

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19498

研究課題名(和文) 内因性免疫を軸としたウイルス性脳炎の解析と低侵襲性治療基盤の構築

研究課題名(英文) Development of a therapeutic strategy for viral encephalitis based on intrinsic immunity.

研究代表者

加藤 哲久(Kato, Akihisa)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：40581187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：単純ヘルペスウイルス1(HSV-1)は、ウイルス性脳炎の原因である。我々は、HSV-1 ウラシル-DNAグリコシダーゼ(vUNG)の酵素活性にはリン酸化が必須であり、vUNGはAPOBEC1に対抗し、マウスの中枢神経系における脳炎を促進することを見出した。APOBEC1の存在は、リン酸化部位特異的なHSV-1変異体感染マウスの致死性脳炎を著しく改善し、UNG阻害は野生型HSV-1感染マウスの致死性脳炎を阻害した。一連の知見は、vUNGがAPOBEC1依存的な内在性の抗ウイルス活性からの回避を可能にする重要な因子であることを再定義し、重症HSV-1脳炎に対する新たな治療法を示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単純ヘルペスウイルス1(HSV-1)はウイルス性脳炎の最も一般的な原因であり、致死性あるいは重篤な神経学的障害をもたらすことがある。しかしながら、健常人におけるHSV脳炎を抑制している実行因子(=HSV脳炎の抑制を司る内因性免疫の実態)は、全く不明であった。したがって、内因性免疫の一端を紐解いた本研究は、高い学術的意義を有すると考えられる。さらに、バクテリオファージがコードする蛋白質とアデノ随伴ウイルスベクターを併用し、内因性免疫を活性化させるというユニークな戦略により、新たなHSV脳炎抑制法を提案した本研究は、ウイルス性脳炎のみならず、CNS疾患研究全般への波及効果も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Herpes simplex virus 1 (HSV-1) is the most common cause of viral encephalitis, which can be lethal or result in severe neurological defects. We demonstrated that activation of HSV-1 uracil-DNA glycosylase (vUNG) by phosphorylation, essential for its enzymatic activity, counteracted APOBEC1 to promote viral replication and encephalitis in the central nervous system (CNS) of mice. The activation of vUNG protected HSV-1 genomes from APOBEC1-mediated DNA editing, allowing efficient viral replication to occur. The presence of APOBEC1 markedly improved lethal encephalitis in mice infected with an HSV-1 mutant carrying a mutation in the phosphorylation site and an UNG inhibitor protected wild-type HSV-1-infected mice from lethal encephalitis. These findings re-define vUNG as an important factor that allows evasion from intrinsic anti-viral immunity mediated by APOBEC1 in the CNS, and suggest a new therapeutic approach for the treatment of fetal and critical HSV-1 encephalitis.

研究分野：ウイルス学

キーワード：単純ヘルペスウイルス 脳炎 内因性免疫 vUNG APOBEC1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

単純ヘルペスウイルス 1 (HSV-1) は、代表的な DNA ウイルスであり、ヒトに脳炎、性器ヘルペス、皮膚疾患等、多様な病態を引き起こす。抗 HSV 剤が臨床応用されている今日においても、その治療効果は十分とは言えず、ヘルペス脳炎 (HSE) 患者の約半数は社会復帰できないか死亡する。HSE は脳炎全体の 10 から 20% を占め、起炎ウイルスの判明した散発性脳炎では最も多い疾患である。したがって、HSE はアンメットメディカル・ニーズの大きな疾患といえる。

脳内に侵入した HSV-1 は、初期・獲得・内因性免疫を克服することで、HSE を引き起こすと感ぜられる。実際、HSV-1 がコードするウイルス構造蛋白質である VP22 が AIM2 依存的なインフラマソーム応答を阻害、ウイルス特異的なプロテインキナーゼである UL13 が CTL 誘導を阻害することで、マウスモデルにおける CNS における効率的な HSV-1 増殖が成立することや TLR3 経路を活性する抗体による初期免疫応答・サイトカイン CXCL9 による獲得免疫応答の増強が、HSE を阻害することを報告してきた。同様に、欧米のグループより、内因性免疫の一部であるオートファジーをウイルス蛋白質 ICP34 が阻害することも、効率的な HSE 発症に関わることを報告している。そこで、本研究では、中枢神経系組織 (CNS) における内因性免疫、すなわち宿主抵抗性因子と HSV によるその回避機構の解明、さらには一連の分子機構を標的とした HSE の阻害を試みた。

