

Title	Sendai virus F glycoprotein induces IL-6 production in dendritic cells in a fusion-independent manner
Author(s)	鈴木, 勇人
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49920">https://hdl.handle.net/11094/49920</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

【10】

氏 名	すず き はや と 鈴 木 勇 人
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 2 7 1 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 21 年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科病態制御医学専攻
学 位 論 文 名	Sendai virus F glycoprotein induces IL-6 production in dendritic cells in a fusion-independent manner (センダイウイルスの F 糖蛋白質は膜融合非依存的に樹状細胞からの IL-6 分泌を促進する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 金 田 安 史 (副査) 教 授 宮 坂 昌 之 教 授 塩 田 達 雄

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

HVJ Envelope(HVJ-E)は、センダイウイルス(HVJ: Hemagglutinating Virus of Japan)を完全に不活化・精製し、外膜の膜融合能だけを残した粒子である。我々は、HVJ-Eが抗腫瘍免疫増強作用を持つことを見出した。特にregulatory T cellの機能をHVJ-Eが抑制し、それによってT細胞免疫を高めることを見出した。その抑制作用は、HVJ-Eが樹状細胞(DC)からのIL-6分泌を促すことによっている。そこで、HVJ-Eのどの構成成分がDCからのIL-6分泌促進に関与するのかを明らかにする研究を行った。

〔 方法ならびに成績 〕

HVJ-Eは、トリプシン処理により活性化するF蛋白の膜融合活性により、エンベロープ中の構成成分を標的細胞中に導入する。HVJ-Eの膜融合活性とIL-6分泌促進能の関係を明らかにするため、膜融合能のあるHVJ-E(トリプシン処理済)とないHVJ-E(トリプシン未処理)を用意し、DCへのIL-6分泌促進能を比較した。その結果、IL-6分泌促進能に膜融合は必要ないことが示された。このことからエンベロープ中ではなく、エンベロープ上に存在する膜蛋白がIL-6分泌促進に関与すると考えられる。そのため、エンベロープ上の2種類の融合蛋白HNおよびFを再構成粒子として精製した。方法としてはHVJ-Eを界面活性剤で処理後に遠心分離により上清を回収し、界面活性剤を除去後、遠心分離により沈殿から精製したHNとF蛋白からなる再構成粒子を回収した。また、HVJ-EをDithiothreitolで処理後に同じく一連の界面活性剤の添加および除去の操作を行うことで、F蛋白だけからなる再構成粒子も回収した。こうして得られた精製蛋白の

再構成粒子で樹状細胞を刺激したところ、HNとF蛋白からなる再構成粒子に加えてF蛋白単独からなる再構成粒子でも、HVJ-Eと同程度のIL-6の分泌をDCからもたらした。さらに、界面活性剤でHVJ-Eを可溶化後、イオン交換カラムを用いてF蛋白を精製し、リボソーム上に載せたFリボソームもまたIL-6分泌促進能をもたらした。同様にHN蛋白をカラムで精製し、リボソーム上に載せたHNリボソームは、IL-6分泌促進能が確認されなかった。この結果から、脂質上に存在するF蛋白がIL-6分泌促進能を強く示すことが考えられる。次にF蛋白の中和抗体で処理したHVJ-EでDCを刺激したところ、樹状細胞へのIL-6分泌促進能が低下し、F蛋白の重要性が再度確認された。また、HNおよびF蛋白は糖蛋白である。IL-6分泌促進におけるF糖蛋白の糖鎖の必要性について検討した。HNに対する糖鎖分解酵素Endoglycosidase H(Endo H)、HNおよびF蛋白に対する糖鎖分解酵素Peptide-N-Glycosidase F(PNGF)で処理したHVJ-Eを用意し、DCに対するIL-6分泌促進能を調べた。その結果、Endo Hで処理したHVJ-EはIL-6分泌促進能を未処理と同等に示したが、PNGFで処理したHVJ-EはIL-6分泌促進能を示さなかった。従って、F蛋白上に存在する糖鎖が重要であることが明らかになった。以上からF糖蛋白が、膜融合非依存的に樹状細胞に対してIL-6分泌促進能を持つことが示された。さらに精製したF蛋白による再構成粒子は、*in vivo*においてHVJ-Eと同等の抗腫瘍効果を大腸癌細胞株CT-26に対して示し、F蛋白がHVJ-EのIL-6分泌促進を介する抗腫瘍効果の責任部位であることが分かった。

#### 〔 総 括 〕

HVJ-EのDCに対するIL-6分泌促進を介した抗腫瘍効果において、F蛋白が責任部位であることが明らかとなった。加えてIL-6分泌促進においては、F蛋白の担う機能である膜融合活性が必要ないことが示された。これまで膜融合としての機能しか明らかにされていなかったF蛋白が、樹状細胞に対するサイトカイン分泌促進能を持つことが示された。また、こうしたF蛋白のIL-6分泌促進能には糖鎖修飾が重要であることが明らかになった。HVJ-Eは現在、癌治療における臨床応用を目指しているが、本研究によりHVJ-Eによる抗腫瘍免疫賦活能の機序の一部が明らかになった。さらに、HVJ-Eと同じく抗腫瘍効果を示す最小限の構成要素として、F蛋白はより洗練された効率の良い治療薬としての可能性がある。

#### 論文審査の結果の要旨

癌治療において免疫療法は効果が確認された低侵襲性の治療法であり、集学的治療法の一つとして期待されている。近年、不活化したセンダイウイルス粒子(HVJ-E)が樹状細胞からのIL-6分泌を促進することで、regulatory T cellを抑制し、T細胞免疫を高めることで抗腫瘍効果をもたらすことが明らかになっている。本研究は、HVJ-Eのどの構成成分が樹状細胞からのIL-6分泌促進に関与するのか明らかにするため、探索を行った。HVJ-Eは膜融合活性非依存的にIL-6分泌促進能作用を持つことから、エンベロープ上の膜蛋白がIL-6分泌促進に関与すると考えた。そのためエンベロープ上の2種類の融合蛋白を可溶化し、イオン交換カラムで精製後、リボソーム上に載せた。融合蛋白の一つHN蛋白をもつリボソームは、樹状細胞に対しIL-6の分泌をもたらさなかった一方で、もう一つの融合蛋白であるF蛋白をもつリボソームは、樹状細胞に対しIL-6の分泌をもたらした。さらにF蛋白の中和抗体で処理したHVJ-E、およびF蛋白に対する糖鎖分解酵素で処理したHVJ-Eでは、樹状細胞へのIL-6分泌促進能が低下した。以上からF糖蛋白が、膜融合非依存的に樹状細胞に対してIL-6分泌促進能を持つことが明らかになった。本研究は、これまで膜融合としての機能しか明らかにされていなかったF蛋白が、樹状細胞に対するサイトカイン分泌促進能を持つという新しい知見をもたらし、癌治療の可能性を示した点において、学位の授与に値すると考えられる。