

【原著・基礎】

オリゴヌクレオチドの抗ヘルペス効果

—PCR 法による判定—

東海林洋子^{1,2)}・乗松 美貴¹⁾・吉田 みさ¹⁾・嶋田甚五郎^{1,2)}・水島 裕¹⁾¹⁾ 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター*²⁾ 同 微生物学教室

(平成 10 年 1 月 29 日受付 平成 10 年 7 月 10 日受理)

われわれはこれまで、単純ヘルペスウイルス I 型 (HSV-I) の早期 pre-mRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成し、スプライシング部位を中心とした配列に相補的なオリゴヌクレオチドに高い抗ヘルペス活性があることを見い出してきた。しかし、G が連続して含まれている配列には塩基配列非特異的な反応も認められることから、アンチセンス法以外のメカニズムも考えられた。そこで、オリゴヌクレオチドのウイルス吸着阻止効果について検討した。細胞膜表面に吸着したウイルス量を感度の良い PCR 法について測定したところ、フォスフォロチオエート型オリゴヌクレオチドには感染の初期に明らかなウイルス吸着阻止効果が認められた。また、ウイルス吸着阻害は 0.5~10 μ M のいずれの濃度でも認められた。

Key words: D-oligos, S-oligos, HSV-1, PCR 法

アンチセンス DNA が医薬品として期待され精力的な研究が行われるようになって 15 年あまり経過した。その間、臨床試験が進み¹⁾、アンチセンス効果が証明される一方で、塩基配列非特異的な反応も無視できずにいるのもまた、事実である²⁾。ウイルスのライフサイクルは吸着・侵入に引き続きウイルス内部の DNA が放出される。早期あるいは初期の蛋白合成、そして後期蛋白の合成が見られ、成熟したウイルスへと成長し、細胞外へ放出される³⁾。抗ウイルス薬はウイルスのどのライフサイクルを阻害するかによって開発の戦略が異なってくる。われわれは、早期 pre-mRNA^{4/5} が単純ヘルペスウイルス I 型 (HSV-I) の増殖に重要な役割を果たすことから⁴⁾、有効なターゲット部位であるとして検討を進めてきた。われわれはこれまで、HSV-I の早期 pre-mRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成し、スプライシング部位を中心とした配列に相補的なオリゴヌクレオチドに高い抗ヘルペス活性があることを見い出してきた⁵⁾。後期蛋白をターゲットとした時やミスマッチ配列では効果が認められなかったことから、アンチセンス法のメカニズムで働いていることが示唆された⁵⁾。しかし、連続した G 配列を含むオリゴヌクレオチドはアンチセンス配列を持たないにもかかわらず、抗ヘルペス活性が認められた (unpublished data)。抗ヘルペス活性のメカニズムとしては、ウイルス吸着阻害、DNA ポリメラーゼ活性阻害などが考えられる。本研究では、アンチセンス法以外にオリゴヌクレオチドのウイ

ルス吸着阻害効果について検討した。ウイルスの定量にはブランク法を用いた。しかし、細胞膜を吸着した微量のウイルス量を検出できないことが懸念され、さらに感度の良い PCR 法も用いた。

I. 材料と方法

1. オリゴヌクレオチドの合成・精製

単純ヘルペスウイルス I 型 (HSV-I) の早期 pre-mRNA に対して相補的配列を有するオリゴヌクレオチド (5' GCG GGT GAG CCC C 3') を DNA 全自動合成装置 (アプライドバイオ社, 394 型) にて β -シアノエチル法にて合成した⁶⁾。天然に存在するフォスフォジエステル型オリゴヌクレオチド (D-oligos) ならびにリン酸結合の酸素原子 1 個をイオウに置換したフォスフォロチオエート型オリゴヌクレオチド (S-oligos)⁷⁾ の 2 つのアナログを合成した。精製は HPLC にて行い凍結乾燥し、実験に供するまで -20°C にて保存した。

2. ウイルス感染と投薬スケジュール

ウイルス吸着試験は Rao らの方法を改良して 4°C 下にて行った⁸⁾。Vero 細胞にて HSV-I (Miyama 株, GC*5 pfu/well) を 4°C にて 2 時間感染させ、良く洗浄しその後 37°C にて、24 時間インキュベーションした。その後、細胞を凍結・融解をくり返し、一部はブランク法に残りはウイルス DNA を抽出し PCR 法に供した。D-oligos ならびに S-oligos を加える時間のスケ

