

**Syncytial 変異を導入した
侵入標的化ヘルペスウイルスベクターの開発**

研究室 分子細胞生物学研究室
学位申請者 大久保 優

目次

	頁
第 1 章 序論	2
第 2 章 実験結果	7
2-1 EGFR 標的化 HSV に既知の syncytial 変異を導入した	
2-2 syncytial 変異を導入した EGFR 標的化 HSV は syncytium を形成した	
2-3 syncytial 変異を導入した EGFR 標的化 HSV はヒトがん細胞株において巨大な syncytium の形成と高い細胞傷害活性を示した	
2-4 syncytial 変異を有する EGFR 標的化 HSV の細胞内侵入・細胞間伝播は EGFR の発現に依存した	
2-5 syncytial 変異の導入は EpCAM 標的化 HSV においても効果を示した	
第 3 章 考察	1 2
第 4 章 実験材料	1 4
第 5 章 実験操作	2 4
参考文献	2 7
図表	3 7
謝辞	5 2

第 1 章 序論

1-1. ヘルペスウイルス

ヘルペスウイルスは 150~250 kb の二本鎖 DNA ウイルスであり脂質二重膜（エンベロープ）を持つ（Kimberlin and Whitley, *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis* 2007）。ヘルペスウイルスは様々な動物を宿主としており培養条件下における指向性や病原性などから α 、 β 、 γ の亜科に分類される（Gruffat et al., *Front Microbiol* 2016）（表 1）。ヒトに感染できるヘルペスウイルスは 8 種類報告されている（Gruffat et al., *Front Microbiol* 2016）（表 2）。初感染では軽症あるいは不顕性感染に終わることが多い。その後、抗体が産生されるにも関わらず宿主の神経、マクロファージ、あるいはリンパ球に潜伏し、免疫力の低下やストレスなどにより回帰発症を起こすことがある（植竹久雄（編），（1982）ウイルス学 理工学社）。

1-2. 単純ヘルペスウイルス 1 型 (herpes simplex virus type 1, HSV-1)

HSV-1（以降 HSV）は幼少期に初感染することが多く、成人の約 8 割が抗 HSV 抗体を保有している（Jenkins et al., *Clin Diagn Lab Immunol* 2003）。通常は三叉神経節に潜伏感染しているが発熱、月経、紫外線、過労などの要因により再活性化して口唇ヘルペスや歯肉口内炎を引き起こす。HSV は ①152 kb の直鎖状二本鎖 DNA、②DNA を内包する正二十面体のカプシド、③テグメント、④12 種類の糖蛋白質が表出するエンベロープで構成される（Ward and Roizman, *Trends Genet* 1994）（図 1）。HSV は少なくとも 74 遺伝子を有しているが約半数は *in vitro* でのウイルス複製に必須でないアクセサリ遺伝子である（Watanabe, *J Dermatol Sci* 2010）。

1-3. HSV の生活環

宿主細胞への侵入（細胞内侵入）は以下の 2 つの経路を利用する；1) 細胞膜表面においてエンベロープと細胞膜が融合する、2) エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれてエンベロープとエンドソームの膜が融合する。侵入経路は宿主細胞株の違いなどによって異なるがその違いをもたらすメカニズムは解明されていない（Akhtar and Shukla, *FEBS J* 2009; Campadelli-Fiume et al., *Curr Opin Virol* 2012）。ウイルス依存性の膜融合はエンベロープに表出する数種類の糖蛋白質が関与する（後述）。エンベロープと細胞膜の融合が生じるとカプシドと一部のテグメントが細胞内に放出される。テグメントにはウイルスの複製や成熟ウイルス粒子の構築に重要な蛋白質が含まれている（Diefenbach et al., *Virus Res* 2015）（表 3；U_L36、U_L41、U_L46、U_L47、U_L48、U_L49）。U_L41 の遺伝子産物である Virion-induced host shutoff は、HSV の感染初期において宿主細胞の mRNA を分解して宿主蛋白

質の合成を阻害する (Read and Frenkel, J Virol 1983; Smibert et al., J Gen Virol 1992)。細胞内に放出されたカプシドは微小管に沿って核膜孔へ移動する (Sodeik et al., J Cell Biol. 1997)。カプシドが核膜孔に到達するとウイルスゲノムが核内に注入される。U_L48 の遺伝子産物である VP16 が核に送り込まれると、前初期遺伝子 (immediate early, IE) の転写が開始する (Campbell et al., J Mol Biol 1984)。核内では IE、初期遺伝子 (early, E)、後期遺伝子 (late, L) の順に転写される (Watanabe et al., J Dermatol Sci 2010)。複製されたウイルスゲノムは核内でカプシドに内包され、カプシドは核膜腔に放出される (一次エンベロップメント) (Darlington et al., J Virol 1968)。その後、核外膜と融合して細胞質に放出される。細胞質でテグメントを獲得した後 (一部のテグメントは核内で獲得する)、トランスゴルジネットワークでエンベロップを獲得する (二次エンベロップメント)。成熟したウイルス粒子はエキソサイトーシスで細胞頂端部から細胞外あるいは細胞側部から細胞間隙に放出される (Johnson and Baines, Nat Rev Microbiol 2011)。細胞間隙に放出されたウイルスは隣接する非感染細胞の細胞膜と融合して感染する (細胞間伝播)。一部の変異 HSV は細胞間隙に放出されることなく、感染細胞と非感染細胞の膜融合を利用して細胞間伝播する。細胞間伝播には細胞内侵入を担うウイルス糖蛋白質に加えて、糖蛋白質 gE/gI 複合体が必須である (Johnson et al., J Virol 2001)。一方で、細胞外へ放出されたウイルスは感覚神経の末端から侵入して感覚神経節内を逆行輸送され細胞体に到達し潜伏する (Preston and Efstathiou, Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis 2007)。潜伏感染時にはほぼ全てのウイルス遺伝子の発現が抑制されている (Koszyvnenchak et al., J Virol 1990)。唯一、多量に転写される遺伝子は latency-associated transcripts (LAT) であり、LAT はウイルスゲノムの転写抑制機能を有すると考えられている (Kramer et al., J Virol 1998; Bloom et al., Biochim Biophys Acta 2010)。潜伏感染した HSV は、宿主の免疫力の低下やストレス環境下で再活性化する。

1-4. 細胞内侵入・細胞間伝播における膜融合

膜融合は細胞内侵入・細胞間伝播のどちらにも必須である。5 種類のエンベロップ糖蛋白質 (gB、gC、gD、gH、gL) が、エンベロップと宿主細胞膜との膜融合過程に関与する (図 4)。まず gB と gC が細胞膜表面に発現するヘパラン硫酸と結合することにより HSV が細胞膜に吸着する。次に gD が herpesvirus entry mediator (HVEM)、nectin-1 あるいは 3-O-sulfated heparan sulfate と結合する (Montgomery et al., Cell 1996; Geraghty et al., Science 1998; Shukla et al., Cell 1999) ことにより gD の構造変化が生じ (Carfi et al., Mol Cell 2001; Fusco et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2005; Krummenacher et al., EMBO J 2005)、gH/gL 複合体にシグナルが伝達される (Atanasiu et al., J Virol 2010; Atanasiu et al., Mbio 2013; Gianni et al., J Biol Chem 2009)。そして gH/gL 複合体が gB を活性化して膜融合が

成立する (Atanasiu et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2007; Atanasiu et al., J Virol 2010; Chowdary et al., Nat Struct Mol Biol 2010)。

1-5. 細胞間伝播様式

HSV の細胞間伝播様式は培養条件下におけるプラーク形態の違いから 2 種類に分類できる。野生株の HSV が感染した細胞集団は個々に丸みを帯びてプラークを形成する。一部の変異ウイルスでは複数の感染細胞が融合した多核巨細胞 (syncytium) を形成する。本論文では前者を non-syncytium 型、後者を syncytium 型と呼ぶ。

1-6. syncytial 変異

HSV の syncytium 形成は syncytial 変異によってもたらされる。syncytial 変異は gB (Bzik et al., Virology 1984; Cai et al., J Virol 1988; Baghian et al., J Virol 1993; Engel et al., Virology 1993; Gage et al., J Virol 1993; Foster et al., Virology 2001; Diakidi-Kosta et al., Virus Res 2003)、gK (Bond and Person, Virology 1984; Debroy et al., Virology 1985; Pogue-Geile and Spear., Virology 1987; Dolter et al., J Virol 1994)、U_L20 (Baines et al., J Virol 1991; MacLean et al., J Gen Virol 1991)、U_L24 (Tognon et al., Virus Res 1991) のいずれかに局在することが報告されている。

gB は 906 個のアミノ酸からなる I 型膜貫通蛋白質であり、ホモ三量体としてウイルスエンベロープおよび感染細胞膜に発現する。gB は膜融合過程において宿主細胞膜に挿入される fusion loop を持つこと (Hannah et al., J Virol 2007; Hannah et al., J Virol 2009)、膜融合蛋白質である vesicular stomatitis virus の G 蛋白質と類似した構造をとること (Heldwein et al., Science 2006) から、HSV の細胞内侵入・細胞間伝播において膜融合を実行すると考えられている。Atanasiu らは、gD、gH/gL 複合体、gB が段階的に相互作用して gB が膜融合を実行することを示した (Atanasiu et al., J Virol 2010)；① gD が受容体と結合することにより活性化する、② 活性化した gD は構造変化を起こし gH/gL 複合体を活性化する、③ 活性化した gH/gL 複合体は gB の膜融合活性を刺激する。この一連の機構を fusion machinery という。gB の syncytial 変異は全て細胞内領域に位置する (Bzik et al., Virology 1984; Cai et al., J Virol 1988; Baghian et al., J Virol 1993; Engel et al., Virology 1993; Gage et al., J Virol 1993; Foster et al., Virology 2001; Diakidi-Kosta et al., Virus Res 2003)。gB の syncytial 変異は gB の細胞内領域が担う膜融合抑制機構を弱める働きがあると考えられている。

gK は 338 個のアミノ酸からなる 4 回膜貫通蛋白質であり、U_L20 と複合体を形成してウイルスエンベロープおよび感染細胞膜に発現する (Debroy et al., Virology 1985)。gK は細胞間伝播に必須である (Melancon et al., J Virol 2005; Chouljenko et al., J Virol 2009)。ウイルス非依存性の膜融合の誘引には gD、gB、gH、gL を細胞膜に発現させることが必須

であるが (Turner et al., J Virol 1998)、上記 4 蛋白質と共に gK を発現させると細胞間融合が阻害される (Avitabile et al., J Virol 2003)。故に gK は細胞間伝播に必須であることに加えて膜融合に対して抑制機能も有すると考えられている。gB とは対照的に gK の syncytial 変異はその多くが細胞外領域 (N 末端) に位置する (Foster et al., J Virol 2003)。gB の syncytial 変異はエンベロープあるいは細胞膜の内側、gK の syncytial 変異はエンベロープあるいは細胞膜の外側にそれぞれ位置することから、これらの変異は細胞膜融合に異なるメカニズムで寄与すると推測される。

1-7. 腫瘍溶解性ウイルス療法

近年、HSV は腫瘍溶解性ウイルスとして注目されている (Peters and Rabkin, Mol Ther Oncolysis 2015)。腫瘍溶解性ウイルスとはウイルスががん細胞に感染し破壊することを利用した治療法である。2015 年 10 月には talimogene laherparepvec (Imlygic) が腫瘍溶解性 HSV として初めて医薬品承認された。Imlygic の他にも様々な種類の腫瘍溶解性 HSV が臨床試験に進められている。これらは主に、正常細胞内におけるウイルス複製に必須でがん細胞内での複製に必須でない ICP34.5 や ICP6 のようなウイルス遺伝子を不活化あるいは欠失させるなどの遺伝子工学的改変が為されている (Liu et al., Gene Ther 2003; MacLean et al., J Gen Virol 1991; Meignier et al., J Infect Dis 1988; Mineta et al., Nat Med 1995; Todo et al., Proc Natl Acad Sci USA 2001; Parker et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2000; Chase et al., Nat Biotechnol 1998)。臨床試験の結果からこれらの腫瘍溶解性 HSV をヒトに投与した際の安全性は担保されているが、がん治療の効果についてはさらなる改善が必要である。改善すべき点の一つとしてがん細胞内でのウイルス複製効率の減弱が挙げられる (Kramm et al., Hum Gene Ther 1997)。この問題を解決するためにいくつかの研究グループでは HSV の syncytium 形成に着目した戦略をとっている。In vitro において syncytial 変異は HSV の細胞傷害活性を高めることから腫瘍溶解活性の増強に有用であると考えられる (Fu and Zhang, Cancer Res 2002; Takaoka et al., Virol J 2011; Israyelyan et al., Hum Gene Ther 2007; Israyelyan et al., Virol J 2008)。

1-8. syncytial 株の細胞間伝播の特異性

HSV の syncytial 変異は膜融合促進機能を有するが、膜融合過程において gD 受容体の発現が必要かどうかについては解明されていない。Silverman らはウイルス非依存性の膜融合において、gB の syncytial 変異のうちのいくつかは、gD が発現していなくとも膜融合が生じると報告した (Silverman et al., J Virol 2012)。しかしながらこの結果は再現されなかった (Rogalin and Heldwein, J Virol 2015)。Cocchi らは non-syncytial 株の細胞間伝播を阻害する抗 nectin-1 抗体を用いても、HSV の syncytial 株である MP および HFEM-syn の細胞間伝播を阻害できないことから、syncytial 株の細胞間伝播は gD 受容体の発現

に依存しないことを報告した (Cocchi et al., J Virol 2000)。しかしながら、Even らは MP および HFEM-syn のウイルスゲノムを細胞に遺伝子導入すると nectin-1 を発現させた細胞株でのみ syncytium を形成することを示し、これらの変異株の細胞間伝播は gD 受容体の発現に依存すると報告した (Even et al., Virus Res 2006)。さらに、HSV は gD あるいは gB に変異を有する場合においては nectin-3 を介して細胞内侵入するようになる (Cocchi et al., J Virol 2004; Uchida et al., J Virol 2010)。syncytium 形成が gD 受容体の発現に依存するかどうかについて見解が分かれる原因は、gD 受容体が複数存在する点にあると考えられる。

1-9. 標的化 HSV

内田らは gD と受容体の結合を不能にした上で、がん関連抗原である上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、がん胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen)、上皮細胞接着分子 (epithelial cell adhesion molecule, EpCAM) に対する単鎖抗体 (single-chain variable fragment, scFv) を挿入することにより標的分子を介してのみ細胞内侵入する侵入標的化 HSV を樹立した (Uchida et al., J Virol 2010; Uchida et al., Mol Ther 2013; Shibata et al., Gene Ther 2016)。侵入標的化 HSV は細胞内侵入のみならず細胞間伝播も標的分子の発現に依存した (Shibata et al., Gene Ther 2016)。本研究では侵入標的化 HSV を標的化 HSV と呼ぶ。

1-10. 本研究の目的

本研究では標的化 HSV の抗腫瘍効果を増強するために syncytial 変異の特性に着目した。syncytial 変異を有する HSV の細胞間伝播様式は syncytium 型であり in vitro において細胞傷害活性を増強することが報告されている (Fu and Zhang, Cancer Res 2002; Takaoka et al., Virol J 2011; Israyelyan et al., Hum Gene Ther 2007; Israyelyan et al., Virol J 2008)。そこで代表的な syncytial 変異である gB:R858H および gK:A40T を EGFR 標的化 HSV に導入して細胞間伝播様式、細胞間伝播能、細胞傷害活性を評価することにより、標的化 HSV へ導入しても syncytial 変異の特性が維持されうるかどうか検討した。また、細胞内侵入および細胞間伝播が標的分子の発現に依存するかどうか評価することにより、syncytial 変異を導入しても標的化 HSV の特異性が維持されうるかどうか検討した。さらに、syncytial 変異の導入は他の分子に対する標的化 HSV においても応用されうるかどうか検討した。

