

博士論文

論文題目 単純ヘルペスウイルス 1 型による
新規宿主免疫回避機構の解明

氏 名 小柳 直人

目次

要旨

1 緒言	6
2 序文	12
3 実験方法	17
4 結果	
I. UL13のPK活性は中枢神経系における感染細胞排除の阻害に寄与する	29
1. UL13 変異導入ウイルスの作製と性状解析	
2. マウス脳内接種モデルにおいて UL13PK 活性はウイルス増殖および病原性に影響しない	
3. マウス脳内接種モデルにおいて Us3 はウイルスの増殖および広がり的重要である	
4. マウス角膜接種モデルにおいて UL13PK 活性はウイルス増殖および病原性に寄与する	
5. マウス角膜接種モデルにおいて UL13PK 活性は神経侵襲性に寄与しない	
6. マウス角膜接種モデルにおいて UL13PK 活性は脳内の感染細胞排除の抑制に寄与する	
7. マウス角膜接種モデルにおいて Us3 は神経侵襲性に寄与する	
II. UL13 の PK 活性は脳感染部位での CXCL9 の発現を抑制し、CD8⁺ T 細胞の浸潤を阻害する	58
1. UL13PK 活性は CD8 ⁺ T 細胞によるウイルス感染細胞排除の抑制に寄与する	
2. UL13PK 活性は MHC class I を介した抗原提示に影響しない	
3. UL13PK 活性は脳感染部位への CD8 ⁺ T 細胞浸潤の阻害に寄与する	

4. UL13PK 活性は脳感染部位への HSV-1 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞浸潤の阻害に寄与する
5. UL13PK 活性は脳感染部位でのケモカイン CXCL9 発現の阻害に寄与する
6. UL13 による VHS のリン酸化は *in vitro* で VHS の RNase 活性に影響しない

III. 脳感染部位への CXCL9 の投与は脳感染部位への CD8⁺ T 細胞の浸潤を促進し、感染細胞排除に寄与する 79

1. 脳感染部位へのケモカイン CXCL9 の投与によりマウス致死性および脳でのウイルス増殖が低下する
2. 脳感染部位への CXCL9 の投与は脳感染部位への CD8⁺ T 細胞および HSV-1 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞の浸潤を促進する
3. HSV-1 角膜接種後マウスへの感染後期の acyclovir の投与ではマウス致死性は回復しない

5 考察 89

謝辞 103

参考文献 105

要旨

単純ヘルペスウイルス1型 (herpes simplex virus type 1 : HSV-1) がコードするプロテインキナーゼ (protein kinase : PK) であるUL13が*in vivo*において病原性発現に果たす役割についてほとんど解明されていない。本研究ではUL13のPK活性に焦点を当て解析をおこなった。

得られた結果は以下の通りである。(i) マウス脳内接種モデルにおいて、UL13のPK活性は神経病原性、脳内でのウイルス増殖およびHSV-1抗原の広がりには重要ではないことを明らかにした。(ii) マウス角膜接種モデルにおいて、UL13のPK活性は角膜での病態発現およびウイルス増殖に寄与することを明らかにした。(iii) マウス角膜接種モデルにおいて、UL13のPK活性は神経侵襲性、脳内でのウイルス増殖およびHSV-1抗原の広がりには重要ではないが、一度広がったHSV-1抗原排除の回避に寄与することを明らかにした。(iv) CD8⁺ T細胞をdepletionしたマウスにUL13PK活性消失株を角膜接種したところ、コントロールのマウスに比べて致死率の亢進、脳内ウイルス力価の増加、HSV-1抗原の増加が認められた。(v) FACS解析およびELISPOT assayによってCD8⁺ T細胞数およびHSV-1抗原特異的IFN- γ 産生細胞数を定量したところ、角膜接種7日後において、UL13PK活性消失株では脳に浸潤するCD8⁺ T細胞数およびHSV-1抗原特異的IFN- γ 産生細胞数はUL13復帰株に比べて有意な増加が認められた。(vi) 角膜接種7日後の脳感染部位において、UL13PK活性消失株では復帰株に比べてCD8⁺ T細胞の遊走に関するケモカインCXCL9の発現量の有意な増加が認められた。

次に、UL13によるこのCXCL9の発現抑制が、中枢神経系でのウイルス増殖や病原性発現に寄与していることを、より直接的に検証することを試みた。UL13復帰株を角膜接種し、マウスの脳内の主要感染部位にCXCL9を直接投与することでCD8⁺ T細胞の浸

潤が促進され、マウス致死率や脳内のウイルス増殖の低下が認められるか解析をおこなった。その結果、(vii) CXCL9を投与したマウスではコントロールのマウスに比べて致死率が有意に低下した。(viii) 角膜接種7日後において、CXCL9を投与したマウスではコントロールのマウスに比べて脳内ウイルス力価が有意に低下した。(ix) 角膜接種7日後において、CXCL9を投与したマウスではコントロールのマウスに比べて脳に浸潤するCD8⁺T細胞およびHSV-1抗原特異的IFN- γ 産生細胞の数が有意に増加した。

以上の結果から、HSV-1はUL13のPK活性依存的に脳感染部位でのCXCL9の発現を制御することで効率的なCD8⁺T細胞の脳感染部位への浸潤を阻害し、中枢神経系での効率的なウイルス増殖や病原性発現を達成していると考えられる。本研究はウイルスPKが感染部位へのCD8⁺T細胞の浸潤を阻害することによってCD8⁺T細胞からの攻撃を回避し、効率的なウイルス増殖や病態発現に寄与するという新規HSV-1免疫回避機構を明らかにした。

本研究では、HSV-1がコードする別のPKであるUs3についても新たな知見を得た。HSV-1 Us3はマウスの末梢および中枢神経系のいずれにおいても病原性発現に重要であることが知られている。しかし、Us3の神経侵襲性への役割は不明であった。本研究において、(i) マウス角膜接種モデルにおいて、Us3 復帰株は角膜接種(10^6 pfu) 3日後から脳でウイルスが検出され、角膜接種7日後で脳におけるウイルス力価はピークに達した。一方、Us3 欠損株はいずれの日においても、脳で感染性ウイルスは検出できなかった。(ii) マウス脳内接種モデルにおいて、Us3 欠損株接種1日後および3日後の脳内ウイルス力価は復帰株に比べて有意に低下したが、感染性ウイルスは検出された。

以上の結果より、HSV-1 Us3は脳におけるウイルス増殖に必須なのではなく、角膜から脳にウイルスが侵入する能力（神経侵襲性）に重要な役割を果たしていることが示唆された。

1 緒言

ヘルペスウイルス

ヘルペスウイルスは現在までに約 200 種類が同定されており、性状およびゲノム構造によって 3 つの亜科 (α , β , γ) に分類される (1)。ヒトでは単純ヘルペスウイルス 1 型 (herpes simplex virus type 1 : HSV-1)、単純ヘルペスウイルス 2 型 (herpes simplex virus type 2 : HSV-2)、水痘・帯状疱疹ウイルス (varicella-zoster virus : VZV)、EB ウイルス (Epstein-Barr virus : EBV)、ヒトサイトメガロウイルス (human cytomegalovirus : HCMV)、ヒトヘルペスウイルス-6 a (human herpesvirus-6a : HHV-6a)、ヒトヘルペスウイルス-6 b (human herpesvirus-6b : HHV-6b)、ヒトヘルペスウイルス-7 (human herpesvirus-7 : HHV-7)、カポジ肉腫関連ウイルス (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus : KSHV) の 9 種類が同定されている (1)。 α -ヘルペスウイルスには HSV-1、HSV-2 および VZV が、 β -ヘルペスウイルスには HCMV、HHV-6a、HHV-6b および HHV-7 が、 γ -ヘルペスウイルスには EBV および KSHV が含まれる (1)。いずれのウイルスも初感染後に体内に潜伏感染を成立させる。また、ストレスやエイズ、移植治療など宿主の免疫抑制状態で再活性化し、様々な病原性を示す (1)。

単純ヘルペスウイルス

単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus : HSV) は、ヒトに口唇ヘルペス、性器ヘルペス、ヘルペス性角膜炎、ヘルペス脳炎、新生児ヘルペスなどの多様な疾患を引き起こす (2)。HSV には二種類の型が存在する。HSV-1 は主に口唇等の上半身に初感染し、三叉神経節などに潜伏感染する。一方、HSV-2 は性器等の下半身に初感染し、脊髄後根神経節などに潜伏感染する。また、この区別は厳密なものではなく、性器ヘルペスの病

変からも HSV-1 は頻繁に分離される (3)。HSV 感染症の治療にはアシクロビルなどの抗ヘルペスウイルス剤が用いられ、治療効果をあげている。しかし、単純ヘルペス脳炎に関しては、その致死率は 10%に上る。また、生存者の約 70%は社会復帰が困難な重度の後遺症を残す(4)。一方、性器ヘルペスに関しては、米国において年間 1,000 万人以上が罹る (5)。この性器ヘルペスは年間数回の回帰発症を約 10 年間繰り返すことから、現在も根治が困難な疾患である。そのため、HSV 感染症の制御法として、他のウイルスと同様に最も効果的であると考えられるワクチンの開発が望まれるが、その開発は現在も困難を極めている。また、新規抗ウイルス剤の開発も常に求められている。

HSV 粒子は外側からエンベロープ、テグメント、ヌクレオカプシドにより構成される (図 1)。HSV のウイルスゲノムは約 150kbp の直鎖状の二本鎖 DNA であり、直径が 110~120nm の正二十面体のヌクレオカプシドの中に存在する (1)。HSV のウイルス DNA には少なくとも 84 種類のウイルスタンパク質がコードされている (1)。最も外側に位置するエンベロープは、宿主細胞由来の脂質二重層を基本構造としており、ウイルスがコードする糖タンパク質も 10 種類以上存在する。テグメントはエンベロープとヌクレオカプシドの間に介在するタンパク質層を示す。このテグメントを構成するウイルスタンパク質の中にはウイルス DNA の転写活性化因子や宿主の RNA を分解する RNA 分解酵素などが含まれている (1)。

単純ヘルペスウイルスの生活環

HSVは、ウイルスのエンベロープに存在する糖タンパク質gB、gCが細胞表面のヘパラン硫酸群を介して細胞表面に吸着し、糖タンパク質gB、gD、gH/gL が細胞表面に存在するそれぞれの細胞受容体と結合し細胞に侵入する。これまでにgBの細胞受容体としてはpaired immunoglobulin-like type 2 receptor α 、myelin-associated glycoprotein、

non-muscle myosin heavy chain IIA (6-8)、gDの細胞受容体としてはnectin-1、herpesvirus entry mediator、heparin sulfate 3-O-sulfated heparan sulfate (9-11) が報告されている。

ウイルスは細胞に侵入後、テグメントの構成因子であるウイルスタンパク質 virion host shutoff (VHS) および VP16 (別名 α -TIF) 等を細胞中に放出する。VHS には RNase 活性があり、宿主細胞の mRNA を分解することで宿主タンパク質の合成を阻害し、ウイルスタンパク質の効率的な合成を促進する。HSV のウイルスタンパク質はその発現時期によって α 、 β 、 γ の 3 群に大別され、各遺伝子発現はカスケード状に制御されている。最初に発現する α 遺伝子群のプロモーター領域には α -TIF response element が存在し、テグメントの構成因子として持ち込まれた α -TIF が宿主転写因子と複合体を形成して、6つの α 遺伝子の発現を活性化する。ICP47は transporter associated with antigen processing (TAP) と相互作用し、ウイルス由来のペプチド抗原の提示を阻害することで感染細胞を細胞性免疫の標的から回避する (12, 13)。その他の 5 つの α 遺伝子 (ICP0、ICP4、ICP22、ICP27、Us1.5) は遺伝子発現制御因子であり、 α 、 β 、 γ 遺伝子の発現を制御している。この発現制御メカニズムは転写、翻訳、mRNA プロセッシング、タンパク質分解といった多岐の段階にわたる。 α 遺伝子発現に伴い、 β 遺伝子の発現が活性化される。 β 遺伝子群は DNA ポリメラーゼ複合体、DNA プライマーゼ・ヘリカーゼ複合体などのウイルス DNA 複製に必要なタンパク質、さらにチミジンキナーゼ、リボヌクレオチド代謝酵素などをコードしており、これらの発現に伴いウイルス DNA の複製を開始する。 γ 遺伝子群はエンベロープ糖タンパク質、カプシドタンパク質、テグメントタンパク質というウイルス粒子を構成するタンパク質をコードする。ウイルス DNA はローリングサイクル機構によって複製し、中間体として巨大なコンカテマーが形成される。このコンカテマーはウイルスゲノムの大きさに開裂され、ウイルス DNA としてカプシドへパッケージングされる。これらの過程は Replication compartment と呼ばれる核内ドメインでおこなわれる。ヌクレオカプシド (ウイルス DNA をパッケージングしたカプシド) は核内

膜でエンベロープを獲得し、核外膜でそのエンベロープを脱ぐことによって細胞質に放出される。その後、ヌクレオカプシドは細胞質でテグメントタンパク質を獲得し、細胞質内の膜オルガネラ (Trans-Golgi Network : TGN) で最終エンベロープを獲得する。ウイルス粒子は最終的にエクソサイトーシスで細胞外に放出される (図 2) (1)。

単純ヘルペスウイルスの潜伏感染

HSV は皮膚や粘膜に感染し、末梢でのウイルス増殖後に知覚神経終末からアクソン内を上向き、三叉神経節または脊髄後根神経節に潜伏感染する。潜伏感染細胞ではウイルス DNA は環状化され、エピゾーム状に存在する。また、潜伏感染細胞では唯一、*latency associated transcript* と呼ばれる転写物の発現が認められており、感染性のウイルス粒子は産生されない。潜伏している HSV は、様々なストレスや免疫抑制状態で再活性化の刺激を受け、ウイルス粒子の産生を開始する。再活性化されたウイルスは末梢神経を下向き、局所で増殖し、回帰発症を引き起こす。HSV はこのように潜伏・再活性化を繰り返し、宿主に終生存在する (1)。

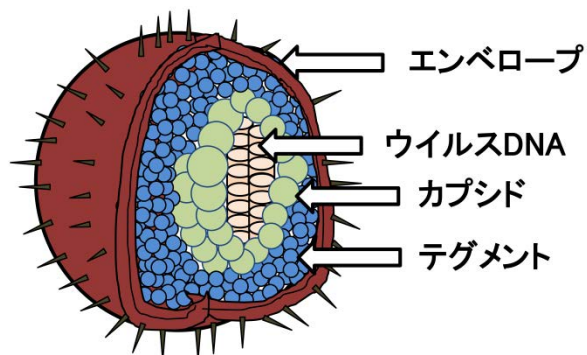


図 1. 単純ヘルペスウイルスの模式図

外側からエンベロープ、テグメント、ヌクレオカプシドにより構成される。ウイルスゲノムは約 150kbp の直鎖状の二本鎖 DNA であり、正二十面対のカプシドの中に存在する。テグメントはエンベロープとカプシドの間に介在するタンパク質層を示す。

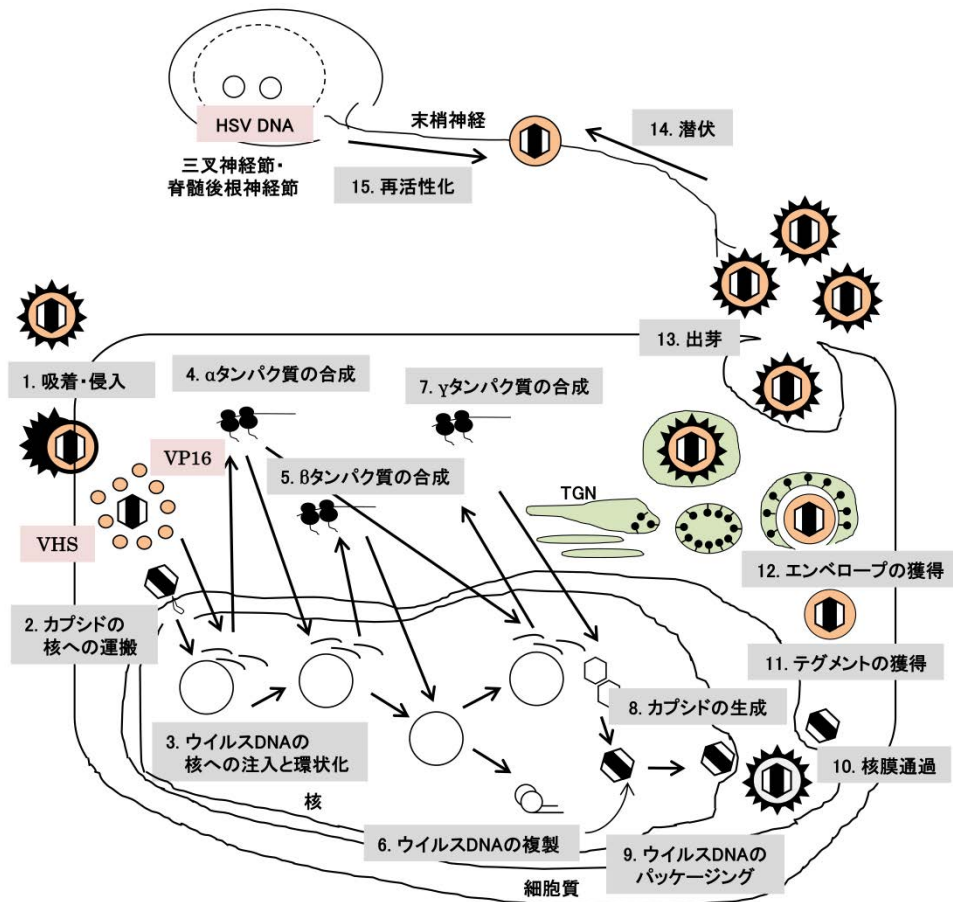


図 2. 単純ヘルペスウイルスの生活環

HSV は細胞に吸着・侵入し (1)、カプシドは核膜孔に運ばれる (2)。ウイルス DNA は核内に注入され、環状化される (3)。 α -TIF によって α 遺伝子群の転写が活性化され、 α タンパク質群が合成される (4)。 α タンパク質群によって β 遺伝子群の転写が活性化され、 β タンパク質群が合成される (5)。 β タンパク質群によりウイルス DNA の複製がおこなわれる (6)。 γ 遺伝子群が合成され (7)、カプシドが生成される (8)。カプシドにウイルス DNA がパッケージングされる (9)。ヌクレオカプシドは核膜通過後 (10)、テグメントタンパク質を獲得し (11)、TGN でエンベロープを獲得する (12)。ウイルス粒子はエクソサイトーシスで出芽する (13)。局所の HSV は三叉神経節または脊髄後根神経節に潜伏し (14)、様々な刺激により再活性化する (15)。

2 序文

HSV-1は少なくとも84個のウイルスタンパク質をコードしている (1)。その中にはウイルス特異的酵素であるUL13とUs3というprotein kinase (PK) が含まれている。PKによるタンパク質のリン酸化は標的タンパク質の活性を制御する上で最も一般的かつ効果的な修飾の一つである。実際、宿主のPKによる標的タンパク質のリン酸化は細胞周期制御、タンパク質分解、アポトーシス、転写および翻訳といった様々な細胞機能を制御することが報告されている (14, 15)。一方、ウイルスPKもウイルスタンパク質や宿主タンパク質をリン酸化し、効率的なウイルス増殖やそのための細胞内環境の改変に寄与していると考えられている。本研究では、UL13に焦点を当てた解析をおこない、一部、Us3にも焦点を当てた解析をおこなった。

UL13は全てのヒトヘルペスウイルス亜科に保存されているPKである (16)。UL13は培養細胞におけるウイルス増殖に必須ではないことがUL13欠損株を用いた解析により示されている(17, 18)。また、UL13欠損株は、Vero細胞やHEp-2細胞において野生型ウイルスと同様の増殖性を示すが、rabbit skin cells (RSC)、baby hamster kidney (BHK) 細胞や初代ヒト繊維芽細胞など特定の細胞において、野生型ウイルスと比べて増殖性の低下が認められる (17-20)。さらに、RSCやBHK細胞にUL13欠損株を感染させた場合、ウイルスの遺伝子発現制御因子のひとつであるICP0、およびいくつかの γ 遺伝子がコードするウイルスタンパク質 (UL26、UL26.5、UL38、UL41、Us11) の発現が減少する (1, 19, 21-23)。これらの結果から、UL13はHSV-1感染細胞においてウイルス遺伝子発現制御への関与が示唆される。

これまでにUL13欠損株や、UL13PKの活性中心に変異を導入し、UL13のPK活性を消失させた株を用いた解析が行われ、UL13はウイルスタンパク質であるICP22、Us1.5、gE/gI、ICP0、VP22および宿主タンパク質であるelongation factor 1 delta (EF-1 δ)、p60、

RNA polymerase IIのリン酸化修飾に寄与することが報告されている (17, 18, 24-30)。その中で興味深いことに、ICP22およびUs1.5の欠損株においてもICP0および γ 遺伝子群がコードするウイルスタンパク質の発現低下が認められる。つまり、UL13欠損株感染細胞によって得られる表現系はICP22/Us1.5欠損株感染細胞によって得られる表現系と同様である (1, 19, 21-23)。よって、UL13はICP22およびUs1.5をリン酸化することでこれらの遺伝子発現制御能に寄与している可能性が考えられるが、UL13によるICP22およびUs1.5のリン酸化とウイルスタンパク質発現制御との直接的な関連は不明のままである。

UL13は全てのヘルペスウイルス亜科に保存されていることからconserved herpesvirus protein kinases (CHPKs) と呼ばれる (16)。CHPKsは全てのヘルペスウイルスで保存されていることから、共通の宿主タンパク質やヘルペスウイルスで保存されたウイルスタンパク質をリン酸化することによって効率的なウイルス増殖や細胞内環境改変に寄与する可能性があると考えられる。これまでに報告されているCHPKsに共通の基質はEF-1 δ だけである (26, 31, 32)。このCHPKsによるEF-1 δ のリン酸化の生物学的な意義は不明なままであるが、このリン酸化部位は宿主のPKであるcdc2によるEF-1 δ のリン酸化部位と同一であることから、CHPKsは潜在的に宿主のPKであるcdc2を模倣する機能を有していることが示唆された (16, 27)。この可能性を支持するように、UL13は*in vitro*において、cdc2によってリン酸化されるcasein kinase II β subunitのリン酸化部位と同じ部位をリン酸化すること (27)、EBVのCHPKであるBGLF4およびcdc2が、EBVがコードするウイルスタンパク質であるEBNA-LPおよびEBNA-2の同じ部位をリン酸化すること (33-35) が報告されている。

UL13はテグメントに含まれることから、ウイルス粒子構成因子である (36, 37)。よって、UL13はウイルス粒子の構造維持等にも関与している可能性が考えられる。また、ウイルス粒子が細胞に感染するとテグメントタンパク質は細胞質中に放出されることから、UL13は感染初期の段階でウイルスタンパク質や宿主タンパク質をリン酸化する

ことで何らかの機能を果たしている可能性も考えられる。この可能性を支持するように、UL13はあらかじめテグメントタンパク質をリン酸化することにより、HSV-1感染時にテグメントタンパク質の細胞質への放出促進に寄与することが示唆されている (38)。さらに、UL13のリン酸化酵素としての機能とテグメント構成因子としての機能との関連は不明であるが、UL13欠損株およびUL13PK活性消失株感染細胞を用いた解析の結果、UL13にはPK活性依存的な機能と非依存的な機能が存在することが明らかになった (39)。UL13欠損株を感染させたRSCでは野生型株に比べて、VHSやICP0の発現量が減少する。一方、UL13PK活性消失株ではこれらのウイルスタンパク質の発現量低下は認められない。このように、UL13はリン酸化酵素としての機能と、UL13タンパク質自体が遺伝子発現制御因子としての機能やテグメント構成因子としての機能を保持していることが予想される。

培養細胞とは異なり、UL13の生体内における詳細な機能はこれまで十分にはわかっていない。*In vivo*における解析では、UL13欠損株を用いた解析の結果、HSV-1 UL13は脳内接種では神経病原性に重要ではないが、腹腔接種では病原性が低下することが報告されている (40)。しかし、腹腔はHSV-1の自然感染の標的ではないことからHSV-1 UL13の生体内における生理学的意義は不明な点が多い。また、上述の感染細胞を用いて明らかになったUL13の機能が実際に生体内において、ウイルス増殖や病原性に与える影響も不明である。そこで本研究ではUL13の生体内における意義の解明を目的とし、特にUL13のPK活性が病原性発現に果たす役割に焦点を当て詳細な解析を試みた。

HSV-1の病原性を解析する系として、中枢神経系における病原性解析には脳内接種モデル、角膜や膺といった末梢組織における病原性解析には末梢接種モデルがそれぞれ用いられる (41-43)。脳内接種モデルはマウスの脳内にHSV-1を直接接種することにより、HSV-1が末梢での増殖や神経輸送を介さずに脳内で増殖を開始する。増殖したHSV-1により中枢神経系は破壊され、マウスが死に至るといふ、HSV-1の神経病原性を測る系

である (1)。一方、末梢接種モデルの中でも角膜接種モデルは、まず HSV-1 がマウスの角膜上皮で増殖する (1)。HSV-1 は神経終末に感染し、神経アクソンにより三叉神経節の nerve cell body に輸送される (1)。病原性の強い HSV-1 や病原性が弱くても十分量の HSV-1 を角膜接種した場合には HSV-1 は中枢神経系に侵入し、マウスは脳炎によって死に至る (1)。このように HSV-1 が角膜から中枢神経系に侵入する能力 (神経侵襲性) はマウス角膜接種モデルを用いることにより解析可能である。また、HSV-1 が角膜から脳に侵入する間に、宿主は様々な免疫応答を誘導し、HSV-1 の増殖抑制効果を発揮することから、HSV-1 による宿主免疫回避機構を解析するのに適した系である。マウス HSV-1 感染モデルにおいて、ウイルスタンパク質やその一部のドメインは、末梢での病原性発現のみに重要であるものや中枢神経系でのみ重要であるもの、どちらにも重要であるもの、どちらにも重要でないものがあると考えられる。そのため、本研究では脳内接種モデルと角膜接種モデルの両モデルを用いた解析により、UL13 の PK 活性が病原性発現に如何にして寄与するかを明らかにした。

Us3 は HSV-1 および HSV-2 がコードする PK であり、 α ヘルペスウイルス亜科に保存されている (44-46)。HSV-1 Us3 は様々な宿主タンパク質やウイルスタンパク質の機能を制御する多機能なウイルスタンパク質である。HSV-1 Us3 はリン酸化によって、HSV-1 感染細胞のアポトーシスの阻害 (47-50)、カプシドの核膜通過の促進 (51-54)、ウイルスタンパク質 (UL31、UL34) および宿主タンパク質 (lamin A/C や emerin) の局在制御 (46, 51, 55-59)、histone deacetylase (HDAC)s のリン酸化を介した histone deacetylation の阻害による遺伝子発現促進 (60-62)、HSV-1 感染細胞の形態制御 (49, 63)、宿主免疫制御 (64-68)、Akt の模倣と mTORC1 の活性化による mRNA 翻訳促進 (69)、ウイルスタンパク質 gB (70, 71) や UL47 (72) の細胞内トラフィック制御に寄与することが報告されている。これまでに 15 個以上の HSV-1 Us3 基質候補が報告されているが (19, 46, 49, 51, 55-58, 61, 63, 69, 71, 72)、感染細胞で Us3 によって直接リン酸化され、Us3 の機能に

直接関連することが示されているのは gB、UL31、Us3、UL47、および tuberous sclerosis complex 2 といった少数の基質のみである (42, 51, 69-72)。

HSV-1 Us3 は培養細胞におけるウイルス増殖には必須ではない (73)。Us3 欠損株や Us3PK 活性消失株は Vero 細胞においてウイルス増殖性に影響しないが、HEp-2 細胞など特定の細胞においては野生型株に比べて増殖性の低下が認められる (52, 53)。生体内においては、Us3 欠損株や Us3PK 活性消失株では野生型株に比べて角膜接種後の眼におけるウイルス増殖や病原性の低下、および脳内接種後の病原性の低下が認められたことから、HSV-1 Us3 はマウスの末梢および中枢神経系において病原性発現に重要であることが明らかとなっている (42, 74, 75)。しかし、HSV-1 角膜接種モデルにおいて HSV-1 Us3 が神経侵襲性に寄与しているかは不明のままであった。今回、HSV-1 Us3 欠損株およびその復帰株を用いた解析により、HSV-1 Us3 欠損株では神経侵襲性が消失したことを明らかにした。

3 実験方法

細胞

Vero 細胞(アフリカミドリザル腎細胞株)は Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) に 5% calf serum (CS)、100 units/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを添加した培地、RSC は DMEM に 5% fetal calf serum (FCS)、100 units/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを添加した培地で培養した。Immortalized Mouse embryonic fibroblast (MEF)、Neuro-2a 細胞は DMEM に 10% FCS、100 units/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを添加した培地で培養した。マウスミエローマ SP2/O 細胞、CD8 α ハイブリドーマ(clone 53.6.72) は Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium に 10% FCS、100 units/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン、50 μ M 2-メルカプトエタノールを添加した培地で培養した。HSV-2.3.2E2 CTL クローン (76) は RPMI medium に 10% FCS、100 units/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン、50 μ M 2-メルカプトエタノール、1mM ピルビン酸ナトリウムを添加した培地で培養した。CS、FCS は 56 $^{\circ}$ C で 30 分間非働化後に使用した。

プラスミド

プラスミド DNA (pUL13KM)、およびプラスミド DNA (AflIII Pst+ in pBS Δ V-Kp) は当研究室で過去に作製されたものを使用した (39)。プラスミド DNA (pMAL-c UL13(336-518)) は pMAL-c vector (New England BioLabs) に UL13 の 336-518 番目のアミノ酸をコードするヌクレオチドをつないだ。

