

| | |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title | 融合細胞形成が単純リポソームの細胞への融合を可能にする |
| Author(s) | 島, 康文 |
| Citation | 大阪大学, 1997, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/40408 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。 |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

| | |
|------------|-----------------------------------------------|
| 氏名 | 島 康 文 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (医 学) |
| 学位記番号 | 第 1 2 7 7 4 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 9 年 1 月 16 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当 |
| 学位論文名 | 融合細胞形成が単純リポソームの細胞への融合を可能にする |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 上田 重晴 (副査) 教授 田中亀代次 教授 米田 悦啓 |

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

亜急性硬化性全脳炎 (subacute sclerosing panencephalitis, SSPE) は、ハシカウイルスが脳内に持続感染していることが病因となっている難病であり、有効な治療法はない。ハシカウイルスはパラミクソウイルス科に属するが、SSPE 患者の脳より分離されたハシカウイルスはウイルス粒子を産生できないため、SSPE ウイルスと呼ばれている。SSPE ウイルスは細胞融合による多核融合巨細胞の形成によって感染巣を拡大する。SSPE の治療法を開発する過程で、ジフテリア毒素フラグメント A を封入した単純リポソームを SSPE ウイルス感染細胞と正常細胞の混合培養系に添加して培養すると、SSPE ウイルス感染細胞のみが破壊できることが明らかにされていたが、単純リポソームは正常細胞に付着しても膜融合を起こさないので、なぜ SSPE ウイルス感染細胞に選択的に膜融合できたのか、その理由は不明のままであった。

本研究では、ニューキャッスル病ウイルス (Newcastle disease virus, NDV) を用いて、その活発型 F タンパクを発現している細胞と、膜融合が誘発されて融合細胞が形成されているモデル実験系を作成し、SSPE ウイルス感染細胞で起こった現象を解析することを目的とした。

(方法ならびに成績)

F タンパク発現細胞の作成

NDV 宮寺株感染 LLC-MK₂ 細胞より精製した mRNA から cDNA を合成し、NDV 感染 LLC-MK₂ 細胞の cDNA ライブラリーを作成した。このライブラリーを、F タンパクをコードする遺伝子塩基配列の N 末端に対応するオリゴヌクレオチドをプローブとしてスクリーニングし、F タンパク遺伝子の全長に対する cDNA をクローニングした。得られた F タンパク遺伝子の cDNA をヒトサイトメガロウイルスのプロモーターを利用した発現ベクターにクローニングし、リン酸カルシウム共沈法により LLC-MN₂ 細胞に導入し、パンニング法により細胞表面に F タンパクを発現している細胞を選択した。得られた F タンパク発現細胞では、F タンパクに対するマウスモノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法および免疫沈降法により、F タンパクが細胞表面で膜融合反応活性型の F₁, F₂ の形で発現している

ことを確認した。

Fタンパク発現細胞とリポソームの融合

ジフテリア毒素フラグメントA (DTA) は、わずか一分子でも細胞内に侵入すると細胞のタンパク合成を阻害し細胞を破壊するので、リポソームと細胞の融合はフラグメントAを封入したリポソーム (DTA-リポソーム) を培養液に加え、細胞のタンパク合成が阻害されるか否かを³H-ロイシンの取り込みを指標にして調べた。フラグメントAはボルテックス法により、リポソームに封入した。

Fタンパク発現細胞の培養にDTA-リポソームを添加しタンパク合成を調べたところ未処理細胞の90%あり、Fタンパク発現細胞のタンパク合成は阻害されず、リポソームが融合しなかったことが示唆された。

融合細胞とリポソームの融合

Fタンパク発現細胞に宮寺株を1 pfu/cellの感染価で感染させたり、HNタンパクの遺伝子を導入すると、細胞融合が誘発され、時間の経過とともに融合細胞のサイズは拡大した。そこで、Fタンパク発現細胞にNDVを感染、あるいはHNタンパクの遺伝子を導入し細胞融合を誘発させ、DTA-リポソームを添加しタンパク合成を調べた。それぞれ47%、58%にまで低下し、タンパク合成が阻害され、リポソームが細胞に融合したことが示唆された。

(総括)

NDV宮寺株のFタンパク遺伝子のcDNAをクローニングし、Fタンパクを発現しているLLC-MK₂細胞を樹立した。得られた細胞では、膜融合反応活性型のFタンパクが細胞表面で発現していた。ジフテリア毒素フラグメントAを封入したリポソームを用いて単純リポソームとFタンパク細胞との融合を調べた。その結果、単純リポソームは、細胞が膜融合反応活性型のFタンパクを発現していても融合しないが、細胞融合が誘発されている状況下でそれらの細胞と融合することが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) の治療実験のために開発したジフテリア毒素フラグメントA封入単純リポソームがSSPEウイルス感染細胞のみを選択的に破壊しうるメカニズムを解析したものである。

ニューキャッスル病ウイルス (NDV) の膜融合タンパク (F) および赤血球凝集タンパク (H) を共発現させた融合細胞形成モデル実験系を作成し、これに上記単純リポソームを作用させた後、細胞のタンパク合成阻害を指標にして単純リポソームと細胞の融合反応を解析した。その結果、単純リポソームは細胞がアクティブに融合細胞を形成している場合にのみ、生じた融合細胞と融合することが明らかになった。

本研究は、SSPEのようなウイルス性難病の細胞工学的治療法開発の基礎的根拠となるもので、学位の授与に値するものと考えられる。