第2章 実験結果

2-1. EGFR 標的化 HSV に既知の syncytial 変異を導入した

ウイルスゲノムの改変には bacterial artificial chromosome (BAC) システムを利用した。BAC は大腸菌 (*E.coli*) の F プラスミドのレプリコンに基づいたクローニングベクターであり 300 kb 以上の遺伝子の効率的なクローニングと安定的な保存が可能である (Shizuya et al., Proc Natl Acad Sci USA 1992)。Red 相同組換え系 (Tischer et al., Biotechniques 2006) を利用することにより、BAC に HSV ゲノムを組込んだプラスミド (HSV-BAC) を *E.coli* 内で目的の配列に改変した。

EGFR 標的化 HSV の BAC プラスミド (pKGNE) には以下の改変が施されている ; (1) ウイルス遺伝子の U_L3 と U_L4 の間にレポーター遺伝子として緑色蛍光蛋白質 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) を挿入、(2) 細胞内侵入効率を促進する gB:D285N/A549T (N/T) 変異を導入、(3) gD と HVEM および nectin-1 との結合を欠失させて EGFR に対する scFv を挿入 (Shibata et al., Gene Ther 2016)。この pKGNE に既知の syncytial 変異である gB:R858H (gB の 858 番目のアミノ酸をアルギニンからヒスチジンに置換) (Bzik et al., Virology 1984) と gK:A40T (gK の 40 番目のアミノ酸をアラニンからスレオニンに置換) (Debroy et al., Virology 1985) を一つずつあるいは組合わせて導入した BAC プラスミドを作製した (pKGNE-Bh、pKGNE-Kt、pKGNE-BhKt)。

次にウイルス粒子を得るためにウイルス産生細胞 Vero/Cre に BAC プラスミドを遺伝子導入した。Vero/Cre は Cre 組換え酵素を発現することができるアフリカミドリザル腎細胞 (Vero) である。また Vero 細胞は EGFR を発現し、本研究で用いた抗 EGFR 抗体 528 はサルの EGFR に交差反応性を示す。HSV-BAC は BAC の両端に loxP 配列を有するため、Vero/Cre で産生されたウイルスでは Cre 組換え酵素の発現により BAC が除去される (Gierasch et al., J Virol Methods 2006)。BAC は全長約 7 kb の巨大な遺伝子である上にウイルス粒子にとって不要である。細胞間伝播へ影響を与える可能性があるため BAC を除去した。pKGNE-Bh、pKGNE-Kt、pKGNE-BhKt を遺伝子導入した Vero/Cre の上清から回収したウイルスをそれぞれ KGNE-Bh、KGNE-Kt、KGNE-BhKt と呼ぶ (図 5)。

2-2. syncytial 変異を導入した EGFR 標的化 HSV は syncytium を形成した

KGNE の細胞間伝播様式は non-syncytium 型である。syncytial 変異の導入により KGNE の細胞間伝播様式が syncytium 型になるかどうか検討した。

まず Vero に非標的化 HSV (KGN)、KGNE、KGNE-Bh、KGNE-Kt、KGNE-BhKt を感染させて 24 時間培養した。そして感染細胞の形態を評価するために、Alexa594 で標識された小麦胚芽凝集素 (wheat germ agglutinin, WGA) で細胞膜、Hoechst33342 で核を染色す

ることにより、それぞれ赤色、青色で染め分けた。その結果、KGNE-Bh、KGNE-Kt、KGNE-BhKt は細胞膜の内部に複数の核を有する syncytium を形成した。一方で KGN、KGNE では野生型の HSV 同様に、丸みを帯びた感染細胞からなるプラークを形成するのみであり syncytium の形成は観察されなかった (図 6 A)。

次に感染細胞のみを可視化するために感染細胞膜に発現する gD に抗 gD 抗体 (DL6) を結合させて Cy3-conjugated sheep anti-mouse IgG を結合させることにより染色した。DL6 の抗原決定基は scFv 挿入部位から遠位のアミノ酸にあるため、gD 標的化改変の有無で gD との結合能は変化しないと考えられる。本実験では KGNE、KGNE-BhKt、Rescued の細胞間伝播様式を評価した。Rescued は KGNE-BhKt の gB、gK の syncytial 変異を本来の gB、gK の配列に置換した復帰変異体である。Vero に各 HSV を感染させて 24 時間培養した後に、感染細胞の gD を上記の方法で染色した。その結果、KGNE および Rescued が感染した細胞は EGFP が発現する細胞の膜が個々に赤色を呈して non-syncytium 型を示す一方で、KGNE-BhKt が感染した細胞は EGFP を発現する複数の細胞が赤色を呈する一続きの膜に囲まれた syncytium 型となった (図 6 B)。以上の結果から gD 改変による標的化は syncytial 変異の導入による膜融合促進活性を阻害しないことが判明した。

2-3. syncytial 変異を導入した EGFR 標的化 HSV はヒトがん細胞株において巨大な syncytium の形成と高い細胞傷害活性を示した

syncytial 変異を含む膜融合活性を増強する変異は、HSV の *in vitro* における細胞傷害活性を増強することが報告されている (Fu and Zhang, *Cancer Res* 2002; Takaoka et al., *Virology* 2011)。そこで標的化 HSV に gB、gK の syncytial 変異を導入した場合にも細胞傷害活性が増強されるかどうか検討した。

まず細胞膜表面に gD 受容体と EGFR を発現するヒト膵がん細胞株 (PANC-1、AsPC-1、PK-8、BxPC-3) に KGNE と KGN を感染させてプラークを形成させた (図 7 A)。その結果、感染させる細胞株の種類によって KGN と KGNE のプラークサイズに違いが見られた (図 7 B)。

次に KGNE への syncytial 変異の導入により細胞間伝播能が増強されるかどうか検討した。上記の 4 種類の膵がん細胞株に KGNE、KGNE-Bh、KGNE-Kt、KGNE-BhKt を感染させてプラークサイズを比較した。感染後 72 時間で KGNE は 100 個以下の感染細胞からなるプラークを形成した。一方で KGNE-Bh、KGNE-Kt、KGNE-BhKt は全ての細胞株において syncytium を形成した (図 7 C)。以上の結果からヒトがん細胞株においても syncytial 変異を導入した EGFR 標的化 HSV は syncytium を形成することが明らかとなった。またそれぞれのプラークの大きさを計測した結果、PANC-1 と BxPC-3 において KGNE-Bh は KGNE-Kt よりも顕著に大きなプラークを形成した。KGNE-Kt は KGNE よりも有意に大きいプラークを形成したがその差は顕著ではなかった。対照的に、PK-8 に

において KGNE-Kt は KGNE-Bh よりも大きなプラークを形成した。興味深いことに、KGNE-BhKt は PANC-1 と PK-8 においてそれぞれの細胞株で細胞間伝播能の増強効果が高い syncytial 変異導入 HSV (KGNE-Bh あるいは KGNE-Kt) と同程度のプラークを形成した一方で、AsPC-1 と BxPC-3 では 4 種類のウイルスの中で最も大きいプラークを形成した (図 7 D)。細胞株によって細胞間伝播能の増強に効果の高い syncytial 変異の序列が異なることから、gB:R858H と gK:A40T が KGNE の細胞間伝播能を増強するメカニズムは異なることが示唆された。

膵がん以外のヒトがん細胞株においても KGNE-BhKt が巨大な syncytium を形成できるかどうか検討した。EGFR が細胞膜表面に発現するヒト胆管がん細胞株 (HuCCT1)、ヒト腎がん細胞株 (ACHN) に KGNE、KGNE-BhKt を感染させてプラークサイズを比較することにより細胞間伝播能を評価した。その結果、KGNE-BhKt はどちらのがん細胞株においても巨大な syncytium を形成した一方で、KGNE は小さなプラークを形成した (図 7 E、F)。以上の結果から、KGNE-BhKt は様々な種類のがん細胞株において細胞間伝播能を増強できることが明らかとなった。

次に syncytial 変異の導入により EGFR 標的化 HSV の細胞傷害活性を増強できるかどうか検討した。4 種類のヒト膵がん細胞株に KGNE あるいは KGNE-BhKt を感染させた 4 日後に MTT アッセイにより生細胞率を評価した。その結果、KGNE-BhKt は 4 種類全てのがん細胞株において KGNE よりも高い細胞傷害活性を示した (図 8 A)。表 4 に図 8 A の半数致死量 (LD₅₀) を示した。KGNE と KGNE-BhKt の LD₅₀ の違いは以下の通りであった; PANC-1 (19 倍)、AsPC-1 (2.6 倍)、PK-8 (18 倍)、BxPC-3 (6.5 倍)。

BxPC-3 では図 7 C、D の結果により、それぞれのウイルスによる細胞間伝播能が有意に異なることがわかっている。KGNE、KGNE-Bh、KGNE-Kt、KGNE-BhKt を BxPC-3 に感染させて細胞傷害活性を比較した。その結果、KGNE、KGNE-Kt、KGNE-Bh、KGNE-BhKt の順に細胞傷害活性が高いことが明らかとなった (図 8 B) (表 5)。また BxPC-3 において、細胞間伝播能と細胞傷害活性に対する各ウイルスの序列が一致した。gB:R858H、gK:A40T の syncytial 変異は gD 標的化 HSV による細胞傷害活性を増強できることが明らかとなり、細胞間伝播能が高いほど細胞傷害活性が高いことが示唆された。

2-4. syncytial 変異を有する EGFR 標的化 HSV の細胞内侵入・細胞間伝播は EGFR の発現に依存した

syncytial 変異を導入しても EGFR 標的化 HSV の細胞内侵入・細胞間伝播における特異性が維持されるかどうか検討するために、それぞれ entry assay、infectious center assay で評価した。

まず細胞内侵入の特異性を entry assay で評価した。本実験には gD 受容体を発現していないチャイニーズハムスター卵巣細胞株 (CHO-K1) を用いた。この CHO-K1 と gD 受

容体であるヒト HVEM、ヒト nectin-1 をそれぞれ発現させた CHO-HVEM、CHO-nectin-1、そしてヒト EGFR を発現させた CHO-EGFR に KGN、KGNE、KGNE-Bh、KGNE-Kt、KGNE-BhKt を感染させ、12 時間後の EGFP の発現を評価した。その結果、KGN は CHO-HVEM と CHO-nectin-1 で EGFP が発現し、EGFR 標的化 HSV は syncytial 変異の有無によらず CHO-EGFR で EGFP が発現した (図 9 A)。gD 受容体の発現しない baby hamster kidney 細胞株 (J 1.1-2) と HVEM、nectin-1、EGFR をそれぞれ発現させた J-HVEM、J-nectin-1、J-EGFR を用いた場合でも同様の結果が得られた (図 9 B)。以上の結果から、syncytial 変異の導入は EGFR 標的化 HSV の細胞内侵入を阻害しないことが明らかとなった。この結果は、これまでに内田らが報告した標的化 HSV の細胞内侵入は標的分子に依存するという結果と一致した (Uchida et al., J Virol 2010; Uchida et al., Mol Ther 2013; Shibata et al., Gene Ther 2016)。故に syncytial 変異の有無によらず標的分子の発現が細胞内侵入を規定することが示唆された。

次に KGNE-BhKt が EGFR 特異的に細胞間伝播するかどうかを infectious center assay で評価した。infectious center assay とは、ウイルスが感染した donor 細胞から感染していない acceptor 細胞へウイルスが細胞間伝播してゆく際の特異性を評価する実験系である。本実験には EGFR が発現しないと報告されているマウス大腸がん細胞株 CT26 (Castle et al., BMC Genomics 2014) にヒト EGFR を発現させた CT26-EGFR と CT26(mock transduced) を使用した。CT26 は野生型 HSV に感受性を示すことから腫瘍溶解性 HSV の抗腫瘍効果の検討に用いられている (Toda et al., Hum Gene Ther 1999; Esaki et al., Int J Cancer 2013)。CT26-EGFR に KGN と KGNE-BhKt をそれぞれ感染させた後 (donor 細胞)、酸性処理を行うことにより細胞外に存在する非感染ウイルスを不活化した。この donor 細胞を acceptor 細胞として播種しておいた CT26 (mock transduced)、CT26-EGFR に同数ずつ重層して、1%メチルセルロース含有培地で 2 日間培養することにより細胞間伝播を観察した (図 10)。その結果、KGN は CT26 (mock transduced) および CT26-EGFR どちらの細胞株でも同程度のサイズのプラークを形成した。一方で KGNE-BhKt は CT26-EGFR では syncytium を形成するが CT26 (mock transduced) ではプラークを形成しないか、あるいは数個の感染細胞からなるプラークの形成に留まった (図 11 A、B)。CT26-EGFR の別のクローンでも同様の結果が得られた (data not shown)。以上の結果から標的細胞における EGFR の発現は KGNE-BhKt の syncytium 形成に必要であることが明らかになった。すなわち syncytial 変異を導入した HSV の感染は細胞内侵入・細胞間伝播のどちらにおいても標的分子の発現に依存することが示唆された。

2-5. syncytial 変異の導入は EpCAM 標的化 HSV においても効果を示した

柴田らは EGFR 以外のがん関連抗原 EpCAM を標的としたウイルスを樹立した (Shibata et al., Gene Ther 2016)。そこで、標的分子が異なっても syncytial 変異は膜融合活性を増

強しうるかどうか検討した。まず BAC システムを利用して KGNE-BhKt の抗 EGFR 単鎖抗体を抗 EpCAM 単鎖抗体に置換して KGNEp-BhKt を樹立した (図 5)。細胞膜表面に EpCAM を発現する膵がん細胞株 AsPC-1 と PK-8 に KGNEp と KGNEp-BhKt を感染させ、72 時間後のプラーク形成能を評価した。その結果、KGNEp は小さなプラークを形成した一方で KGNEp-BhKt は巨大な syncytium を形成した (図 1 2 A)。KGNEp-BhKt のプラークサイズは KGNEp のプラークサイズと比較して、AsPC-1 で 67 倍、PK-8 で 37 倍であった (図 1 2 B)。

次に KGNEp-BhKt の膜融合が EpCAM の発現に依存することを示すために抗 EpCAM 抗体 (MY24) を用いて細胞内侵入の blocking assay を行った。その結果、抗体非存在条件および isotype (IgG1, κ)-matched negative control 抗体 MG1-45 を加えた条件での KGNEp-BhKt の細胞内侵入効率と比較して、MY24 を加えた条件では KGNEp-BhKt の細胞内侵入効率が顕著に抑制されることが明らかとなった (図 1 3)。以上より syncytial 変異の導入により膜融合活性が増強しても、標的化 HSV の膜融合は改変 gD とその受容体の相互作用に依存することが明らかとなった。さらに syncytial 変異の導入による細胞間伝播効率の増強は異なる分子を標的とする改変 HSV にも応用可能であることが示唆された。

第3章 考察

本研究では、標的化 HSV への syncytial 変異 (gB:R858H、gK:A40T) の導入は細胞内侵入・細胞間伝播の特異性を損なわないこと、gD 改変による EGFR (あるいは EpCAM) の標的化は syncytial 変異の膜融合促進活性を阻害しないことを明らかにした。以上の結果から syncytial 変異を有する HSV の細胞内侵入および細胞間伝播は gD 受容体の発現に依存することが示唆された。

gB、gK の syncytial 変異をそれぞれ単独で導入した EGFR 標的化 HSV (KGNE-Bh、KGNE-Kt) の細胞間伝播能はヒト膀胱がん細胞株の種類により異なった (図7)。一方で2種類の syncytial 変異を組合わせて導入した KGNE-BhKt は、細胞株の種類によらず細胞間伝播能、細胞傷害活性を増強した (図7、図8)。syncytial 変異を有する HSV の syncytium 形成能、細胞傷害活性は、syncytial 変異の種類と細胞の何らかの性質の違いに依存すると考えられる。これは、gB:R858H、gK:A40T の syncytial 変異がエンベロープあるいは宿主細胞膜の内側、外側にそれぞれ局在することにより異なる機序で膜融合促進に寄与するという推測に反しない。

