

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：13701
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2018～2021
課題番号：18H02343
研究課題名（和文）ヘルペスウイルスによる致死性脳炎の発現機構解明および予防法確立に向けた基礎的研究

研究課題名（英文）Basic research for mechanism and prevention for lethal encephalitis by herpesviruses

研究代表者
福士 秀人（Fukushi, Hideto）

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：10156763
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：ヘルペスウイルス，特にアルファヘルペスウイルスは自然宿主に急性感染後，潜伏感染するが，非自然宿主に感染した場合には，致死性脳炎を引き起こすことが知られている。本研究では，UL11というEHV-1がコードする最も小さなタンパク質のアシル化がウイルス増殖に必須であることを見出した。UL11にアシル化されない変異を導入したウイルス（EHV-1 UL11 G2A/C7A/C9A）は増殖制限型ウイルスであることを確認した。EHV-1 UL11 G2A/C7A/C9A接種マウスは神経病原性EHV-1の感染を予防することができた。これらの結果から，アシル化不全による増殖制限型ワクチンを構築できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではウイルス増殖におけるウイルスタンパク質のアシル化の意義を明らかにしたとともに，アシル化不全変異を導入したウイルスは増殖制限型ウイルスであり，ヘルペスウイルスによる致死性脳炎の予防を可能とするワクチンとして有用であることを示した。

研究成果の概要（英文）：Herpesviruses, especially alphaherpesviruses, are latently infected after acute infection in natural hosts, but are known to cause fatal encephalitis when they infect non-natural hosts. In this study, we found that acylation of UL11, the smallest protein encoded by EHV-1, is essential for viral replication, and confirmed that viruses with non-acylating mutations in UL11 (EHV-1 UL11 G2A/C7A/C9A) are growth-restricted virus. EHV-1 UL11 G2A/C7A/C9A-inoculated mice were able to prevent infection with neuropathogenic EHV-1. Based on these results, we were able to construct a growth-restricted vaccine due to acylation deficiency.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ヘルペスウイルス 増殖不全型ウイルス ワクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヘルペスウイルス 特にアルファヘルペスウイルスは自然宿主に急性感染後、潜伏感染するが、非自然宿主に感染した場合には、致死性脳炎を引き起こすことが知られており、サルの B ウイルスや豚のオーエスキー病ウイルスが挙げられる。申請者らも 1993 年にガゼルの致死性脳炎から新しいウマヘルペスウイルス (現在の 9 型, EHV-9) を分離した (Fukushi et al., 1993)。近年, EHV-9 やウマヘルペスウイルス 1 型 (EHV-1) がキリンやシロクマなどに感染し, 致死性脳炎を引き起こしたことが報告された。この現象は, 同じウイルスが宿主によりなぜ病原性を異にするのかというウイルスと宿主との関係性に関する根本的な「問い」をなげかける (図 1)。

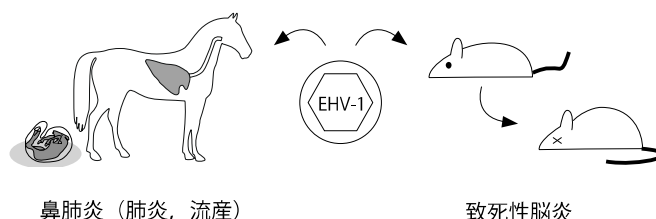


図 1 ヘルペスウイルスの病原性

ヘルペスウイルスは自然宿主に様々な病原性を示す。例えば, EHV-1 は馬に流産などを引き起こすが, 偶発的に他の動物種に感染したり, 実験的にマウスなどに感染させると致死性の脳炎を引き起こすことが知られている。申請者らの研究により, EHV-1 遺伝子のうち US9, UL24, ORF19 などがこの致死性脳炎を引き起こす遺伝子, すなわち神経病原性責任遺伝子であることが明らかとなった。しかしながら, これらの遺伝子を含め, なぜ自然宿主である馬では EHV-1 が神経病原性を発揮しないのかは未解明である。

