

ヘルペスの再発を防ぐ ワクチンを提供するために

福岡大学 アニマルセンター
准教授 田中聖一

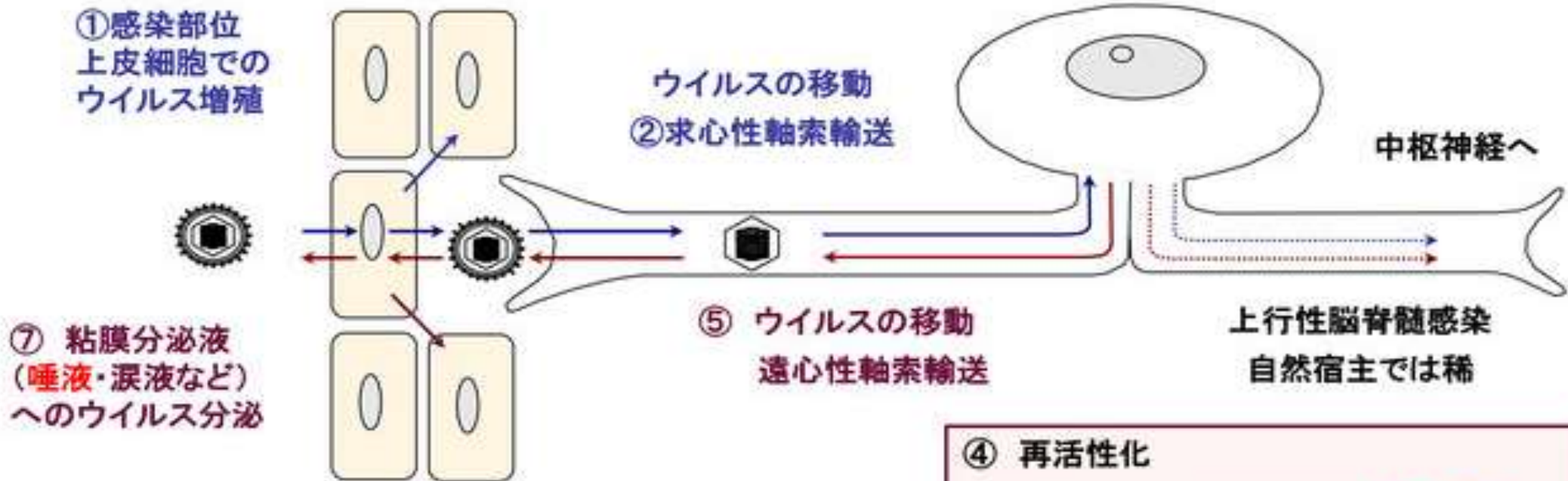
平成30年12月11日

ヘルペスウイルスの潜伏感染、再活性化

皮膚・粘膜上皮細胞
(口腔、眼結膜、泌尿生殖器)
(皮膚の創傷、咬傷部位)

③ 脊髄知覚神経節 (腰仙・胸椎神経節など)
三叉神経節

- ・ニューロンにおけるウイルスの**潜伏感染**
- ・ウイルスの複製はない



④ 再活性化

- ・神経節Neuronでのウイルス**再活性化**
- ・ウイルスの複製あり

↑
ストレス、免疫力の低下などの刺激!

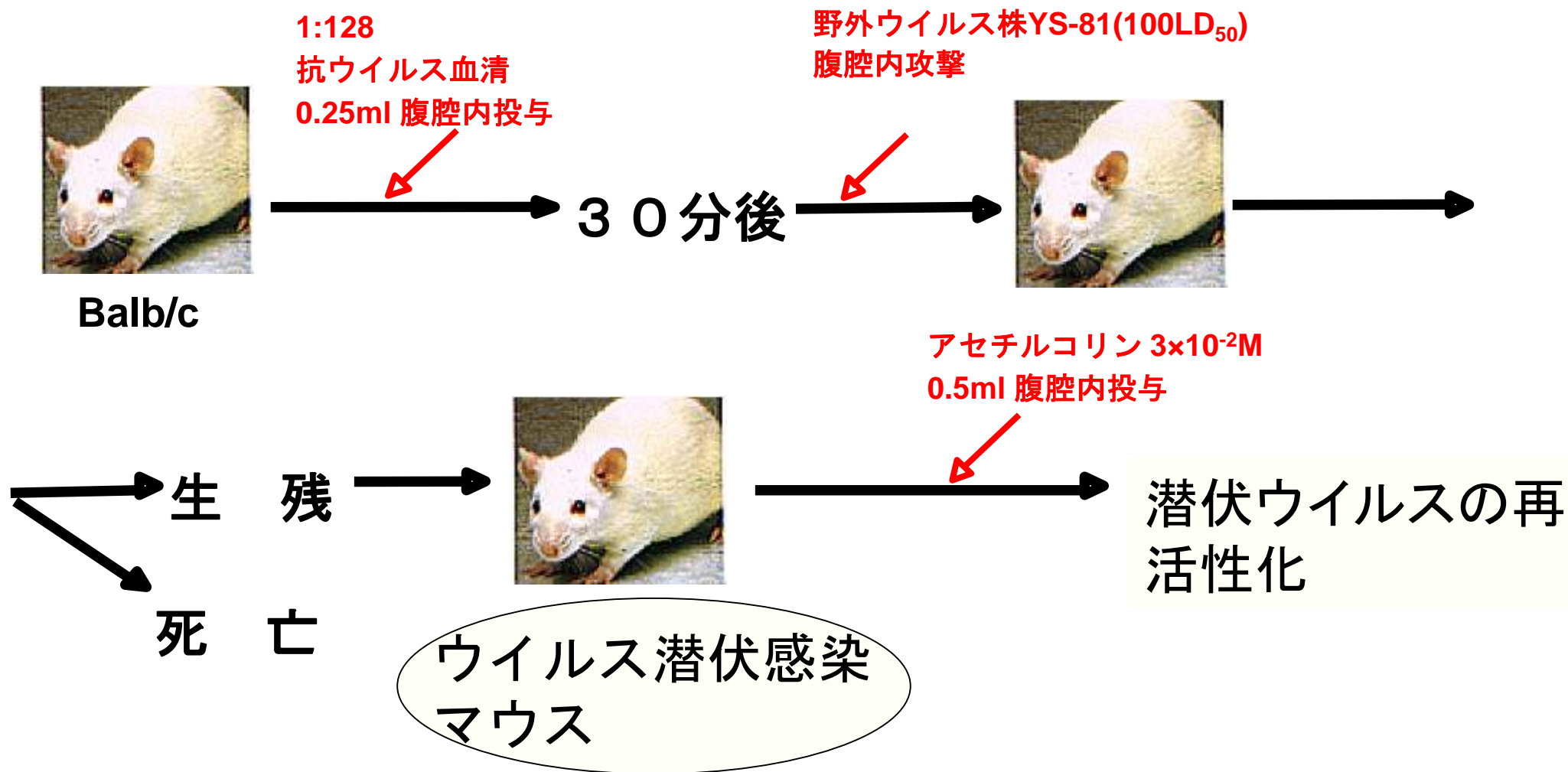
Crispr-Cas9システムを用いたUL41ノックアウトによる 潜伏感染 α ヘルペスウイルス再活性化の抑制