Rogalin と Heldwein は、ウイルス非存在下で膜融合を解析することにより、gB の syncytial 変異が、gH/gL から伝達されるシグナルに対する gB の感受性を上げること、あるいは gB 活性化後に膜融合が生じるまでの速度を上げることが報告された (Rogalin and Heldwein, *J Virol* 2015)。また同研究グループは、構造学的・生化学的解析の結果から、gB の細胞内領域はエンベロープあるいは宿主の細胞膜と結合してフォールディングすることにより膜融合活性を抑制することを示した (Silverman et al., *J Virol* 2012)。gB の細胞内領域が担う膜融合抑制機構には、エンベロープあるいは宿主の細胞膜との結合が重要であることから、gB:R858H 変異の表現型は宿主細胞側の特性 (膜脂質の組成、細胞膜の電荷分布など) に依存すると考えられる。

gK の syncytial 変異が膜融合の促進に寄与するメカニズムは解明されていない。Chouljenko らは、コンピューターを用いた構造解析により、gK の N 末端 (gK の syncytial 変異のうち多くが N 末端に位置する) が gB のドメイン I に直接的に結合できることを示した (Chouljenko et al., *J Virol* 2010)。gB のドメイン I は fusion loop を有する (Hannah et al., *J Virol* 2009; Heldwein et al., *Science* 2006)。gK の syncytial 変異は標的細胞の細胞膜に gB の fusion loop を挿入する過程に影響を与えうると考えられた。さらに同研究グループは、gK の N 末端は gH にも直接的に結合できることを報告しており、gK の syncytial 変異は膜融合において gH による gB の活性化を促進している可能性も挙げられる (Chouljenko et al., *J Virol* 2010)。EGFR および EpCAM 標的化 HSV は、gB の細胞外領域に HSV の細胞内侵入を促進する変異 gB:N/T を有する (Uchida et al., *J Virol* 2010)。gB:N/T は syncytium 形成

や細胞間伝播を促進する変異ではないため (Uchida et al., J Virol 2010)、syncytial 変異の導入による膜融合促進活性に直接的な影響を与えないと考えられる。しかしながら D285N は gB のドメイン I に位置するため gB と gK の接触面の立体構造に何らかの影響を与えている可能性もある。

HSV の標的化改変はがん細胞のみに発現する分子をターゲットとすることにより正常細胞への感染を抑制できるため弱毒化の必要がないと考えられる。また本研究により、gD の標的化改変は gB、gK の syncytial 変異による syncytium 形成を阻害しないこと、2 つの syncytial 変異を組合わせて導入しても標的化 HSV は特異性を喪失しないことが明らかとなった。syncytial 変異を導入した標的化 HSV は標的分子を発現するがん細胞にのみ効率よく感染できるため、syncytial 変異を導入した非標的化 HSV よりも安全性が高いと考えられる。

本研究の他にも侵入標的化改変と他の改変を組合わせた例がある。Mazzacurati らは、グリオーマではほとんど発現せず正常な神経細胞に高発現する microRNA の miR-124 が認識する配列 (T124) をウイルスの IE 遺伝子である ICP4 の 3' 側に挿入した EGFR 標的化 HSV (KGE-4:T124) を樹立した (Mazzacurati et al., Mol Ther 2015)。KGE-4:T124 は腫瘍溶解活性を減弱させることなく腫瘍特異的なウイルス複製を示した。

本研究の結果および Mazzacurati らの報告からも、標的化改変と異なる機能を有する改変を組合わせることにより新たな腫瘍溶解性 HSV を作製することが可能である。特に syncytial 変異の導入は治療効果の増強に効果的である可能性が高い。gB:R858H、gK:A40T の syncytial 変異を導入した標的化 HSV が in vivo においても高い腫瘍溶解活性を示すのかどうかさらなる検討が期待される。

第4章 実験材料

4-1. 細胞

1. Vero 細胞、Vero 細胞亜株

Vero、Vero/Cre (Gierasch et al., J Virol Methods 2006)、Vero-EpCAM (Shibata et al., Gene Ther 2016) は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Nacalai Tesque) に 5% 牛胎児血清 (FBS; Thermo Fisher Scientific)、1% ペニシリン・ストレプトマイシンを加えた培養液で 37 °C、5% CO₂ 存在下にて培養した。Vero-EpCAM は以下のようにして樹立した。レトロウイルスパッケージング細胞株 PLAT-A にシャトルベクター pMXc-puro-hEpCAM を Lipofectamin 2000 (Invitrogen) を用いて遺伝子導入した。その後、ヒト EpCAM 遺伝子を搭載したレトロウイルスを回収し Vero に感染させた。4 µg/mL となるように puromycin を加えて選抜し、限界希釈を行うことにより Vero-EpCAM として樹立した。

2. CHO-K1 細胞、CHO-K1 細胞亜株

CHO-K1 (Chouljenko et al., J Virol 2010)、CHO-HVEM (Uchida et al., J Virol 2010)、CHO-nectin-1 (Geraghty et al., Science 1998)、CHO-EGFR (Nakamura et al., Nat Biotechnol 2004) は F12K (Gibco) に 10% FBS、1% ペニシリン・ストレプトマイシン、1% ピルビン酸ナトリウムを加えた培養液で 37 °C、5% CO₂ 存在下にて培養した。

3. J1.1-2 細胞、J1.1-2 細胞亜株

J1.1-2 (Cocchi et al., J Virol 1998)、J-HVEM (Uchida et al., J Virol 2009)、J-nectin-1 (Frampton et al., J Virol 2007)、J-EGFR (Nakano et al., Virology 2011) は、DMEM に 5% FBS、1% ペニシリン・ストレプトマイシンを加えた培養液で 37 °C、5% CO₂ 存在下にて培養した。

4. ヒトがん細胞株

PANC-1 は、DMEM に 10% FBS、1% ペニシリン・ストレプトマイシンを加えた培養液を用いて 37 °C、5% CO₂ 存在下にて培養した。AsPC-1、PK-8、BxPC-3、HuCCT1 は、RPMI 1640 (Nacalai Tesque) に 10% FBS、1% ペニシリン・ストレプトマイシンを加えた培養液で 37 °C、5% CO₂ 存在下にて培養した。ACHN は Eagle's minimal essential medium (Wako) に 10% FBS、1% ペニシリン・ストレプトマイシン、1% 非必須アミノ酸 (NEAAs) を加えた培養液で 37 °C、5% CO₂ 存在下にて培養した。

5. CT26 細胞株、CT26 細胞亜株

CT26.WT、CT26 (mock transduced)、CT26-EGFR は RPMI 1640 に 10% FBS、1% ペニシリン・ストレプトマイシンを加えた培養液で 37 °C、5% CO₂ 存在下にて培養した。CT26 (mock transduced) (puromycin 耐性 CT26.WT) と CT26-EGFR (puromycin 耐性ヒト EGFR 発現 CT26.WT) は以下のようにして樹立した。PLAT-A にシャトルベクター pMXc-

puro あるいは pMXc-puro-hEGFR を Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて遺伝子導入した。その後、レトロウイルスを回収し、CT26.WT に感染させた。10 µg/mL となるように puromycin を加えて選抜することにより CT26 (mock transduced) として樹立した。CT26-EGFR は限界希釈により単クローン化することにより樹立した。

以下の表に各細胞株の由来をまとめた。

name		origin
Vero	African green monkey kidney	ATCC CCL-81
Vero/Cre	Vero cells constitutively expressing Cre recombinase	provided by David Leib, Dartmouth Medical School, NH
Vero-EpCAM	human EpCAM-transduced Vero	by our group
CHO-K1	Chinese hamster ovary	ATCC CCL-61
CHO-HVEM	human HVEM-transduced CHO-K1	by our group
CHO-nectin-1	human nectin-1-transduced CHO-K1	provided by Patricia Spear, Northwestern University, IL
CHO-EGFR	human EGFR-transduced CHO-K1	provided by Stephen Russell, Mayo Clinic, MN
J1-1.2	baby hamster kidney	provided by Gabriella Campadelli-Fiume, University of Bologna, Italy
J-HVEM	human HVEM-transduced J1-1.2	by our group
J-nectin-1	human nectin-1-transduced J1-1.2	by our group
J-EGFR	human EGFR-transduced J1-1.2	by our group
PANC-1	human pancreatic carcinoma	ATCC CRL-1469
AsPC-1	human pancreatic carcinoma	ATCC CRL-1682
PK-8	human pancreatic carcinoma	RBRC RCB2700
BxPC-3	human pancreatic carcinoma	ATCC CRL-1687
ACHN	human renal cell carcinoma	ATCC CRL-1611
HuCCT1	human bile duct carcinoma	RBRC RCB1960
CT26.WT	murine colon carcinoma	ATCC CRL-2638
CT26 (mock-transduced)	puromycin resistant	by our group
CT26-EGFR	human EGFR-transduced CT26	by our group
PLAT-A	retroviral packaging cell	provided by Toshio Kitamura, University of Tokyo, Japan

4-2. プラスミド

1. pcDNA3.1 (-)-hEGFR (pSYM27)

ヒト EGFR を発現するプラスミドである。pcDNA3.1 (-) (Invitrogen) のマルチクローニングサイトにヒト EGFR 遺伝子を挿入した。

2. pMXc-puro-hEGFR (pTS251)

ヒト EGFR を発現するレトロウイルスのシャトルベクターである。pSYM27 からヒト EGFR のフラグメントを切り出し、pMXc-puro (東京大学 北村俊雄先生より供与) に挿入した。本プラスミドを用いて調製したレトロウイルス感染細胞は puromycin 耐性を獲得する。

3. pSP72-EGFP-Kan (pY010)

EGFP 発現遺伝子に相同な 50 bp の配列、I-Sce I サイト、カナマイシン耐性遺伝子を有するプラスミドである。PCR で調製したフラグメントを pSP72 に挿入した。

鋳型：pEP-Kan-S2

プライマー：

hu245 (forward)

5'CCGAATTCGGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCATAATCAGCCATACCACATTTG
TAGAGGTAGGATGACGACGATAAGTAGGG3'

hu246 (reverse)

5'CCTCTAGAGGATCCCTACAACCAATTAACCAATTCTGATTAG3'

4. pEGFP-KAN (pY011)

HSV ゲノムの U_L3 と U_L4 の間に EGFP 発現カセットを導入する際の、ターゲティングフラグメント調製用プラスミドである。pY010 から EGFP 発現遺伝子に相同な 50 bp の配列、I-Sce I サイト、カナマイシン耐性遺伝子を含むフラグメントを切り出し、pEGFP-C1 (Clontech) に挿入した。

5. pgD:d2-24/Y38C (pHU174)

gD の 2-24 番目のアミノ酸 (HVEM と結合) を欠失させ 38 番目のアミノ酸 (nectin-1 と結合) をチロシン (Y) からシステイン (C) に置換したプラスミドである。

6. pgD:d2-24/Y38C-scEGFR (pHU165)

pHU174 の 2-24 番目のアミノ酸欠失部位に抗 EGFR 単鎖抗体 (scEGFR) を挿入したプラスミドである。

7. pgD:d2-24/Y38CAfIKAN (pHU194)

gD に相同な 50 bp の配列、I-Sce I サイト、カナマイシン耐性遺伝子を含むフラグメントを PCR で調製し、pHU174 に挿入した。

鋳型：pEP-Kan-S2

プライマー：

hu101 (forward)

5'CCGAATTCTTAAGGTCTCTTTTGTGTGGTGC GTTCCGGTATGGGGGGGGCTGCCGCC
AGGATGACGACGATAAGTAGGG3'

hu102 (reverse)

5'CCGGATCCTTAAGCTACAACCAATTAACCAATTCTGATTAG3'

8. pgD:d2-24/Y38C-scEGFRaFlKAN (pHU195)

gD の 2-24 番目のアミノ酸欠失部位に抗 EGFR 抗体 528 の単鎖抗体 (scEGFR) を挿入する際のターゲティングフラグメント調製用プラスミドである。PCR で調製したフラグメントを pHU165 に挿入した。プライマーの配列は pHU194 参照。

鋳型 : pEP-Kan-S2

プライマー : hu101 (forward) 、 hu102 (reverse)

9. pgD:d2-24/Y38C-scEpCAMaFlKan (pSBT26)

gD の 2-24 番目のアミノ酸欠失部位に抗 EpCAM 抗体 MY24 の単鎖抗体 (scEpCAM) を挿入する際のターゲティングフラグメント調製用プラスミドである。pSP72-scEpCAM (pSBT20) から scEpCAM を切り出し、pHU194 に挿入した。

4-3. 抗体

1. 抗体ヒト EGFR 抗体 (528)

購入した (Santa Cruz) 。ストック溶液は 200 µg/mL。IgG2a、κ。サルの EGFR に交差反応性を示す。

2. 抗体ヒト EpCAM 抗体 (MY24)

研究室で作製した。ストック溶液は 894 µg/mL。IgG1、κ。

3. 抗 HSV-1 gD 抗体 (DL6)

購入した (Santa Cruz) 。ストック溶液は 200 µg/mL。IgG2a、κ。gD の 272-279 番目のアミノ酸に結合する。

4. 抗マウス IgG1、κ アイソタイプコントロール抗体 (MG1-45)

購入した (BioLegend) 。ストック溶液は 1 mg/mL。

5. 抗マウス IgG2a、κ アイソタイプコントロール抗体 (MOPC-173)

購入した (BioLegend) 。ストック溶液は 1 mg/mL。

6. Alexa Fluor 488-goat anti-mouse IgG (H+L)

購入した (Invitrogen) 。ストック溶液は 2 mg/mL。

7. Cy3-conjugated sheep anti-mouse IgG

購入した (Sigma) 。ストック溶液は 2 mg/mL。

4-4. ウイルス

4-4-1. ウイルス BAC プラスミド (HSV-BAC) の作製

本研究で用いた HSV-BAC コンストラクトは KOS-37 BAC (Even et al., Virus Res 2006) を由来とする (Dartmouth Medical School, Dr. David Leib より供与)。BAC プラスミドの相同組換えは Red 相同組換え法 (Tischer et al., Biotechniques 2006) と以下のプラスミドを用いた: pRed/ET (Gene Bridge)、pBAD-I-Sce I (Free University, Dr. Nikolaus Osterrieder より供与) (Tischer et al., Biotechniques 2006)。また相同組換えが成立したコロニーの選別には下記の抗生物質を用いた。

抗生物質の名称 (略称)	ストック溶液 (mg/mL)	終濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
クロラムフェニコール (Cm)	30	15
カナマイシン (Kan)	30	15
アンピシリン (Amp)	10	50
テトラサイクリン (Tet)	10	3

(1) HSV-BAC を有するコンピテントセルの調製

ElectroMAX DH10B Cells (Invitrogen) に HSV-BAC をエレクトロポレーションにより導入した (1.5 kV、200 Ω 、25 μF)。BAC は Cm 耐性遺伝子を有するため、37 $^{\circ}\text{C}$ で翌日まで培養することにより Cm を添加した LB (LB-Cm) 固形培地でコロニーを形成した。LB-Cm 液体培地 (2 mL) にシングルコロニーをピックアップし 37 $^{\circ}\text{C}$ で 20 時間振盪培養した。この培養液から 30 μL を採取して新鮮な LB-Cm 液体培地 (2 mL) に加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間振盪培養した後、遠心して *E. coli* を回収した。回収した *E. coli* を精製水で洗浄し、10 % グリセロールで再懸濁することによりコンピテントセルを調製した。

(2) 相同組換え

10~30 ng の pRed/ET (エクソヌクレアーゼと DNA 結合蛋白質を生成させることができる) をコンピテントセルに加えてエレクトロポレーションにより導入した (同上)。pRed/ET は温度感受性があり Tet 耐性遺伝子を有するため、*E. coli* は遮光して 30 $^{\circ}\text{C}$ で翌日まで培養することにより LB-Cm/Tet 固形培地でコロニーを形成した。LB-Cm/Tet 液体培地 (2 mL) にシングルコロニーをピックアップして遮光して 30 $^{\circ}\text{C}$ で 20 時間振盪培養した。この培養液から 30 μL を採取して新鮮な LB-Cm/Tet 液体培地 (1.5 mL) に加え、遮光して 30 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間振盪培養した。10 % L-arabinose を 53 μL 加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で遮光して 1 時間震盪培養した後、上記方法によりコンピテントセルを調製した。

