

17. 単純ヘルペスウイルス (Herpes Simplex Virus)

—多彩なウイルス遺伝子の感染病理における役割の解明と宿主の関与—

皆川 洋子

1. はじめに

単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus: HSV) はヒトヘルペスウイルスのなかで歴史が最も長く、研究者人口も多い。一般的な HSV 感染・発症病理研究、抗ウイルス剤・ワクチン開発に加え、近年は弱毒組換え HSV を腫瘍治療や遺伝子ベクターとして臨床の場で応用するための研究も活発である。Overview セミナーの趣旨に従い、HSV を扱いはじめてまもない、あるいは HSV を通常扱わない読者を対象として HSV 研究の概説を試みた。

2. 研究の歴史とウイルス学的特徴

HSV (あるいは VZV) 感染症は、古代ギリシャにおいてすでに '*herpes* = creep; (蛇の) 這う (ような) 病変として知られていた (表 1)。19世紀にウイルス学が確立された後、1919年に HSV が分離同定され、以後多彩な臨床疾患病巣から HSV 分離が報告された。ヘルペスウイルスには生物学的特性の異なる3つの亜科が知られており、HSV および VZV の属するアルファヘルペスウイルス亜科 (alphaherpesvirinae) (表 2) には神経細胞に潜伏感染できるという特徴が知られている。HSV は粘膜あるいは皮膚に初感染後、神経行性に伝播した神経細胞に終生潜伏感染するが、ときどき回帰発症することがある。初感染、回帰発症ともほぼ無症候性から致死感染まで様々な病態を呈す (Whitley, Lancet 357:1513, 2001) が、その症状や回帰は宿主の免疫状態に大きく左右される。

潜伏感染 (latency あるいは latent infection) は広義の持続感染 (persistent infection) の一形態であり、感染性ウイルス粒子を産生する能力は温存しているがウイルス粒子自体は検出されない状態を指す。潜伏時にはウイルス遺伝子情報は episome とよばれる環状 DNA の形で存在する。latency-associated transcripts (LATs) とよばれる一群の遺伝子群を除けば転写産物 (RNA) や発現産物 (タンパク) は認められない。ウイルスはときに再活性化して潜伏神経細胞の支配領域に完全な (= 感染・複製能力のある) ウイルス粒子を形成し、唾液など体液中に明らかな粘膜病変形成を伴わず (無症候性) に感染性ウイルスを排泄させたり、回帰発症病変を形成する。

HSV には2つの血清型 (HSV-1, HSV-2) が知られており、HSV-1 は主に脳炎、眼、上半身の皮膚粘膜疾患、初感染陰部ヘルペス、一方 HSV-2 は主に再発性陰部ヘルペスを主体とする (下半身の) 粘膜皮膚病変、新生児ヘルペス、脊髄炎の病因である。エイズの出現や移植医療の進歩に伴い、日和見病原体としての HSV の重要性が再認識された。Acyclovir (ACV) は HSV にコードされた thymidine kinase により選択的に1リン酸化されるため、therapeutic index の高い抗ヘルペス剤として有用である。免疫不全状態の患者における抗ウイルス剤耐性 HSV 感染が問題となっている。

HSV のウイルス学的特徴を図 1 にまとめた。大きな DNA ウイルスで、ウイルス遺伝子 DNA は150kbp 以上、ゲノム上に認められる open reading frame (ORF) は80 以上である。

ウイルス粒子の最外層を形成するエンベロープは、ウイルスにコードされた10種を越えるエンベロープ糖タンパクを表出しており、宿主免疫系から認識される抗原 (ワクチン開発にあたって標的とされる) や細胞レセプターに対するリガンドとして作用する。

エンベロープとヌクレオカプシドの間にはテグメント構造が存在し、数種のウイルスタンパクが含まれている。カプシドは正二十面体状である。

カプシドに包まれたコアの中に存在するウイルス遺伝子

九州大学大学院医学研究院ウイルス学分野 (〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1)

Topics on herpes simplex virus pathogenesis—roles of viral 'non-essential' genes and host immune status
Hiroko Minagawa

