

単純ヘルペスウイルスの神経軸索輸送の解析
と治療用ベクターとしての可能性の検討

(課題番号 13670291)

平成 13 年度～平成 15 年度科学研究費補助金（基盤研究 (C) (2)）研究成果報告書

平成 16 年 5 月

研究代表者 小笠原 正洋

(旭川医科大学 医学部 助手)

はしがき

本冊子は、平成13～15年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)、「単純ヘルペスウイルスの神経軸索輸送の解析と治療用ベクターとしての可能性の検討、課題番号：13670291」の研究成果報告書である。

ヘルペスウイルスが潜伏感染するためには、粘膜に感染後、神経軸索を經由して中枢神経細胞核に到達しなければならない。軸索という“地下トンネル”を往復して潜伏・再発を起こすわけだ。

本研究は“地下トンネル”を移動するというヘルペス独特のメカニズムを少しでも明らかにしたいと始めた。また、移動手段を明らかにし、その制御を可能にし、最終的にウイルスベクター開発の足掛かりにしたいと考えていた。残念ながら、事を簡単に考え過ぎていたようだ。如何に本来の機能を損なわないで、且つ標識の付いた組み換え体ウイルスを作成するか、如何に軸索輸送を可視かするかという問題を最後まで解決できなかった。その為、若干道筋から外れたが、将来のウイルスベクター開発の足掛かりとなるパッケージングその他の検討を行った。

厳密には本研究の実績とは言い難いかもしれないが、本研究予算で実験したこともあり、本冊子に載せたいと思う。

研究組織

研究代表者 小笠原 正洋 (旭川医科大学 医学部 助手)

研究経費

交付決定額 (配分額)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 13 年度	1,800	0	1,800
平成 14 年度	1,000	0	1,000
平成 15 年度	500	0	500
総計	3,300	0	3,300

研究発表

(1)学会誌等

Ogasawara, M., Knox Y.M. and Wakamiya, N.
Packaging machinery of herpes simplex virus type 1 genome.
Virus Infection Seminar. Vol.5, 1-5 (2003)

Suzutani, T., Ogasawara, M. (以下省略)
Differential mutation patterns in thymidin kinase and DNA polymerases genes of herpes simplex virus type 1 clones passaged in the presence of acyclovir or penciclovir.
Antimicrobial agents and chemotherapy.47 (5), 1707-1713 (2003)

Suzutani, T., Ogasawara, M. (以下省略)
Anti-herpes activity of an extract of Ribes nigrum L.
Phytother. Res. 17 609-613 (2003)

Ogasawara, M., Suzutani, T., Yoshida, I. and Azuma, M.
Role of the UL25 gene product in packaging DNA into the herpes simplex virus capsid; Location of UL25 product in the capsid and demonstration that it binds DNA.
Journal of Virology.75 (3), 1427-1436 (2001)

Shibaki, T., Suzutani, T., Yoshida, I., Ogasawara, M. and Azuma, M.
Participation of type I interferon in the Decreased virulence of the UL 13 gene-deleted mutant of herpes simplex virus type 1.
Journal of Interferon and Cytokine Research. 21, 279-285 (2001)

(2)口頭発表 (発表予定)

(3)出版物 (なし)

研究成果による工業所有権の出願・所得状況 (なし)

研究目的

ヘルペスウイルスが潜伏感染するためには、粘膜に感染後、神経軸索を經由して中枢神経細胞核に到達しなければならない。軸索という“地下トンネル”を往復して潜伏・再発を起こすわけだが、“地下トンネル”を移動するというヘルペス独特のメカニズムは謎である。年度内に、ヘルペスウイルスが“地下トンネル”を移動する交通手段を明らかにしたい。

軸索輸送のメカニズムが解明できれば、単純疱疹・带状疱疹の根本的治療法の開発につながると共に“潜伏のメカニズム”も明らかにすることが可能となる。さらに軸索輸送を外部から制御できるリコンビナントウイルスを開発できれば、遺伝子治療において“潜伏”という隠れみのあるウイルスベクターの開発も可能となる。普段は“消防署”という神経核に待機し、急患・病気の再発が生じると“地下トンネル”を通して危険信号を送ったり、治療が可能となるかもしれない。

ヘルペスウイルスが“地下トンネル”を移動する交通手段とは、つまり“自分の足で走る”のか、“整備されたベルトコンベアー”を利用するのかということだろう。恐らく、後者の手段、つまり細胞のモーター蛋白（ダイネインあるいはキネシン・スーパーファミリー）を利用しているのだろう。それも、神経細胞特異的な分子モーターにより微小管に沿って輸送されると考えられる。もう一つ重要なことは、神経節と粘膜間の往復切符をいかにして優先的に手に入れたかである。その為には、コンベアーベルトにしがみついた“腕”と“スイッチ”となるべきウイルス蛋白が必要となる。“腕”が分子モーターに結合するウイルス構造蛋白であり、“スイッチ”はウイルスの持つ蛋白リン酸化酵素であろう。これらのメカニズムが明らかになれば、神経細胞間での神経伝達物質・神経伝達物質受容体の輸送の詳細も明らかにできるかもしれない。さらに、これらの物質やウイルスの輸送を制御が可能となるだろう。神経節から脳への移行の制御も可能になれば、治療用ベクターとして、脳腫瘍・その他の癌の治療・再発防止（神経節に潜伏しながら、再発を監視）が可能となる。