α ヘルペスウイルスの一種で豚を宿主とするオーエスキー病ウイルス (PRV) は、宿主域が広いのでマウスにも容易に感染させることができる。研究代表者はPRVマウス潜伏感染モデルを確立し、ヘルペスウイルスの潜伏感染と再活性化の機構の解明を目的として研究を続けている。

過去の研究において潜伏ウイルスが再活性化する際に最初にUL41を起動させること、siRNAを用いてUL41を抑制することによって潜伏ウイルスの再活性化が抑制されることも見出している。加えて、ゲノム編集ツールとして有名となったが元々は細菌の自然免疫機構であるCRISPR-Cas9システムによってUL41を抑制した場合も同様の効果を得られることを報告している(平成29年日本獣医学会、平成30年九州実験動物研究会発表)。

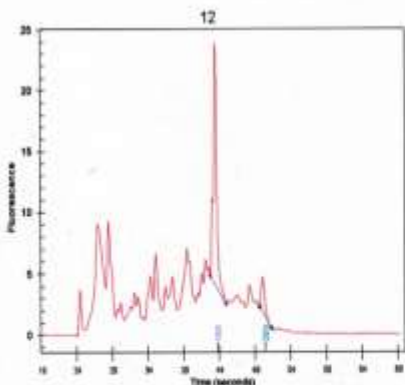
今回はこれらを発展させたCRISPR-Cas9導入PRVを作製してワクチンとして使用し、特に潜伏ウイルスの再活性化を抑制する方法を提案するものである。

オーエスキー病ウイルス潜伏感染マウス



ウイルス再活性化に先行して起こるRNA 崩壊

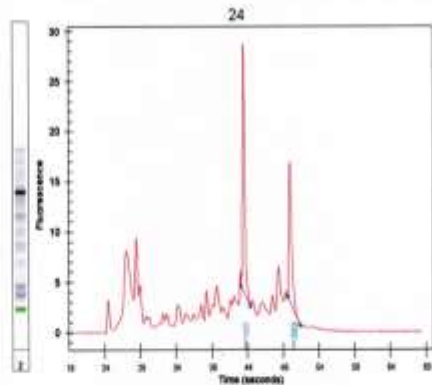
刺激後 1 2 時間



Corrected RNA Area: 272.85
RNA Concentration: 357.86 ng/ml
rRNA Ratio (28S / 18S): 0.13

#	Name	Start Time (s)	End Time (s)	Corr. Area	% of total Area
1	18S	42.75	44.90	25.24	9.28
2	28S	49.85	51.30	3.39	1.24

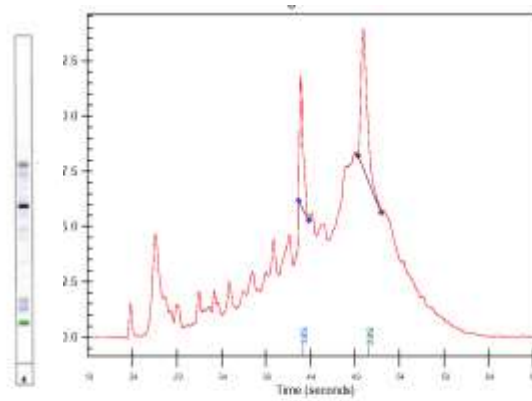
刺激後 2 4 時間



Corrected RNA Area: 218.82
RNA Concentration: 286.17 ng/ml
rRNA Ratio (28S / 18S): 0.85

#	Name	Start Time (s)	End Time (s)	Corr. Area	% of total Area
1	18S	43.10	44.40	21.33	9.76
2	28S	49.80	51.40	13.89	6.37

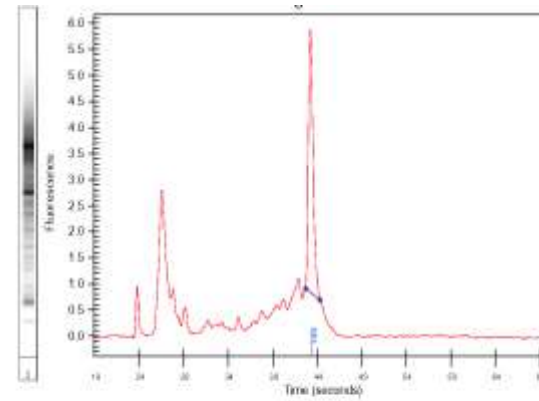
刺激後 3 時間



Corrected RNA Area: 275.73
RNA Concentration: 424.93 ng/ml
rRNA Ratio (28S / 18S): 1.43

Name	Start Time (s)	End Time (s)	Corr. Area	% of total Area
18S	42.70	43.85	7.18	2.60
28S	48.35	51.95	10.25	3.72

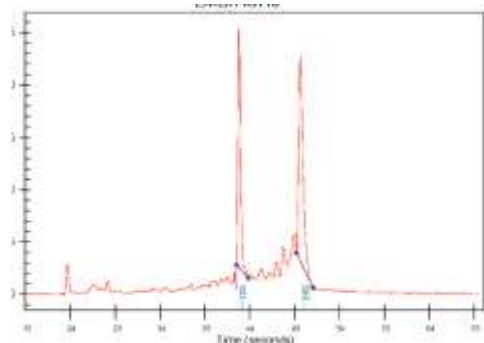
刺激後 6 時間



Corrected RNA Area: 40.27
RNA Concentration: 42.05 ng/ml
rRNA Ratio (28S / 18S): 0.00