Department of Virology Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

TEL: 092-642-6138, FAX: 092-642-6140

E-mail: hmina@virology.med.kyushu-u.ac.jp

表1 HSV 研究の歴史的背景

古代ギリシャ時代	‘herpes = creep ; 這う’ 病変として知られる
1919	ヘルペスウイルスのなかでは最初に分離同定 多種の実験動物に病変を起こすことが可能 多種の培養細胞に CPE を起こす
1920s~	多彩な臨床疾患病巣より HSV が分離同定される
1961	最初に抗ウイルス剤 (iododeoxyuridine) 角膜ヘルペスに使用⇒薬剤耐性ウイルス
1962	2つの血清型が提唱される・臨床病型・病変分布との相関
1980s~	AIDS 等免疫抑制状態における日和見病原体のひとつ
1990s~	遺伝子導入用ベクター 腫瘍の治療に弱毒 HSV-1 を実用化

表2 アルファヘルペスウイルス亜科

ウイルス名	主な臨床疾患 初感染 (多くが無症候性)	回帰発症・持続感染等
HSV-1 単純ヘルペスウイルス 1 型 (herpes simplex virus-1 : HSV-1) (= human herpesvirus-1 : HHV-1)	ヘルペス性水疱口内炎 単純ヘルペス脳炎 (約半数) 陰部ヘルペス (日本)	口唇ヘルペス, 角膜ヘルペス 皮膚粘膜病変 (主に上半身) 単純ヘルペス脳炎 (約半数)
HSV-2 (= HHV-2)	新生児ヘルペス 陰部ヘルペス 無菌性髄膜炎	陰部ヘルペス 皮膚粘膜病変 (主に下半身), 脊髄炎 急性壊死性網膜炎
(その他のアルファヘルペスウイルス) VZV 水痘帯状疱疹ウイルス (varicella-zoster virus : 日本で開発された弱毒生ワクチンが実用化) B virus (自然宿主はサルであるが, ヒトにも感染しうる) 家畜のヘルペスウイルス (ウシ, ウマ, ブタ, ニワトリ等)	水痘	帯状疱疹, 急性壊死性網膜炎

は 2 本鎖線状 DNA であるが, 長短 2 種のユニーク配列 (U_L, U_S) の両端にリピート配列が存在するため 4 種の isomer を形成しうる。また 1~数コピーのゲノムから成る環を形成する。

ウイルス粒子を構成するタンパク (structural proteins) 以外に, HSV 感染細胞においてのみ検出され, 完成したウイルス粒子にはとりにこまれない非構造タンパク (non-structural proteins) も多種産生される。構造タンパクと非構造タンパクの両方に, ウイルス増殖には非必須であるが, ウイルス増殖の調節や種々の免疫回避機構を担当する分子が知られている。

HSV 遺伝子およびタンパクの命名法には, 表 3 に示すように多様な規則が用いられてきた。結果として一つの分子種に複数の名前が使われていることが多い [例: U_L48 (遺伝子の位置から命名) = Vmw65 (タンパクの分子量から) = VP16 (ウイルス粒子中に検出されるタンパクの電気泳動度順から) = ICP25 (感染細胞中に検出されるタンパクの電気泳動度順から) = αTIF (タンパクのになう転写調節機能から)]. 複数の呼称は従来の膨大な研究の蓄積に発するが, 新たに学ぶ者にとっては煩雑である。近年は遺伝子 DNA の位置に由来する名前 (例: U_L40) を, 機

能や転写時期に由来する名称に併記することが多い。

3. 多彩な HSV 遺伝子

3-1. HSV 遺伝子転写のカスケード状制御

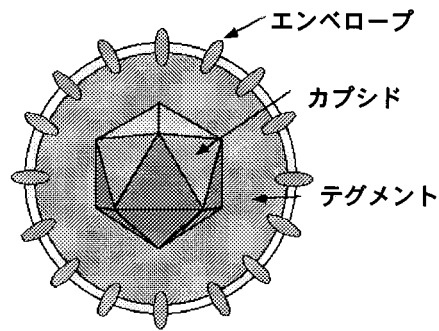
感染成立後, HSV 遺伝子発現はカスケード状制御を受ける。遺伝子を発現の順に α(immediate-early), β(early), γ (late) の 3 群に分類できる。HSV 粒子が細胞に感染し, 脱殻すると粒子内の VP16 (機能的には α transinducing activator) の作用により α 遺伝子の発現スイッチが on となる (図 2)。α 遺伝子の全ておよび β 遺伝子の一部は非構造タンパクをコードしているが, γ の多くは構造遺伝子である。γ 遺伝子には比較的発現時期のはやい γ1 遺伝子群と最後期に発現する γ2 遺伝子群が知られている。