### 2. 研究の目的

上述の通り、本研究では、CNS における新規内因性免疫、すなわち宿主抵抗性因子の同定と HSV によるその回避機構の解明、さらには一連の分子機構を標的とした HSE の阻害戦略の確立を目標とした。

### 3. 研究の方法

HSV-1 研究の先行報告に従い、ウイルス学的・細胞生物学的解析を試みた。本研究において、特に特殊と考えられる実験法のみ、以下に記載する。

(1) vUNG 酵素活性測定：vUNG 活性は、ウラシル含有オリゴヌクレオチドのアルカリ切断を測定することで測定した。具体的には、野生型 HSV-1 や各組換えウイルスを 10 MOI で感染させた培養細胞を感染後 24 時間で回収し、プロテアーゼ阻害剤カクテルを含む細胞溶解バッファー (10mM Tris-HCl [pH7.4]、1mM EDTA、0.5% Triton X-100、1mM DTT) で可溶化した。短時間の超音波処理と遠心分離の後、20 $\mu$ l の上清を 80 $\mu$ l の反応バッファー (10mM Tris-HCl [pH7.4]、1mM EDTA、62.5mM NaCl) および 0.5 $\mu$ l の 0.5pmol/ $\mu$ l 5'-P32 標識ウラシル含有オリゴヌクレオチド (5'-CATAAAGTG-U-AAAGCCTGG-'3) (10 位に U を含む) と混合した。反応を 37 $^{\circ}$ C で 30 分間進行させた後、75 $\mu$ l のストップバッファー (70%ホルムアミド、0.4M NaOH、1x TBE) を加え、100 $^{\circ}$ C で 15 分間加熱して反応を停止させた。その後、サンプルを 35 $\mu$ l の色素バッファー (36%グリセロール、30mM EDTA、0.05%プロモフェノールブルー、0.035%キシレンシアノール) と混合し、グリセロール耐性ゲルバッファー (5%グリセロール、40%メタノール、10%酢酸) 中の 20%ポリアクリルアミド/7M 尿素ゲルで電気泳動して分析した。ゲル乾燥後、オートラジオグラフィーに供した。切断されたオリゴヌクレオチドの量は、ImageQuant (GE Healthcare) を用いて定量した。

(2) APOBEC1 依存的な HSV-1 ゲノムへの変異導入の解析：AT リッチ DNA を検出するため、高感度アッセイ法 3D-PCR 法を、以下の通り実施した。GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) の溶解バッファーとプロテイナーゼ K で HSV-1 感染細胞/組織を溶解後、RNase A で処理した。短時間の超音波処理の後、フェノール-クロロホルムで 2 回、ジエチルエーテルで 4 回抽出し、NucleoSpin Plasmid EasyPure Column (TaKaRa) を用いて、ゲノム DNA を精製した。そして、HSV-1 Us3 に対するプライマー 5'-CAAAGTCCGCTCCTTAAAA-3' および 5'-TCTGGGTGGCTGCTGTCAA-3' と r-taq (TaKaRa) を用いて、95 $^{\circ}$ C で 9 分間、95 $^{\circ}$ C で 45 秒間、63 $^{\circ}$ C で 30 秒間、72 $^{\circ}$ C で 1 分間のサイクルを 40 回、72 $^{\circ}$ C で 1 分間の伸長というプロトコールで、1stPCR を実施した。2ndPCR は、プライマー 5'-AATGGCTGTCGTAAGTTTT-3' および 5'-CTATGGGGTAGCTCCTGGTT-3' と r-taq (TaKaRa) を用いて、96-83 $^{\circ}$ C で 5 分間、96-83 $^{\circ}$ C で 60 秒間、62 $^{\circ}$ C で 30 秒間、72 $^{\circ}$ C で 1 分間のサイクルを 40 回、72 $^{\circ}$ C で 10 分間の伸長というプロトコールで実施した。なお、変異頻度を決定するために、2ndPCR サンプルから PCR で増幅された DNA 断片を pGEM-T-easy ベクター (Promega) にクローニングし、大腸菌に形質転換した後、無作為に選択したクローンを、3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を用いて塩基配列を決定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) vUNG Ser-302 リン酸化は、vUNG 活性に極めて重要である。