ターゲティングフラグメント調製用プラスミドと各プライマーを用いて PCR を行うことによりターゲティングフラグメントを増幅し、Dpn I 処理を行った後に Qiagen gel extraction kit (Qiagen) あるいは Qiagen PCR purification kit (Qiagen) で精製した。HSV-BAC および pRed/ET を有するコンピテントセルにターゲティングフラグメント (100 ng) をエレクトロポレーションにより導入した (同上)。温めておいた LB 液体培地を 1 mL 加え、37 °C で 70 分間振盪培養した後に LB-Cm/Tet/Kan 固形培地にプレーティングした。HSV-BAC、pRed/ET、ターゲティングフラグメントを有する *E.coli* は遮光して 30 °C で翌日まで培養することによりコロニーを形成した。シングルコロニーをピックアップして LB-Cm/Tet/Kan 固形培地でレプリカ (遮光して 30 °C で翌日まで培養) を作製した後に LB-Cm/Kan 液体培地 (2 mL) で 37 °C、20 時間振盪培養し、増殖した *E.coli* から DNA を精製した。精製した DNA を制限酵素で処理してパルスフィールド泳動を行い DNA の切断パターンを比較することにより相同組換えが成立したことを確認した。

(3) Kan 耐性遺伝子の除去

正しく相同組換えが起こったクローンをレプリカから LB-Cm/Tet/Kan 液体培地 (2 mL) にピックアップして遮光して 30 °C で 20 時間振盪培養した。この培養液から 30 μ L を採取して新鮮な LB-Cm/Tet/Kan 液体培地 (1.5 mL) に加え、30 °C で 3 時間培養した後、上記方法でコンピテントセルを調製した。次に 10~30 ng の pBAD-I-Sce I (*E.coli* 内で I-Sce I を生成することができる) をコンピテントセルに加えエレクトロポレーションにより導入した (同上)。pBAD-I-Sce I は Amp 耐性遺伝子を有するため *E.coli* は LB-Cm/Tet/Amp 固形培地で遮光して翌日まで 30 °C で培養することによりコロニーを形成した。

LB-Cm/Tet/Amp 液体培地 (2 mL) にシングルコロニーをピックアップして遮光して 30 °C で 20 時間振盪培養した。この培養液から 100 μ L を採取して新鮮な LB-Cm/Tet/Amp 液体培地 (2 mL) に加え、遮光して 30 °C で 2 時間振盪培養した。Kan 耐性遺伝子を除去するために 10% L-arabinose を 400 μ L 加え、30 °C で 1 時間、37 °C で 45 分間、30 °C で 1 時間振盪培養した後、LB-Cm 固形培地にプレーティングした。37 °C で翌日まで培養することによりコロニーを形成した。

Kan 耐性遺伝子が除去されたことを確認するために、シングルコロニーをピックアップして LB-Cm/Kan 固形培地にストリークした後、LB-Cm 固形培地にストリークした。37 °C で翌日まで培養し、LB-Cm/Kan 固形培地では生育せず LB-Cm 固形培地でのみ生育したコロニーを選別した。LB-Cm 固形培地でのみ生育したコロニーを LB-Cm 液体培地 (2 mL) にピックアップして 37 °C で 20 時間振盪培養し、増殖した *E.coli* から DNA を精製した。精製した DNA を制限酵素で処理してパルスフィールド泳動を行い

DNA の切断パターンを比較することにより Kan 耐性遺伝子が除去されたことを確認した。

4-4-2. HSV-BAC

1. pKB3G-gB:NT-gDwt (以降 pKGN)

U_L3 と U_L4 の間に細胞内侵入のレポーター遺伝子である EGFP、U_L27 (gB) に細胞内侵入の効率を増強する点変異 (gB:N/T) を挿入した (Shibata et al., Gene Ther 2016)。ターゲティングフラグメントは PCR で調製した。

鋳型 : pYO11

プライマー :

hu249 (forward)

5'CCTCACTGCCCGTCGCGCGTGTGGATGTTAATAAATAACACATAAATTTTAGTTAT
TAATAGTAATCAATTACGGGG 3'

hu250 (reverse)

5'CCGACACTGAAATGCCCCCCCCCTTGCGGGCGGTCCATTAAAGACAACA
CGCGTTAAGATACATTGATGAGTTTG3'

2. pKB3G-gB:NT-gDscEGFR (pKGNE)

pKGN の配列のうち、US6 (gD) の 2-24 番目のアミノ酸を欠失させ HVEM との結合を不能とし、38 番目のアミノ酸に点変異 (Y38C) により nectin-1 との結合を不能とした。さらに gD の 2-24 番目のアミノ酸欠失部位に scEGFR を挿入した (Shibata et al., Gene Ther 2016)。ターゲティングフラグメントは PCR で調製した。

鋳型 : pHU195

プライマー :

hu15 (forward)

5'AAGCAGGGGTTAGGGAGTTG3'

hu4ANL (reverse)

5'TCCGGACGTCTTCGGAGGCCCC3'

3. pKB3G-gB:NT-gDscEpCAM (pKGNEp)

pKGN の配列のうち、gD の 2-24 番目のアミノ酸を欠失させ HVEM との結合を不能とし、38 番目のアミノ酸に点変異 (Y38C) により nectin-1 との結合を不能とした。さらに gD の 2-24 番目のアミノ酸欠失部位に scEpCAM を挿入した (Shibata et al., Gene Ther 2016)。ターゲティングフラグメントは PCR で調製した。

プライマーの配列は pKGNE 参照。

鋳型 : pSBT26

プライマー : hu15 (forward) 、 hu4ANL (reverse)

4. pKB3G-gB:NT:858H-gDscEGFR (pKGNE-Bh)

pKGNE の配列のうち、gB の 858 番目のアミノ酸をアルギニン (R, CGC) からヒスチジン (H, CAT) に置換した (syncytial 変異)。ターゲティングフラグメントは PCR で調製した。

鋳型 : pEP-Kan-S2

プライマー :

hu351 (forward)

5'GAGATGATACGGTACATGGCCCTGGTGTCTCGGCCATGGAGCATAACGGAACACAAGG
CCAAGAGGATGACGACGATAAGTAGGG3'

hu352 (reverse)

5'CAGCGCGCTCGTGGCCCTTCTTCTTGGCCTTGTGTTCCGTATGCTCCATGGCCGACAC
CAGCTACAACCAATTAACCAATTCTGATTAG3'

5. pKB3G-gB:NT-gK:40T-gDscEGFR (pKGNE-Kt)

pKGNE の配列のうち、gK の 40 番目のアミノ酸をアラニン (A, GCG) からスレオニン (T, ACC) に置換した (syncytial 変異)。ターゲティングフラグメントは PCR で調製した。

鋳型 : pEP-Kan-S2

プライマー :

hu349 (forward)

5'ACCGTCTTCGGTGCCAGTCCGCTGCACCGATGTATTTACACCGTACGCCCCACCGGC
ACCAGGATGACGACGATAAGTAGGG3'

hu350 (reverse)

5'ACGAGGGCGGTGTCGTTGTTGGTGCCGGTGGGGCGTACGGTGTAATACATCGGTG
CAGCCTACAACCAATTAACCAATTCTGATTAG3'

6. pKB3G-gB:NT:858H-gK:40T-gDscEGFR (pKGNE-BhKt)

pKGNE-Kt の配列のうち gB の 858 番目のアミノ酸を R (CGC) から H (CAT) に置換し、KGNE のゲノム内に gB:858H と gK:40T の 2 つの syncytial 変異を組合わせた。ターゲティングフラグメントは PCR で調製した。

鋳型 : pEP-Kan-S2

プライマー :

hu351 (forward)

5'GAGATGATACGGTACATGGCCCTGGTGTCTCGGCCATGGAGCATAACGGAACACAAGG
CCAAGAGGATGACGACGATAAGTAGGG3'

hu352 (reverse)

5'CAGCGCGCTCGTGCCCTTCTTCTTGGCCTTGTGTTCCGTATGCTCCATGGCCGACAC
CAGCTACAACCAATTAACCAATTCTGATTAG3'

7. pRescued (pKGNE-BhKt の復帰変異体)

pKGNE-BhKt の配列のうち、gB の 858 番目のアミノ酸を H (CAT) から R (CGC) に置換し、gK の 40 番目のアミノ酸を T (ACC) から A (GCG) に置換することにより、KGNE のゲノム内に挿入した 2 つの syncytial 変異を本来の配列に戻した。gK 変異のターゲティングフラグメントの調製には hu409 と hu410 を、gB 変異のターゲティングフラグメントの調製には hu411 と hu412 を用いた。いずれも鋳型は pEP-Kan-S2。

hu409 (forward)

5'ACCGTCTTCGGTGCCAGTCCGCTGCACCGATGTATTTACGCGGTACGCCCCACCGGC
ACCAGGATGACGACGATAAGTAGGG3'

hu410 (reverse)

5'ACGAGGGCGGTGTCGTTGTTGGTGCCGGTGGGGCGTACCGCGTAAATACATCGGTG
CAGCCTACAACCAATTAACCAATTCTGATTAG-3'

hu411 (forward)

5'GAGATGATACGGTACATGGCCCTGGTGTTCGGCCATGGAGCGCACGGAACACAAGG
CCAAGAGGATGACGACGATAAGTAGGG3'

hu412 (reverse)

5'CAGCGCGCTCGTGCCCTTCTTCTTGGCCTTGTGTTCCGTGCGCTCCATGGCCGACAC
CAGCTACAACCAATTAACCAATTCTGATTAG3'

8. pKB3G-gB:NT:858H-gK:40T-gDscEpCAM (pKGNEp-BhKt)

pKGNE-BhKt の配列のうち gD の 2-24 番目のアミノ酸欠失部位に scEpCAM を挿入した。ターゲティングフラグメントは PCR で調製した。プライマーの配列は pKGNE 参照。
鋳型 : pSBT26

プライマー : hu15 (forward) 、 hu4ANL (forward)

4-4-3. ウイルス粒子

1. KGN、KGNE

HSV-BAC を Lipofectamine LTX (Thermo Fisher Scientific) で Vero に遺伝子導入し、その培養上清から回収した。2 回限界希釈を行った後、Vero/Cre に感染させて BAC を除去した。

2. KGNEp

HSV-BAC を Lipofectamine LTX で Vero/Cre-EpCAM に遺伝子導入し、その培養上清から回収した。2 回限界希釈を行った。

3. KGNE-Bh、KGNE-Kt、KGNE-BhKt

HSV-BAC を Lipofectamine LTX で Vero/Cre に遺伝子導入し、その培養上清から回収した。2 回限界希釈を行った。

4. Rescued

HSV-BAC と Cre 組換え酵素発現プラスミド pxCANCre (東京大学 齋藤泉先生より供与) を Lipofectamine LTX で Vero に遺伝子導入し、その培養上清から回収した。2 回限界希釈を行った。

5. KGNEp-BhKt

HSV-BAC と pxCANCre を Lipofectamine LTX で Vero-EpCAM に遺伝子導入しその培養上清から回収した。2 回限界希釈を行った。

4-4-4. ウイルスの精製

8~16 枚の 175 cm² フラスコで培養した Vero 細胞あるいは Vero-EpCAM 細胞に MOI 0.0003~MOI0.03 で各ウイルスを感染させて 4~5 日間培養した。全ての細胞がウイルスに感染したことを確認した後、5 M NaCl を終濃度 0.45 M になるように滴下し、室温で 45 分間インキュベートした。感染細胞および培養上清を全て回収して超音波破碎を行った後に 4 °C で 15 分間遠心することにより細胞を沈殿させた。上清のみを回収して孔径 0.8 μm のフィルターに通し細胞破碎物を除去した後、4 °C で 30 分間遠心を行った (48,500 ×g)。上清を除去してペレットを PBS (-) で洗浄し再度 4 °C で 30 分間遠心を行った (48,500 ×g)。上清を除去して PBS (-) を加え 4 °C で翌日までインキュベートした。ウイルス液は再懸濁した後に液体窒素で凍結した後 -80 °C で保存した。

4-4-4. ウイルスの力価測定

48 穴プレートに Vero を単層となるように播種した。培養液を除去した後、各ウイルスを 10 倍ずつ希釈したサンプルを調製して 100 μL/well で感染させた (37 °C、2 時間)。感染から 2 時間後に 1 %メチルセルロース含有培養液を 500 μL/well で加えて培養した (37 °C、24~72 時間)。各ウェルにおけるプラークをカウントすることにより各ウイルスの力価を決定した。

第5章 実験操作

5-1. プラーク形態の観察

5-1-1. 細胞膜と核の染色 (図6A)

48穴プレートに Vero を単層となるように播種した。培養液を除去した後、各 HSV を 30 plaque forming units (pfu)/100 μ L/well で感染させた (37 $^{\circ}$ C、2 時間)。感染から 2 時間後に培養液を 200 μ L/well で加えて培養した (37 $^{\circ}$ C、22 時間)。プラークの染色は Image-iT LIVE Plasma Membrane and Nuclear Labeling Kit (I34406, Thermo Fisher Scientific) を用いた。4% paraformaldehyde (PFA) で固定した細胞に Alexa Fluor 594 wheat germ agglutinin (5 μ g/mL) と Hoechst 33342 (1 μ M) の混合溶液を 100 μ L/well で加えて染色した (室温、10 分)。プラークは FLoid セルイメージングステーション (Life Technologies) で観察した。

5-1-2. 感染細胞膜に発現した gD の染色 (図6B)

KGNE、KGNE-BhKt、Rescued を 5-1-1 と同様に感染させた (37 $^{\circ}$ C、24 時間)。感染から 24 時間後、1:400 に希釈した抗 gD 抗体 DL6 (Santa Cruz Biotechnology) で標識した後に (室温、1 時間)、4% PFA を加えて固定した。10% horse serum でブロッキングを行い (37 $^{\circ}$ C、1 時間)、Cy3-conjugated sheep anti-mouse IgG (Sigma) で染色した (室温、1 時間)。Nikon ECRIPSE Ti 倒立型研究用顕微鏡 (Nikon) で観察した。

5-2. 膵がん細胞株における EGFR の発現解析：フローサイトメトリー (図7A)

PANC-1、AsPC-1、PK-8、BxPC-3 をトリプシン処理して回収した。一次抗体反応：1 μ g の抗 EGFR 抗体 528 あるいは isotype (IgG2a, κ) -matched negative control 抗体 MOPC-173 (Biolegend) を結合させた (4 $^{\circ}$ C、30 分)。二次抗体反応：2 μ g の Alexa Fluor 488-goat anti-mouse IgG (H+L) (Thermo Fisher Scientific) を結合させた (4 $^{\circ}$ C、30 分)。解析は FACSCalibur (BD Biosciences) を用いた。

5-3. 細胞間伝播効率の評価：plaque formation assay (図7、図12)

6穴プレートにがん細胞株を単層になるように播種した。培養液を除去した後、各 EGFR 標的化 HSV を 300 pfu で感染させた (37 $^{\circ}$ C、2 時間)。感染から 2 時間後、1% メチルセルロース含有培地を重層した。感染細胞は 4% PFA を加えて固定した。プラークは Nikon ECRIPSE Ti 倒立型研究用顕微鏡 (Nikon)、OLYMPUS IX70 倒立型研究用顕微鏡 (Olympus) または倒立型位相差顕微鏡 BZ-X700 (Keyence) で観察した。各 HSV が形成したプラーク 15 個のサイズを Image J 64 を用いて測定し、平均値をグラフ化した。Steel-Dwass 検定 (図7D) あるいは Welch の t 検定 (図7F、図12B) を行い、有意差あり ($p < 0.05$) は*、有

意差なしは n.s. で示した。スケールバーは図 7 B、図 1 2 A は 500 μm 、図 7 E は 1 mm である。

5-4. 細胞傷害活性の評価 : cell killing assay (図 8)

96 穴プレートにがん細胞を 2.5×10^4 cells/well となるように播種した。培養液を除去した後、KGNE あるいは KGNE-BhKt を多重感染度 (multiplicity of infection, MOI) 0.003~0.3 で感染させた (37°C、96 時間)。感染から 96 時間後の生細胞率を 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) アッセイで評価した (Mosmann et al., J Immunol Methods 1983)。ウイルス液を除去し、MTT 試薬 (0.5 mg/mL) を 100 μL /well で加えた (37°C、1 時間)。1 時間後、MTT 試薬を除去し 100% エタノールを 100 μL /well で加えることにより生細胞によって還元されたホルマザンを可溶化した。その後マイクロプレートリーダー SH-9000 Lab 型 (コロナ電気) を用いて吸光度 570 nm、630 nm を測定した。生細胞の吸光度は OD570-OD630 により求め、6 ウェルの平均値をグラフ化した。