一方, ヘルペスウイルスにはアシクロビルを代表とする治療薬が広く用いられているが, 致死性脳炎の場合, 発症してからでは治療されたとしても, 脳神経は不可逆的な損傷を受けており, 重い後遺症が残る。したがって, 致死性脳炎の場合, 予防することが必要であるが, ヘルペスウイルスによる致死性脳炎に対するワクチンはない。

2. 研究の目的

本研究の目的は, 我々が行ってきたヘルペスウイルスが非自然宿主に致死性脳炎を引き起こす機構解明をさらに発展させると共に, その成果を新しいメカニズムに基づく予防法 (ワクチン) に結びつけることである。これまでのワクチンは様々な動物や培養細胞で長期継代することにより偶発的に生じる弱毒株を見出すことや病原性に関与する遺伝子を欠損させることにより生み出されてきたが, 科学的な根拠が解明されていない場合や, 接種動物体内での増殖時に病原性が復帰する場合があること, また, 遺伝子欠損により病原性だけでなく増殖能が低下するといった問題も抱えている。そこで本研究では, これまでに構築した組換えウイルスに加え, EHV-1 のいくつかの遺伝子について遺伝子発現欠損ウイルスを構築し, これらのウイルスについて培養細胞での増殖性 (必須遺伝子か非必須遺伝子かを解析), 致死性脳炎惹起能 (神経病原性責任遺伝子かどうかを解析) などを評価した。特に, UL11 という EHV-1 がコードする最も小さなタンパク質のアシル化がウイルス増殖に必須であることを見出し, UL11 にアシル化されない変異を導入することにより, これまでにないメカニズムとして必須遺伝子の機能発現欠損による「半生ワクチン」の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) EHV-1 神経病原性責任遺伝子探索

我々が樹立した BAC システムにより遺伝子改変 EHV-1 を構築した (Kasem et al. 2020, Badr et al. 2018)。すなわち, EHV-1Ab4p 株全ゲノムを mini-F replicon プラスミド, いわゆる BAC (bacterial artificial chromosome) として保有する大腸菌内で EHV-1 ゲノムの標的とする遺伝子に変異を導入した。即ち, 標的遺伝子に選択マーカーとして rpsLneo 遺伝子カセットを導入した。並行して, 標的遺伝子が大腸菌にクローニング後, in site mutagenesis により塩基置換を導入した変異遺伝子を構築した。この変異導入遺伝子を PCR 増幅し, rpsLneo と置換した。BAC における変異導入を塩基配列解読により確認した。BAC DNA を抽出精製し, 培養細胞に transfection することにより感染性ウイルスを得た。変異導入としてアミノ酸置換に加え, 標的遺伝子の開始コドンを終止コドンに変換することによる遺伝子発現欠損ウイルスの構築を行った。遺伝子発現欠損ウイルスの構築では, BAC DNA の transfection によるウイルス回収実

験で感染性ウイルスが得られなかった場合、その標的遺伝子は必須遺伝子であるとみなした。欠損してもウイルス増殖が可能な遺伝子が非必須遺伝子であり、非必須遺伝子欠損ウイルスについて神経病原性を評価した。

必須遺伝子発現欠損ウイルスを増殖させるため、必須遺伝子を馬胎子腎臓細胞に導入し、構成的に発現する細胞クローンを得た。すなわち、必須遺伝子コード領域を真核細胞発現プラスミドにクローニングした。プラスミド DNA を培養細胞にトランスフェクションし、薬剤（ピューロマイシン）による選択を行なった。複数の細胞クローンを採取し、細胞クローニングを行なった。

蛍光タンパク質融合遺伝子発現ウイルスの構築は相同組換えにより行なった。即ち、標的遺伝子を大腸菌にクローニング後、蛍光タンパク質遺伝子（EGFP ないし mCherry）を導入し、融合遺伝子とした。この融合遺伝子および隣接する相同領域を PCR 増幅したのちウイルス感染細胞に transfection した。レーザー共焦点顕微鏡観察により蛍光を発するプラークを抽出し、ウイルスクローニングをプラーク法により行なった。

