2025年度（第50回）学術研究振興資金　学術研究報告

学　校　名	**京　都　薬　科　大　学**	研究所名等	
研 究 課 題	遺伝子改変によるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス複製機構解明	研 究 分 野	理　　学 （生物学系）
キ ー ワ ー ド	①カポシ肉腫関連ヘルペスウイルス　②ウイルス複製　③キャプシド　④抗ウイルス化合物		

〇研究代表者

氏　　名	所　　属	職　　名	役　割　分　担
藤　室　雅　弘	京都薬科大学　薬学部	教　　授	研究代表者　実験・総括

〇研究分担者

氏　　名	所　　属	職　　名	役　割　分　担
伊　藤　昭　博	東京薬科大学・生命科学部・細胞情報科学	教　　授	LC－MS／Msによる蛋白質同定
鈴　木　陽　一	大阪医科薬科大学・医学部・感染制御	講　　師	電子顕微鏡によるキャプシド解析
市　　川　　聡	北海道大学・薬学部・有機合成医薬学	教　　授	抗ウイルス薬の設計および合成

遺伝子改変によるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス複製機構解明

1. 研究の目的

本申請研究では、我々の得意とするウイルスゲノム改変技術により、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)のウイルス複製機構を解明し、さらにウイルス複製阻害化合物を創生する。KSHVは感染者の免疫不全時にカポジ肉腫やリンパ腫を発症する腫瘍ヘルペスウイルスで**（図 1）**、唾液や性交渉を介してヒト間で伝播する。健常人における KSHV の既感染率は、アフリカでは 50%以上(約 6 億人)、日本では約 1-2%(約 100 万人)と報告されている。また、**世界ではエイズ発症者のうち年間 20 万人以上が KSHV 関連腫瘍により死亡している**。KSHV は健常人に感染すると潜伏感染と溶解感染サイクルの 2 つの感染様式を示す。

潜伏感染期ではウイルスは環状 2 本鎖 DNA として核内で保持され感染者の免疫不全時にカポジ肉腫やリンパ腫を発症する。一方で、紫外線等により感染細胞が溶解感染期(ウイルス複製期)に移行すると核内でキャプシド形成とゲノム複製が行われ、ゲノムを内封した成熟キャプシドは外皮エンベロープを獲得し、宿主細胞から出芽する。この全過程のなかでも、連結ゲノム前駆体として合成される**ウイルス DNA 複製と切断機構、ゲノムのキャプシド内腔への挿入**や**キャプシドの核脱出**は**真核生物には類似の機構はなく、その殆どが不明である**。そこで本研究ではこれら KSHV の複製機構の不明な点を解明する。そして得られた知見と研究ツール、さらに我々の開発したシーズ化合物を活用し、ウイルス複製阻害剤開発へと研究を展開する。

ヒトヘルペスウイルスは現在までに 8 種類同定され、バラシクロビル等の有効なウイルス薬も開発されているが、KSHV には無効である。つまり KSHV の発見から 29 年が経過した現在でも、KSHV の治療薬は開発されておらず、さらに複製機構も不明のままである。しかし、比較的研究が進んでいる他のヘルペスウイルス研究と我々グループの一貫した KSHV 研究により、KSHV の複製過程は以下のように推論されている **(図 2)**。

KSHV は溶解感染期に移行すると、キャプシド等の構造蛋白質が発現し、核内でキャプシドが形成される。一方、ウイルスゲノムは鎖状にターミナルリピート(TR)部で連結した連結ゲノムとして複製される。この前駆体 DNA は TR 部で、ターミナーゼ複合体により切断されキャプシド内に挿入される。ゲノムを内封し正 20 面体を形成した成熟キャプシドは核から細胞質へ移行する。**上述の推測された KSHV 複製過程は複数のウイルス研究者により支持されているが、その真偽と分子機構の多くは不明のまま残されている**。そこで、本研究では KSHV 複製過程で特に不明な点が多いキャプシド形成機構を解明する。特に、ウイルス構造蛋白質発現、ウイルスゲノム複製と切断、キャプシド形成・成熟、ゲノムのキャプシド挿入、キャプシドの核脱出の分子機構を解明する。そして得られた知見や過去のシード化合物を活用してウイルスゲノムの複製阻害化合物を開発する。