近年ウイルス遺伝子産物と相互作用する細胞側因子研究 (同定および機能解析) の進捗が著しい。遺伝子発現制御機構については川口博士による平成13年度杉浦賞論文も参照されたい。

3-2. non-essential 遺伝子のはたす重要な役割

他のヘルペスウイルス同様, HSV は *in vitro* 環境で培養細胞に感染・増殖する際には必須でない (non-essential

- ・大きなDNAウイルス(2本鎖), カプシドは正二十面体構造, エンベロープあり



- ・ウイルス遺伝子DNA>150kbp、ORF>80



- ・多くの非必須(non-essentialあるいはaccessory)遺伝子をコード
- ・血清型は2つ (HSV-1, HSV-2) あり、生物学的特徴と関連
- ・広い宿主域
- ・初感染 (粘膜・皮膚) 後、神経行性に伝播した神経細胞に潜伏感染
- ・潜伏ウイルスはときに再活性化して回帰発症

図1 HSVのウイルス学的特徴

表3 HSV 遺伝子・タンパクの呼称

遺伝子
・DNA上の位置から (例: U_L20)
・転写の時期+位置から (前初期 α , 初期 β , 後期 γ) (例: $\gamma_1 34.5$)
・機能から (例: $vhs = \underline{v}irion \underline{h}ost \underline{s}hut\text{off}$)
タンパク
・遺伝子の名前のまま (例: U_L20)
・分子量 (molecular weight) から (例: $Vmw110$)
・タンパクの検出される場所から
エンベロープ糖タンパク (glycoprotein) $gB, gC, \dots, gL, gM, gN$ (gA と gF は欠番)
構造タンパク=ウイリオン構成タンパク (virion polypeptide) (例: $VP16$)
感染細胞 (infected cell polypeptide) (例: $ICP 8$)
ICP^{**} は非構造タンパクと構造タンパクの両方に用いられている
・機能から (例: $\alpha TIF = \alpha \underline{t}rans\underline{i}nducing \underline{f}actor$)
一つの分子種に複数の名前 (例: $U_L48 = Vmw65 = VP16 = ICP25 = \alpha TIF$)

あるいは accessory) 遺伝子を多数 (40以上) コードしている。近年、個々の non-essential 遺伝子の機能が次々に解明され、その多くが免疫回避・アポトーシスなどのメカニズムを通じて、*in vivo* での発症・感染拡大には重要な役割を担っていることが明らかになりつつある。

表4にHSVに対する宿主側の感染防御機構を列挙し

た。自然免疫 (innate immunity) の諸因子および液性獲得免疫 (humoral adaptive immunity) すなわち抗体は感染病巣成立・拡大の阻止に重要な役割をはたす。しかしT細胞機能を欠くヌードマウスやSCID (重症複合免疫不全: severe combined immune deficiency) マウスでの感染実験において抗体のみ投与しても、顕著な延命効果は認

められるものの末梢→神経節→脳・脊髄に至る HSV 伝播をブロックできず、体内から感染性ウイルス粒子を排除できないまま致命的脳炎が起こる (Minagawa, Arch Virol 145: 2259, 2000). 免疫不全患者における病態や細胞性免疫欠損マウスにおける感染結果は、いったん HSV が innate immunity をくぐりぬけて感染を成立させた場合、ウイルス感染細胞の排除に T 細胞を介した細胞性免疫が必須であることを示している。