新たに同定された必須遺伝子や神経病原性責任遺伝子産物について、抗血清を作成した。レーザー共焦点顕微鏡およびウエスタンブロットングを用いた感染細胞内ウイルスタンパク質の合成状況、標的遺伝子産物の感染細胞内局在や欠損ウイルス増殖能などの解析により、当該遺伝子がウイルス増殖において、ウイルス遺伝子発現制御、ウイルス粒子構築、宿主細胞自然免疫抑制など、どのような機能を有するか解析した。

II. 遺伝子改変ウイルスの致死性脳炎予防能解析

半生ワクチンウイルスである必須遺伝子 UL11 欠損ウイルスについては、接種個体の体内でのウイルス伝播がないこと、UL11 欠損ウイルス接種個体から感染性ウイルスが検出されないことを確認するため、ウイルスを CBA マウスに経鼻接種した。

感染防御能を評価するため、半生ワクチンウイルスを経鼻接種後、神経病原性 EHV-1 94-138 株による攻撃試験を行なった。接種前および接種後の体重を測定するとともに、神経症状を観察した。

動物実験については岐阜大学の審査承認を受けた（承認番号 18-015）。

4. 研究成果

I. EHV-1 神経病原性責任遺伝子探索

EHV-1 がコードする遺伝子のうち、UL56 (ORF3) および UL21 (ORF40) について遺伝子発現欠損ウイルスを構築した。UL21 については BAC DNA の transfection 後に感染性ウイルスが回収されなかったため、必須遺伝子であることがわかった。UL56 遺伝子発現欠損ウイルスでは培養細胞における増殖動態は親ウイルスと同様であった。UL56 遺伝子産物は塩基配列からミリスチル化タンパク質であることが予想された。そこで、遺伝子発現欠損に加え、N 末端のグリシンをアラニンに置換した G2A 変異も導入した。この G2A 変異導入により ORF3 の細胞内局在は見られなくなったが、ウイルス増殖への影響はなかった。

これまでの我々および他の研究室の研究から EHV-1 の神経病原性に関与する可能性が示唆されている UL30 (ORF30) の一アミノ酸置換ウイルス (UL30 N752) を構築した。変異ウイルス (UL30 N752) の培養細胞における増殖性は親株および復帰株と同様であった (図 2)。

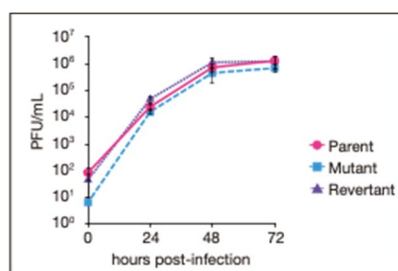


図 2 EHV-1 UL30 親株、変異株および復帰株の FHK Tcd3.1 細胞における増殖動態

EHV-1 UL30 親株 (Parent)、変異株 (Mutant) および復帰株 (Revertant) を馬胎子腎臓細胞 FHK Tcd3.1 に接種し、24 時間ごとに培養上清のウイルス力価を測定した。各株間で増殖に差はなかった。

ハムスターを実験宿主として接種実験を行なった所、親株および復帰株は接種後 4 日目から体重減少および神経症状を停止する、それぞれ 4 頭中 2 頭および 4 頭中 3 頭が死亡した。UL30 D752N ウイルスを接種したハムスターでは体重減少および神経症状発現までの期間が延長するとともに、全頭が生残した (図 3)。これらの結果から、UL30 の 752 番目のアミノ酸は EHV-1 のハムスター感染における神経病原性に関与している可能性が示唆された。