#	Name	Start Time (s)	End Time (s)	Corr. Area	% of total Area
1	18S	42.70	44.30	7.20	17.87

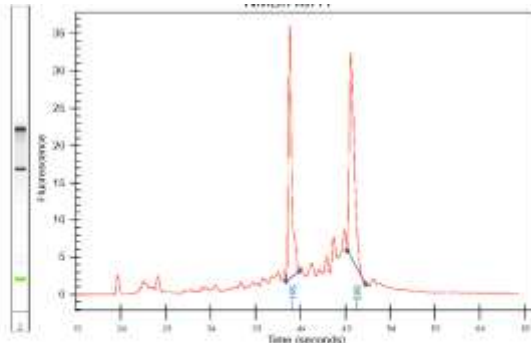
刺激前



Corrected RNA Area: 115.87
RNA Concentration: 208.98 ng/ml
rRNA Ratio (28S / 18S): 1.08

Name	Start Time (s)	End Time (s)	Corr. Area	% of total Area
18S	42.55	43.85	30.57	17.59
28S	48.20	51.05	22.10	19.09

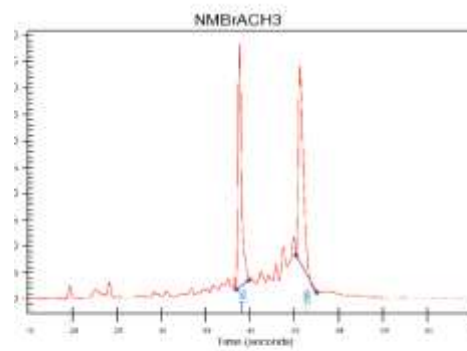
刺激後 1 時間



Corrected RNA Area: 198.04
RNA Concentration: 353.59 ng/ml
rRNA Ratio (28S / 18S): 1.00

#	Name	Start Time (s)	End Time (s)	Corr. Area	% of total Area
1	18S	43.43	45.95	35.53	17.94
2	28S	49.29	51.25	36.41	17.89

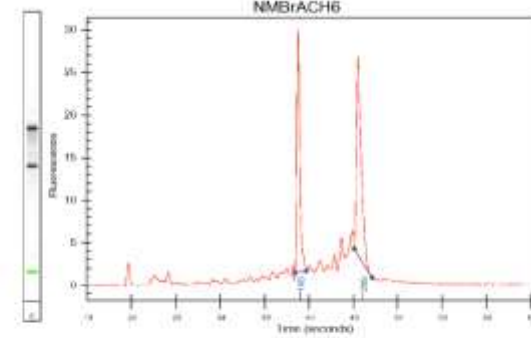
未感染マウス刺激後 3 時間



Corrected RNA Area: 245.80
RNA Concentration: 438.86 ng/ml
rRNA Ratio (28S / 18S): 1.00

Name	Start Time (s)	End Time (s)	Corr. Area	% of total Area
18S	42.45	43.00	47.39	19.28
28S	48.20	51.95	47.55	19.35

未感染マウス刺激後 6 時間



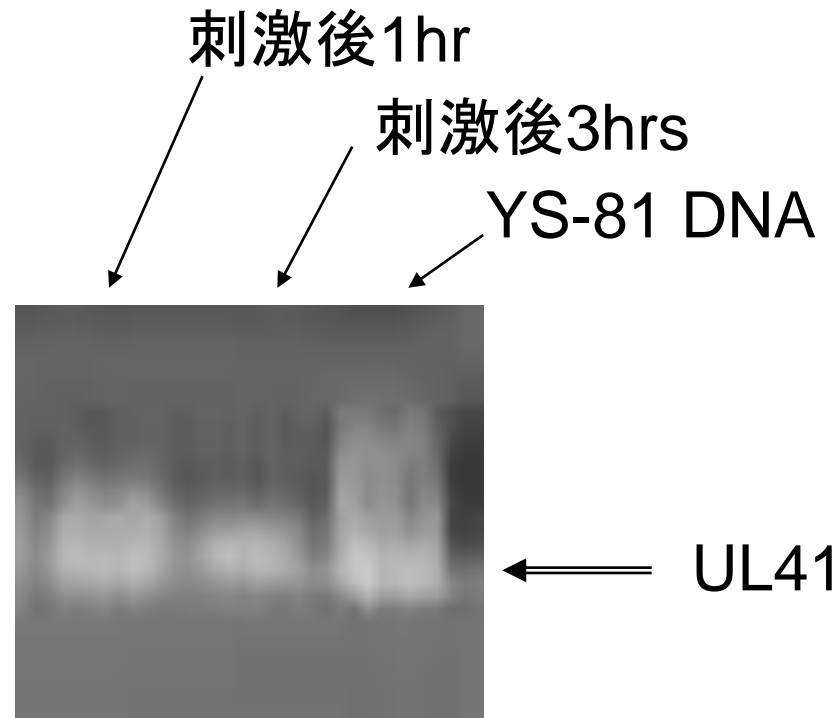
Corrected RNA Area: 133.01
RNA Concentration: 248.41 ng/ml
rRNA Ratio (28S / 18S): 1.08

#	Name	Start Time (s)	End Time (s)	Corr. Area	% of total Area
1	18S	42.45	43.70	27.75	20.11
2	28S	48.15	51.10	29.24	21.89

ヘルペスウイルスの持つRNA分解酵素活性

- UL41遺伝子産物 = Virion host shutoff protein
- 細胞内mRNA崩壊により宿主蛋白合成を阻害
- α ヘルペスウイルス内で広く保存

潜伏感染マウスの三叉神経節におけるUL41の転写



YS-81 UL41遺伝子のクローニング

YS-81 DNA



PCR



Vhs-F:5'-TGTGCGAGCGGAGACATGGGCT-3'
Vhs-R:5'-AGAGGGCGAGCATCACAC-3'