ウイルス

野生体の laboratory strain は HSV-1(F) を用いた (77)。組換えウイルス R7356 (Δ UL13)、R7041 (Δ Us3)、R7306 (Us3-repair) (図 3) はシカゴ大学 Dr. Roizman により分与いただいた (17, 73)。組換えウイルス YK476 (Δ UL41)、YK477 (UL41-repair) (図 3) は当研究室で過去に作製されたものを使用した (78)。組換えウイルス YK405 (UL13-K176M) は、組換えウイルス R7356 (Δ UL13) のウイルス DNA とプラスミド DNA (pUL13KM) を RSC にリン酸カルシウム法でトランスフェクションし、産生されたウイルス集団から標準的なプラークピック法により、組換えウイルス YK405 (UL13-K176M) を単離し、シーケンシングにより UL13-K176M 変異の導入を確認後使用した (79)。組換えウイルス YK406 (UL13-repair) は、組換えウイルス YK405 (UL13-K176M) のウイルス DNA とプラスミド DNA (AflIII Pst+ in pBS Δ V-Kp) を RSC に上記と同様の方法でトランスフェクションし、単離した (図 3)。全てのウイルスは、Vero 細胞にてウイルス力価を測定した後に本実験に使用した。

抗体作製

UL13を特異的に検出するマウスモノクローナル抗体を作製した。大腸菌内にて、pMAL-c UL13(336-518)より発現される maltose-binding protein (MBP) にUL13の336-518番目のアミノ酸がfusionしたタンパク質を抗体作製の抗原として用いた。抗原100 μ gと TiterMax gold (TiterMax USA, Inc.) を混合したものを4週齢のメスBalb/cマウス(Charles River) に腹腔接種した。2ヶ月後、マウスから脾細胞を分離し、マウスミエローマSP2/O細胞と融合させ、選択培地にて培養することによりハイブリドーマを得た。ハイブリドーマの培養上清をenzymed-lynked immunosorbent assayに供し、UL13を特異的に認識する

ハイブリドーマを選択した。得られたハイブリドーマを培養し、プリスタン(Wako) で刺激した8週齢メスBalb/cマウスに腹腔接種した。1週間後マウスの腹水を回収し、これを、UL13を特異的に認識するモノクローナル抗体として使用した。

トランスフェクション

RSC を継代して 2 時間後に、H₂O 250 μ l、ウイルス DNA 1 μ g、2.2mM CaCl₂ 35 μ l、2xHepes buffered saline (pH7.05) (0.14mM NaCl、2.7mM KCl、1 mM Na₂HPO₄ · 2H₂O、50mM HEPES、1mM dextrose) 250 μ l を混合し、室温で 15 分間インキュベートした。細胞に DEAE dextran を加え、室温で 15 分間インキュベートした。TEN (100mM NaCl、10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA) で細胞を洗浄した後、DNA 混合液と培地を添加し、6 時間培養後に新しい培地に交換した (41)。

ウイルス DNA の精製

Vero 細胞に各ウイルスを MOI 0.01 で感染させ、48 時間後に回収した。PBS で洗浄後、NaCl/tris/MgCl buffer (150 mM NaCl、10 mM Tris (pH7.4)、10mM Tris-HCl (pH7.4)、0.1% NP-40) に溶かして 15 分間氷上に静置した。遠心して上清に終濃度 0.2% SDS、0.5mM EDTA、50mM β -Mercaptoethanol となるようにそれぞれを添加し、15 分間氷上に静置した。フェノール・クロロホルム処理後、エタノール沈殿によりウイルス DNA を回収した。TE (pH8.0) で DNA を溶かし、RNaseA を終濃度 20 μ g/ml となるように加え 15 分間室温で反応させた。この DNA 溶液を 5% - 20%酢酸カリウム gradient に上層し、超遠心 (27,000rpm、24h、20°C) し、エタノール沈殿後、ウイルス DNA を回収した (80)。

ウェスタンブロット

ウイルス感染細胞から得られたタンパク質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) にて分離した。SDS-PAGE 後に transfer buffer (Tris12.1g、glycine 14.4g、メタノール 200 ml、H₂O 800 ml) に浸したろ紙でゲル及びニトロセルロースメンブレン (BIORAD) をはさみ、トランスファーした。その後、ブロッキング液 (5% スキムミルク、0.1% Tween20 を含む PBS (PBS-T)) を用いて 30 分間ブロッキングした。PBS-T で洗浄後、一次抗体を 1% BSA in PBS-T で希釈して、4°C、overnight で反応させた。一次抗体には作製した anti-UL13 抗体、もしくは anti-VP22 抗体 (82) を使用した。PBS-T で洗浄後、二次抗体である Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse もしくは anti-rabbit 抗体 (GE Healthcare) を 3% スキムミルク in PBS-T で希釈して、室温で 2 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、Enhanced chemiluminescence (GE Healthcare) により目的のバンドを検出した(81)。

ウイルス力価の測定 (プラークアッセイ)

ウイルス液を 1% FCS を含む 199 培地 (Sigma) で希釈した。このウイルス希釈液を 6well もしくは 12well プレート中の Vero 細胞に感染させた。1 時間吸着させた後、ヒト γ -グロブリンを含む新しい 199 培地に変え、37°C で 3 日間培養した。細胞をメタノール固定し、クリスタルバイオレットで染色後、well ごとにプラークを数え、ウイルス力価を算出した (41)。

ウイルス増殖曲線

Vero 細胞、RSC に各ウイルスを MOI 0.01 もしくは MOI 5 で感染させた。1 時間吸着させた後、199 培地に変え、定期的に培養上清と細胞を回収した。凍結融解した後、Vero 細胞における標準的プラークアッセイ法を用いてウイルス力価を測定した (41)。

CTL アッセイ

MEF 細胞を 24well プレートにまき、ウイルスを MOI 1 で感染させた。1 時間吸着させた後、新しい 199 培地に交換した。感染 12 時間後、HSV-2.3.2E2 CTL クローンをそれぞれの well に 5×10^4 個加え、さらに 12 時間培養した。プレートを $1,100 \times g$ で遠心後、上清を丁寧に除去し、LacZ の発現を CPRF 溶液 (CPRG 45.5 mg, 9 mM $MgCl_2$, 0.126% NP40 in 500 ml of PBS) を加え、595nm のフィルターを用いたプレートリーダー (BIO-RAD) で吸光度を測定した (68)。

Quantitative RT-PCR

MEF、Neuro-2a 細胞を 12well プレートにまき、ウイルスを MOI 5 で感染させた。1 時間吸着させた後、新しい 199 培地に交換した。感染 24 時間後、細胞を PBS で洗浄した後、Total RNA を High Pure RNA Isolation Kit (Roche) にて精製した。マウスの脳幹由来の Total RNA は、マウスから脳幹を回収し、TriPure Isolation Reagent (Roche) を加え、ペッスルにてホモジナイズし、遠心後、上清を High Pure RNA Tissue Kit に供し、精製した。cDNA は各 Total RNA を Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) を用いて合成した。特定の遺伝子に対する cDNA 量は、TaqMan Master (Roche)、特定の遺伝

子に対するプライマー、the Universal ProbeLibrary (Roche) を混合した反応液を the LightCycler 1.5 system (Roche) もしくは the LightCycler 96 system (Roche) に供することで測定した。特定の遺伝子に対するプライマーとプローブは ProbeFinder software (Roche) により作製及び使用した。各遺伝子に対するプライマーとプローブは以下の通りである。各遺伝子の相対量は比較 CT ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 法を用いて算出した (68)。

Mouse

β -actin 5'-GGAGGGGGTTGAGGTGTT-3', 5'-GTGTGCACTTTTATTGGTCTCAA-3'

Universal ProbeLibrary probe 71

Mouse

IL-6 5'-ATCAGGAAATTTGCCTATTGAAA-3', 5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGA-3'

Universal ProbeLibrary probe 6

Mouse

CXCL9 5'-TGCTAGAGGCCAAAACTCTGTG-3', 5'-TAGGCTCAAGGGCGTGAT-3'

Universal ProbeLibrary probe 76

Mouse CXCL10

were 5'-CCTTGGTCTTCTGAAAGGTGAC-3', 5'-ACCATGGCTTGACCATCATC-3'

ProbeLibrary Probe 63

18S rRNA

5'-GCAATTATTCCCATGAACG-3', 5'-GGGACTTAATCAACGCAAGC-3'

ProbeLibrary Probe 48

マウスにおける病原性試験

脳内接種における50% lethal dose (LD₅₀) の算出では、3週齢メスICRマウス (Charles River) にpentobarbitalを腹腔接種することで麻酔し、10倍希釈したウイルス液を脳内に接種した。ウイルス接種後1日から14日まで観察し、マウスの生死を記録し、Behrens-Karber法を用いてLD₅₀を算出した (41)。脳内接種後の脳内ウイルス力価測定では、5週齢メスICRマウス (Charles River) に麻酔し、 1×10^4 pfuのウイルスを脳内に接種した。感染1日後および3日後に解剖して脳を取り出し、1 mlの199培地中でホモジェナイズし、-80°Cで凍結した。融解後、Vero細胞における標準的プラークアッセイ法にて脳内におけるウイルス力価を測定した。

角膜接種では、5週齢メスICRマウスに麻酔し、27-gaugeの注射針を用いて角膜に傷をつけ、その後、 1×10^6 pfuのウイルスを左右の角膜に接種した。ウイルス接種後1日から14日まで観察し、マウスの生死を記録した (83)。マウスの涙液中のウイルス力価は、脱脂綿でマウスの角膜を拭うことにより涙液を回収した。脱脂綿を1 mlの199培地中に入れ、-80°Cで凍結した。融解後、Vero細胞における標準的プラークアッセイ法にて涙液中のウイルス力価を測定した。角膜接種後の眼球、三叉神経節、脳のウイルス力価測定では、5週齢メスICRマウス (Charles River) に麻酔し、 1×10^6 pfuのウイルスを角膜に接種した。感染1、3、5、7、8日後に解剖して各組織を取り出し、1 mlの199培地中でホモジェナイズし、-80°Cで凍結した。融解後、5,000rpm、4°C、5分間遠心後、上清をVero細胞における標準的プラークアッセイ法に供し、各組織におけるウイルス力価を測定した。角膜接種7日後のヘルペス性角膜炎 (Herpes stromal keratitis ; HSK) および眼周囲の皮膚病変をスコアリングした。HSKスコアは以下に示す基準でスコアリングした。 0, normal cornea; 1, mild corneal haze; 2, moderate corneal opacity or scarring; 3, severe corneal opacity, iris not visible; 4, opaque cornea; and 5, necrotizing stromal keratitis (42,84)。また、眼

周囲の皮膚病変は以下に示す基準でスコアリングした。 0, no lesions; 1, minimal eyelid swelling; 2, moderate eyelid swelling accompanied by crusty ocular discharge; 3, severe eyelid swelling and moderate hair loss in periocular skin; and 4, severe swelling with eyes crusted shut, severe periocular hair loss, and skin lesions (42,84)。

CD8⁺ T cell depletion

6週齢のメス Balb/c nude マウス (Charles River) に Incomplete Freund's adjuvant (Sigma) を 300 μ l 接種した。7日後、CD8 α に対する抗体を産生するハイブリドーマ (clone 53.6.72) を腹腔に接種した。1-2週間後に得られた腹水をカプロン酸と硫酸アンモニウムを用いて精製した後、透析膜を用いて PBS へと置換した。得られた抗体を5週齢のメス ICR マウスに 200 μ g/head で腹腔接種した。抗体接種は3日ごとに継続しておこなった。腹腔接種2日後、16日後および23日後にマウスの脾臓および顎下腺リンパ節から白血球を精製し、フローサイトメトリーを用いて95%以上のCD8⁺ T cellの除去を確認した (68)。CD8⁺ T cell depletion におけるマウスの生存曲線は、5週齢のメス ICR マウスに CD8 α に対する抗体を 200 μ g/head で腹腔接種した。2日後、上述と同様の方法で角膜接種をおこない、ウイルス接種後1日から21日まで観察し、マウスの生死を記録した。角膜接種後の脳のウイルス力価測定は、5週齢メス ICR マウスに上述と同様の方法で角膜接種をおこない、感染5日後および7日後に解剖して脳を取り出し、上述と同様の方法でウイルス力価を測定した。

脳幹へのケモカイン投与

5週齢メスICRマウスに上述と同様の方法で 1×10^6 pfuのウイルスを左右の角膜に接種した。感染5日後のマウスにpentobarbitalを腹腔接種することで麻酔し、ステレオタキシック Model 900M (DKI) に固定した。頭皮を切開後、頭蓋骨のブレグマから後方に0.32cm、左右に0.20cmの箇所（主要なHSV-1感染部位である脳幹部）に歯科用ドリルで穴を開けた。ハミルトンシリンジを脳の表面から0.30cmまで刺し、2 μ l のPBSで希釈した200 ng/ μ l マウスリコンビナントCXCL9 (Peprotech)、もしくはコントロールとしてPBSのみを2分間かけて投与した。針を抜き、頭皮を糸で縫い、閉じた。マウスの生存曲線は、ウイルス接種後1日から21日まで観察し、マウスの生死を記録した。角膜接種後の脳のウイルス力価測定は、感染5日後および7日後に解剖して脳を取り出し、上述と同様の方法でウイルス力価を測定した。

アシクロビル投与

5週齢メスICRマウスに上述と同様の方法で 1×10^6 pfuのウイルスを左右の角膜に接種した。PBSで希釈したマウス体重1kgあたり50 mgのアシクロビル(Wako)、もしくはコントロールとしてPBSを、感染2日後から8日後もしくは感染5日後から11日後までそれぞれ7日間継続して腹腔に1日1回投与した (85)。マウスの生存曲線は、ウイルス接種後1日から21日まで観察し、マウスの生死を記録した。

免疫組織染色

パラフィン切片による免疫組織染色は、5週齢メス ICR マウスに 上述と同様の方法で 1×10^4 pfu、もしくは 1×10^6 pfu のウイルスをそれぞれ脳内接種、角膜接種した。脳内接種では感染 3 日後、角膜接種では感染 5 日後および 8 日後に解剖し、マウスの脳を回収し、4°C の 4% パラホルムアルデヒド in PBS に overnight で浸した。70%エタノールに置換後、パラフィン切片の作製に供した。キシレンにて脱パラフィン処理をおこなった。脱ペルオキシダーゼ処理として、1%過酸化水素 in メタノールで 30 分間インキュベーションした。その後、ブロッキング液 (5% スキムミルク、0.1% Tween20 を含む PBS (PBS-T)) を用いて 10 分間ブロッキングした。一次抗体 anti-HSV-1 (Dako) をブロッキング液で希釈して、4°C、overnight で反応させた。PBS-T で洗浄後、二次抗体である Envision+ system HRP labeled polymer anti-rabbit (Dako) を室温で 45 分間反応させた。PBS-T で洗浄後、diaminobenzidine (Dako) により発色させた。流水で洗浄した後、ヘマトキシリンで染色した (78, 86)。

凍結切片による免疫組織染色は、5週齢メス ICR マウスに 上述と同様の方法で 1×10^6 pfu のウイルスを角膜接種した。感染 5 日後もしくは 7 日後に解剖し、マウスの脳を回収し、4°C の 4% パラホルムアルデヒド in PBS に overnight で浸した。次に、5% スクロース in PBS に 1 時間、15% スクロース in PBS に 3 時間、30% スクロース in PBS に overnight で置換した。Tissue Mount を用いて、ブロックを作製し、クライオスタットにて切片を作製した。TNT buffer (0.05% Tween20 in PBS) で洗浄後、ブロッキング液 (Avidin 200 μ l、Donkey serum 50 μ l、TNB (TSA blocking Reagent (Perkin Elmer)) 750 μ l) で 45 分間ブロッキングした。TNT buffer で洗浄後、ブロッキング液 (Biotin 200 μ l、30% 過酸化水素 33 μ l、TNB 100 μ l、PBS 666 μ l) で 10 分間ブロッキングした。TNT buffer で洗浄後、一次抗体を TNB で希釈して、4°C、overnight で反応させた。一次抗体として

は anti-HSV-1 (Dako)、anti-CD8 (BD Pharmingen)、anti-CXCL9 (R&D SYSTEMS) をそれぞれ用いた。TNT buffer で洗浄後、Biotin-SP-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Mouse Anti-Rat IgG(H+L)、Biotin-SP-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG(H+L)、もしくは Biotin-SP-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Donkey Anti-Goat IgG(H+L) (Jackson ImmunoResearch) を TNB で希釈して、室温で 30 分間反応させた。TNT buffer で洗浄後、Streptavidin-HRP (Zymed) を TNB で希釈して、室温で 30 分間反応させた。TNT buffer で洗浄後、Tyramide (Perkin Elmer) で染色した。核染色は 4,6-diamidino-2-phenylindole (Sigma) にておこなった。パラフィン切片の観察は Olympus BX41 Microscope (Olympus) を用いておこなった。凍結切片の観察は Olympus IX71 Microscope (Olympus) を用いておこなった。

フローサイトメトリー

5週齢メスICRマウスに上述と同様の方法で 1×10^6 pfu のウイルスを角膜接種した。感染5日後もしくは7日後にマウスを解剖し、脾臓および顎下腺リンパ節から赤血球を溶血バッファー(160 mM NH₄Cl、170mM Tris-HCl (pH7.2))で処理した後に白血球を回収した。脳幹中の白血球の回収は以下の通りにおこなった。メスで脳幹を細かく裁断後、1mg/ml collagenase D (Wako) と 15 µg/ml DNase I (Roche) を含むRPMI 1640 (Nacalai) で37°C、30分間インキュベーションした。70-µm pore size フィルターに通した後、30% Percoll (GE Healthcare) にて、7,800 rpm、室温で30分間遠心した。上層のミエリン層の除いた後、白血球層を3,000 rpm、室温で5分間遠心して回収した。各白血球は、FITC-conjugated anti-CD8α (eBioscience)、APC- conjugated anti-CD4 (eBioscience) および PE-conjugated anti-CD45 (eBioscience) と4°Cで30分間反応させた。次に、生細胞と死細胞を分けるために7-amino-actinomycin D (7-AAD) (Becton Dicknson) で染色した。細胞を

洗浄後、各蛍光強度をFACS Calibur (Becton Dicknson) もしくはFACS Verse (Becton Dicknson) と Cell Quest software (Becton Dickinson) で解析した。

Enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay

5週齢メスICRマウスに上述と同様の方法で 1×10^6 pfuのウイルスを角膜接種した。感染5日後もしくは7日後にマウスを解剖し、脾臓、顎下腺リンパ節および脳幹から上述と同様の方法で白血球を回収した。非感染の5週齢メスICRマウス脾臓由来の白血球 (2×10^5 cells/well) をガンマセル処理後、熱不活化した野生型のHSV-1 (F) (2×10^6 PFU/well) と37°C、1時間インキュベーションした。これをanti-mouse IFN- γ Ab (eBioscience) をコートした96-well PVDF Membrane ELISPOT plates (Millipore) に、各組織から回収した白血球とともに加え、37°Cでインキュベーションした。3日後、培養液を除き、TNT buffer (0.05% Tween20 in PBS) で洗浄後、Biotin-anti-mouse IFN- γ Ab (eBioscience) と室温で2時間インキュベーションした。TNT bufferで洗浄後、Avidin-HRP (eBioscience) と室温で45分間インキュベーションした。TNT bufferで洗浄後、AEC solution (3-amino-9-ethyl-carbazole 3.33 mg、N,N, Dimethylformamide 333 μ l、氷酢酸 17 μ l、酢酸ナトリウム 96 mg、30% 過酸化水素 5 μ l in H₂O) にて発色させ、スポットをカウントした。

4 結果

I. UL13のPK活性は中枢神経系における感染細胞排除の阻害に寄与する

1. UL13 変異導入ウイルスの作製と性状解析

HSV-1 UL13のPK活性が生体内におけるウイルス増殖および病原性に及ぼす影響を調べるために、UL13PKの活性中心である176番目のアミノ酸であるLysineをMethionineに置換することによりPK活性を消失した株 YK405 (UL13-K176M) を作製し、さらにその復帰株 YK406 (UL13-repair) を作製した (図3)。まず、各ウイルスにおけるUL13の発現をタンパク質レベルで比較するために、Vero細胞に各ウイルスを感染させ、24時間後の感染細胞を、UL13抗体を用いたウェスタンブロットに供した。その結果、YK405 (UL13-K176M)、およびYK406 (UL13-repair) 感染細胞で発現するUL13タンパク質に顕著な違いは見られなかった (図4)。よって、YK405 (UL13-K176M) 感染細胞においてUL13はタンパク質として発現し、その発現量は復帰株と同程度であることが示された。

次に、作製した組換えウイルスの培養細胞におけるウイルス増殖性を調べた。Vero細胞もしくはRSCにMOI 5もしくはMOI 0.01で各ウイルスを感染させ、6、12、18、24、48 (MOI 0.01のみ) 時間後に細胞内と細胞外のウイルスを混合して回収し、各々のウイルス量を測定した。その結果、Vero細胞におけるYK405 (UL13-K176M) の増殖性は、MOI 5およびMOI 0.01のいずれにおいてもHSV-1 (F) (wild-type) およびYK406 (UL13-repair) との間に顕著な差は見られなかった (図5a、b)。これまでに、UL13欠損株は、Vero細胞において野生型ウイルスと同様の増殖性を示すことが報告されている (17-20)。よって今回得られたUL13のPK活性がVero細胞におけるウイルス増殖に影響しないという結果は過去の報告と合致する。一方、RSCにおけるYK405 (UL13-K176M) の増殖性は、

MOI 5およびMOI 0.01のいずれにおいてもHSV-1 (F) (wild-type) およびYK406 (UL13-repair) と比べて低下する傾向が認められた (図5c、d)。これは我々のグループが以前に異なる方法で作製したUL13PK活性消失株とその復帰株を用いて得られた結果と合致するものである (39)。

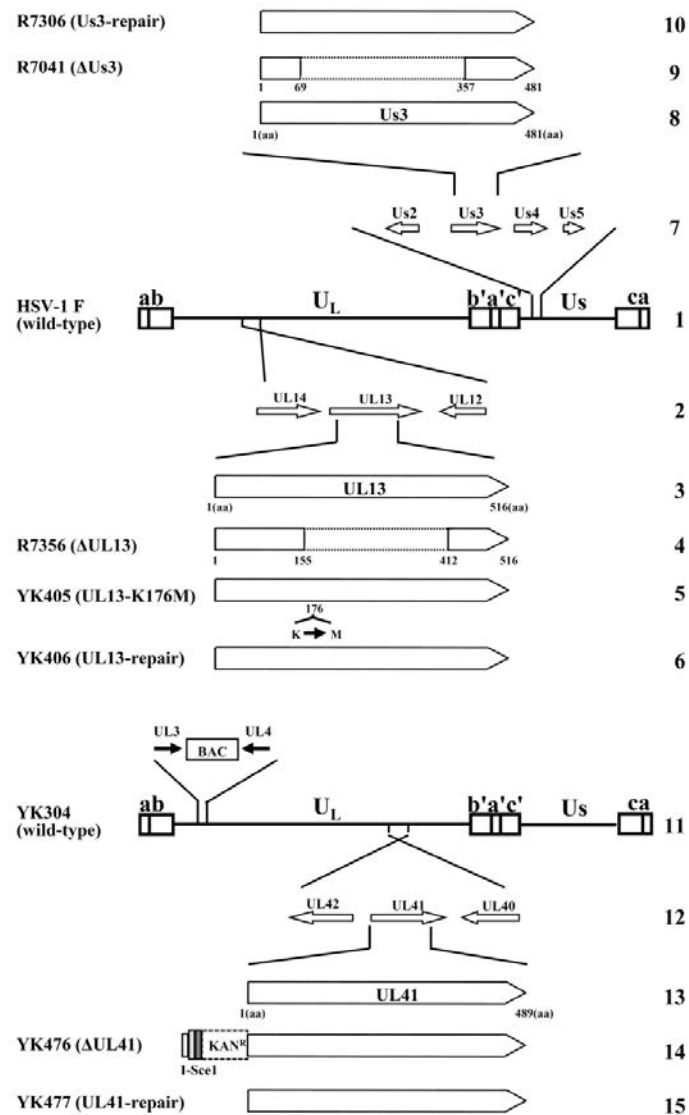


図3. ウイルスゲノム構造と本研究で利用したウイルス

HSV-1 (F) (wild-type) およびYK304 (wild-type) のゲノム構造を示す。Unique配列は unique long (UL) と unique short (Us) ドメインとして表記した。HSV-1 (F) を親株とした、UL13を欠損したウイルスR7356 (Δ UL13)、UL13のPK活性を消失したウイルスYK405 (UL13-K176M)とその復帰ウイルスYK406 (UL13-repair)、Us3を欠損したウイルスR7041 (Δ Us3)とその復帰ウイルス R7306 (Us3-repair) の模式図を示す。また、YK304を親株とした、UL41を欠損したウイルスYK476 (Δ UL41)とその復帰ウイルスYK477 (UL41-repair) の模式図を示す。

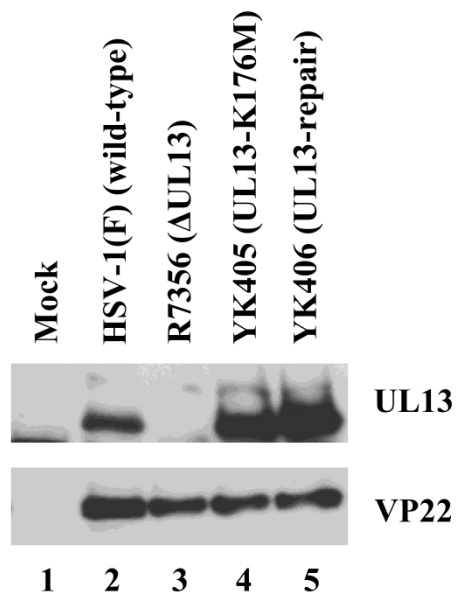


図4. UL13組換えウイルス感染細胞でのUL13の発現

Vero細胞に非感染 (lane1)、HSV-1 (F) (wild-type) (lane2)、R7356 (Δ UL13) (lane3)、YK405 (UL13-K176M) (lane4)、YK406 (UL13-repair) (lane5) をMOI 5で感染させ、24時間後に細胞を回収し、SDS-PAGE後、anti-UL13抗体 (upper panel) とanti-VP22抗体 (lower panel) を用いたウェスタンプロットで検出した。

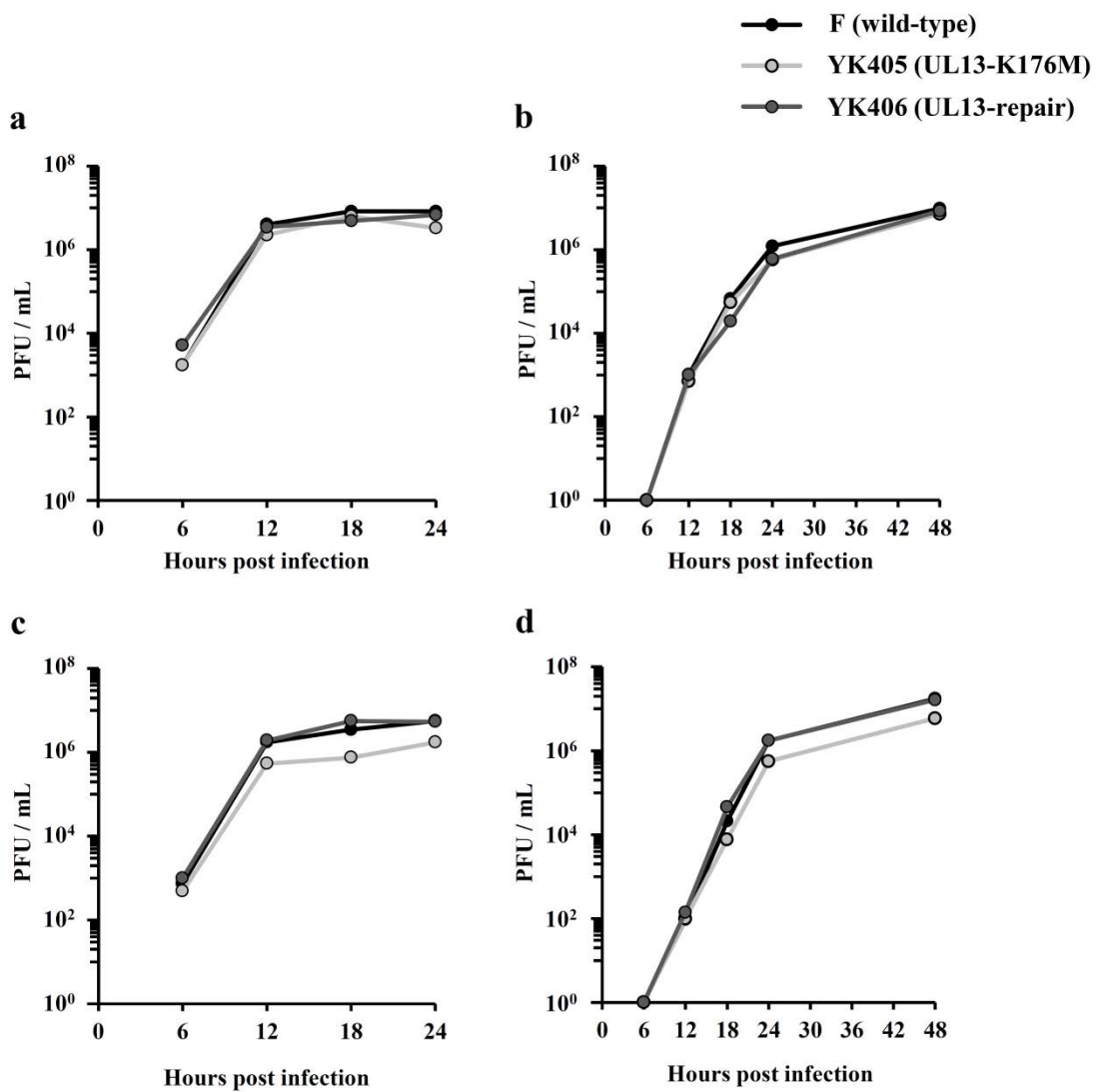


図 5. 各ウイルス感染細胞におけるウイルス増殖能

Vero 細胞 (a, b) もしくは RSC (c, d) に HSV-1 (F) (wild-type)、YK405 (UL13-K176M)、YK406 (UL13-repair) を MOI 5 (a, c) もしくは MOI 0.01 (b, d) で感染させ、経時的に細胞内および細胞外ウイルスを混ぜて回収し、その感染性ウイルス量をプラークアッセイで測定した。