一方 HSV は宿主防御機構に対抗する手段をいくつも持

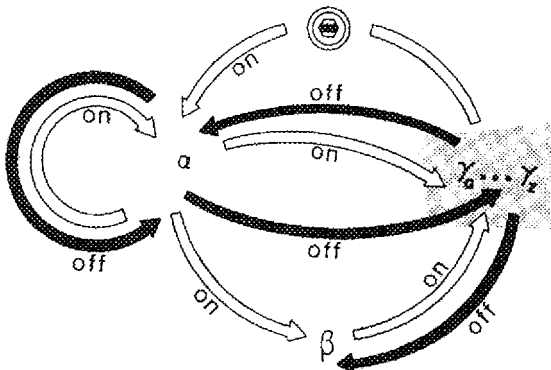


図2 HSV 遺伝子の発現調節

HSV 遺伝子は発現の順に α (前初期), β (初期), γ (後期) の3群に分けることが出来る。
 HSV 感染に伴う遺伝子発現は
 ①ウイルス粒子中の調節タンパク (α TIF) による α 遺伝子発現 ON,
 ② α タンパクによる α 遺伝子発現 ON/OFF (自己調節) および β 遺伝子発現 ON,
 ③ α および β タンパクによる γ 遺伝子発現 ON,
 ④十分な遺伝子発現後の γ タンパクによる α および β 遺伝子発現 OFF,
 の順に行われる。
 γ 遺伝子の発現時期や発現調節体系は一様ではなく、早く発現される γ_1 遺伝子群 (図中 $\gamma_1 \dots$) と、最後期に発現される γ_2 遺伝子群 (図中 $\dots \gamma_2$) ではかなり異なる。(Roizman & Knipe より一部改変)

ち合わせている (表5)。免疫逃避 (immune evasion) 機構は、HSV 以外のヘルペスウイルスや他のウイルス科でも知られている。HSV が潜伏感染期にはウイルスタンパクを発現しないという特性も究極の逃避とみなすことができる。

表5 にあげたウイルス側因子は全て non-essential 遺伝子にコードされている。しかし例えば γ_1 34.5 変異ウイルス (脳腫瘍治療に使用) のように、遺伝子欠損変異株にはしばしば病原性低下が認められる。一方 ICP47 分子はヒト TAP と比較しマウス TAP に対する抑制作用は弱いため、マウスおよびマウス由来細胞を用いた実験ではその作用が不明瞭であった。

エンベロープ糖タンパク gC, gE+gI はそれぞれ補体および抗体への対抗手段として有効である。

3-3. 感染時のウイルス-細胞間分子メカニズム

細胞への HSV 感染の成立においては吸着と侵入の2段階でそれぞれ異なる分子が作用することが明らかになっている。吸着過程では、ウイルスエンベロープ糖タンパク gB および gC と細胞側ヘパラン硫酸の相互作用が重要である。しかしこの相互作用は感染に必須ではなく、ヘパラン硫酸欠損細胞にも HSV 感染は成立することが報告されている。

侵入過程の初期においては gD-細胞側分子間の相互作用が重要である。gD (細胞への感染における主要なウイルス側リガンド) と結合する細胞側 coreceptor (entry mediator) が本学会シンポジウムに招かれた Spear 博士のグループらにより複数同定され、解析が進められている。既知の HVEM (herpesvirus entry mediators) は TNFR family や immunoglobulin superfamily に属している (Spear, Virology 275: 1, 2000)。HSV エンベロープ糖タンパクのなかで essential なものは gB, gD, gH, gL (gH と複合体を形成) のみであり、いずれも侵入後期の virus-cell fusion に関与する。

表4 HSV に対する感染防御機構

自然免疫 ・皮膚・粘膜バリアー (ラクトフェリン, 胃酸, リゾチーム等) ・補体 ・サイトカイン (インターフェロン (IFN)- α , IFN- β , IFN- γ , TNF, インターロイキン (IL) IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18) ・マクロファージ, 好中球 ・Natural Killer (NK) 細胞, γ/δ T 細胞
獲得免疫 ・B 細胞, 抗体 (IgG IgM IgA) ・T 細胞 CD4 ⁺ T 細胞 (MHC class II 拘束性・主にサイトカイン産生) CD8 ⁺ T 細胞 (MHC class I 拘束性・殺細胞機能, サイトカイン産生) ・抗原提示細胞

