

Title	単純ヘルペスウイルスによるオートファジー誘導に関する検討
Author(s)	古川, 禎伸
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56158
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論 文 内 容 の 要 旨

氏 名 （ 古 川 禎 伸 ）	
論 文 題 名	単純ヘルペスウイルスによるオートファジー誘導に関する検討
<p>【緒言】</p> <p>腫瘍融解性ウイルス療法（ウイルス療法）は複製可能型の弱毒化ウイルスを感染させ細胞変性効果によって腫瘍細胞を破壊する治療法である。単純ヘルペスウイルス 1 型（HSV-1）は研究が進んでいるウイルスで、われわれも神経毒性遺伝子γ34.5を欠失させたHSV-1RH2を開発し、その口腔扁平上皮癌（SCC）細胞に対する腫瘍障害性を明らかにしてきた。</p> <p>オートファジーは異常タンパク質、過剰なタンパク質、損傷を受けた細胞内小器官をオートファゴソーム-リソソーム系によって分解する異化作用の経路である。栄養飢餓条件によって活性化され、生理的、病理的な過程と関連づけられている。HSV-1感染では、オートファジーがウイルス複製を制限する例やオートファジーがアポトーシスを阻害することなどが報告されているが、オートファジーの誘導はウイルス種、細胞の組み合わせで異なるとされている。本研究では、HSV-1 のRH2が扁平上皮癌（SCC）細胞においてオートファジーの誘導の可否とその意義についての検討を行った。</p> <p>【材料と方法】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 細胞として、サル腎由来Vero細胞、ヒト口腔扁平上皮癌由来SAS細胞、マウス扁平上皮癌由来SCCVII細胞を用いた。RH2の感染力価はVero単層細胞でのブラック形成法にて測定した。 2. 細胞内でのLC3の発現は、抗LC3抗体と反応させた細胞を共焦点レーザー蛍光顕微鏡にて観察した。 3. 細胞の超微構造はグルタルアルデヒドとオスミウムによる固定後、超薄切片を作成し、透過型電子顕微鏡で観察した。 4. 活性型カスパーゼ3はELISAにて測定した。LC3-I, LC3-II, beclin1, Bcl-2, Baxは、イムノプロット法にて検出した。 5. 細胞生存率はMTT assayにて、細胞傷害性はLactate dehydrogenase (LDH) release assayにて測定した。オートファジー阻害剤である3-MA, chloroquine, bafilomycin A1ならびにカスパーゼ阻害剤であるZ-VAD-FMK, Z-YVAD-FMK, Z-DEVD-FMKはHSV-1 RH2感染後に培養液に添加し、細胞傷害率に対する抑制効果を評価した。 <p>【結果】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. RH2によるSCC細胞に対する傷害性を知るため、各種感染多重度(MOI: multiplicity of infection)でSAS細胞, SCCVII細胞に接種し、経時的に細胞形態の変化を観察した。SAS細胞の場合、低いMOIでも細胞融合による多核巨細胞がみられたが、SCCVII細胞では、MOI=10で細胞の円形化を認めた。 2. RH2をSAS細胞, SCCVII細胞にそれぞれMOI=0.1とMOI=10で接種し24時間後の生細胞率をMTT assayで測定したところ、生細胞率はそれぞれ非感染対照の48%, 54%にまで低下した。 3. RH2を接種し、LC3の発現を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察したところ、SAS細胞では多核巨細胞の細胞質にLC3の集積像がみられた。SCCVII細胞では円形化細胞の細胞質で強い染色性が認められた。 4. RH2感染SAS細胞の透過型電子顕微鏡観察では、オートファゴソーム、オートリソソーム、細胞外へ放出されたウイルス粒子がみられた。 5. オートファジーにおいて、細胞質に拡散したLC3-IIはリン脂質と共有結合してLC3-IIとなってオートファゴソームに形成に働く。イムノプロット解析を行ったところ、非感染細胞と比較して、感染細胞ではLC3-IIの発現が顕著に増加した。 6. アポトーシスの実行カスパーゼであるカスパーゼ3の活性型は、RH2感染SAS細胞において、非感染 	

対照の1.6倍であり、対照との間で有意差を認めた。オートファジータンパク質beclin1とこれに結合する抗アポトーシスタンパク質Bcl-2ならびにアポトーシス促進タンパク質Baxをイムノブロットにて検出したが、RH2感染細胞と非感染対照とでこれらタンパク質の発現に差はなかった。

7. RH2感染24時間後、SAS細胞の細胞傷害率は24%にまで上昇したが、オートファジー阻害剤である3-MA, chloroquine, bafilomycin A1存在下では、それぞれ12%, 16%, 13%にまで低下した。

8. RH2感染SAS細胞をオートファジー阻害剤存在下に24時間培養し、生産されたウイルス量を測定した結果、いずれの阻害剤もウイルス産生量を低下させることはなかった。

9. RH2感染後、汎カスパーゼ阻害剤存在下にSAS細胞を培養すると、RH2による細胞傷害性は低下した。カスパーゼ1あるいはカスパーゼ3の阻害剤でも細胞傷害性は低下し、感染単独群との間で有意差を認めた。

【考察と結論】

SCC細胞に対してHSV-1のRH2を感染することで、SAS細胞では細胞融合による多核巨細胞が形成され、SCCVII細胞では高いウイルス量で細胞の円形化が確認された。細胞形態の変化は生細胞の減少を反映していた。RH2が感染したSAS細胞では、多核巨細胞の細胞質で、SCCVII細胞では円形化細胞の細胞質でLC3の発現が亢進し、LC3-IIの増加がみられた。電子顕微鏡観察でもRH2感染SAS細胞でオートファゴソーム、オートリソソームを示す像が確認されたことから、SCC細胞にRH2が感染することでオートファジーが誘導されると考えられた。RH2感染細胞では、アポトーシスの実行カスパーゼであるカスパーゼ3が活性化しており、アポトーシスも誘導された。Beclin 1, Bcl-2, Baxの変化はなく、これらのタンパク質の量的変化がオートファジーとアポトーシスに関与する可能性は低い。オートファジー阻害剤はウイルス複製に影響を及ぼさなかったが、RH2感染による細胞傷害は低下させた。さらに、カスパーゼ阻害剤を用いた実験でも、カスパーゼ1, カスパーゼ3に対する阻害剤でRH2の細胞傷害が低下した。

以上より、RH2はSCC細胞においてオートファジーならびにアポトーシスを誘導すること、オートファジーは細胞傷害に働いており、オートファジーを介する細胞死を生じることが示唆された。SCCに対するRH2を用いたウイルス療法においては、オートファジーを促進する薬剤との併用がRH2の腫瘍融解性を増強するうえで有用と考えられた。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (古川 禎伸)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	大阪大学教授	由良 義明
	副 査	大阪大学教授	野田 健司
	副 査	大阪大学准教授	北村 正博
	副 査	大阪大学講師	田中 晋
論文審査の結果の要旨			
<p>本研究は、腫瘍融解性ウイルスである単純ヘルペスウイルス 1 型 RH2 株による扁平上皮癌細胞におけるオートファジーの誘導について検討したものである。その結果、RH2 感染細胞での LC3 の発現亢進、LC3-I から LC3-II への変換、オートファゴソーム形成からオートファジーの誘導が明らかとなった。さらに、オートファジーの阻害で細胞傷害が抑制されたことより、オートファジーは細胞傷害に働くことが示唆された。</p> <p>以上は、扁平上皮癌細胞での腫瘍融解性ウイルス感染による細胞変性におけるオートファジーの関与を示すものであり、博士(歯学)授与に値するものと認める。</p>			