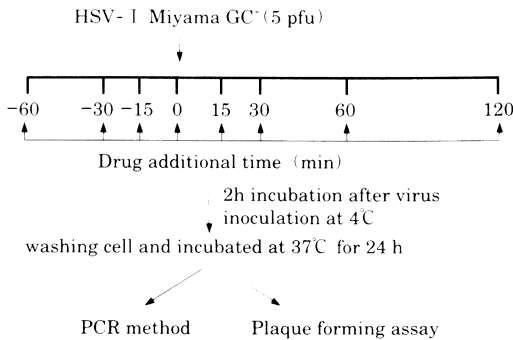


Fig. 1. Time schedule for drug administration and virus inoculation.

ジュールを Fig. 1 に示した。投薬する時間は時間依存性を検討する実験以外はウイルス感染 30 分後とした。加える濃度は実験により 0.5~10 μM を用いた。

3. プラーク法によるウイルス量の測定

細胞を凍結融解した後、適宜希釈し、Vero 細胞を単相に撒いたシャーレに加えた。72 時間後、1% クリスタルバイオレット/エタノール溶液で染色し、形成されたプラーク数を計測し、plaque forming unit (pfu) として表わした。希釈した場合は、測定プラーク数に希釈倍数をかけて pfu として表わした。同様の実験を 3 回行い、平均値として表わした。

4. PCR 法によるウイルス量の測定

ISOGEN (ニッポンジーン) をウイルス感染細胞に加え、ウイルス DNA をクロロホルム抽出した。抽出した DNA テンプレートは DEPC 処理した蒸留水に溶解し、PCR にかけた。使用したプライマーは HSV-1-F (5' GTT AGG GAG TTG TTC AAT CAT AAG CT 3') ならびに HSV-1-R (5' TCG GCC ATC TTG AGA GAG GCA TTC 3') である。PCR の条件は 94 $^{\circ}\text{C}$ 7 分処理した後、94 $^{\circ}\text{C}$ 1 分、61 $^{\circ}\text{C}$ 1 分、72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 分を 35 サイクルくり返した。PCR 産物を 2.5% アガロースゲルにて電気泳動をかけた後、コンピューターによる画像処理により、泳動バンドの濃さを測定した。プラーク法により定量した既知ウイルス量をコントロールとし、半定量した値を百分率で表記した。吸着阻害実験においては、薬剤を加えないときのウイルス量を PCR 法にて測定した値をコントロールとし、百分率で表わした。同様の実験を 3 回行い、平均値として表わした。

II. 結 果

1. プラーク法と PCR 法の相関について

横軸にプラーク法にて測定したウイルス量を、縦軸に PCR 法にて測定したウイルス DNA 量を示した (Fig. 2)。このとき、35 サイクル数では、各濃度の PCR 産物の量は、まだプラトーに達しておらず、直線部分であることをサイクル数を変えた別の実験にて確認している。Fig. 2 に示すように、正の相関が認められ、

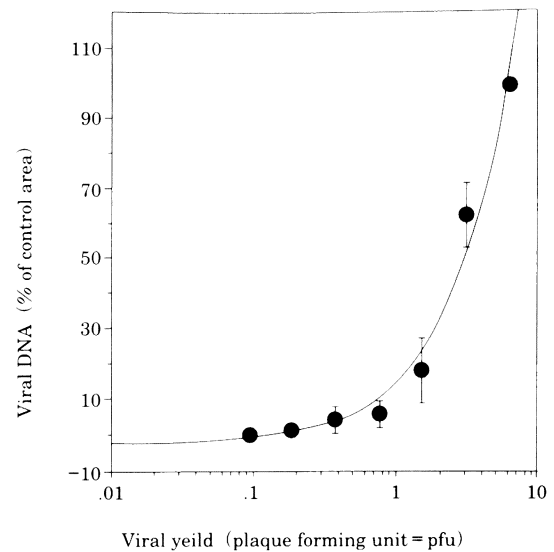


Fig. 2. Relation between virality yield by plaque forming assay and viral DNA by PCR method.

