

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08858

研究課題名(和文)水痘帯状疱疹ウイルス弱毒生ワクチン弱毒化分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of varicella-zoster vaccine virus attenuation

研究代表者

定岡 知彦 (Sadaoka, Tomohiko)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：00435893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：水痘帯状疱疹ウイルスはヒトヘルペスウイルスにおいて唯一ワクチンが存在するウイルスである。このワクチンは臨床分離株親ウイルスを、培養細胞において継続して培養し続けることで得られた弱毒生ウイルスであるが、その弱毒化の機構は明らかでなかった。本研究では最新のウイルスゲノム解読法を用いて、ワクチンウイルスゲノムと、このワクチンウイルスの元となった親ウイルスゲノムを比較することで、ワクチンウイルスの弱毒に関わる新たな遺伝子変異を同定し、弱毒化機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、世界中で広く使用されているにもかかわらず謎の多かった、水ぼうそう・帯状疱疹ワクチンの弱毒化機構を一塩基レベルで明らかにした。水痘帯状疱疹ウイルスは多くのウイルス感染症の中でもとりわけ感染力の高いウイルスであるが、このワクチンの効果により水ぼうそうの発症は劇的に抑えられる。しかし時としてこのワクチンウイルスによる病気の発症も報告されており、弱毒化機構を理解した上でのより安全で効果的なワクチン作製が、接種率の向上による本感染症の撲滅につながると期待される。本研究結果により新たな戦略的ワクチン創出への第一歩となる知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：The attenuation mechanism of a live attenuated vaccine of varicella-zoster virus (VZV) has been postulated to be stemmed from its heterogenous nature acquired through semi-permissive cultivations. However, there has been no conclusive result regarding the attenuation mechanism. The key for uncovering the attenuation mechanism of vaccine virus should be the understanding of the population diversity of the parental VZV. Deep sequencing analysis identified that parental VZV consists of a heterogenous population of virus sequences with two nearly equally represented bases, G or A, at nucleotide 2096 of ORF31 gene encoding the glycoprotein B (gB, the former (G) was completely absent in the vaccine virus. Strikingly, when the parental viruses with both alleles equally represented were used to infect human neurons, the virus with ORF31 nucleotide 2096G was dominant for virus entry. These data identify a variant in gB responsible for attenuation of the vaccine virus.

研究分野：ウイルス学

キーワード：水痘帯状疱疹ウイルス 弱毒生ワクチン 弱毒化機構

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

水痘带状疱疹ウイルス弱毒生ワクチンは、水ぼうそうの発症率を 90%以上抑制するが、ウイルスの再活性化による带状疱疹の発症は 50%程度しか抑制できない。またワクチンウイルスそのものが潜伏感染を獲得した後再活性化し、带状疱疹を発症する。ワクチンウイルスによる带状疱疹の発生頻度は野生ウイルスに比べると非常に低いが、いったん発症するとその重篤さは野生ウイルスとさほど変わらない。近年、このワクチン効果による水ぼうそう発症者数の減少にもかかわらず带状疱疹発症者数は世界的に増加しており、これは社会の超高齢化と成人での低いワクチン接種率に起因すると考えられている。医学ウイルス学研究最大のテーマである「感染症制圧」を鑑みた時、全世界での成人におけるワクチン接種率の向上は必須であり、これを成し遂げるためにはより安全、すなわち潜伏感染しないあるいは再活性化できない弱毒生ワクチンの開発が重要である。また、他のヒトヘルペスウイルスにおいてはいまだ有効なワクチンは開発・承認されておらず、唯一ヒトヘルペスウイルスにおいて成功したワクチンである、水痘带状疱疹ウイルス弱毒生ワクチン株の分子レベルでの弱毒化機構を解明することは、これら他のヒトヘルペスウイルスに対するワクチン開発の一助となることが期待される。しかしながら、これらの基礎となる、水痘带状疱疹ウイルス弱毒生ワクチン株の弱毒化機構は明らかでなかった。

水痘带状疱疹ウイルス弱毒生ワクチン株の弱毒化は、ヒト培養細胞とモルモット培養細胞を用いた経験的な半許容性継代培養法によって成し遂げられた (Michiaki Takahashi et al. Lancet 1974)。ヒトにおいてはその皮下接種によりほぼ病原性を示すことなく、長期間持続可能な免疫を誘導することが全世界における使用により証明されており、確かに弱毒化している。しかし、その詳細な分子レベルでの弱毒化機構は、水痘带状疱疹ウイルスがヒトにのみ感染可能であることに起因する、動物実験モデルの欠如、ヒト培養細胞においても生体内での水痘带状疱疹ウイルス生活環(溶解感染による病原性発揮および潜伏感染)に関わる感染可能な細胞種の欠如により、明らかではなかった。

