

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670220

研究課題名(和文)単純ヘルペスウイルスの新しい弱毒生ワクチンプラットフォームの構築

研究課題名(英文)Construction of novel platforms for herpes simplex virus attenuated vaccines

研究代表者

川口 寧 (Kawaguchi, Yasushi)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：60292984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：新しいHSVワクチンを複数構築した。構築したHSVワクチンは、過去にワクチン候補になったTK変異ウイルスと比較して高いワクチン効果を示した。また、新しい宿主免疫回避ウイルス因子を複数同定した。その中の1つのウイルス因子のメカニズムを解析したところ、ウイルスのin vivoでの増殖制御に極めて重要な炎症性サイトカインの誘導に必須な宿主因子と相互作用することによってその機能を阻害し、炎症性サイトカインの誘導を抑制していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We have constructed novel live attenuated herpes simplex virus (HSV) vaccines. The constructed vaccines exhibited more vaccine efficacy than a control live attenuated HSV vaccine, TK-deficient mutant virus. In addition, we identified novel HSV proteins that inhibit host immune responses. One of the HSV proteins inhibited induction of proinflammatory cytokines, which are known to control HSV infection in vivo, by interacting with a host cellular protein that regulates the induction of the proinflammatory cytokines.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HSV 宿主免疫回避 感染制御 制御

1. 研究開始当初の背景

(1) HSV はヒトに脳炎、口唇ヘルペス、性器ヘルペス、皮膚疾患、眼疾患、新生児ヘルペスといった多様な病態を引き起こす医学上重要なウイルスである。HSV は一度感染すると宿主に終生潜伏感染し、頻繁に再活性化し病態を引き起こす(回帰発症)。例えば、性器ヘルペスの場合、平均年 5~6 回の回帰発症が約 10 年間続くと言われている。このような HSV 感染症を制御するために、初感染または回帰発症を防ぐワクチンの開発が求められている。事実、外資系大手製薬企業を中心に HSV ワクチンの大規模臨床試験が実施されてきたが、未だ有効なワクチンの開発には至っていない (Science 330:304, 2010)。HSV の頻繁な回帰発症は、HSV が高度な宿主免疫回避機構を獲得していることを示唆している。

(2) 野生体が年間数回体内で増殖しているにも関わらず、さらに回帰発症を繰り返すことは、野生体の免疫原生ではワクチンとしては不十分であり、「野生体の免疫原生をできるだけ保持しながら、弱毒化する」従来の弱毒生ワクチン開発戦略は適応しないことを示唆している。

2. 研究の目的

(1) HSV の効果的なワクチン開発戦略の1つとして、「HSV の宿主免疫回避機構を解除することによって、宿主免疫反応をより強力に惹起できるワクチンのプラットフォームを本研究で開発する。研究代表者は、既に HSV の病原性に極めて大きな役割を果たし、かつ、宿主細胞傷害性 T 細胞 (CTL) からの免疫回避に関与するウイルス因子を同定している。本ウイルス因子に変異を導入すると変異ウイルスは高度に弱毒化し、野生体と比して HSV 特異的 T 細胞の誘導が顕著に亢進する。そこで、宿主細胞免疫回避因子に変異を導入したウイルス、さらには、過去に報告された HSV ワクチン候補株のワクチン効果を詳細に解析・比較する。

(2) 解析するワクチンプラットフォームの改良、つまり、より獲得免疫反応を惹起できるワクチンを開発するために、CTL 回避に関わる新規 HSV 因子を網羅的にスクリーニングすることによって同定し、より効果的な HSV ワクチン開発の標的シーズを蓄積することも目指す。

3. 研究の方法

(1) 宿主細胞免疫回避因子に変異を導入したウイルス、過去にワクチン候補となったことのある TK 変異ウイルス(作製済み)の培養細胞での増殖能、マウス病態モデル (HSV

脳炎モデル、HSV 角膜炎モデル、HSV 膺炎モデル)における個体レベルでの増殖能、病原性を詳細に解析・比較する。

(2) 各変異ウイルス感染マウスにおける HSV 特異的 CTL の誘導を CTL の主要標的である gB に対するテトラマーを用いて解析・比較する。

(3) 約 80 種類ある HSV-1 全遺伝子を発現するプラスミドライブラリーを構築し、構築された HSV-1 遺伝子発現プラスミドとレポーター CTL を用いて、CTL を阻害する HSV-1 因子を網羅的にスクリーニングする。

(4) HSV-1 因子の欠損変異ウイルスを作製する。そして、野生体感染細胞と比して変異ウイルス感染細胞が HSV-1 特異的 CTL クローンの活性化を亢進できるかを確認する。

(5) CTL の活性化の亢進が認められた変異ウイルスには、マウス病態モデルに供し、HSV-1 特異的 CTL の誘導をテトラマー解析で、抗 CD8 抗体投与による CD8 陽性 T 細胞 depletion マウスでの変異ウイルスの増殖・病原性を解析する。そして、同定した HSV-1 因子が個体レベルにおいて CTL 回避に関与しているかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) HSV の宿主細胞性免疫回避因子に変異を導入した組換えウイルスのマウス動物モデルでの病原性およびワクチン効果を、過去にワクチン候補となったことのある TK 変異ウイルスと比較解析した。具体的には、マウス角膜炎モデル、マウス脳炎モデル、およびマウス膺炎モデルにて当該組換えウイルスの病原性を解析した。また、ワクチン効果は当該組換えウイルスを皮下接種にてワクチン後、野生体をチャレンジし、マウス角膜モデルおよびマウス膺炎モデルでワクチン効果を解析した。その結果、当該変異ウイルスは TK 変異ウイルスと比して、高いワクチン効果を発揮することが明らかになった。

