

# 論文内容の要旨

## 論文題目

単純ヘルペスウイルス 2 型改変系の構築と血清型間の差異

(Construction of herpes simplex virus reverse genetics system and analyses of the differences in HSV serotypes)

氏名 森本 智美

単純ヘルペスウイルス(HSV)には、血清型があり、HSV-1 と HSV-2 が存在する。HSV-1 は主に脳炎や口唇ヘルペスなど上半身への病態を引き起こし、HSV-2 は主に性器ヘルペスのような下半身への病態を引き起こすとされている。HSV-1 と HSV-2 で、ウイルスの構造やウイルス遺伝子のリニアリティに、ほとんど差は見られないにもかかわらず、病態に差があることは古くから知られている。この違いは、再活性化および潜伏感染におけるウイルス機能の差によるものであることが推測されているが、詳細は解明されていない。これは、HSV-1 の分子生物学的解析が世界中で精力的に行われているのに対して、HSV-2 の分子生物学的解析が遅れていることによると考えられる。HSV-2 の分子生物学的解析の遅れの要因の 1 つとして、HSV-2 には適切なウイルス改変系がないことが挙げられる。本研究では、まず、HSV ゲノムにおける外来遺伝子の挿入に適した領域の探索を行った。次に、HSV-2 の基礎研究および医学的利用を加速させるため、同定した外来遺伝子至適挿入領域を利用して HSV-2 のウイルス改変系を構築した。

## 1. HSV ゲノムにおける外来遺伝子至適挿入部位の解析

マウス脳腫瘍モデルにおいてある種の HSV 変異ウイルスを投与すると腫瘍が消失するという報告があり、臨床応用が試みられてきた。しかし、最近では、HSV をオンコリテックベクターとして利用するには、HSV 単独では十分な効果が得られないとされている。これを改良するために、HSV に IL12 を搭載して癌障害性を高めた組換えウイルスの報告がある。また、HSV をベースとしてサルの免疫不全ウイルス(simian immunodeficiency virus:SIV)の構造タンパク質を搭載した多価ワクチンが作製され、サルの動物モデルにおけるワクチン効果が報告されている。このように HSV は、遺伝子治療ベクターや多価ワクチンのベースとしての利用に有効なウイルスである。

遺伝子治療ベクターや多価ワクチンとして HSV を利用するには、ウイルスゲノムのいずれかの領域に外来遺伝子を挿入する必要がある。その際、ベクターやワクチンのプラットフォームであるウイルスにはできるだけ影響を及ぼさないことが重要となる。つまり、外来遺伝子の挿入によって、元来 HSV に備わっている癌障害性やワクチン能が低下することは避けなければならない。

我々は、これまでに、HSV-1 の UL3-UL4 遺伝子間領域に外来遺伝子を挿入しても、ウイルスの増殖やマウスへの病原性には影響がないことを報告している (PNAS, 2001; J. Virol., 2003)。UL3-UL4 遺伝子間領域は、逆方向からコードされる 2 つの遺伝子とそれら 2 つの遺伝子の poly A シグナルに挟まれた領域であり、同様な構造をもった領域は、HSV ゲノムにおいて 10 ヶ所以上存在する。そこで、本研究では、UL3-UL4 遺伝子間領域と同様な構造を有する領域が外来遺伝子挿入に適しているのではないかという仮定に基き、HSV-1 の UL3-UL4 領域のほか、UL50-UL51 および US1-US2 遺伝子間領域への外来遺伝子の挿入を試みた。また、HSV-2 においても UL3-UL4 および UL50-UL51 遺伝子間領域への外来遺伝子の挿入を試みた。

HSV 後期タンパク質のプロモーターである UL26.5p、蛍光タンパク質 Venus および poly A シグナルで構成される外来遺伝子挿入カセットを HSV-1 F 株の UL3-UL4、UL50-UL51 および Us1-Us2 の遺伝子間領域に挿入したウイルスを作製した。また、HSV-2 186 株の UL3-UL4 および UL50-UL51 の遺伝子間領域に同様のカセットを挿入したウイルスを作製した。作製したウイルスの感染細胞における Venus の発現量には、遺伝子挿入部位による差は認められなかった。作製したウイルスは、培養細胞において野生体と同等な増殖能を有し、マウスモデルにおいては野生体と同等な病原性を示した。すなわち、HSV-1 の UL3-UL4、UL50-UL51、Us1-Us2 および HSV-2 の UL3-UL4、UL50-UL51 の遺伝子間領域は、外来遺伝子を挿入しても、ウイルスの性状にほぼ影響を与えない理想的な外来遺伝子挿入部位といえる。

以上のことから、逆方向からコードされる 2 つの遺伝子とそれらの polyA シグナルにはさまれた領域は、HSV において外来遺伝子の挿入に適していることが示唆された。この構