5-5. 細胞内侵入の特異性評価

5-5-1. entry assay (図 9)

48 穴プレートに CHO-K1 とその亜株、あるいは J1.1-2 とその亜株を単層となるように播種した。各 HSV を MOI 3 で感染させた (37°C、2 時間)。感染から 2 時間後に培養液を 150 μL /well 加えた。CHO-K1 とその亜株は感染から 12 時間後、J1.1-2 とその亜株は感染から 8 時間後に 4% PFA を加えて固定した。Nikon ECRIPSE Ti 倒立型研究用顕微鏡 (Nikon) または OLYMPUS IX70 倒立型研究用顕微鏡 (Olympus) で EGFP の発現を観察した。スケールバーは 125 μm である。

5-5-2. blocking assay (図 1 3)

48 穴プレートに AsPC-1 を単層となるように播種した。培養液を除去して PBS (-) で洗浄し、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製した抗 EpCAM 抗体 MY24 溶液あるいは isotype (IgG1, κ)-matched negative control 抗体 MG1-45 (Biolegend) 溶液を 100 μL /well で加えて反応させた (室温、1 時間)。抗体溶液を除去して PBS (-) で洗浄し、KGNEp-BhKt を MOI 0.01 で感染させた (37°C、2 時間)。2 時間後、0.1 M グリシン溶液 (pH 3.0) を加えて細胞外のウイルスを不活化した (室温、5 分)。PBS (-) で洗浄後、培養液を加えて培養した (37°C、12 時間)。12 時間後に EGFP が発現する細胞をカウントして 3 ウェルの平均値をグラフ化した。Welch の t 検定を行い、有意差あり ($p < 0.05$) は *、有意差なしは n.s. で示した。

5-6. 細胞間伝播の特異性評価 (infectious center assay) (図 1 1)

48 穴プレートに donor 細胞として CT26-EGFR を 1×10^5 cells/well、acceptor 細胞として CT26 (mock transduced) あるいは CT26-EGFR を 5×10^4 cells/well で播種した。翌日、donor 細胞の培地を除去し、KGN あるいは KGNE-BhKt を MOI 10 で感染させた (37°C、2 時間)。感染から 2 時間後ウイルス液を除去し 0.1 M グリシン溶液 (pH 3.0) を加えて細胞外のウイルスを不活化した (室温、3 分)。PBS (-) で洗浄後、培養液を 500 μ L/well で加えて培養した (37°C、30 分)。感染から 30 分後、トリプシン処理により donor 細胞を回収した。acceptor 細胞の培地を除去し、donor 細胞を 300 cells/well で重層した (室温、30 分)。30 分後、1 % メチルセルロース含有培地を重層して培養した (37 °C、48 時間)。48 時間後に 4 % PFA を加えて固定した。発現した EGFP を指標とし Nikon ECRIPISE Ti 倒立型研究用顕微鏡 (Nikon) を用いてプラークを観察した。各 HSV が形成したプラークのうち 15 個のサイズを Image J 64 を用いて測定し、平均値をグラフ化した。Welch の t 検定を行い、有意差あり ($p < 0.05$) は*、有意差なしは n.s. で示した。スケールバーは 500 μ m である。

5-7. 統計解析

各群の比較は Steel-Dwass 検定 (4 群の比較) あるいは Welch の t 検定 (2 群の比較) を行った。 $p < 0.05$ で有意差ありとした。

参考文献

Akhtar J, Shukla D. 2009. Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS J.* 276(24):7228-36.

Atanasiu D, Saw WT, Cohen GH, Eisenberg RJ. Cascade of events governing cell-cell fusion induced by herpes simplex virus glycoproteins gD, gH/gL, and gB. 2010. *J Virol.* 84(23):12292-9.

Atanasiu D, Cairns TM, Whitbeck JC, Saw WT, Rao S, Eisenberg RJ, Cohen GH. Regulation of herpes simplex virus gB-induced cell-cell fusion by mutant forms of gH/gL in the absence of gD and cellular receptors. 2013. *MBio.* 26;4(2). pii:e00046-13.

Atanasiu D, Whitbeck JC, Cairns TM, Reilly B, Cohen GH, Eisenberg RJ. Bimolecular complementation reveals that glycoproteins gB and gH/gL of herpes simplex virus interact with each other during cell fusion. 2007. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(47):18718-23.

Avitabile E, Lombardi G, Campadelli-Fiume G. Herpes simplex virus glycoprotein K, but not its syncytial allele, inhibits cell-cell fusion mediated by the four fusogenic glycoproteins, gD, gB, gH, and gL. 2003. *J Virol.* 77(12):6836-44.

Baghian A, Huang L, Newman S, Jayachandra S, Kousoulas KG. Truncation of the carboxy-terminal 28 amino acids of glycoprotein B specified by herpes simplex virus type 1 mutant amb1511-7 causes extensive cell fusion. 1993. *J Virol.* 67(4):2396-401.

Baines JD, Ward PL, Campadelli-Fiume G, Roizman B. The U_L20 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function necessary for viral egress. 1991. *J Virol.* 65(12):6414-24.

Bloom DC, Giordani NV, Kwiatkowski DL. Epigenetic regulation of latent HSV gene expression. 2010. *Biochim Biophys Acta.* 1799(3-4):246-56.

Bond VC, Person S. Fine structure physical map locations of alterations that affect cell fusion in herpes simplex virus type 1. 1984. *Virology.* 132(2):368-76.

Bzik DJ, Fox BA, DeLuca NA, Person S. Nucleotide sequence of a region of the herpes simplex virus type 1 gB glycoprotein gene: mutations affecting rate of virus entry and cell fusion. 1984. *Virology*. 137(1):185-90.

Cai WH, Gu B, Person S. Role of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 in viral entry and cell fusion. 1988. *J Virol*. 62(8):2596-604.

Campadelli-Fiume G, Menotti L, Avitabile E, Gianni T. Viral and cellular contributions to herpes simplex virus entry into the cell. 2012. *Curr Opin Virol*. 2(1):28-36.

Campbell ME, Palfreyman JW, Preston CM. Identification of herpes simplex virus DNA sequences which encode a trans-acting polypeptide responsible for stimulation of immediate early transcription. 1984. *J Mol Biol*. 180(1):1-19.

Carfi A, Willis SH, Whitbeck JC, Krummenacher C, Cohen GH, Eisenberg RJ, Wiley DC. Herpes simplex virus glycoprotein D bound to the human receptor HveA. 2001. *Mol Cell*. 8(1):169-79.

Castle JC, Loewer M, Boegel S, de Graaf J, Bender C, Tadmor AD, Boisguerin V, Bukur T, Sorn P, Paret C, Diken M, Kreiter S, Türeci Ö, Sahin U. Immunomic, genomic and transcriptomic characterization of CT26 colorectal carcinoma. 2014. *BMC Genomics*. 15:190.

Chase M, Chung RY, Chiocca EA. An oncolytic viral mutant that delivers the CYP2B1 transgene and augments cyclophosphamide chemotherapy. 1998. *Nat Biotechnol*. 16(5):444-8.

Chouljenko VN, Iyer AV, Chowdhury S, Chouljenko DV, Kousoulas KG. The amino terminus of herpes simplex virus type 1 glycoprotein K (gK) modulates gB-mediated virus-induced cell fusion and virion egress. 2009. *J Virol*. 83(23):12301-13.

Chouljenko VN, Iyer AV, Chowdhury S, Kim J, Kousoulas KG. The herpes simplex virus type 1 U_L20 protein and the amino terminus of glycoprotein K (gK) physically interact with gB. 2010. *J Virol*. 84(17):8596-606.

Chowdary TK, Cairns TM, Atanasiu D, Cohen GH, Eisenberg RJ, Heldwein EE. Crystal structure of the conserved herpesvirus fusion regulator complex gH-gL. 2010. *Nat Struct Mol Biol*. 17(7):882-8.

Cocchi F, Menotti L, Mirandola P, Lopez M, Campadelli-Fiume G. The ectodomain of a novel member of the immunoglobulin subfamily related to the poliovirus receptor has the attributes of a bona fide receptor for herpes simplex virus types 1 and 2 in human cells. 1998. *J Virol.* 72(12):9992-10002.

Cocchi F, Menotti L, Dubreuil P, Lopez M, Campadelli-Fiume G. Cell-to-cell spread of wild-type herpes simplex virus type 1, but not of syncytial strains, is mediated by the immunoglobulin-like receptors that mediate virion entry, nectin1 (PRR1/HveC/HIgR) and nectin2 (PRR2/HveB). 2000. *J Virol.* 74(8):3909-17.

Cocchi F, Menotti L, Di Ninni V, Lopez M, Campadelli-Fiume G. The herpes simplex virus JMP mutant enters receptor-negative J cells through a novel pathway independent of the known receptors nectin1, HveA, and nectin2. 2004. *J Virol.* 78(9):4720-9.

Colgrove RC, Liu X, Griffiths A, Raja P, Deluca NA, Newman RM, Coen DM, Knipe DM. History and genomic sequence analysis of the herpes simplex virus 1 KOS and KOS1.1 sub-strains. 2016. *Virology.* 487:215-21.

Darlington RW, Moss LH 3rd. Herpesvirus envelopment. 1968. *J Virol.* 2(1):48-55.

Debroy C, Pederson N, Person S. Nucleotide sequence of a herpes simplex virus type 1 gene that causes cell fusion. 1985. *Virology.* 145(1):36-48.

Diakidi-Kosta A, Michailidou G, Kontogounis G, Sivropoulou A, Arsenakis M. A single amino acid substitution in the cytoplasmic tail of the glycoprotein B of herpes simplex virus 1 affects both syncytium formation and binding to intracellular heparan sulfate. 2003. *Virus Res.* 93(1):99-108.

Diefenbach RJ. Conserved tegument protein complexes: Essential components in the assembly of herpesviruses. 2015. *Virus Res.* 210:308-17.

Dolter KE, Ramaswamy R, Holland TC. Syncytial mutations in the herpes simplex virus type 1 gK (U_L53) gene occur in two distinct domains. 1994. *J Virol.* 68(12):8277-81.

Engel JP, Boyer EP, Goodman JL. Two novel single amino acid syncytial mutations in the carboxy terminus of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 confer a unique pathogenic phenotype. 1993. *Virology*. 192(1):112-20.

Esaki S, Goshima F, Kimura H, Murakami S, Nishiyama Y. Enhanced antitumoral activity of oncolytic herpes simplex virus with gemcitabine using colorectal tumor models. 2013. *Int J Cancer*. 132(7):1592-601.

Even DL, Henley AM, Geraghty RJ. The requirements for herpes simplex virus type 1 cell-cell spread via nectin-1 parallel those for virus entry. 2006. *Virus Res*. 119(2):195-207.

Foster TP, Alvarez X, Kousoulas KG. Plasma membrane topology of syncytial domains of herpes simplex virus type 1 glycoprotein K (gK): the UL20 protein enables cell surface localization of gK but not gK-mediated cell-to-cell fusion. 2003. *J Virol*. 77(1):499-510.

Foster TP, Melancon JM, Kousoulas KG. An alpha-helical domain within the carboxyl terminus of herpes simplex virus type 1 (HSV) glycoprotein B (gB) is associated with cell fusion and resistance to heparin inhibition of cell fusion. 2001. *Virology*. 287(1):18-29.

Frampton AR Jr, Stolz DB, Uchida H, Goins WF, Cohen JB, Glorioso JC. Equine herpesvirus 1 enters cells by two different pathways, and infection requires the activation of the cellular kinase ROCK1. 2007. *J Virol*. 81(20):10879-89.

Fu X, Zhang X. Potent systemic antitumor activity from an oncolytic herpes simplex virus of syncytial phenotype. 2002. *Cancer Res*. 62(8):2306-12.

Fusco D, Forghieri C, Campadelli-Fiume G. The pro-fusion domain of herpes simplex virus glycoprotein D (gD) interacts with the gD N terminus and is displaced by soluble forms of viral receptors. 2005. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(26):9323-8.

Gage PJ, Levine M, Glorioso JC. Syncytium-inducing mutations localize to two discrete regions within the cytoplasmic domain of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B. 1993. *J Virol*. 67(4):2191-201.

Geraghty RJ, Krummenacher C, Cohen GH, Eisenberg RJ, Spear PG. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. 1998. *Science*. 280(5369):1618-20.

Gianni T, Amasio M, Campadelli-Fiume G. Herpes simplex virus gD forms distinct complexes with fusion executors gB and gH/gL in part through the C-terminal profusion domain. 2009. *J Biol Chem*. 284(26):17370-82.

Gierasch WW, Zimmerman DL, Ward SL, Vanheyningen TK, Romine JD, Leib DA. Construction and characterization of bacterial artificial chromosomes containing HSV strains 17 and KOS. 2006. *J Virol Methods*. 135(2):197-206.

Gruffat H, Marchione R, Manet E. Herpesvirus Late Gene Expression: A Viral-Specific Pre-initiation Complex Is Key. 2016. *Front Microbiol*. 7:869.

Hannah BP, Heldwein EE, Bender FC, Cohen GH, Eisenberg RJ. Mutational evidence of internal fusion loops in herpes simplex virus glycoprotein B. 2007. *J Virol*. 81(9):4858-65.

Hannah BP, Cairns TM, Bender FC, Whitbeck JC, Lou H, Eisenberg RJ, Cohen GH. Herpes simplex virus glycoprotein B associates with target membranes via its fusion loops. 2009. *J Virol*. 83(13):6825-36.

Heldwein EE, Lou H, Bender FC, Cohen GH, Eisenberg RJ, Harrison SC. Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. 2006. *Science*. 313(5784):217-20.

Israyelyan AH, Melancon JM, Lomax LG, Sehgal I, Leuschner C, Kearney MT, Chouljenko VN, Baghian A, Kousoulas KG. Effective treatment of human breast tumor in a mouse xenograft model with herpes simplex virus type 1 specifying the NV1020 genomic deletion and the gBsyn3 syncytial mutation enabling high viral replication and spread in breast cancer cells. 2007. *Hum Gene Ther*. 18(5):457-73.

Israyelyan A, Chouljenko VN, Baghian A, David AT, Kearney MT, Kousoulas KG. Herpes simplex virus type-1(HSV) oncolytic and highly fusogenic mutants carrying the NV1020 genomic deletion effectively inhibit primary and metastatic tumors in mice. 2008. *Virol J*. 5:68.

Jenkins FJ, Rowe DT, Rinaldo CR Jr. Herpesvirus infections in organ transplant recipients. 2003. *Clin Diagn Lab Immunol.* 10(1):1-7.

Johnson DC, Baines JD. Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. 2011. *Nat Rev Microbiol.* 9(5):382-94.

Johnson DC, Webb M, Wisner TW, Brunetti C. Herpes simplex virus gE/gI sorts nascent virions to epithelial cell junctions, promoting virus spread. 2001. *J Virol.* 75(2):821-33.

Kimberlin DW, Whitley RJ. Antiviral therapy of HSV and -2. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K, editors. 2007. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis.* Cambridge: Cambridge University Press; 2007. Chapter 64.

Kosz-Vnenchak M, Coen DM, Knipe DM. Restricted expression of herpes simplex virus lytic genes during establishment of latent infection by thymidine kinase-negative mutant viruses. 1990. *J Virol.* 64(11):5396-402.

Kramer MF, Chen SH, Knipe DM, Coen DM. Accumulation of viral transcripts and DNA during establishment of latency by herpes simplex virus. 1998. *J Virol.* 72(2):1177-85.

Kramm CM, Chase M, Herrlinger U, Jacobs A, Pechan PA, Rainov NG, Sena-Esteves M, Aghi M, Barnett FH, Chiocca EA, Breakefield XO. Therapeutic efficiency and safety of a second-generation replication-conditional HSV1 vector for brain tumor gene therapy. 1997. *Hum Gene Ther.* 1997 8(17):2057-68.