2. マウス脳内接種モデルにおいて UL13PK 活性はウイルス増殖および病原性に影響しない

UL13 の PK 活性が神経病原性に与える影響を調べるために、3 週齢のメス ICR マウスに 10 倍段階希釈した YK405 (UL13-K176M)、もしくは YK406 (UL13-repair) を脳内接種し、マウスの生死を 14 日間観察し、各ウイルスの LD₅₀ を算出した。その結果、YK405 (UL13-K176M) の LD₅₀ は 147 pfu、YK406 (UL13-repair) の LD₅₀ は 88 pfu であり、顕著な違いはみられなかった (図 6)。次に、脳内接種後のウイルス増殖を調べるために、5 週齢のメス ICR マウスに 1×10^4 pfu の YK405 (UL13-K176M)、もしくは YK406 (UL13-repair) を脳内接種し、感染 1 日後と 3 日後のマウスから脳を回収し、脳に含まれるウイルス力価を測定した。その結果、ウイルス間でウイルス増殖に有意な差は認められなかった (図 7)。さらに、脳内接種後の HSV-1 抗原の広がり調べるために、5 週齢のメス ICR マウスに 1×10^4 pfu の YK405 (UL13-K176M)、および YK406 (UL13-repair) を脳内接種し、感染 3 日後のマウスから脳を回収し、パラフィン切片を作製し、HSV 抗原の観察をおこなった。その結果、ウイルス間で HSV-1 抗原の広がりに顕著な違いはみられなかった (図 8)。以上の結果より、UL13 の PK 活性は神経病原性に寄与しないことに加えて、脳内接種後の脳におけるウイルス増殖や HSV-1 抗原の広がりにも寄与しないことが明らかになった。

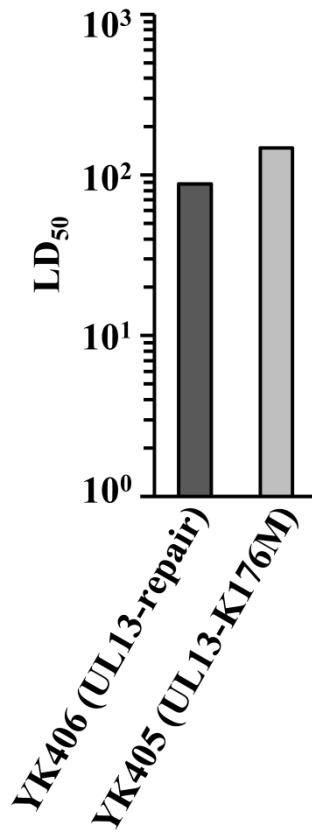


図 6. マウス脳内接種後の各組換えウイルスの LD₅₀ 値

3 週齢メス ICR マウスの脳内に 10 倍段階希釈した YK405 (UL13-K176M)、もしくは YK406 (UL13-repair) をそれぞれの濃度で各 9 匹ずつ接種し、14 日後の生存数を計数した。LD₅₀ 値は Behrens-Karber 法にて算出した。

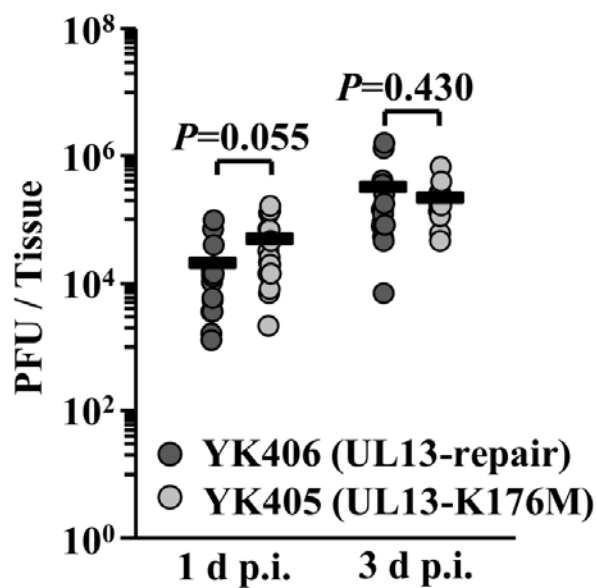


図 7. マウス脳内接種後の脳に含まれるウイルス力価

15 匹の 5 週齢メス ICR マウスの脳内に 1×10^4 pfu の YK405 (UL13-K176M)、もしくは YK406 (UL13-repair) を接種し、感染 1 日後および 3 日後のマウスから脳を回収し、脳に含まれるウイルス力価をプラークアッセイで測定した。それぞれの点は、一匹のマウスの脳に含まれるウイルス力価を表している。図に示した線は、それぞれのグループの平均値を示した。有意性は student の t 検定により評価した。

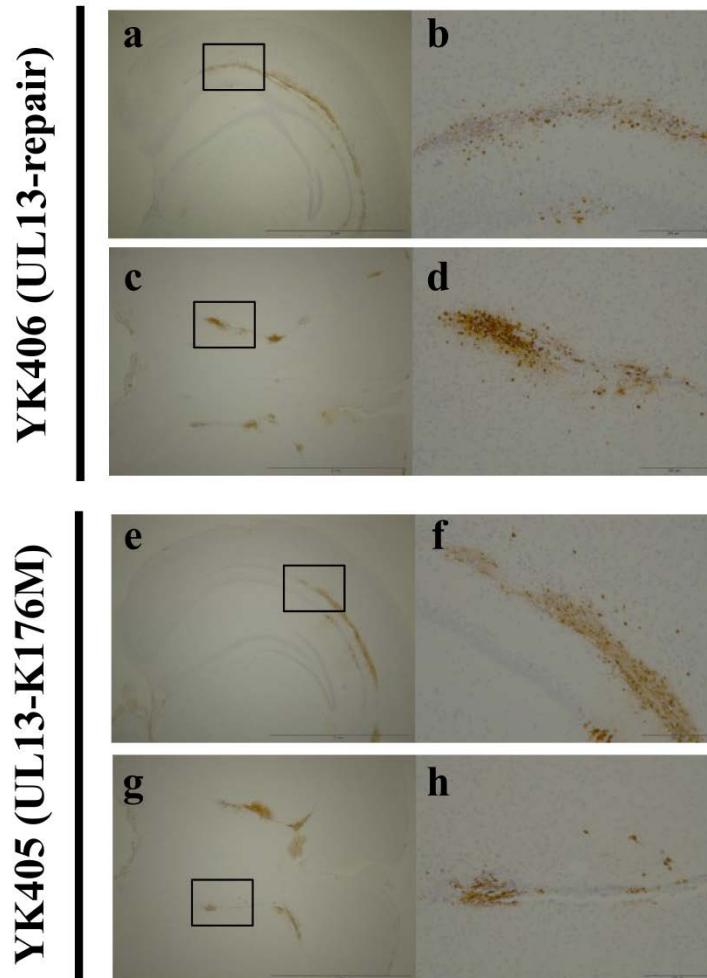


図 8. マウス脳内接種後の脳における HSV-1 抗原の広がり

5 週齢メス ICR マウスの脳内に 1×10^4 pfu の YK405 (UL13-K176M)、もしくは YK406 (UL13-repair) を接種し、感染 3 日後のマウスから脳を回収し、脳における HSV-1 抗原の広がりを anti-HSV 抗体を用いた免疫組織染色法で染色し、Olympus BX41 microscope (Olympus) で観察した。なお、b、d、f、h はそれぞれ a、c、e、g を拡大したものである。

3. マウス脳内接種モデルにおいて Us3 はウイルスの増殖および広がりにおいて重要である

UL13 の PK 活性が脳内接種後の脳においてウイルス増殖や HSV-1 抗原の広がりにおいて重要であるかを解析する上での対照実験として、HSV-1 がコードする他の PK である Us3 の欠損株 R7041 (Δ Us3)、および復帰株 R7306 (Us3-repair) を用いた解析をおこなった。

5 週 齢のメス ICR マウスに 1×10^4 pfu の R7041 (Δ Us3)、もしくは R7306 (Us3-repair) を脳内接種し、感染 1 日後と 3 日後のマウスから脳を回収し、脳に含まれるウイルス力価を測定、および、感染 3 日後のマウスから脳を回収し、パラフィン切片を作製し、HSV-1 抗原の観察をおこなった。その結果、R7041 (Δ Us3) を感染させたマウスでは R7306 (Us3-repair) を感染させたマウスに比べて脳のウイルス力価が感染 1 日後で 71 倍、感染 3 日後で 5.9 倍に低下していた (図 9)。この脳のウイルス力価の結果と一致するように、R7041 (Δ Us3) を感染させたマウスの脳における HSV-1 抗原の広がり、R7306 (Us3-repair) を感染させたマウスの脳に比べてより限定的であった (図 10)。

以上の結果より、Us3 欠損ウイルスはマウスの脳において増殖および拡散する能力は保持してはいるが、Us3 は脳内接種後のマウスの脳での効率的なウイルス増殖および HSV-1 抗原の広がりにおいて重要であることが明らかになった。

この Us3 に関する研究結果は、学術雑誌 *Microbiology and Immunology* 58, 31-37. (2014) に掲載された (86)。(http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mim.v58.1/issuetoc)

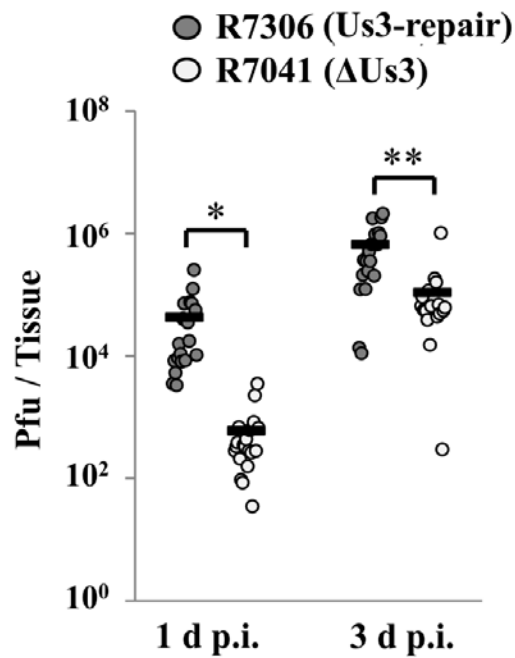


図 9. マウス脳内接種後の脳に含まれるウイルス力価

20 匹の 5 週齢メス ICR マウスの脳内に 1×10^4 pfu の R7041 (Δ Us3)、もしくは R7306 (Us3-repair) を接種し、感染 1 日後および 3 日後のマウスから脳を回収し、脳に含まれるウイルス力価をプラークアッセイで測定した。それぞれの点は、一匹のマウスの脳に含まれるウイルス力価を表している。図に示した線は、それぞれのグループの平均値を示した。有意性は student の t 検定により評価した。*, $P < 0.005$, **, $P < 0.001$.

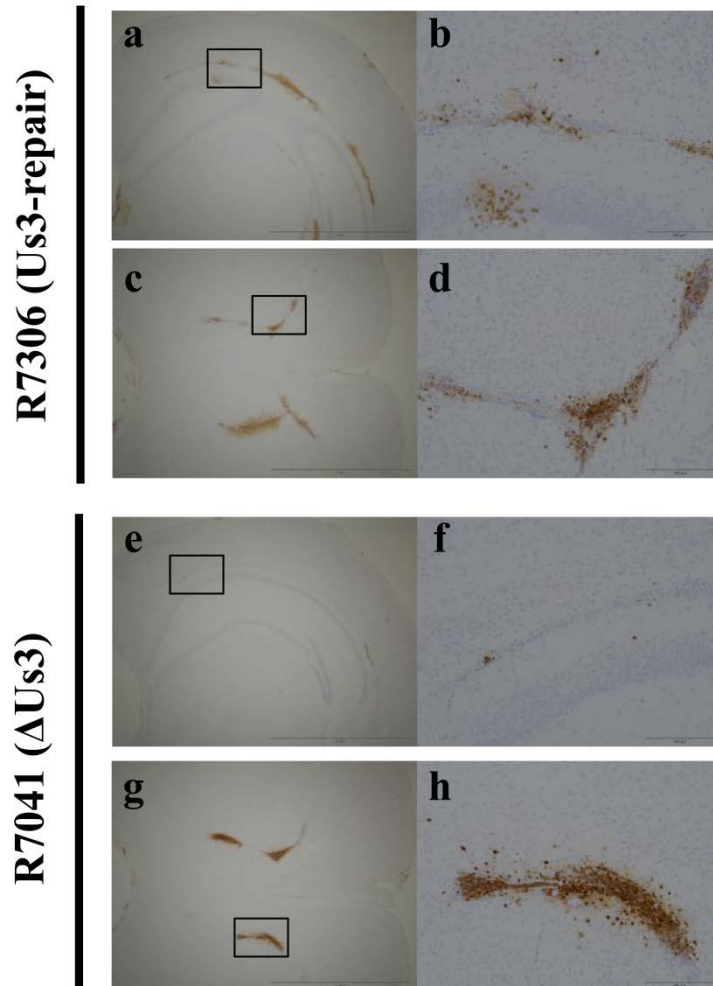


図 10. マウス脳内接種後の脳における HSV-1 抗原の広がり

5 週齢メス ICR マウスの脳内に 1×10^4 pfu の R7041 (Δ Us3)、もしくは R7306 (Us3-repair) を接種し、感染 3 日後のマウスから脳を回収し、脳における HSV-1 抗原の広がりを anti-HSV 抗体を用いた免疫組織染色法で染色し、Olympus BX41 microscope (Olympus) で観察した。なお、b、d、f、h はそれぞれ a、c、e、g を拡大したものである。

4. マウス角膜接種モデルにおいて UL13PK 活性はウイルス増殖および病原性に寄与する

UL13 の PK 活性が末梢でのウイルス増殖や病原性に与える影響を調べるために、5 週齢のメス ICR マウスに 1×10^6 pfu の YK405 (UL13-K176M)、および YK406 (UL13-repair) を角膜接種した。感染部位におけるウイルス増殖を調べるために、感染 1 日後、2 日および 5 日後にマウスの眼から涙液を回収し、含まれるウイルス力価を測定した。その結果、YK405 (UL13-K176M) を感染させたマウスは YK406 (UL13-repair) 感染マウスと比べ、3-4 倍低いウイルス力価を示した (図 11)。よって、UL13 の PK 活性は末梢での効率的なウイルス増殖に寄与していることが明らかになった。また、病原性の評価として、角膜接種 7 日後の HSK および眼周囲の皮膚病変をスコアリングした。その結果、YK405 (UL13-K176M) を感染させたマウスは YK406 (UL13-repair) 感染マウスと比べ、HSK および眼周囲の皮膚病変に著しい減弱が認められた (図 12a、b)。よって、UL13 の PK 活性はヘルペス性角膜炎と眼周囲の皮膚炎に重要な役割を果たしていることが明らかになった。さらに、角膜接種後 1 日から 14 日までマウスの生死を観察した。その結果、YK405 (UL13-K176M) を感染させたマウスは 8%しか死に至らなかったが、YK406 (UL13-repair) を感染させたマウスは 84%が死に至った (図 13)。よって、UL13 の PK 活性は角膜接種後のマウスの致死能を司ることが明らかになった。本結果より、UL13 の PK 活性は神経侵襲性、もしくはウイルスによる免疫回避に寄与していることが示唆された。

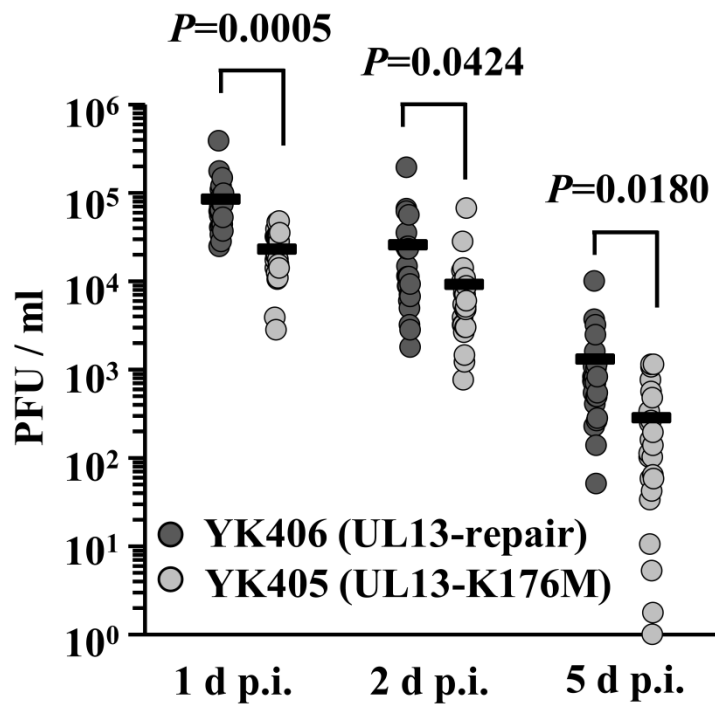


図 11. マウス角膜接種後の涙液中に含まれるウイルス力価

25 匹の 5 週齢メス ICR マウスに 1×10^6 pfu の YK405 (UL13-K176M)、もしくは YK406 (UL13-repair) を角膜接種し、感染 1、2、5 日後のマウスから回収した涙液中に含まれるウイルス力価をプラークアッセイで測定した。それぞれの点は、一匹のマウスの脳に含まれるウイルス力価を表している。図に示した線は、それぞれのグループの平均値を示した。有意性は student の t 検定により評価した。

- YK406 (UL13-repair)
- YK405 (UL13-K176M)

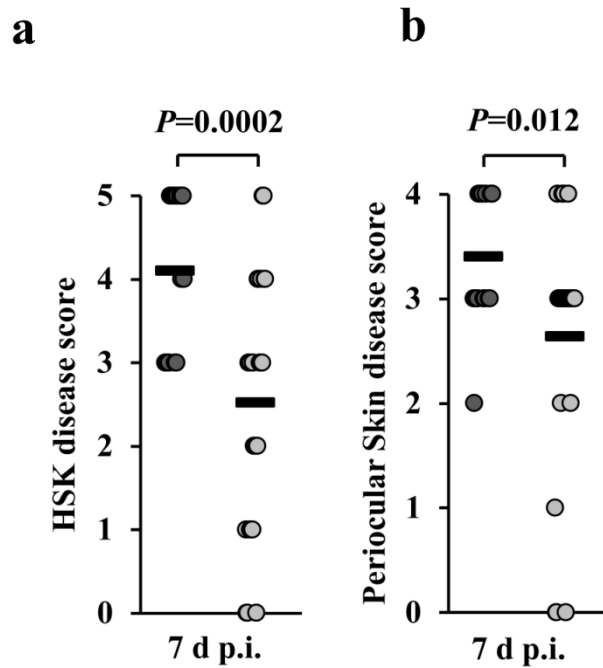


図 12. マウス角膜接種後のヘルペス性角膜炎および眼周囲の皮膚炎スコア

(a and b) 図 11 の実験の際に、感染 7 日後のマウスのヘルペス性角膜炎 (a) と眼周囲の皮膚炎 (b) の症状を観察し、スコアリングした。それぞれの点は、一匹のマウスの脳に含まれるウイルス力価を表している。図に示した線は、それぞれのグループの平均値を示した。有意性は student の t 検定により評価した。

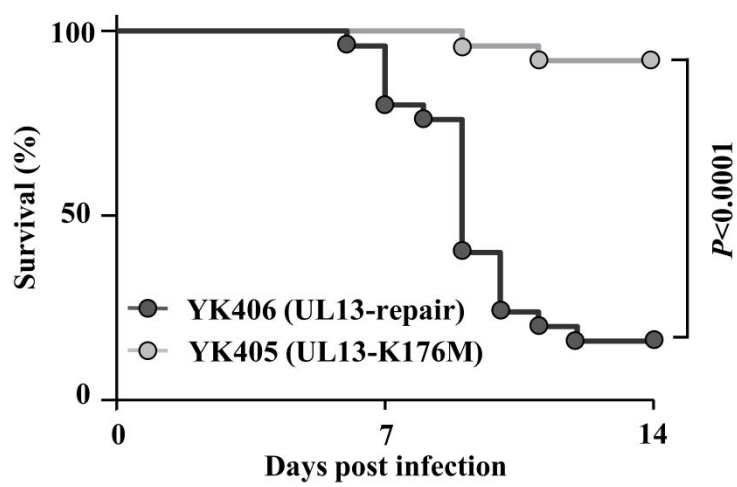


図 13. マウス角膜接種後のマウス生存率への影響

図 11 の実験の際に、感染 14 日後まで各マウスの生存数を観察した。データは各ウイルスにおけるマウスの生存率を示している。有意性は Log-rank test により評価した。

5. マウス角膜接種モデルにおいて UL13PK 活性は神経侵襲性に寄与しない

UL13 の PK 活性が角膜接種後の神経侵襲性に与える影響を調べるために、5 週齢のメス ICR マウスに 1×10^6 pfu の YK405 (UL13-K176M)、もしくは YK406 (UL13-repair) を角膜接種した。感染 1、3、5、7 および 8 日後にマウスから眼球、三叉神経節、脳を回収し、含まれるウイルス力価を測定した。その結果、眼球に含まれるウイルス力価は、感染 1 日後では YK405 (UL13-K176M) と YK406 (UL13-repair) の間で有意な差はみられなかった。一方、感染 3、5、7 および 8 日後では、YK405 (UL13-K176M) 感染マウスの眼球に含まれるウイルス力価は、YK406 (UL13-repair) 感染マウスに比べてそれぞれ 7 倍、27 倍、24 倍、1,160 倍、有意に低下していた (図 14)。三叉神経節に含まれるウイルス力価は、YK405 (UL13-K176M)、YK406 (UL13-repair) のいずれにおいても HSV-1 感染 3 日後から検出され、感染 3 日後に最も高いウイルス力価が検出された。感染 3 日後および 5 日後の三叉神経節に含まれるウイルス力価は、YK405 (UL13-K176M) と YK406 (UL13-repair) の間で有意な差は認められなかった。一方、感染 7 日後および 8 日後では、YK405 (UL13-K176M) 感染マウスの三叉神経節に含まれるウイルス力価は、YK406 (UL13-repair) 感染マウスに比べてそれぞれ 8 倍、30 倍、有意に低下していた (図 15)。脳に含まれるウイルス力価は、YK405 (UL13-K176M)、YK406 (UL13-repair) のいずれにおいても HSV-1 感染 3 日後から検出され、感染 5 日後から 7 日後にかけて最も高いウイルス力価が検出された。感染 3 日後および 5 日後の脳に含まれるウイルス力価は、YK405 (UL13-K176M) と YK406 (UL13-repair) の間で有意な差は認められなかった。一方、感染 7 日後および 8 日後では、YK405 (UL13-K176M) 感染マウスの脳に含まれるウイルス力価は、YK406 (UL13-repair) 感染マウスに比べてそれぞれ 2.4 倍、6.9 倍、有意に低下していた (図 16)。感染 3 日後や 5 日後では、三叉神経節、脳のウイルス力価にウイルス間で有意な差が認められなかったことから、UL13 の PK 活性は神経侵襲性

には寄与しないことが示唆された。また、感染 7 日後や 8 日後に、YK405 (UL13-K176M) 感染マウスの三叉神経節および脳に含まれるウイルス力価が YK406 (UL13-repair) 感染マウスに比べて有意に低下していたことから UL13 の PK 活性は HSV-1 感染細胞排除の阻害に寄与していることが示唆された。

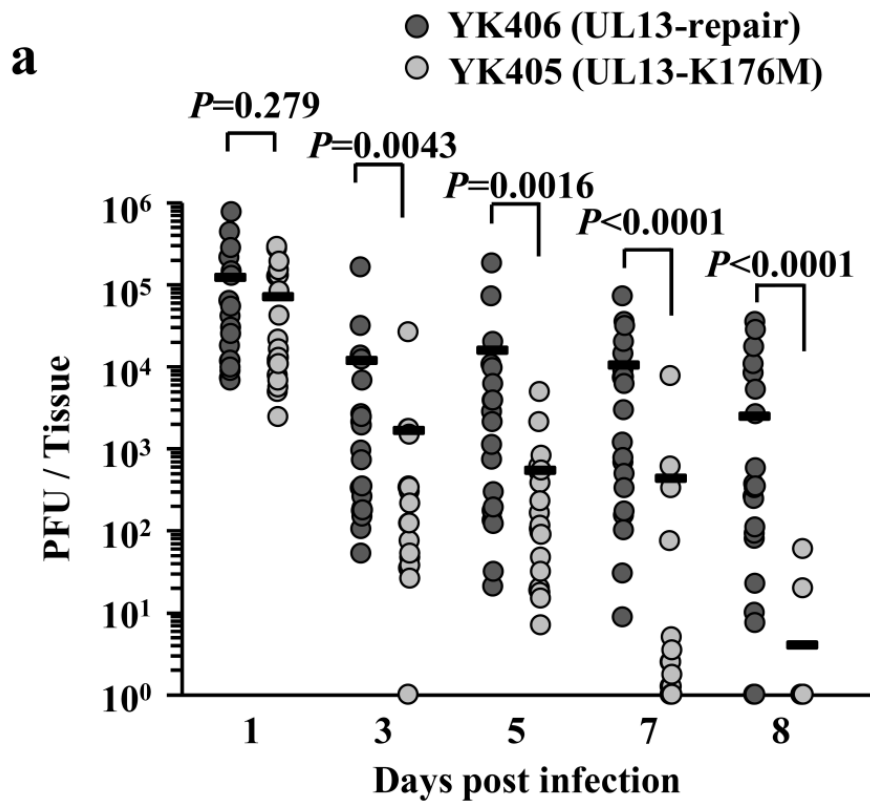


図 14. マウス角膜接種後の眼球に含まれるウイルス力価

20 匹の 5 週齢メス ICR マウスに 1×10^6 pfu の YK405 (UL13-K176M)、もしくは YK406 (UL13-repair) を角膜接種し、感染 1、3、5、7 日後および 8 日後のマウスから回収した眼球に含まれるウイルス力価をプラークアッセイで測定した。それぞれの点は、一匹のマウスの脳に含まれるウイルス力価を表している。図に示した線は、それぞれのグループの平均値を示した。有意性は Mann-Whitney test により評価した。

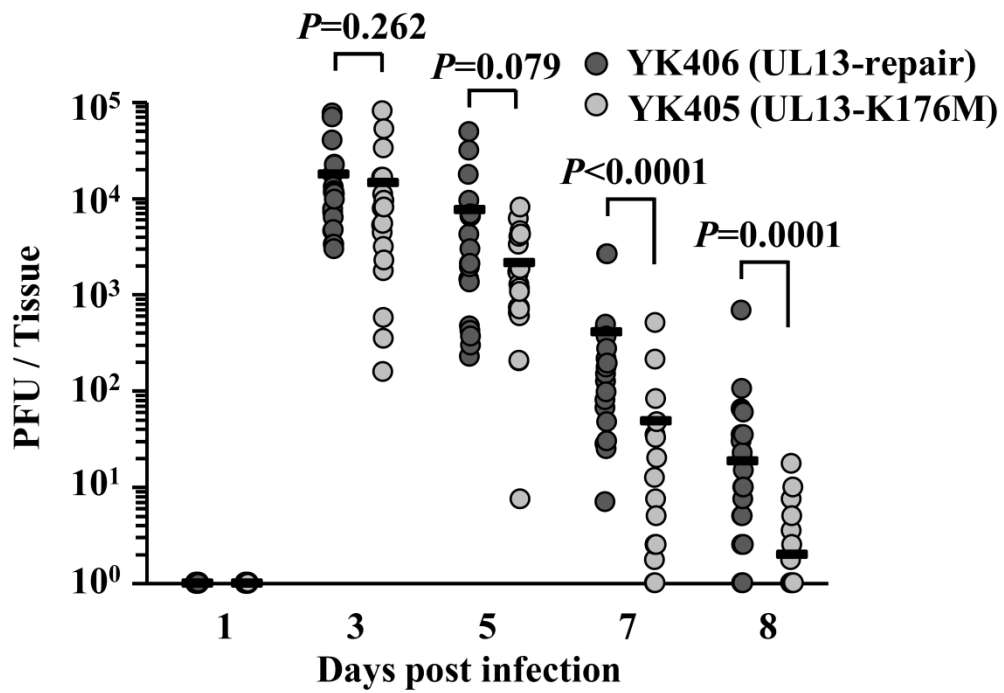


図 15. マウス角膜接種後の三叉神経節に含まれるウイルス力価

図 14 の実験の際に同時にマウスから回収した三叉神経節 に含まれるウイルス力価を
 プラークアッセイで測定した。それぞれの点は、一匹のマウスの脳に含まれるウイルス
 力価を表している。図に示した線は、それぞれのグループの平均値を示した。有意性
 は Mann-Whitney testにより評価した。

