The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学位論文

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

大阪大学大学院歯学研究科　口腔科学専攻
顎口腔病因病態制御学講座　口腔外科第二教室

古川　禎伸

緒言

現在の口腔癌治療では，手術，放射線療法，化学療法を主体としたものが一般的である．しかし，近年の医療技術の進歩にも拘らず，進行癌において十分な治療成績の向上は見られていない[1,2]．そのため，進行癌に対する新たな治療法が必要とされている．

近年，遺伝子を組み換えたウイルスを治療に応用する腫瘍融解性ウイルス療法（ウイルス療法）が注目されている[3-9]．これは変異により弱毒化した増殖性ウイルスを腫瘍細胞に感染させ，ウイルス複製に伴う細胞変性効果により腫瘍を破壊する療法である．これまで，単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1: herpes simplex virus type 1)，ワクシニアウイルス，アデノウイルス，レオウイルス，Newcastle disease virus (NDV), measles virus (MV)などで研究されてきたが，HSV-1 は最も臨床研究が進んだウイルスといえる[10]．

HSV-1 は上皮細胞ならびに神経細胞に対する親和性が強く，幼児期に初感染すると口腔では歯肉口内炎を発症し，その後神経線維から侵入して神経節に潜伏し，成人後に再発性の口唇ヘルペスを生じることがよく知られている．HSV-1 遺伝子 DNA は 150 kbp の大きさで，ゲノム上の open reading

frame (ORF)は 80 以上存在する．ゲノム 82%を占める L 領域と 18%を占める S 領域に分けられ，各領域の両端を倒置反復配列に囲まれたユニークな配列 UL，US からなっている．感染後の遺伝子発現はカスケード制御をとり，発現順に α (immediate early), β (early), γ (late)の 3 群に分けられる．ウイルス thymidine kinase (TK)を標的としてヘルペスウイルスの複製を特異的に阻害する抗ヘルペス薬アシクロビルが開発されている．ヘルペスウイルスベクターは，特異的抗ヘルペス薬でウイルス感染をいつでも中断できること，遺伝子配列や大半の遺伝子の機能が解明されている，外来遺伝子を組み込むことができるゲノムサイズを有する，エンベロープを持ち宿主域が広い，多くの成人がすでに感染し抗体を保有しているなどから，ウイルスベクターとしての優位性がある[11,12]．倒置反復配列に含まれるγ34.5 は脳炎の原因となる神経毒性遺伝子であり，これを遺伝子操作で欠失させたウイルスを主体として臨床用ウイルスベクターが開発されている．

生体に HSV-1 が感染した場合，感染に対する宿主の反応として interferon (INF)が誘導され，これによって protein kinase R (PKR)が活性化される．PKR は翻訳因子である

eukaryotic initiation factor 2α (eIF-2α)をリン酸化するため，リン酸 eIF-2αは翻訳機能を失いタンパク合成が停止する．そのためウイルス複製が不可能になる．しかし，HSV-1 遺伝子に存在するγ34.5 遺伝子は protein phosphatase 1αをリクルートして PKR によってリン酸化された eIF-2α を脱リン酸化するため，タンパク質が合成され，ウイルス複製が可能となる．細胞の癌化と最も密接に関連しているシグナル伝達系には，ERK-mitogen- activated protein kinase (MAPK)経路（増殖シグナル経路）と phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-Akt 経路（生存シグナル経路）がある[13-17]．多くの癌細胞では Ras 経路の下流で MAPK が活性化しており，これが PKR 活性を阻害して eIF-2αのリン酸化を防ぐためγ34.5 遺伝子を欠失した HSV-1 でも増殖が可能となる．このようにして，γ34.5 遺伝子を欠損したウイルスは細胞毒性を示さずに腫瘍を融解するとされている[16]．

当教室では，これまでに野生型 HSV-1 F 株のγ34.5 遺伝子を欠失させた R849 株[18]と自然変異体である HF 株[19,20]との組み換え体 RH2 を作製し，全塩基配列は決定している[21]．RH2 はγ34.5 遺伝子を持たずヒト癌細胞に対して細胞融合能を示すウイルスで，細胞融合に関与する gB 遺伝子に変異が認められ

る[22]．RH2 の親ウイルスにあたる HF 株をクローニングした HF10 は頭頸部癌，乳癌，肝臓癌で抗腫瘍効果がみられ，米国で臨床研究が行われている[8,23,24]．最近では，HSV-1 ベクターである talimogene laherparepvec (商品名 IMLYGIC)が，2015 年 10 月に，初回外科治療後の悪性黒色腫の再発で切除できない皮膚，皮下，リンパ節病変の局所治療薬として欧州と米国で承認されている．そのため，ウイルス療法は本格的な臨床使用の段階に入ったことになる．

オートファジーは二重膜の細胞内構造として発見されたもので，細胞順応やモデリング，劣化した細胞の細胞成分を再利用するなどの機能が判明している[25]．アミノ酸やインスリンは mammalian target of rapamycin (mTOR)複合体 (mTORC1)を介してオートファジーを抑制する．mTORC1 は ULK1-Atg 13- FIP200-Atg 101 複合体と結合する．飢餓時には ULK1 複合体は小胞体膜あるいは近傍へ Atg9 小胞とともに移動し，その下流では Atg14-beclin 1-Vps34-p150 複合体，Atg2-WIPI 複合体，Atg 12-Atg5-Atg16L1 複合体，microtubule-associated protein 1 light chain3 (LC3)などがオートファゴソーム形成において重要な役割を担う[26]．LC3 は Atg4 によって LC3-I に分解され，これにホスファチジルエ

タノールアミンが共有結合してLC3-IIとなり，オートファゴソーム膜に挿入される．その後，オートファゴソームはリソソームと融合してオートリソソームとなり，内包物が分解され細胞内で再利用される[27]．このように，オートファジーは栄養素欠乏時の細胞生存に関わるが，アポトーシスを阻害した細胞ではオートファジーを伴った細胞死にも関わっており，この細胞死はオートファジーを伴う細胞死（autophagic cell death)と呼ばれる．オートファジーは細胞生存と細胞死に関わることになる[24]．

ウイルス療法では，抗腫瘍効果を発揮するために腫瘍細胞へのウイルス感染によって細胞は変性する必要がある．HSV-1感染によってどのような細胞死が誘導されるかは用いるウイルスや宿主細胞によって異なる．これまでに，ヒトならびにマウスの扁平上皮癌(SCC)細胞に対してHSV-1 RH2が感染して細胞変性をきたすことが明らかにされてきた．しかしながら，RH2感染による細胞死のメカニズムは明らかではない．最近，HSV-1感染による細胞変性におけるオートファジーの関与が報告されている[28,29]．そこで，本研究では，RH2によるSCC細胞におけるオートファジーの可否と意義について検討した．

材料と方法

1. 細胞培養

細胞として，ヒト口腔扁平上皮癌由来 SAS 細胞，マウス皮膚扁平上皮癌由来 SCCVII，サル腎由来 Vero 細胞を用いた．SAS 細胞は Riken Bioresource Center (Tsukuba,Japan)から購入した．SCCVII 細胞は京都大学原子炉実験所の福永慎一郎博士から分与された．Vero 細胞は理化学研究所 Cell Bank (Ibaraki, Japan)から購入した．SAS 細胞は 5%牛胎児血 (fetal bovine serum (FBS; JRH Biosciences, Lenexa, KS, USA)，100 μg/ml penicillin，100 μg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine (Wako, Osaka, Japan)を含む Dulbecco 変法 Eagle 培地(DMEM; Nissui, Tokyo, Japan)を用い，37℃，5%CO_2 存在下の培養器中で培養した．SCCVII 細胞は 10%仔牛血清 calf serum (CS; JRH Biosciences)，2 μM L-glutamine を含む Eagle の最小必須培地 minimum essential medium (MEM; Nissui)で培養した．Vero 細胞は MEM に 5%CS を添加したものを培養液として使用した．SAS 細胞，SCCVII 細胞，Vero 細胞は 0.1% trypsin (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)と 1% ethyl enediaminetetraacetic acid (EDTA; Wako)で細胞を単離して浮遊液を調整し，継代培養を

行った．

2. ウイルス産生と力価測定

ウイルスとして，HSV-1 RH2 を用いた．RH2 の増殖と感染力価の測定には，Vero 細胞を使用した．感染力価はプラック形成法にて測定した．すなわち，Vero 細胞を 24 穴プレートに 2×10^5 cell/well で播種し，2 日間培養し単層を形成させた．希釈したウイルス液を Vero 細胞に接種し，1 時間吸着させた．Phosphate buffered saline (PBS (-); Nissui)にて洗浄し未吸着ウイルスを除去したのち，0,3%メチルセルロース(Wako)含有培養液を重層し，37℃で培養した。細胞変性が明瞭となった時点で細胞をエタノールで固定し，1%クリスタルバイオレット(Wako)にて染色した．細胞変性部位に一致して得られる不染色領域のプラックを算定し，希釈倍率から感染力価．plaque forming unit (PFU)を算出した[30-32]．

3. 試薬

オートファジー阻害剤として，3-methyladenine (3-MA; Wako, Osaka, Japan)を用いた．chloroquine, bafilomycin A1 (Sigma, St. Louis, MO, USA)を用い，それぞれ 1 μM，1 μM，

5 μM の濃度で使用した．カスパーゼ阻害剤として， Z-DEVD-FMK，Z-VAD-FMK (R＆D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用い，10 μM の濃度で使用した．Z-YVAD-FMK (Bio Vision, Milpitas, CA,USA)から購入し，50 μM の濃度で使用した(25).

4. 3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

生細胞率は MTT assay にて測定した．すなわち，96 穴プレートの各ウェルに SAS 細胞あるいは SCCVII 細胞を 1×10^4 cell/well で播種し，24 時間培養した．実験終了後，MTT (Dojindo, Kumamoto, Japan) 50 mg を PBS (-) 10 ml に溶解した MTT 溶液を 10 μl/well 加えた．さらに 4 時間培養したのち，2-プロパノール(Wako)反応停止液 100 μl を加え，生成物を完全溶解させた．これをマイクロプレートリーダー(Benchmark Plus; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)にて吸光度（630 nm 対照波長で 570 nm 波長）を測定し，ウイルスを感染させていない対照に対する比率から生細胞率を算出した．非感染対照には PBS(-)を用いて mock infection を行った[21,23,24].

5. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)による

human active caspase-3 の測定

10 cm dish に SAS 細胞を 1 × 10^6 cell 播種し，24 時間培養した．実験終了後，培養上清を除去し，6 μl の biotin-ZVK-FMK inhibitor 含有培養液を 3 ml 添加し，1 時間培養した．その後，浮遊細胞を 1,000×g, 5 分間遠心して回収した．付着細胞に leupeptin 25 mg/ml を 1 μl, pepstatin 25 mg/ml を 1 μl，phenylmethanesulfony fluoride (PMSF) 1 μl/ml を 1 μl, aprotinin 3 μg/ml を 1μl 含む 1 ml の Extraction Buffer を加えて，セルスクレイパーを用いて付着細胞を採取した．これに遠心にて回収した浮遊細胞を加えてボルテックスを 2 分間行い，2 時間温室で静置して測定用サンプルとした．Active caspase-3 は Active Caspase-3 Immunoassay (R & D)を用いて測定した．すなわち，スタンダード，コントロール，サンプルを各 well に 100 μl 加え，接着性ストリップでカバーし，2 時間常温で反応させた．Wash Buffer を用いて 400 μl/well で洗浄する操作を 5 回行った．wash 後はプレートをペーパー上で倒置し水分を完全に除去した。次に 100 μl の Human Active Caspase-3 Conjugate を各プレートに 100 μl 添加し，1 時間常温で反応させた．Wash Buffer を用いて 5 回の洗浄し，プレートを倒置して水分を完全に除去した．反応後，

Substrate Solution を 100 μl/well 添加し，室温で 30 分間反応させた．100 μl/well の Stop Solution を 100 μl/well 加え，タッピングを行ってマイクロプレートリーダーを用い，570 nm で吸光度を測定した．Standard 希釈標準液より検量線を作成し，吸光度から Human Active Caspase-3 濃度を算出した．

6. 蛍光抗体法

LC3 検出のため，底部にカバーガラスを入れた 6 穴プレートの各 well に SCCVII 細胞あるいは SAS 細胞を 1×10^5 cell/well で播種し，24 時間培養した．実験終了後，細胞層を PBS(-)にて洗浄し，4%パラホルムアルデヒド含有リン酸緩衝液(Wako)で 15 分固定した．その後，細胞を PBS(-)にて 2 回洗浄し，一次抗体として，ブロッキングバッファー(3%bovine serum albumin 含有 PBS(-))で希釈(1：500)した抗 LC-3 マウスモノクローナル抗体(MBL, Nagoya, Japan)を温室で 1 時間反応させた．PBS(-)にて 2 回洗浄したのち，二次抗体 Alexa Fluor 488 結合抗マウスヒツジ抗体（Life Technologies Corporation, USA）を希釈(1:500)して温室で 1 時間反応させた．ProLong Gold Antifade Reagent with 4',6-diamidino-2-

phenylindole (DAPI) (Life Technologies, Carlsbad, USA)で封入し，共焦点レーザー顕微鏡 Leica TCS　SP8 (Leica Microsystems, Mannheim, Germany)にて拡大率 630 倍で観察した．

7. イムノブロット法

SAS 細胞，SCCVII 細胞を 10 cm dish にて培養した．実験終了後，氷上にてセルスクレイパーを用いて細胞を採取し，5,000×g で 3 分間遠心して細胞沈渣を回収した．プロテアーゼインヒビターを含む RIPA buffer (Santa Cruz Biotechnology, California, USA)に懸濁した．氷上でソニケーターを用いて細胞を破壊し，15,000×g，4℃で 5 分間遠心して全細胞タンパク質抽出液を得た．タンパク質の定量は DC™プロテインアッセイ(Bio-Rad)を用いた．タンパク質試料は Mini-PROTEAN TGX Precast Gel (Bio-Rad)を用いて泳動し，polyvinylidene difluoride メンブレン(Millipore, Billerica, MA,USA）にセミドライ型転写装置(Bio-Rad)を用いて 50 mA で 60 分間転写させた．5%スキムミルクを含む PBS-T (0.5% Tween 20 含有)で 1 時間ブロッキングを行ったのち，ブロッキングバッファーにて希釈した一次抗体を 4℃で一夜反応させた．メンブラン

を洗浄したのち，蛍光標識した二次抗体を室温で 1 時間反応させ，ECL Western Blotting Analysis System (Amersham, Little Chalfront, UK)を用いて検出した[26,27]．一次抗体として，マウスモノクローナル抗 LC3 抗体 (MBL)(1:1,000)，抗 Beclin1 ラットモノクローナル抗体 (MBL)(1:1,000)，抗 Bax ラットモノクローナル抗体(Cell Signaling Technology, USA)(1:1,000)，抗 Bcl-2 ラットモノクローナル抗体および抗 β-actin マウスモノクローナル抗体(MBL) (1:1,000)を用いた。二次抗体として，ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)標識抗マウス IgG 抗体(CST Japan) (1:5,000)，HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Cell Signaling) (1:5,000)を用いた[22,23]．ImageJ にて各バンド強度を測定し sample/β−actin の値を求めた．

8. Lactate dehydrogenase (LDH) release assay

細胞傷害性は，細胞から培養液中に放出される LDH 量から評価した。すなわち，96 穴プレートの各ウェルに SAS 細胞を 1×10^4 cell/well で播種し，24 時間培養した．実験終了後， PBS(-)を 100 μl 加え 1,500 rpm，30 分間遠心を行い，各ウェルから 50 μl の上清を採取し，微量毒性試験用試薬

MTX"LDH" (Kyokuto, Tokyo, Japan)のキット付属の 96 穴プレートに移した．これに LDH 反応性の基質発光試薬を 50 μl 加え，37℃で 30 分間反応させた．各ウェルに反応停止液 100 μl を加えて混和したのち，マイクロプレートリーダー (Benchmark Plus)にて波長 560 nm で吸光度を測定した．ネガティブコントロールではウイルス液の代わりに PBS(-)を，オートファジー阻害剤含有培養液の代わりに DMSO 含有培養液を用い，ポジティブコントロールでは 0.8% Triton X-100 (Sigma-Aldrich)含有培養液を用いた．吸光度の値から下記の計算式を用いて細胞傷害率を算出した．

細胞傷害率＝

$$\frac{(\text{検体})-(\text{ネガティブコントロール})}{(\text{ポジティブコントロール})-(\text{ネガティブコントロール})}\times 100$$

9. 透過型電子顕微鏡用試料作製と細胞の観察

細胞を 2%グルタールアルデヒド(0.1 M リン酸緩衝液)を用いて，4℃で 24 時間固定したのち，4℃のリン酸緩衝液にて 2 回洗浄した。次に，2%オスミウム水溶液にて 4℃で 2 時間後固定を行った．その後，エタノール濃度 50%, 75%, 90%で各

15 分，100%で 30 分間脱水を行った．エタノール：エポキシ樹脂を 2:1 の割合で 1 時間，その後エタノール：エポキシ樹脂を 1:1 の割合で 1 時間エポキシ樹脂置換を行ったのち，エポキシ樹脂(EPON812)にて倒立包埋した．ウルトラミクロトームにて 70～80 nm の超薄切切片を作製し，2%酢酸ウランで 15 分間，鉛染色液で 5 分間の染色を行い，透過型電子顕微鏡(JEM-1200EX, JEOL, Tokyo, Japan)を用いて観察した．

10.　統計解析

有意差検定は Student- t test を行い統計学的に比較した．実験結果は平均±標準偏差と表記した．P＜0.05 を有意差有と判断した．

結果

1．RH2 感染による細胞形態と細胞生存率の変化

RH2 の SAS 細胞，SCCVII 細胞に対する細胞変性効果を知るため，各種ウイルス量で接種し，経時的に細胞形態を観察した．

SAS 細胞では MOI=0.1 で感染した場合，12 時間後では細胞の融合を生じ，24 時間後では多核の巨細胞が形成された（図 1A）．培養を継続すると細胞層あるいは大きな細胞塊となって浮遊状態となった．SCCVII 細胞に RH2 を MOI=0.1 で感染させた場合，細胞の形態変化はみられなかったが，より高いウイルス量の MOI=10 で感染させると，12 時間後には円形化した細胞が出現し，24 時間後には円形化し浮遊する細胞が増加した（図 1B）．

RH2 感染による細胞形態の変化と細胞生存率を比較するため，SAS 細胞に MOI=0.01, 0.1, 1, 10 で RH2 を感染させた．SCCVII 細胞では MOI=0.1, 1, 10, 100 で RH2 を感染させた．12, 24, 48 時間後に MTT assay を行い，非感染対照と比較して生細胞率を求めたところ，SAS 細胞では，MOI=0.1 で感染した場合，24 時間後には非感染対照の 46%，48 時間後では 33%まで低下した．SCCVII 細胞では，MOI=10 で感染させた

場合，24 時間後には 54%，48 時間後では 39%にまで低下した（図 2）.