30 s at 94 °C



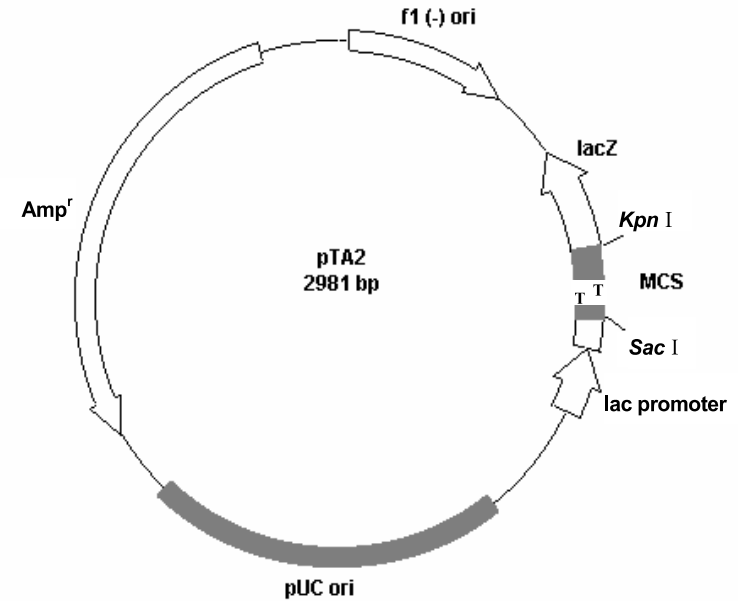
30 s at 55 °C



1 min at 72°C



45
cycles



SEQUENCING

他のヘルペスウイルスとの相同性

Strain	homology
Suid herpesvirus 1 strain BJ/YT genome	99
Suid herpesvirus 1 strain NIA3, complete genome	95
Suid herpesvirus 1 isolate SC, complete genome	95
Suid herpesvirus 1 strain Kaplan, complete genome	95
Suid herpesvirus 1 strain DUL34Pass, complete genome	95
Suid herpesvirus 1 strain DUL34gfp, complete genome	95
Suid herpesvirus 1 strain Kaplan, complete genome	95
Suid herpesvirus 1 strain Becker, complete genome	95
Suid herpesvirus 1 strain Kaplan, complete genome	95
Suid herpesvirus 1 strain Bartha, complete genome	95
Suid herpesvirus 1 (clone PRV VHS) HSV1 UL41 gene homologue	95
Suid herpesvirus 1 strain Kolchis, complete genome	94
Suid herpesvirus 1 strain Hercules, partial genome	94
TPA: Suid herpesvirus 1, complete genome	94
VHS=virion host shutoff gene [pseudorabies virus PRV, Genomic, 1458 nt]	94
Suid herpesvirus 1 strain ADV32751/Italy2014, complete genome	94
Suid herpesvirus 1 isolate HB1201, partial sequence	94
Suid herpesvirus 1 isolate DL14/08, complete genome	94
Suid herpesvirus 1 strain Fa, complete genome	94
Suid herpesvirus 1 strain HNX, complete genome	94
Suid herpesvirus 1 isolate HLJ8, complete genome	94
Suid herpesvirus 1 strain HN1201, complete genome	94
Suid herpesvirus 1 strain HNB, complete genome	94
Suid herpesvirus 1 strain JS-2012, complete genome	94
Suid herpesvirus 1 strain HeN1, complete genome	94
Suid herpesvirus 1 isolate ZJ01, complete genome	94
Suid herpesvirus 1 strain TJ, complete genome	94
Suid herpesvirus 1 strain Ea, complete genome	93
Suid herpesvirus 1 strain BJ/YT genome	93
Pseudorabies virus isolate Ea virion host shutoff protein (VHS) gene, complete cds	93

Strain	homology
Papiine herpesvirus 2 strain OU4-2, complete genome	78
Papiine herpesvirus 2 strain OU4-8, complete genome	78
Papiine herpesvirus 2 strain A951, complete genome	78
Papiine herpesvirus 2 strain OU2-5, complete genome	74
Papiine herpesvirus 2 strain OU1-76, partial genome	74
Papiine herpesvirus 2 strain A189164, complete genome	74
Cercopithecine herpesvirus 16 UL41 gene for UL41, complete cds, isolate:OU2-5	74
Cercopithecine herpesvirus 16 UL41 gene for UL41, complete cds, isolate:A951	74
Cercopithecine herpesvirus 16 UL41 gene for UL41, complete cds, isolate:OU1-76	74
Cercopithecine herpesvirus 16 strain X313, complete genome	74

Strain	homology
Cercopithecine herpesvirus 1 strain E2490, complete genome	77
Cercopithecine herpesvirus 1 DNA, UL region, complete sequence	77
Macacine herpesvirus 1 isolate E90-136, complete genome	77

Strain	homology
Cercopithecine herpesvirus 2, complete genome	77
Saimiriine herpesvirus 1 strain MV 5-4, complete genome	75
Baboon herpesvirus 2 virion host shutoff protein (VHS) gene, complete cds	74