表5 HSVによる免疫逃避(あるいは回避)機構

宿主側の標的因子	ウイルス側因子	機能
インターフェロン	γ 34.5	IFNによる転写活性化をeIF2脱リン酸化により抑制
補体C3	gC	C3bと結合
アポトーシス抑制	US3	プロテインキナーゼ
IgG Fc レセプター	HSV-1 gE-gI, HSV-2 gE	Fc γ レセプター
MHC class I 表出の抑制	HSV-1 ICP47	ERにおける transporter associated with antigen processing (TAP) を抑制

表6 HSV研究における最近のトピックス

- ・感染初期に必要な細胞側分子 (coreceptor, entry mediator) 群の同定
- ・ウイルス遺伝子・タンパクと相互作用する細胞側因子同定および機能解析
- ・非必須 (non-essential) 遺伝子の機能解明 (免疫回避・アポトーシス)
- ・ウイルス粒子形成 (envelopment, egress) 機序の解明
- ・CMV同様 HSVも特定の viral RNA を選択的に粒子に取り込んでいる
- ・HSVによる自己免疫実験モデル (角膜ヘルペス molecular mimicry)
- ・HSVによる抗腫瘍療法: 弱毒 HSV-1 接種による脳腫瘍の縮小
- ・潜伏・再活性化制御機構に関する新たな知見

4. 最近の研究トピックス-潜伏・再活性化を中心に

表6に過去数年間のHSV研究トピックスの一部をあげた。

ヒトサイトメガロウイルス (CMV) 粒子が特定の viral RNA を取り込んでいる (Bresnahan, Science 288:2373, 2000) 報告と類似の所見がHSVについても報告された。

(Sciortino, J Virol 75:8105, 2001)

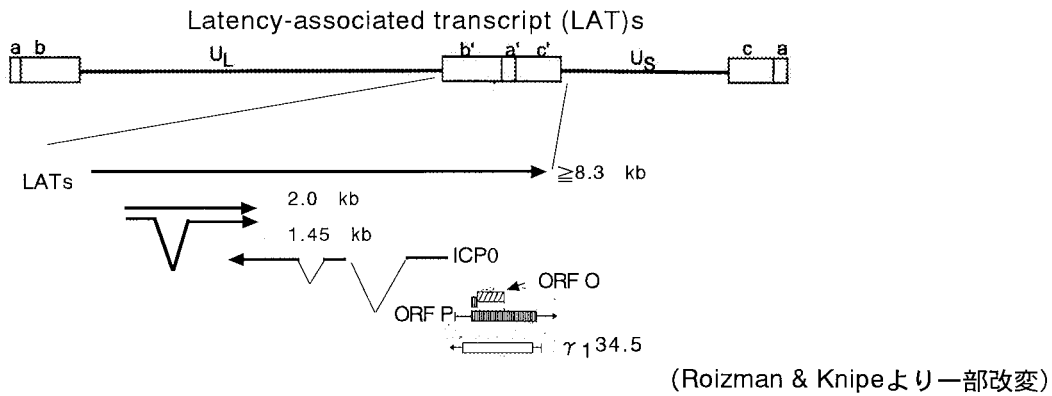
Cantor らによるマウス角膜ヘルペスの自己免疫機序研究 (Panoutsakopoulou, Immunity 15:137, 2001) は興味深い, ヒトの病態との関連についてはさらなる検討が必要と思われる。

潜伏感染細胞に Latency-associated transcripts (LATs) が発見 (Stevens, Science 235:1056, 1987) (図3-1) されてからすでに15年を経過したが, LATsの潜伏時に果たす役割についてはいまだに議論が続いている。最近 Wechsler 研究室より LATs がアポトーシスを抑制して神経細胞における潜伏感染維持に貢献しているとの論文 (Perng, Science 287:1500, 2000) が発表されたが研究者間のコンセンサスには至っていない (Thompson, Science 289:1651a, 2000)。LATsの遺伝子上の位置を図3-1に記した。LATsの中には大量に検出される RNA transcript 以

外, ORF O, ORF P が同定されている。ORF O, ORF P は pre- α 遺伝子に分類される。LATsの一部は ICP0 (α 0 = α 遺伝子のなかでも最初に転写され, 他の遺伝子転写を強力に活性化する) および γ 34.5 と antisense の関係にある。