図1. 免疫不全患者のカポジ肉腫
AIDSに合併するカポジ肉腫等のHHV-8関連疾患における診断と治療の手引き

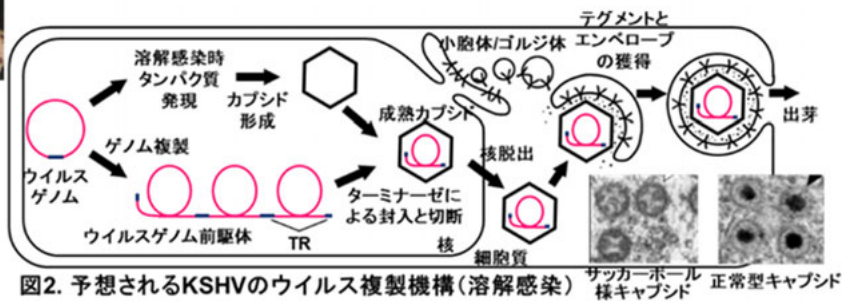


図2. 予想されるKSHVのウイルス複製機構(溶解感染)

2. 研究の計画

申請者のウイルス複製研究の成果、および他グループの先行研究により、KSHV 複製は以下のとおり推測される(図 3)。感染細胞が溶解感染期に移行するとキャプシド等の構造遺伝子が転写される。キャプシド蛋白質は核内で自己会合しプロキャプシドを形成し、キャプシド内壁が外壁から切り離されて B キャプシドへと変化する。一方で、ウイルスゲノムは鎖状にターミナルリピート(TR)部で連結した前駆体ゲノムとしてウイルス性ポリメラーゼ ORF9 等により複製される。この前駆体 DNA はターミナーゼ複合体により TR 部で切断され、キャプシド内に挿入される。す

ると、キャプシド内壁が排出され、頂点因子により正 20 面体の成熟キャプシドが形成され、核から細胞質へ移行すると推測されている。

本申請研究（3 年間）では複製イベントに重要と思われるが不明なまま残されている**黄色ハイライトで示した**イベントとウイルス ORF（図 3）を研究対象とする。

