

氏名（本籍）	大久保 優(徳島県)
学位の種類	博士(生命科学)
学位記番号	博 第96号
学位授与の日付	平成29年3月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	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
論文審査委員	(主査) 多賀谷 光男 教授 深見 希代子 教授 浅野 謙一 准教授 内田 宏昭 (外部審査委員)

論文内容の要旨

<背景・目的>

単純ヘルペスウイルス (HSV) は 152 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。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。

HSV の宿主細胞への侵入はエンベロープと細胞膜の融合により生じる。エンベロープ糖蛋白質 gD が herpesvirus entry mediator (HVEM)、nectin-1 あるいは 3-O-sulfated heparan sulfate と結合することにより gD の構造変化が生じ、gH/gL 複合体にシグナルが伝達される。そして gH/gL 複合体が gB を活性化して膜融合が成立する。細胞内で増殖した成熟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。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。

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プラークを形成する。一部の変異ウイルスでは多核巨細胞 (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。HSV の syncytium 形成は syncytial 変異によってもたらされ、syncytial 変異は gB、gK、UL20、UL24 のいずれかに局在する。I 型膜貫通蛋白質である gB の細胞外領域は、膜融合に促進的に働く一方で細胞内領域は膜融合に抑制的に働く。gB の syncytial 変異は全て細胞内領域に局在しており、膜融合抑制機構を弱める働きがあると考えられている。4 回膜貫通蛋白質である gK は細胞間伝播に必須であるが膜融合に対して抑制機能も有すると考えられている。gK の syncytial 変異の多くは細胞外領域に局在する。gB と gK の syncytial 変異はそれぞれ、エンベロープあるいは細胞膜の内側 (gB)、外側 (gK) に

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。HSV の syncytial 変異は膜融合の促進機能を有するが、gD と受容体の結合依存性を維持しているかどうかについては解明されていない。

また、HSV はヒトの主な病原体としてのみならず新規がん治療のツールとしての研究も進められてきた。内田らはがん関連抗原である上皮成長因子受容体 (EGFR)、がん胎児性抗原あるいは上皮細胞接着分子 (EpCAM) などの標的分子を介してのみ細胞内侵入・細胞間伝播する標的化 HSV を樹立した。

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。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るかどうか検討した。

<結果>

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

既知の syncytial 変異である gB:R858H と gK:A40T を EGFR 標的化 HSV (KGNE) に片方あるいは両方導入した KGNE-Bh、KGNE-Kt、KGNE-BhKt を作製し細胞間伝播様式を評価した。その結果、非標的化 HSV (KGN) と KGNE の細胞間伝播様式は non-syncytium 型である一方で、KGNE-Bh、KGNE-Kt、KGNE-BhKt は syncytium 型であった。以上の結果から gD 改変による標的化と syncytial 変異の導入による膜融合促進活性は互いの効果を阻害しないことが明らかとなった。

2. 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 変異などの膜融合促進変異は、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。この理由として syncytium 型の HSV は細胞間伝播を増強することにより細胞傷害活性を高めるということが挙げられる。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 受容体および EGFR を発現するヒト膵がん細胞株数種類に KGNE と KGN を感染させてプラークを形成させた。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みられた。

次に同じ細胞株を使用して KGNE、KGNE-Bh、KGNE-Kt、KGNE-BhKt の細胞間伝播能を評価した結果、KGNE は non-syncytium 型のプラーク、KGNE-Bh、KGNE-Kt、KGNE-BhKt は syncytium を形成した。またそれぞれのプラークの大きさを比較すると、いずれの細胞株においても syncytial 変異を有する HSV は KGNE よりも大きなプラークを形成したが、KGNE-Bh と KGNE-Kt は細胞株の種類によって細胞間伝播能の増強に効果の高い syncytial 変異が異なった。一方で KGNE-BhKt はそれぞれの細胞株において、KGNE-Bh あるいは KGNE-Kt のうち細胞間伝播の増強に効果の高い syncytial 変異を有する HSV と同程度、あるいは 4 種類の HSV の中で最も大きいプラークを形成した。また、KGNE-BhKt は膵がん以外のがん細胞株においても巨大な syncytium を形成した。

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するために、数種類の膀胱がん細胞株に KGNE と KGNE-BhKt を感染させ細胞傷害活性を比較した。その結果、全ての細胞株において KGNE-BhKt は KGNE よりも高い活性を示した。さらに KGNE、KGNE-Bh、KGNE-Kt、KGNE-BhKt の細胞間伝播能が有意に異なることがわかっている細胞株を用いて各 HSV の細胞傷害活性を比較した。その結果、細胞間伝播能と細胞傷害活性は相関する可能性が高いことが示唆された。

