

平成 21 年 3 月 30 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791300
 研究課題名（和文） HSV-1 ワクチンの開発

研究課題名（英文） Development of HSV-1 vaccine

研究代表者

菅原 大輔 （SUGAHARA DAISUKE）
 近畿大学・医学部・助教
 研究者番号：30309314

研究成果の概要：

研究期間の前半で、眼科領域における HSV-1 感染実験マウスモデルの構築を行い、後半では HSV-1 潜伏感染・再活性化時の三叉神経に浸潤する炎症細胞の解析を行った。潜伏感染モデル作成において、現在の時点で最適と思われる感染条件を決定した。三叉神経に浸潤している免疫細胞（制御性 T 細胞）の分離技術の確立には至らなかった。しかし、免疫細胞の分離技術を他の炎症細胞に応用出来る可能性があり、今後も解析を継続していく予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：HSV-1、ワクチン、潜伏感染、再活性化

1. 研究開始当初の背景

分子生物学の技術的進歩により、HSV-1 の感染機構の解明も加速度的に進んでいる。しかし、HSV-1 の潜伏感染・再活性化に関する詳細は未だ不明である。HSV-1 の潜伏感染と再活性化に関わる免疫細胞の動態を、三叉神経を中心に解析し、HSV-1 ワクチンの開発につなげようと考えた。

2. 研究の目的

ヒトを宿主としたヘルペスウイルスには、単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) , 単純ヘルペス 2 型 (HSV-2) , 水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) 、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) , Epstein-Barrウイルス (EBV) 、ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) , ヒトヘルペスウイルス 7 (HHV-7) , ヒトヘルペスウイルス 8 (HHV-8あるいはカポジ肉腫関連

ヘルペスウイルス (KSHV)) の 8 種類が現在知られている。これらのヒトヘルペスウイルスは健常人において致命的な疾病を引き起こすことはほとんどない。HSV-2, HHV-8を除く 6 種類のヘルペスウイルスには 40 代までにほとんどの人が感染し、生涯にわたって潜伏感染の状態を保つ。しかし、加齢やストレス、免疫不全状態により、宿主の抵抗性が減弱したときにウイルスが再活性化して増殖を開始し、多彩な症状を呈する。また、悪性腫瘍の原因ともなる。ウイルス感染の予防には多様なワクチンが開発され効果を挙げているが、ヒトヘルペスウイルスに関しては VZV ワクチンを除き、有効なワクチンがなく、いまだ開発段階である。そこで今回、眼科ヘルペス感染症の代表的なウイルスである HSV-1 を実験対象とし、潜伏感染と再活性化のメカニズムを解明することにより、ヘルペスウイルス感染症の予防・制御に有効なワクチンを開発することを目的とする。

(1) HSV-1 潜伏感染マウスモデルの樹立

ウイルスの感染実験を行う際に、ヒトでの病態に近似したモデル系を確立していることは非常に重要である。HSV-1 の感染モデルの場合、初感染を経て、致死性の合併症をほとんど起こさず三叉神経に HSV-1 が潜伏感染をしている状態で、ある一定の刺激によりウイルスの再活性がほぼすべての個体で引き起こされるのが理想である。

眼科関係の研究施設では実験系にマウスを用い、HSV-1 の初感染を角膜経由で行っている。感染約 4 週後に、三叉神経中の HSV-1 DNA コピー数を real-time PCR で測定することにより、潜伏感染が成立しているかを確認している。しかし、実際にはヒトでの HSV-1 感染様式は親子間での口唇、口腔経由がほと

んどであり、眼粘膜を通しての感染の割合は低いと思われる。マウスに対する HSV-1 の感染を様々な条件で行い、ヒトの潜伏感染状態により近いマウスモデルを樹立する。

(2) HSV-1 再活性時の三叉神経におけるケモカイン動態変化の検討

ウイルス感染を受けた宿主は、非特異的炎症反応 (自然免疫系) から感染ウイルス特異的免疫反応 (獲得免疫系) にわたるいろいろな程度の防御反応を動員して、その状況に対処する。この過程で、ウイルス感染細胞からはインターフェロン (IFN) をはじめとするさまざまなサイトカインがつけられ、免疫反応に関与する各種の細胞の活性化、分化誘導、遊走、抗体産生と Ig クラススイッチなどを促す。HSV 眼感染症においては、角膜および三叉神経にて様々な免疫反応が繰り広げられる。今回は、潜伏感染マウス三叉神経節細胞での回帰発症時のケモカイン発現の変化を網羅的に調べる。それにより HSV の潜伏感染と再活性化をコントロールしている免疫細胞とサイトカイン、ケモカインの新たな相互関係を解明する予定である。免疫細胞に関しては、CD8T 細胞を中心に解析していく予定である。Liu らは、HSV 感染時に神経節に浸潤している CD8T 細胞が HSV の再活性化を抑制していることを明らかにした。(Liu, T. et al.: CD8T cells can block herpes simplex virus type 1 (HSV-1) reactivation from latency in sensory neurons. *J. Exp. Med.*, 191 : 1459-1466, 2000) CD8T 細胞ノックアウトマウスを用いてより詳細なケモカインの動態を解析し、サイトカイン・ケモカインでの免疫反応をコントロールするという新たな展開を目標にしている。