2.RH2 感染細胞における LC3 の発現

オートファジーが誘導される場合，LC3 がオートファゴソームに集積する[33].そこで，RH2 を感染させた細胞における LC3 の局在を免疫蛍光染色にて検討した．非感染 SAS 細胞では，LC3 は細胞質でびまん性に染色されたが，RH2 を MOI=0.1 で感染させ 12 時間経過した SAS 細胞では，核周囲で顆粒状に染色されるようになった．24 時間後では，多核巨細胞が形成されるため，この感染巨細胞を観察したところ，細胞質での LC3 の発現が顕著で，顆粒状に染色される像がみられた(図 3A)．RH2 を MOI=10 で感染させた SCCVII 細胞では，感染 24 時間の円形化細胞において，細胞質で強い LC3 の染色像がみられた．(図 3B)

3.RH2 感染細胞における超微細構造の観察

オートファジーでは細胞質に隔離膜と呼ばれる扁平な膜区画が出現，弯曲しながら伸長し，最後に隔離膜の末端同士が融合しオートファゴソームと呼ばれる二重膜構造が形成される．続いてリソソームが融合してオートリソソームとなり，

加水分解酵素が包み込んだ内容物を消化する．RH2 を MOI=0.1 で SAS 細胞に感染し，24 時間後に超微細構造を透過型電子顕微鏡にて観察した．RH2 感染 12 時間後では，二重膜に囲まれたオートファゴソーム，いくつかの二重膜が融合して形成された大きな空胞がみられた（図 4)．RH2 感染 24 時間後では複製後に細胞外へ放出されたウイルス粒子がみられた．細胞質には，オートリソソームが形成され，オートファゴソームと形成されたウイルスが隣接する像もみられた．非感染の対照では，このような細胞質の構造物は観察されなかった（図 4)．

4.RH2 感染細胞における LC3-II の検出

オートファジーでは，LC3-I が LC3-II に変換される．SAS 細胞に MOI=0.1，SCCⅦ細胞には MOI=10 で RH2 を感染させ，24 時間後に感染細胞のタンパク質を回収して，イムノブロットで LC3 を検出した．RH2 を感染していない SAS 細胞と SCCVII 細胞では LC3-II はほとんど検出されなかったが，RH2 感染細胞では LC3-II の発現が顕著に認められた（図 5)．

5.RH2 感染 SAS 細胞におけるカスパーゼと beclin1, Bcl-2, Bax の検出

癌細胞における抗腫瘍薬ならびに HSV-1 感染におけるオートファジーの誘導実験では，アポトーシスも誘導されることが報告されている[34]．そこで，SAS 細胞に MOI=0.1 で RH2 を感染させ 24 時間後に細胞を採取し，アポトーシスの実行カスパーゼであるカスパーゼ 3 の活性について，ELISA にて測定を行った．その結果，RH2 感染 24 時間の活性化カスパーゼ 3 の値は，非感染対照の 1.6 倍にまで上昇しており，対照との間で有意差を認めた（図 6A）.

抗アポトーシスタンパク質 Bcl-2 は beclin 1 と結合してオートファゴソームの形成を阻害する．Bcl-2 と beclin1 との結合が促進されるとアポトーシス促進タンパク質である Bax の Bcl-2 からの解離が促進されアポトーシスが誘導される[35]. RH2 を MOI=0.1 で SAS 細胞に感染させ，24 時間後に beclin1, Bcl-2, Bax の発現をイムノブロットで検出したところ，非感染対照と比較していずれも明らかな変化はみられなかった（図 6B）.

6.RH2 による細胞傷害に対するオートファジー阻害剤の影響

SAS 細胞に RH2 を MOI=0.1 で接種し，オートファジー阻害剤である，3-MA (1 μM), chloroquine (1 μM), bafilomycin A1 (5 μM)を含む培養液で 12 時間，24 時間培養し，細胞傷害性を LDH release assay にて測定した．12 時間後では，オートファジー阻害剤単独での細胞傷害性はなく，RH2 による細胞傷害性に対する抑制効果もみられなかった（図 7A）．24 時間後，RH2 感染によって細胞傷害率は 24%にまで上昇した．阻害剤単独の影響はなかったが，3-MA, chloroquine, bafilomycin A1 が存在すると，それぞれ，12 %, 16%, 13%にまで低下した（図 7B）．

7.RH2 感染に対するオートファジー阻害剤の影響

オートファジー阻害剤がウイルス複製を阻害すると感染による細胞変性効果が減弱する．そこで，細胞傷害率の低下がウイルス複製への影響か否かを調べた．MOI=0.1 で RH2 を感染させ 24 時間後にウイルス産生量を測定した結果，いずれの阻害剤でもウイルス産生の減少はみられなかった（図 8）．

8.RH2 感染による細胞傷害に対するカスパーゼ阻害剤の影響

SAS 細胞に RH2 を MOI=0.1 で感染させた．感染後から汎

カスパーゼ阻害剤である Z-VAD-FMK (10 μM)存在下に SAS 細胞を培養したところ，阻害剤単独では細胞傷害性に影響はなかったが，RH2 による細胞傷害率を低下させ，阻害剤を含まない RH2 群との間で有意差を認めた（図 9A）.

SAS 細胞に RH2 を MOI=0.1 で感染し，カスパーゼ 1 阻害剤 Z-YVAD-FMK (50 μM)あるいはカスパーゼ 3 阻害 Z-DEVD - FMK(10 μM)の存在下に培養したところ，RH2 による細胞傷害は抑制され，阻害剤を含まない RH2 群との間で有意差を認めた（図 9B）.

考察

HSV-1 感染とオートファジーの関連性については，実験に使用する細胞，ウイルス株によって異なった結果が得られている．Yakoub らが行った一連の研究で，生理的あるいは薬理学的なオートファジー誘導剤は各種細胞の生存に影響を与えず，HSV-1 KOS 株の感染を抑制したとしている[26]．また，HeLa 細胞に KOS あるいは McKrae 株を感染させ，オートファジーを LC3-II レベルで測定すると感染 2 時間まではわずかに低下し，12～30 時間では低下から回復したとしている[30]．これらは野性型 HSV-1 を用いた研究である．

抗ウイルス作用を示すインターフェロンで誘導される PKR シグナル経路は，eIF2αをリン酸化してタンパク質翻訳を停止する．PKR/eIF2αリン酸化はオートファジーを誘導することや HSV-1γ34.5 がオートファジータンパク質 beclin 1 と結合して eIF2α依存的なオートファジーを阻害することも明らかにされている[35]．γ34.5 遺伝子を欠失した HSV-1 は beclin 1 との結合能がないため，オートファジーを抑制できないことになる．Orvedahl らはγ34.5 遺伝子の beclin1 結合ドメインを欠失した変異 HSV-1 が神経細胞のオートファジーを阻害できないため，感染細胞でオートファゴソームが増え，マウスに

対する神経毒性が低減したとしている[36]．一方，HSV-1 がコードするγ群タンパク質のひとつである US11 タンパク質は double-stranded RNA (dsRNA)と結合して PKR と PKR/eIF2α シグナル系の活性化を阻害する働きがあり，PKR/eIF2αシグナル経路を介してオートファジーを阻害することも分かっている．そのため，オートファジーを抑制する HSV-1 の遺伝子 γ34.5 遺伝子が欠失しても US11 タンパクの働きでオートファジーの誘導が抑制される可能性もある．

SCC に対する腫瘍融解性 HSV-1 感染による細胞変性過程でのオートファジーを明らかにするため，HSV-1 の RH2 株を用いて，SCC 細胞におけるオートファジー誘導の可能性について検討を行った．まず SAS 細胞に RH2 を MOI=0.1 で感染させた場合，多核巨細胞が形成され，さらに培養を継続すると細胞が浮遊する像がみられた．SCCVII 細胞では高い MOI で細胞変性がみられるようになった．したがって，細胞形態の変化は細胞生存率の低下を反映するといえる．HSV-1 の細胞への侵入にはウイルス糖タンパク質である gB, gC, gD, gH, gL1 が必要とされ，吸着はまず細胞表面のヘパラン硫酸との結合で引き起こされる．その後，gB とその特異的なレセプターである non-muscle myosin IIA (NM-IIA), paired

immunoglobulin-like type 2 receptor (PILR), myelin associated glycoprotein (MAG)が働き，gD には nectin, CD 258 (HVEM: herpesvirus entry me-d iator)が働く．マウス由来の SCCVII 細胞では RH2 と特異的に結合する受容体が不足するか，侵入後の複製過程がヒト細胞と異なるため，感染効率と細胞融合能が低下すると考えられる[38].

RH2 感染によるオートファジー誘導の可否を知るため，まずオートファジーの指標となる LC3 についてその細胞内局在を検討した．SAS 細胞では RH2 感染で形成される多核巨細胞について観察したところ，細胞質で発現が増加し顆粒状に集積する像がみられた．SCCVII 細胞の場合，円形化した感染細胞の細胞質で LC3 が強く染色され発現の増強が確認された．イムノブロット法でオートファジーに伴う LC3-I から LC3-II への変換を調べたが，いずれの SCC 細胞でも RH2 感染によって LC 3-II の増加が認められた．さらに，透過型電子顕微鏡にて感染細胞で，非感染対象ではみられないオートファゴソーム，オートリソソームが確認された．したがって，いずれの SCC 細胞にいても RH2 はオートファジーを誘導するものと考えられた．

オートファジーは細胞の恒常性，ストレスに対する反応を

統合するため，アポトーシス，炎症，獲得免疫と協調して働くとされている．多くの化学療法薬ではアポトーシスが誘導されるが，癌細胞の防御反応あるいは生存機構として，オートファジーが誘導されることが知られている[38]．この場合，オートファジーを特異的阻害剤で阻止すると細胞死が助長されることになる．アポトーシスは主要なプログラム細胞死のメカニズムで，核凝集，細胞収縮，膜構造変化，DNA の断片化によって特徴づけられる．システインプロテアーゼであるカスパーゼ群によって下流の各カスパーゼが順次切断，活性化され，カスパーゼ 3 が実行カスパーゼとして働く．これを制御するものとして，Bcl-2 ファミリーがあり，Bcl-2, Bcl-xL が抗アポトーシスタンパク質，Bax, Bcl-xS, Bad, Bik がアポトーシス促進タンパク質である．アポトーシ刺激で Bcl-2 ファミリーのアポトーシス促進タンパク質がミトコンドリアからカスパーゼ誘導因子を放出させる[39,40]．また，Bcl-2 ファミリーはアポトーシスだけでなくオートファジーを伴う細胞死にも関与するとされている．HSV-1 感染が誘導する U251 glioma 細胞のアポトーシスはオートファジーによって阻害される[41]．そこで，RH2 感染細胞におけるカスパーゼ 3 の活性を測定したところ，活性が上昇しており，RH2 感染による細

胞死にアポトーシスも関与すると考えられた．Beclin 1はオートファゴソームを形成する際に必須の物質であるが，抗アポトーシスタンパク質であるBcl-2は，beclin 1との相互作用を介してオートファジーを阻害する[42-44]． beclin 1，Bcl-2，Baxの発現につき，RH2感染細胞のタンパク質をイムノブロット法で調べたが，オートファジータンパク質であるbcelin1の変化ならびに，Bcl-2, Baxの変化はみられなかった．したがって，これら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と考えらえる．