3. 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

gB、gK の syncytial 変異では膜融合に関与するメカニズムが異なると予想されるがいずれも促進的に働くことから、標的化 HSV の細胞内侵入・細胞間伝播における改変 gD とその受容体の結合依存性を喪失させる可能性が考えられた。そこで syncytial 変異を導入した EGFR 標的化 HSV の細胞内侵入・細胞間伝播における特異性をそれぞれ 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。gD 受容体を発現しない細胞株にヒト HVEM、ヒト nectin-1、ヒト EGFR をそれぞれ発現させ、KGN、KGNE、KGNE-Bh、KGNE-Kt、KGNE-BhKt を感染させた。そして、細胞内での EGFP の発現を指標に HSV の細胞内侵入を評価した。その結果、KGN は HVEM あるいは nectin-1 が発現する細胞株にのみ侵入し、EGFR 標的化 HSV は syncytial 変異の有無によらず EGFR が発現する細胞にのみ侵入した。以上の結果から、syncytial 変異の有無によらず標的化 HSV の gD と受容体との相互作用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できるかどうかを infectious center assay で評価した。HSV が感染できることが報告されているマウス大腸がん細胞株 CT26.WT に、ヒト EGFR を発現させた CT26-EGFR と CT26(mock transduced)を使用した。CT26-EGFR に KGN と KGNE-BhKt をそれぞれ感染させた後 (donor 細胞)、acceptor 細胞として播種しておいた CT26 (mock transduced)、CT26-EGFR に donor 細胞を同数ずつ重層して、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。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。KGNE-BhKt は CT26-EGFR では syncytium を形成するが CT26 (mock transduced) では単感染あるいは数個の感染細胞からなるプラークに留まった。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 変異を導入しても EGFR 標的化 HSV の細胞内侵入・細胞間伝播は EGFR の発現に依存することが示唆された。

4. syncytial 変異は EpCAM 標的化 HSV においても巨大な syncytium を形成した

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。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するために EpCAM を標的としたウイルス (KGNEp) に gB:R858H、gK:A40T の syncytial 変異を組合わせて導入した (KGNEp-BhKt)。そして EpCAM を発現する膀胱がん細胞株に KGNEp と KGNEp-BhKt を感染させ、細胞間伝播能を評価した。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。

次に KGNEp-BhKt の膜融合が EpCAM 特異的であ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、陰性コントロール群での 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。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。

<考察>

本研究の結果により、syncytial 変異を有する標的化 HSV の細胞内侵入・細胞間伝播は標的分子の発現に依存することが明らかとなった。また gB、gK の syncytial 変異は、変異の局在や膜融合に関する糖蛋白質の機能の違いから、異なるメカニズムで膜融合を促進すると予想される。本研究において、KGNE-Bh、KGNE-Kt の細胞間伝播能はヒト膵がん細胞株の種類により異なったことから、前述の通り各 syncytial 変異のメカニズムの違いが示唆された。

近年、HSV は腫瘍溶解性ウイルスとして注目されている。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。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。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 の細胞間融合に着目した戦略をとっている。syncytial 変異は *in vitro* において HSV の細胞傷害活性を増強することが複数の論文で示されており、腫瘍溶解活性の増強においても有用性が高いと考えられる。本研究において KGNE-BhKt はヒトがん細胞株における細胞間伝播能および細胞傷害活性が高いという結果が得られた。今後は syncytial 変異を有する標的化 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検討してゆく必要がある。

【研究結果の掲載誌】

Okubo Y, Uchida H, Wakata A, Suzuki T, Shibata T, Ikeda H, Yamaguchi M, Cohen JB, Glorioso JC, Tagaya M, Hamada H, Tahara H. Syncytial Mutations Do Not Impair the Specificity of Entry and Spread of a Glycoprotein D Receptor-Retargeted Herpes Simplex Virus. 2016 *J Virol*. 90(24):11096-105.

審査結果の要旨

二本鎖 DNA ウイルスである単純ヘルペスウイルス (HSV) は、口唇ヘルペスや歯肉口内炎を引き起こすウイルスとしてよく知られているが、近年、がん治療のツールとして注目を集めており、既に 2015 年には医薬品として承認を受けたものもある。ウイルスをがん細胞に特異性に感染させるために、細胞表面タンパク質 (受容体) を利用する「細胞内侵入標的化」などの工夫が行われその有効性が示されているが、問題点として、対象とするがん細胞によっては細胞傷害活性の低下が生じることがあげられる。この問題を克服するために、大久保さんは syncytial 変異を導入したウイルスを用いることを考案した。syncytium とは、細胞が融合して多核細胞となった状態を指し、HSV の場合は、ウイルスの特定のエンベロープタンパク質に変異が導入されると、感染した細胞が融合し、細胞傷害活性が亢進する。

本研究において、大久保さんは、単鎖抗体を導入して細胞内侵入標的化を行ったウイルスを基にし、2 つのウイルス糖タンパク質 (gB と gK) のそれぞれあるいは両方に変異を導入して syncytium 型に変換させた。そして、変異を導入した標的化ウイルスの細胞内への侵入と細胞間伝播機構を解析した。その結果、野生型 (非標的化) ウイルスと同様に、標的化したウイルスもヒトがん細胞株において syncytium を形成し、高い細胞傷害活性を示すことが明らかとなった。また、細胞内への侵入および細胞間伝播は標的タンパク質 (細胞表面受容体) に依存しており、syncytium 形成によって非標的化細胞への感染は起こらないことが示された。これらの成果は、大久保さんが第一著者として既に Journal of Virology に発表されている。

以上の研究成果は、生命科学の研究として高い価値を有する。発表会での発表と質疑応答も適切であり、博士に相応しいものであった。従って本申請論文は博士 (生命科学) 学位論文に値すると判断する。