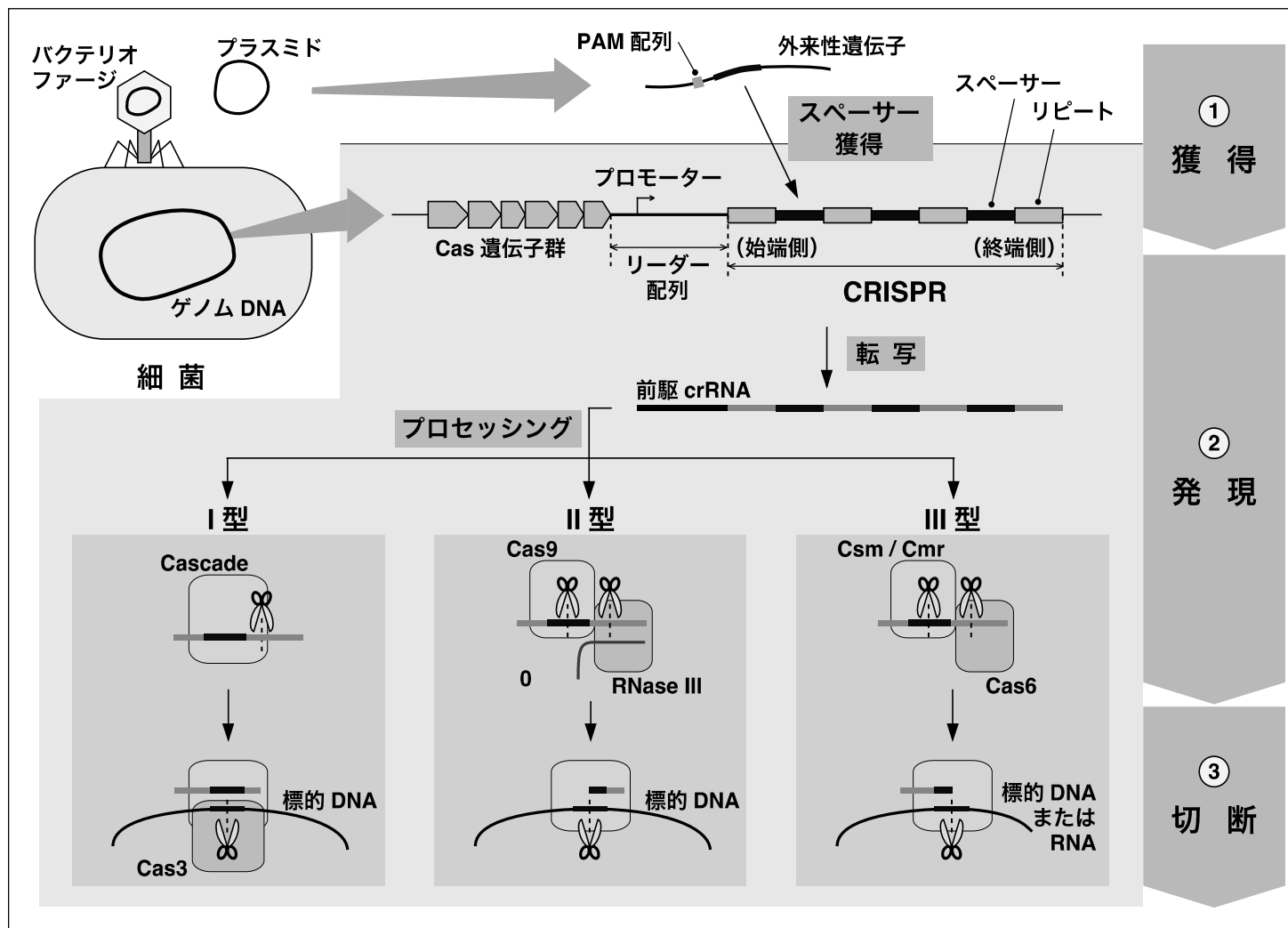
他のヘルペスウイルスとの相同性

Strain	homology
Equid herpesvirus 1 strain T-529, complete genome	72
Equid herpesvirus 1 strain 94-137, complete genome	72
Equid herpesvirus 1 strain T-616, complete genome	72
Equid herpesvirus 1 strain T616 delta71, complete genome	72
Equid herpesvirus 1 strain T953, complete genome	71
Equid herpesvirus 1 isolate 438-77, partial genome	71
Equid herpesvirus 1 isolate 970-90, partial genome	71
Equid herpesvirus 1 isolate 1074-94, partial genome	71
Equid herpesvirus 1 isolate 1966-02, partial genome	71
Equid herpesvirus 1 isolate 2019-02, partial genome	71
Equid herpesvirus 1 isolate 2222-03, partial genome	71
Equid herpesvirus 1 isolate 3038-07, partial genome	71
Equid herpesvirus 1 isolate 3045-07, partial genome	71
Equid herpesvirus 1 isolate NZA-77, partial genome	71
Equid herpesvirus 1 DNA, complete genome, strain: HH1	71
Equid herpesvirus 1 strain 89c25, complete genome	71
Equid herpesvirus 1 strain 01c1, complete genome	71
Equid herpesvirus 1 strain 89c105, complete genome	71
Equid herpesvirus 1 strain 00c19, complete genome	71
Equid herpesvirus 1 strain VA02, complete genome	71
Equid herpesvirus 1 strain OH03, complete genome	71
Equid herpesvirus 1 strain NY05, complete genome	71
Equid herpesvirus 1 strain NY03, complete genome	71
Equid herpesvirus 1 strain NMKT04, complete genome	71
Equid herpesvirus 1 strain FL06, complete genome	71
Equid herpesvirus 1 strain 90c16, complete genome	71
Equid herpesvirus 1 DNA complete genome, isolate:5586	71
Equid herpesvirus 1 strain V592, complete genome	71
Equid herpesvirus 1 strain Ab4, complete genome	71
Equid herpesvirus 1 isolate 717A-82, partial genome	71
Equid herpesvirus 1 isolate 1029-93, partial genome	71
Equid herpesvirus 3 strain AR/2007/C3A, complete genome	76
Equid herpesvirus 9 DNA, complete genome, strain: P19	70

Strain	homology
Bovine herpesvirus type 1.2 strain SP1777, complete genome	77
Bovine herpesvirus type 1.2 strain B589, complete genome	77
Bovine herpesvirus type 1.2 strain SM023, complete genome	77
Bovine herpesvirus type 1.2 strain K22, complete genome	77
Bovine herpesvirus 1 strain Cooper, complete genome	76
Bovine herpesvirus type 1.1 isolate NVSL challenge 97-11, complete genome	76
Bovine herpesvirus type 1.1 complete genome	76
Bovine herpesvirus type 1 31-kb DNA (left genome end)	76
Bovine herpesvirus 2 virion host shutoff protein gene, complete cds	79
Bovine herpesvirus 5 strain SV507/99, complete genome	80

Strain	homology
Human herpesvirus 2 isolate G, partial 105 genome	70
Human herpesvirus 2 isolate 4674, partial genome	70
Human herpesvirus 2 isolate B ³ x2.5, partial genome	70
Human herpesvirus 2 isolate B ³ x2.2, partial genome	70
Human herpesvirus 2 strain CtSF, partial genome	70
Human herpesvirus 2 strain COH 3818, partial genome	70
Human herpesvirus 2 strain 1192, partial genome	70
Human herpesvirus 2 strain GSC-56, partial genome	70
Human herpesvirus 2 strain CtSF-R, partial genome	70
Human herpesvirus 2 strain 333, partial genome	70
Human herpesvirus 2 strain SD90e, complete genome	70
Human herpesvirus 2 strain HG52, complete genome	70