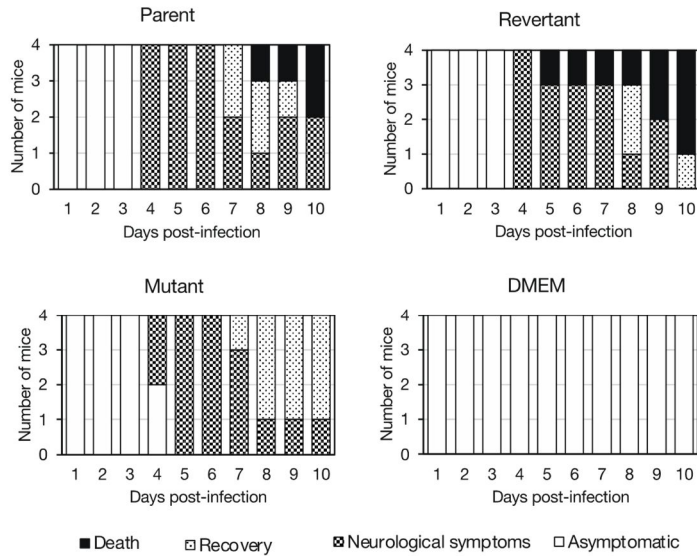


図3 EHV-1 UL30 親株, 変異株および復帰株接種ハムスターの臨床経過

EHV-1 UL30 親株 (Parent), 変異株 (Mutant) および復帰株 (Revertant) をハムスターに接種し, 神経症状を観察した。対照として培養液 (DMEM) を接種した。親株および復帰株接種ハムスターでは斃死したが, 変異株接種ハムスターは全頭が生残した。

必須遺伝子である UL11 の機能を解明するため, 初めに UL11 の細胞内局在に必要なアミノ酸の同定を行った。UL11 には 3ヶ所の推定アシル化アミノ酸 (G2, C7, C9) があることから, それぞれをアラニンに置換した変異 UL11 発現プラスミドを作成し, 培養細胞に導入後, 細胞内局在を解析した。その結果, UL11 の 2 番目のグリシンがゴルジ装置への局在に必要であることがわかった。一方, 7 番および 9 番目のシステインはゴルジ装置への局在に必ずしも必要ではないことがわかった。UL11 遺伝子の 5' 側は UL12 遺伝子の 3' 末側と部分的に重複している。UL11 のアシル化がウイルス増殖にどのような役割をになっているかを明らかにするために以下の変異を導入した。UL12 の 3' 末側に終止コドンを導入し, UL11 と UL12 の重複のない UL12 部分欠損ウイルスを構築したところ, 培養細胞における増殖に親株と差は見られなかった。そこで, この UL12 部分欠損ウイルスの UL11 遺伝子を改変し, 培養細胞での増殖動態および改変 UL11 の細胞内局在を観察した (図 4)。UL11 の 2 番目のグリシンがウイルス増殖および UL11 のゴルジ装置への局在に必要であることを明らかにすることができた。EHV-1 の UL11 の N 末端グリシンのミリストイル化と少なくとも 7 番目ないし 9 番目のどちらかのシステイン のパルミトイル化が EHV-1 の増殖に必要であった。

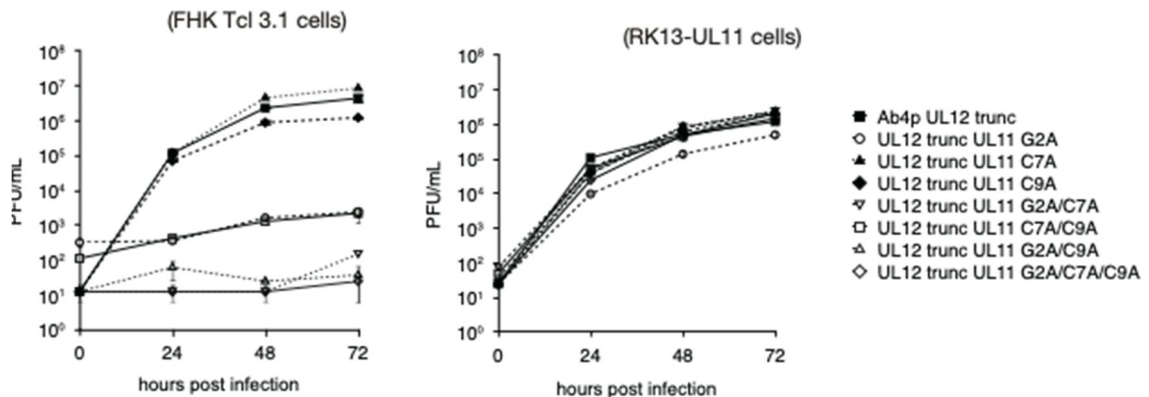


図4 EHV-1 UL11 変異株の培養細胞における増殖動態

各種 EHV-1 UL11 変異体を培養細胞に接種し, 増殖動態を調べた。非補完細胞 (FHK Tcl 3.1) および補完細胞 (RK13-UL11) を用いた。

