

学位論文題名

Studies on MHC class I-mediated entry of
equine herpesvirus-1 into cells

(MHC class Iを介したウマヘルペスウイルス1型の細胞内侵入機構の解析)

学位論文内容の要旨

ウマヘルペスウイルス1型 (EHV-1) はヘルペスウイルス科アルファヘルペスウイルス亜科に属し、馬に脳脊髄炎、流産、鼻肺炎を惹き起こす。罹患馬に重篤な神経症状をもたらす脳脊髄炎では、中枢神経系の血管内皮細胞へのウイルス感染が病態形成に大きな役割を果たすことが明らかになっている。しかしながら、EHV-1の血管内皮向性を規定する宿主因子に関しては不明な点が多い。

第1章では、ウマ脳微小血管内皮細胞 (EBMECs) より作製したcDNA発現ライブラリーを用いて、EHV-1レセプターのクローニングを試みた。スクリーニングの結果、EHV-1非感受性細胞であるマウス由来細胞株NIH3T3にEHV-1感受性を付与する遺伝子として、ウマ主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) class I重鎖遺伝子を同定した。ウマMHC class I重鎖遺伝子を安定発現させたNIH3T3細胞へのEHV-1感染は、抗MHC class Iモノクローナル抗体、抗EHV-1 glycoprotein D (gD) ポリクローナル抗体およびgDヒトイムノグロブリン (Ig) 融合タンパク (gD-Ig) によって阻害された。また、gD-IgはウマMHC class I分子に特異的に結合した。これらの結果から、ウマMHC class IがEHV-1 gDをリガンドとするエントリーレセプターであることが明らかになった。

次に、EHV-1の自然宿主である馬の細胞を用いて、EHV-1感染におけるウマMHC class I分子の関与を解析した。ウマ真皮由来株化細胞E. Derm、EBMECs、ウマ末梢血単核球 (PBMC) を抗MHC class Iモノクローナル抗体で前処理すると、EHV-1感染は阻害された。また、 β 2ミクログロブリン (β 2m) 分子のノックダウンによってMHC class I分子の細胞表面発現を抑制したE. Derm細胞は、EHV-1感受性が顕著に減少した。以上の結果から、ウマMHC class IはEHV-1のウマ細胞内侵入に重要な役割を果たすことが明らかになった。

EHV-1は既知のアルファヘルペスウイルスレセプターを発現していないハムスター由来細胞株CHO-K1に感染し増殖する。そこで、EHV-1のCHO-K1細胞への侵入にハムスターMHC class I分子が関与しているかどうかを検討した。抗MHC class Iモノクローナル抗体の前処理によってEHV-1感染は阻害されな

った。また、 $\beta 2m$ ノックダウンによってCHO-K1細胞表面におけるMHC class I分子の発現を抑制しても、EHV-1感受性の変化は認められなかった。従って、CHO-K1細胞にはMHC class Iに依存しないEHV-1の細胞内侵入機構が存在することが示唆された。

第2章では、ウマ組織におけるMHC class I遺伝子発現の局在を解析した。成馬の全身主要臓器をノーザンハイブリダイゼーションにより解析した結果、検索した全臓器においてウマMHC class I mRNAが検出された。また、成馬脳組織に対して*in situ*ハイブリダイゼーション法を施行したところ、ウマMHC class I mRNAの局在を示すシグナルは血管内皮細胞に限局しており、神経細胞を含むその他の細胞にシグナルは認められなかった。以上の結果より、馬の中樞神経系におけるMHC class Iの遺伝子発現はEHV-1の標的細胞である血管内皮細胞に限局しており、MHC class Iの遺伝子発現がEHV-1の脳脊髄炎の病態形成に関与している可能性が示唆された。

ウイルスの細胞内侵入は、感染の成立に重要なステップである。本研究によって、ウマMHC class IがEHV-1のエントリーレセプターとして機能することが明らかとなり、これはEHV-1の細胞内侵入機構の解明において重要な知見であると考えられる。また、抗体や組換えタンパクを用いた感染実験の結果より、EHV-1 gDとMHC class Iの結合阻害が、EHV-1感染症の治療法として有用である可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 澤 洋 文
副 査 教 授 梅 村 孝 司
副 査 教 授 大 橋 和 彦
副 査 教 授 高 田 礼 人

学 位 論 文 題 名

Studies on MHC class I-mediated entry of equine herpesvirus-1 into cells

(MHC class Iを介したウマヘルペスウイルス1型の細胞内侵入機構の解析)

ウマヘルペスウイルス1型 (EHV-1) は罹患馬に重篤な神経症状をもたらす。EHV-1感染症に起因する脳脊髄炎では、中枢神経系の血管内皮細胞へのウイルス感染が病態形成に大きな役割を果たす。しかしながら、EHV-1の血管内皮向性を規定する宿主因子に関しては不明な点が多い。

第1章では、ウマ脳微小血管内皮細胞 (EBMECs) より作製したcDNA発現ライブラリーを用いてスクリーニングを行い、EHV-1非感受性細胞であるNIH3T3細胞にEHV-1感受性を付与する遺伝子として、ウマ主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) class I重鎖遺伝子を同定した。抗MHC class Iモノクローナル抗体、抗EHV-1 glycoprotein D (gD) ポリクローナル抗体およびgDヒトイムノグロブリン (Ig) 融合タンパク (gD-Ig) を用いた解析により、ウマMHC class IがEHV-1 gDをリガンドとするエントリーレセプターであることを明らかにした。さらに、EHV-1の自然宿主である馬の細胞を用いた解析により、ウマMHC class IはEHV-1のウマ細胞内侵入に重要な役割を果たすことを明らかにした。

第2章では、ウマ組織におけるMHC class I遺伝子発現の局在を解析した。成馬中枢神経系におけるMHC class Iの遺伝子発現は、EHV-1の標的細胞である血管内皮細胞に限局しており、MHC class Iの遺伝子発現がEHV-1の血管内皮向性に関与している可能性が示唆された。

ウイルスの細胞内侵入は、感染の成立に重要なステップである。本研究によって、ウマMHC class IがEHV-1のエントリーレセプターとして機能することが明らかとなり、これはEHV-1の細胞内侵入機構の解明において極めて重要な知見であると考えられる。

審査委員一同は、上記博士論文提出者 佐々木 道仁氏が博士 (獣医学) の学位を授与されるのに十分な資格を有する者と認めた。