2002 年、水痘带状疱疹ウイルスワクチン株とその親株の全ゲノム配列解析が完了し、ワクチン株において、親株との比較により 40 を超える遺伝子変異が同定された。ワクチン株はひとつのウイルスゲノム上にすべての変異が蓄積した単一のウイルスではなく、種々の変異が複数のウイルスゲノム上に不規則に蓄積した多様なウイルス集団であることが明らかとなった (Yasuyuki Gomi et al. Journal of Medical Virology 2000, Journal of Virology 2002)。さらに 2016 年、現行のワクチン製造を行う異なる 3 社からの製造時期の異なる複数のワクチン株の次世代シーケンサーによる解析により、150 から 400 に近い遺伝子変異が認められ、137 の共通する遺伝子変異が同定された。これらの変異の中で、6 つの遺伝子変異が全ウイルス中 90% 以上に認められたことから、これら 6 つの遺伝子変異がワクチン株の弱毒化に関わる変異であることが提案された (Daniel P. Depledge et al. Journal of Virology 2016)。しかしながら、ワクチン株と親株の遺伝子断片を入れ替えた種々の組換えウイルスの作製実験により、弱毒化には上記 6 つの遺伝子変異ではなく、ORF30 から ORF55 遺伝子を含む遺伝子領域に存在することが、ヒト胎児組織を移植した免疫不全マウスを用いた溶解感染モデルにおいてすでに示されていた (Leigh Zerboni et al. Virology 2005)。

すなわち、水痘带状疱疹ウイルスの弱毒生ウイルス株は確かにヒトへの感染において弱毒化しているが、70 を超える遺伝子領域をコードする 125-kb というウイルスとしては最長級のゲノム領域において、どの遺伝子がこの弱毒化に関わっているかということは、遺伝子組換えウイルスを用いた実験と比較ゲノム解析との間で一致せず、まったく謎のままであった。

2. 研究の目的

本研究では、水痘带状疱疹ウイルス弱毒株の弱毒化に関わる責任遺伝子、さらには責任核酸を明らかにし、弱毒化の作用点を明らかにすることで、

- (1)より安全な弱毒生ワクチンの戦略的な創出に寄与する知見を得るとともに
- (2)ワクチンのない他のヒトヘルペスウイルスに対するワクチン開発につながる基礎知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

近年のゲノム解析手法の進展により、複数の遺伝子変異が混在するウイルス集団において、ウイルスゲノム上の変異核酸の存在だけでなく、その割合まで解析可能となってきた。本研究の対象となる水痘帯状疱疹ウイルスに関しては、このゲノム解析手法により弱毒生ワクチンウイルスが、非常に多くの遺伝子変異を含んだ遺伝的に多様なウイルス集団であることは明らかとなっていたが、この弱毒生ワクチンウイルスの元となる臨床分離株ウイルス(親ウイルス)の多様性はまったく明らかでなかった。そこで本研究では、

- (1)ウイルスゲノム濃縮法と次世代ゲノム解析による親ウイルスの遺伝子的多様性の解析
- (2)比較ゲノム解析による弱毒生ワクチンウイルスと親ウイルスの相違の再解析
- (3)親ウイルスゲノムへの弱毒生ワクチンウイルス特異的遺伝子変異の導入による弱毒化の有無の検討
- (4)弱毒生ワクチンウイルス特異的遺伝子変異による弱毒化機構の解明

以上の4点を行った。

4. 研究成果

上記「3. 研究の方法」に記載した(1)-(4)に対応した研究成果を記載する。

(1)親ウイルスの遺伝子的多様性の解析

本研究を行うまで、親ウイルスのゲノム配列は一世代から二世代前のゲノム解析手法により得られており、単一なゲノムを持つウイルス集団であると認識されていた。また弱毒生ワクチンウイルスはこの親ウイルスのゲノム配列情報を元に解析されたため、すべての遺伝子変異は親ウイルスに存在する核酸とは異なることを前提として解析されており、親ウイルスゲノムから弱毒生ワクチンウイルス創出の過程において「消失」した核酸の存在は知られていなかった。本研究により、