例えば、癌特異的あるいは癌で産生量の多い物質（増殖因子など）が血中に存在する可能性のある癌の場合、癌の発生・再発の監視と防止を可能にすることが可能となるだろう。ヘルペスウイルスは神経節では、Latency associated transcripts (LATs) を発現しているため、この転写物の元の一部の遺伝子領域に上記の癌関連物質のレセプターの遺伝子を組み込んだリコンビナントウイルスを作成。癌関連物質の結合により、そのレセプターからのシグナル伝達により再発感染の“スイッチ”がオンになるようにウイルス遺伝子を設計し、エフェクター蛋白としてIFN・TNFの遺伝子を前早期遺伝子のプロモーター下に発現するような治療用ベクターの作成が可能だろう。

研究実施計画

分子モーターとウイルス蛋白間の相互作用の検討

分子モーター蛋白（ダイネイン、キネシン）遺伝子の組織別のクローニング。微小管依存性輸送に係わるウイルスゲグメント蛋白(UL34, US11, UL25)の遺伝子クローニングとタグ付きプラスミドの作成。上記蛋白分子間の相互作用の解析。

組み換え体ウイルスの作成

分子モーター蛋白と相互作用を示したウイルスゲグメント蛋白に可視化の為、GFPタグの付いた組み換え体ウイルスを作成。

GFP-UL34組み換え体ウイルス (rGFP-UL34v)

GFP-US11組み換え体ウイルス (rGFP-US11v)

以上の作成したウイルス株を培養細胞に感染させ、細胞内の局在、増殖能を検討する。

ウイルスの蛋白リン酸化酵素の微小管依存性輸送の検討

ウイルスリン酸化酵素によるモーター蛋白のリン酸化によるウイルス微小管輸送への影響を検討する為、リン酸化遺伝子欠損ウイルスを作成。

UL13とUS3の遺伝子欠損ウイルス作成 (Δ UL13vと Δ US3v)

作成したウイルス株を培養細胞に感染させ、細胞内の局在、増殖能を検討後、さらに可視化ウイルス株作成と同様の方法で2重組み換え体ウイルスを作成。

UL13欠損/GFP-UL34/組み換え体ウイルス
(Δ UL13/rGFP-UL34v)

US3欠損/GFP-UL34組み換え体ウイルス
(Δ US3/rGFP-UL34v)

UL13欠損/GFP-US11組み換え体ウイルス
(Δ UL13/rGFP-US11v)

US3欠損/GFP-US11組み換え体ウイルス
(Δ US3/rGFP-US11v)

以上の作成したウイルス株を培養細胞に感染させ、細胞内の局在、増殖能を検討する。またマウスを使った実験で角膜から三叉神経節到達度合いを検討、あるいは後根神経節の初代培養細胞で可視化組み換え体ウイルスの軸索輸送を観察する。

微小管依存性輸送制御の可能性の検討

前述の2重組み換えたいウイルスで明らかに輸送に変化のあったものについて、プロモーターの改変が可能かを検討。

プロモーター領域をメタロチオネインのプロモーターに改変した組み換えたいウイルスの作成し、初代培養細胞で輸送制御の可否の検討を行い、出来れば動物実験に持っていく。

ウイルスベクターとしての可能性の検討

最後に、UL41 欠損ウイルス（宿主蛋白の発現を抑制しなくなった株）を基礎に、神経軸索輸送に関係したウイルス遺伝子のプロモーターを外部から誘導可能なプロモーターに置き換えてリコンビナントウイルスが、遺伝子治療用のベクターとして利用可能かどうかを動物実験で検討する。つまりウイルスの蛋白リン酸化酵素あるいは“スイッチ”の役割をする遺伝子産物を誘導することにより、再活性化され、神経節粘膜まで輸送されるかどうか。

研究成果

分子モーター蛋白の遺伝子クローニング

神経特異的レトログレイド分子モーター蛋白としてダイネイン IC1A variant とカーゴアダプター蛋白ダイナクチン(DCTN1;p150^{Gln⁶⁴})を脳由来cDNAライブラリーから、普遍的モーター蛋白ダイネイン IC2C variant を臍帯由来cDNAライブラリーからクローニングした。

微小管依存性輸送に係わるウイルステグメント蛋白(UL34, US11, UL25)の遺伝子をHSV 1 業室内ストレインVR 3株のゲノムからクローニングした。

蛋白分子間の相互作用の検討

蛋白間相互作用をウサギ網状赤血球を用いた In vitro 翻訳システムで解析した。テグメント蛋白 UL34 が神経特異的蛋白ダイネイン(IC1A variant)と高い親和性を示した。さらに、弱いながら普遍的モーター蛋白(IC2C variant)、カーゴアダプター蛋白(DCTN1;p150^{Gln⁶⁴})とも親和性を示した。カプシド蛋白 UL25 のこれらモーター蛋白との相互作用は確認されなかった。