Tovilovicらが U251 human gliomaに対して HSV-1のMcIntyre株を用いて行った実験では，カスパーゼの活性化，DNAの断片化，LC3-IからLC3-IIへの変換があり，アポトーシスならびにオートファジーを証明し，HSV-1感染によるアポトーシスに対してオートファジーが拮抗して glioma細胞の生存を助長する働きがあるとしている[41]．そこで，オートファジーとアポトーシスに対する阻害剤を用いて，RH2が誘導する細胞傷害に対する効果を検討した．オートファジー阻害剤 3-MA, chloroquine, bafilomycinA1で RH2感染によって上昇する細胞傷害率は有意に低下し，RH2感染細胞の生存に働いた．オートファジー阻害剤のウイルス産生量を測定した

が，いずれの阻害剤でもウイルス産生の減少はなかった．したがって，RH2 によって誘導されるオートファジーは細胞死に寄与しており，その阻害は細胞死を減弱させると考えられた．

次に RH2 感染による細胞死とアポトーシスの関係を調べた． RH2 による細胞傷害性は汎カスパーゼ阻害剤で低下し，さらにアポトーシスの実行カスパーゼであるカスパーゼ 3 に対する特異的阻害剤でも低下したことから，RH2 による SCC 細胞の細胞死にはアポトーシスが関与すると考えられた．一方，HSV-1 感染では，カスパーゼ 1 が活性化され，細胞死の一種であるパイロトーシスを生じることも報告されている[45]．カスパーゼ 1 は炎症性サイトカイン interleukin (IL)-1β, IL-18, IL-33 を活性型に転換する酵素で炎症と関係する．今回，カスパーゼ 1 阻害剤でも RH2 による細胞死に関与する可能性がある[46]．

近年，アポトーシスを誘導する抗癌剤によるオートファジー誘導の研究が進んでおり，オートファジーが癌細胞の生存に働く場合には，オートファジーを阻害する薬剤との併用が抗腫瘍薬の効果を高めるとして，臨床研究が進んでいる[47]．HSV-1 によるオートファジーもアポトーシスに対して拮抗的

に働くとする報告もあるが，オートファジーがウイルスによるプログラムされた細胞死を仲介することも知られている[48,49]．RH2は後者のオートファジーを伴う細胞死を誘導する腫瘍融解性ウイルスといえる．

以上より，腫瘍融解性HSV-1であるRH2をSCC細胞に感染することで，オートファジーが誘導され，アポトーシスとともに腫瘍細胞の細胞死の促進に働くことが示唆された．オートファジーを促進する物質としてラパマイシンが知られている[50].臨床でRH2を口腔癌の治療に使用する際には，ラパマイシンなどオートファジーを促進する薬剤との併用が治療効果を向上させるうえで有用と考えられた．

結語

1) RH2をヒト口腔扁平上皮癌細胞由来のSAS細胞，マウス皮膚扁平上皮癌由来SCCVIIに接種すると感染が認められた．

2) RH2を接種し感染させたSAS細胞では，オートファゴソーム，オートリソソームが確認でき，ウエスタンブロット法においてもオートファジーの指標となるLC3-IIを検出した．

3) RH2感染にともなってカスパーゼ3が活性化し，アポトーシスも関与していることが示唆された．beclin1，Bcl-2，BaxはRH2感染SAS細胞で明瞭な変化はなかった．

4) RH2感染SAS細胞をオートファジー阻害剤と培養するとコントロールと比較して細胞傷害率が低下した．この低下にはオートファジー阻害剤のウイルス複製への影響はなかった．

5) RH2感染SAS細胞をカスパーゼ阻害剤と培養するとコントロールと比較して細胞傷害率が低下した．

以上より，腫瘍融解性HSV-1であるRH2をSCC細胞に感染することで，オートファジーが誘導され，アポトーシスとともに腫瘍細胞の細胞死の促進に働くことが示唆された．

謝辞

稿を終えるにあたり，本研究を行う機会を与えて頂き，御指導，御校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座(口腔外科第二教室）由良義明教授に謹んで感謝の意を表します．また，本研究に対し特別のご配慮，御協力を頂きました本学部口腔外科第二教室の教室員，花市電子顕微鏡技術研究所の皆様に厚く御礼申しあげます．

引用文献

[1]Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefèbvre J, Greiner R, Giralt J, Maingon P, Rolland F, Bolla M, Cognetti F, Bourhis J, Kirkpatrick A, Glabbeke M.(2004):Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J*, 350:1945-1952.

[2]Genden EM, Ferlito A, Silver CE, Takes RP, Owen RP.(2010):Contemporary management of cancer of the oralcavity. *Eur Arch Otorhinolaryngol,* 267:1001-1017.

[3]Martuza RL, Malick A, Markert JM, Ruffner KL, Coen DM.(1991):Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science*, 252:854-856.

[4]Yazaki T, Manz HJ, Rabkin SD, Martuza RL.(1995): Treatment of human malignant meningiomas by G207, a replication-competent multimutated herpes simplex virus 1. *Cancer Research*, 55:4752-4756.

[5]Kaufman HL, Kim DW, Raffele G, Mitcham J, Coffin RS, Schulze k.(2009):Local and distant immunity induced by

intralesional vaccination with an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF in patients with stage IIIc and IV melanoma. *Ann Surg Oncol*, 17:718-730.

[6]Prestwich RJ, Ilett EJ, Errington F, Diaz RM, Steele LP, Kottke T, Thompson J, Galivo F, Harrington KJ, Pandha HS, Selby PJ, Vile RG, Melcher AA.(2009):Immune-mediated antitumor activity of reovirus is required for therapy and is independent of direct viral oncolysis and replication. *Clin Cancer Res*, 15:4374-4381.

[7]Breitbach CJ, Burke J, Jonker D, Stephenson J, Haas AR, Chow LQ, Nieva J, Hwang TH, Moon A, Patt R, Pelusio A, Leboeuf F, Burns J, Evgin LD, Silva N, Cvancic S, Robertson T, Lee YS, Parato K, Diallo JS, Fenster A, Daneshmand M, Bell JC, Kirn DH.(2011):Intravenous delivery of a multi mechanistic cancer targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature*, 477:99-102.

[8]Nakao A, Kasuya H, Sahin TT, Nomura N, Kanzaki A, Misawa M.(2011):A phase I dose escalation clinical trial of intraoperative direct intratumoral injection of HF10

oncolytic virus in non resectable patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer Gene*,18:167-175.

[9]Russell SJ, Peng KW, Bell JC.(2012):Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol*, 30:658-670.

[10]Campadelli FG, Giovanni C, Gatta V, Nanni P, Lollini PL, Menotti L.(2011):Rethinking herpes simplex virus:the way to oncolyticagents. *Rev Mde,* 21:213-226.

[11]Mori Y.(2007):Mechanisms of herpesvirus infection virus entry into host cells and virus assembly. *Uirusu*,57:151 -158.

[12]Mineta T, Rabkin SD, Yazaki T, Hunter WD, Murtuza, RL.(1995):Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nat.Med*,1,938-943.

[13]Roberts PJ.(2007):Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, 26:3291-3310.

[14]Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W.(2007):MAP kinase signaling pathways in cancer. *Oncogene*, 26:3279-3290.

[15]Editor M, Santos E.(2011):Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer*, 2:344-358.

[16]Rajalingam K, Schreck R, Rapp UR, Albert S.(2007): Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochim Biophys Acta*, 1773:1177-1195.

[17]Satoh T, Suenaga T, Wang J, Kogure A, Uehori J, Arase N, Shiratori I, Tanaka S, Kawaguchi I, Patricia P, Spear G, Lewis L, Arase H.(2008):PILRα is a herpes simplex virus-1 entrycoreceptor that associates with glycol protein B. *Cell*, 132:935-944.

[18]Andreansky S, Soroceanu L, Flotte ER, Chou J, Markert JM, Gillespie GY, Roizman B, Whitley RJ. (1997):Evaluation of genetically engineered herpes simplex viruses as oncolytic agents for human malignant brain tumors. *Cancer Res*, 57:1502-1509.

[19]Wheeler CE.(1958):The Effect of Temperature upon the Production of Herpes Simplex Virus in Tissue Culture. *J Immunol,* 81:98-106.

[20]Ogawa F, Takaoka H, Iwai S, Aota K, Yura Y. (2008):Combined oncolytic virotherapy with Herpes

Simplex Virus for oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res,* 28:3637-3645.

[21]Takaoka H, Takahashi G, Ogawa F, Imai T, Iwai S, Yura Y.(2011):A novel fusogenic herpes simplex virus for oncolytic virotherapy of squamous cell carcinoma. *Virol J*, 8:294.

[22]Takahashi G, Meshii N, Hamada M, Iwai S, Yura Y. (2013):Sequence of a fusogenic herpes simplex virus, RH2, for oncolytic virotherapy. *J Gen Virol*, 94:726-737.

[23]Nakao A, kimata H, Imai T, kikumori O, Teshiwgawara T, Nagasaka F, Nishiyama Y.(2004):Intratumoral injection of herpes simplex virus HF10 in recurrent breast cancer. *Ann Oncol*, 15:988-989.

[24]Fujimoto Y, Mizunoa T, Sugiuraa S, Goshimab F, Kohnob S, Nakashima T, NishiyamaY. (2006):Intra-tumoral injection of herpes simplex virus HF10 in recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol*, 126:1115-1117.

[25]Eskelinen EL, Reggiori F, Baba M, Kovács AL, Seglen PO.(2011):Seeing is believing: The impact of electron

microscopy on autophagy research. *Autophagy*, 5:184-193.

[26]Jin M, klionsky Dj.(2014):Regulation of autophagy: modulation of the size and number of autophagosomes. *FEBS Let,* 588:2457-2463.

[27]Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo AA, Adeli K.(2008):Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. Autophagy, 4:151-175.

[28]Yakoub A, Shukla D.(2015):Autophagy stimulation abrogates herpes simplex virus-1 infection. *Sci Rep,* 5:9730.

[29]Yakoub A, Shukla D.(2015):Herpes Simplex Virus-1 fine-tunes host's autophagic response to infection: a comprehensive analysis in productive infection. Models. PLoS One, 10:e0124646.

[30]Kondo Y, Kondo S.(2006):Autophagy and cancer therpy. *Autophagy*, 2:85-90.

[31]Sugimoto K, Uema M, Sagara H, Tanaka M, Sata T, Hashimoto Y, Kawaguchi Y.(2008):Simultaneous

tracking of capsid, tegument, and envelope protein localization in living cells infected with triply fluorescent herpes simplex virus. *Virology*, 82:5198-5211.