一方再活性化制御の議論も活発である。Hendricks ら (Liu, Exp Med 191:1459; Liu, J Virol 75:11178, 2001) は一貫して HSV-1 強毒株マウス角膜接種三叉神経節潜伏実験システムにおける CD8⁺T細胞の重要性を示している (図3)。CD8⁺T細胞の作用はキラー活性よりも IFN- γ 等サイトカインを介したものと考えられる。図3-2に末梢神経節での潜伏感染・再活性化制御モデルのシエマを描いた。潜伏からの再活性化は1986年当初いわゆる自発的イベントではなく適切な‘刺激’に誘発されるために起こる, という考えが優勢であり, 再活性化のコントロールを目的として‘刺激’を同定しようとする研究が行われた。しかし PCR 等少量の transcript 検出・定量が容易となった結果 HSV 再活性化自体はかなり多様な刺激というより生理的変動に近い神経細胞の変化によって誘発されることが示され, 再活性化した HSV の三叉神経節での増殖阻止, 下行性末梢病巣形成 (= 回帰発症) あるいは上行性脳炎発症の阻止を目的とした研究に移行している。潜伏感染

1 Latency-associated transcripts (LATs)が感染ウサギ三叉神経節ニューロンのアポトーシスを抑制 (Wechsler研)



2 神経節浸潤CD8+細胞がIFN-γを介してHSV-1再活性化を抑制 (Hendricks研)

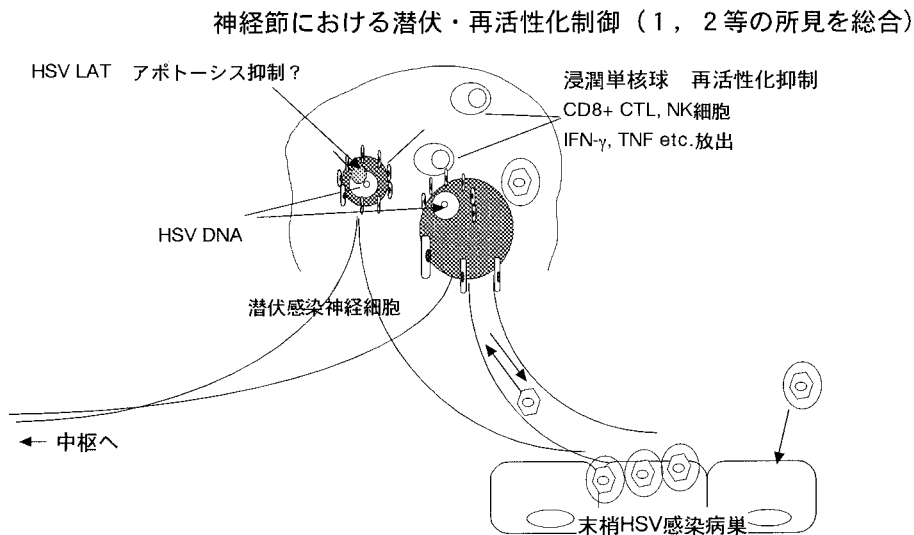


図3 潜伏感染・再活性化制御に関する最近の知見

表7 アポトーシスとHSV

HSV 感染により Bcl 2 を破壊→アポトーシスを誘発
アポトーシス抑制により感染持続, 子孫ウイルスの産生
・アポトーシスの抑制に必要なウイルス蛋白
→Us 3 protein kinase, ICP27, ICP22, Us 5 (gJ)
・Granzyme B, Fas により誘導されるアポトーシスを抑制
→HSV-1 gJ (Us 5) Caspase 6, 9 活性を抑制
→HSV-2 感染細胞 Fas ligand 表出の抑制
潜伏感染の維持にもアポトーシス抑制が必要
→HSV-1 γ1 34.5

局所に集合した T 細胞, NK 細胞およびこれらの細胞の産生するサイトカイン等液性因子 (図 3-2) の役割について検討がなされている。

5. アポトーシスと HSV (表 7)

HSV 感染が多くの細胞にアポトーシスを誘発する一方, HSV 上には異なるアポトーシス誘発経路に作用する複数のアポトーシス抑制遺伝子の存在 (Us 3 プロテインキナーゼ; gD; gJ Gerome, J Immunol 167:3928, 2001