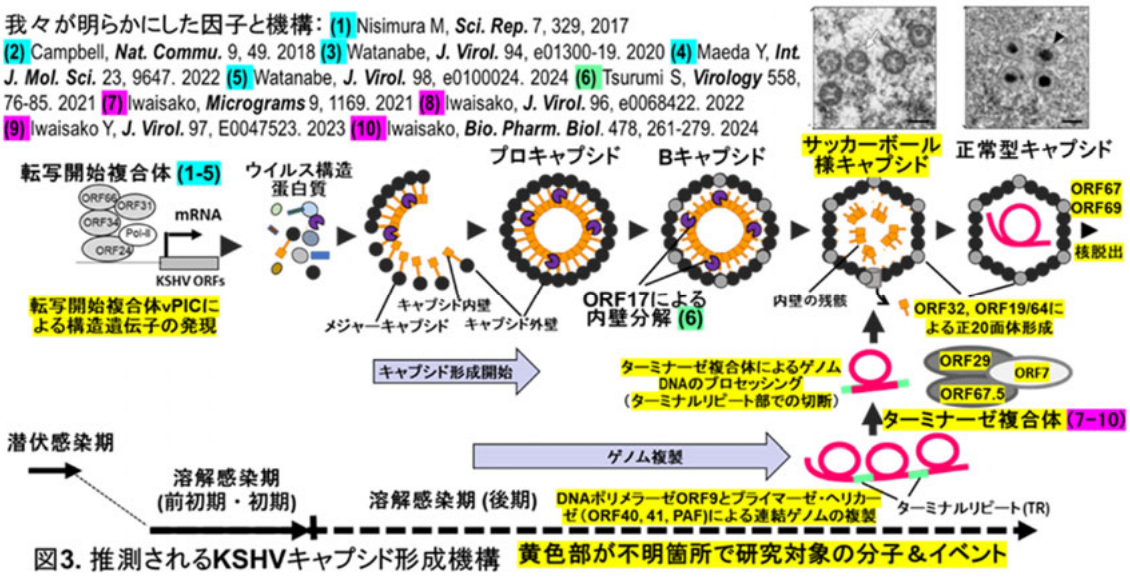


図3. 推測されるKSHVキャプシド形成機構　黄色部が不明箇所で研究対象の分子＆イベント

初年度（2025 年）の計画

ウイルス複製に重要と考えられる各ウイルス ORF の欠損 KSHV の作製を実施する。つまり、(A)遺伝子発現に関わる ORF34、(B)ゲノム複製に関わる DNA ポリメラーゼ ORF9、プライマーゼ PAF、(C)ターミナーゼ構成因子 ORF29、(D)頂点分子 ORF32、(E)成熟キャプシドの核脱出に関わる ORF67 と ORF69 の欠損ウイルスを、作製する。さらに、それら遺伝子欠損 KSHV のウイルス学的特徴（感染能やウイルス形態、遺伝子発現、ゲノム複製、孫ウイルスの産生量と感染能力）の解析と、電子顕微鏡によるキャプシド形態の解析、さらに、相互作用する細胞性およびウイルス性結合因子の解析を実施する。

2 年目（2026 年）の計画

当初の申請書に記載のとおり、前年度（2025 年）の研究計画を引き続き行う。図 3 黄色ハイライトで示したキャプシド形成に関わる各 ORF が欠損した遺伝子改変 KSHV の作製は昨年度に概ね完了している。それら各 ORF 欠損 KSHV のウイルス学的特徴とウイルス複製に関する表現型、さらに、電子顕微鏡を用いたキャプシド形態解析や、各 ORF のウイルス性（および細胞性）相互作用分子の MS 解析を実施し各 ORF のキャプシド形成やウイルス複製に関する機能を解明する。

次に、我々が世界に先駆けて発見したサッカーボール様キャプシドと名付けた新規キャプシドの実態を解明する。この新規キャプシドは今まで報告がなく、その構成成分や生物学的意義は全く不明である。また、正常なキャプシド形成やサッカーボール様キャプシド形成に関わるウイルスタンパク質同士の分子間相互作用の詳細なメカニズム解明のため、我々は人工知能 AlphaFold2 により予測されたタンパク質間の予想結合モデルを活用する。

3 年目（2027 年）の計画

申請書に記載のとおり、下記研究課題は 2026 年度途中から開始する。過去に開発したシード化合物 CNDAG を活用し、ウイルスゲノムの複製阻害化合物を開発する。核酸誘導体 CNDAG はウイルス選択性を持つアシクロビルと、β 脱離反応により DNA 鎖切断活性を持つ核酸誘導体 CNDAC の二つの長所を融合させたハイブリッド化合物である。北大・市川グループと共同で CNDAG を基本骨格とした 18 種類の CNDAG の誘導体類を合成中であるが、その半分は既に合成が完了している。これらの合成と活性評価、CNDAG の作用機序解析を進める。

3. 研究の成果

初年度（2025 年）の研究成果

申請時の計画書どおり、ウイルス複製に重要と考えられる各ウイルスORFの欠損KSHVの作製は、ほぼ全て完了した。つまり、(A)遺伝子発現に関わるORF34、(B)ゲノム複製に関わるDNAポリメラ

ーゼORF9、プライマーゼPAF、(C)ターミナーゼ構成因子ORF29、(D)頂点分子ORF32、(E)成熟キャプシドの核脱出に関わるORF67とORF69の欠損ウイルスを、当初の計画どおり作製した。さらに、それら遺伝子欠損KSHVのウイルス学的特徴（感染能やウイルス形態、遺伝子発現、ゲノム複製、孫ウイルスの産生量と感染能力）の解析と、電子顕微鏡によるキャプシド形態の解析(大阪医科薬科大・鈴木先生の協力)、さらに、相互作用する細胞性およびウイルス性結合因子の解析(東京薬科大・伊藤先生の協力)も実施した。

その結果、(A)ORF34はウイルスの後期遺伝子発現を活性化する転写開始複合体の構成因子として機能することを解明し、その成果を米国微生物学会の旗艦誌に発表した(Watanabe T ***J. Virology*** 2024)。さらに、(C)ORF29は前駆体ゲノムのTR部切断活性を有すること、またキャプシド挿入に関わるターミナーゼ複合体形成能も有し、成熟キャプシドの形成に必須であることを解明した。なお、ORF29の研究成果は、米国微生物学会の学術OA誌に発表した(Iwaisako Y. ***Microbiology Spectrum*** 2025)。

4. 研究の反省・考察

研究課題(B)、(D)に関しては、論文投稿まで至らなかった。研究完成まで解明しなければならない幾つかの課題が残った。現在、論文発表に向けて研究を遂行中である。これらの研究成果により、申請時の研究計画の 9 割以上の目標を達成したと言える。

5. 研究発表

(1)学会誌等

なし

(2)口頭発表　**(37 件から 9 件を抜粋)**

①池田育寛, 黒橋萌, 山口達夫, 祝迫佑紀, 須賀 圭, 中曽一裕, 藤室雅弘, HSV-1感染で産生されるタンパク質凝集塊の神経細胞傷害活性, 日本薬学会第145年会,福岡,2025年3月26－29日.