プラーク法に比べ、PCR 法は感度が良く、半定量化が可能であった。

2. ウイルス吸着阻害-アナログによる違い-

D-oligos あるいは S-oligos 10 μM をウイルス吸着 30 分後に加え、ウイルス存在下に 120 分間インキュベーションした。D-oligos と S-oligos を比較すると、D-oligos はウイルス吸着阻害がみられず、S-oligos ではウイルスの吸着阻害が観察された。この傾向はプラーク法ならびに PCR 法いずれにおいても同様であった。プラーク法では完全にウイルスの吸着を阻害しているかを見えたが、PCR 法では阻害率は約 70% であった (Fig. 3)。

3. ウイルス吸着阻害-時間依存性-

Fig. 1 に示すように、S-oligos を投薬する時間を変化させて、ウイルスを感染させ 120 分間インキュベーションした。プラーク法では、ほとんどウイルスは検出されず、完全にウイルスの吸着が阻害されているように思われた。PCR 法では、感染 30 分後までは、ウイルスの吸着阻害が観察されたが、感染 60 分後に S-oligos を加えた場合はウイルス吸着は阻害されなかった。感染 60 分後にはウイルスの吸着・侵入が成立するものと思われ、S-oligos のウイルス吸着阻害は、感染のごく初期にのみにおこるものと思われた (Fig. 4)。

4. ウイルス吸着阻害-濃度依存性-

S-oligos によるウイルス吸着阻害が濃度依存的 (0.5~10 μM) におこるかどうかを検討したところ、いずれの濃度でも、ウイルスの吸着阻害が観察された。この傾向は、プラーク法または PCR 法でも同様であった (Fig. 5)。ウイルス吸着阻害が濃度依存的におきているか否かについては、明確な結果は得られなかった。

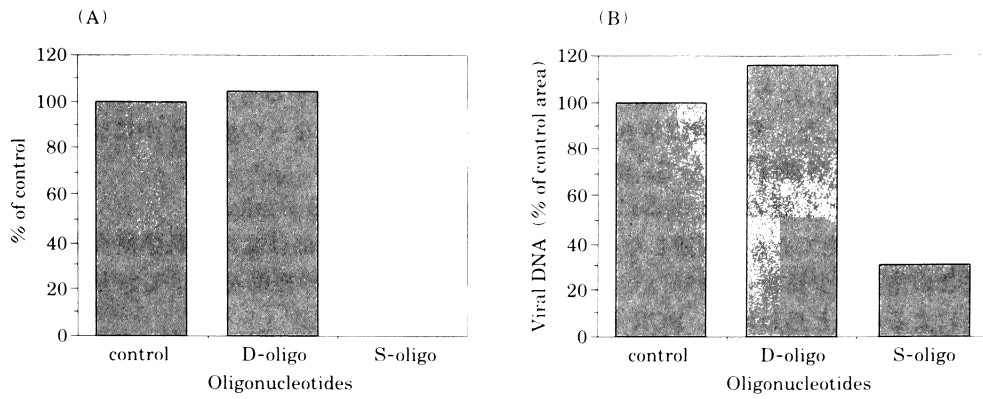


Fig. 3. Inhibitory effect of viral absorption by different type of oligonucleotides analogues. Vero Cells were incubated with 10 μ M of S-oligos or D-oligos at 4°C for 30 minutes under the presence of HSV- I (Miyama strain GC⁺, 5 pfu). After the washing cells by PBS, cells were incubated at 37°C for 24 hours. Viral yield were assessed by plaque forming assay and viral DNA were measured by PCR. (A): plaque forming assay, (B): PCR method.