造をもつ領域が、HSVには13ヵ所存在する。本知見は、HSVの今後の医学的利用において有用な情報を提供するものである。また、本研究において作製されたウイルスは、動物モデルにおけるウイルスの局在解析に有用であると考えられる。

## 2. 野生体の性状を保持した完全長 HSV-2 感染クロンの構築とそれを用いたウイルス改変系の確立

ウイルスの解析において、ウイルスの改変技術は非常に重要となる。しかし、HSVは巨大なゲノムを有するため、その遺伝子改変の過程が煩雑であった。しかし、ウイルスゲノムをBAC (bacterial artificial chromosome) にクローニングし大腸菌に保持させ、大腸菌遺伝学を用いてウイルスゲノムに変異を導入後、ウイルスゲノムを培養細胞に導入することで変異ウイルスの作製が容易にできるようになった (BACシステム)。これまでに、我々の研究室において完全長のウイルスゲノムおよび野生体の性状を保持した HSV-1 の BACシステムを構築したが、HSV-2 に関しては、同様な BACシステムは構築されていない。そこで、野生体の性状を保持した完全長の HSV-2 感染クロンの構築およびそれを用いたウイルス改変系の確立を試みた。

HSV-2 186 株を親株として、今回同定した至適外来遺伝子挿入部位の1つである UL50-UL51 遺伝子間領域に選択マーカーとしての GFP 発現カセットおよび BAC を挿入した組換えウイルスを作製した。組換えウイルスの感染細胞から環状ウイルス DNA を抽出し、大腸菌 DH10B に保持させた。制限酵素パターンによる解析により、クローニングされた HSV-2 ゲノムクローンは完全長であることが示唆された。また、大腸菌より回収した HSV-2 ゲノムクローンからウイルスを再構築することが可能であった。再構築したウイルスは、培養細胞において野生体と同等の増殖能を示し、マウスモデルにおいては野生体と同等な神経病原性および神経侵襲性を示した。また、EGFP 発現カセットおよび BAC は Cre/loxP recombination によって容易に除去することが可能であった。

次に、確立した HSV-2 の BACシステムを用いて HSV にコードされているプロテインキナーゼの1つである US3 の活性中心である 220 番目のリジンをメチオニンに置換したウイルス (HSV-2 US3KM) および HSV-1 Us3 の自己リン酸化部位に対応する 147 番目のアスパラギン酸をアラニンに置換したウイルス (HSV-2 US3DA) の作製を試みた。大腸菌内で US3 に点変異を導入後、大腸菌から抽出したウイルスゲノムを rabbit skin cell にトランスフェクションして変異ウイルスを作製した。Us3KM は、すべてのプロテインキナーゼに保存されている活性中心に変異を入れたので、Us3 は予想どおりプロテインキナーゼ活性を消失していた。また、Us3 DA でも Us3 のプロテインキナーゼ活性が著しく低下していた。すなわち、HSV-2 Us3 の 147 番目のアスパラギン酸は、Us3 のプロテインキナーゼ活性の発現に重要であることが明らかとなった。

作製した Us3 変異ウイルスを感染させた細胞は野生体を感染させた細胞に比べて細胞の形態が変化しにくく、HSV-2 の感染における細胞形態の変化は US3 のキナーゼ活性に依存

することが示唆された。また、UL34とUL31はUS3のリン酸化基質であり、HSV-1 US3KM感染細胞において核膜での局在がHSV-1野生体感染細胞と異なることが報告されている。しかし、HSV-2においては、野生体感染細胞とUS3KM感染細胞でUL34とUL31の核膜における局在に変化は見られなかった。

以上のことから、HSV-1のUs3とHSV-2のUs3は、プロテインキナーゼ活性の制御機構および下流の標的因子の制御が異なることが明らかとなった。これらUs3の機能の差異と、HSV-1とHSV-2の病態の差異の関連について今後さらなる解析が必要である。

## まとめ

本研究において、HSVにおける外来遺伝子の挿入には、UL3-UL4遺伝子間領域と同様の逆方向からコードされる2つの遺伝子とpolyAシグナルという構造を持つ領域が至適であることが明らかとなった。この構造をもつ領域はHSVに13カ所存在した。本知見は、HSVの今後の医学的利用および基礎研究において有用な情報を提供するものである(特許出願中：特願2008-142662)。

また、同定した外来遺伝子至適挿入部位の1つを利用して完全長のウイルスゲノムおよび野生体の性状を保持したHSV-2のBACシステムを構築した。HSV-2における簡便な組換えウイルス作製系の確立は、HSV-2の基礎研究の進展やHSV-2をベースとした遺伝子治療ベクターやワクチン開発に貢献するものである。また、HSV-2のBACシステムは、我々が以前構築したHSV-1のBACシステムと併用することにより、血清型間における病原性差異の発現メカニズムの解明に大きく貢献すると考えられる。