弱毒生ワクチンウイルスほどではないが親ウイルスも遺伝的に多様なウイルス集団を形成すること

ORF31 というすべてのヘルペスウイルスに共通して保存され、ウイルスの細胞への侵入過程において必須である糖タンパク glycoprotein B (gB)をコードする遺伝子領域において、これまでに報告のなかった核酸が 2096 番目に存在すること{既知の核酸 = アデニン(2096A)、新規核酸 = グアニン(2096G)}

親ウイルス集団において 2096A と 2096G を持つウイルス集団がそれぞれ 52%と 48%存在すること

以上の3点が明らかとなった。

(2)弱毒生ワクチンウイルスと親ウイルスの比較ゲノム解析

同じ手法を用いて得られた弱毒生ワクチンウイルスと親ウイルスの遺伝子配列を全ゲノム領域において行った。弱毒生ワクチンウイルスにおいては(1)で明らかとなった ORF31 遺伝子領域における 2096 番目の核酸がすべてアデニン(2096A)であり、グアニン持つウイルス集団は皆無であった。

(3)単クローン親ウイルスにおける ORF31 2096G と 2096A の導入による弱毒化への寄与

すでに単クローン化され、親ウイルスと同様の性状を持つウイルスを用いて、ORF31 2096G あるいは ORF31 2096A を保有する遺伝子組換えウイルスを作製した。各ウイルスはまったく同一のクローン化ウイルスより作製されており、ORF31 遺伝子領域の 2096 番目の核酸以外はすべて同一である。

水痘帯状疱疹ウイルスが感染拡大できる3種類のヒト培養細胞において、以下の4種類のウイルスを用いた比較解析を行った。

- a. 親ウイルス(ORF31 2096G と 2096A が同程度含まれる)

b. 親ウイルス由来 ORF31 2096G のみを保有するウイルス

c. 親ウイルス由来 ORF31 2096A のみを保有するウイルス

d. 弱毒生ウイルス (ORF31 2096A のみを保有する)

いずれのヒト培養細胞においても b の遺伝子組換えウイルスは a の親ウイルスと同様の性状を示し、c の遺伝子組換えウイルスは d の弱毒生ウイルスと同様の性状を示した。

以上より、ORF31 遺伝子領域における 2096 番目の核酸がグアニンであるウイルス集団が、弱毒化の過程において親ウイルス集団より消失することで、弱毒化ウイルス集団が形成されたことが明らかとなった。

(4) ヒト多能性幹細胞由来神経細胞でのウイルス侵入過程における弱毒化機構

水痘帯状疱疹ウイルスは上皮細胞に感染して増殖した後、皮膚領域を支配する神経細胞軸索末端より神経細胞に侵入し、潜伏感染状態を獲得する。この状態を模倣するヒト多能性幹細胞由来神経細胞を用いた潜伏感染実験系をすでに確立しており、この実験系を用いた弱毒化機構の解析を行った。(3)で使用した b、c のウイルスをそれぞれ単独で感染させた時、ウイルスの神経細胞体への到達はまったく同じであったが、両者が同程度混在する a のウイルスを感染させると、神経細胞体へ到達したウイルス集団の 90%以上が ORF31 2096G を保有しており、2096A を保有するウイルス集団はほぼ到達できなかった。さらに、2096G あるいは 2096A を保有する ORF31 遺伝子のみから作製した gB タンパクのみを用いてウイルスの感染が防御されるかを検討したところ、2096G より作製した gB タンパクのみが c のウイルスの感染を抑制した。

以上の結果より、水痘帯状疱疹ウイルス弱毒生ワクチンウイルスの弱毒化には、現在までにまったく報告のなかった「弱毒化過程における親ウイルス集団からの強毒ウイルス集団の消失」が大きく関与したことが明らかとなった。本研究により多くの矛盾を含んだ水痘帯状疱疹ウイルス弱毒生ウイルスの弱毒化機構の、責任遺伝子さらにはその責任核酸までもが明らかとなった。本研究結果は、「1. 研究開始当初の背景」に記載した Leigh Zerboni らの研究成果を支持するが、決してそのほか、特に弱毒生ウイルスに共通して認められる ORF31 以外の遺伝子領域に存在する 6 つの遺伝子変異の寄与を否定する結果ではなく、新たなそして最も貢献度の高い責任遺伝子を明らかとした研究成果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Depledge Daniel P., Srinivas Kalanghad Puthankalam, Sadaoka Tomohiko, Bready Devin, Mori Yasuko, Placantonakis Dimitris G., Mohr Ian, Wilson Angus C.	4. 巻 10
2. 論文標題 Direct RNA sequencing on nanopore arrays redefines the transcriptional complexity of a viral pathogen	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-08734-9	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 該当する
1. 著者名 Depledge Daniel, Sadaoka Tomohiko, Ouwendijk Werner	4. 巻 10
2. 論文標題 Molecular Aspects of Varicella-Zoster Virus Latency	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 349 ~ 349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v10070349	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 該当する
1. 著者名 Sadaoka Tomohiko, Mori Yasuko	4. 巻 1045
2. 論文標題 Vaccine Development for Varicella-Zoster Virus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Advances in Experimental Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 123 ~ 142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-10-7230-7_7	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Depledge Daniel P., Ouwendijk Werner J. D., Sadaoka Tomohiko, Braspenning Shirley E., Mori Yasuko, Cohrs Randall J., Verjans Georges M. G. M., Breuer Judith	4. 巻 9
2. 論文標題 A spliced latency-associated VZV transcript maps antisense to the viral transactivator gene 61	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-03569-2	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 該当する