また、UL11 のトポロジー解析において UL11 は細胞質側からゴルジ装置に局在すること、ライブイメージング解析および電顕による超微形態学的解析から UL11 は EHV-1 感染 4 時間後から発現するが、成熟ウイルスは感染 7〜8 時間以降に産生されることがわかった。EHV-1 の UL11 の N 末端グリシンのミリストイル化および 7 番目ないし 9 番目のシステインのアルミル化をクリックケミストリーにより生化学的に確認した。また、N 末端グリシンのミリストイル化が 7 番目および 9 番目のシステインのアルミル化に必須であることもわかった(図 5)。これらの結果から、UL11N 末端グリシンのミリストイル化は UL11 の機能発現に必須であり、EHV-1 の増殖は UL11N 末端のグリシンという一つのアミノ酸のアルミル化により決定されていることが明らかになった。

II. 遺伝子改変ウイルスの致死性脳炎予防能解析

ウマヘルペスウイルス 1 型(EHV-1)遺伝子改変ウイルス(半生ワクチンウイルスとして UL11 欠損ウイルス)の神経病原性および致死性脳炎予防能の評価を行った。EHV-1 UL11 欠損ウイルスを CBA マウスに接種したところ、臨床的な変化は何も見られず、UL11 欠損ウイルスが病原性を喪失していることを確認した。一方、ウイルス接種マウスの血清中には EHV-1 に対する抗体が検出され、EHV-1 UL11 欠損ウイルスに対する免疫応答が確認された。

EHV-1 UL11 欠損ウイルス接種後 2 ヶ月目に神経病原性親ウイルスによる攻撃試験を実施し、致死性脳炎予防能を評価した。UL11 欠損ウイルス接種マウスでは臨床的な変化は見られなかった。陽性対照群では 5 頭中 2 頭に体重減少が見られた。これらの結果から、EHV-1 UL11 欠損ウイルスは致死性脳炎を予防できる可能性が示された。神経病原性ウイルスとして親株である Ab4p に加え、シマウマ由来 EHV1 を用いた攻撃試験を実施した。その結果、UL11 欠損ウイルス接種マウスは、いずれの神経病原性ウイルス感染においても、臨床症状は見られず、脳炎の発症が防御された。

次いで、UL11 はタンパク質として発現するが、アルミル化されない遺伝子改変半生ワクチンウイルスとして UL11G2A 変異ウイルスをマウスに接種し、シマウマ由来 EHV1 を用いた攻撃試験を実施した。その結果、UL11G2A ウイルス接種マウスにシマウマ由来 EHV-1 による攻撃試験を行ったが、臨床症状は見られず、完全に脳炎の発症が防御された。

UL11G2A ウイルスは全ての EHV-1 ウイルス遺伝子発現が行われるが、UL11 のアルミル化が起きないことにより増殖が制限されるという、これまでにないメカニズムによる弱毒化および感染予防付与を行う新規のワクチンとして致死性脳炎の予防を可能とすることが示された。

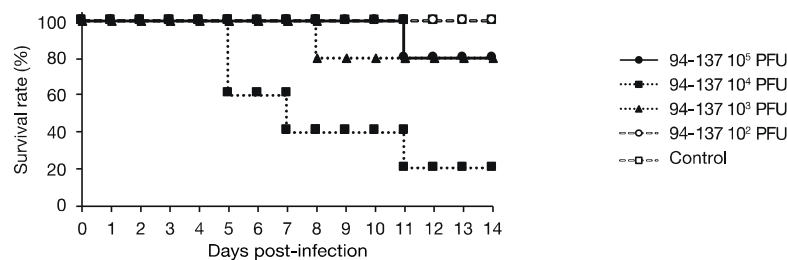


図 5 EHV-1 UL11 変異株免疫マウスに対する攻撃試験における生残曲線

EHV-1 UL11 変異体 (G2A/C7A/C9A) をマウスに接種した。2 ヶ月後に神経病原性 EHV-1 である 94-137 を接種した。マウスの生残率を示した。

< 引用文献 >

Kasem, S., Yu, M. H. H., Yamada, S., Kodaira, A., Matsumura, T., Tsujimura, K., Madbouly, H., Yamaguchi, T., Ohya, K. and Fukushi, H. 2010. The ORF37 (UL24) is a neuropathogenicity determinant of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in the mouse encephalitis model. *Virology*. **400**: 259-270.