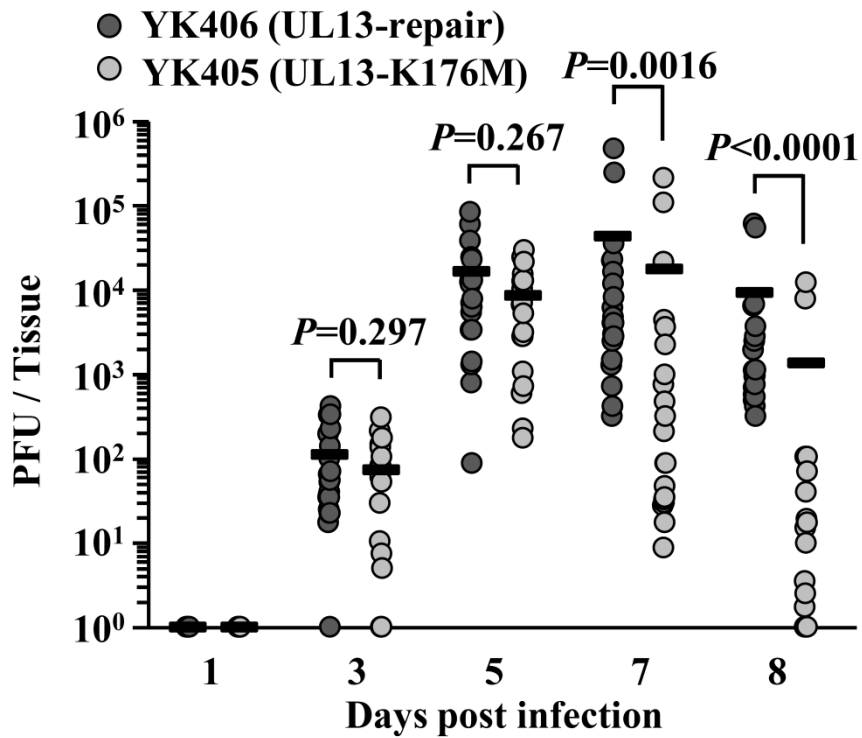


図 16. マウス角膜接種後の脳に含まれるウイルス力価

図 14 の実験の際に同時にマウスから回収した脳に含まれるウイルス力価をプラークアッセイで測定した。それぞれの点は、一匹のマウスの脳に含まれるウイルス力価を表している。図に示した線は、それぞれのグループの平均値を示した。有意性は Mann-Whitney testにより評価した。

6. マウス角膜接種モデルにおいて UL13PK 活性は脳内の感染細胞排除の抑制に寄与する

UL13 の PK 活性が角膜接種後の脳において HSV-1 抗原の広がりに寄与しているかを調べるために、5 週齢のメス ICR マウスに 1×10^6 pfu の YK405 (UL13-K176M)、および YK406 (UL13-repair) を角膜接種した。感染 5 日後および 8 日後にマウスから脳を回収し、パラフィン切片を作製し、HSV-1 抗原の観察をおこなった。その結果、感染 5 日後では YK405 (UL13-K176M)、および YK406 (UL13-repair) の HSV-1 抗原は脳幹で顕著に検出され、その広がりに顕著な違いはみられなかった (図 17)。一方、感染 8 日後では、YK406 (UL13-repair) を感染させたマウスの脳では、HSV-1 抗原が感染 5 日後で検出されたように顕著に検出された。しかし、YK405 (UL13-K176M) を感染させたマウスの脳では、HSV-1 抗原の排除が進んでおり、HSV-1 抗原はほとんど検出されなかった (図 17)。以上の結果より、UL13 の PK 活性は、角膜接種後の脳において HSV-1 抗原の広がりには寄与しないが、一度広がった HSV-1 抗原排除の抑制に寄与することが示唆された。また、感染 5 日後では、脳のウイルス力価にウイルス間で有意な差は認められないが、感染 7 日後や 8 日後では、YK405 (UL13-K176M) 感染マウスの脳に含まれるウイルス力価は YK406 (UL13-repair) 感染マウスに比べて有意に低下した結果をふまえると、UL13 の PK 活性は角膜接種後の脳において HSV-1 感染細胞を排除する宿主因子の阻害に寄与している可能性が考えられた。

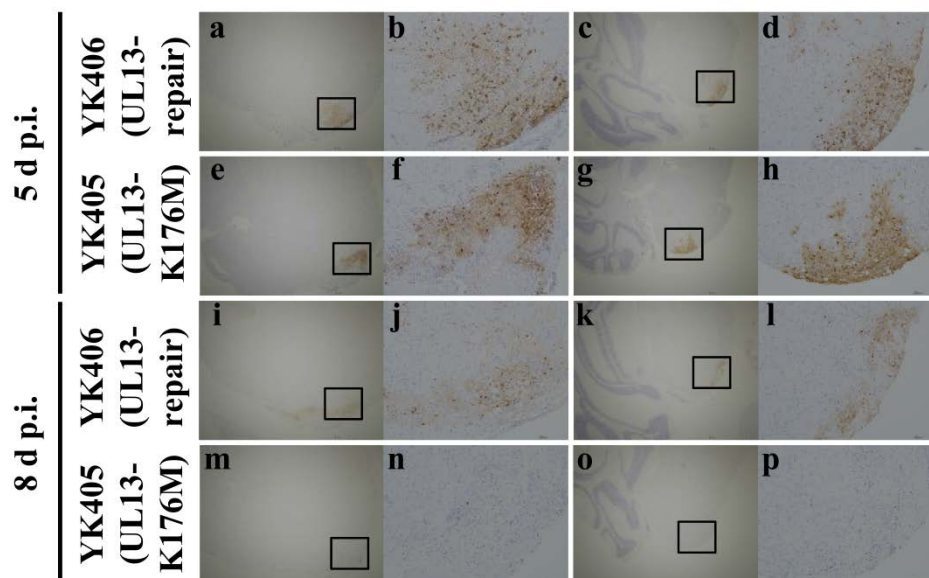


図 17. マウス角膜接種後の脳における HSV-1 抗原の広がり

5 週齢メス ICR マウスに 1×10^6 pfu の YK405 (UL13-K176M)、もしくは YK406 (UL13-repair) を角膜接種し、感染 5 日後もしくは感染 8 日後 のマウスから脳を回収し、脳における HSV-1 抗原の広がりを anti-HSV 抗体を用いた免疫組織染色法で染色し、Olympus BX41 microscope (Olympus) で観察した。なお、b、d、f、h、j、l、n、p はそれぞれ a、c、e、g、i、k、m、o を拡大したものである。

7. マウス角膜接種モデルにおいて Us3 は神経侵襲性に寄与する

脳内接種時と同様に、UL13 の PK 活性が角膜接種後の眼球、三叉神経節および脳におけるウイルス増殖、脳における HSV-1 抗原の広がり的重要性を解析する上で、Us3 の欠損株 R7041 (Δ Us3)、および復帰株 R7306 (Us3-repair) を用いた解析をおこなった。

Us3 が角膜接種後の神経侵襲性に与える影響を調べるために、5 週齢のメス ICR マウスに 1×10^6 pfu の R7041 (Δ Us3)、および R7306 (Us3-repair) を角膜接種した。感染 1、3、5、7 および 8 日後にマウスから眼球、三叉神経節、脳を回収し、含まれるウイルス力価を測定した。その結果、R7041 (Δ Us3) を感染させたマウスの眼球に含まれるウイルス力価は、R7306 (Us3-repair) を感染させたマウスに比べて継続的に低下していた。この結果は、Us3 の PK 活性が角膜接種後のマウスの眼において病態発現やウイルス増殖に重要であるという我々の研究室の報告と一致していた (42)。感染 1 日後および 3 日後において、R7041 (Δ Us3) を感染させたマウスの眼球に含まれるウイルス力価は、R7306 (Us3-repair) を感染させたマウスに比べてそれぞれ 5.1 倍、3.7 倍低下していた (図 18)。また、感染 5 日後および 7 日後において、R7041 (Δ Us3) と R7306 (Us3-repair) を感染させたマウスの眼球におけるウイルス力価の違いはそれぞれ 21 倍、62 倍とより拡大する結果となった (図 18)。

次に、角膜接種後のマウスの三叉神経節におけるウイルス増殖について解析した。R7306 (Us3-repair) を感染させたマウスの三叉神経節におけるウイルス力価は感染 3 日目でピークに達し、その後徐々に減少した (図 19)。同様に、R7041 (Δ Us3) を感染させたマウスの三叉神経節におけるウイルス力価も感染 3 日目でピークに達し、その後徐々に減少した (図 19)。しかし、感染 3 日後および 5 日後における R7041 (Δ Us3) 感染マウスの三叉神経節のウイルス力価は R7306 (Us3-repair) 感染マウスに比べてそれぞれ 960

倍、2900倍と著しく低下していた（図19）。さらに、R7041 (Δ Us3) 感染マウスは感染7日後や8日後では感染性ウイルスは検出できなかったが、R7306 (Us3-repair) 感染マウスでは検出可能であった（図19）。これらの結果は HSV-1 Us3 が角膜接種後のマウスの三叉神経節におけるウイルス増殖や眼から三叉神経節へのウイルスの輸送に重要であることを示唆している。

次に、角膜接種後のマウスの脳におけるウイルス増殖について解析した。R7306 (Us3-repair) を感染させたマウスの脳におけるウイルス力価は感染3日目から検出可能であり、感染7日後でピークに達した（図20）。一方、R7041 (Δ Us3) を感染させたマウスでは感染性ウイルスは検出不可能であった（図20）。これらの結果と一致するように、R7306 (Us3-repair) を感染させたマウスの脳では HSV-1 抗原が顕著に検出されたが、R7041 (Δ Us3) を感染させたマウスでは HSV-1 抗原は検出できなかった（図21）。

以上の結果より、Us3 はマウスの眼から脳へのウイルスの侵襲性に重要であることが明らかになった。また、UL13 は Us3 とは異なるメカニズムで病原性発現に寄与していることが示唆された。

この Us3 に関する研究結果は、学術雑誌 *Microbiology and Immunology* 58, 31-37. (2014) に掲載された (86)。(<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mim.v58.1/issuetoc>)

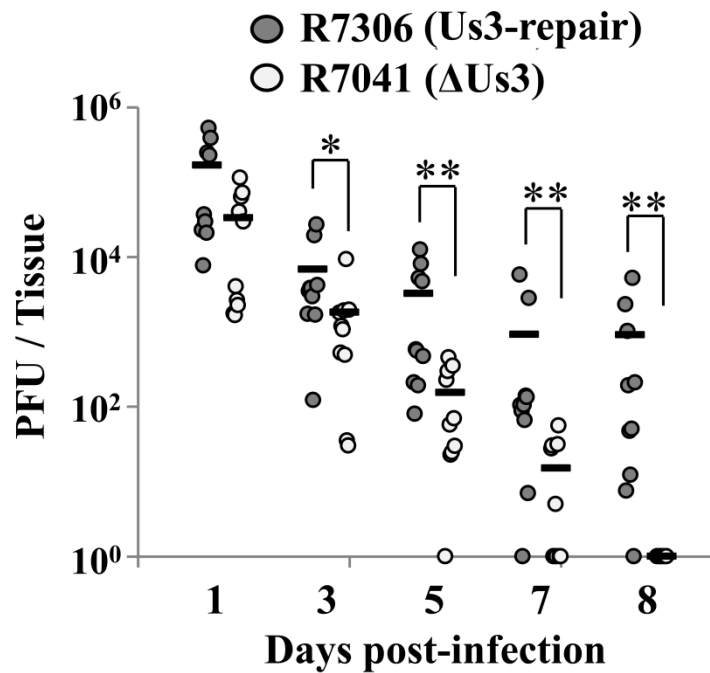


図 18. マウス角膜接種後の眼球に含まれるウイルス力価

10 匹の 5 週齢メス ICR マウスに 1×10^6 pfu の R7041 (Δ Us3)、もしくは R7306 (Us3-repair) を角膜接種し、感染 1、3、5、7 日後および 8 日後のマウスから回収した眼球に含まれるウイルス力価をプラークアッセイで測定した。それぞれの点は、一匹のマウスの脳に含まれるウイルス力価を表している。図に示した線は、それぞれのグループの平均値を示した。有意性は Mann-Whitney test により評価した。*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

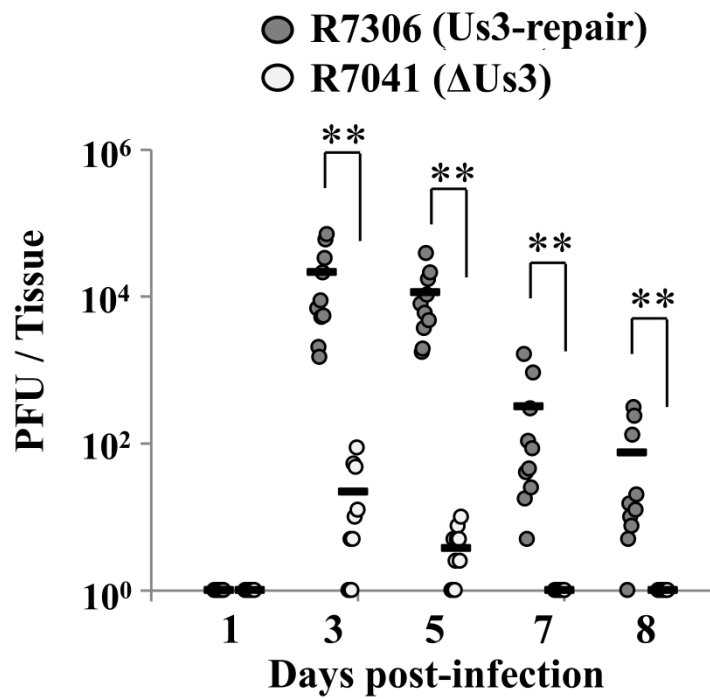


図 19. マウス角膜接種後の三叉神経節に含まれるウイルス力価

図 18 の実験の際に同時にマウスから回収した三叉神経節に含まれるウイルス力価をブ
 ラークアッセイで測定した。それぞれの点は、一匹のマウスの脳に含まれるウイルス力
 価を表している。図に示した線は、それぞれのグループの平均値を示した。有意性
 は Mann-Whitney testにより評価した。**, $P < 0.01$.

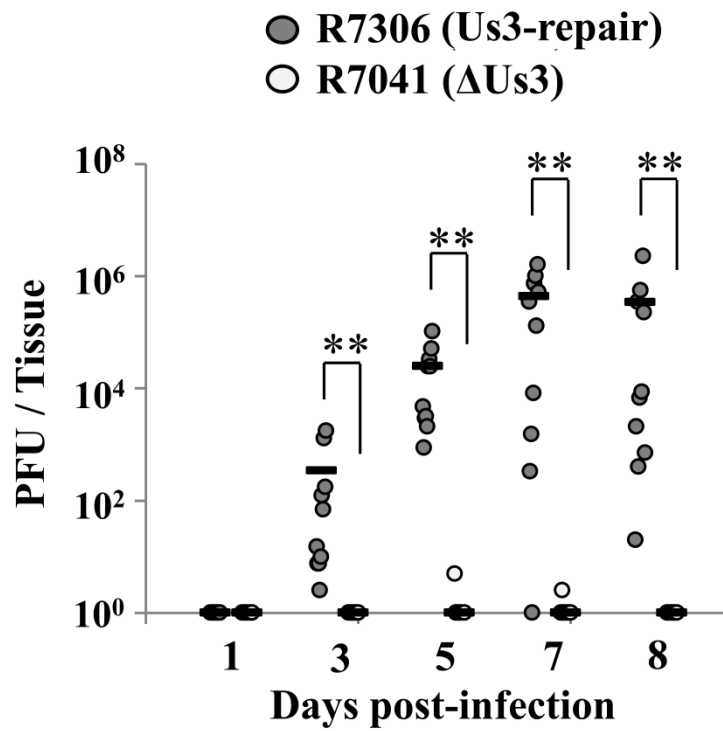


図 20. マウス角膜接種後の脳に含まれるウイルス力価

図 18 の実験の際に同時にマウスから回収した脳に含まれるウイルス力価をプラークアッセイで測定した。それぞれの点は、一匹のマウスの脳に含まれるウイルス力価を表している。図に示した線は、それぞれのグループの平均値を示した。有意性は Mann-Whitney testにより評価した。**, $P < 0.01$.

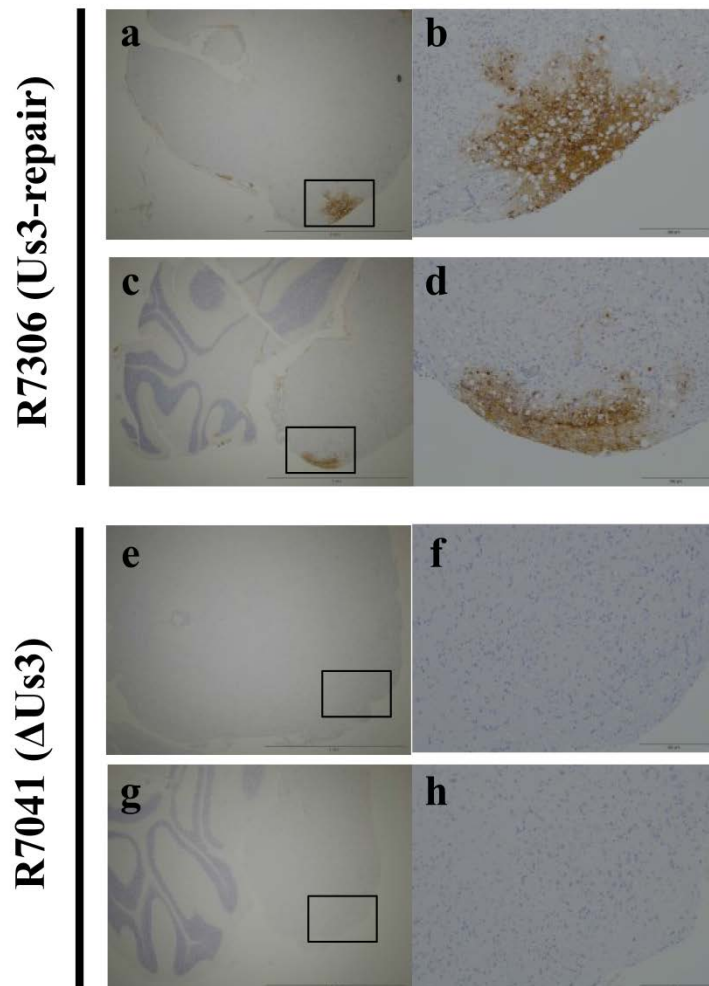


図 21. マウス角膜接種後の脳における HSV-1 抗原の広がり

5 週齢メス ICR マウスに 1×10^6 pfu の R7041 (Δ Us3)、もしくは R7306 (Us3-repair) を角膜接種し、感染 3 日後のマウスから脳を回収し、脳における HSV-1 抗原の広がりを anti-HSV 抗体を用いた免疫組織染色法で染色し、Olympus BX41 microscope (Olympus) で観察した。なお、b、d、f、h はそれぞれ a、c、e、g を拡大したものである。

II. UL13 の PK 活性は脳感染部位での CXCL9 の発現を抑制し、CD8⁺ T 細胞の浸潤を阻害する

1. UL13PK 活性は CD8⁺ T 細胞によるウイルス感染細胞排除の抑制に寄与する

ここまでの結果から、UL13 の PK 活性は角膜接種後の脳における HSV-1 感染細胞排除の抑制に寄与していることが示唆された。次に、その作用機序を明らかにすることを試みた。そこで、脳内接種と角膜接種では、HSV-1 が脳内に侵入するタイミングに違いがあることに着目し、UL13 の PK 活性が CD8⁺ T cell の機能を阻害することで HSV-1 感染細胞排除の抑制に寄与するという仮説を立て、これを検証するために、CD8 α 抗体による CD8⁺ T cell depletion 実験をおこなった。この仮説を支持するように、Lang らは、マウス HSV-1 角膜接種モデルにおいて、末梢から脳に侵入したウイルスの排除に CD8⁺ T 細胞が重要であることを、CD8 α ^{-/-} マウスを用いた解析により明らかにしている (87)。まず、5 週齢のメス ICR マウスの腹腔に抗 CD8 α 抗体を接種することにより、マウスから CD8⁺ T 細胞を depletion した。初回の抗体接種から 2 日後に 1×10^6 pfu の YK405 (UL13-K176M)、もしくは YK406 (UL13-repair) を角膜接種した。角膜接種後 1 日から 21 日までマウスの生死を観察した。その結果、マウスの生存率は、YK406 (UL13-repair) を感染させたマウスでは、CD8⁺ T 細胞を depletion したマウスとコントロールのマウスとの間に有意な差はみられなかった (図 22a)。一方、YK405 (UL13-K176M) を感染させたマウスでは、コントロールのマウスの生存率は 83%であったのに対して、CD8⁺ T 細胞を depletion したマウスの生存率は 54%であり、生存率が有意に低下した (図 22b)。

次に、CD8⁺ T 細胞を depletion したマウスとコントロールのマウスに 1×10^6 pfu の YK405 (UL13-K176M)、もしくは YK406 (UL13-repair) を角膜接種し、角膜接種 5 日後および 7 日後にマウスから脳を回収し、含まれるウイルス力価を測定した。角膜接種

5 日後では、YK405 (UL13-K176M) と YK406 (UL13-repair) において、CD8⁺ T 細胞を depletion したマウスとコントロールのマウスとの間に有意な差は認められなかった (図 23a、b)。一方、感染 7 日後では、YK405 (UL13-K176M) 感染において、コントロールのマウスで認められたウイルス力価の低下が CD8⁺ T 細胞 depletion により回復することが認められた (図 23b)。YK406 (UL13-repair) では感染 7 日後でも CD8⁺ T 細胞 depletion によるウイルス増殖への変化は認められなかった (図 23a)。

さらに、免疫組織染色によって HSV-1 抗原の排除への影響を検証した。CD8⁺ T 細胞を depletion したマウスとコントロールのマウスに 1×10^6 pfu の YK405 (UL13-K176M)、もしくは YK406 (UL13-repair) を角膜接種し、角膜接種 5 日後および 7 日後にマウスから脳を回収し、凍結切片を作製した後、抗 HSV-1 抗体で染色し、HSV-1 抗原を検出した。角膜接種 5 日後では、YK405 (UL13-K176M) と YK406 (UL13-repair) において、CD8⁺ T 細胞を depletion したマウスとコントロールのマウスとの間に HSV-1 抗原の広がりには顕著な差は認められなかった (図 24)。一方、感染 7 日後では、YK405 (UL13-K176M) 感染において、コントロールのマウスでは HSV-1 抗原の広がりの減少が認められたが、CD8⁺ T 細胞 depletion により回復することが認められた (図 24)。一方、YK406 (UL13-repair) では感染 7 日後でも CD8⁺ T 細胞 depletion による HSV-1 抗原の広がりへの影響は認められなかった (図 24)。

以上の結果から、UL13 の PK 活性は、CD8⁺ T 細胞による脳内のウイルス感染細胞排除の抑制に寄与し、その結果、効率的なウイルス増殖やウイルスの広がり、およびマウス致死性に寄与していることが示唆された。

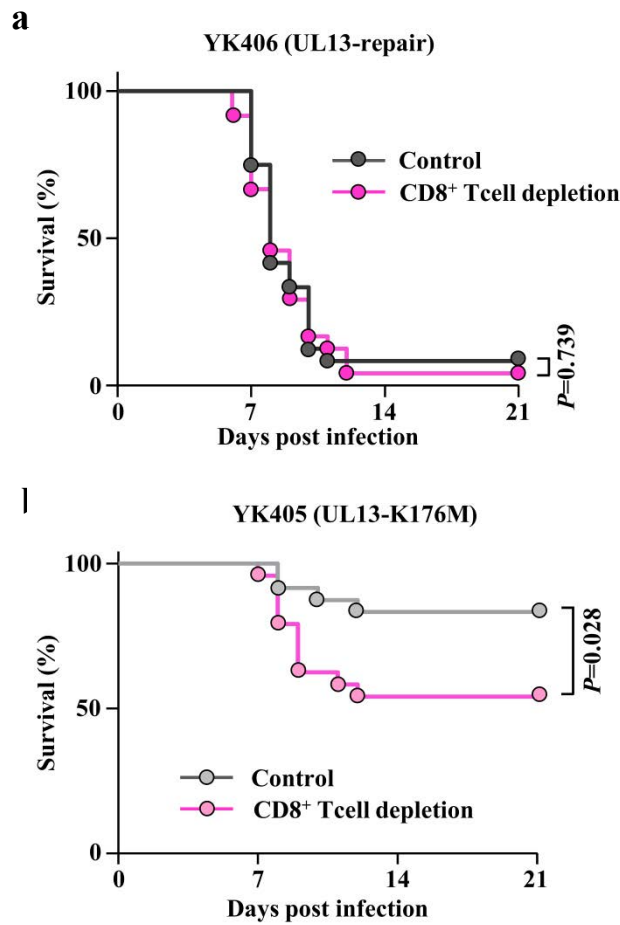


図 22. CD8⁺ T細胞を depletion したマウスへの HSV-1 角膜接種後のマウス生存率への影響

(a and b) 24 匹の 5 週齢メス ICR マウスの腹腔に 200 μ g の抗 CD8 α 抗体を接種し、2 日後に 1×10^6 pfu の YK406 (UL13-repair) (a)、もしくは YK405 (UL13-K176M) (b) を角膜接種した。感染 21 日後まで各マウスの生存数を観察した。なお、抗体接種は 2 日おきに継続しておこなった。データは各ウイルスにおけるマウスの生存率を示している。有意性は Log-rank test により評価した。

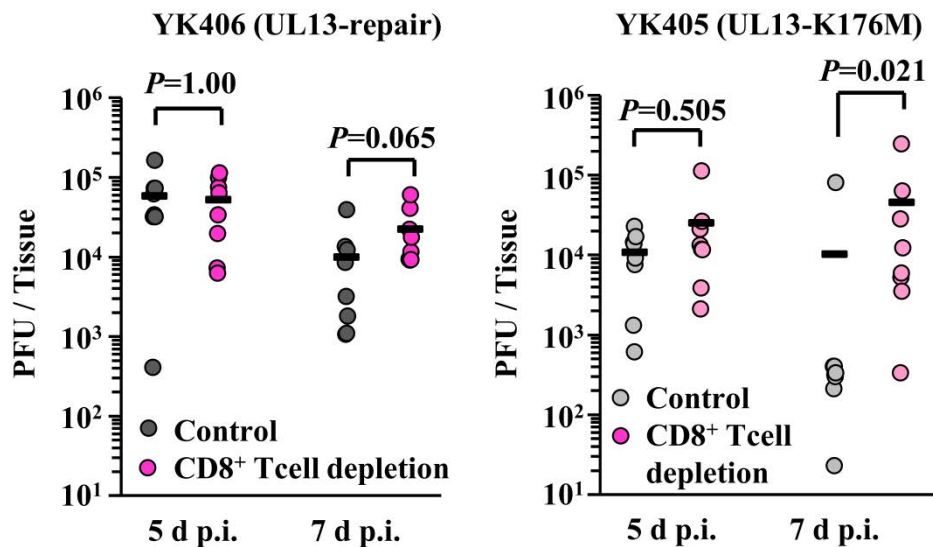


図 23. CD8⁺ T細胞を depletion したマウスへの HSV-1 角膜接種後の脳でのウイルス増殖への影響

(a and b) 8 匹の 5 週齢メス ICR マウスの腹腔に 200 μg の抗 CD8α 抗体を接種し、2 日後に 1 x 10⁶ pfu の YK406 (UL13-repair) (a)、もしくは YK405 (UL13-K176M) (b) を角膜接種した。感染 5 日後および 7 日後のマウスから回収した脳に含まれるウイルス力価をプラークアッセイで測定した。それぞれの点は、一匹のマウスの脳に含まれるウイルス力価を表している。図に示した線は、それぞれのグループの平均値を示した。なお、抗体接種は 2 日おきに継続しておこなった。有意性は Mann-Whitney test により評価した。

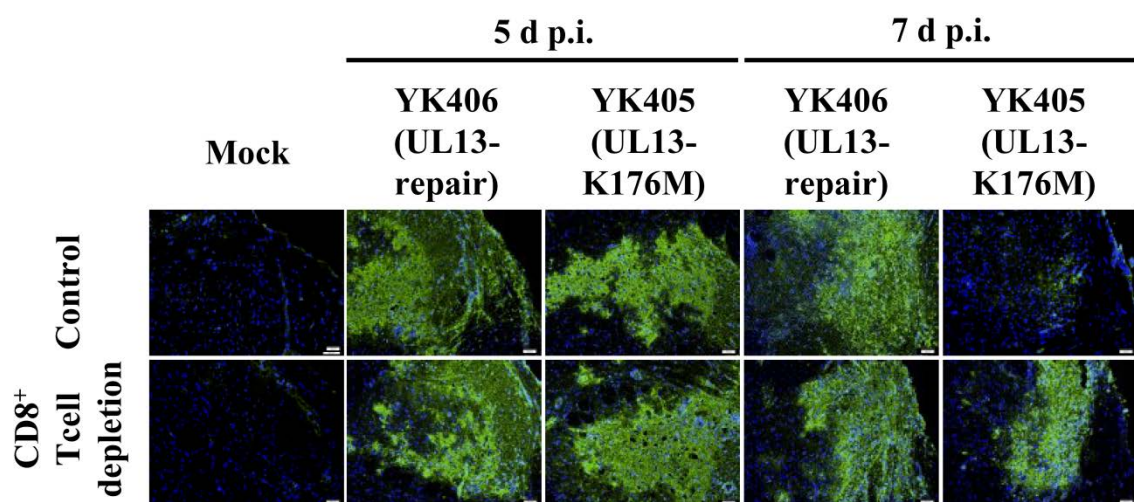


図 24. CD8⁺ T 細胞を depletion したマウスへの HSV-1 角膜接種後の脳における HSV-1 抗原排除への影響

5 週齢メス ICR マウスの腹腔に 200 μ g の抗 CD8 α 抗体を接種し、2 日後に 1×10^6 pfu の YK406 (UL13-repair)、もしくは YK405 (UL13-K176M) を角膜接種した。感染 5 日後および 7 日後のマウスから脳を回収し、脳における HSV-1 抗原の広がりをも anti-HSV 抗体を用いた免疫組織染色法で染色し、Olympus IX71 Microscope (Olympus) で観察した。なお、抗体接種は 2 日おきに継続しておこなった。