CRISPRの構造と獲得免疫機構



CRISPR-Cas9によるUL41の抑制はヘルペスウイルスの再活性化を阻止する

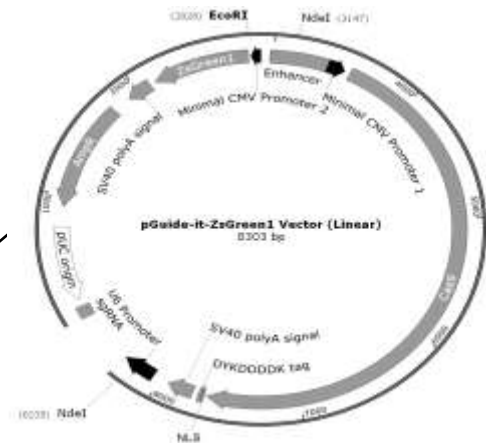


ウイルス潜伏感染マウス

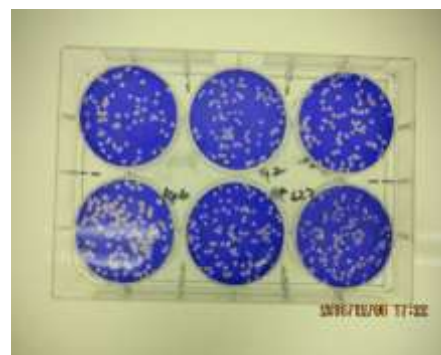
pGuide-it™ CRISPR/Cas9 YS-vhs

pGuide-it-ZsGreen1 Vector (Linear)

Catalog No(s):
632603 (Not sold separately)
Sold as a part of 632601



* プラークアッセイに対する効果



	YS-vhs	対照
	80	146
	92	114
	102	127
平均	91.33	129
標準誤差	8.99	13.14
有意差		0.028



再活性化刺激

PCR法による再活性化ウイルスの検出

	ウイルス排泄			総計		χ ²
	1日目	2日目	3日目	陽性数	陰性数	
プラスミド投与群	0	0	0	0	15	0.0056
非投与群	3	0	2	5	7	
Mock	0	0	0	0	12	

UL41を欠損させるとウイルス増殖は抑制される！

FULL PAPER *Virology*

Role of the UL41 Protein of Pseudorabies Virus in Host Shutoff, Pathogenesis and Induction of TNF- α Expression

Hui-Wen LIN¹⁾, Wei-Li HSU²⁾, Yuan-Yen CHANG^{3,4)}, Ming-Shiou JAN⁵⁾, Min-Liang WONG¹⁾ and Tien-Jye CHANG^{1)*}

¹⁾Department of Veterinary Medicine and ²⁾Graduate Institute of Microbiology and Public Health, College of Veterinary Medicine, National Chung-Hsing University, Taichung, ³⁾Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Chung Shan Medical University, Taichung, ⁴⁾Clinical Laboratory, Chung Shan Medical University Hospital, Taichung and ⁵⁾Institute of Immunology, School of Medicine, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan

(Received 9 February 2010/Accepted 10 April 2010/Published online in J-STAGE 24 April 2010)

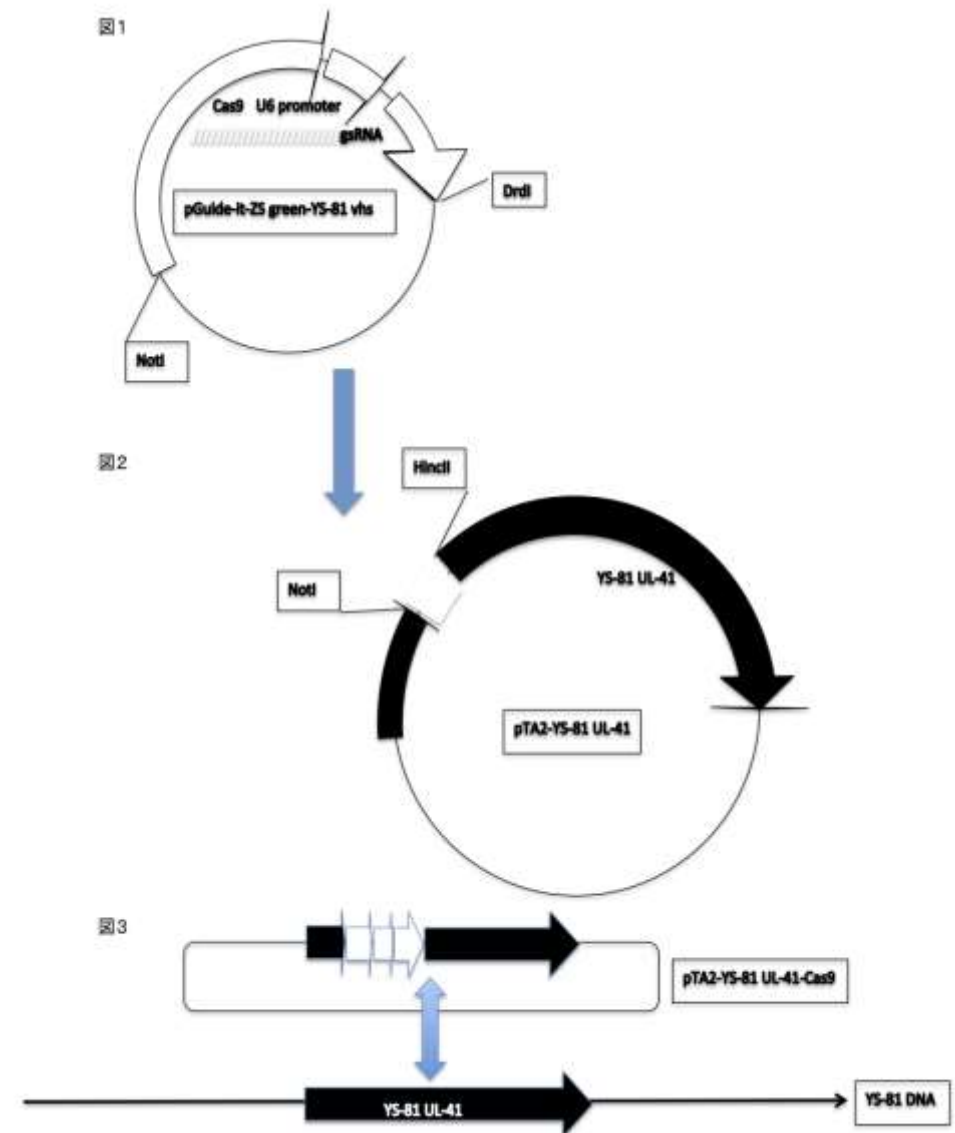
ABSTRACT. The vhs (virion host shutoff) is highly conserved in *alpha*herpesvirus, including pseudorabies virus (PRV). In an attempt to explore the function of vhs of PRV, we constructed and characterized a mutant virus (Δ 41). In the absence of vhs activity, Δ 41 mutant is highly attenuated in mice model and the lethality is correlated with the virus dissemination in neural tissues. As with herpes simplex virus type 1 (HSV-1), the prototype virus of *alpha*herpesvirus, the pronounced decrease in cellular protein synthesis triggered by wild type PRV was largely restored in cells infected with Δ 41 virus. Furthermore, tumor necrosis factor- α (TNF- α) protein expression was elevated significantly in spleen of mice infected with vhs mutant virus. Since TNF- α has been indicated to be an important cytokine in the innate immune response against various infections, our results implicate vhs may contribute to the protection against PRV lethality via the action of TNF- α . Overall, we confirm the shutoff function of vhs protein in PRV, and demonstrate the role that vhs protein plays in virulence, and regulation of cytokine production.