組み換え体ウイルスの作成

以上の結果より、UL 3 4 組み換え体の作成と共にアンテログレイド輸送に関係すると言われるUS 1 1の組み換え体を作成した。

GFP-UL 3 4 組み換え体ウイルス (rGFP-UL 3 4 v)

UL 3 4 のN末末端にGFPのストップコドンを除いてフレームシフトが起こらないように組み換え体を作成した。このウイルスの感染により UL34 の核膜への集積が観察されたのみで、微小管への集積は見られなかった。残念ながら、この組み換え体はヘルパー細胞なしでは、遊離ウイルスは殆ど取れなかった。つまり、GFP-UL34 はテグメント蛋白として機能しないし、且つビリオンの一部となっていないと考えられ、新たなタグ付きの組み換え体の作成を検討中である。

GFP-US11組み換え体ウイルス (rGFP-US11v)

UL11のN末端にGFPのストップコドンを除いてフレームシフトが起こらないように組み換え体を作成した。細胞内で増殖率の低下に比べ、細胞外へのウイルスの放出に影響はないものと考えられる (ページ8)。このウイルスの感染細胞ではUS11の核小体への集積が観察されたが、微小管への集積は見られなかった。11, 12ページに作成したウイルス株の感染細胞の蛍光像を示す。この蛋白はウイルス増殖に必須ではないが、神経軸索輸送には必須であるといわれているので、神経節細胞の初代培養系あるいは動物での実験が必要と思われた。

ウイルス増殖率 (MOI=1)

	4h	8h	10h	12h	24h	32h
Wt type						
遊離	50	0	0	1000	1.5×10^7	3.0×10^7
細胞内	0	0	2.1×10^4	1.5×10^5	7.0×10^6	6.0×10^6
rGFP-US11v						
遊離	0	50	0	0	2.0×10^5	2.5×10^6
細胞内	0	0	0	500	1.9×10^6	6.0×10^6

ウイルスリン酸化酵素の遺伝子欠損ウイルスと2重組み換え体ウイルスの作成

UL13とUS3の遺伝子欠損ウイルス ($\Delta UL13v$ と $\Delta US3v$) と可視化ウイルス株作成と同様の方法で以下の2重組み換え体ウイルスを作成。

UL13欠損/GFP-UL34/組み換え体ウイルス

($\Delta UL13/rGFP-UL34v$)

US3欠損/GFP-UL34組み換え体ウイルス

($\Delta US3/rGFP-UL34v$)

UL13欠損/GFP-US11組み換え体ウイルス

($\Delta UL13/rGFP-US11v$)

US3欠損/GFP-US11組み換え体ウイルス

($\Delta US3/rGFP-US11v$)

ウイルス増殖率 (MOI = 1)

	4h	8h	10h	12h	24h	32h
Wt type						
遊離	50	0	0	1000	1.5×10^7	3.0×10^7
細胞内	0	0	2.1×10^4	1.5×10^5	7.0×10^6	6.0×10^6
ΔUL13v						
遊離	0	50	0	0	5.0×10^5	2.5×10^5
細胞内	0	0	0	500	7.0×10^5	7.3×10^5
ΔUS3v						
遊離	0	50	0	0	5.8×10^5	1.6×10^6
細胞内	0	0	0	500	1.3×10^6	9.5×10^5

UL13とUS3の遺伝子欠損ウイルスの感染細胞での増殖率を比較してみた。9ページに示すように遊離ウイルス量に差はないが、細胞内ビリオン数を見ると Δ US3v感染細胞の方がWt typeに近かった。つまり Δ US3vの方がビリオンの細胞外放出が遅れる傾向にあった。

ウイルス増殖率 (MOI = 1)

	4h	8h	10h	12h	24h	32h
Wt type						
遊離	50	0	0	1000	1.5×10^7	3.0×10^7
細胞内	0	0	2.1×10^4	1.5×10^5	7.0×10^6	6.0×10^6
ΔUL13/rGFP-US11v						
遊離	0	100	0	0	5.0×10^4	8.0×10^5
細胞内	0	0	0	7000	8.5×10^5	6.0×10^5
ΔUS3/rGFP-US11v						
遊離	50	100	0	0	4.8×10^5	1.6×10^6
細胞内	0	50	8200	5.5×10^4	3.5×10^5	6.0×10^5

UL13欠損/GFP-UL34、US3欠損/GFP-UL34組み換え体ウイルスの作成は断念した。残念ながら、rGFP-UL34vはヘルパー細胞なしでは、遊離ウイルスは殆ど取れないし、本来の機能が消失していると考えられるので、新たなタグ付きの組み換え体の作成を検討中である。

Δ UL13/rGFP-US11vと Δ US3/rGFP-US11vとの感染細胞内での増殖を比較してみた。10ページに示すように、全体として増殖率の低下が見られるが、 Δ UL13vと Δ US3vとの比較の時と同様にUS3遺伝子欠損のあるウイルスの方が細胞外放出の遅延が見られた。さらに Δ US3vと Δ US3/rGFP-US11vを比較すると、明らかに Δ US3/rGFP-US11vの方に遅延が確認された。この事はウイルスのアンテログレイド輸送の障害が考えられると思う。以前より、培養細胞での感染実験でUS11はUS3によりリン酸化の基質になるが、その機能には必須ではないといわれている。しかし、今回観察された結果を見ると、US3が直接あるいは間接的にアンテログレイド輸送に関係している可能性がある。US11は必須の遺伝子ではないが、神経軸索輸送ではアンテログレイド輸送に必須といわれている。