2. UL13PK 活性は MHC class I を介した抗原提示に影響しない

HSV は CD8⁺ T 細胞による傷害の回避機構として、major histocompatibility complex class I (MHC class I) を介した抗原提示の阻害機構を保持していることが報告されている (12, 64-66, 68, 88)。そこで、UL13 の PK 活性も他のウイルス因子と同様に、MHC class I を介した抗原提示を阻害することにより CD8⁺ T 細胞による傷害の回避に寄与しているかを検証した。HSV 2.3.2E2 CTL クローンは、HSV 特異的な CTL ハイブリドーマであり、haplotype H-2Kb のマウス MHC class I に結合する HSV 抗原である gB498-505 epitope (SSIEFARL) を認識し活性化する。さらにこの CTL クローンは、CTL 活性化のマーカーである IL-2 プロモーターの下流に β-ガラクトシダーゼをコードしており、この β-ガラクトシダーゼの産生量を測定することにより、各感染細胞に対する CTL 活性を調べることができる。C57BL/6 (haplotype; H-2b) 由来の MEF 細胞に、HSV-1 (F) (wild-type)、YK405 (UL13-K176M)、YK406 (UL13-repair)、R7041 (ΔUs3)、もしくは R7306 (Us3-repair) を感染させ、12 時間後に CTL クローンと混ぜ、β-ガラクトシダーゼの発現量を測定した。Us3 は CTL 回避に寄与することが報告されているため (64-66, 68)、Us3 欠損株である R7041 (ΔUs3) とその復帰株 R7306 (Us3-repair) をコントロールのウイルスとして使用した。その結果、R7041 (ΔUs3) 感染細胞と混合した CTL クローンは、HSV-1 (F) (wild-type) および R7306 (Us3-repair) 感染細胞と混合した CTL クローンに比べて著しい活性化を示した (図 25)。一方 YK405 (UL13-K176M) 感染細胞と混合した CTL クローンは、HSV-1 (F) (wild-type) および YK406 (UL13-repair) 感染細胞と混合した CTL クローンと同程度の活性化を示した (図 25)。

以上の結果から、UL13 の PK 活性は感染細胞において MHC class I を介した抗原提示の阻害には寄与しないことが示唆された。よって、UL13 の PK 活性による CD8⁺ T 細

胞からの回避には MHC class I を介した抗原提示の阻害とは異なる作用機序によることが示唆された。

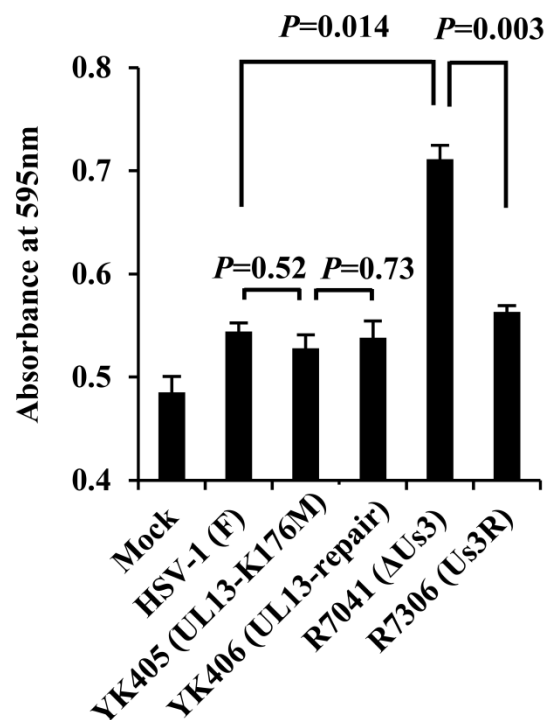


図 25. 各感染細胞に対する CTL 活性

MEF 細胞に非感染また HSV-1 (F) (wild-type)、 YK405 (UL13-K176M)、 YK406 (UL13-repair)、 R7041 (Δ Us3)、 R7306 (Us3-repair) を MOI 1 で感染し、12 時間後に 5×10^4 個の HSV 特異的 CTL クローンと混合した。さらに 12 時間培養後、CPRG 溶液を加え、 β -galactosidase の発現量を調べた。グラフには triplicate の実験で得られた結果の平均値と標準誤差を示した。有意性は student の t 検定により評価した。

3. UL13PK 活性は脳感染部位への CD8⁺ T 細胞浸潤の阻害に寄与する

UL13 の PK 活性による CD8⁺ T 細胞からの回避機構として、UL13 の PK 活性が脳感染部位への CD8⁺ T 細胞浸潤の阻害に寄与しているのではないかという仮説を立てた。5 週齢のメス ICR マウスに 1×10^6 pfu の YK405 (UL13-K176M)、もしくは YK406 (UL13-repair) を角膜接種した。感染 5 日後および 7 日後にマウスから脳幹、顎下腺リンパ節、脾臓を回収した。Depletion の確認実験時と同様の方法で脾臓および顎下腺リンパ節から白血球を回収した。また、脳幹に含まれる白血球は percoll を用いて分離、回収した。これらの細胞を抗 CD8 α 抗体、抗 CD4 抗体および抗 CD45 抗体で染色し、フローサイトメトリーに供することにより、CD8⁺ T 細胞と CD4⁺ T 細胞の数をそれぞれ算出した。

その結果、感染 5 日後のマウスの脳幹、顎下腺リンパ節および脾臓に含まれる CD8⁺ T 細胞の数は YK405 (UL13-K176M) および YK406 (UL13-repair) の間で有意な差は認められなかった (図 26a-c)。一方、感染 7 日後のマウスでは、YK405 (UL13-K176M) 感染マウスの脳幹に含まれる CD8⁺ T 細胞の数は YK406 (UL13-repair) 感染マウスに比べて有意に増加した (図 26a)。よって UL13 の PK 活性は、脳感染部位への CD8⁺ T 細胞の浸潤抑制に寄与していることが示唆された。また、顎下腺リンパ節に含まれる CD8⁺ T 細胞の数は YK405 (UL13-K176M) および YK406 (UL13-repair) の間で有意な差は認められなかった (図 26b)。しかし、YK405 (UL13-K176M) を感染させたマウスの脾臓中の CD8⁺ T 細胞の数は YK406 (UL13-repair) を感染させたマウスに比べて増加する傾向がみられた (図 26c)。

一方、感染 5 日後のマウスの脳幹、顎下腺リンパ節および脾臓に含まれる CD4⁺ T 細胞の数は YK405 (UL13-K176M) と YK406 (UL13-repair) の間で有意な差は認められなかった (図 27a-c)。一方、感染 7 日後のマウスでは、YK405 (UL13-K176M) 感染マウス

の脳幹に含まれる CD4⁺ T 細胞の数は YK406 (UL13-repair) 感染マウスに比べて増加する傾向がみられた (図 27a)。顎下腺リンパ節に含まれる CD4⁺ T 細胞の数は YK405 (UL13-K176M) および YK406 (UL13-repair) の間で有意な差は認められなかった (図 27b)。しかし、YK405 (UL13-K176M) を感染させたマウスの脾臓中の CD4⁺ T 細胞の数は YK406 (UL13-repair) を感染させたマウスに比べて有意な増加が認められた (図 27c)。

次に、CD8⁺ T 細胞が HSV-1 感染部位に実際に浸潤しているかを検証するために凍結切片を用いた病理解析をおこなった。5 週齢のメス ICR マウスに 1×10^6 pfu の YK405 (UL13-K176M)、および YK406 (UL13-repair) を角膜接種し、感染 7 日後にマウスから脳幹を回収した。凍結切片作製後、抗 HSV-1 抗体および抗 CD8 α 抗体で染色し、それぞれの局在を観察した。その結果、YK405 (UL13-K176M)、および YK406 (UL13-repair) を感染させたマウスの脳幹の HSV-1 感染部位では、いずれのマウスでも HSV-1 抗原と重なるように CD8⁺ T 細胞の浸潤が確認された (図 28)。

以上の結果から、UL13 の PK 活性は脳感染部位への CD8⁺ T 細胞および CD4⁺ T 細胞の浸潤の阻害に寄与していることが示唆された。一方で、UL13 の PK 活性は脾臓における CD8⁺ T 細胞および CD4⁺ T 細胞の数に影響を与えることから、これらが脳に浸潤する CD8⁺ T 細胞および CD4⁺ T 細胞の数にも影響を与えている可能性も考えられる。

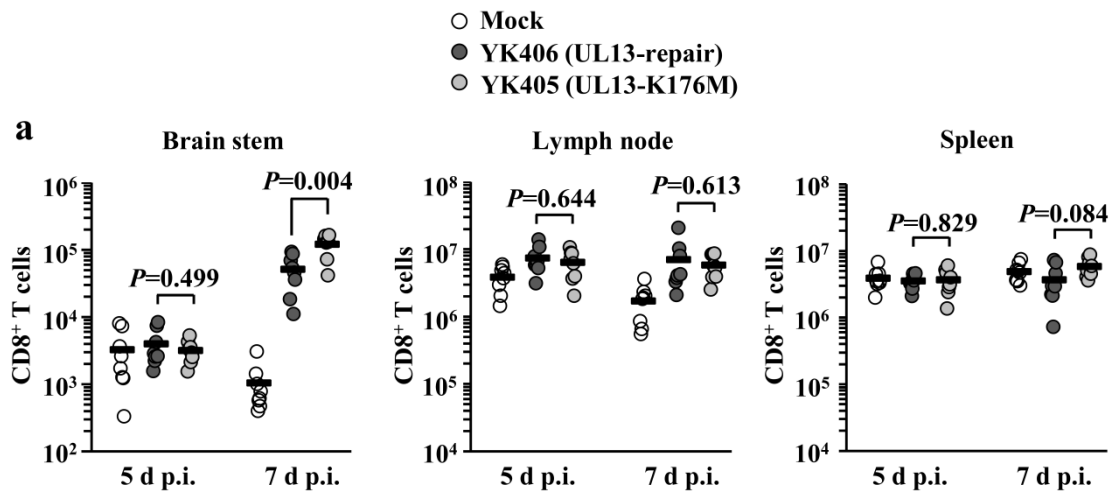


図 26. マウス角膜接種後の脳幹、顎下腺リンパ節、脾臓における CD8⁺ T 細胞数

(a,b and c) 8 匹の 5 週齢メス ICR マウスに非感染、 1×10^6 pfu の YK406 (UL13-repair)、もしくは YK405 (UL13-K176M) を角膜接種した。感染 5 日後および 7 日後のマウスから回収した脳幹 (a)、顎下腺リンパ節 (b)、脾臓 (c) に含まれる CD8⁺ T 細胞の数をフローサイトメーターを用いて測定した。それぞれの点は、一匹のマウスの各組織に含まれる CD8⁺ T 細胞の数を表している。図に示した線は、それぞれのグループの平均値を示した。有意性は student の t 検定により評価した。

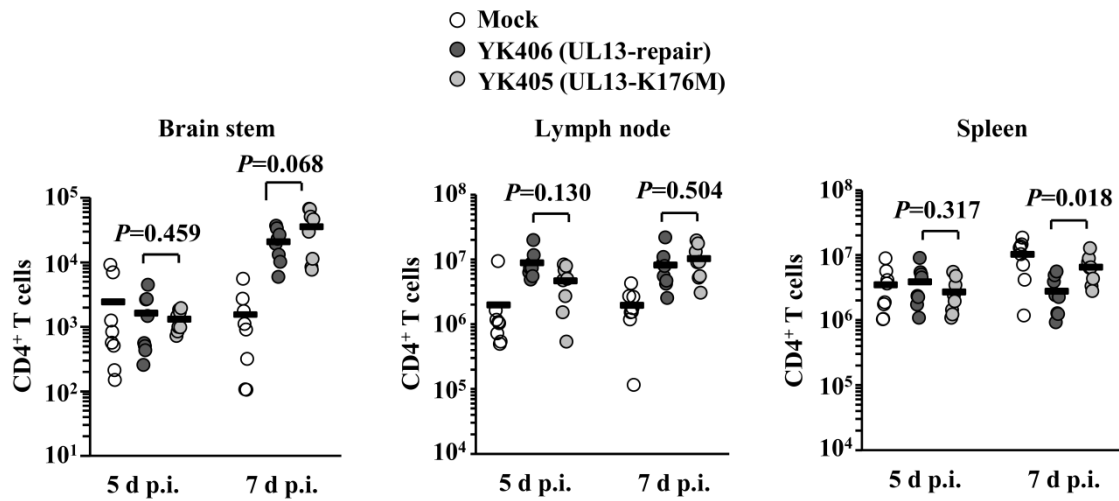


図 27. マウス角膜接種後の脳幹、顎下腺リンパ節、脾臓における CD4⁺ T 細胞数

(a,b and c) 図 26 の実験の際に、脳幹 (a)、顎下腺リンパ節 (b)、脾臓 (c) に含まれる CD4⁺ T 細胞の数をフローサイトメーターを用いて測定した。それぞれの点は、一匹のマウスの各組織に含まれる CD4⁺ T 細胞の数を表している。図に示した線は、それぞれのグループの平均値を示した。有意性は student の t 検定により評価した。

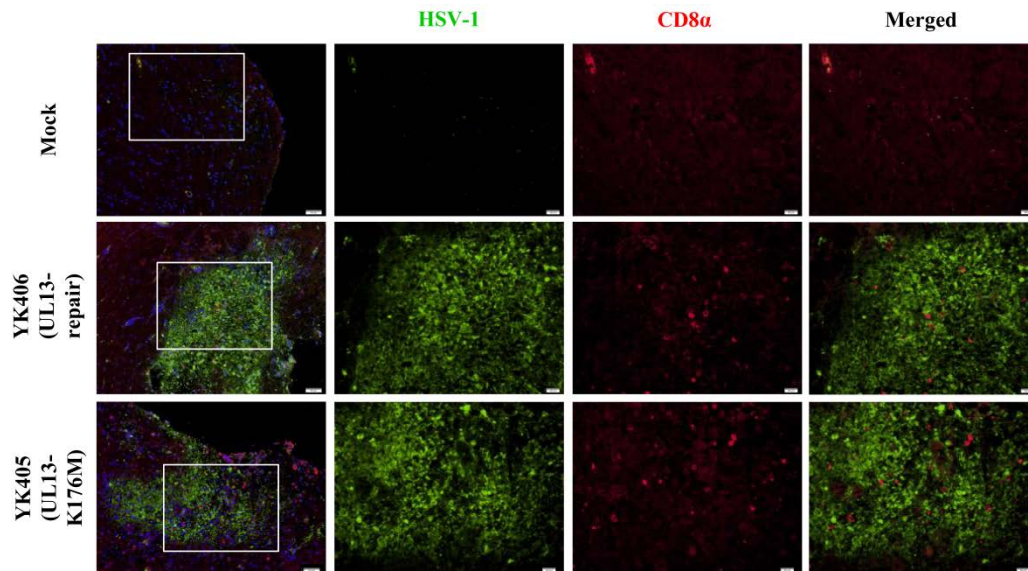


図 28. マウス角膜接種後の脳感染部位における CD8⁺ T 細胞浸潤の影響

5 週齢メス ICR マウスに非感染、 1×10^6 pfu の YK406 (UL13-repair)、もしくは YK405 (UL13-K176M) を角膜接種した。感染 7 日後のマウスから脳を回収し、脳感染部位における HSV-1 抗原および CD8⁺ T 細胞の浸潤を抗 HSV 抗体 (green) もしくは抗 CD8 α 抗体 (red) を用いた免疫組織染色法で染色し、Olympus IX71 Microscope (Olympus) で観察した。

4. UL13PK 活性は脳感染部位への HSV-1 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞浸潤の障害に寄与する

図26および図27の結果から、UL13のPK活性が脳感染部位へのCD8⁺ T細胞およびCD4⁺ T細胞浸潤の障害に寄与している可能性が示唆された。次に、これらのT細胞がHSV-1抗原特異的なIFN- γ 産生細胞であるかをELISPOT assayにより評価した。図26で回収した脳幹、顎下腺リンパ節、脾臓に含まれる白血球を熱不活化したHSV-1抗原と混合し、抗IFN- γ 抗体をコートしたウェル上で培養し、3日後に培養液を除去し、ビオチン化抗IFN- γ 抗体、酵素標識ストレプトアビジンで反応後、基質を添加して発色したスポット数をカウントした。その結果、感染5日後のマウスの脾臓、顎下腺リンパ節および脳幹に含まれるHSV-1抗原特異的なIFN- γ 産生細胞の数はYK405 (UL13-K176M) およびYK406 (UL13-repair) の間で有意な差は認められなかった (図29a-c)。一方、感染7日後のマウスでは、YK405 (UL13-K176M) 感染マウスの脳幹および脾臓に含まれるHSV-1抗原特異的なIFN- γ 産生細胞の数はYK406 (UL13-repair) 感染マウスに比べて有意に増加した (図29a, c)。また、顎下腺リンパ節に含まれるHSV-1抗原特異的IFN- γ 産生細胞数はYK405 (UL13-K176M) およびYK406 (UL13-repair) の間で有意な差は認められなかった (図29b)。

以上の結果より、UL13のPK活性は、脳感染部位へのHSV-1抗原特異的IFN- γ 産生細胞の浸潤抑制に寄与していることが示唆された。一方で、YK405 (UL13-K176M) 感染マウスの脾臓におけるHSV-1抗原特異的IFN- γ 産生細胞の数もYK406 (UL13-repair) 感染マウスに比べて有意に増加していたことから、脾臓におけるこれらの細胞数の違いが脳幹におけるHSV-1抗原特異的IFN- γ 産生細胞の数に影響していることも示唆された。

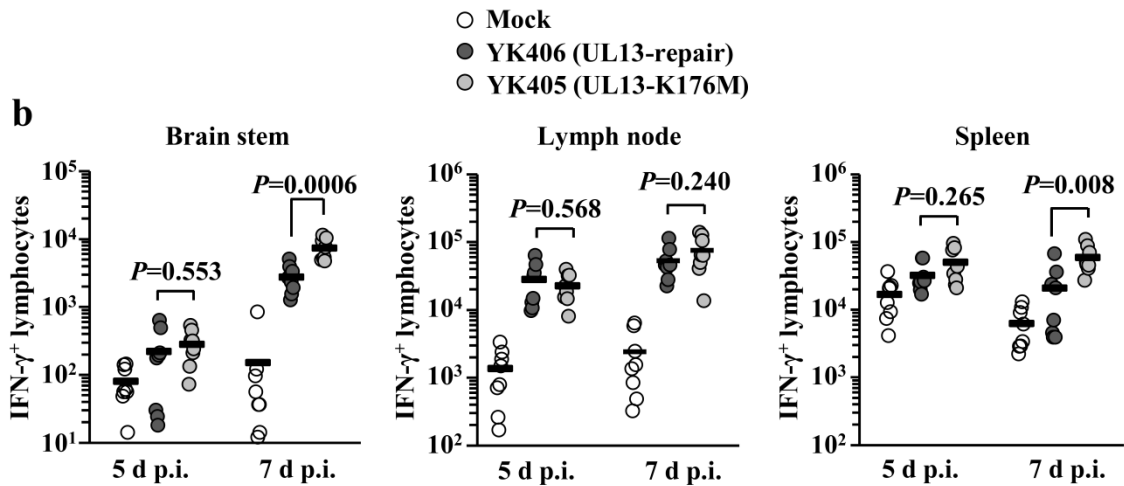


図 29. マウス角膜接種後の脳幹、顎下腺リンパ節、脾臓における HSV-1 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞数

(a,b and c) 図 26 の実験の際に、脳幹 (a)、顎下腺リンパ節 (b)、脾臓 (c) に含まれる HSV-1 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞 の数を ELISPOT assay によって測定した。それぞれの点は、一匹のマウスの各組織に含まれる HSV-1 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞 の数を表している。図に示した線は、それぞれのグループの平均値を示した。有意性は student の t 検定により評価した。

5. UL13PK 活性は脳感染部位でのケモカイン CXCL9 発現の阻害に寄与する

図 26-29 の結果より、UL13 の PK 活性による CD8⁺ T 細胞からの回避機構として、UL13 の PK 活性が脳感染部位への HSV-1 抗原特異的に IFN- γ を産生する CD8⁺ T 細胞浸潤の阻害に寄与していることが示唆された。次に、これらの T 細胞浸潤のメカニズムを明らかにするために、HSV-1 感染マウスの脳幹におけるケモカインおよびサイトカインの mRNA 発現量を解析した。これまでに、HSV-1 感染部位への T 細胞の浸潤には T 細胞に発現する chemokine (C-X-C motif) receptor 3 (CXCR3)、および CXCR3 のリガンドである chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9) および CXCL10 の発現が重要であることが報告されている (89, 90)。

そこで、5 週齢のメス ICR マウスに 1×10^6 pfu の YK405 (UL13-K176M)、もしくは YK406 (UL13-repair) を角膜接種し、感染 3、5 および 7 日後にマウスから脳幹を回収した。これらの脳幹から RNA を抽出し、TaqMan プローブを用いた quantitative RT-PCR に供した。その結果、感染 3 日後および 5 日後のケモカイン CXCL9 および CXCL10、サイトカイン IL-6 の発現量に YK405 (UL13-K176M) と YK406 (UL13-repair) の間で有意な差は認められなかった (図 30a-c)。しかし、感染 7 日後において、ケモカイン CXCL10 およびサイトカイン IL-6 の発現量に YK405 (UL13-K176M) と YK406 (UL13-repair) の間で有意な差は認められなかったが、ケモカイン CXCL9 の発現量は YK405 (UL13-K176M) 感染マウスの脳幹では YK406 (UL13-repair) 感染マウスに比べて有意な増加が認められた (図 30a-c)。

次に、ケモカイン CXCL9 が HSV-1 感染部位で発現しているかを検証するために凍結切片を用いた病理解析をおこなった。5 週齢のメス ICR マウスに 1×10^6 pfu の YK405 (UL13-K176M)、および YK406 (UL13-repair) を角膜接種し、感染 7 日後にマウスから脳幹を回収した。凍結切片作製後、抗 HSV-1 抗体および抗 CXCL9 抗体で染色し、それぞ

れの局在を観察した。その結果、HSV-1 非感染のマウスではケモカイン CXCL9 の発現はほとんど検出されなかった (図 31)。一方、YK405 (UL13-K176M)、および YK406 (UL13-repair) を感染させたマウスの脳幹では、いずれのマウスでも HSV-1 抗原と重なるように CXCL9 の発現が確認された (図 31)。

以上の結果より、UL13 の PK 活性は脳感染部位での CXCL9 の発現を抑制し、その結果、HSV-1 抗原特異的な CD8⁺ T 細胞の HSV-1 感染部位への浸潤を抑制することで、効率的なウイルス増殖およびマウス致死性に寄与していることが示唆される。

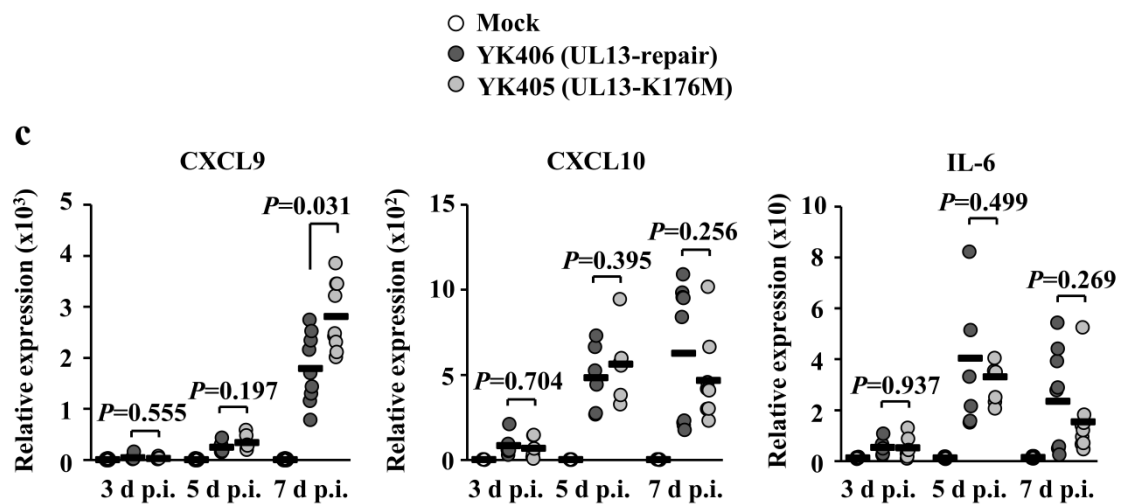


図 30. マウス角膜接種後の脳における CXCL9、CXCL10 および IL-6 mRNA の発現量 (a,b and c) 6-8 匹の 5 週齢メス ICR マウスに非感染、 1×10^6 pfu の YK406 (UL13-repair)、もしくは YK405 (UL13-K176M) を角膜接種した。感染 5 日後および 7 日後のマウスから回収した脳で発現する CXCL9 (a)、CXCL10 (b) および IL-6 (c) の mRNA 量を quantitative RT-PCR により測定した。それぞれの点は、一匹のマウスの脳に発現する 18S rRNA 量に対する各 mRNA 量の割合を表している。図に示した線は、それぞれのグループの平均値を示した。有意性は student の t 検定により評価した。

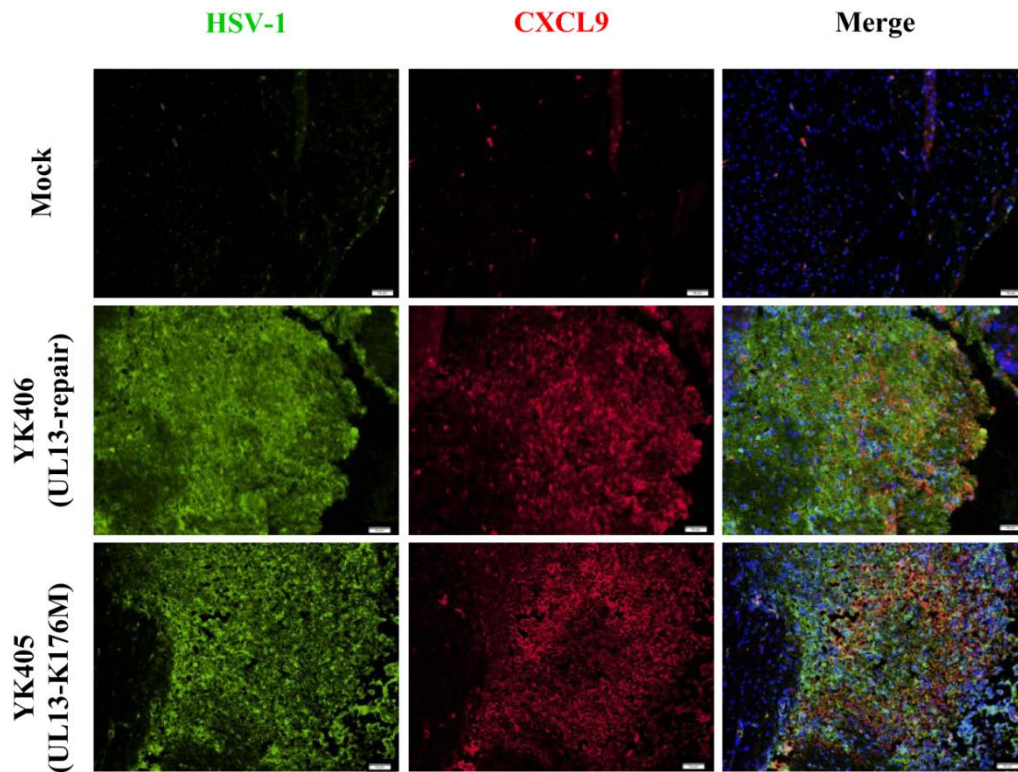


図 31. マウス角膜接種後の脳感染部位における CXCL9 の発現の影響

5 週齢メス ICR マウスに非感染、 1×10^6 pfu の YK406 (UL13-repair)、もしくは YK405 (UL13-K176M) を角膜接種した。感染 7 日後のマウスから脳を回収し、脳感染部位における HSV-1 抗原および CXCL9 の発現を抗 HSV 抗体 (green) もしくは抗 CXCL9 抗体 (red) を用いた免疫組織染色法で染色し、Olympus IX71 Microscope (Olympus) で観察した。

6. UL13によるVHSのリン酸化は *in vitro* でVHSのRNase活性に影響しない

HSV-1はVHSをUL41遺伝子にコードしている。このVHSはRNase活性を有しており、宿主のmRNAの分解を促進し、宿主免疫応答からの回避に寄与する可能性が示唆されている(91-95)。HSV-1 VHS欠損ウイルスでは生体内におけるウイルス増殖性が著しく低下することから、VHSは生体内における効率的なウイルス増殖に極めて重要である(96-98)。また、当研究室は過去に、UL13がVHSをリン酸化することを報告している(99)。そこで、このUL13によるVHSのリン酸化がVHSのRNase活性に影響するかを検討した。

マウス由来のMEFもしくはNeuro-2a細胞にHSV-1(F)(wild-type)、YK405(UL13-K176M)、YK406(UL13-repair)、YK476(Δ UL41)、もしくはYK477(UL41-repair)を感染させ、24時間後に細胞を回収後、RNAを抽出し、先程と同様にTaqManプローブを用いたquantitative RT-PCRに供した。UL41欠損ウイルスであるYK476(Δ UL41)はRNase活性を保持しないウイルスであるため、この解析のコントロールとして用いた。測定するmRNAとして β -actinを使用し、各ウイルス感染細胞中の β -actin mRNA量を比較した。その結果、いずれの細胞においてもYK476(Δ UL41)感染細胞ではHSV-1(F)(wild-type)、およびUL41復帰株であるYK477(UL41-repair)感染細胞に比して β -actin mRNA量の有意な増加が認められた(図32)。一方、YK405(UL13-K176M)感染細胞における β -actin mRNAの量はHSV-1(F)(wild-type)、およびYK406(UL13-repair)感染細胞と同程度であり、有意な差は認められなかった(図32)。

