi K, Komatsu F, Sasaki A, Andoh T, Nojima H, Shiraki K, Hsu DK, Liu FT, Kato I, Hiraga K, Kuraishi Y. Contribution of spinal galectin-3 to acute herpetic allodynia in mice. *Pain.* 2012 Mar;153(3):585-92.

Chono K, Katsumata K, Kontani T, Shiraki K, Suzuki H. Characterization of virus strains resistant to the herpes virus helicase-primase inhibitor ASP2151 (Amenamivir). *Biochem Pharmacol.* 2012 Aug 15;84:459-67.

Miyakoshi A, Takemoto M, Shiraki K, Hayashi A. Varicella-zoster virus keratitis with asymptomatic conjunctival viral shedding in the contralateral eye. *Case Rep Ophthalmol.* 2012 Sep;3(3):343-8.

Shiraki K, Daikoku T, Takemoto M, Yoshida Y, Suzuki K, Akahori Y, Okuno T, Kurosawa Y, Asano Y. Neutralizing anti-gH antibody of Varicella-zoster virus modulates distribution of gH and induces gene regulation, mimicking latency. *J Virol.* 2011 Aug;85(16):8172-80.

[学会発表](計 10 件)

Takemoto M, Daikoku T, Yajima M, Asano Y, Shiraki K. Neutralizing antibody against VZV gH modulates localization of IE62, IE63, and Sp1 during termination of productive infection. The 39th Annual International Herpesvirus Workshop (IHW). 2014

Daikoku T, Oyama Y, Sekizuka T, Kuroda M, Sata T, Shiraki K. Identification of Ribonucleotide Reductase Mutation Causing Temperature-Sensitivity of Herpes Simplex Virus Isolates from Recurrent Whitlow by Genome Wide Sequence. 38th Annual International Herpesvirus Workshop 2013

白木公康、帯状疱疹疫学と帯状疱疹の2回発症。第87回日本感染症学会学術講演会第61回日本化学療法学会総会合同学会 2013

白木公康 単純ヘルペス・帯状疱疹治療の新しい可能性。第77回日本皮膚科学会東部支部学術大会(招待講演)2013

武本眞清, 大黒 徹, 白木公康。水痘帯状疱疹ウイルスの抗gH中和抗体による潜伏感染誘導時の転写制御。第61回日本ウイルス学会総会 2103

白木公康 ヘルペスウイルス感染症。日本性感染症学会第26回学術大会 2013

丹内秀典, 尾上泰彦, 尾上智彦, 松尾光馬, 本田まり子, 白木公康 性器ヘルペス患者から分離された単純ヘルペスウイルス2型におけるTKの変異および薬剤耐性 日本性感染症学会第26回学術大会 2013

雄山由香利, 白木公康 単純ヘルペスウイルス臨床分離株の次世代シーケンサーによる変異部位の網羅的解析 日本性感染症学会第26回学術大会 2013

白木公康, 外山 望, 宮崎県皮膚科医会 1369 例の帯状疱疹の臨床診断とPCR法による診断について 第136回日本皮膚科学会宮崎地方会 2013

白木公康 免疫グロブリン製剤のVZVとCMV中和抗体価の比較 第36回日本造血細胞移植学会総会。2013

[図書](計 0 件)

[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：

6. 研究組織

(1)研究代表者

白木 公康 (SHIRAKI, Kimiyasu)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授
研究者番号：50135745

(3)連携研究者

大黒 徹 (DAIKOKU, Tohru)
北陸大学・薬学部・教授
研究者番号：80291409

武本 眞清 (TAKEMOTO, Masaya)
北陸大学・薬学部・講師
研究者番号：60379237

矢島 美彩子 (YAJIMA, Misako)
東北医科薬科大学・医学部・助教
研究者番号：60443131

(4)研究協力者

黒澤 良和 (KUROSA, Yoshikazu)
浅野 善造 (ASANO, Yoshizo)
鈴木 定彦 (SUZUKI, Yasuhiko)
大野 歩 (OHNO, Ayumu)