宿主 UNG 欠損細胞における野生型 HSV-1 感染細胞由来の UNG 活性、すなわち vUNG 活性は、脱リン酸化酵素 CIP 処理により、ほぼ消失した。

リン酸化プロテオーム解析により、vUNG Ser-302 が HSV-1 感染細胞において、リン酸化されていることが明らかとなった。

vUNG の X-結晶解析データを位型とした分子動力学解析により、Ser-302 リン酸化時、vUNG の基質である DNA の相互作用部位のフレキシビリティが上昇することが示唆された。

vUNG Ser-302 をアラニン置換した vUNG-S302 変異 HSV-1 感染細胞では、vUNG 活性がほぼ消失した。

これら から の知見より、HSV-1 感染細胞では、vUNG Ser-302 リン酸化が、vUNG 活性に必須であることが明らかとなった。

##### (2) マウス脳内において、vUNG は APOBEC1 による抗 HSV-1 活性を阻害する。

野生型 HSV-1 感染マウスの脳では、APOBEC1 および APOBEC3 mRNA レベルの上昇が認められた。特に、APOBEC1 に関しては、脳内における HSV-1 の主要な標的組織と考えられるニューロンにおける mRNA レベルの上昇や、HSV-1 感染細胞集団における蛋白質レベルでの発現上昇も確認された。

vUNG-S302 変異 HSV-1 を脳内接種したマウスでは、野生型 HSV-1 を脳内接種時と比較して、マウスの致死率および脳内における HSV-1 子孫ウイルス産生量が有意に低下した。APOBEC1 欠損マウスでは、vUNG-S302 変異によるマウスの致死率および脳内における HSV-1 子孫ウイルス産生量の低下が消失した。

一方、APOBEC3 欠損マウスは、vUNG-S302 変異マウスの致死率および脳内における HSV-1 子孫ウイルス産生量の低下には影響が認められなかった。

さらに、マウス脳由来の total DNA を対象とした APOBEC1 依存的な HSV-1 ゲノムの変異率を、簡便かつ敏速に解析可能な Us3-3D-PCR 法により、vUNG-S302A 変異 HSV-1 ゲノムには APOBEC-1 依存的な C to T 変異が蓄積していることが示唆された。本 DNA 編集は、APOBEC1 欠損や野生型 vUNG の存在により、ほぼ完全に消失した。

これら から の知見より、HSV-1 感染によりマウス脳内では、APOBEC1 の発現が誘導され、HSV-1 ゲノムに DNA 変異が導入される一方で、HSV-1 は vUNG により DNA 変異を修復することで、効率的な DNA 複製を成立させていることが明らかとなった。かとなった。

##### (3) vUNG は内因性免疫を利用した誘導な HSE 治療標的分子である。

バクテリオファージ PBS がコードする小分子である UGI は、古くから HSV-1 がコードする vUNG を含む広域の UNG と効率的に結合し、阻害することが知られている。そこで、UGI をアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターにクローニングした AAV-UGI を作出し、野生型マウスに投与した後、致死量の HSV-1 を脳内接種したところ、マウス致死率の著しい回復が認められた。

なお、陰性コントロールである蛍光蛋白質 ZsGreen を AAV ベクターにクローニングした AAV-ZsGreen では、マウス脳内における蛍光シグナルは確認されたが、AAV-UGI とは異なり、マウス致死率の低下は認められなかった。

さらに、AAV-UGI による致死率低下は、APOBEC1 欠損マウスでは、ほぼ完全に消失したことから、APOBEC1 依存的、すなわち内因性免疫に起因することも確認された。

これらの から 結果より、vUNG は HSE 治療に対する有望な創薬標的分子であること、我々が作出した AAV-UGI は、APOBEC1 依存的な内因性免疫を機能的にすることで、中枢神経系組織における HSV-1 増殖を阻害可能であることが示唆された。