以上の結果より、UL13によるVHSのリン酸化は感染細胞においてVHSのRNase活性に影響しないことが示唆された。

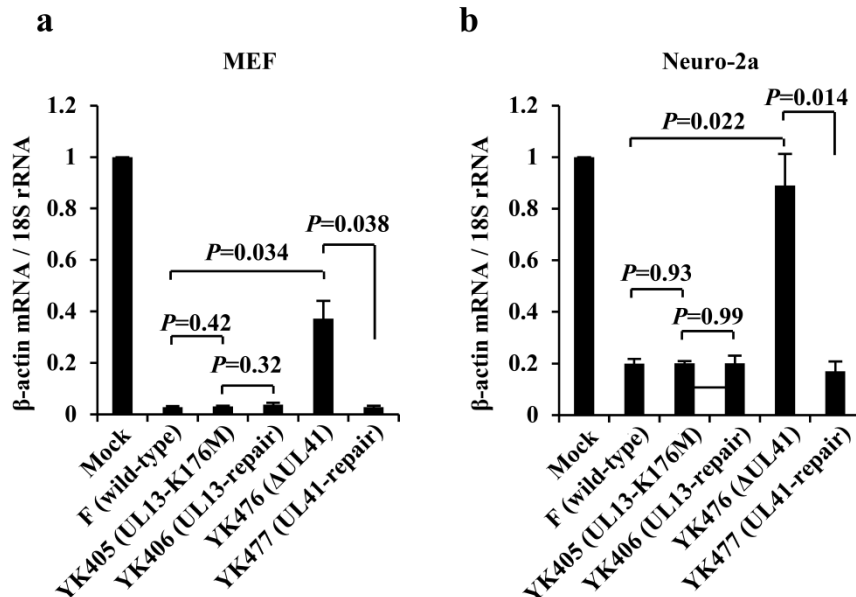


図 32. 各ウイルス感染細胞における β -actin mRNA の発現量

(a and b) MEF (a)もしくは Neuro-2a 細胞 (b) に非感染または HSV-1 (F) (wild-type)、YK405 (UL13-K176M)、YK406 (UL13-repair)、YK476 (Δ UL41)、および YK477 (UL41-repair) を MOI 5 で感染し、24 時間後に細胞を回収し、発現する β -actin mRNA および 18S rRNA の量を quantitative RT-PCR により測定し、18S rRNA 量に対する β -actin mRNA 量の割合を表している。グラフには 3 回の実験で得られた結果の平均値と標準誤差を示した。有意性は student の t 検定により評価した。

III. 脳感染部位への CXCL9 の投与は脳感染部位への CD8⁺ T 細胞の浸潤を促進し、感染細胞排除に寄与する

1. 脳感染部位へのケモカイン CXCL9 の投与によりマウス致死性および脳でのウイルス増殖が低下する

UL13 の PK 活性によるケモカイン CXCL9 の発現抑制が、脳感染部位への CD8⁺ T 細胞の浸潤を抑制し、感染細胞の排除を阻害することでマウス致死性に寄与している可能性が示唆された。そこで、UL13 の PK 活性によるケモカイン CXCL9 の発現抑制が、中枢神経系でのウイルス増殖や病原性発現に寄与していることを、より直接的に検証することを試みた。YK406 (UL13-repair) を感染させたマウスの脳内の主要感染部位（脳幹部）に CXCL9 を直接投与し、UL13 によって抑制された CXCL9 の発現を補うことで CD8⁺ T 細胞の浸潤を促進し、致死率やウイルス増殖の低下が認められるかを解析した。5 週齢のメス ICR マウスに 1×10^6 pfu の YK406 (UL13-repair) を角膜接種した。感染 5 日後に YK406 (UL13-repair) を感染させたマウスをステレオタキシックに固定し、左右の脳幹部に CXCL9 (200ng/ μ l) もしくはコントロールとして PBS を 2 μ l ずつ直接投与した。角膜接種後 1 日から 21 日までマウスの生死を観察した。その結果、CXCL9 を投与したマウスの生存率は 52%であったのに対して、コントロールのマウスの生存率は 12%であり、CXCL9 を投与したマウスはコントロールのマウスに比べて生存率が有意に亢進した（図 33）。

次に、5 週齢のメス ICR マウスに 1×10^6 pfu の YK406 (UL13-repair) を角膜接種し、感染 5 日後に CXCL9 もしくは PBS を脳幹部に直接投与した。感染 5 日後（CXCL9 および PBS 非投与）もしくは感染 7 日後（CXCL9 もしくは PBS 投与から 2 日後）にマウスから脳を回収し、含まれるウイルス力価を測定した。その結果、感染 7 日後におい

て、CXCL9 を投与したマウスはコントロールのマウスに比べて脳に含まれるウイルス力価が有意に低下した (図 34)。

以上の結果より、脳感染部位への CXCL9 の直接投与は 効率的なウイルス増殖およびマウス致死性の低下に寄与することが明らかになった。

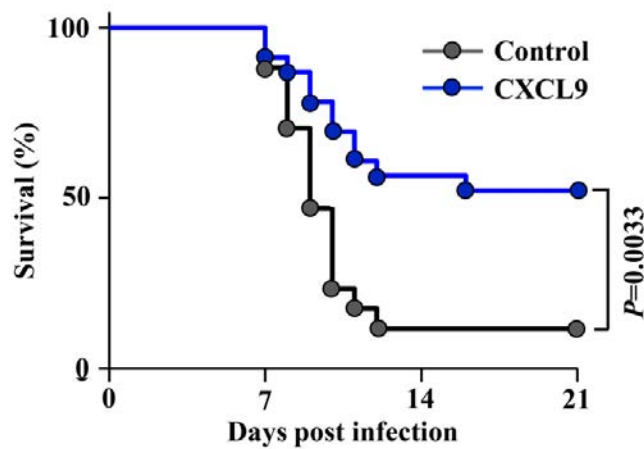


図 33. HSV-1 角膜接種後のマウスへの CXCL9 投与によるマウス生存率への影響

5 週齢メス ICR マウスに 1×10^6 pfu の YK406 (UL13-repair) を角膜接種した。感染 5 日後のマウスの左右の脳感染部位に CXCL9 を各 400 ng 直接投与し、感染 21 日後まで各マウスの生存数を観察した。CXCL9 投与群は 23 匹のマウス、コントロール群は 17 匹のマウスを評価した。データは各ウイルスにおけるマウスの生存率を示している。有意性は Log-rank test により評価した。

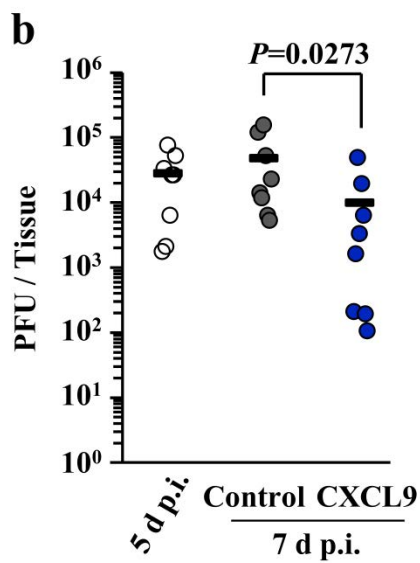


図 34. HSV-1 角膜接種後のマウスへの CXCL9 投与による脳でのウイルス増殖への影響

8 匹の 5 週齢メス ICR マウスに 1×10^6 pfu の YK406 (UL13-repair) を角膜接種した。感染 5 日後のマウスの左右の脳感染部位に CXCL9 を各 400 ng 直接投与した。感染 5 日後 (CXCL9 投与前)、および感染 7 日後 (CXCL9 もしくは PBS 投与 2 日後) の各マウスから脳を回収し、脳に含まれるウイルス力価をプラークアッセイで測定した。それぞれの点は、一匹のマウスの脳に含まれるウイルス力価を表している。図に示した線は、それぞれのグループの平均値を示した。有意性は Mann-Whitney test により評価した。

2. 脳感染部位への CXCL9 の投与は脳感染部位への CD8⁺ T 細胞および HSV-1 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞の浸潤を促進する

次に、マウスの脳内の主要感染部位（脳幹部）へのケモカイン CXCL9 の直接投与が CD8⁺ T 細胞、CD4⁺ T 細胞および HSV-1 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞の浸潤を促進するか解析した。5 週齢のメス ICR マウスに非感染もしくは 1×10^6 pfu の YK405 (UL13-K176M)、もしくは YK406 (UL13-repair) を角膜接種し、感染 5 日後に YK406 (UL13-repair) を感染させたマウスの左右の脳幹部に CXCL9 (200ng/ μ l) もしくはコントロールとして PBS を 2 μ l ずつ直接投与した。感染 7 日後に各マウスから脾臓、顎下腺リンパ節、脳幹を回収した。これまでと同様の方法で脾臓、顎下腺リンパ節および脳幹から白血球を回収した。これらの細胞を抗 CD8 α 抗体、抗 CD4 抗体および抗 CD45 抗体で染色しフローサイトメトリーに供することにより、CD8⁺ T 細胞と CD4⁺ T 細胞の数をそれぞれ算出した。これに合わせて ELISPOT assay をおこなうことにより各組織における HSV-1 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞の数を算出した。

その結果、CXCL9 を投与したマウスでは、YK405 (UL13-K176M) を感染させたマウスには及ばないものの、コントロールのマウスに比べて脳に浸潤する CD8⁺ T 細胞（図 35）、および HSV-1 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞の数の有意な増加が認められた（図 37）。一方で、CD4⁺ T 細胞の数に有意な差は認められなかった（図 36）。また、顎下腺リンパ節および脾臓における CD8⁺ T 細胞、CD4⁺ T 細胞および HSV-1 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞の数は CXCL9 を投与したマウスとコントロールのマウスの間で有意な差は認められなかった（図 35b、c、図 36b、c、図 37b、c）。

以上の結果より、CXCL9 の直接投与は顎下腺リンパ節および脾臓での HSV-1 抗原特異的な CD8⁺ T 細胞の数には影響を与えないが、HSV-1 抗原特異的な CD8⁺ T 細胞の脳幹部への効率的な浸潤を促進することが明らかになった。

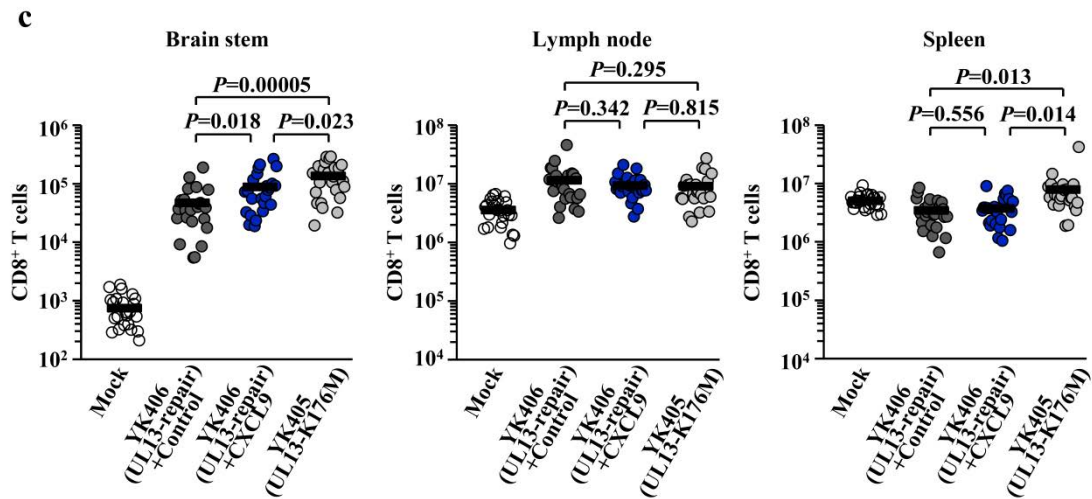


図 35. HSV-1 角膜接種後のマウスへの CXCL9 投与による脳幹、顎下腺リンパ節、脾臓における CD8⁺ T 細胞数への影響

(a,b and c) 24 匹の 5 週齢メス ICR マウスに非感染、 1×10^6 pfu の YK406 (UL13-repair)、もしくは YK405 (UL13-K176M) を角膜接種した。YK406 (UL13-repair) 感染 5 日後のマウスの左右の脳感染部位に CXCL9 を各 400 ng 直接投与した。感染 7 日後 (CXCL9 投与 2 日後) の各マウスから回収した脳幹 (a)、顎下腺リンパ節 (b)、脾臓 (c) に含まれる CD8⁺ T 細胞の数をフローサイトメーターを用いて測定した。それぞれの点は、一匹のマウスの各組織に含まれる CD8⁺ T 細胞の数を表している。図に示した線は、それぞれのグループの平均値を示した。有意性は student の t 検定により評価した。

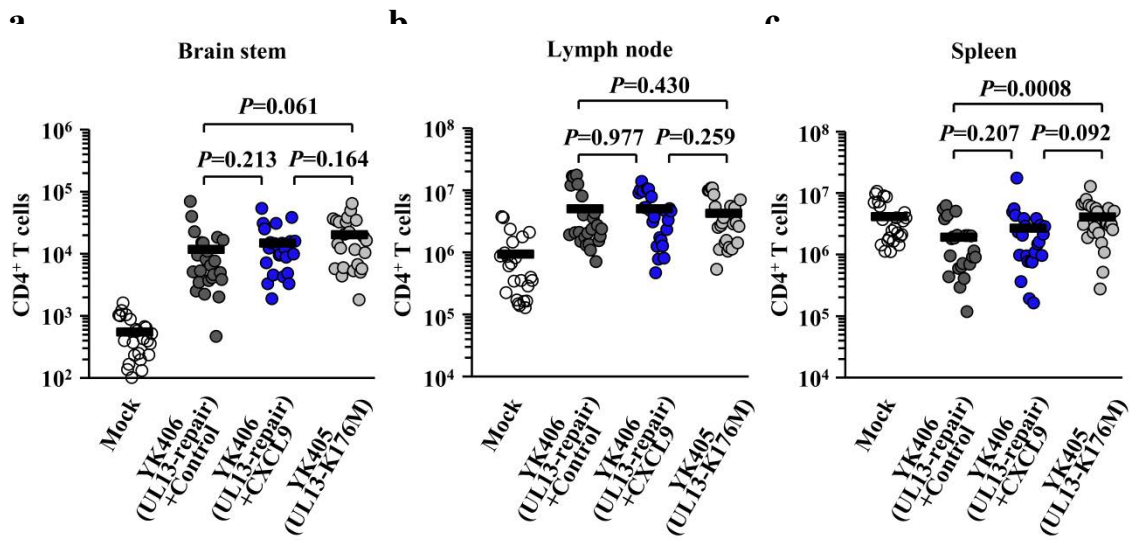


図 36. HSV-1 角膜接種後のマウスへの CXCL9 投与による脳幹、顎下腺リンパ節、脾臓における CD4⁺ T 細胞数への影響

(a,b and c) 図 35 の実験の際に、脳幹 (a)、顎下腺リンパ節 (b)、脾臓 (c) に含まれる CD4⁺ T 細胞の数をフローサイトメーターを用いて測定した。それぞれの点は、一匹のマウスの各組織に含まれる CD8⁺ T 細胞の数を表している。図に示した線は、それぞれのグループの平均値を示した。有意性は student の t 検定により評価した。

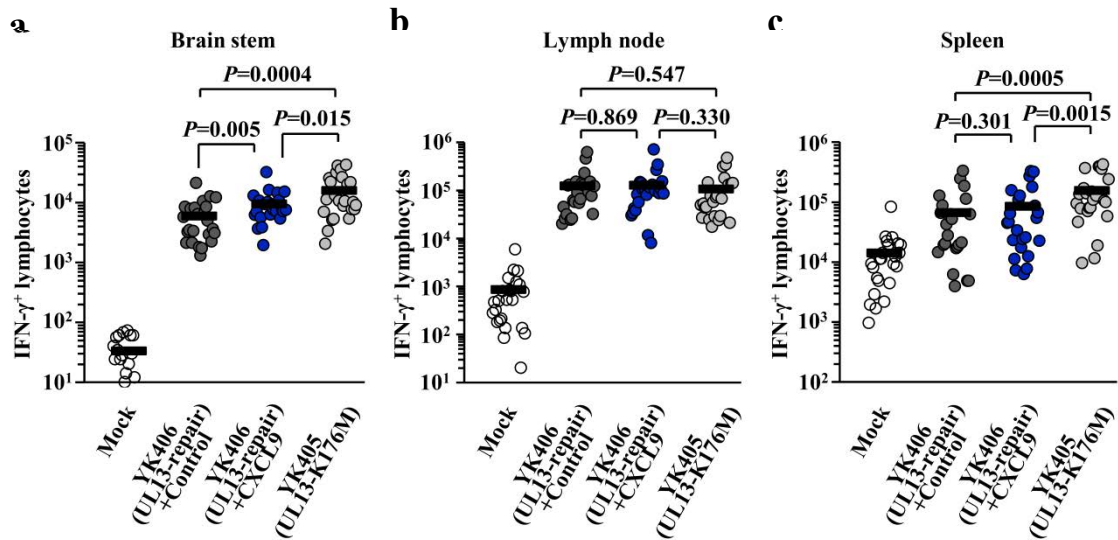


図 37. HSV-1 角膜接種後のマウスへの CXCL9 投与による脳幹、顎下腺リンパ節、脾臓における HSV-1 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞数

(a,b and c) 図 35 の実験の際に、脳幹 (a)、顎下腺リンパ節 (b)、脾臓 (c) に含まれる HSV-1 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞 の数を ELISPOT assay によって測定した。それぞれの点は、一匹のマウスの各組織に含まれる HSV-1 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞 の数を表している。図に示した線は、それぞれのグループの平均値を示した。有意性は student の t 検定により評価した。

3. HSV-1 角膜接種後マウスへの感染後期の acyclovir の投与ではマウス致死性は回復しない

上記の結果より、感染 5 日後に脳感染幹部へ CXCL9 を投与することにより HSV-1 抗原特異的な CD8⁺ T 細胞の脳幹部への効率的な浸潤を促進し、効率的なウイルス増殖およびマウス致死性の低下に寄与していることが明らかになった。そこで、既存の抗 HSV-1 治療薬である acyclovir (ACV) の投与実験をおこなうことで、HSV 脳炎に対する既存の治療法の効果と今回おこなった CXCL9 投与による効果を比較した。実際、HSV 脳炎の治療のためにおこなわれる ACV の投与は静脈からの投与であるが、今回は過去のマウスモデルで使用されていた腹腔投与をおこなった (85)。5 週齢のメス ICR マウスに 1×10^6 pfu の YK406 (UL13-repair) を角膜接種した。感染 2 日後もしくは感染 5 日後に YK406 (UL13-repair) を感染させたマウスの腹腔に 50 mg/kg (body weight) の ACV もしくはコントロールとして PBS のみを腹腔接種し、1 日 1 回、7 日間継続して投与した (図 38a)。マウスの生存曲線は、ウイルス接種後 1 日から 21 日まで観察し、マウスの生死を観察した。その結果、感染 2 日後に ACV を投与開始したマウスの生存率は 100% であったが、コントロールではその生存率は 8% であり、感染早期の ACV 投与はコントロールに比べて致死率を有意に低下させた (図 38b)。一方、感染 5 日後からの ACV 投与の生存率は 0% であり、コントロールの生存率は 17% であり、致死率に有意な差は認められなかった (図 38b)。

以上の結果より、ケモカイン CXCL9 を投与することで致死率が低下する感染 5 日目のマウスへの ACV の投与は、マウスの致死率を低下させるには至らなかった。この結果より、ケモカイン CXCL9 の投与は HSV 脳炎の新規治療法開発の足がかりにもなりうることを示すと考える。

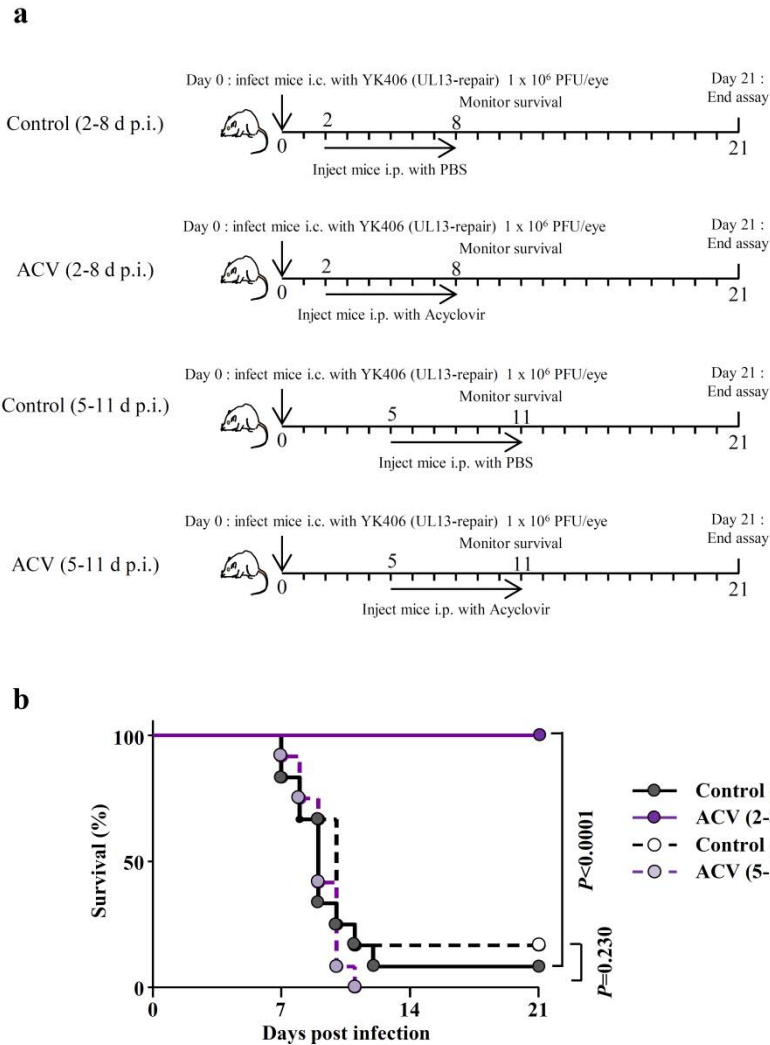


図 38. HSV-1 角膜接種後のマウスへの ACV 投与によるマウス生存率への影響

(a and b) 12 匹の 5 週齢メス ICR マウスに 1×10^6 pfu の YK406 (UL13-repair) を角膜接種した。感染 2 日後もしくは感染 5 日後のマウスの腹腔に ACV (50 mg/kg (body weight)) を投与し、感染 21 日後まで各マウスの生存数を観察した。ACV 投与は一日一回、一週間継続して投与した。データは各ウイルスにおけるマウスの生存率を示している。有意性は Log-rank test により評価した。

5 考察

ヘルペスウイルスには多くの保存されたウイルスタンパク質が存在する。それらのウイルスタンパク質はウイルスの侵入から新たなウイルス粒子成熟に至る様々なステップに寄与することが報告されており、その保存性がウイルス増殖における重要性を物語っている (1)。今回焦点を当てた HSV-1 UL13 も全てのヘルペスウイルス亜科で保存されているウイルスタンパク質である。感染細胞を用いた解析により、UL13 はいくつかのウイルスタンパク質や宿主タンパク質の直接のリン酸化もしくはリン酸化亢進に寄与することが報告されている (16)。一方で、その保存性にも関わらず、UL13 は培養細胞におけるウイルス増殖に必須ではない (17, 18)。UL13 欠損株や UL13PK 活性消失株においてウイルス増殖が低下する一部の培養細胞においても、UL13 によるリン酸化がウイルス増殖自体にいかにか寄与しているかは不明のままである。

UL13 を含む CHPKs (16) はヒトヘルペスウイルスおよびマウスヘルペスウイルスを用いて広く解析が行われており、それぞれの感染細胞における機能が明らかにされつつある。一方、生体内における解析はヒトヘルペスウイルスでは α ヘルペスウイルス亜科では解析可能であるが、 β および γ ヘルペスウイルス亜科では解析できない。そのため、生体内においてヒトヘルペスウイルスの CHPKs が生体内におけるウイルス増殖や病原性発現にいかにか寄与するかは α ヘルペスウイルス亜科を用いた解析に頼るところが大きい。これまでに、HSV-1 の UL13 および VZV の CHPK である ORF47 に関して、それぞれの欠損株を用いた解析により、HSV-1 UL13 は脳内接種では神経病原性に重要ではないが、腹腔接種では病原性が低下する (40)、ORF47 は皮膚でのウイルス増殖に重要である (100) ことが報告されている。しかし、UL13 や ORF47 がこのような病原性やウイルス増殖にどのようなメカニズムで寄与しているか、その詳細は不明であった。一方、マウスヘルペスウイルスに目を向けると、マウスの γ ヘルペスウイルスである

MHV-68 の CHPK である ORF36 に関して、培養細胞および生体内における機能解析が盛んに行われており、いずれにおいてもウイルス増殖に寄与することが報告されている (101, 102)。ORF36 は interferon response factor-3 (IRF-3) と相互作用し、感染細胞における IFN- β の産生を抑制し、*in vivo* において効率的なウイルス増殖に寄与することが報告されている (102)。また、ORF36 が IRF-3 と相互作用し、IFN- β の産生を抑制する機能は、ヒトヘルペスウイルスである VZV の ORF47 や EBV の CHPK である BGLF4 においても保存されていることが、感染細胞を用いた解析によって明らかにされている (103, 104)。一方、HSV-1 UL13 に関しては、HSV-1 UL13 を一過的に発現させた細胞を IFN- β promoter のレポーターアッセイや IFN- β mRNA の定量 PCR に供した結果、HSV-1 UL13 にも IFN- β の産生を抑制する機能が保存されていることが示唆されている (102)。しかし、これらのヒトヘルペスウイルスの CHPKs による IFN- β の産生阻害が実際に生体内において機能し、生体内での効率的なウイルス増殖等に寄与するかは不明である。このように、マウスの CHPK の *in vivo* における機能解析は進んでいるが、ヒトヘルペスウイルスにおける CHPKs の生体内での意義は不明な点が多い。そこで本研究では、HSV-1 の UL13 を解析対象とし、生体内における詳細な機能を解析した。

我々のグループでは以前に、UL13 欠損株および UL13PK 活性消失株を用いた解析の結果、RSC 感染細胞において UL13 タンパク質自体はウイルスタンパク質 ICPO の発現に重要であるが、UL13 の PK 活性は重要ではないことを報告している (39)。また、UL13 は virion のテグメント構成因子の一つであることから、virion の構造維持にも関与している可能性が考えられる。よって、UL13 には PK 活性依存的機能と非依存的機能が存在することが示唆された。この報告と合致するように、Hwang らは、MHV-68 の UL13 ホモログである ORF36 が type I interferon の発現制御に寄与することを報告し、この制御には ORF36 の PK 活性が重要なのではなく、タンパク質そのものが重要であることを示している (102)。つまり、UL13 ホモログには PK 活性依存的機能と非依存的機能と

いう異なる機能が存在し、CHPKs で広く保存されている可能性が示唆された。本研究では、UL13 の中心的な機能であると考えられる PK 活性依存的な機能に焦点を当てた解析をおこなうことを目的とし、UL13 の PK 活性を消失した株 YK405 (UL13-K176M) およびその復帰株 YK406 (UL13-repair) を作製した。欠損株と同様に、YK405 (UL13-K176M) も Vero 細胞においては YK406 (UL13-repair) と同様のウイルス増殖性を示し、RSC 細胞においては YK405 (UL13-K176M) は YK406 (UL13-repair) に比べてウイルス増殖性の低下が確認された。

In vivo における HSV-1 UL13 の PK 活性の意義を検証するにあたり 2 種類のマウス HSV-1 感染モデルを用いた。一つ目の脳内接種モデルでは、作製した 2 種類のウイルスを脳内接種し、LD₅₀、脳におけるウイルス力価および脳における HSV-1 抗原の広がりについて解析した。その結果、いずれもウイルス間で顕著な差は認められなかった。これは UL13 の PK 活性が神経病原性には重要ではないことを示している。これは Shibaki らによる、UL13 欠損株を用いた解析において UL13 欠損株が神経病原性の低下を示さない報告 (40) と一致しており、UL13 の PK 活性依存的機能および非依存的機能のいずれもが神経病原性には重要ではないことを示している。

次に、作製した 2 種類のウイルスを角膜接種モデルに供した結果、UL13 の PK 活性は角膜でのウイルス増殖性、ヘルペス性角膜炎および眼の周囲の皮膚炎に重要であることが明らかになった。さらに、YK406 (UL13-repair) を感染させたマウスは 84% が死に至ったが、YK405 (UL13-K176M) を感染させたマウスの致死率は 8% であり、YK406 (UL13-repair) と比べて致死率の著しい低下が認められた。これは UL13 の PK 活性が神経侵襲性か宿主免疫回避、もしくはその両方に重要であることを示唆している (図 39 e)。本知見は、HSV のヒトでの病態を反映する疾患モデルにおいて、UL13 の PK 活性の重要性を示した初の知見であり、UL13 の PK 活性が創薬標的となりうることを示すと考えられる。