KEY WORDS: pseudorabies virus (PRV), tumor necrosis factor- α (TNF- α), UL41, virion host shutoff (vhs) protein.

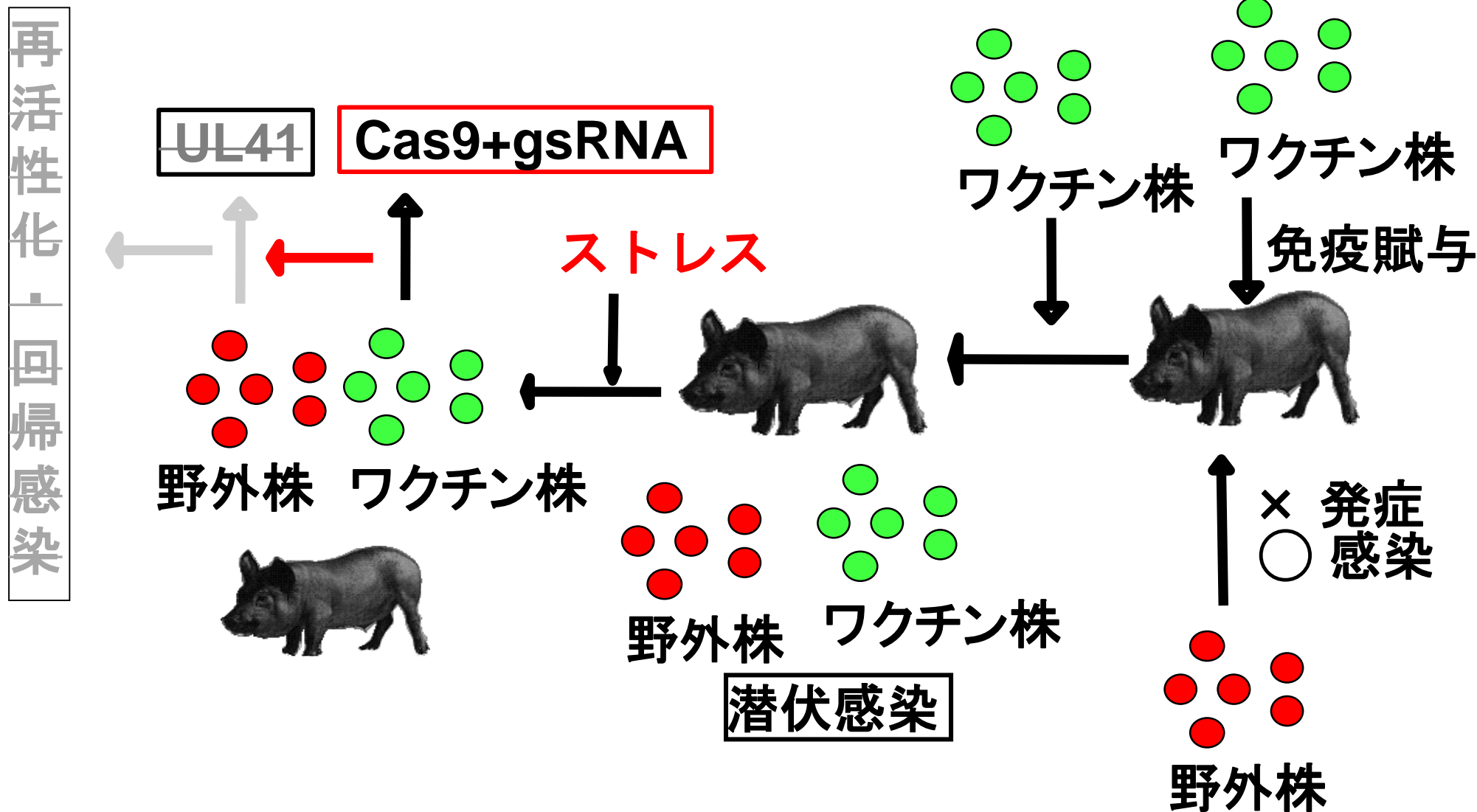
J. Vet. Med. Sci. 72(9): 1179–1187, 2010

Cas9-sgRNA導入ワクチン株の確立

- a. ブタヘルペスウイルス1型YS-81株UL-41に対するgsRNA配列を融合したpGuide-it-ZS green(pGuide-it-ZS green-YS-81 vhs)からCas9、U6プロモーター、gsRNA配列を切り出してUL-41の相補DNAをコードするプラスミドDNA:pTA2-YS-81 UL-41の NotI-HincII切断部位に挿入、大腸菌を用いて増幅する(図1、2)。
- b. 得られたプラスミドをブタ腎株化細胞にブタヘルペスウイルスDNAと共に遺伝子導入し相同組換えにより組換えウイルス粒子を作製する(図3)。
- c. 組換えウイルスをブタ腎株化細胞に接種することによってワクチン株を得る。



