The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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（なかの かずし）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　15255　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v MIP－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関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、アミノ酸シークエ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－1α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－1α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300μl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Casthleman'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る。