表 8 残された問題点と将来の展望

<ul style="list-style-type: none"> ・ HSV と宿主細胞間のタンパクおよび遺伝子相互作用を解明 → 宿主細胞域決定因子の同定 (例: entry mediators) → 神経細胞での潜伏・再活性化機構 など発症病理の解明
<ul style="list-style-type: none"> ・ HSV-1 に比べ検討の遅れている HSV-2 の個々の遺伝子機能の解析 → 血清型間にみられる病変分布の相違について分子レベルで解明 (HSV-1: 主に上半身で発症, HSV-2: 主に下半身で発症)
<ul style="list-style-type: none"> ・ (HSV) 病原性遺伝子・免疫回避・アポトーシス関連遺伝子の機能解析 (宿主) 感染免疫において個々の因子の分担する役割の解明 → 発症予防ワクチンの開発, 再活性化・回帰発症封じ込め? → 遺伝子治療, 抗腫瘍療法用のウイルスに対しては免疫反応を制御
<ul style="list-style-type: none"> ・ 薬剤耐性ウイルス出現の抑制

等) が知られている。今後異なる lineage に属する細胞に対するアポトーシスの制御の差異について細かな検討が望まれる。

6. HSV 研究の問題点と今後の展望

今後のさらなる研究展開が期待される点を、表 8 に列挙した。

HSV・細胞間の遺伝子相互作用の解明は、宿主細胞域決定因子の同定や、神経細胞での潜伏・再活性化機構の決定に結実することが期待される。

HSV-1 に比べ検討の遅れている HSV-2 の個々の遺伝子機能の解析は、名大西山研などで着々と進行しているが、血清型間の違いについての謎、たとえば病変分布の相違 (HSV-1: 主に上半身で発症, HSV-2: 主に下半身で発症) を分子レベルで解明できるかもしれない。

感染免疫において登場する個々の宿主側因子 (表 4) の分担する役割を決定できれば、発症予防ワクチンの開発、再活性化・回帰発症封じ込め対策に多大な貢献となるであろう。一方遺伝子治療、抗腫瘍療法に HSV を利用する場合は遺伝子導入や腫瘍細胞殺傷をより効果的にするために一部の抗ウイルス免疫反応を調節 (抑制) する必要があるかもしれない。

遺伝子組換えウイルスを利用した遺伝子治療や抗腫瘍療法の開発において、HSV は大きな役割を演じている。すでに脳腫瘍の治療は患者での臨床試験段階にあり、腫瘍内に弱毒 (γ_1 34.5 遺伝子機能欠損) HSV-1 を接種した患者に

おいて、腫瘍の縮小・延命効果が報告されている (Markovitz, Adv Virus Res 55: 409, 2000)。

病原体としての HSV 研究においては、潜伏感染ならびに免疫病理に起因する発症病理の解明が急務である。神経再生医療の急速な進展は HSV 潜伏感染の病態にも新しい展開をもたらすかもしれない。

最後に膨大な HSV 研究について演者の独断で '面白くて役に立つ' と判断したトピックを紹介したため、内容に偏りがあることをご容赦いただきたい。腫瘍治療応用への見通しが明るい一方、大きな DNA に組み込まれた豊富な遺伝情報を武器に潜伏感染その他巧妙な手段を駆使して病原体としても成功している HSV を、今後も多くの方が研究対象とされることを願ってやみません。

参考文献 (HSV 研究関係書籍の一部のみ)

(最近発表された論文・総説のレファレンスは本文中に略記した)

- ・ Brown MS & MacLean AR (eds) Herpes simplex virus protocols, Human Press, Totowa, 1998.
- ・ Roizman B & Knipe DM, Herpes simplex viruses and their replication, in Fields Virology (4/e) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001.
- ・ Rouse BT (ed) Herpes simplex virus: pathogenesis, immunology and control, Current Topics in Microbiology and Immunology 179, Springer-Verlag, Berlin, 1992.
- ・ Umene K, Herpesvirus-Genetic variability and recombination, Touka Shobo, Fukuoka, 1998.