[32]Logu A, Loy G, Pellerano ML, Bonsignore L, Schivo, ML. (2000):Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by Santolina insularis essential oil. *Antivir Res,* 48:177-185.

[33]Tanida I, Ueno T, Kominami E.(2008):LC3 and autophagy. *Methods Mol Biol*, 445:77-88.

[34]Simon HU, Kang R, Zeh H, Lotze MT, Tang D.(2011): The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis.*Cell Death Differ*, 18:571-580.

[35]Maejima Y, Kyoi S, Zhai P, Liu TL, Ivessa A, Sciarretta S,Del Re, Zablocki DK, Hsu CP, Lim DS, Isobe M, Sadoshima J.(2013):Mst1 inhibits autophagy by promoting the interaction between Beclin1 and Bcl-2. *NatMed,* 19:1478-1488.

[36]Whitbeck JC, Peng C, Lou H, Willis SH, Poncedeleon M, Peng H, Tnicola AV, Montgomery RI, Warner MS, Soulika

AM, Spruce LA, Moore WT, Lambris JD, Spear PG, Cohen GH, Eisenberg RJ.(1997):Glycoprotein d of herpes simplex virus (HSV) binds directly to HVEM, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily and a mediator of HSV entry. J Virol, 71:6083-6093.

[37]Orvedahl A, Alexander D, Tallóczy Z, Sun Q, Wei Y Zhang W, Burns D, Leib DA, Levine B.(2007):HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the beclin 1 autophagy protein. Cell Host Microbe, 15:23-35.

[38]Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kond S.(2005):The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer*, 5:726-734.

[39]Kroemer G.(1997):Mitochondrial implication in apoptosis.Towards an endosymbiont hypothesis of apoptosis evolution. *Cell Death Differ*, 4:443-456.

[40]Green DR, Amarante GP.(1998):The point of no return: mitochondria,caspases, and the commitment to cell death. *Results Probl Cell Differ*, 24:45-61

[41]Tovilovic G, Ristic B, Siljic M, Nikolic V, Kravic ST, Dulovic M, Milenkovic M, Knezevic A, Bosnjak M,

Bumbasirevic V, Stanojevic M, Trajkovic V.(2013): mTOR-independent autophagy counteracts apoptosis in herpes simplex virus type 1-infected U251 glioma cells. *Microbes Infect*, 15:615-624.

[42]Marquez RT, Xu L.(2012):Bcl-2:Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. *Cancer Res*, 2:214-221.

[43]Pattingre A, Tassa QR, Garuti XH, Liang N, Mizushima M, Packer, Schneider M, Levine B.(2005)Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit beclin 1-dependent autophagy. *Cell,* 122:927-939.

[44]García S.(2013) Cell biology:Beneficial lessons from viruses. *Nature*, 7436:181-182.

[45]Fink SL, Cookson BT. (2006) Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol*, 8:1812-1825.

[46]Colunga AG, Laing JM, Aurelian L.(2010):The HSV-2 mutant DeltaPK induces melanoma oncolysis through nonredundant death programs and associated with autophagy and pyroptosis proteins. *Gene Ther,*

17:315-327.

[47]Ozpolat B, Benbrook DM.(2015):Targeting autophagy in cancer management strategies and developments. *Cancer Manag*, 117,291-299.

[48]Pei Y, Chen ZP, Ju HQ, Wang YF, Kitazato, K.(2011):Autophagy is involved in anti-viral activity of type 1 infection in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 405:186-191.

[49]Bowie M, Pilie P, Wulfkuhle J, Lem S, Hoffman A, Desai S, Petricoin E, Carter A, Ambrose A, Seewaldt V, Ibarra F, Drendall C.(2015):Fluoxetine induces cytotoxic endoplasmic reticulum stress and autophagy in triple negative breast cancer. *World J Clin Oncol,* 10:299-311.

[50]Brian K.(2005):Rapamycin Anti-cancer immunosuppressant?. *Oncol Hematol*, 56:47-60.

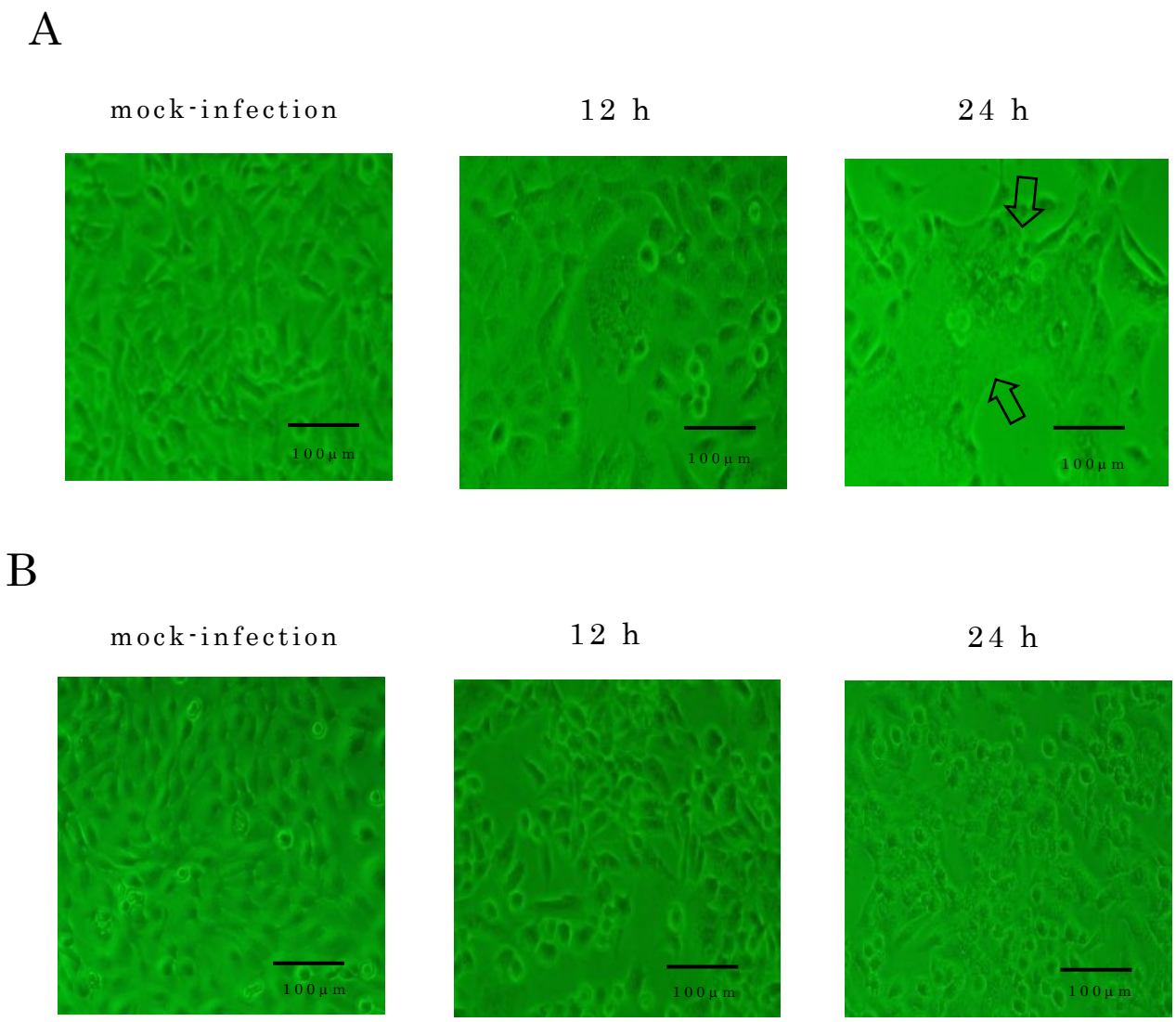
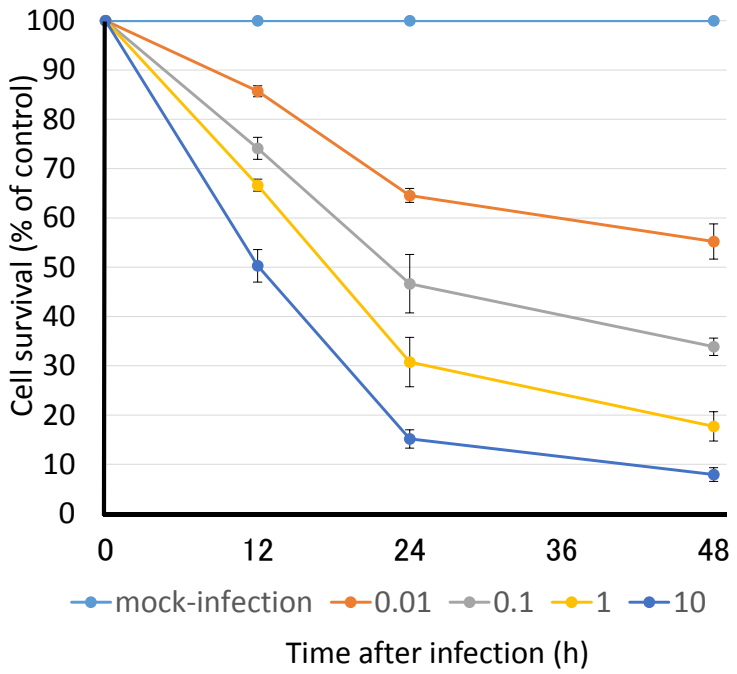


図 1 RH2 感染による SAS 細胞(A)と SCCVII 細胞(B)の細胞形態の変化

RH2 を SAS 細胞に MOI=0．1 で，SCCVII 細胞には RMOI=10 で接種し，経時的に位相差顕微鏡で細胞形態を観察した．SAS 細胞では，細胞の融合を生じ，24 時間後では多核巨細胞がみられた（矢印）．SCCVII 細胞では，円形化細胞，円形化後に浮遊する細胞がみられた．

A


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Cell survival (% of control)
0
12
24
36
48
mock-infection
0.01
0.1
1
10
Time after infection (h)

