



Title	カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスがコードするvMIP-IとvMIP-IIの単球におけるシグナル伝達
Author(s)	中野, 和司
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41805
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	中 野 和 司
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 2 5 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平成12年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学 位 論 文 名	カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスがコードする vMIP-I と vMIP-II の単球におけるシグナル伝達 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) -Encoded vMIP - I and vMIP - II Induce the Monocyte Signal Transduction)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 山 西 弘 一 (副査) 教 授 上 田 重 晴 教 授 生 田 和 良

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

KSHVはカポジ肉腫(KS)、原発性のリンパ腫(PEL)やCastleman's diseaseの原因ウイルスである。一方、in vivoでは単球、B細胞、上皮細胞に感染するという報告がある。しかし、感染経路やKSHVと細胞との相互作用についての研究は進んでいない。また、既に報告されているKSHVの全ゲノム解析から、KSHVはいくつかのサイトカインホモログをコードしている。そこで本研究ではKSHVのコードするケモカインホモログ(vMIP-IとvMIP-II)の単球における機能解析を以下に述べる4点から行った。1. KSHV感染細胞におけるvMIP-IとvMIP-IIの発現。2. vMIP-IとvMIP-IIの単球でのシグナル伝達。3. そのシグナル伝達に關与するレセプターの解析。4. vMIP-IとvMIP-IIの単球に対する細胞遊走能の解析

【方法ならびに成績】

1) vMIP-I-SEAP (His)₆とvMIP-II-SEAP (His)₆融合タンパク質の精製とN-末端アミノ酸配列の解析
vMIP-I-SEAP (His)₆とvMIP-II-SEAP (His)₆融合タンパク質を調製するために293/EBNA-1細胞に作製したvMIP-IとvMIP-II真核細胞発現ベクターそれぞれをLipofectAmineによって遺伝子導入した。これらの遺伝子導入した293/EBNA-1細胞を10%FCSを含むDMEM培地で72時間培養した。このvMIP-IとvMIP-IIを細胞内カルシウムイオン誘導実験と細胞遊走活性測定に供試するために培養上清から親和性クロマトグラフィーで精製した。さらに、アミノ酸シーケンスにより精製したvMIP-I-SEAP (His)₆のN-末端はOpen reading frameで見られる開始コドンから数えて25番目のアラニンであり、vMIP-II-SEAP (His)₆は24番目のロイシンであることを明らかにした。

2) vMIP-IとvMIP-IIのBC-3細胞での発現の検討

抗vMIP-I抗体と抗vMIP-II抗体それぞれを得るためにvMIP-I、vMIP-IIタンパク質のC-末端部分の配列をそれぞれペプチド合成しウサギに免疫した。その結果、抗vMIP-II抗体はvMIP-IIタンパク質に対して特異的に反応したが、抗vMIP-I抗体はvMIP-Iタンパク質に対して特異的な反応を示さなかった。そこでvMIP-Iタンパク質を特異的に認識する抗体を得るために大腸菌の発現ベクターであるpGEX-3XとvMIP-I遺伝子のプラスミドベクター(pGEK6)から発現させたvMIP-I-GST融合タンパク質をグルタチオンセファロース4Bカラムクロマトグラフィーによって精製し、これをFreund's adjuvantを用いてウサギに3回免疫することによって

vMIP-I に対して特異的に反応する抗 vMIP-I 抗体を得た。

TPA で刺激した BC-3 細胞をスライドガラスにスポットし風乾後、冷アセトンで10分間固定した。一次反応を行うために固定した細胞を抗 vMIP-I、vMIP-II 抗体を用い1時間、室温で反応した。二次反応に rhodamine 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を1時間室温でインキュベートし、Deltavision 顕微鏡で観察した結果、vMIP-I と vMIP-II はともに BC-3 細胞の細胞質と細胞膜に発現することが明らかとなった。

3) vMIP-I と vMIP-II が誘導した細胞内 $[Ca^{2+}]$ 濃度の変化

vMIP-I と vMIP-II を単球系 cell line である THP-1 細胞に添加し、細胞内カルシウムイオン濃度変化を fluoremeter により測定した結果、細胞内カルシウムイオン濃度は上昇した。また、RANTES や MIP-1 α で刺激後、vMIP-II を添加するとカルシウムイオンシグナルは完全に脱感作され、vMIP-I は完全には脱感作されなかった。RANTES と MIP-1 α のレセプターは CC ケモカインレセプター (CCR) 1、CCR 3、CCR 5 であることから次に THP-1 細胞で確認されたカルシウムイオン濃度の上昇がいずれのケモカインレセプターによるものか検索を行った結果 CCR 5 を強発現した K562 細胞のみで細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させることが明らかになった。以上より vMIP-I と vMIP-II が単球系の THP-1 細胞で誘導したカルシウムイオン濃度の上昇は少なくとも CCR 5 を介していることが明らかとなった。

4) 細胞遊走活性測定

THP-1 細胞の遊走がトランスウェルチャンバーによって調べられた。上層部に 10^6 cells/well の濃度で THP-1 細胞を充填し、下層部に各濃度に希釈したケモカイン溶液、または陰性コントロールで満たした。これを4時間インキュベート後、下層部の浸漬液 300 μ l を分取し FACSCalibur によって細胞数を計測した結果、vMIP-I と vMIP-II とともに単球系の cell line である THP-1 細胞の遊走を誘導することを見いだした。

【総括】

本研究では vMIP-I と vMIP-II が THP-1 細胞にシグナル伝達を誘導することを細胞内カルシウムイオン濃度の測定から明らかにした。そのシグナル伝達に CCR 5 を介していることも明らかにした。さらに vMIP-I と vMIP-II は単球系の細胞を遊走させることを見いだした。これらの結果から lytic phase の KSHV は感染組織から vMIP-I と vMIP-II と含むウイルスケモカインを産生し血液中に放出し、血液中の単球が活性化され、感染部位に遊走することが考えられる。さらに KSHV は感染組織から単球へ cell to cell で感染し、感染した単球が血液中を移動することによって、広範な組織に渡り KSHV が伝播する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) / ヒトヘルペスウイルス 8 は近年発見された γ -ヘルペスウイルスでカポジ肉腫 (KS)、原発性のリンパ腫 (PEL) や Castlemann's disease の原因ウイルスである。しかし感染経路や KSHV と細胞との相互作用についての研究は進んでいない。本研究では KSHV がコードするケモカインホモログである vMIP-I と vMIP-II の機能を明らかにすることを目的とした。まず vMIP-I と vMIP-II タンパク質の発現を KSHV の潜伏感染細胞である BC-3 細胞で確認した。さらに vMIP-I と vMIP-II は単球系の cell line である THP-1 細胞に細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を誘導した。CCR 5 を強発現させた K562 細胞に細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を誘導した。また vMIP-I と vMIP-II は THP-1 細胞に反応し細胞を遊走させた。したがって vMIP-I と vMIP-II は単球を KSHV 増殖部位に遊走させ、その単球に感染し血液中を移動してより広範な組織に感染を広める可能性が示唆された。このように多くの新しい知見を得、今後の研究の発展に大きな期待を抱かせる論文であり、学位の授与に充分値するものと考ええる。