(3) HSV-1 ワクチンの開発

ワクチンがウイルス感染症の制御における第一手段である。HSV に対しても様々な観点からワクチンの開発が試みられてきた。米国では STD としての重要性が大きく、主に HSV-2 に対するワクチン開発が進められている。ホルマリンや紫外線などで感染性を失わせた不活化ワクチン、精製したエンベロップ蛋白 gB, gD などを抗原として用いたサブユニットワクチン、必須遺伝子を欠損させ細胞内で一度だけ増殖できるようにした DISC ワクチン、エンベロップ蛋白質遺伝子を組み込んだ DNA ワクチンなどいろいろな工夫がなされてきた。いずれもマウスモデルでは感染防御効果が認められるが、臨床応用されているものは現在の所まだない。HSV の場合、ワクチンによる中和抗体や細胞性免疫の誘導がある程度あったとしても、ウイルスの粘膜・皮膚への直接的な接触による感染の成立は避けられないと考えられる。免疫不全でない健常成人が回帰発症を繰り返すことより、野生株に対する以上の強力な免疫反応を誘導する必要が出てくる。そこで、近畿大学大学院で習得した組み換え型ワクシニアウイルス作成の技術と、上記 B で得られた知見を元に、感染防御に有効な HSV ワクチンの開発を行う。

3. 研究の方法

平成19年度

- (1) HSV-1 潜伏感染モデルマウスの作成
- ① 6 週齢の Balb/c マウスに HSV-1 (McRae 株) を各条件下 (下記) で感染させる。
 - ② 感染 4 週後に、サンプルとしてマウスの左右の三叉神経を採取する。
 - ③ 採取した三叉神経から DNeasy® Tissue Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出する。
 - ④ Total DNA 中の HSV-1 DNA コピー数を real-

time PCR にて検出する。

⑤ 潜伏感染モデルとして最適であると思われる感染条件を決定する。

各条件 各群 10 匹を下に示す条件で振り分ける。(実験結果により下記以外にも条件を追加する場合もあり)

HSV-1 を感染させる 感染力価: $10^3, 10^4, 10^5, 10^6$ pfu

HSV-1 を感染させる 部位: 眼球 (角膜)、口腔内、皮下など。

HSV-1 を感染させる 回数: 1 回から 4 回ぐらいまで。

最適であると思われる感染条件とは、感染マウスの三叉神経内の HSV-1 DNA コピー数が個体によってばらつきが少なく確実に検出され、ヘルペス脳炎等による死亡が少ないことである。

(2) HSV-1 再活性時の三叉神経におけるケモカイン動態変化の検討

① HSV-1 潜伏感染マウスに heat shock (43 度の温水槽に首から下を 10 分間浸す) ストレスを加え、ウイルスの再活性化を促す。

② RT-PCR

heat shock から 24 時間後に、マウスから三叉神経を採取する。Trizol で溶解し、RNA を RNeasy キット (Qiagen) にて精製。逆転写反応後、RT-PCR を用いて各ケモカイン mRNA の発現量を測定する。heat shock をするグループとしないグループでの比較をする。

③ CD8T 細胞ノックアウトマウス

上記 b で行った RT-PCR を、CD8 陽性 T 細胞ノックアウトマウスを用いて同様の方法で行う。

④ 免疫染色

三叉神経サンプルを免疫染色し、神

経細胞内での浸潤細胞、ケモカイン、サイトカインの局在を確認する。

平成20年度

(3) HSV-1 ワクチンの開発

HSV-1 遺伝子産物上にある細胞障害性 T 細胞 (CTL) と CD4 陽性 T 細胞の認識する抗原エпитープ、及び感染防御に有効な抗原構造を同定する。

種々の HSV-1 ミニ遺伝子を発現する組み換え型ワクシニアウイルス (rVV) を作成する。ミニ遺伝子を HSV-1 のどの部位にするかは実験 (2) での結果を元に決定する。

① 初感染防御

HSV-1 感染前に rVV を接種。接種後 4 週目に HSV-1 を challenge し、HSV-1 感染が成立するか確認する。

② 回帰発症防御

潜伏感染マウスに rVV を接種し、heat shock ストレスを与えた後の再活性化率を確認する。

研究費申請時の実験方法は以上である。実験 (1) 終了後、実験 (2) に移る時期に、眼科領域において制御性 T 細胞 (regulatory T cells) に関する研究成果が学会等で多く発表されるようになってきた。そこで、HSV-1 再活性時の三叉神経におけるケモカインの動態を調べる前に、三叉神経に浸潤する制御性 T 細胞の検討をすることにした。