②髙山愛理, 祝迫佑紀, 上田啓次, 藤室雅弘, B型肝炎ウイルス様粒子（VLP）を用いた肝細胞特異的薬物送達キャリアの作製, 日本薬学会第145年会,福岡,2025年3月26－29日.

③祝迫佑紀, 渡部匡史, 鈴木陽一, 中野隆, 藤室雅弘,KSHVターミナーゼ複合体の機能解明, 日本薬学会第145年会,福岡,2025年3月26－29日.　学生優秀発表賞

④髙田まり菜, 祝迫佑紀, 藤室雅弘, カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスのプライマーゼ関連因子PAFの機能解析, 日本薬学会第145年会,福岡,2025年3月26－29日.

⑤前田 笙, 角谷廣智, 太田萌絵, 井上拓美, 古田 巧, 藤室雅弘, 抗単純ヘルペスウイルス1型化合物YI32の作用機序の解析, 日本薬学会第145年会,福岡,2025年3月26－29日.

⑥池田 宝, 祝迫佑紀, 橘 明日香, 中森悠佳, 藤室雅弘, カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)遺伝子ORF67とORF69の機能解析, 第72回日本ウイルス学会学術集会,浜松,2025年10月28－30日.

⑦伊東宏起, 高山愛理, 川瀬暉人, 榎本美咲, 小川真都花, 大塩ひとみ, 祝迫祐紀, 上田啓次, 藤室 雅弘, B型肝炎ウイルス（HBV）の膜タンパク質を用いたVLPの送達, 第72回日本ウイルス学会学術集会,浜松,2025年10月28－30日.

⑧金巻沙菜, 池田育寛, 堤 万紘, 川端捷太, 祝迫佑紀, 須賀 圭, 中曽一裕, 藤室雅弘, HSV-1感染細胞から神経細胞傷害活性をもつアミロイドβ凝集物が産生される, 第72回日本ウイルス学会学術集会,浜松,2025年10月28－30日.

⑨宿谷明日香,がんウイルスがコードする E3 ユビキチンリガーゼの機能解析会, 第 48回日本分子生物学会年会横浜, 2025年12月3-5日.

(3)出版物

① Takayama E, Enomoto M, Nagae M, Tomoda M, Miyazumi Y, Iwaisako Y, Shirasawa R, Suzuki Y, Nakano T, Ueda K, and Fujimuro M. HBV Envelope Protein-Bearing Vesicles Show Preferential Uptake in Hepatocyte-Derived Cells. ***Int. J. Mol. Sci.*** 27, 4331. 2026

② Saito A, Tankou S, Ishii K, Sakao-Suzuki M, Oh EC, Murdoch H, Namkung H, Adelakun S, Furukori K, Fujimuro M, Salomoni P, Maul GG, Hayward GS, Tang Q,

Yolken RH, Houslay MD, Katsanis N, Kosugi I, Yang K, Kamiya A, Ishizuka K, Sawa A. Cytomegalovirus-encoded immediate early 1 protein perturbs neural progenitor proliferation via interfering with host PML-DISC1 interaction. ***J Biol Chem.*** 302: 111269. 2026

③ Sekine Y, Hatasa A, Matsuda T, Fujimuro M. Nogo-A-cleaved amino-terminal fragment but not Nogo-B regulates STAT3 activation. ***Biochem Biophys Res Commun.*** 797, 153205. 2026

④ Iwaisako Y, Shimizu K, Suzuki Y, Nakano T, Fujimuro M. Characterization of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus terminase complex component ORF29. ***Microbiology Spectrum Microbiol Spectr.*** 13, e0330824. 2025

⑤ Shikata S, Kikkawa K, Fujimuro M, Sekine Y. Dual-specific phosphatase DUSP21 is a novel negative feedback regulator for STAT3. ***Biochem Biophys Res Commun.*** 752:151488. 2025