UL13 の PK 活性が神経侵襲性に重要であるかを検証するために、YK405 (UL13-K176M)、および YK406 (UL13-repair) を角膜接種した後のマウスの各組織(眼球、三叉神経節、脳) のウイルス力価、および脳における HSV-1 抗原の広がりを経時的に測定、観察した。その結果、感染 5 日後で三叉神経節や脳へのウイルス侵襲能にウイルス間で有意な差は認められなかった。これは UL13 の PK 活性が神経侵襲性には重要ではないことを示している (図 39 a)。一方、感染 7 日後や 8 日後において、YK405 (UL13-K176M) 感染マウスは YK406 (UL13-repair) 感染マウスに比べて脳におけるウイルス力価の有意な低下、および感染 8 日後において YK405 (UL13-K176M) 感染マウスでは YK406 (UL13-repair) 感染マウスに比べて脳での HSV-1 抗原の顕著な排除が認められた。これは UL13 の PK 活性は脳におけるウイルスの広がりには寄与しないが、HSV-1 抗原排除の回避、つまり宿主免疫回避に寄与することを示唆していると考えられる (図 39 d)。

ウイルスによる宿主免疫回避機構は大別して自然免疫系の阻害と適応免疫からの回避に分けられる。自然免疫系の阻害として、HSV-1 がコードするウイルスタンパク質 (ICP0、VHS、 γ 34.5、Us11、Us3) は type I interferon シグナル伝達経路をそれぞれ阻害することにより効率的なウイルス増殖に寄与することが報告されている (105-118)。一方、これまでに HSV による適応免疫からの回避機構としての報告は CTL からの傷害回避が主である。CTL は MHC class I によって細胞表面に提示された抗原を認識し、感染細胞を傷害し、ウイルス増殖を阻害する。HSV による CTL からの回避機構として、ウイルスタンパク質 (ICP47、VHS、Us3) がそれぞれ MHC class I を介した抗原提示の阻害に寄与することが報告されている (12, 64-66, 68, 88)。

作製したウイルスを二種類のマウス HSV-1 感染モデルに供した結果、ウイルス接種後にすぐに脳内で増殖を開始する脳内接種モデルにおいて、UL13 の PK 活性は神経病原性には重要ではなかった。一方、ウイルスが脳内に侵入するまでに数日を要する角膜

接種モデルにおいて、UL13 の PK 活性は脳からのウイルス排除に寄与することが示唆された。この二種類のマウス HSV-1 感染モデルの大きな違いである、HSV-1 感染後にウイルスが脳内に侵入するまでの時間に着目し、UL13 の PK 活性が CTL からの回避に寄与するという可能性について検証した。CD8 α 抗体を接種することで CD8⁺ T 細胞を除去したマウスに YK406 (UL13-repair) を角膜接種した場合、マウスの生存率、脳でのウイルス増殖や HSV-1 抗原の広がりに影響はみられなかった。一方、YK405 (UL13-K176M) を CD8⁺ T 細胞を除去したマウスに角膜接種した場合、コントロールのマウスに比べてマウスの致死率の亢進およびウイルス力価の増加が認められた。また、HSV-1 抗原の広がりに関しても、YK405 (UL13-K176M) を感染させたコントロールのマウスの脳では HSV-1 抗原の排除が認められたが、CD8⁺ T 細胞を除去したマウスでは抗原排除の阻害が認められた。これらは CD8⁺ T 細胞が脳において HSV-1 感染細胞の排除に極めて重要であることを示している。この結果はマウス HSV-1 角膜接種モデルにおいて、CD8 knockout マウスを用いた解析から CD8⁺ T 細胞が脳からのウイルス排除に重要であるという報告に一致する (87)。さらに、UL13 の PK 活性は脳において CD8⁺ T 細胞による HSV-1 感染細胞の排除の阻害に寄与していることを示唆する。一方、CD8⁺ T 細胞を除去したマウスに YK405 (UL13-K176M) を角膜接種した後のマウスの致死率はコントロールのマウスに比べて亢進したが、YK406 (UL13-repair) を感染させたマウスの致死率には及ばなかった。これは、CD8⁺ T 細胞以外にも脳からの HSV-1 感染細胞の排除に重要であり、UL13 の PK 活性はその機能も阻害している可能性を示唆している。

現在までに、HSV がコードするウイルスタンパク質 (ICP47、VHS、Us3) が CD8⁺ T 細胞からの傷害回避に寄与することが報告されており、それらの全てが MHC class I による CD8⁺ T 細胞への抗原提示を阻害するというメカニズムである (12, 64-66, 68, 88)。また、それらの解析は主に *in vitro* の系でおこなわれた解析の結果であり、その免疫回避機構が実際に *in vivo* でウイルス増殖や病態発現に寄与することを明らかにしたのは

Us3 の一例のみである (68)。また、Us3 は上記の通り、自然免疫の阻害にも関与することから (118)、*in vivo* において Us3 がウイルス増殖や病態発現に寄与するメカニズムは多岐にわたると考えられる。UL13 に関しても MHC class I による CD8⁺ T 細胞への抗原提示阻害に寄与する可能性を CTL assay により検証したが、UL13 の PK 活性は MHC class I による抗原提示の阻害には寄与しないことが示唆された。これは、UL13 の PK 活性がこれまでに報告されている、HSV がコードするウイルスタンパク質とは異なるメカニズムで CD8⁺ T 細胞からの傷害回避に寄与していることを示唆している。

UL13 の PK 活性による CD8⁺ T 細胞からの傷害回避機構として、UL13 の PK 活性が CD8⁺ T 細胞の脳への浸潤阻害に寄与する可能性について検証した。感染 7 日後において、YK405 (UL13-K176M) を感染させたマウスの脳感染部位 (脳幹) の CD8⁺ T 細胞の数は YK406 (UL13-repair) を感染させたマウスに比べて有意な増加が認められた。この結果より、UL13 の PK 活性は CD8⁺ T 細胞の脳への浸潤を阻害する可能性が考えられる (図 39 c)。一方、顎下腺リンパ節における CD8⁺ T 細胞の数には UL13 の PK 活性の影響は認められなかったが、脾臓における CD8⁺ T 細胞の数は、YK405 (UL13-K176M) を感染させたマウスでは YK406 (UL13-repair) を感染させたマウスに比べて増加する傾向が認められた。よって、YK405 (UL13-K176M) を感染させたマウスでは YK406 (UL13-repair) を感染させたマウスに比べて全身を循環する CD8⁺ T 細胞の数が増加しており、それが脳感染部位に浸潤する CD8⁺ T 細胞の数の増加に影響している可能性も考えられる。また、これらの CD8⁺ T 細胞は HSV-1 抗原特異的な CD8⁺ T 細胞であるかは不明であるため、同時に ELISPOT assay を実施し、HSV-1 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞の数について検証した。その結果、CD8⁺ T 細胞の数と同様に、顎下腺リンパ節における HSV-1 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞数はウイルス間で影響は認められなかったが、脳幹および脾臓における HSV-1 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞の数は YK405 (UL13-K176M) を感染させたマウスでは YK406 (UL13-repair) を感染させたマウスに比べて有意な増加が認

められた。この ELISPOT assay による測定では、HSV-1 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞としては主に CD8⁺ T 細胞および CD4⁺ T 細胞が考えられる。そこで各組織における CD4⁺ T 細胞の数についても検証した。その結果、顎下腺リンパ節における CD4⁺ T 細胞の数はウイルス間で影響は認められなかったが、脳幹および脾臓における HSV-1 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞の数は、YK405 (UL13-K176M) を感染させたマウスでは YK406 (UL13-repair) を感染させたマウスに比べてそれぞれ増加傾向、および有意な増加が認められた。これらの結果より、UL13 の PK 活性は HSV-1 抗原特異的な CD8⁺ T 細胞および CD4⁺ T 細胞の浸潤を阻害する可能性が考えられる。また、UL13 の PK 活性が全身を循環する HSV-1 抗原特異的な CD8⁺ T 細胞および CD4⁺ T 細胞の増加阻害に寄与する可能性も考えられる。

ウイルス抗原特異的な CD8⁺ T 細胞はウイルス感染細胞を認識し、傷害することで生体内からウイルスを排除する重要な免疫細胞である。その CD8⁺ T 細胞は細胞表面にケモカインレセプターである CXCR3 を発現すること、および活性化した CD8⁺ T 細胞において CXCR3 の発現量が上昇することが報告されている (119)。また、HSV-1 脳感染部位においては CXCR3 のリガンドであるケモカイン CXCL9 や CXCL10 の発現が誘導されることが明らかになっている (120)。これらのケモカインは HSV 感染部位で高発現することにより CD8⁺ T 細胞の効率的なリクルートを促進する (121)。今回用いたマウス HSV-1 角膜接種モデルにおいて、脳感染部位におけるケモカイン CXCL10 mRNA の発現量は、YK405 (UL13-K176M) および YK406 (UL13-repair) を感染させたマウスではその発現量に有意な差は認められなかった。一方、CXCL9 mRNA の発現量は感染 7 日後において YK405 (UL13-K176M) を感染させたマウスでは YK406 (UL13-repair) を感染させたマウスに比べて有意な増加が認められた。これにより、UL13 の PK 活性は CXCL9 の発現制御に寄与している可能性が示唆された (図 39 b)。一方で、上述したように、UL13 は IRF-3 を介した type I interferon の発現制御に寄与する可能性が示唆され

ている (102)。しかし、IRF-3 は CXCL9 promoter を直接活性化しないこと (122) や、MHV-68 の CHPK である ORF36 は PK 活性非依存的に IRF-3 と相互作用し、type I interferon の発現制御に寄与すること (102) から、UL13 と IRF-3 の相互作用が UL13 の PK 活性依存的な CXCL9 の発現制御に与える影響は低いと考えられる。

これまでに、CXCR3 や CXCL9、CXCL10 の knockout マウスを用いた HSV-1 感染実験が報告されている (120, 123)。驚くべきことに、CXCR3 knockout マウスを HSV-1 角膜接種モデルに供したところ野生型のマウスに比べて生存率の亢進が認められた (123)。一方、CXCL10 knockout マウスを HSV-1 角膜接種モデルに供したところ野生型のマウスに比べて生存率が低下することが報告されている (120)。また、Wuest らは CXCL9 knockout マウスを HSV-1 角膜接種モデルに供したところマウスの生存率は野生型のマウスと同様であったことを報告している (120)。これらの報告はウイルス接種量や同時に実施した結果ではないこと、及び double knockout や triple knockout を用いた解析はおこなっていないことから、CXCR3 と CXCL9 および CXCL10 の関係性が角膜接種後のマウスの致死性にどのような影響を及ぼしているか不明な点が多い。また、これらの knockout マウスは、HSV-1 の角膜接種モデルでは HSV-1 非感受性マウスである C57BL/6 を background に作製されており、本研究で用いた HSV-1 感受性マウスである ICR マウスとは条件が異なることから本研究で得られた結果と過去の knockout マウスを用いて得られた結果を比較するのは困難であると考ええる。一方、HSV-2 を用いた膣接種モデルにおいて、CXCR3 knockout マウスは野生型のマウスに比べて致死率の亢進や脳幹におけるウイルス力価の増加が報告されている (89)。また、CXCL9 や CXCL10 knockout マウスは野生型マウスに比べて脳幹に浸潤する HSV-2 特異的 CD8⁺ T 細胞の減少、致死率の亢進、脳幹におけるウイルス力価の増加が報告されている (90)。このように、HSV-2 による膣接種モデルでは感受性マウスであるこれらの knockout マウスを

用いたモデルでは、脳幹における CXCR3 と CXCL9 および CXCL10 の関係がマウスの致死性に重要な影響を与えていることが明らかになっている。

本研究により、UL13 の PK 活性が CXCL9 mRNA の発現制御に寄与している可能性が示唆された。その一方で、UL13 はウイルスタンパク質 VHS (UL41 遺伝子産物) をリン酸化することが報告されている (99)。VHS は RNase 活性を有したテグメントタンパク質であり、感染細胞において宿主の RNA 分解を促進し、効率的なウイルス増殖に寄与すると考えられている。そこで、UL13 による VHS のリン酸化が VHS の RNase 活性に影響を及ぼし、結果として CXCL9 mRNA の発現に影響を与えている可能性を感染細胞の系にて検証した。RNase 活性の指標とした β -actin mRNA の量は、YK476 (Δ UL41) 感染細胞では野生体である F (wild-type) および YK477 (UL41-repair) に比べて有意な増加が認められた。一方、YK405 (UL13-K176M) 感染細胞では F (wild-type) および YK406 (UL13-repair) との間で β -actin mRNA の量に有意な差は認められなかった。これより、感染細胞において UL13 による VHS のリン酸化は VHS の RNase 活性に影響を及ぼさないことが示された。よって、脳感染部位で認められた、UL13 の PK 活性による CXCL9 の発現制御は VHS の RNase 活性の影響ではないことが示唆される。また、脳感染部位において CXCL10 mRNA やサイトカインのひとつである IL-6 mRNA の発現には UL13 の PK 活性は影響しないこともこの可能性を支持すると考える。

Shin らは、systemic に HSV-2 の thymidine kinase (UL23 遺伝子産物) 欠損株を免疫したマウスの膺に CXCL9 および CXCL10 を塗布することで、HSV-2 抗原特異的な CD8⁺ T 細胞をリクルートさせうることを報告している (124)。そこで本研究では、YK405 (UL13-K176M) 感染マウスに比べて CXCL9 の発現量が低い YK406 (UL13-repair) 感染マウスの脳感染部位 (脳幹) に CXCL9 を直接投与することで、CXCL9 の発現量の不足を補い、HSV-1 抗原特異的な CD8⁺ T 細胞の浸潤促進、その結果としてウイルス感染細胞排除の促進や致死率の低下が認められるか検証した。感染 5 日後に YK406

(UL13-repair) 感染マウスの脳感染部位に CXCL9 を投与し、感染 7 日後 (CXCL9 投与 2 日後) のマウスを解析した結果、コントロールのマウスに比べて脳幹における CD8⁺ T 細胞および HSV-1 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞の数の有意な増加が認められた。一方、CD4⁺ T 細胞の数は CXCL9 投与マウスとコントロールのマウスで有意な差は認められなかった。また、CXCL9 投与マウスとコントロールのマウスの間で、顎下腺リンパ節および脾臓の CD8⁺ T 細胞、CD4⁺ T 細胞および HSV-1 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞の数に有意な差は認められなかった。これにより脳感染部位に浸潤する CD8⁺ T 細胞の数は脳感染部位での CXCL9 の発現量が極めて重要であることが明らかとなった。また、CXCL9 の投与によって、全身を循環する CD8⁺ T 細胞の数に差が認められないにも関わらず、脳感染部位での CD8⁺ T 細胞の数が増加したことから、今回の実験系においては、全身を循環する CD8⁺ T 細胞の数の影響は脳感染部位での CXCL9 の発現量の影響に比べて低い可能性が示唆される。また、CXCL9 を投与したマウスではコントロールのマウスに比べて脳におけるウイルス力価および致死率の低下が認められた。これは CXCL9 の投与により脳感染部位への CD8⁺ T 細胞の浸潤が促進され、効率的なウイルス感染細胞の排除が進んだ結果と考えられる。よって、この結果は、UL13 の PK 活性は脳感染部位において CXCL9 の発現を制御し (図 39 b)、CD8⁺ T 細胞の脳感染部位への浸潤を阻害する (図 39 c) という可能性を支持すると考える。一方で、CXCL9 を投与したマウスにおいて、その生存率は YK405 (UL13-K176M) を感染させたマウスの場合には及ばない。この結果と一致するように、CXCL9 投与したマウスでは YK405 (UL13-K176M) を感染させたマウスに比べて脳幹における CD8⁺ T 細胞および HSV-1 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞の数が有意に少ない。これは CXCL9 の投与箇所、投与のタイミング、投与量などによる影響であることが考えられる。個体によって感染の進行がいくらかずれている可能性を考慮すると、HSV-1 抗原特異的な CD8⁺ T 細胞の数や脳感染部位におけるウイ

ルス力価に違いがあるため、CXCL9を投与したマウスと YK405 (UL13-K176M) を感染させたマウスでこのような生存率の差が生じていると考える。

今日、抗ヘルペスウイルス剤は臨床応用に至っているが、ヘルペス脳炎患者の約 10% は死に至り、生存者の約 2/3 も中度および重度の障害を残す (4)。そのため、現行の治療法には改善の余地があると考えられる。今回おこなった HSV-1 感染マウスへの CXCL9 投与は致死性のマウス HSV 脳炎から一部のマウスを生存させた。本研究では、既存薬である ACV 投与後のマウス致死率についても比較検証した。YK406 (UL13-repair) 感染 2 日後から一週間 ACV を腹腔投与したマウスは全て生存したが、コントロールのマウスは著しく死に至った。これは YK406 (UL13-repair) 感染 2 日後のマウスでは、中枢神経系、特に脳に十分量のウイルスが侵入、増殖していないため、脳でウイルスが著しく増殖する前に ACV がウイルス増殖を抑制することで効果があったものと考えられる。一方、感染 5 日後から一週間 ACV を投与したマウスでは、コントロールのマウスと同様に著しく死に至った。これは YK406 (UL13-repair) 感染 5 日後のマウスでは、脳において一定量のウイルスがすでに侵入・増殖し、ACV を投与してもウイルス増殖を抑制できず、中枢神経系の破壊を阻止できなかった結果であると考えられる。つまり、今回用いたモデルでは、臨床現場において、HSV 脳炎患者が ACV の投与を開始する段階に相当すると考えられる、脳にウイルスが侵入し、増殖した後の段階では ACV の効果は極めて弱く、致死性のヘルペス脳炎からマウスを生存させることが困難であることが示された。一方、CXCL9 は脳にウイルスが侵入した後でも一度の投与でマウスの生存率を亢進させうることから、今回用いたモデルでは、CXCL9 投与は ACV 投与より有効な治療法であることが示唆された。ただし、実際に HSV 脳炎患者の脳感染部位に CXCL9 を直接投与することは様々なリスクを考慮すると現行の Drug delivery system では困難である。そのため、CXCL9 による治療は、脳感染部位で特異的に CXCL9 を発現することが可能となる安全な方法、例えばウイルスベクターなどを用いた方法の

開発が必要である。本研究はヘルペスウイルス感染症の中でも治療が困難であり、かつ致死性の疾患である HSV 脳炎に対する新規治療法の足がかりも提示することに成功したと考える。

本研究では、Us3 の欠損株である R7041 (Δ Us3) も脳内接種モデルおよび角膜接種モデルに供した。Us3 は α ヘルペスウイルス亜科に保存される PK であり、HSV-1 Us3 は *in vivo* において神経病原性および神経侵襲性に極めて重要であることが報告されている (42, 74, 75)。そこで、本研究で焦点を当てた UL13 の PK 活性の *in vivo* での機能を解析する上で、Us3 欠損株である R7041 (Δ Us3) を用い、比較した。その結果、Us3 の *in vivo* における詳細な機能の一部についても示した。

本研究により、HSV-1 Us3 は角膜接種モデルにおいて、眼から脳へのウイルス侵入能に重要であることが示された。この結論は、角膜接種後の R7041 (Δ Us3) 感染マウスの脳においてウイルス増殖や HSV-1 抗原が検出されないが、復帰株である R7306 (Us3-repair) 感染マウスでは脳においてよく増殖し、HSV-1 抗原の広がりが見られることに起因する。つまり、HSV-1 の Us3 は *in vivo* において神経侵襲性に必須である。また、角膜接種後の眼球におけるウイルス力価は、感染 1 日後や 3 日後では、R7041 (Δ Us3) 感染マウスでは R7306 (Us3-repair) 感染マウスに比べて 7 倍ほどの低下しか認められない。一方、角膜接種後の三叉神経節におけるウイルス力価は、R7041 (Δ Us3) 感染マウスでは R7306 (Us3-repair) 感染マウスに比べて 1,000 倍から 3,000 倍もの低下が認められた。これは、HSV-1 の Us3 が角膜接種後の三叉神経節においてウイルス増殖に重要であることを示す。三叉神経節において R7041 (Δ Us3) のウイルス増殖が顕著に低下することは、R7041 (Δ Us3) が眼から三叉神経節への retrograde transport に欠陥があること、三叉神経節において感染性のウイルスが産生されないこと、もしくはそのどちらもが原因であることが考えられるが、その詳細は不明である。さらに、角膜接種後の脳において R7041 (Δ Us3) が検出できないことは、三叉神経節から脳へのウイルスの

anterograde transport の欠陥、三叉神経節でのウイルス増殖が十分でないこと、もしくはそのどちらかが考えられるが、その詳細も不明であり、Us3 の *in vivo* における機能のさらなる解析が求められる。また、脳において R7041 (Δ Us3) が検出できないことは、このウイルスがマウスの脳において感染性のウイルスを産生する能力に欠陥があるという可能性も考えられる。しかし、R7041 (Δ Us3) は脳内接種後のマウスの脳で増殖する能力が十分にあることから、この可能性は低いと考えられる。今後、Us3 が末梢から三叉神経節や脳のような中枢神経系へのウイルスの侵入にどのようなメカニズムで寄与しているか、解析を進めることが求められる。

これまでに HSV-1 の Us3 と HSV-2 の Us3 の間で病原性への貢献度が顕著に違うことが報告されている (74, 75, 125)。脳内接種モデルにおいて、HSV-1 Us3 欠損株はその親株に比べて 10,000 倍以上の病原性の低下が認められたが (74)、HSV-2 Us3 欠損株は 10 倍程度の低下しか認められなかった (125)。これらの知見と一致するように、HSV-1 Us3 と HSV-2 Us3 の神経侵襲性への貢献度にも違いがあると思われる。実際、本研究で HSV-1 Us3 欠損株を用いて得られた結果とは異なり、HSV-2 Us3 欠損株では、角膜接種後のマウスの脳でウイルスが検出されることが報告されている (125)。これらの知見は *in vivo* において、いくつかの HSV-1 Us3 の機能が HSV-2 Us3 では機能していないという仮説を支持する。実際、HSV-2 Us3 はウイルスの nuclear egress や gB の細胞表面量の制御といった HSV-1 Us3 の機能をもっていない (75)。しかし、これらの違いが HSV-1 Us3 と HSV-2 Us3 の *in vivo* におけるウイルス増殖や病原性発現、神経侵襲性に関与しているかは不明のままであり、今後検討すべき問題である。

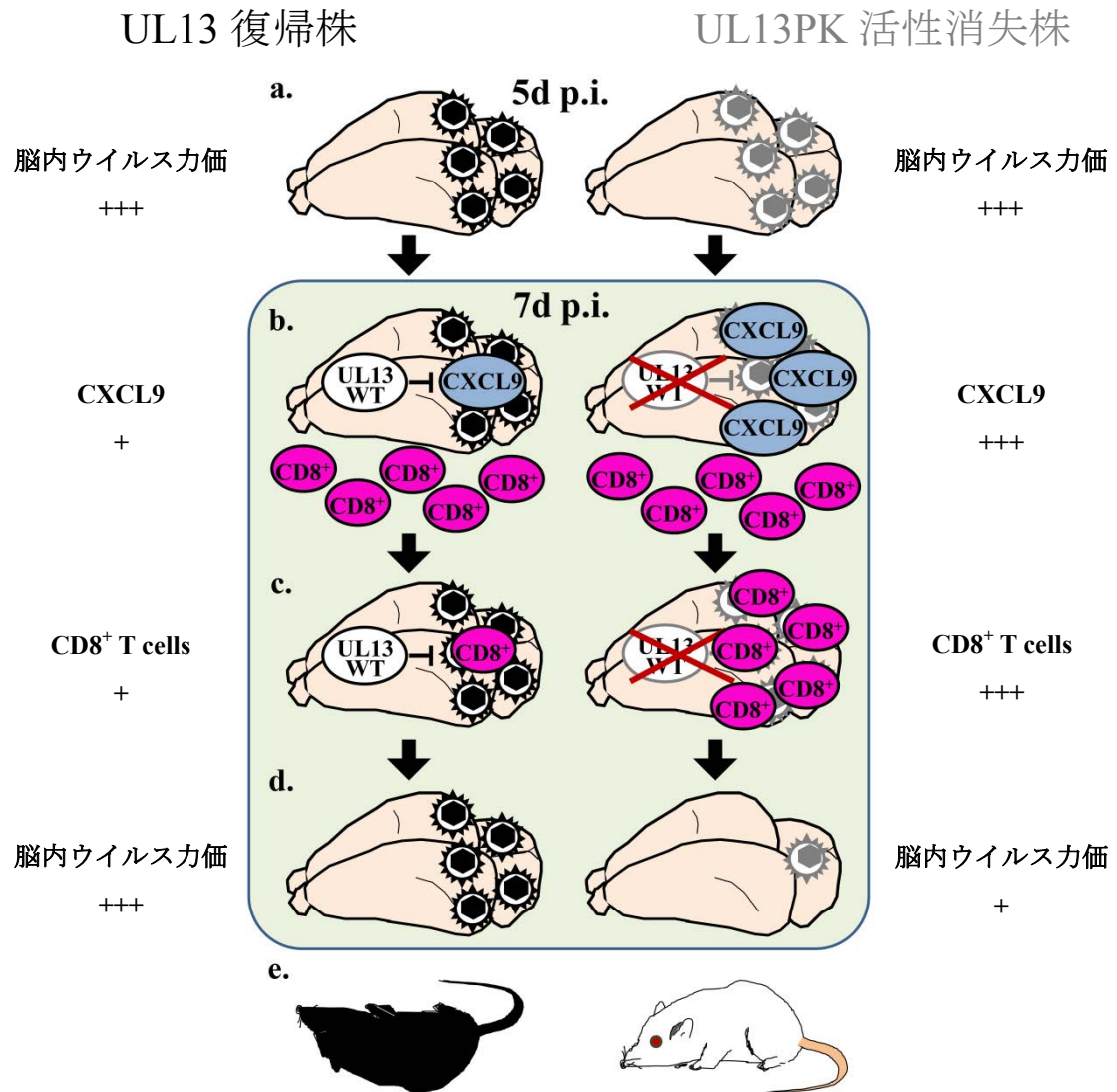


図 39. UL13 の PK 活性による HSV-1 新規宿主免疫回避機構のモデル図

HSV-1 は UL13 の PK 活性の有無に関わらず、角膜接種 5 日後までは脳内で増殖する (a)。角膜接種 7 日後の脳感染部位では UL13 の PK 活性依存的に CXCL9 の発現が抑制される (b)。CXCL9 の発現量が低い野生型株感染マウスでは、活性化した CD8⁺ T 細胞の脳感染部位への浸潤が抑制され (c)、効率的なウイルス排除が阻害される (d)。その結果、マウスは死に至る (e)。

謝辞

本研究は東京大学 医科学研究所 感染・免疫部門 ウイルス病態制御分野および東京大学 医科学研究所 感染症国際研究センター 感染制御系 ウイルス学分野にておこなわれた。

本研究を遂行するにあたり、これ以上無い研究環境を与えてくださり、日々適切な御助言、御指導をしてくださり、研究の基礎を教えてくださいました東京大学 医科学研究所 感染・免疫部門 ウイルス病態制御分野 川口 寧 教授に深く感謝と敬意を表します。

ウイルス病態制御分野 加藤 哲久 助教、有井 潤 助教には日々の研究を遂行する上で豊富な研究経験に基づいた、たくさんの暖かい御指導と御助言をいただきました。この場をお借りして厚く感謝申し上げます。

ウイルス病態制御分野の先輩である上間 匡 博士、今井 孝彦 博士には研究生活を始めるにあたり、何もわからない私に実験だけでなく学会やゼミの発表にいたるまで多大なる御指導、御協力をいただきました。この場をお借りして厚く感謝申し上げます。

国立感染症研究所 感染病理部 田中 道子 博士はプラスミド、ウイルス作製等において多大なる御協力を賜りました。この場をお借りして深く感謝の意を表します。

ウイルス病態制御分野 小山 志保子 氏、安藤 朋子 氏には実験だけでなく、学会や事務手続きなど研究室生活の中で多大なる御協力をいただきました。深く感謝の意を表します。

東京大学 医科学研究所 感染・免疫部門 炎症免疫学分野 清野 宏 教授、木村 あゆみ 博士は抗体等を御供与下さり、免疫の実験に関する御指導、御助言を数多く与えて下さいました。この場をお借りして深く感謝の意を表します。

東京大学 医科学研究所 病理コアラボ I の後藤 明輝 助教（現 秋田大学 医学系研究科 器官病態学 教授）、河原 元 氏には病理解析において多大なる御指導、御協力を賜りました。深く感謝申し上げます。

理化学研究所 システム糖鎖生物学研究グループ 疾患糖鎖研究チームの兼清 健志 博士、北爪 しのぶ 博士はマウス実験に関する御指導、御助言を数多く与えて下さいました。この場をお借りして深く感謝の意を表します。

また、東京大学 医科学研究所 FACS コアラボの皆様、実験動物センターの皆様、RI 管理室の皆様に心から感謝申し上げます。

日々、有意義な議論を交わし、切磋琢磨した研究生生活を共にしたウイルス病態制御分野の同期、後輩の皆様にこの場をお借りして感謝の意を表します。

最後に、私の 5 年間の研究生生活を暖かく見守っていただき、また精神的、経済的に支援していただきました両親に厚い感謝と敬意を表します。

参考文献

1. **Roizman B KD, Whitley RJ.** . 2013. Herpes simplex viruses., p. 2501-2601, In Knipe DM, Howley PM, Cohen JI, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Racaniello VR, and Roizman B. (ed), Fields virology, 6th ed. Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
2. **Koelle DM, Corey L.** 2008. Herpes simplex: insights on pathogenesis and possible vaccines. *Annu Rev Med* **59**:381-395.
3. **Manavi K, McMillan A, Ogilvie M.** 2004. Herpes simplex virus type 1 remains the principal cause of initial anogenital herpes in Edinburgh, Scotland. *Sex Transm Dis* **31**:322-324.
4. **Skoldenberg B, Forsgren M.** 1985. Acyclovir versus vidarabine in herpes simplex encephalitis. *Scand J Infect Dis Suppl* **47**:89-96.
5. **Szucs TD, Berger K, Fisman DN, Harbarth S.** 2001. The estimated economic burden of genital herpes in the United States. An analysis using two costing approaches. *BMC Infect Dis* **1**:5.
6. **Satoh T, Arii J, Suenaga T, Wang J, Kogure A, Uehori J, Arase N, Shiratori I, Tanaka S, Kawaguchi Y, Spear PG, Lanier LL, Arase H.** 2008. PILRalpha is a herpes simplex virus-1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B. *Cell* **132**:935-944.
7. **Suenaga T, Satoh T, Somboonthum P, Kawaguchi Y, Mori Y, Arase H.** 2010. Myelin-associated glycoprotein mediates membrane fusion and entry of neurotropic herpesviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:866-871.
8. **Arii J, Goto H, Suenaga T, Oyama M, Kozuka-Hata H, Imai T, Minowa A, Akashi H, Arase H, Kawaoka Y, Kawaguchi Y.** 2011. Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1. *Nature* **467**:859-862.
9. **Montgomery RI, Warner MS, Lum BJ, Spear PG.** 1996. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* **87**:427-436.
10. **Geraghty RJ, Krummenacher C, Cohen GH, Eisenberg RJ, Spear PG.** 1998. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* **280**:1618-1620.
11. **Shukla D, Liu J, Blaiklock P, Shworak NW, Bai X, Esko JD, Cohen GH, Eisenberg RJ, Rosenberg RD, Spear PG.** 1999. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* **99**:13-22.