近年、免疫抑制機能に特化した制御性 T 細胞とよばれる T 細胞サブセットが存在し、自己免疫やアレルギーといった病的免疫応答を制御して免疫恒常性の維持に重要な役割を果たしていることが明らかになり、この概念は確固としたものとして受け入れられるようになっている。HSV-1 感染症にも制御性

T 細胞が関与していることが大いに考えられる。

(4) 三叉神経中に浸潤する免疫細胞 (制御性 T 細胞) の解析

① 実験 (2) で示した方法で、HSV-1 をマウスに潜伏感染させる。

② ウイルス感染群 (heat shock あり、heat shock なし)、ウイルス未感染群 (heat shock あり、heat shock なし) の 4 群 (各 10 匹) を準備する。

③ ウイルス感染後 4 週以上待ち、heat shock 施行 24 時間後に頸椎脱臼にて安楽死させ、両側の三叉神経を採取する。

④ 各群の三叉神経を一まとめにし、コアグラデーゼ I で処理。三叉神経を single cell の状態にする。

⑤ ミルテニーバイオテック社の死細胞除去キットおよび磁気ビーズ (MACS®) を用いて、三叉神経採取時にアポトーシスに陥った神経細胞を除去する。

⑥ MACS® でネガティブセレクションされた細胞浮遊液を蛍光抗体にて細胞染色を行う。

(CD4-FICT、CD25-PE)

⑦ FACS® で cell sorting し、CD4 陽性、CD25 陽性の分画を制御性 T 細胞として、細胞数をカウントする。

(5) 三叉神経に浸潤する制御性 T 細胞の免疫染色による同定

4. 研究成果

(1) HSV-1 潜伏感染モデルマウスの作成

① HSV-1 潜伏感染マウスモデルを、より人間に近い条件に近づける為、ウイルスの感染経路とウイルス接種回数の検討実験を行った。(1) 角膜に接種する HSV-1 の力価を $(0 \cdot 10^3 \cdot 10^4 \cdot 10^5 \text{ pfu/eye})$ の 4 点設け、感染 4 週後の三叉神経節を取り出し、real time PCR を施行した

。ウイルス感染4週後の生存率は100%・80%・80%・20% (0・10³・10⁴・10⁵pfu/eyeの順で)であった。real time PCRで三叉神経中にHSV-1 DNAを検出できた割合は0%・25%・14%・100% (同上) であった。これらの結果より、この実験系での角膜経由のウイルス感染力価は10⁴と10⁵の間、すなわち5x10⁴が最適であると考えられた。

②ウイルスの経口による潜伏感染効率を調べた。人間のHSV-1潜伏感染の成立は経口感染が最も多くの割合を占めると考えられる。(1)で施行したウイルス力価(0・10³・10⁴・10⁵pfu/mouth)を用い、感染回数も1回の群と3回の群を設けた。感染4週後の生存率はどの群も80~90%で大差は無かった。感染4週後に採取した三叉神経中のHSV-1 DNAの検出率は、一番多く検出されたのが10⁵pfuを3回感染させた群で、約3割であった。これらの結果より、三叉神経へHSV-1を潜伏感染させるのは経角膜が今のところ効率的な方法であると結論付けた。

(2) HSV-1再活性時の三叉神経におけるケモカイン動態変化の検討

ケモカインの検討をする前に、HSV-1 潜伏感染時の三叉神経への浸潤細胞の検討をする事とした。浸潤している免疫細胞をある程度限定することにより、三叉神経内で分泌されるサイトカインもある程度限定することが出来ると考えられる。実験(2、3)をする前に、実験(4)を開始した。

(4) 三叉神経に浸潤している制御性T細胞の解析

三叉神経からのネガティブセレクションにより細胞浮遊液は得られた。しかし、CD4 陽性 CD25 陽性の制御性T細胞と考えられる分画はカウントして比較検討出来るだけの細胞数が得られなかった。複数回、実験を試みたが、同様の結果であった。制御性T細胞が

三叉神経に浸潤していても極微量のため、直接分離するのは困難であるとの結論に達した。

しかし、神経細胞からの細胞分離方法は安定した系として確立され、他の炎症細胞分離には応用できる可能性が十分ある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Motoki Itahashi , Shiro Higaki,
Daisuke Sugahara , Koji Sugioka,
Tatunori Deai , Kazumasa Takao,
Kozaburo Hayashi , Yoshikazu Shimomura,
A-5021 a new acyclovir analogue inhibits
murine herpetic keratitis、27 卷、334-338、
2008 年、査読有り

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 大輔 (SUGAHARA DAISUKE)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：30309314