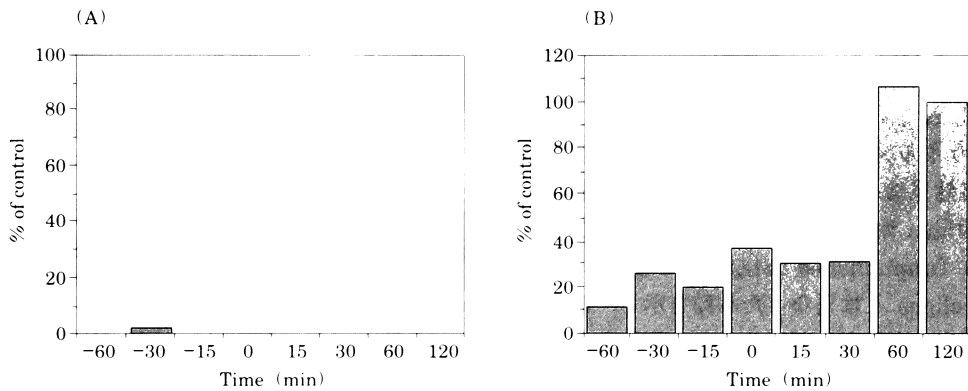


Fig. 4. Time dependency of inhibitory effect of viral absorption by S-oligos. Vero Cells were incubated with 10 μ M S-oligos at 4°C for different time course (-15, -30, -60, 0, 15, 30, 60, 120 minutes) under the presence of HSV-I (Miyama strain GC⁺, 5 pfu). After the washing cells by PBS, cells were incubated at 37°C for 24 hours. Viral yield were assessed by plaque forming assay and viral DNA were measured by PCR. (A): plaque forming assay, (B): PCR method.

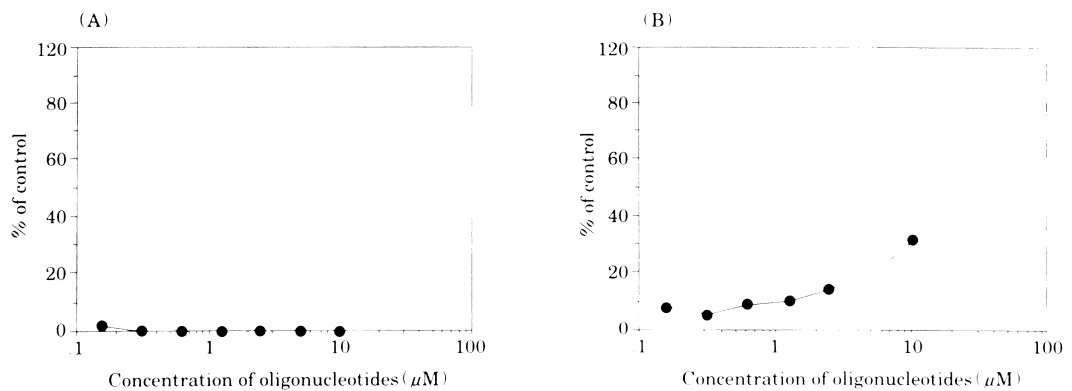


Fig. 5. Dose dependency of inhibitory effect of viral absorption by S-oligos. Vero Cells were incubated with S-oligos in different concentration at 4°C for 30 minutes under the presence of HSV- I (Miyama strain GC⁺, 5 pfu). After the washing cells by PBS, cells were incubated at 37°C for 24 hours. Viral yield were assessed by plaque forming assay and viral DNA were measured by PCR. (A): plaque forming assay, (B): PCR method.

III. 考 察

ブランク法より感度の良い PCR 法を用いることにより、細胞膜にわずかに吸着したウイルスを半定量的に検出することが可能であった。本実験にさきだって、PCR の条件を種々検討し、各濃度において、35 サイクルでは直線部分にあることを認めている。これより、35 サイクルで半定量が可能であると判断した。ブランク法と PCR 法との結果多少異なっているが、これは、検出感度の違いによるものと思われる。PCR 法による半定量化には写真による画像判定を行っているために、百分率で表示してあるが、実際には PCR 法により、ブランク法による検出感度以下のウイルス量を測定しており、データとしては、感度の良い PCR 法の結果を優先させた。

S-oligos が塩基配列非特異的効果を有することはしばしば指摘されており、なかでも G3 または G4 以上の連続した G 配列を含むときに、この傾向は強く認められている¹⁰⁾。ひとつには連続した G 配列を含む時には G カルテットという特異な立体構造をとるものと推測されており¹¹⁾、この立体構造がウイルス吸着阻害に関連しているかもしれない。同様の配列を有していても D-oligos にはウイルス吸着阻害効果は認められず、ウイルス吸着阻害効果は S-oligos に特有のものと思われた。また、S-oligos が直接ウイルスへ吸着することも確認されている (unpublished data)。こうしたことも、S-oligos が D-oligos とは異なった挙動を示し、塩基配列非特異性を示す一因となっているものと思われる。

PCR 法により明らかになったことだが、感染 30 分後に S-oligos を加えたときには、ウイルス吸着阻害が認められ、感染 1 時間後に S-oligos を加えた時には、ウイルス吸着阻害はおこらなかった。これより、オリゴヌクレオチドによるウイルスの吸着阻害は感染初期におこるものと思われた。オリゴヌクレオチドの抗ヘルペス活性を検討する際には、いつオリゴヌクレオチドを加えるかということが重要になってくる。ウイルス感染と同時に S-oligos を投与する場合には、ウイルス吸着阻害効果もメカニズムのひとつとして含まれているものと思われ、その解釈には注意が必要である。