12. **York IA, Roop C, Andrews DW, Riddell SR, Graham FL, Johnson DC.** 1994. A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8+ T lymphocytes. *Cell* **77**:525-535.
13. **Hill A, Jugovic P, York I, Russ G, Bennink J, Yewdell J, Ploegh H, Johnson D.** 1995. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature* **375**:411-415.
14. **Edelman AM, Blumenthal DK, Krebs EG.** 1987. Protein serine/threonine kinases. *Annu Rev Biochem* **56**:567-613.
15. **Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S.** 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**:1912-1934.
16. **Kawaguchi Y, Kato K.** 2003. Protein kinases conserved in herpesviruses potentially share a function mimicking the cellular protein kinase cdc2. *Rev Med Virol* **13**:331-340.
17. **Purves FC, Roizman B.** 1992. The UL13 gene of herpes simplex virus 1 encodes the functions for posttranslational processing associated with phosphorylation of the regulatory protein alpha 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:7310-7314.
18. **Coulter LJ, Moss HW, Lang J, McGeoch DJ.** 1993. A mutant of herpes simplex virus type 1 in which the UL13 protein kinase gene is disrupted. *J Gen Virol* **74 (Pt 3)**:387-395.
19. **Purves FC, Ogle WO, Roizman B.** 1993. Processing of the herpes simplex virus regulatory protein alpha 22 mediated by the UL13 protein kinase determines the accumulation of a subset of alpha and gamma mRNAs and proteins in infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:6701-6705.
20. **Ng TI, Talarico C, Burnette TC, Biron K, Roizman B.** 1996. Partial substitution of the functions of the herpes simplex virus 1 U(L)13 gene by the human cytomegalovirus U(L)97 gene. *Virology* **225**:347-358.
21. **Ng TI, Chang YE, Roizman B.** 1997. Infected cell protein 22 of herpes simplex virus 1 regulates the expression of virion host shutoff gene U(L)41. *Virology* **234**:226-234.
22. **Ogle WO, Roizman B.** 1999. Functional anatomy of herpes simplex virus 1 overlapping genes encoding infected-cell protein 22 and US1.5 protein. *J Virol* **73**:4305-4315.
23. **Poon AP, Ogle WO, Roizman B.** 2000. Posttranslational processing of infected cell protein 22 mediated by viral protein kinases is sensitive to amino acid

- substitutions at distant sites and can be cell-type specific. *J Virol* **74**:11210-11214.
24. **Bruni R, Fineschi B, Ogle WO, Roizman B.** 1999. A novel cellular protein, p60, interacting with both herpes simplex virus 1 regulatory proteins ICP22 and ICP0 is modified in a cell-type-specific manner and is recruited to the nucleus after infection. *J Virol* **73**:3810-3817.
 25. **Durand LO, Advani SJ, Poon AP, Roizman B.** 2005. The carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II is phosphorylated by a complex containing cdk9 and infected-cell protein 22 of herpes simplex virus 1. *J Virol* **79**:6757-6762.
 26. **Kawaguchi Y, Van Sant C, Roizman B.** 1998. Eukaryotic elongation factor 1delta is hyperphosphorylated by the protein kinase encoded by the U(L)13 gene of herpes simplex virus 1. *J Virol* **72**:1731-1736.
 27. **Kawaguchi Y, Kato K, Tanaka M, Kanamori M, Nishiyama Y, Yamanashi Y.** 2003. Conserved protein kinases encoded by herpesviruses and cellular protein kinase cdc2 target the same phosphorylation site in eukaryotic elongation factor 1delta. *J Virol* **77**:2359-2368.
 28. **Long MC, Leong V, Schaffer PA, Spencer CA, Rice SA.** 1999. ICP22 and the UL13 protein kinase are both required for herpes simplex virus-induced modification of the large subunit of RNA polymerase II. *J Virol* **73**:5593-5604.
 29. **Ng TI, Ogle WO, Roizman B.** 1998. UL13 protein kinase of herpes simplex virus 1 complexes with glycoprotein E and mediates the phosphorylation of the viral Fc receptor: glycoproteins E and I. *Virology* **241**:37-48.
 30. **Ogle WO, Ng TI, Carter KL, Roizman B.** 1997. The UL13 protein kinase and the infected cell type are determinants of posttranslational modification of ICP0. *Virology* **235**:406-413.
 31. **Kato K, Kawaguchi Y, Tanaka M, Igarashi M, Yokoyama A, Matsuda G, Kanamori M, Nakajima K, Nishimura Y, Shimojima M, Phung HT, Takahashi E, Hirai K.** 2001. Epstein-Barr virus-encoded protein kinase BGLF4 mediates hyperphosphorylation of cellular elongation factor 1delta (EF-1delta): EF-1delta is universally modified by conserved protein kinases of herpesviruses in mammalian cells. *J Gen Virol* **82**:1457-1463.
 32. **Kawaguchi Y, Matsumura T, Roizman B, Hirai K.** 1999. Cellular elongation factor 1delta is modified in cells infected with representative alpha-, beta-, or gammaherpesviruses. *J Virol* **73**:4456-4460.
 33. **Kato K, Yokoyama A, Tohya Y, Akashi H, Nishiyama Y, Kawaguchi Y.** 2003. Identification of protein kinases responsible for phosphorylation of Epstein-Barr

- virus nuclear antigen leader protein at serine-35, which regulates its coactivator function. *J Gen Virol* **84**:3381-3392.
34. **Yokoyama A, Tanaka M, Matsuda G, Kato K, Kanamori M, Kawasaki H, Hirano H, Kitabayashi I, Ohki M, Hirai K, Kawaguchi Y.** 2001. Identification of major phosphorylation sites of Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein (EBNA-LP): ability of EBNA-LP to induce latent membrane protein 1 cooperatively with EBNA-2 is regulated by phosphorylation. *J Virol* **75**:5119-5128.
 35. **Yue W, Gershburg E, Pagano JS.** 2005. Hyperphosphorylation of EBNA2 by Epstein-Barr virus protein kinase suppresses transactivation of the LMP1 promoter. *J Virol* **79**:5880-5885.
 36. **Cunningham C, Davison AJ, Dolan A, Frame MC, McGeoch DJ, Meredith DM, Moss HW, Orr AC.** 1992. The UL13 virion protein of herpes simplex virus type 1 is phosphorylated by a novel virus-induced protein kinase. *J Gen Virol* **73 (Pt 2)**:303-311.
 37. **Overton HA, McMillan DJ, Klavinskis LS, Hope L, Ritchie AJ, Wong-kai-in P.** 1992. Herpes simplex virus type 1 gene UL13 encodes a phosphoprotein that is a component of the virion. *Virology* **190**:184-192.
 38. **Morrison EE, Wang YF, Meredith DM.** 1998. Phosphorylation of structural components promotes dissociation of the herpes simplex virus type 1 tegument. *J Virol* **72**:7108-7114.
 39. **Tanaka M, Nishiyama Y, Sata T, Kawaguchi Y.** 2005. The role of protein kinase activity expressed by the UL13 gene of herpes simplex virus 1: the activity is not essential for optimal expression of UL41 and ICP0. *Virology* **341**:301-312.
 40. **Shibaki T, Suzutani T, Yoshida I, Ogasawara M, Azuma M.** 2001. Participation of type I interferon in the decreased virulence of the UL13 gene-deleted mutant of herpes simplex virus type 1. *J Interferon Cytokine Res* **21**:279-285.
 41. **Tanaka M, Kagawa H, Yamanashi Y, Sata T, Kawaguchi Y.** 2003. Construction of an excisable bacterial artificial chromosome containing a full-length infectious clone of herpes simplex virus type 1: viruses reconstituted from the clone exhibit wild-type properties in vitro and in vivo. *J Virol* **77**:1382-1391.

42. **Sagou K, Imai T, Sagara H, Uema M, Kawaguchi Y.** 2009. Regulation of the catalytic activity of herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 by autophosphorylation and its role in pathogenesis. *J Virol* **83**:5773-5783.
43. **Gillgrass AE, Ashkar AA, Rosenthal KL, Kaushic C.** 2003. Prolonged exposure to progesterone prevents induction of protective mucosal responses following intravaginal immunization with attenuated herpes simplex virus type 2. *J Virol* **77**:9845-9851.
44. **Frame MC, Purves FC, McGeoch DJ, Marsden HS, Leader DP.** 1987. Identification of the herpes simplex virus protein kinase as the product of viral gene US3. *J Gen Virol* **68 (Pt 10)**:2699-2704.
45. **McGeoch DJ, Davison AJ.** 1986. Alphaherpesviruses possess a gene homologous to the protein kinase gene family of eukaryotes and retroviruses. *Nucleic Acids Res* **14**:1765-1777.
46. **Purves FC, Spector D, Roizman B.** 1991. The herpes simplex virus 1 protein kinase encoded by the US3 gene mediates posttranslational modification of the phosphoprotein encoded by the UL34 gene. *J Virol* **65**:5757-5764.
47. **Leopardi R, Van Sant C, Roizman B.** 1997. The herpes simplex virus 1 protein kinase US3 is required for protection from apoptosis induced by the virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:7891-7896.
48. **Munger J, Chee AV, Roizman B.** 2001. The U(S)3 protein kinase blocks apoptosis induced by the d120 mutant of herpes simplex virus 1 at a premitochondrial stage. *J Virol* **75**:5491-5497.
49. **Munger J, Roizman B.** 2001. The US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 mediates the posttranslational modification of BAD and prevents BAD-induced programmed cell death in the absence of other viral proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:10410-10415.
50. **Ogg PD, McDonnell PJ, Ryckman BJ, Knudson CM, Roller RJ.** 2004. The HSV-1 Us3 protein kinase is sufficient to block apoptosis induced by overexpression of a variety of Bcl-2 family members. *Virology* **319**:212-224.
51. **Mou F, Wills E, Baines JD.** 2009. Phosphorylation of the U(L)31 protein of herpes simplex virus 1 by the U(S)3-encoded kinase regulates localization of the nuclear envelopment complex and egress of nucleocapsids. *J Virol* **83**:5181-5191.
52. **Reynolds AE, Wills EG, Roller RJ, Ryckman BJ, Baines JD.** 2002. Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34, and

- US3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids. *J Virol* **76**:8939-8952.
53. **Ryckman BJ, Roller RJ.** 2004. Herpes simplex virus type 1 primary envelopment: UL34 protein modification and the US3-UL34 catalytic relationship. *J Virol* **78**:399-412.
 54. **Wisner TW, Wright CC, Kato A, Kawaguchi Y, Mou F, Baines JD, Roller RJ, Johnson DC.** 2009. Herpesvirus gB-induced fusion between the virion envelope and outer nuclear membrane during virus egress is regulated by the viral US3 kinase. *J Virol* **83**:3115-3126.
 55. **Kato A, Yamamoto M, Ohno T, Kodaira H, Nishiyama Y, Kawaguchi Y.** 2005. Identification of proteins phosphorylated directly by the Us3 protein kinase encoded by herpes simplex virus 1. *J Virol* **79**:9325-9331.
 56. **Leach N, Bjerke SL, Christensen DK, Bouchard JM, Mou F, Park R, Baines J, Haraguchi T, Roller RJ.** 2007. Emerin is hyperphosphorylated and redistributed in herpes simplex virus type 1-infected cells in a manner dependent on both UL34 and US3. *J Virol* **81**:10792-10803.
 57. **Morris JB, Hofemeister H, O'Hare P.** 2007. Herpes simplex virus infection induces phosphorylation and delocalization of emerin, a key inner nuclear membrane protein. *J Virol* **81**:4429-4437.
 58. **Mou F, Forest T, Baines JD.** 2007. US3 of herpes simplex virus type 1 encodes a promiscuous protein kinase that phosphorylates and alters localization of lamin A/C in infected cells. *J Virol* **81**:6459-6470.
 59. **Reynolds AE, Ryckman BJ, Baines JD, Zhou Y, Liang L, Roller RJ.** 2001. U(L)31 and U(L)34 proteins of herpes simplex virus type 1 form a complex that accumulates at the nuclear rim and is required for envelopment of nucleocapsids. *J Virol* **75**:8803-8817.
 60. **Poon AP, Gu H, Roizman B.** 2006. ICP0 and the US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 independently block histone deacetylation to enable gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:9993-9998.
 61. **Poon AP, Liang Y, Roizman B.** 2003. Herpes simplex virus 1 gene expression is accelerated by inhibitors of histone deacetylases in rabbit skin cells infected with a mutant carrying a cDNA copy of the infected-cell protein no. 0. *J Virol* **77**:12671-12678.
 62. **Walters MS, Kinchington PR, Banfield BW, Silverstein S.** 2010. Hyperphosphorylation of histone deacetylase 2 by alphaherpesvirus US3 kinases. *J Virol* **84**:9666-9676.

63. **Kato A, Tanaka M, Yamamoto M, Asai R, Sata T, Nishiyama Y, Kawaguchi Y.** 2008. Identification of a physiological phosphorylation site of the herpes simplex virus 1-encoded protein kinase Us3 which regulates its optimal catalytic activity in vitro and influences its function in infected cells. *J Virol* **82**:6172-6189.
64. **Cartier A, Masucci MG.** 2004. Differential regulation of MHC class-I-restricted and unrestricted cytotoxicity by the Us3 protein kinase of herpes simplex virus-1. *Scand J Immunol* **60**:592-599.
65. **Cartier A, Broberg E, Komai T, Henriksson M, Masucci MG.** 2003. The herpes simplex virus-1 Us3 protein kinase blocks CD8T cell lysis by preventing the cleavage of Bid by granzyme B. *Cell Death Differ* **10**:1320-1328.
66. **Sloan DD, Zahariadis G, Posavad CM, Pate NT, Kussick SJ, Jerome KR.** 2003. CTL are inactivated by herpes simplex virus-infected cells expressing a viral protein kinase. *J Immunol* **171**:6733-6741.
67. **Rao P, Pham HT, Kulkarni A, Yang Y, Liu X, Knipe DM, Cresswell P, Yuan W.** 2011. Herpes simplex virus 1 glycoprotein B and US3 collaborate to inhibit CD1d antigen presentation and NKT cell function. *J Virol* **85**:8093-8104.
68. **Imai T, Koyanagi N, Ogawa R, Shindo K, Suenaga T, Sato A, Arii J, Kato A, Kiyono H, Arase H, Kawaguchi Y.** 2013. Us3 kinase encoded by herpes simplex virus 1 mediates downregulation of cell surface major histocompatibility complex class I and evasion of CD8(+) T cells. *PLoS One* **8**:e72050.
69. **Chuluunbaatar U, Roller R, Feldman ME, Brown S, Shokat KM, Mohr I.** 2010. Constitutive mTORC1 activation by a herpesvirus Akt surrogate stimulates mRNA translation and viral replication. *Genes Dev* **24**:2627-2639.
70. **Imai T, Arii J, Minowa A, Kakimoto A, Koyanagi N, Kato A, Kawaguchi Y.** 2011. Role of the herpes simplex virus 1 Us3 kinase phosphorylation site and endocytosis motifs in the intracellular transport and neurovirulence of envelope glycoprotein B. *J Virol* **85**:5003-5015.
71. **Kato A, Arii J, Shiratori I, Akashi H, Arase H, Kawaguchi Y.** 2009. Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 phosphorylates viral envelope glycoprotein B and regulates its expression on the cell surface. *J Virol* **83**:250-261.
72. **Kato A, Liu Z, Minowa A, Imai T, Tanaka M, Sugimoto K, Nishiyama Y, Arii J, Kawaguchi Y.** 2011. Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 and major tegument protein UL47 reciprocally regulate their subcellular localization in infected cells. *J Virol* **85**:9599-9613.

73. **Purves FC, Longnecker RM, Leader DP, Roizman B.** 1987. Herpes simplex virus 1 protein kinase is encoded by open reading frame US3 which is not essential for virus growth in cell culture. *J Virol* **61**:2896-2901.
74. **Meignier B, Longnecker R, Mavromara-Nazos P, Sears AE, Roizman B.** 1988. Virulence of and establishment of latency by genetically engineered deletion mutants of herpes simplex virus 1. *Virology* **162**:251-254.
75. **Morimoto T, Arii J, Tanaka M, Sata T, Akashi H, Yamada M, Nishiyama Y, Uema M, Kawaguchi Y.** 2009. Differences in the regulatory and functional effects of the Us3 protein kinase activities of herpes simplex virus 1 and 2. *J Virol* **83**:11624-11634.
76. **Mueller SN, Jones CM, Smith CM, Heath WR, Carbone FR.** 2002. Rapid cytotoxic T lymphocyte activation occurs in the draining lymph nodes after cutaneous herpes simplex virus infection as a result of early antigen presentation and not the presence of virus. *J Exp Med* **195**:651-656.
77. **Ejercito PM, Kieff ED, Roizman B.** 1968. Characterization of herpes simplex virus strains differing in their effects on social behaviour of infected cells. *J Gen Virol* **2**:357-364.
78. **Tanaka M, Kato A, Satoh Y, Ide T, Sagou K, Kimura K, Hasegawa H, Kawaguchi Y.** 2012. Herpes simplex virus 1 VP22 regulates translocation of multiple viral and cellular proteins and promotes neurovirulence. *J Virol* **86**:5264-5277.
79. **Kato A, Yamamoto M, Ohno T, Tanaka M, Sata T, Nishiyama Y, Kawaguchi Y.** 2006. Herpes simplex virus 1-encoded protein kinase UL13 phosphorylates viral Us3 protein kinase and regulates nuclear localization of viral envelopment factors UL34 and UL31. *J Virol* **80**:1476-1486.
80. **Igarashi K, Fawl R, Roller RJ, Roizman B.** 1993. Construction and properties of a recombinant herpes simplex virus 1 lacking both S-component origins of DNA synthesis. *J Virol* **67**:2123-2132.
81. **Kawaguchi Y, Van Sant C, Roizman B.** 1997. Herpes simplex virus 1 alpha regulatory protein ICP0 interacts with and stabilizes the cell cycle regulator cyclin D3. *J Virol* **71**:7328-7336.
82. **Nozawa N, Kawaguchi Y, Tanaka M, Kato A, Kato A, Kimura H, Nishiyama Y.** 2005. Herpes simplex virus type 1 UL51 protein is involved in maturation and egress of virus particles. *J Virol* **79**:6947-6956.
83. **Arii J, Wang J, Morimoto T, Suenaga T, Akashi H, Arase H, Kawaguchi Y.** 2010. A single-amino-acid substitution in herpes simplex virus 1 envelope

- glycoprotein B at a site required for binding to the paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha (PILRalpha) abrogates PILRalpha-dependent viral entry and reduces pathogenesis. *J Virol* **84**:10773-10783.
84. **Polcicova K, Biswas PS, Banerjee K, Wisner TW, Rouse BT, Johnson DC.** 2005. Herpes keratitis in the absence of anterograde transport of virus from sensory ganglia to the cornea. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:11462-11467.
 85. **Lundberg P, Ramakrishna C, Brown J, Tyszka JM, Hamamura M, Hinton DR, Kovats S, Nalcioglu O, Weinberg K, Openshaw H, Cantin EM.** 2008. The immune response to herpes simplex virus type 1 infection in susceptible mice is a major cause of central nervous system pathology resulting in fatal encephalitis. *J Virol* **82**:7078-7088.
 86. **Koyanagi N, Imai T, Arai J, Kato A, Kawaguchi Y.** 2013. Role of Herpes Simplex Virus 1 Us3 in Viral Neuroinvasiveness. *Microbiol Immunol*.
 87. **Lang A, Nikolich-Zugich J.** 2005. Development and migration of protective CD8+ T cells into the nervous system following ocular herpes simplex virus-1 infection. *J Immunol* **174**:2919-2925.
 88. **Tigges MA, Leng S, Johnson DC, Burke RL.** 1996. Human herpes simplex virus (HSV)-specific CD8+ CTL clones recognize HSV-2-infected fibroblasts after treatment with IFN-gamma or when virion host shutoff functions are disabled. *J Immunol* **156**:3901-3910.
 89. **Thapa M, Carr DJ.** 2009. CXCR3 deficiency increases susceptibility to genital herpes simplex virus type 2 infection: Uncoupling of CD8+ T-cell effector function but not migration. *J Virol* **83**:9486-9501.
 90. **Thapa M, Welner RS, Pelayo R, Carr DJ.** 2008. CXCL9 and CXCL10 expression are critical for control of genital herpes simplex virus type 2 infection through mobilization of HSV-specific CTL and NK cells to the nervous system. *J Immunol* **180**:1098-1106.
 91. **Kwong AD, Frenkel N.** 1987. Herpes simplex virus-infected cells contain a function(s) that destabilizes both host and viral mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:1926-1930.
 92. **Kwong AD, Frenkel N.** 1989. The herpes simplex virus virion host shutoff function. *J Virol* **63**:4834-4839.
 93. **Oroskar AA, Read GS.** 1989. Control of mRNA stability by the virion host shutoff function of herpes simplex virus. *J Virol* **63**:1897-1906.

94. **Hill AB, Barnett BC, McMichael AJ, McGeoch DJ.** 1994. HLA class I molecules are not transported to the cell surface in cells infected with herpes simplex virus types 1 and 2. *J Immunol* **152**:2736-2741.
95. **Trgovcich J, Johnson D, Roizman B.** 2002. Cell surface major histocompatibility complex class II proteins are regulated by the products of the gamma(1)34.5 and U(L)41 genes of herpes simplex virus 1. *J Virol* **76**:6974-6986.
96. **Strelow LI, Leib DA.** 1995. Role of the virion host shutoff (vhs) of herpes simplex virus type 1 in latency and pathogenesis. *J Virol* **69**:6779-6786.
97. **Strelow L, Smith T, Leib D.** 1997. The virion host shutoff function of herpes simplex virus type 1 plays a role in corneal invasion and functions independently of the cell cycle. *Virology* **231**:28-34.
98. **Smith TJ, Ackland-Berglund CE, Leib DA.** 2000. Herpes simplex virus virion host shutoff (vhs) activity alters periocular disease in mice. *J Virol* **74**:3598-3604.
99. **Asai R, Ohno T, Kato A, Kawaguchi Y.** 2007. Identification of proteins directly phosphorylated by UL13 protein kinase from herpes simplex virus 1. *Microbes Infect* **9**:1434-1438.
100. **Moffat JF, Zerboni L, Sommer MH, Heineman TC, Cohen JI, Kaneshima H, Arvin AM.** 1998. The ORF47 and ORF66 putative protein kinases of varicella-zoster virus determine tropism for human T cells and skin in the SCID-hu mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:11969-11974.
101. **Tarakanova VL, Leung-Pineda V, Hwang S, Yang CW, Matatall K, Basson M, Sun R, Piwnica-Worms H, Sleckman BP, Virgin HWt.** 2007. Gamma-herpesvirus kinase actively initiates a DNA damage response by inducing phosphorylation of H2AX to foster viral replication. *Cell Host Microbe* **1**:275-286.
102. **Hwang S, Kim KS, Flano E, Wu TT, Tong LM, Park AN, Song MJ, Sanchez DJ, O'Connell RM, Cheng G, Sun R.** 2009. Conserved herpesviral kinase promotes viral persistence by inhibiting the IRF-3-mediated type I interferon response. *Cell Host Microbe* **5**:166-178.
103. **Vandevenne P, Lebrun M, El Mjiyad N, Ote I, Di Valentin E, Habraken Y, Dortu E, Piette J, Sadzot-Delvaux C.** 2011. The varicella-zoster virus ORF47 kinase interferes with host innate immune response by inhibiting the activation of IRF3. *PLoS One* **6**:e16870.

104. **Wang JT, Doong SL, Teng SC, Lee CP, Tsai CH, Chen MR.** 2009. Epstein-Barr virus BGLF4 kinase suppresses the interferon regulatory factor 3 signaling pathway. *J Virol* **83**:1856-1869.
105. **Melroe GT, DeLuca NA, Knipe DM.** 2004. Herpes simplex virus 1 has multiple mechanisms for blocking virus-induced interferon production. *J Virol* **78**:8411-8420.
106. **Cotter CR, Nguyen ML, Yount JS, Lopez CB, Blaho JA, Moran TM.** 2010. The virion host shut-off (vhs) protein blocks a TLR-independent pathway of herpes simplex virus type 1 recognition in human and mouse dendritic cells. *PLoS One* **5**:e8684.
107. **Eidson KM, Hobbs WE, Manning BJ, Carlson P, DeLuca NA.** 2002. Expression of herpes simplex virus ICP0 inhibits the induction of interferon-stimulated genes by viral infection. *J Virol* **76**:2180-2191.
108. **Mossman KL, Saffran HA, Smiley JR.** 2000. Herpes simplex virus ICP0 mutants are hypersensitive to interferon. *J Virol* **74**:2052-2056.
109. **Mossman KL, Smiley JR.** 2002. Herpes simplex virus ICP0 and ICP34.5 counteract distinct interferon-induced barriers to virus replication. *J Virol* **76**:1995-1998.
110. **Harle P, Sainz B, Jr., Carr DJ, Halford WP.** 2002. The immediate-early protein, ICP0, is essential for the resistance of herpes simplex virus to interferon-alpha/beta. *Virology* **293**:295-304.
111. **He B, Gross M, Roizman B.** 1997. The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:843-848.
112. **Cassady KA, Gross M, Roizman B.** 1998. The herpes simplex virus US11 protein effectively compensates for the gamma1(34.5) gene if present before activation of protein kinase R by precluding its phosphorylation and that of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *J Virol* **72**:8620-8626.
113. **Chou J, Chen JJ, Gross M, Roizman B.** 1995. Association of a M(r) 90,000 phosphoprotein with protein kinase PKR in cells exhibiting enhanced phosphorylation of translation initiation factor eIF-2 alpha and premature shutoff of protein synthesis after infection with gamma 134.5- mutants of herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:10516-10520.

114. **Cassady KA, Gross M.** 2002. The herpes simplex virus type 1 U(S)11 protein interacts with protein kinase R in infected cells and requires a 30-amino-acid sequence adjacent to a kinase substrate domain. *J Virol* **76**:2029-2035.
115. **Leib DA, Machalek MA, Williams BR, Silverman RH, Virgin HW.** 2000. Specific phenotypic restoration of an attenuated virus by knockout of a host resistance gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6097-6101.
116. **Poppers J, Mulvey M, Khoo D, Mohr I.** 2000. Inhibition of PKR activation by the proline-rich RNA binding domain of the herpes simplex virus type 1 Us11 protein. *J Virol* **74**:11215-11221.
117. **Orzalli MH, Conwell SE, Berrios C, Decaprio JA, Knipe DM.** 2013. Nuclear interferon-inducible protein 16 promotes silencing of herpesviral and transfected DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:E4492-4501.
118. **Wang S, Wang K, Lin R, Zheng C.** 2013. Herpes Simplex Virus 1 Serine/Threonine Kinase US3 Hyperphosphorylates IRF3 and Inhibits Beta Interferon Production. *J Virol* **87**:12814-12827.
119. **Groom JR, Luster AD.** 2011. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol Cell Biol* **89**:207-215.
120. **Wuest TR, Carr DJ.** 2008. Dysregulation of CXCR3 signaling due to CXCL10 deficiency impairs the antiviral response to herpes simplex virus 1 infection. *J Immunol* **181**:7985-7993.
121. **Nakanishi Y, Lu B, Gerard C, Iwasaki A.** 2009. CD8(+) T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4(+) T-cell help. *Nature* **462**:510-513.
122. **Helbig KJ, Ruszkiewicz A, Lanford RE, Berzsenyi MD, Harley HA, McColl SR, Beard MR.** 2009. Differential expression of the CXCR3 ligands in chronic hepatitis C virus (HCV) infection and their modulation by HCV in vitro. *J Virol* **83**:836-846.
123. **Wickham S, Lu B, Ash J, Carr DJ.** 2005. Chemokine receptor deficiency is associated with increased chemokine expression in the peripheral and central nervous systems and increased resistance to herpetic encephalitis. *J Neuroimmunol* **162**:51-59.
124. **Shin H, Iwasaki A.** 2012. A vaccine strategy that protects against genital herpes by establishing local memory T cells. *Nature* **491**:463-467.
125. **Nishiyama Y, Yamada Y, Kurachi R, Daikoku T.** 1992. Construction of a US3 lacZ insertion mutant of herpes simplex virus type 2 and characterization of its phenotype in vitro and in vivo. *Virology* **190**:256-268.