(2) 新たに宿主細胞免疫の回避に関与するウイルス因子を同定した。また、複数の宿主免疫回避ウイルス因子に変異を導入した組換えウイルスの作製に成功した。

(3) 複数の HSV の宿主細胞性免疫回避因子に変異を導入した組換えウイルスのマウス動物モデルでの病原性およびワクチン効果を解析した。具体的には、マウス角膜炎モデル、マウス脳炎モデル、およびマウス膺炎モデルにて当該組換えウイルスの病原性を解析した。また、ワクチン効果は当該組換えウイルスを皮下接種にてワクチン後、野生体をチャレンジし、マウス角膜モデルおよびマウス膺

炎モデルでワクチン効果を解析した。その結果、当該組換えウイルスは著しく弱毒化しており、マウス動物モデルにおいて高いワクチン効果を発揮した。

(4) 複数の HSV の宿主細胞性免疫回避因子に変異を導入した組換えウイルスのマウス動物モデルでの病原性およびワクチン効果を、過去にワクチン候補となったことのある TK 変異ウイルスと比較解析した。その結果、新しいワクチンプラットフォームは TK 変異ウイルスと比して、高いワクチン効果を発揮することが明らかになった。

(5) HSV 因子を網羅的に発現するプラスミドライブラリーを用いて、HSV の細胞性免疫回避に關与すると考えられる HSV 因子をスクリーニングした結果、細胞性免疫回避に關与する新規 HSV 因子を複数同定した。その中の 1 つのウイルス因子に關してメカニズムを解析した。その結果、当該ウイルス因子はウイルスの *in vivo* での増殖制御に極めて重要な炎症性サイトカインの誘導に必須な宿主因子と相互作用することによってその機能を阻害し、炎症性サイトカインの誘導を抑制していることが明らかになった。当該ウイルス因子に変異を導入するとマウスモデルでの増殖が低下する。一方、相互作用する宿主因子のノックアウトマウスでは変異ウイルスの増殖は野生体の増殖レベルまで回復した。つまり、この新しいウイルスの免疫回避機構は、実際に *in vivo* におけるウイルス増殖に寄与していることが明らかになった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Y. Maruzuru, N. Koyanagi, N. Takemura, S. Uematsu, D. Matsubara, Y. Suzuki, J. Aarii, A. Kato and Y. Kawaguchi. 2016, p53 is a Host Cell Regulator during Herpes Simplex Encephalitis. *J. Virol.* 90: 6738-6745, 査読有
DOI:10.1128/JVI.00846-16

K. Shindo, A. Kato, N. Koyanagi, H. Sagara, J. Aarii and Y. Kawaguchi. 2016, Characterization of a herpes simplex virus 1 (HSV-1) chimera in which the Us3 protein kinase gene is replaced with the HSV-2 Us3 gene. *J. Virol.* 90: 457-473, 査読有,
DOI:10.1128/JVI.02376-15

A. Kato, J. Aarii, Y. Koyanagi and Y. Kawaguchi. 2015, Phosphorylation of Herpes Simplex Virus 1 dUTPase Regulates Viral Virulence and Genome Integrity by Compensating for Low Cellular dUTPase Activity in the

Central Nervous System. *J. Virol.* 89: 241-248, 査読有
DOI:10.1128/JVI.02497-14

A. Kato, Y. Hirohata, J. Aarii and Y. Kawaguchi. 2014, Phosphorylation of Herpes Simplex Virus 1 dUTPase Up-regulated Viral dUTPase Activity to Compensate for Low Cellular dUTPase Activity for Efficient Viral Replication. *J. Virol.* 88: 7776-7785
査読有
DOI:10.1128/JVI.00603-14

〔学会発表〕(計 5 件)

丸鶴雄平, 小柳直人, 有井潤, 加藤哲久, 川口壺, p53 は HSV-1 の神経病原性に關与する, 第 30 回ヘルペスウイルス研究会, 2016 年 6 月 16 日~2016 年 6 月 18 日, セミナーハウス クロス・ウェーブ府中(東京都府中市)

Keiko Shindo, Akihisa Kato, Koyanagi Naoto, Jun Aarii, Yasushi Kawaguchi, Elucidation of the type-specific differences in herpes simplex virus Us3 genes. The 14th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2015 年 9 月 8 日~2015 年 9 月 11 日, 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)

小柳直人, 今井孝彦, 神道慶子, 有井潤, 加藤哲久, 川口壺, 中枢神経系における新規 HSV-1 宿主免疫回避機構の解明: HSV-1 プロテインキナーゼ UL13 は CXCL9 の発現を抑制し、中枢神経系への CD8+ T 細胞の浸潤を阻害する, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月 10 日~2014 年 11 月 12 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Keiko Shindo, Jun Aarii, Akihisa Kato, Yasushi Kawaguchi, Characterization of a recombinant chimera HSV-1 in which its Us3 gene is substituted with the HSV-2 Us3 gene. 39th Annual International Herpesvirus Workshop, 2014 年 7 月 19 日~2014 年 7 月 23 日, 神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

Naoto Koyanagi, Takahiko Imai, Keiko Shindo, Jun Aarii, Akihisa Kato, Yasushi Kawaguchi. The HSV-1 UL13 protein kinase down-regulates expression of a cytokine to inhibit CD8+ T cell infiltration into the central nervous system, 39th Annual International Herpesvirus Workshop,

2014年7月19日～2014年7月23日、神戸コンベンションセンター（兵庫県神戸市）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/Kawaguchi-lab/KawaguchiLabTop.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

川口 寧 (KAWAGUCHI, Yasushi)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：60292984