本実験系を用いることにより、ウイルス吸着阻害効果を有する物質の探索が可能と思われた。ヘルペスウイルスのように、細胞—細胞間による感染がおこる場合は、たとえ、ウイルスの吸着阻害がおきても、有効な治療薬、予防薬としては難しいものと思われ、HIV

のような感染経路をたどるものには有効な探索系と思われる。S-oligos のウイルス吸着阻害効果が連続した G 配列に起因するものかどうか、あるいはヘルペスウイルスに特有なものかどうかについては今後の課題として残った。

謝 辞

本研究の一部は文部省科学研究費補助金 (C) (No. 08670540) の援助を受けており、ここに深謝致します。

文 献

- 1) Bishop M R, Iversen P L, Bayever E, et al.: Phase I trial of an antisense oligonucleotide OL (1) p53 in hematologic malignancies. *J. Clin. Oncol.* 14: 1320~1326, 1996
- 2) Burgee T L, Fisher E F, Ross S L, et al.: The anti proliferative activity of c-myc and c-myc antisense oligonucleotides in smooth muscle cells is caused by a nonantisense mechanism. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4051~4055, 1995
- 3) White D O, Fenner F J: *Medical virology* (Fourth edition) Chapter 3: Viral replication. p31~52. Academic Press. 1994
- 4) Preston C M, Cordingley M G, Stow N D: Analysis of DNA sequences which regulate the transcription of a herpes simplex virus immediate early gene. *J Virol* 50: 708~716, 1984
- 5) Tamura N, Iwatani W, Shoji Y, et al.: Antiviral effects of phosphorothioate oligonucleotides complementary to 3' splice region of herpes simplex virus immediate early pre-mRNA5. *Nucleic Acids Symposium Series* 31: 73~74, 1994
- 6) Bulletin for DNA synthesizer (Applied Biosystem)
- 7) Asseline U, Geiser T, Zon G: Synthesis of antisense phosphorothioate analogues for pharmacokinetics and pre-clinical studies. *Nucleosides Nucleotides* 8: 967~970, 1989
- 8) Rao P V, Kumari S, Gallagher T M: Identification of a contiguous 6-residue determinant in the MHV receptor that controls the level of virion binding to cells. *Virology* 229: 336~348, 1997
- 9) 青野利哉, 山西弘一: ウイルスゲノムの検出・解析 2 ヘルペスウイルス。蛋白質核酸酵素 41: 669~675, 1996
- 10) Tamura N, Iwatani W, Shoji Y, et al.: Aptameric inhibition of in vitro DNA polymerization by phosphorothioate oligonucleotides. *Nucleic Acids Symposium Series* 34: 93~94, 1995
- 11) Bishop J S, Guy Caffey J K, Ojwang J O, et al.: Intramolecular G-quartet motifs confer nuclease resistance to a potent anti-HIV oligonucleotide. *J. Biol. Chem.* 271: 5698~5703, 1996

Anti-herpetic activities of oligonucleotides

—Assesment by PCR method—

Yoko Shoji^{1,2)}, Miki Norimatsu²⁾, Misa Yoshida²⁾,
Jingoro Shimada^{1,2)} and Yutaka Mizushima²⁾

¹⁾ Institute of Medical Science, St. Marianna University School of Medicine, 2-16-1, Sugao Miyamae-ku, Kawasaki 216-8511, Japan

²⁾ Department of Microbiology, St. Marianna University School of Medicine

We synthesized antisense oligonucleotides toward to immediate early pre-mRNA4/5 of herpes simplex virus type I (HSV- I). We've found that complementary sequences of splicing site possessed potent anti-herpetic activities in *in vitro* assay. Since sequences containing consecutive G sequences showed sequence non-specific anti-herpetic activities, it might involve another mechanism other than antisense manner. In this study, we studied inhibitory effect of oligonucleotides on virus absorption onto the cell membrane. Virus yield absorbed onto the cell membrane were measured by PCR technique. It was obviously recognized that phosphorothioate oligonucleotides showed inhibitory effect on virus absorption onto the cell membrane in the early phase of infection. This inhibitory effect was recognized in a range of 0.5-10 μ M concentrations.