以上の作成したウイルス株を培養細胞に感染させ、細胞内の局在の検討を行った(13、14ページ)。MOI=100の感染では、4時間でrGFP-US11vの細胞質、核小体への局在が見られた。組み換え体間で差が見られ、 Δ UL13/rGFP-US11v感染細胞で2時間以上の遅れが見られたが、この結果がUL13のレトログレイド輸送への関連を意味するのかは分からない。今後さらなる精査が必要であろう。

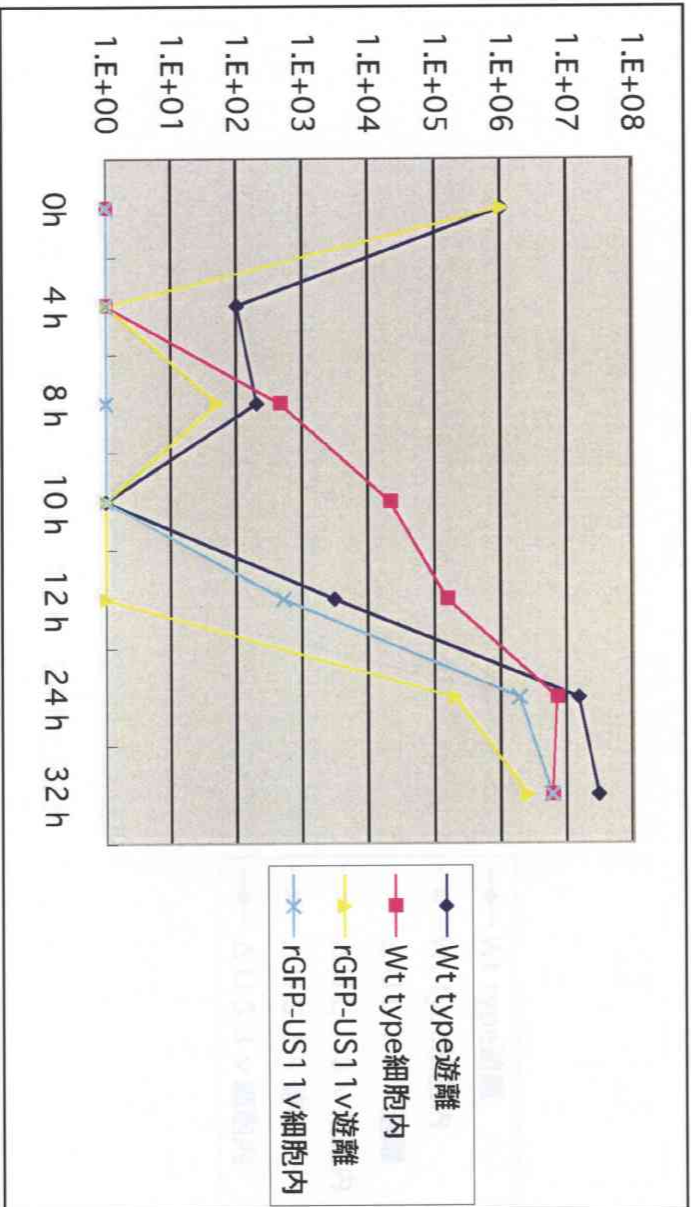
マウスを使った実験で角膜から三叉神経節到達度合いを検討、あるいは後根神経節の初代培養細胞で可視化組み換え体ウイルスの軸索輸送を観察する予定であった。しかし、GFPタグ自体が本来のウイルス蛋白の機能に影響している可能性が強く、動物実験まで進めなかった。今後、組み換え体の再検討と共に動物実験に進んでいく予定である。