Badr, Y., Okada, A., Abo-Sakaya, R., Beshir, E., Ohya, K. and Fukushi, H. 2018. Equine herpesvirus type 1 ORF51 encoding UL11 as an essential gene for replication in cultured cells. *Arch. Virol.* **163**: 599-607.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fukushi Noriko, Badr Yassien, Fukushi Hideto	4. 巻 104
2. 論文標題 The N-terminal glycine of EHV-1 UL11 is essential for the localization of UL11 and EHV-1 replication in cultured cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/jgv.0.001798	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 -

1. 著者名 Fukushi Noriko, Fukushi Hideto	4. 巻 277
2. 論文標題 Prevention of fatal equine herpesvirus type 1 encephalitis in mice by immunization with a limited-replication cycle virus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Veterinary Microbiology	6. 最初と最後の頁 109633 ~ 109633
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vetmic.2022.109633	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 -

1. 著者名 Minato Erina, Kobayashi Atsushi, Aoshima Keisuke, Fukushi Hideto, Kimura Takashi	4. 巻 64
2. 論文標題 Susceptibility of rat immortalized neuronal cell line Rn33B expressing equine major histocompatibility class 1 to equine herpesvirus 1 infection is differentiation dependent	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 123 ~ 132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12761	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11件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 國枝 希衣, 福士 法子, 中川 敬介, 福士 秀人
2. 発表標題 馬ヘルペスウイルス1型UL21の機能解析
3. 学会等名 日本獣医学会学術集会第164回
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福士 法子, 岡田 彩加, 中川 敬介, 福士 秀人
2. 発表標題 ウマヘルペスウイルス1型増殖過程の可視化解析
3. 学会等名 日本獣医学会学術集会第164回
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福士 法子, 桐澤 力雄, 福士 秀人
2. 発表標題 ウマヘルペスウイルス脊髄脳症由来ウマヘルペスウイルス1型の増殖温度耐性
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 國枝 希衣, 福士 法子, 福士 秀人
2. 発表標題 ウマヘルペスウイルス1型UL21の機能解析
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福士 法子, 中川 敬介, 福士 秀人
2. 発表標題 ウマヘルペスウイルス1型UL11のアシル化のウイルス増殖における役割
3. 学会等名 日本獣医学会学術集会第163回
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村 風哉, 福士 法子, 中川 敬介, 福士 秀人
2. 発表標題 EHV-1 Ab4p ORF30 N752変異体の構築
3. 学会等名 日本獣医学会学術集会第163回
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福士法子, Yassine Badr, 中川敬介, 福士秀人
2. 発表標題 増殖不全型ウマヘルペスウイルス1型の致死性脳炎予防能評価
3. 学会等名 日本獣医学会学術集会第162回
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noriko Fukushi, Yassine Badr, Keisuke Nakagawa, Hideto Fukushi
2. 発表標題 Prevention of fatal encephalitis in mice by immunizing with replication-defective equine herpesvirus type 1
3. 学会等名 the 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福士法子, Badr Yassien, 大屋賢司, 福士秀人
2. 発表標題 ウマヘルペスウイルス1型UL11の細胞内局在におけるアシル化の役割
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 桑井彩, 下里徳博, 小林雅典
2. 発表標題 ウマヘルペスウイルス 1 型神経病原性発現に関するORF19の役割
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福土秀人, 桑井彩, 山口由, 福土法子, 八木彩予, 大屋賢司
2. 発表標題 ウマヘルペスウイルス1型神経病原性発現因子UL24の機能ドメイン解析
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018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
研究分担者	桐澤 力雄 (Kirisawa Rikio) (70153252)	酪農学園大学・獣医学群・教授 (30109)	

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
---------	---------