上述の通り、HSV-1 は最も一般的な散発性脳炎の原因であり、アシクロビルに代表される抗ウイルス剤により、HSE の死亡率そのものは低下したが、生存者の約半数は社会復帰できないか死亡する。また、生存者の 44%~62%が記憶障害あるいはパーソナリティ障害等の神経学的後遺症を有するという報告もあることから、内因性免疫を活用した治療戦略の確立は、重要な知見であると考えられる。また、中枢神経系疾患は従来の低分子や抗体といったモダリティでは、治療困難なことも少なくないことから、AAV ベクターを用いた治療戦略の確立は、他の中枢神経系疾患への波及効果も期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 A. Kato, R. Iwasaki, K. Takeshima, Y. Maruzuru, N. Koyanagi, T. Natsume, H. Kusano, S. Adachi, S. Kawano, Y. Kawaguchi.	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of a novel neurovirulence factor encoded by the cryptic orphan gene UL31.6 of herpes simplex virus 1.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 J. Virol.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/jvi.00747-24	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 A. Fukui, Y. Maruzuru, S. Ohno, M. Nobe, S. Iwata, K. Takeshima, N. Koyanagi, A. Kato, S. Kitazume, Y. Yamaguchi, Y. Kawaguchi.	4. 巻 14
2. 論文標題 Dual impacts of a glycan shield on the envelope glycoprotein B of HSV-1: evasion from human antibodies in vivo and neurovirulence.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e00992-23.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mbio.00992-23.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Y. Kuchitsu, K. Mukai, R. Uematsu, Y. Takaada, A. Shinojima, R. Shindo, T. Shoji, S. Hamano, E. Ogawa, R. Sato, K. Miyake, A. Kato, Y. Kawaguchi, M. Nishitani-Isa, K. Izawa, R. Nishikomori, T. Yasumi, T. Suzuki, N. Dohmae, T. Uemura, G. N. Barber, H. Arai, S. Waguri, T. Taguchi.	4. 巻 25
2. 論文標題 STING signalling is terminated through ESCRT-dependent microautophagy of vesicles originating from recycling endosomes.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nat. Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 453-466.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41556-023-01098-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 K. Takeshima, Y. Maruzuru, N. Koyanagi, A. Kato, Y. Kawaguchi.	4. 巻 96
2. 論文標題 Redundant and specific roles of A-type lamins and lamin B receptor in herpes simplex virus 1 infection.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Virol.	6. 最初と最後の頁 e0142922.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/jvi.01429-22.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 F. Maeda, A. Kato, K. Takeshima, M. Shibasaki, R. Sato, T. Shibata, K. Miyake, H. Kozuka-Hata, M. Oyama, E. Shimizu, S. Imoto, S. Miyano, S. Adachi, T. Natsume, K. Takeuchi, Y. Maruzuru, N. Koyanagi, J. Arii, Y. Kawaguchi.	4. 巻 96
2. 論文標題 Role of the orphan transporter SLC35E1 in the nuclear egress of herpes simplex virus 1.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Virol.	6. 最初と最後の頁 e00306-22.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.00306-22.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Y. Maruzuru, N. Koyanagi, A. Kato, and Y. Kawaguchi.	4. 巻 95
2. 論文標題 Role of the DNA Binding Activity of Herpes Simplex Virus 1 VP22 in Evading AIM2-Dependent Inflammasome Activation Induced by the Virus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Virol.	6. 最初と最後の頁 e02172-20.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.02172-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 加藤哲久, 播磨勇人, 恒川雄二, 五十嵐学, 喜多村晃一, 若江亨祥, 竹島功高, 丸鶴雄平, 小柳直人, 岡田尚巳, 村松正道, 川口寧
2. 発表標題 HSV-1宿主抵抗性因子に対する新規回避機構の解明とその応用
3. 学会等名 第36回ヘルペスウイルス研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤哲久, 播磨勇人, 恒川雄二, 五十嵐学, 喜多村晃一, 若江亨祥, 竹島功高, 丸鶴雄平, 小柳直人, 岡田尚巳, 村松正道, 川口寧
2. 発表標題 単純ヘルペスウイルス内因性免疫に対する新規回避機構の解明とヘルペス脳炎制御への応用
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤哲久, 川口寧
2. 発表標題 単純ヘルペスウイルスの 神経病原性制御機
3. 学会等名 第25回日本神経感染症学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/Kawaguchi-lab/KawaguchiLabTop.html">https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/Kawaguchi-lab/KawaguchiLabTop.html</a> 東京大学医科学研究所 感染・免疫部門 ウイルス病態制御分野
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	川口 寧  (Kawaguchi Yasushi)  (60292984)	東京大学・医科学研究所・教授    (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------