ウイルスゲノムのパッケージング機構の解析

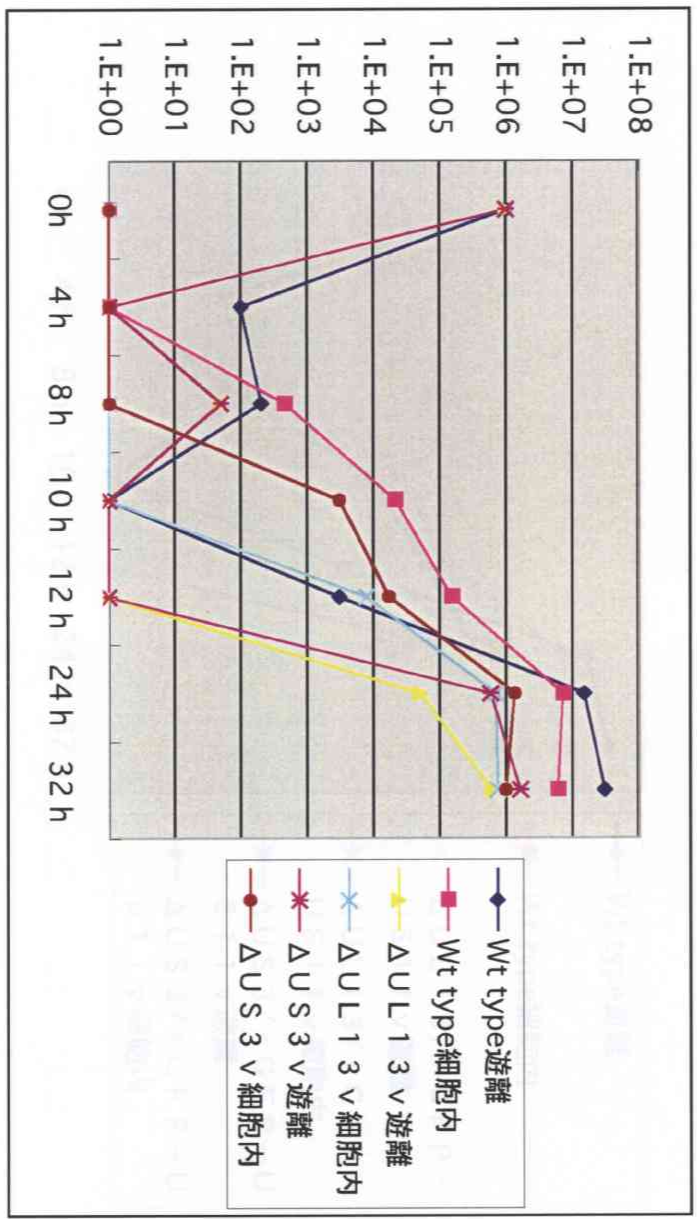
ヘルペスウイルスのパッケージング機構は遺伝子欠損ウイルスの研究から UL 6, UL 15, UL 25, UL 28, UL 17, UL 32, UL 33 遺伝子産物が DNA cleavage / packaging に必須であると同等されている。このうちカプシド蛋白としてパッケージングに関わっているのが UL 6 と UL 25 で、UL 15, UL 28, UL33 は直接 DNA に結合しゲノムサイズに特異的切断すると考えられている。

今回の研究から、以下の結果が示唆された。(1) UL25 はペントン局在蛋白で、成熟カプシドではゲノム侵入部位で機能している。かつ terminase の一つである UL28 と会合している可能性がある。(2) UL 15 / UL 28 はゲノムの繋ぎ目に存在する”a-a” sequence: -Uc-DR4mDR2n-Ub-DR1-Uc-DR4mDR2n-Ub- の中の特異的ゲノム切断サイトである Ub-DR1-Uc に結合する。(3) UL15 は Uc 内の *pac 2* 配列に結合する。