B

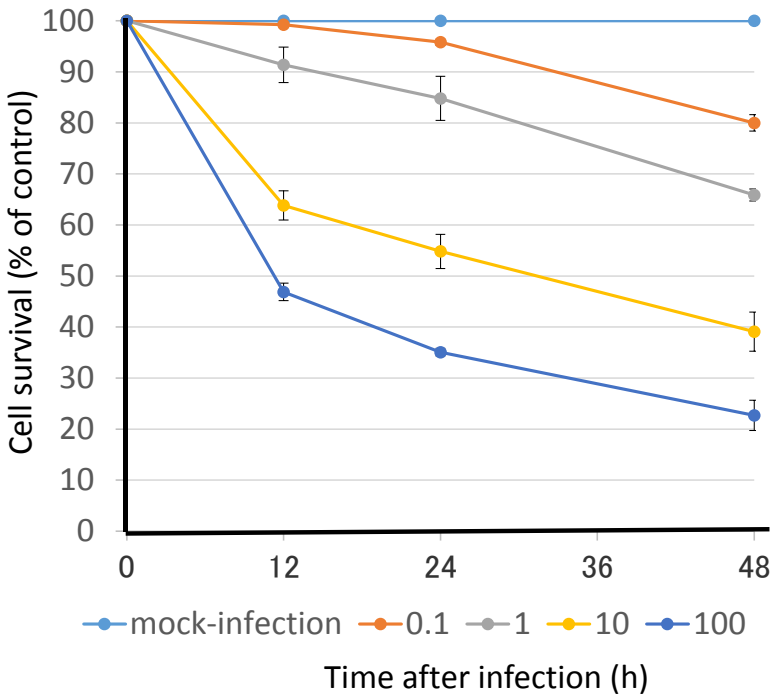
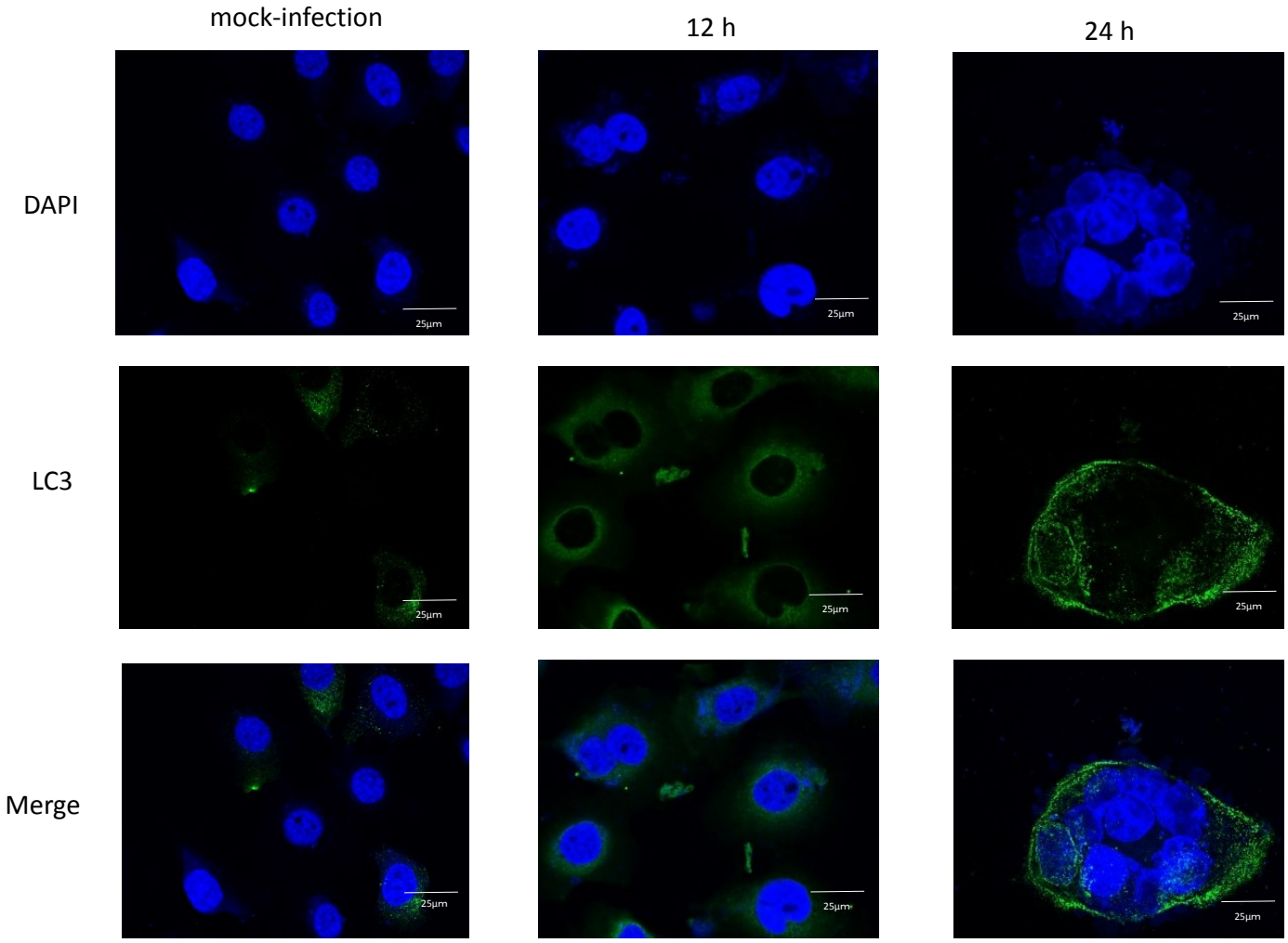

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Cell survival (% of control)
0
12
24
36
48
mock-infection
0.1
1
10
100
Time after infection (h)

図 2 RH2 感染による SAS 細胞(A)と SCCVII 細胞(B)における生細胞率の変化

RH2 を SAS 細胞には MOI=0.01, 0.1, 1, 10 にて，SCCVII 細胞には MOI=0.1, 1, 10, 100 にて接種し，経時的に MTT assay を行い，非感染対照と比較して生細胞率を求めた．SAS 細胞では，MOI=0.1, 24 時間後に非感染対照の 46%まで生細胞率は低下した．SCCVII 細胞では，MOI=10，24 時間後で非感染対照の 54%であった(n=3).

A



B

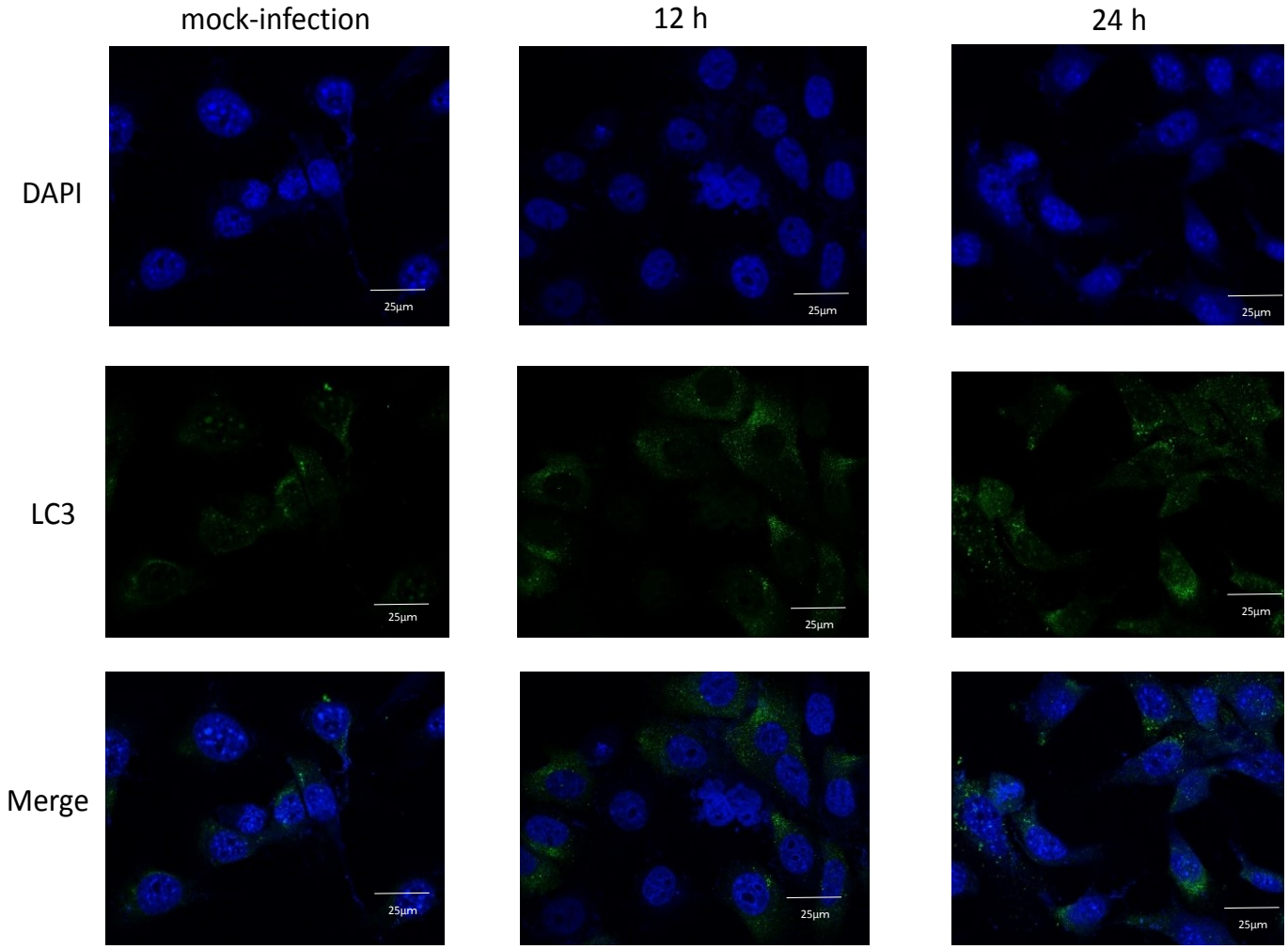
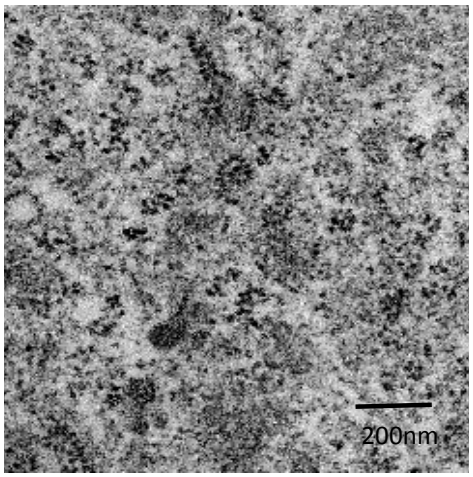