Krummenacher C, Supekar VM, Whitbeck JC, Lazear E, Connolly SA, Eisenberg RJ, Cohen GH, Wiley DC, Carfi A. Structure of unliganded HSV gD reveals a mechanism for receptor-mediated activation of virus entry. 2005. *EMBO J.* 24(23):4144-53.

Liu BL, Robinson M, Han ZQ, Branston RH, English C, Reay P, McGrath Y, Thomas SK, Thornton M, Bullock P, Love CA, Coffin RS. ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. 2003. *Gene Ther.* 10(4):292-303.

MacLean AR, ul-Fareed M, Robertson L, Harland J, Brown SM. Herpes simplex virus type 1 deletion variants 1714 and 1716 pinpoint neurovirulence-related sequences in Glasgow strain 17+ between immediate early gene 1 and the 'a' sequence. 1991. *J Gen Virol.* 72 (Pt 3):631-9.

Mazzacurati L, Marzulli M, Reinhart B, Miyagawa Y, Uchida H, Goins WF, Li A, Kaur B, Caligiuri M, Cripe T, Chiocca EA, Amankulor N, Cohen JB, Glorioso JC, Grandi P. Use of miRNA response sequences to block off-target replication and increase the safety of an unattenuated, glioblastoma-targeted oncolytic HSV. 2015. *Mol Ther.* 23(1):99-107.

Meignier B, Longnecker R, Roizman B. In vivo behavior of genetically engineered herpes simplex viruses R7017 and R7020: construction and evaluation in rodents. 1988. *J Infect Dis.* 158(3):602-14.

Melancon JM, Luna RE, Foster TP, Kousoulas KG. Herpes simplex virus type 1 gK is required for gB-mediated virus-induced cell fusion, while neither gB and gK nor gB and U_L20p function redundantly in virion de-envelopment. 2005. *J Virol.* 79(1):299-313.

Mettenleiter TC. Budding events in herpesvirus morphogenesis. 2004. *Virus Res.* 106(2):167-80.

Mineta T, Rabkin SD, Yazaki T, Hunter WD, Martuza RL. Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. 1995. *Nat Med.* 1(9):938-43.

Montgomery RI, Warner MS, Lum BJ, Spear PG. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. 1996. *Cell.* 87(3):427-36.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. 1983. *J Immunol Methods.* 65(1-2):55-63.

Nakamura T, Peng KW, Vongpunsawad S, Harvey M, Mizuguchi H, Hayakawa T, Cattaneo R, Russell SJ. Antibody-targeted cell fusion. 2004. *Nat Biotechnol.* 22(3):331-6.

Nakano K, Kobayashi M, Nakamura K, Nakanishi T, Asano R, Kumagai I, Tahara H, Kuwano M, Cohen JB, Glorioso JC. Mechanism of HSV infection through soluble adapter-mediated virus bridging to the EGF receptor. 2011. *Virology.* 413(1):12-8.

Parker JN, Gillespie GY, Love CE, Randall S, Whitley RJ, Markert JM. Engineered herpes simplex virus expressing IL-12 in the treatment of experimental murine brain tumors. 2000 Proc Natl Acad Sci U S A. 97(5):2208-13.

Peters C, Rabkin SD. Designing Herpes Viruses as Oncolytics. 2015. Mol Ther Oncolytics. 2. pii: 15010.

Pogue-Geile KL, Spear PG. The single base pair substitution responsible for the Syn phenotype of herpes simplex virus type 1, strain MP. 1987. Virology. 157(1):67-74.

Preston CM, Efstathiou S. Molecular basis of HSV latency and reactivation. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K, editors. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Cambridge: Cambridge University Press; 2007. Chapter 33.

Read GS, Frenkel N. Herpes simplex virus mutants defective in the virion-associated shutoff of host polypeptide synthesis and exhibiting abnormal synthesis of alpha (immediate early) viral polypeptides. 1983. J Virol. 46(2):498-512.

Rogalin HB, Heldwein EE. Interplay between the Herpes Simplex Virus 1 gB Cytodomain and the gH Cytotail during Cell-Cell Fusion. 2015. J Virol. 89(24):12262-72.

Shibata T, Uchida H, Shiroyama T, Okubo Y, Suzuki T, Ikeda H, Yamaguchi M, Miyagawa Y, Fukuhara T, Cohen JB, Glorioso JC, Watabe T, Hamada H, Tahara H. Development of an oncolytic HSV vector fully retargeted specifically to cellular EpCAM for virus entry and cell-to-cell spread. 2016. Gene Ther. 23(6):479-88.

Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector. 1992. Proc Natl Acad Sci U S A. 89(18):8794-7.

Shukla D, Liu J, Blaiklock P, Shworak NW, Bai X, Esko JD, Cohen GH, Eisenberg RJ, Rosenberg RD, Spear PG. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. 1999. Cell. 99(1):13-22.

Silverman JL, Greene NG, King DS, Heldwein EE. Membrane requirement for folding of the herpes simplex virus 1 gB cytodomain suggests a unique mechanism of fusion regulation. 2012. *J Virol.* 86(15):8171-84.

Smibert CA, Johnson DC, Smiley JR. Identification and characterization of the virion-induced host shutoff product of herpes simplex virus gene U_L41. 1992. *J Gen Virol.* 73 (Pt 2):467-70.

Sodeik B, Ebersold MW, Helenius A. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. 1997. *J Cell Biol.* 136(5):1007-21.

Takaoka H, Takahashi G, Ogawa F, Imai T, Iwai S, Yura Y. A novel fusogenic herpes simplex virus for oncolytic virotherapy of squamous cell carcinoma. 2011. *Virol J.* 8:294.

Tischer BK, von Einem J, Kaufer B, Osterrieder N. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. 2006. *Biotechniques.* 40(2):191-7.

Toda M, Rabkin SD, Kojima H, Martuza RL. Herpes simplex virus as an in situ cancer vaccine for the induction of specific anti-tumor immunity. 1999. *Hum Gene Ther.* 10(3):385-93.

Todo T, Martuza RL, Rabkin SD, Johnson PA. Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. 2001. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(11):6396-401.

Tognon M, Guandalini R, Romanelli MG, Manservigi R, Trevisani B. Phenotypic and genotypic characterization of locus Syn 5 in herpes simplex virus 1. 1991. *Virus Res.* 18(2-3):135-50.

Uchida H, Shah WA, Ozuer A, Frampton AR Jr, Goins WF, Grandi P, Cohen JB, Glorioso JC. Generation of herpesvirus entry mediator (HVEM)-restricted herpes simplex virus type 1 mutant viruses: resistance of HVEM-expressing cells and identification of mutations that rescue nectin-1 recognition. 2009. *J Virol.* 83(7):2951-61.

Uchida H, Chan J, Goins WF, Grandi P, Kumagai I, Cohen JB, Glorioso JC. A double mutation in glycoprotein gB compensates for ineffective gD-dependent initiation of herpes simplex virus type 1 infection. 2010. *J Virol.* 84(23):12200-9.

Uchida H, Marzulli M, Nakano K, Goins WF, Chan J, Hong CS, Mazzacurati L, Yoo JY, Haseley A, Nakashima H, Baek H, Kwon H, Kumagai I, Kuroki M, Kaur B, Chiocca EA, Grandi P, Cohen JB, Glorioso JC. Effective treatment of an orthotopic xenograft model of human glioblastoma using an EGFR-retargeted oncolytic herpes simplex virus. 2013. *Mol Ther.* 21(3):561-9.

Ward PL, Roizman B. Herpes simplex genes: the blueprint of a successful human pathogen. 1994. *Trends Genet.* 10(8):267-74.

Watanabe D. Medical application of herpes simplex virus. 2010. *J Dermatol Sci.* 57(2):75-82.

植竹久雄（編），（1982）ウイルス学 理工学社

	潜伏組織	培養条件における特性
αヘルペスウイルス	神経	複製周期が短い。様々な種類の細胞株に感染可能である。
βヘルペスウイルス	マクロファージ・リンパ球	αヘルペスウイルスよりも複製周期が長い。
γヘルペスウイルス	リンパ球	感染可能な細胞株が限定的である。

Gruffat et al., Front Microbiol 2016より改変

表1. ヘルペスウイルス亜科

学名	一般名	亜科	病態生理学
HHV-1	単純ヘルペスウイルス1型	HSV-1	α 口唇ヘルペス・ 歯肉口内炎など
HHV-2	単純ヘルペスウイルス2型	HSV-2	α 性器ヘルペスなど
HHV-3	水痘・帯状疱疹ヘルペスウイルス	VZV	α 水疱瘡・帯状疱疹
HHV-4	EBウイルス	EBV	γ 伝染性単核球症
HHV-5	サイトメガロウイルス	CMV	β 先天性サイトメガロウイルス 感染症・肝脾腫など
HHV-6A・ HHV-6B			β 風疹・腎臓移植の拒絶反応に 関連性が見られる
HHV-7			β
HHV-8	カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス	KSHV	γ カポジ肉腫・ 原発性滲出リンパ腫など

Gruffat et al., Front Microbiol 2016より改変

表2. ヒトヘルペスウイルス

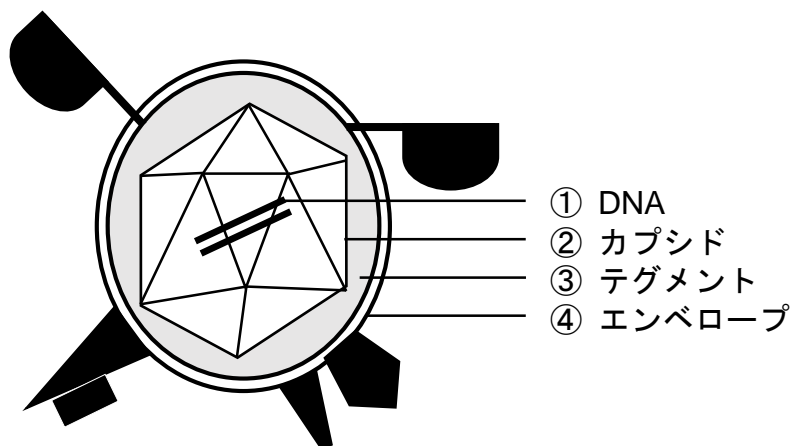


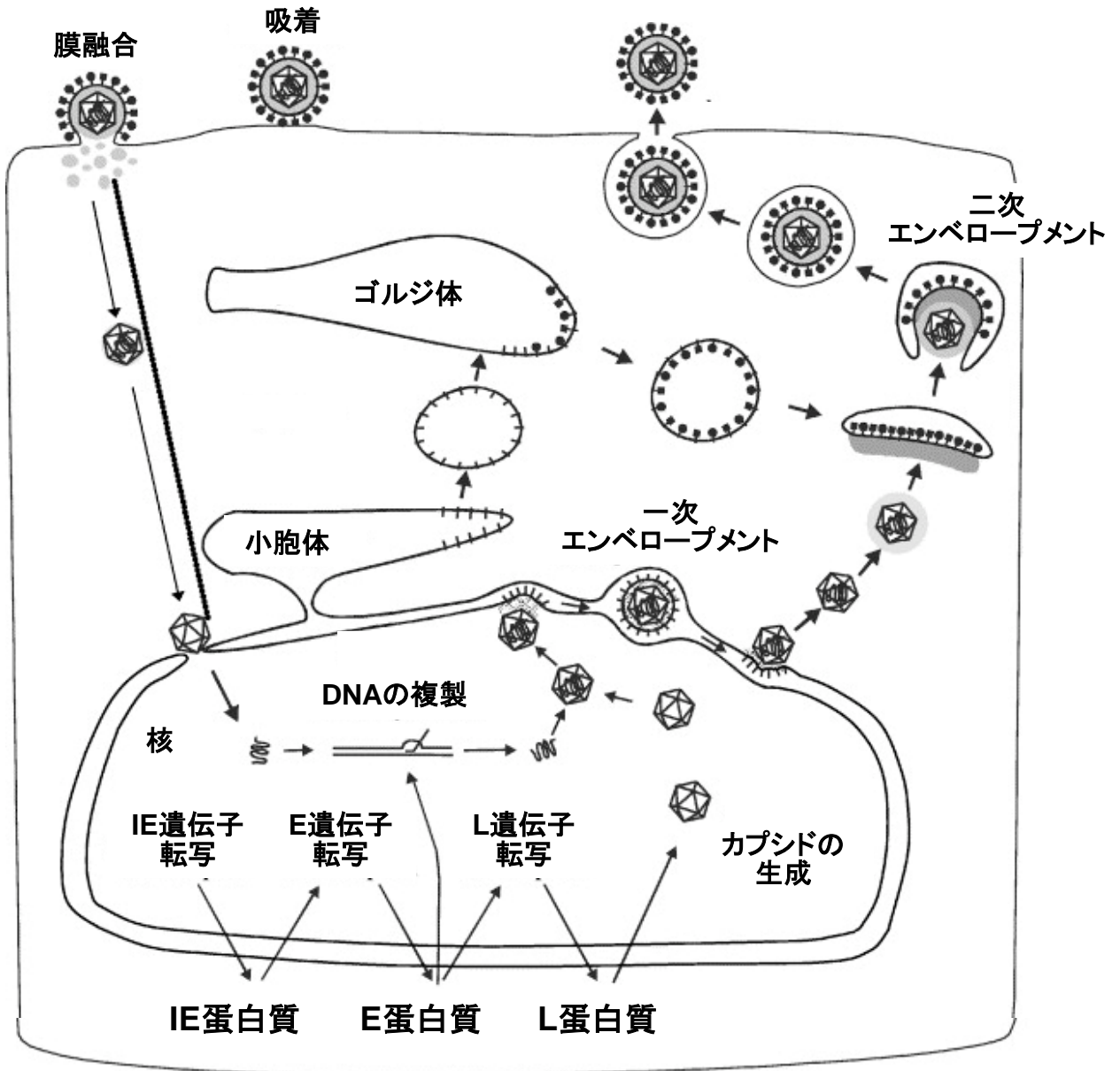
図1.HSV-1の構造

gene	
RL1	neurovirulence factor ICP34.5
RL2	ubiquitin E3 ligase ICP0
UL1	envelope glycoprotein L
UL2	uracil-DNA glycosylase
UL3	nuclear protein UL3
UL4	nuclear protein UL4
UL5	helicase-primase helicase subunit
UL6	capsid portal protein
UL7	tegument protein UL7
UL8	helicase-primase subunit
UL9	DNA replication origin-binding helicase
UL10	envelope glycoprotein M
UL11	myristylated tegument protein
UL12	deoxyribonuclease
UL13	tegument serine/threonine protein kinase
UL14	tegument protein UL14
UL15	DNA packaging terminase subunit 1
UL16	tegument protein UL16
UL17	DNA packaging tegument protein UL17
UL18	capsid triplex subunit 2
UL19	major capsid protein
UL20	envelope protein UL20
UL21	tegument protein UL21
UL22	envelope glycoprotein H
UL23	thymidine kinase
UL24	nuclear protein UL24
UL25	DNA packaging tegument protein UL25
UL26	capsid maturation protease
UL26.5	capsid scaffold protein
UL27	envelope glycoprotein B
UL28	DNA packaging terminase subunit 2
UL29	single-stranded DNA-binding protein
UL30	DNA polymerase catalytic subunit
UL31	nuclear egress lamina protein
UL32	DNA packaging protein UL32
UL33	DNA packaging protein UL33
UL34	nuclear egress membrane protein
UL35	small capsid protein
UL36	large tegument protein
UL37	tegument protein UL37
UL38	capsid triplex subunit 1
UL39	ribonucleotide reductase subunit 1
UL40	ribonucleotide reductase subunit 2
UL41	tegument host shutoff protein
UL42	DNA polymerase processivity subunit
UL43	envelope protein UL43
UL44	envelope glycoprotein C
UL45	membrane protein UL45
UL46	tegument protein VP11/12
UL47	tegument protein VP13/14
UL48	transactivating tegument protein VP16
UL49	tegument protein VP22
UL49A	envelope glycoprotein N
UL50	deoxyuridine triphosphatase
UL51	tegument protein UL51
UL52	helicase-primase primase subunit
UL53	envelope glycoprotein K
UL54	multifunctional expression regulator
UL55	nuclear protein UL55
UL56	membrane protein UL56
RL2	ubiquitin E3 ligase ICP0

gene	
RS1	transcriptional regulator ICP4
US1	regulatory protein ICP22
US2	virion protein US2
US3	serine/threonine protein kinase US3
US4	envelope glycoprotein G
US5	envelope glycoprotein J
US6	envelope glycoprotein D
US7	envelope glycoprotein I
US8	envelope glycoprotein E
US8A	membrane protein US8A
US9	membrane protein US9
US10	virion protein US10
US11	tegument protein US11
US12	TAP transporter inhibitor ICP47
RS1	transcriptional regulator ICP4