ワクチン株の効能: Cas9を持つワクチン株の潜伏により UL41を抑制して再活性化を阻止する



従来技術とその問題点

既に実用化されている抗ヘルペスワクチンには、
オーエスキー病や水痘に対する生ワクチン等が
あるが、

発症防御は可能であるが、

潜伏感染を防ぐことはできない

といった問題があり、再帰感染を防ぐまでには
至っていない。

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術の問題点であった、再帰感染予防能を改良することに成功した。
- 従来ワクチンは感染防御ができない点で発症防御の使用に限られていたが、潜伏ウイルスを再活性化させることなく抑え込むまで性能が向上できたため、再帰感染に対するワクチンとしても使用することが可能となる。
- 本技術の適用により、畜産の分野では新生豚の死亡や肥育豚の増体が改善できるため、生産コストの改善が期待される。

想定される用途

- 本技術の特徴を生かすためには、ワクチン株を潜伏感染させることで初感染も再帰感染も防御できるメリットが大きいと考えられる。
- また、達成された防御能に着目すると、サルBウイルスや単純ヘルペスといった現行のワクチンが存在しない疾患へ展開することも可能と思われる。
- 上記以外に、再帰発症により増悪すると考えられるアルツハイマー病に対する効果が得られることも期待される。

ヘルペスウイルス感染がアルツハイマー病を悪化！？

Exp. Anim. 67(2), 185–192, 2018

—Original—

Establishment of an Alzheimer's disease model with latent herpesvirus infection using PS2 and Tg2576 double transgenic mice

Seiichi TANAKA¹⁾ and Hiroshi NAGASHIMA²⁾

¹⁾Center for Experimental Animals, Fukuoka University, 7-45-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka 814-0180, Japan

²⁾Animal-care Co., Ltd., 5-18-14 Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0022, Japan

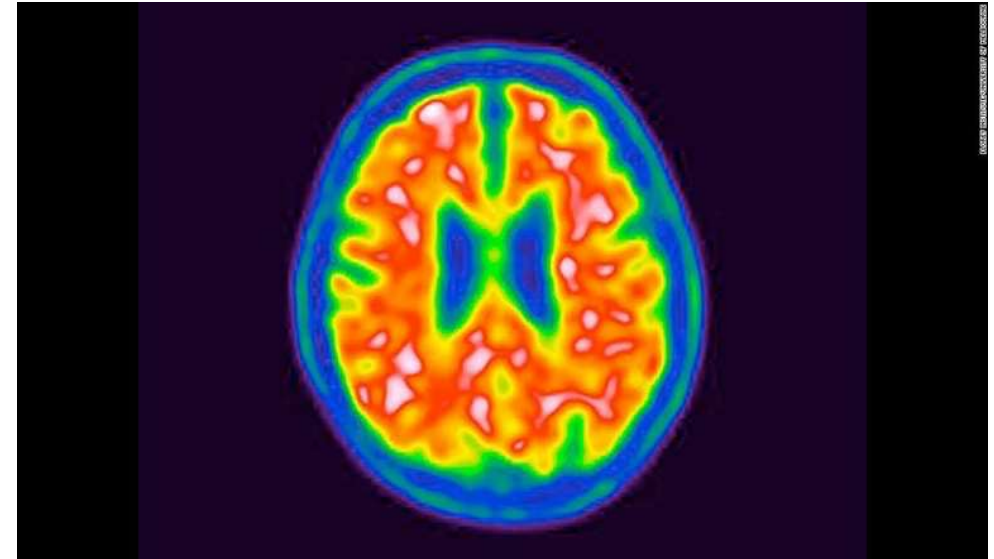
Abstract: A relationship between Alzheimer's disease and herpes simplex virus infection has been pointed out. We established a model of Alzheimer's disease with a latent herpesvirus infection using a mouse model of Alzheimer's disease (PS2Tg2576) and examined the changes in amyloid β ($A\beta$) in the brain. We crossbred female PS2 mice with male Tg2576 hemi mice and chose PS2Tg2576 mice. After priming 5-week-old male mice with anti-pseudorabies virus swine serum, we challenged the mouse with 100 LD₅₀ of YS-81, a wild-type strain of pseudorabies virus. The viral DNA was detected in nasal swabs by a reactivation test and in the trigeminal ganglia. At two months after infection, the $A\beta$ 40 and $A\beta$ 42 levels in the brains of the mice of the latently infected group were increased; the increase was greater than that observed in the noninfected group. Latent pseudorabies virus infection was established in PS2Tg2576 mice and the level of $A\beta$ increased with the reactivation of the latent virus.

Key words: Alzheimer's disease, herpesvirus, latent infection, pseudorabies virus

アルツハイマーにヘルペスが関係か、治療法の発見に期待

🕒 2018.06.25 Mon posted at 16:54 JST

「Neuron」6月21日オンライン版



アルツハイマー病の発症にヘルペスウイルスが関係している可能性があるという

(CNN) アルツハイマー病の発症にはヘルペスウイルスが関係している可能性があるという研究結果が、このほど科学誌に発表された。原因の究明や治療法の確立に向けた手がかりになることが期待されている。

実用化に向けた課題

- 現在、CRISPR-Cas9によってウイルス増殖と再活性化の抑制が可能なところまで確認済み。しかし、生ワクチン株構築の点が未解決である。
- 今後、生ワクチン株を構築して防御能評価について実験データを取得し、野外での利用に適用していく場合の条件設定を行っていく。
- 実用化に向けて、ワクチン株を潜伏感染させる条件を確立する必要あり。

企業への期待

- 未解決の生ワクチン株構築については、ストラテジーの構築は完了しているので程なく克服できると考えている。
- 可能であれば遺伝子組換え実験の大臣確認実験が可能な施設を持つ企業との共同研究を希望。
- また、海外における畜産ブタ、あるいは実験用サルに対するワクチン開発への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : a ヘルペスウイルス感染を
処置する方法及び医薬組成物
- 出願番号 : 特願2018-019505
- 出願人 : 福岡大学
- 発明者 : 田中 聖一

お問い合わせ先

福岡大学 研究推進部 産学官連携センター
担当コーディネーター 芳賀 慶一郎

TEL 092-871-6631 (ext.2809)

FAX 092-866-2308

E-mail sanchi@adm.fukuoka-u.ac.jp