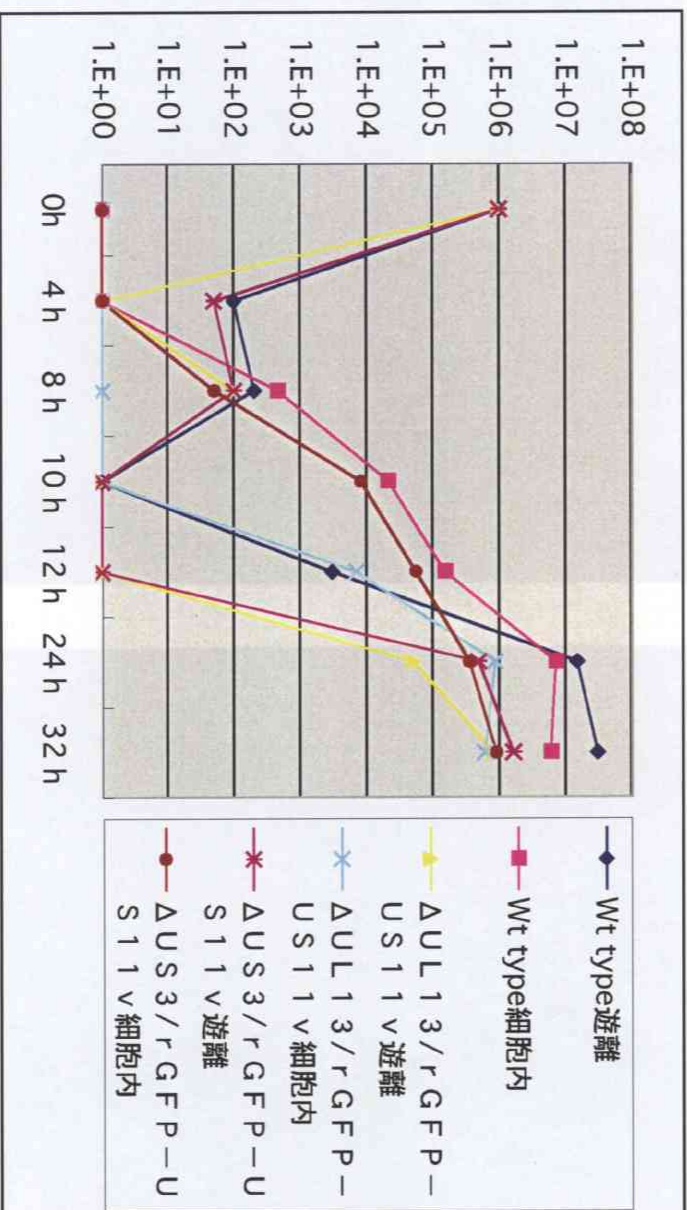
GFP-US11組み換え体ウイルスの増殖曲線



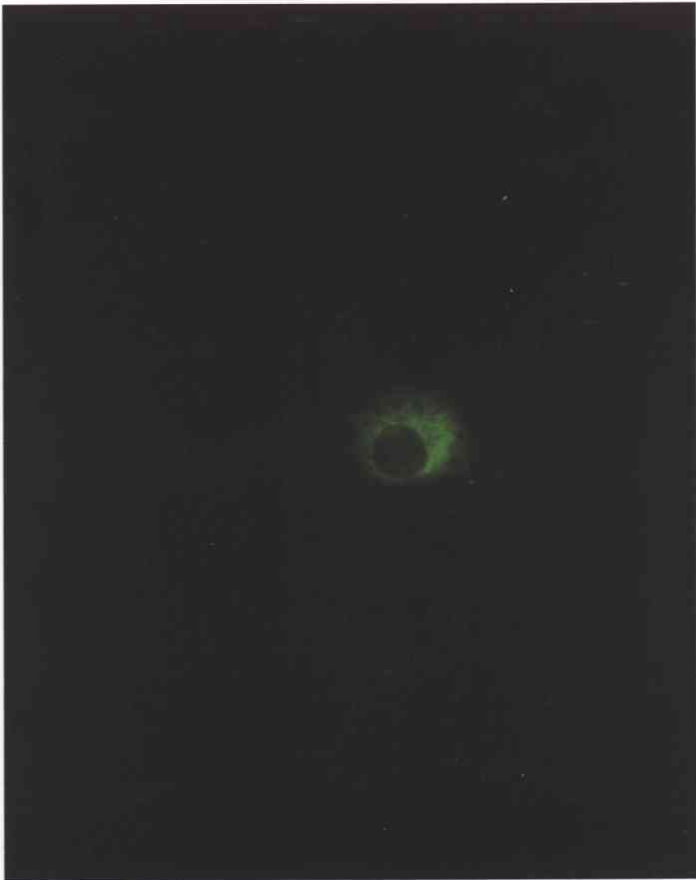
UL13とUS3の遺伝子欠損ウイルスの増殖曲線