Colgrove et al., Virology 2016より改変

表 3. HSV-1の遺伝子



Mettenleiter et al., Virus Res 2004より改変

図3. HSVの生活環

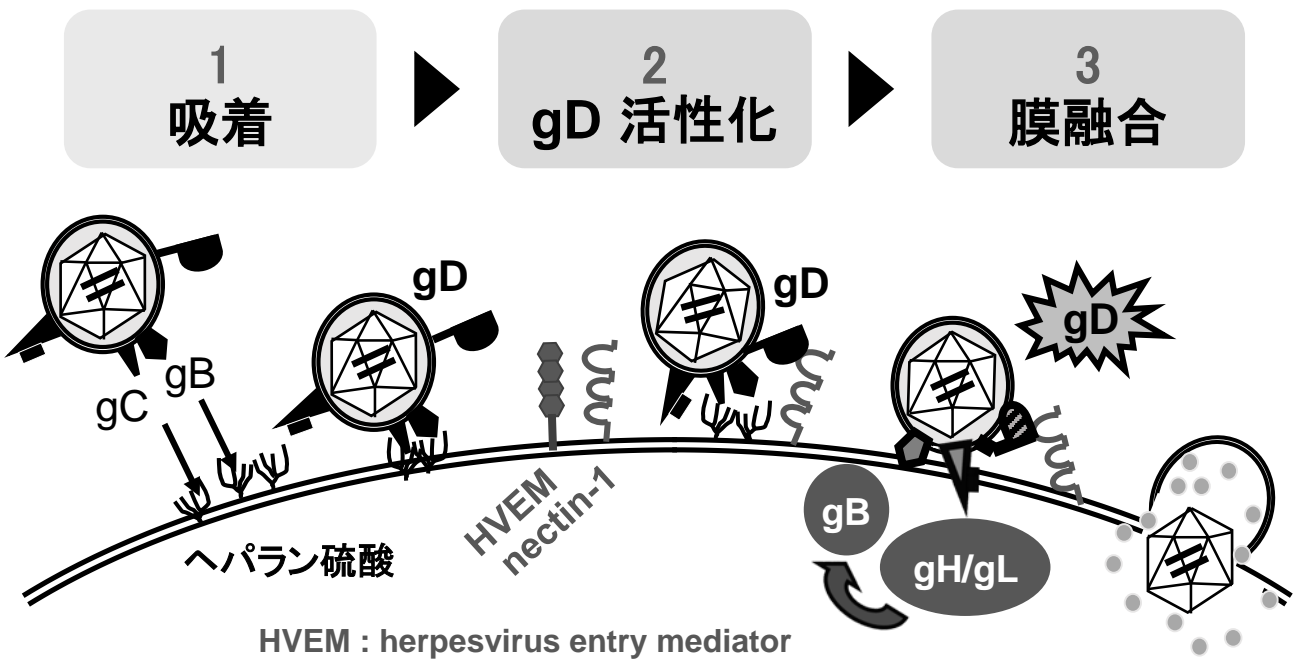


図4. HSV-1の細胞内侵入機序

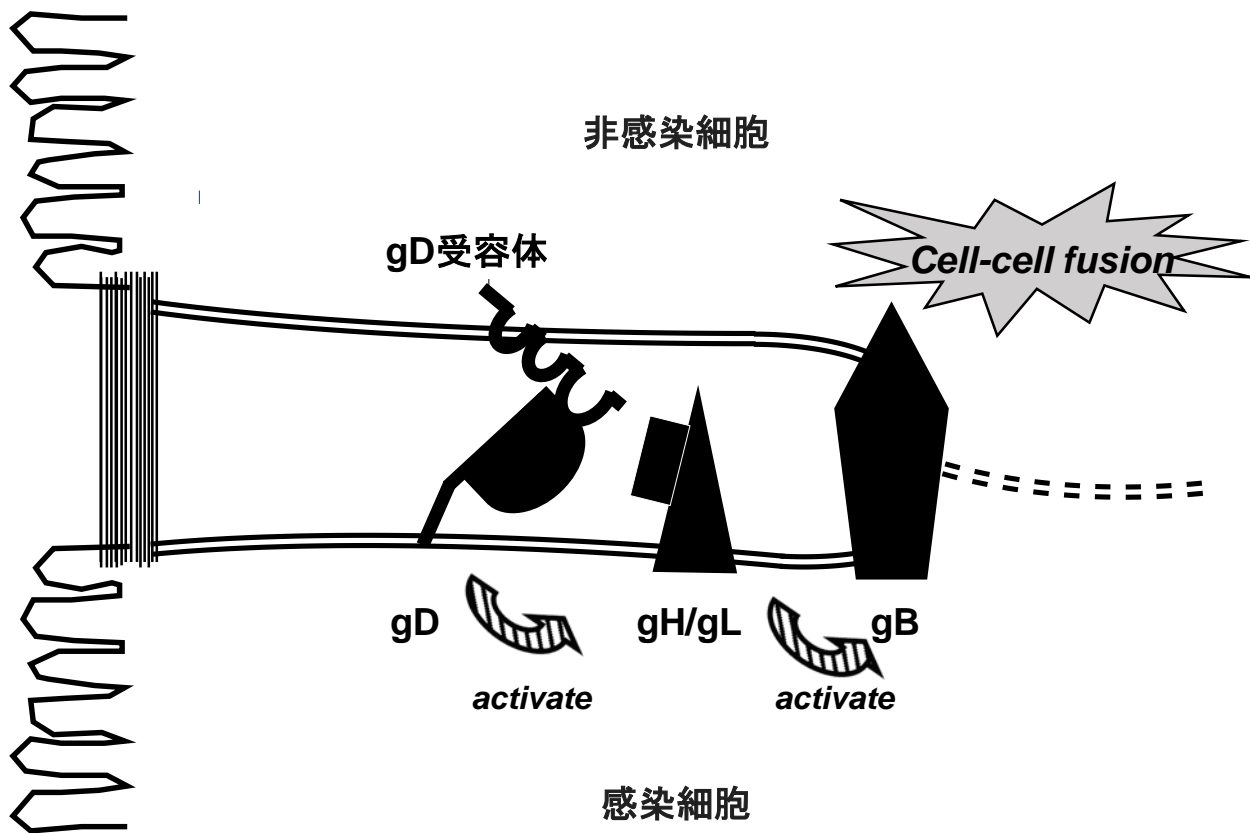


図 5. HSV感染細胞と非感染細胞の細胞間融合

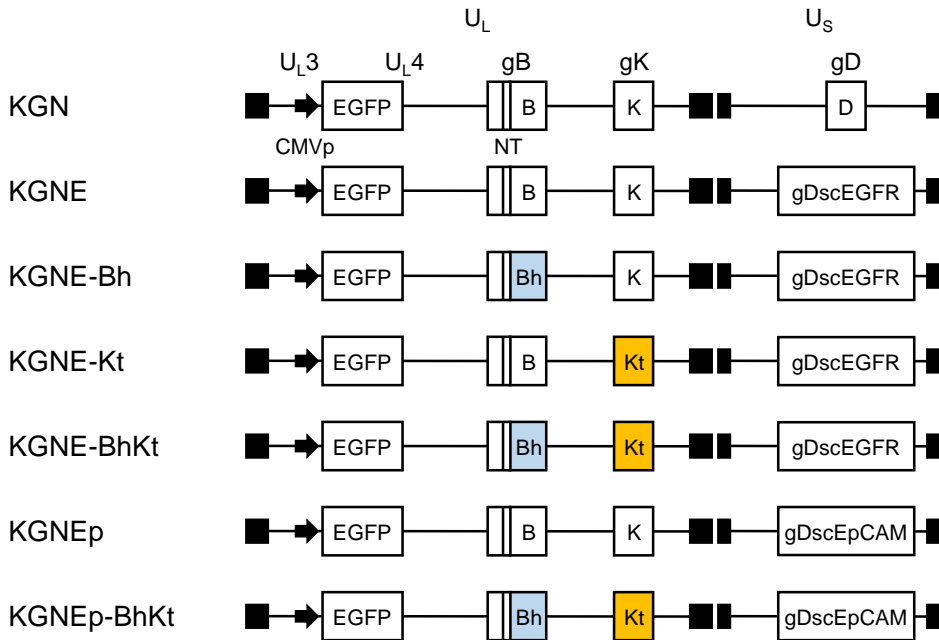


図6. 組換えHSVのゲノム構造

本研究で使用した組換えHSVのゲノム構造を図示した。UL, unique long segment; US, unique short segment; CMVp, ヒトサイトメガロウイルスの前初期遺伝子プロモーター; gDscEGFR, 抗EGFR単鎖抗体融合gD; gDscEpCAM, 抗EpCAM単鎖抗体融合gD; NT, HSVの細胞内侵入を促進する変異gB:D285N/A549T; Bh, gB:R858H; Kt, gK:A40T; □倒置反復配列

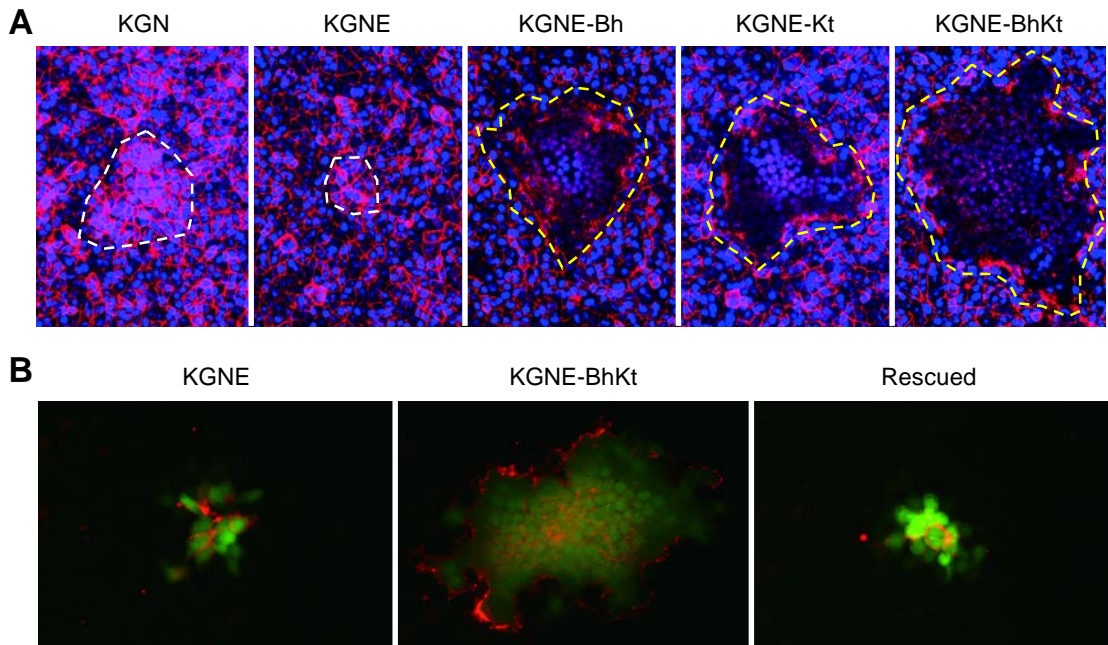


図 7. syncytial変異導入型EGFR標的化HSVのプラーク形態

(A) Vero細胞に各ウイルスを感染させ、24時間後に細胞膜をwheat germ agglutinin-Alexa Fluor 594 (赤)、核をHoechst 33342 (青)で染色した。点線はプラークの縁を示した(白: non-syncytial型、黄: syncytial型)。(B) Vero細胞に各ウイルスを感染させ、24時間後に、感染細胞に発現するgDを染色した。一次抗体には抗gD抗体(DL6)を用い、二次抗体にはCy3-conjugated sheep anti-mouse IgGを用いた。感染細胞はHSVのレポーター遺伝子であるEGFPを発現する(緑)。gDはCy3により赤色を呈する。KGN, gD野生型HSV; KGNE, EGFR標的化HSV; KGNE-Bh, gB:R858H変異を導入したEGFR標的化HSV; KGNE-Kt; gK:A40T変異を導入したEGFR標的化HSV; KGNE-BhKt, gBとgKの変異を組合せて導入したEGFR標的化HSV; Rescued, KGNE-BhKtのsyncytial変異を野生型の配列に置換した復帰変異体

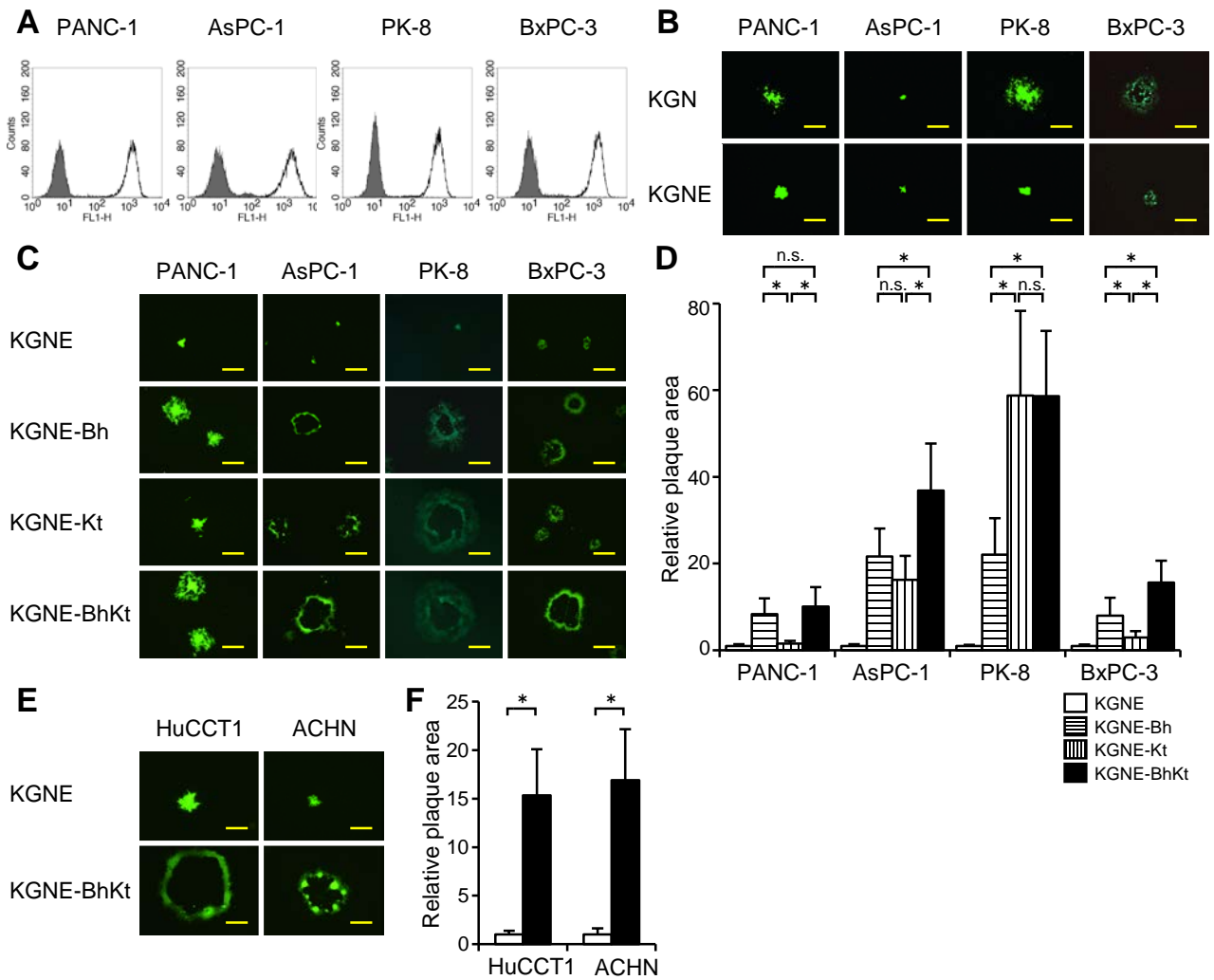


図 8. ヒトがん細胞株におけるsyncytial変異導入型EGFR標的化HSVのプラーク形態
 (A) ヒト膵がん細胞株におけるEGFRの発現をフローサイトメトリー解析で評価した。灰色のヒストグラム, 一次抗体にisotype-matched negative control抗体を用いた。白色のヒストグラム, 一次抗体に抗EGFR抗体528を用いた。(B, C, E) 各ヒトがん細胞株にHSVを感染させた2時間後メチルセルロース含有培地を加えた。EGFPのシグナルは感染から3日後に観察した。スケールバーは (B) 500 μ m (C) 500 μ m (E) 1mmを示した。(D, F) (C, E) の各ウイルスについて15個のプラークサイズを測定し平均値をグラフ化した。KGNEの平均プラークサイズで標準化した。エラーバーは標準偏差を示した。Steel-Dwass検定 (D) ; Welchのt検定 (F) 。*, $p < 0.05$; n.s., 有意差なし

