The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Functional Analysis of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus RTA in an RTA-depressed Cell Line
Author(s)	西村, 健
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43841
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

【53】

氏　　名	西村　健（にしむら　けん）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　17623　号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学　位　論　文　名	Functional Analysis of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus RTA in an RTA-depressed Cell Line. （カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス RTA 遺伝子発現減少細胞株を用いた RTA 遺伝子の機能解析）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　山西　弘一 （副査） 教　授　生田　和良　　教　授　塩田　達雄

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

カポジ肉腫関連ウイルス/ヒトヘルペスウイルス８（KSHV/HHV-8）は、カポジ肉腫組織から遺伝子断片がクローニングされたガンマヘルペスウイルス亜科に属するウイルスであり、カポジ肉腫や primary effusion lymphoma (PEL) との疾患特異性がきわめて濃厚である。ガンマヘルペスウイルス亜科には他に Epstein-Barr ウイルス (EBV) などが属しており、KSHV もこれらのウイルスと同様に癌ウイルスとしての性質を有すると思われる。KSHV 潜伏感染細胞株として PEL 由来の BCBL-1 細胞などが分離されており、TPA（12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate）などの試薬を加えることによって、KSHV が再活性化してくるということが明らかになっている。しかしこの再活性化の機構についてはあまり多くのことは明らかになっていない。

潜伏感染・再活性化は KSHV の病態において重要な現象である。そのため、我々はこの機構について解析するために、BCBL-1 細胞をサブクローニングし、その中から再活性化の刺激への反応性が強い、または弱いクローンを分離し、そのクローンの解析を行うことによって、再活性化機構を明らかにすることを試みた。

【方法】

1）BCBL-1 細胞のサブクローニング：1dish あたり 500 個の BCBL-1 細胞を 1.5% methylcellulose #4000 を含む培地で生育させ、約２週間後に 96 個のコロニーをクローニングした。

2）KSHV の再活性化の誘導：培地中に 25 ng/mL TPA もしくは、3 mM *n*-butyrate や 30 U/mL IFN-γ を加えることによって再活性化を誘導した。

3）KSHV 遺伝子の発現確認：再活性化誘導後に発現してくる KSHV 遺伝子の発現を、蛍光抗体法、Western blotting 法、Northern blotting 法を用いて解析した。

4）ウイルスの複製や粒子産生の確認：細胞から分離した genomic DNA に対して KSHV の K8 遺伝子領域に特異的なプローブを用いて Southern blotting を行い、ウイルス DNA の複製を検定した。培養上清中へのウイルス粒子の放出は、proteinase K 処理をした細胞培養上清からウイルス DNA を回収し、TaqMan PCR 法を用いて、ウイルス DNA の copy 数を定量することによって解析した。

【結果】

1．BCBL-1細胞のサブクローニング

BCBL-1細胞をサブクローニングし、得られた96個のクローンに対して、再活性化の際に発現してくる遺伝子(lytic gene）のうちRTA（replication and transcription activator）、K9（vIRF）、ORF59（DNA replication protein）の発現を調べた。その結果、TPAで再活性化を誘導しても、これらの遺伝子がほとんど発現しない細胞株が3株存在した。RTAは再活性化の際に中心的な役割をする前初期遺伝子（immediate-early gene）として考えられていることから、再活性化の刺激に対する反応性が弱い細胞株のうちの一株（BLS50-4株）を用いて、再活性化とRTAの機能の関係について解析を行った。

2．BLS50-4細胞におけるKSHV遺伝子の発現動態

BLS50-4細胞における再活性化誘導後のKSHV遺伝子の発現を調べた結果、上記の3遺伝子以外にもK8(EBV Zta homolog）、ORF57（posttranscriptional regulator）などのlytic geneの発現が、親株であるBCBL-1細胞と比べて減少していた。その一方で、vIL-6、ORF9（DNA polymerase）、K8.1（virion glycoprotein）、ORF65（capsid protein）の発現はBCBL-1細胞と違いはなかった。このことから、RTAは再活性化の際に発現してくる遺伝子、特に転写・複製制御に関わる初期遺伝子（early gene）の発現調節に重要であるということが示唆された。

3．BLS50-4細胞におけるウイルスの複製や粒子産生

BLS50-4細胞において再活性化を誘導した際の、細胞内のウイルスDNA量と細胞外に放出されるウイルス量についてそれぞれ検討した。その結果、いずれも親株BCBL-1細胞と比較して著しく減少していたことから、RTAはウイルスの複製や粒子の産生にも影響を与えているということが考えられた。

4．BLS50-4細胞へのRTA発現の補充

BLS50-4細胞における遺伝子発現やウイルス複製の減少の原因が、RTAの発現の減少であることを確認するために、BLS50-4細胞にRTAをtransfectionしてRTAの発現を補った場合の、lytic geneの発現を調べた。その結果RTAのtransfectionによってK9、ORF59などの発現の回復が観察され、一方、K8.1の発現は誘導されなかった。このことから、BLS50-4細胞の再活性化誘導に対する反応性の低下は、RTAの発現低下が原因であり、RTAは転写・複製制御に関わるearly geneの発現を調節していることが明らかになった。

【総括】

我々は再活性化誘導に対する反応性が低下しているBLS50-4細胞をBCBL-1細胞から分離し、その反応性低下の機構について解析した結果、RTAは再活性化の際に発現してくる遺伝子の発現調節に重要であり、ウイルスDNAの複製やウイルス粒子の産生にも影響するということを明らかにした。また、構造遺伝子などの後期遺伝子（late gene）の発現調節には、RTAは直接関与せず、他の制御機構が存在すると考えられた。

現在、RTAの発現をすべての細胞で誘導できるstable cell lineの樹立に成功し、その細胞を用いて、さらなるRTAの機能解析を行っている。

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/ヒトヘルペスウイルス8（KSHV/HHV-8）は最も新しく発見されたヒトヘルペスウイルスであり、癌ウイルスとしての性質を有することなどが指摘されている。しかし、その病態に関してあまり多くのことは明らかになっていないのが現状である。このウイルスは他のヘルペスウイルスと同様に、潜伏感染から急性感染への再活性化という感染様式を持ち、急性感染時にウイルスが増殖することなどからも、再活性化の機構の解析はKSHVの病態解明において重要な課題となっている。

本研究は、再活性化誘導に対する反応性が低下している細胞株を分離し、その細胞の解析を通して、KSHVの前初期遺伝子であるRTAの発現が、再活性化の際に発現してくる遺伝子の発現誘導や、ウイルスの複製に重要であるということを明らかにしたものである。この研究結果は、RTAを中心とした再活性化機構の解明という点で非常に興味深く、またこの研究で分離された細胞株は、今後の再活性化機構の解析にも大いに役立つことが期待される。以上の理由から、本研究は学位の授与に値すると考えられる。