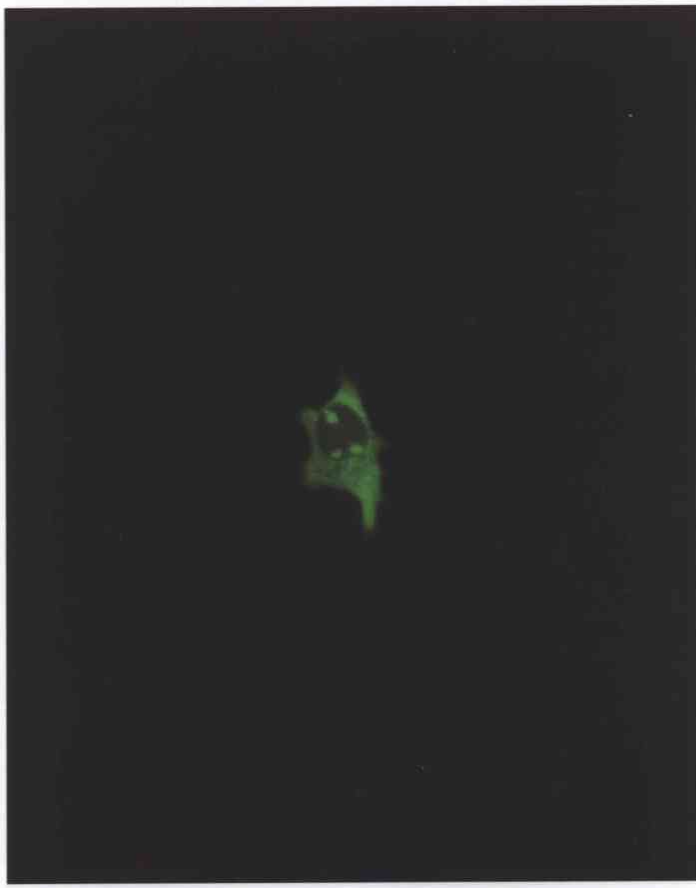
2重組み換え体ウイルスの増殖曲線



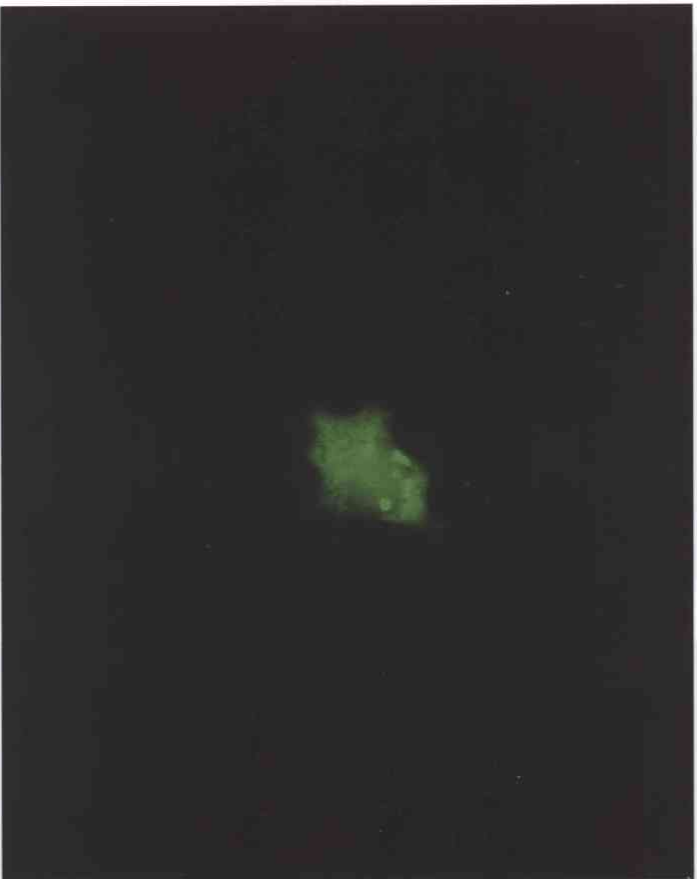
GFP-US11組み換えウイルスの蛍光像 (MOI=0.1)