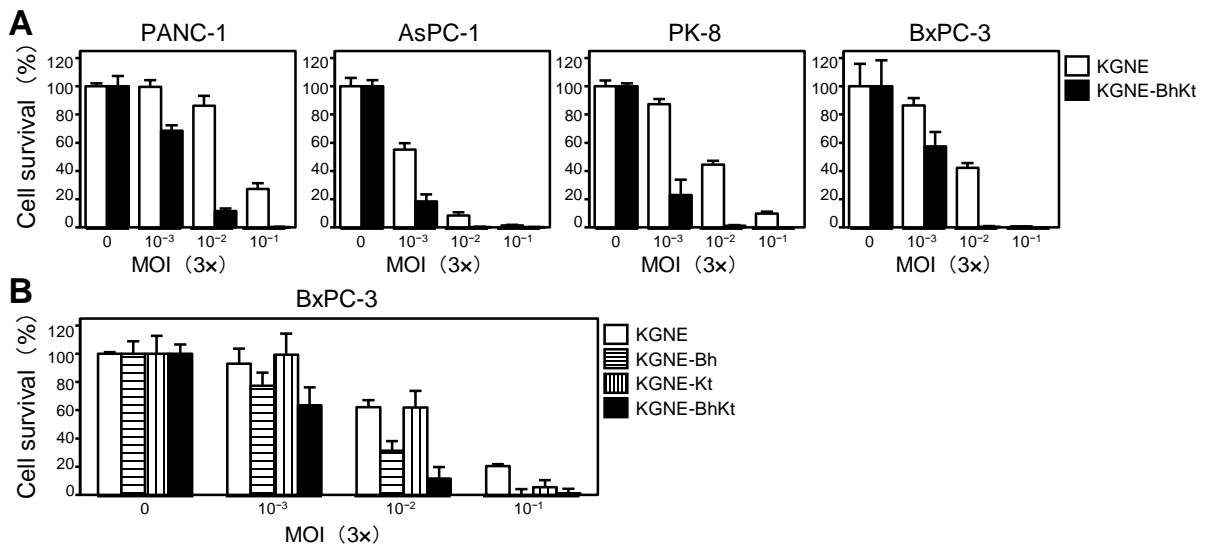


図9. ヒト膵がん細胞株におけるsyncytial変異導入型EGFR標的化HSVの細胞傷害活性

(A, B) ヒト膵がん細胞株に各ウイルスを多重感染度 (multiplicity of Infection, MOI) 0.003-0.3で感染させた。感染から96時間後にMTTアッセイを行い、細胞の生存率 (%) を評価した。6ウェルの平均値をグラフ化した。エラーバーは標準偏差を示した。

	LD ₅₀ (pfu/cell)	
	KGNE	KGNE-BhKt
PANC-1	1.1×10 ⁻¹	5.7×10 ⁻³
AsPC-1	3.6×10 ⁻³	1.4×10 ⁻³
PK-8	2.4×10 ⁻²	1.3×10 ⁻³
BxPC-3	2.2×10 ⁻²	3.4×10 ⁻³

表 4. 各膵がん細胞株におけるKGNEとKGNE-BhKtの細胞傷害活性の比較 (LD₅₀)

LD ₅₀ (pfu/cell)			
KGNE	KGNE-Bh	KGNE-Kt	KGNE-BhKt
5.3×10 ⁻²	1.3×10 ⁻²	3.9×10 ⁻²	4.9×10 ⁻³

表 5. BxPC-3における各HSVの細胞傷害活性の比較 (LD₅₀)

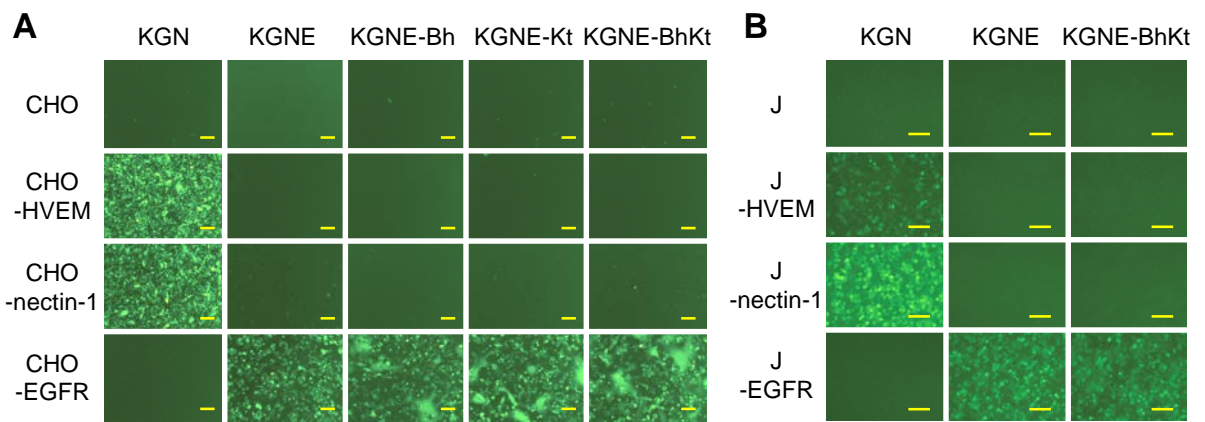


図 1 0 . syncytial変異導入型EGFR標的化HSVの細胞内侵入特異性

各細胞株に各ウイルスをMOI 3で感染させて (A) 12時間後、 (B) 8時間後のEGFPの発現を観察した。スケールバーは125 μ mを示した。

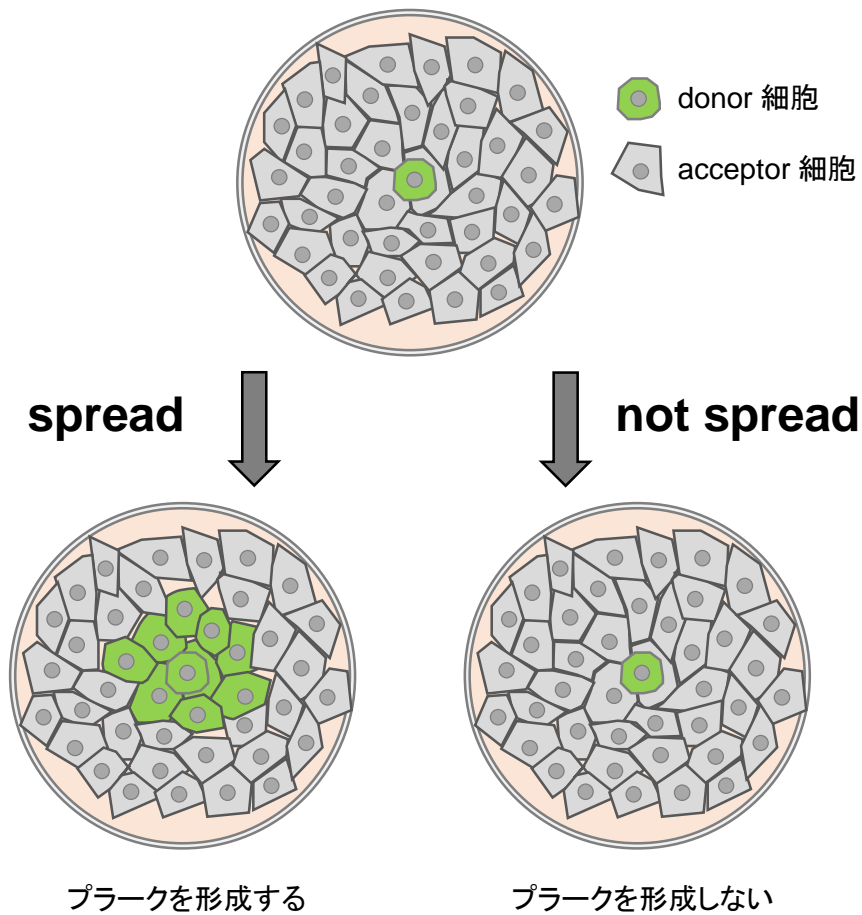


図 1 1. 細胞間伝播特異性の評価の方法 (infectious center assay)

donor細胞; KGNあるいはKGNE-BhKtを10 pfu/cellで感染させたCT26-EGFRを、acceptor細胞; CT26 (mock transduced) あるいはCT26-EGFRに重層した。acceptor細胞におけるプラーク形成の有無を評価した。

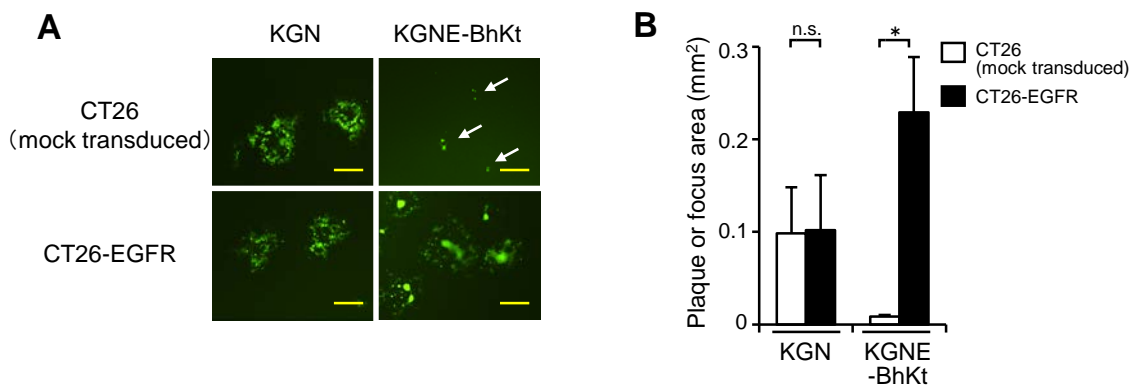


図 1 2. KGNE-BhKtの細胞間伝播の特異性

(A) CT26-EGFRにKGN, KGNE-BhKtをMOI 10で感染させた。細胞外のウイルスを0.1 Mグリシンバッファー (pH 3.0) で不活化して同数の細胞 (donor細胞) を非感染細胞 (acceptor細胞) に重層した。メチルセルロース含有培地で培養した2日後にEGFPを検出した。スケールバーは500 μm を示した。矢印: 単細胞感染あるいは数個の感染細胞からなるプラークを示している。(B) 15個のプラークのサイズを測定し平均値をグラフ化した。エラーバーは標準偏差を示した。Welchのt検定。*, $p < 0.05$; n.s., 有意差なし

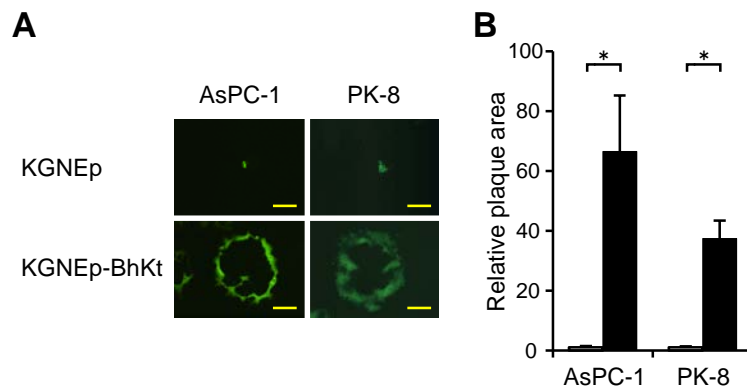


図13. ヒトがん細胞株におけるKGNEp-BhKtの細胞間伝播

(A) ヒト膵がん細胞株に各HSVを感染させ、2時間後にメチルセルロース含有培地を重層した。感染から3日後にEGFPの発現を検出した。スケールバーは500 μ mを示した。(B) 15個のプラークサイズを測定し平均値をグラフ化した。KGNEpの平均プラークサイズで標準化した。エラーバーは標準偏差を示した。白, KGNEp; 黒, KGNEp-BhKt。Welchのt検定。*, $p < 0.05$

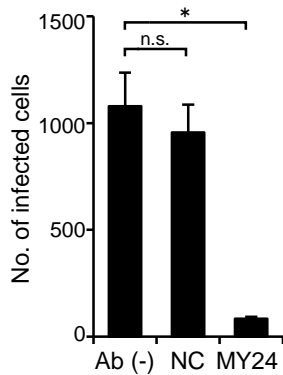


図 1 4. 抗EpCAM抗体によるKGNEp-BhKtの細胞内侵入阻害

AsPC-1に抗EpCAM抗体あるいはisotype-matched negative control抗体（いずれも100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を結合させて室温で1時間処理し、KGNEp-BhKtをMOI 0.01で感染させた。2時間後に細胞外のウイルスを酸性処理により不活化した。感染から12時間後にEGFPの発現を検出し3ウェルの平均値をグラフ化した。エラーバーは標準偏差を示した。Ab (-), 抗体なし; NC, isotype-matched negative control抗体 (MG1-45); MY24, 抗EpCAM抗体。Welchのt検定。*, $p < 0.05$; n.s., 有意差なし

謝辞

本研究を遂行し論文をまとめるにあたり多くの皆様のご指導・ご支援を頂きました。謹んで御礼申し上げます。

田原秀晃先生、内田宏昭先生（東京大学医科学研究所先端医療研究センター臓器細胞工学分野）には科学的思考・実験技術のみならず全面的にご指導・ご鞭撻頂きました。

多賀谷光男先生（東京薬科大学分子細胞生物学研究室）には論文作成のみならず研究の進め方についても暖かいご指導を頂きました。

濱田洋文先生、山口美樹先生（札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所分子医学部門）、Dr. Joseph C. Glorioso、Dr. Justus B. Cohen（University of Pittsburgh）、若田愛加さん（神戸大学大学院医学研究科臨床ウイルス学分野、2012年に本学修士課程卒業）には論文作成にあたりご指導・ご協力頂きました。

熊谷泉先生（東北大学大学院工学系研究科）、Dr. David Leib（Dartmouth Medical School）、Dr. Nikolaus Osterrieder（Free University of Berlin）、Dr. Patricia Spear（Northwestern University）、Dr. Stephen Russell（Mayo Clinic）、Dr. Gabriella Campadelli-Fiume（University of Bologna）、北村俊雄先生（東京大学医科学研究所先端医療研究センター細胞療法分野）、齋藤泉先生（東京大学医科学研究所遺伝子解析施設）にはマテリアルを供与して頂きました。

渡部徹郎先生（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科硬組織病態生化学分野）、深見希代子先生（東京薬科大学ゲノム病態医科学研究室）、浅野謙一先生（免疫制御学研究室）、福原武志先生（順天堂大学大学院医学研究科神経難病治療開発講座）、吉松康裕先生（東京医科歯科大学大学院分子細胞機能学分野）、東京大学医科学研究所先端医療研究センター臓器細胞工学分野の皆様、東京薬科大学分子細胞生物学研究室の皆様、そして本研究を進めるにあたりお力添えを頂いた全ての皆様に感謝致します。