1. 著者名 Tomohiko Sadaoka, Cindi Schwartz, Labchan Rajbhandari, Arun Venkatesan, Jeffrey I. Cohen	4. 巻 92
2. 論文標題 Human embryonic stem cell derived neurons are highly permissive for varicella-zoster virus lytic infection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01108-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01108-17	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 Sravya Kurapati, Tomohiko Sadaoka, Labchan Rajbhandari, Balaji Jagdish, Priya Shukla, Yong Jun Kim, Gabsang Lee, Jeffrey I. Cohen, Arun Venkatesan	4. 巻 91
2. 論文標題 Role of JNK pathway in varicella-zoster virus lytic infection and reactivation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e00640-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00640-17	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 Liu XueQiao, Sadaoka Tomohiko, Krogmann Tammy, Cohen Jeffrey I.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Epstein-Barr virus tegument protein BGLF2 suppresses type I IFN signaling to promote EBV reactivation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	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.00258-20	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 Sadaoka Tomohiko, Rajbhandari Labchan, Shukla Priya, Jagdish Balaji, Lee Hojae, Lee Gabsang, Venkatesan Arun	4. 巻 なし
2. 論文標題 Human stem cell derived sensory neurons are positioned to support varicella zoster virus latency	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.01.24.919290	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 定岡知彦	4. 巻 4
2. 論文標題 先端技術による水痘帯状疱疹ウイルス潜伏感染機構の解明を目指して	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床とウイルス	6. 最初と最後の頁 261-268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 定岡知彦
2. 発表標題 先端技術による水痘帯状疱疹ウイルス潜伏感染機構の解明を目指して
3. 学会等名 第60回日本臨床ウイルス学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 定岡知彦、森康子
2. 発表標題 水痘帯状疱疹ウイルス潜伏感染関連遺伝子発見とin vitro再現系の構築
3. 学会等名 第122回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiko Sadaoka, Werner J.D. Ouwendijk, Daniel P. Depledge, Judith Breuer, Georges M. G. M. Verjans, Yasuko Mori
2. 発表標題 Transcriptional complexity of the varicella-zoster virus latency-associated transcript
3. 学会等名 43rd Annual International Herpesvirus Workshop (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomohiko Sadaoka, Daniel P. Depledge, Labchan Rajbhandari, Arun Venkatesan, Jeffrey I. Cohen, Judith Breuer, Yasuko Mori
2. 発表標題 An allele selection within ORF31 gene which encodes glycoprotein B, which occurred during production of the varicella-zoster virus vaccine, contributes to its attenuation
3. 学会等名 The 42nd Annual International Herpesvirus Workshop (国際学会)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 Tomohiko Sadaoka, Werner J. D. Ouwendijk, Daniel P. Depledge, Labchan Rajbhandari, Judith Breuer, Georges M. G. M. Verjans, Arun Venkatesan, Yasuko Mori
2. 発表標題 A novel fusion of the VZV latency-associated transcript and ORF63 facilitates reactivation
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiko Sadaoka, Werner J. D. Ouwendijk, Daniel P. Depledge, Labchan Rajbhandari, Judith Breuer, Georges M. G. M. Verjans, Arun Venkatesan, Yasuko Mori
2. 発表標題 Novel Fusion Transcript of VZV VLT and ORF63 Facilitates Broad Viral Transcription in Latently Infected iPSC-derived Human Sensory Neurons
3. 学会等名 44th Annual International Herpesvirus Workshop (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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