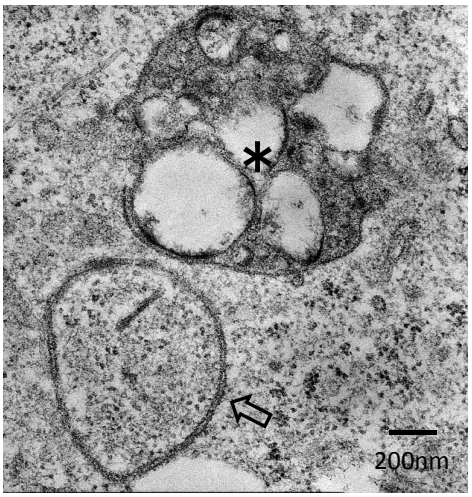
図 3 RH2 感染による SAS 細胞(A)と SCCVII 細胞(B)における LC3 の発現の変化

RH2 感染 12 時間と 24 時間で SAS 細胞と SCCVII 細胞における LC3 の発現と DAPI 染色による核形態を蛍光抗体法にて検出した．SAS 細胞は MOI=0.1, SCCVI 細胞は MOI=10 で感染した．非感染 SAS 細胞では，LC3 は細胞質でびまん性に染色され，24 時間後に形成された多核巨細胞では，細胞質に粒状に LC3 が染色された．SCCVII 細胞でも，感染 24 時間で円形化細胞の細胞質で LC3 が強く染色された．

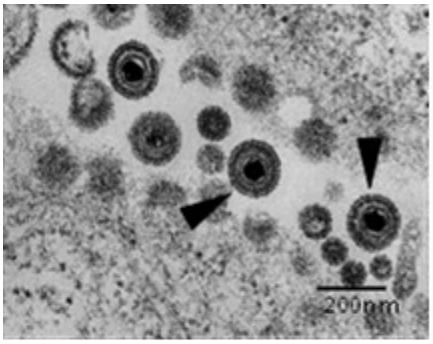
Mock-infection

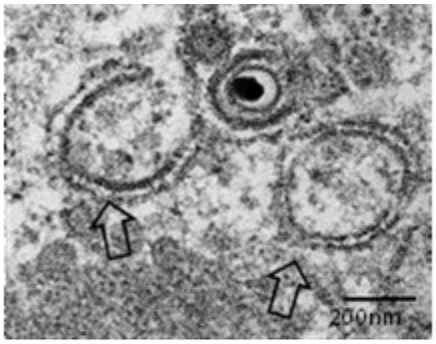


12 h



24 h





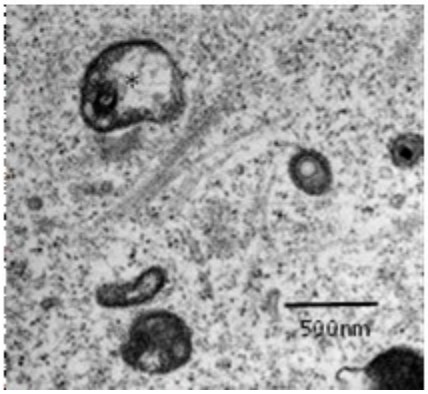


図 4 RH2 感染による SAS 細胞における超微細構造の変化

非感染 SAS 細胞ならびに RH2 感染 24 時間の SAS 細胞につき，電子顕微鏡で観察した．RH2 感染細胞では，細胞質において，二重膜に囲まれたオートファゴゾーム(矢印)，空胞が融合したオートリソソーム(星印）を認めた．RH2 感染 24 時間後では，複製後に細胞外へ放出されたウイルス粒子（矢頭）がみられた．

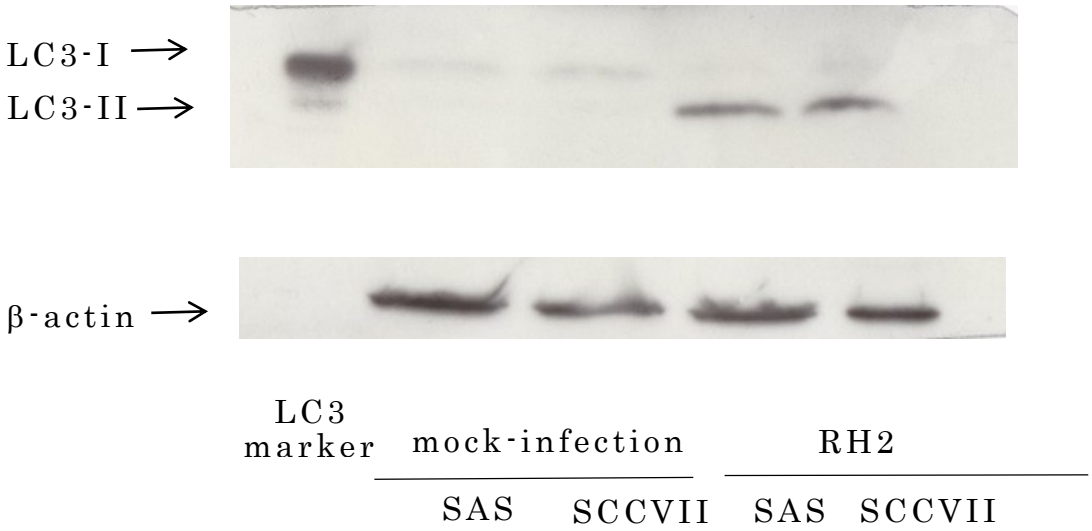
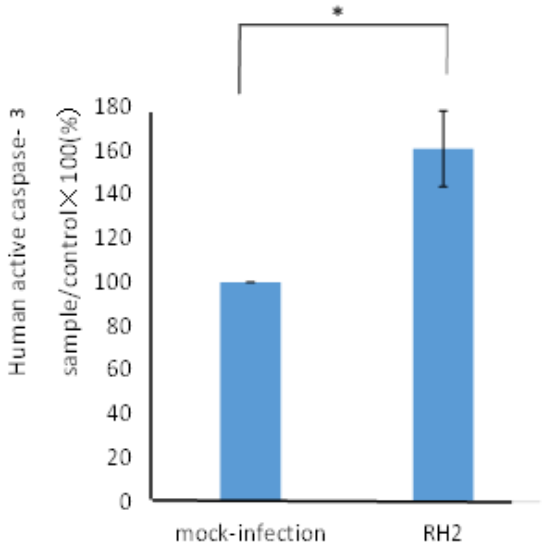


図 5 RH2 感染細胞における LC3-II の検出

非感染 SAS 細胞，SCCVII 細胞ならびに RH2 感染 24 時間後の SAS 細胞，SCCVII 細胞からタンパク質を抽出し，抗 LC3 抗体を用いてイムノブロット法を行った．左端は LC3 marker を示す．非感染の SAS 細胞と SCCVII 細胞でも LC3-I と LC3-II をわずかに認めたが，感染細胞では LC3-II の発現が顕著であった．

A


*
Human active caspase- 3
sample/control×100(%)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
mock-infection
RH2

B

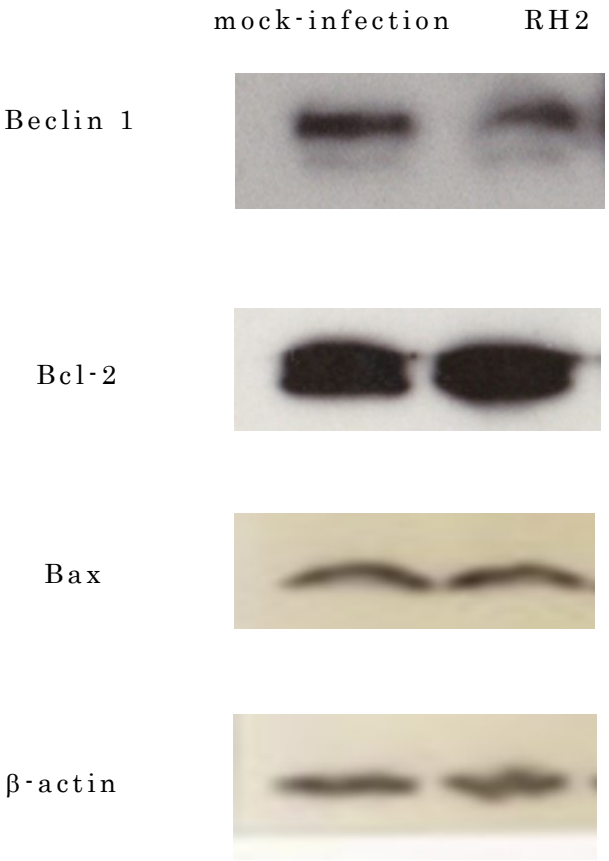
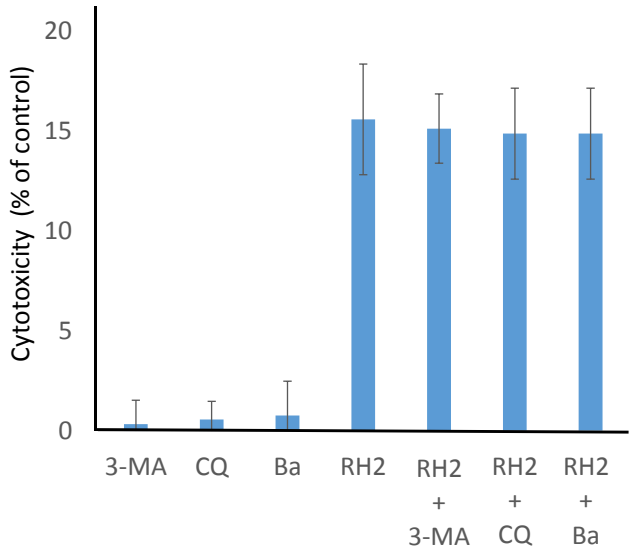

mock-infection
RH2
Beclin 1
Bcl-2
Bax
β-actin

図 6 RH2 感染 SAS 細胞における活性化カスパーゼ 3(A)と bectin 1, Bcl-2, Bax (B)の検出

アポトーシスの実行カスパーゼであるカスパーゼ 3 の活性化を ELISA にて測定した．RH2 感染細胞では，24 時間後に非感染対照の 1.6 倍にまで上昇した(n=3)．*P<0.05. Beclin1, Bcl-2, Bax の発現をイムノブロット法にて検出した結果，非感染対照と比較していずれも明らかな変化はみられなかった．