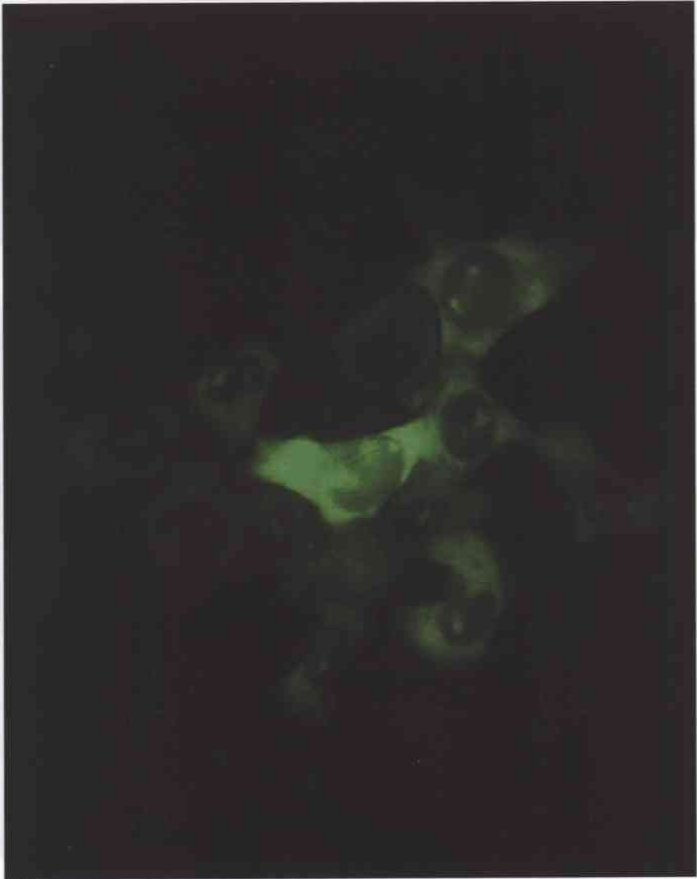
8 h post-infection



10 h post-infection



12 h post-infection

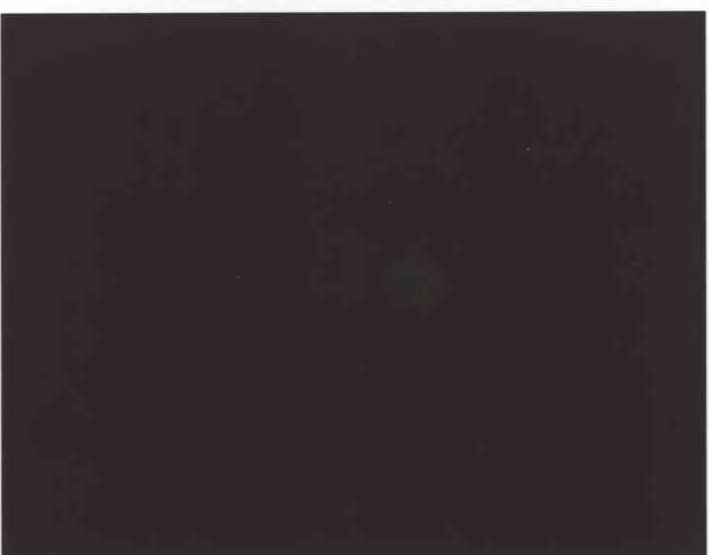


24 h post-infection

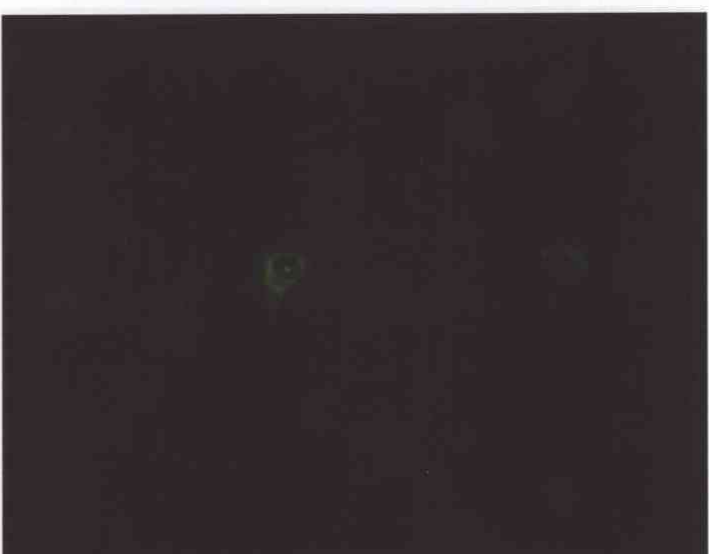
野生株と2重組み換え体ウイルスの感染後4hの蛍光像 (MOI=100)



rGFP-US11v

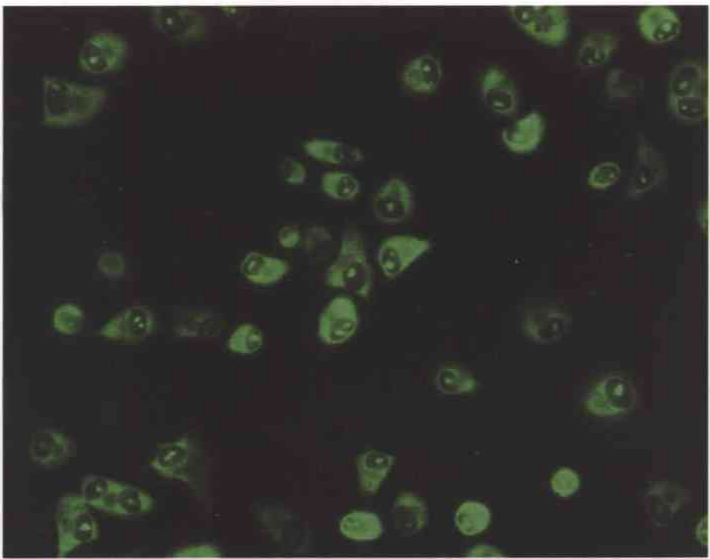


ΔUL13/rGFP-US11v

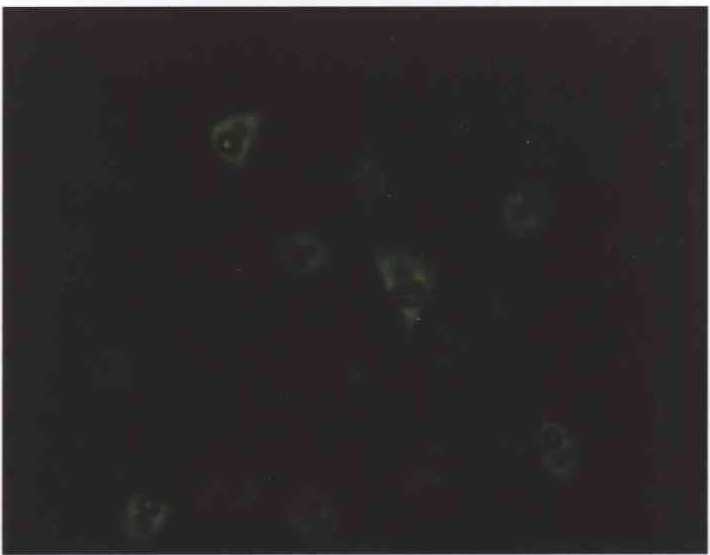


ΔUL13/rGFP-US11v

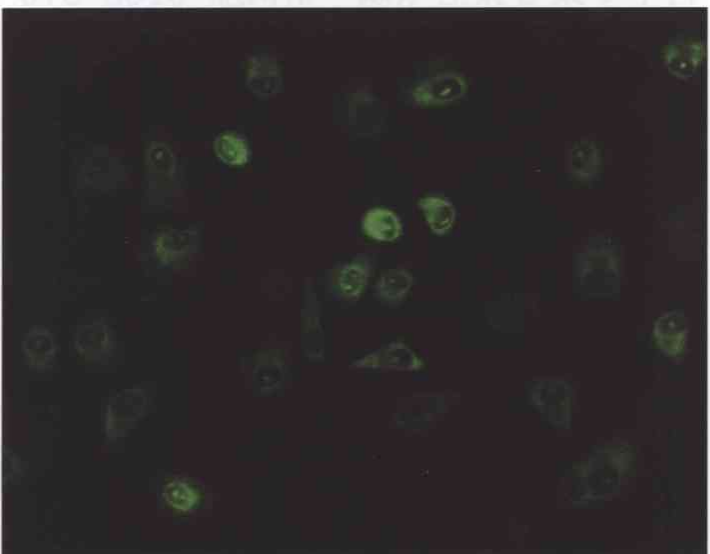
野生株と2重組み換え体ウイルスの感染後5hの蛍光像 (MOI=100)



rGFP-US11v



ΔUL13/rGFP-US11v



ΔUL13/rGFP-US11v