A


Cytotoxicity (% of control)
20
15
10
5
0
3-MA
CQ
Ba
RH2
RH2 + 3-MA
RH2 + CQ
RH2 + Ba

B

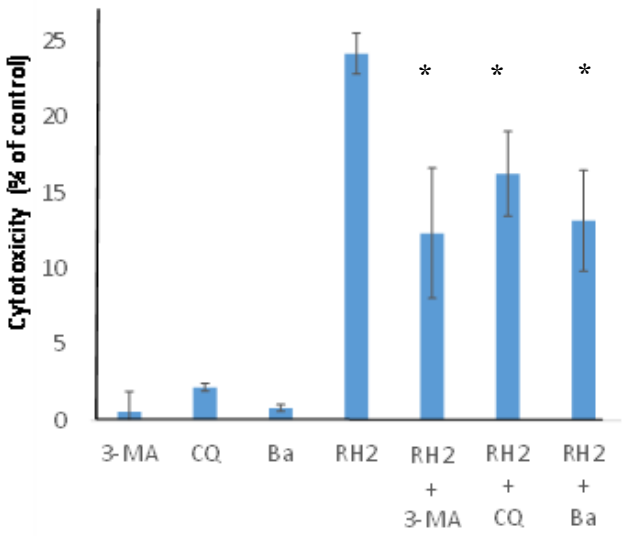

Cytotoxicity (% of control)
25
20
15
10
5
0
*
*
*
3-MA
CQ
Ba
RH2
RH2 + 3-MA
RH2 + CQ
RH2 + Ba

図 7 RH2 感染 12 時間(A)と 24 時間(B)後の細胞傷害性に対するオートファジー阻害剤の効果

RH2 を SAS 細胞に感染し，オートファジー阻害剤である 3-MA，chloroquine（CQ），bafilomycin A1（Ba）存在下と非存在下に 12 時間と 24 時間培養し，細胞傷害率を LDH release assay にて測定した．12 時間では，RH2 による細胞傷害に対するオートファジー阻害剤の効果は明らかでなかったが，24 時間では感染による細胞傷害率は 24%にまで上昇し，これが 3-MA, chloroquine，bafilomycinA1 にて，それぞれ 12%，16 %，13%にまで低下した．オートファジー阻害剤単独での細胞傷害性はみられなかった(n=3)．*P<0.05.

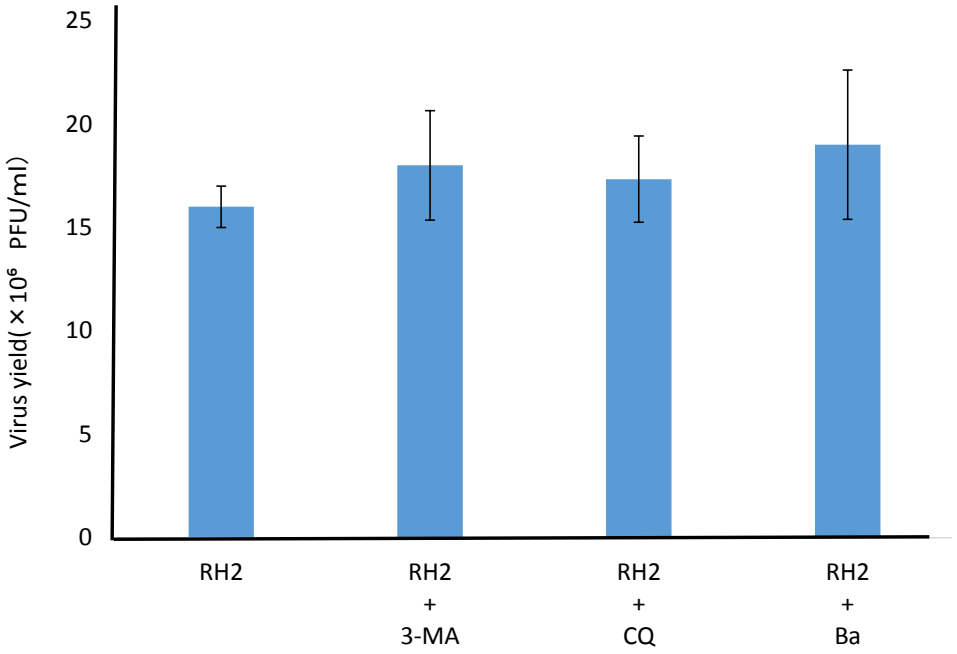
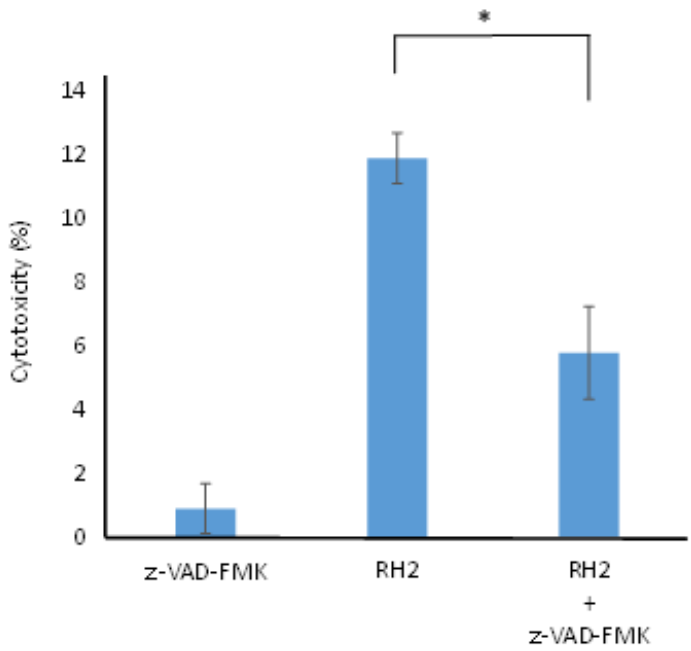


図 8 RH2 複製に対するオートファジー阻害剤の効果

図 7 と同様にして，オートファジー阻害剤存在下と非存在下に RH2 感染を行い，24 時間後に培養液と細胞を回収し，産生されたウイルス量を Vero 細胞でのプラック形成法にて測定した．いずれの阻害剤でもウイルス産生の減少はなかった(n=3).

A


*
14
12
10
8
6
4
2
0
Cytotoxicity (%)
z-VAD-FMK
RH2
RH2
+
z-VAD-FMK

B

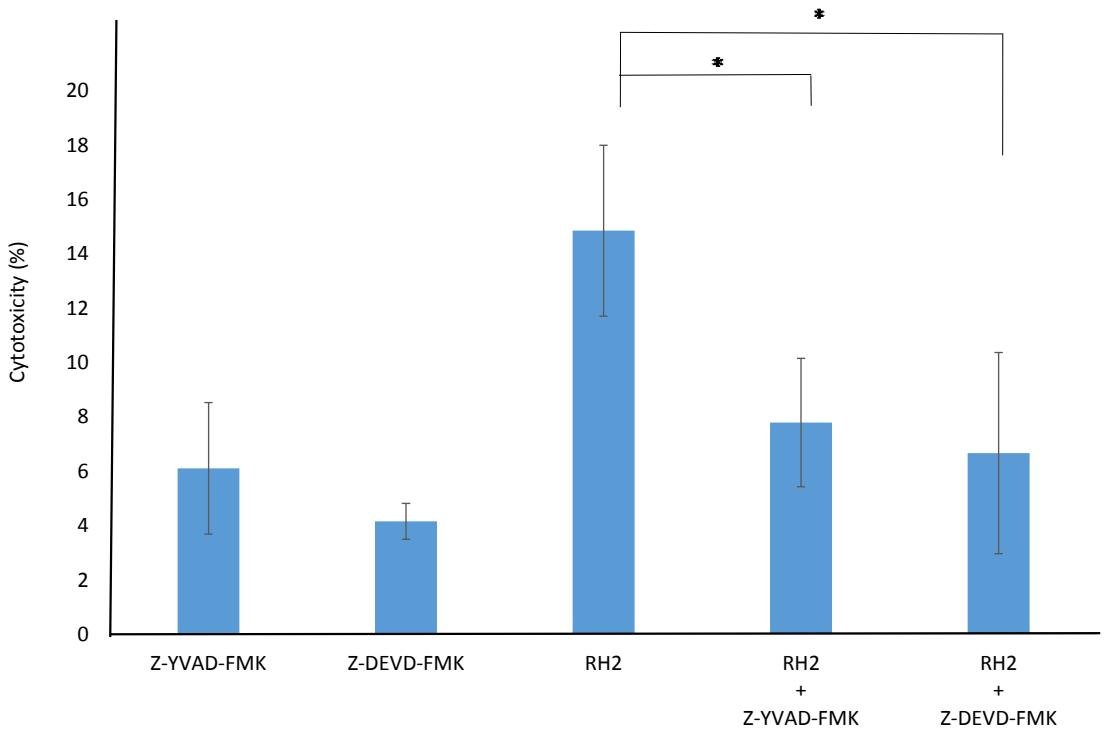

*
*
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Cytotoxicity (%)
Z-YVAD-FMK
Z-DEVD-FMK
RH2
RH2
+
Z-YVAD-FMK
RH2
+
Z-DEVD-FMK

図 9 RH2 の細胞傷害性に対する汎カスパーゼ阻害剤(A)ならびにカスパーゼ 1，カスパーゼ 3 阻害剤(B)の効果

RH2 を SAS 細胞に感染し，汎カスパーゼ阻害剤である z-VAD-FMK 存在下と非存在下に 24 時間培養し，細胞傷害率を LDH release assay にて測定した．同様にカスパーゼ 1 阻害剤 Z-YVAD-FMK あるいはカスパーゼ 3 阻害剤 Z-DEVD-FMK の存在下に培養を行った．汎カスパーゼ阻害剤では，傷害率 12%から 6%まで，カスパーゼ 1 と 3 では傷害率 14%が，それぞれ 7%と 6%にまで低下した(n=3)．*P<0.05.