

平成22年9月

寺坂祐樹 学位論文審査要旨

主 査 景 山 誠 二
副主査 佐 藤 建 三
同 井 上 幸 次

主論文

Induction of IL-6 in transcriptional networks in corneal epithelial cells after herpes simplex virus type 1 infection

(角膜上皮の単純ヘルペスウイルス1型感染による転写ネットワークにおけるIL-6の誘導)

(著者：寺坂祐樹、宮崎 大、矢倉慶子、春木智子、井上幸次)

平成22年 Investigative Ophthalmology & Visual Science 51巻 2441頁～2449頁

学 位 論 文 要 旨

Induction of IL-6 in transcriptional networks in corneal epithelial cells after herpes simplex virus type 1 infection

(角膜上皮の単純ヘルペスウイルス1型感染による転写ネットワークにおけるIL-6の誘導)

単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus; HSV) の角膜上皮への感染は、上皮型角膜ヘルペスの発症を引き起こし、その後実質型角膜炎のトリガーとなる。本研究は、HSV感染に対する最初の防御反応を担うヒト角膜上皮細胞の役割を分子レベルで理解し、多くの分子の中でその中心的な役割を果たすメディエーターを明らかにすることを目的とした。

方 法

不死化ヒト角膜上皮細胞 (human corneal epithelial cell; HCEC) に、HSV-1 型KOS株を multiplicity of infection (MOI) 1にて感染させた。コントロールとして、非感染HCEC及び紫外線不活化HSV感染HCECを用いた。各3群とも4つのsampleを採取し、合計12sampleを検討した。感染12時間後に採取したmRNAを材料にし、GeneSpringGX10を用いてマイクロアレイ法による遺伝子解析を行った。更に、Ingenuity Pathways Analysis 7.0 (IPA) を使用して、得られた遺伝子群の分子ネットワークモデルを構築した。ネットワークモデルにおいて、統計的関連性の高い候補遺伝子を抽出し、その中心となる分子の役割を、HSV-1感染HCECを用いて阻害抗体により探索した。また、抽出した感染応答制御因子の感染応答分子ネットワークにおける役割をプロテインアレイにて検証した。

結 果

HSV感染群と非感染群および紫外線不活化HSV感染群において、ANOVAで有意な変動を示し ($P < 0.05$) かつ2倍以上発現が変動した遺伝子は412個であった。その内、365個の遺伝子の発現が増加し、47個の遺伝子の発現が減少していた。なお、紫外線不活化HSV感染群と非感染群では発現レベルに有意差を認めなかった。クラスタリング解析では、HSV感染群は、非感染群・紫外線不活化HSV感染群と全く異なるパターンを示した。

412個の遺伝子群についてIPAを用いてネットワーク解析した結果、HSV感染により誘導されたシグナル伝達経路は、MAP kinase、JUN kinase、p38、ERK、NF- κ B経路に関連づけられ

た。更に、IL-6がその中心的分子であることと、VEGFへの直接的な関与が示唆された。

IL-6がHSV感染HCECにおいてmRNAレベルで発現していることをreal-time PCRを用いて検討し、更に、蛋白質レベルで発現していることを、HSV感染HCECから得られた上清を用いてELISAで確認した。その結果、IL-6は、mRNAレベルでは感染3時間後から上昇し、12時間後にピークとなった(MOI0.1)。また、培養上清中のIL-6はMOI依存性に増加し、24時間後まで検出された。

IL-6がVEGFを誘導するかどうかについて、抗IL-6抗体でIL-6を阻害したHSV感染HCECとコントロールIgGを加えたHSV感染HCECの2群間で検討した。その結果、IL-6を阻害することにより、VEGFは有意に抑制された。また、IL-6の阻害はHSVのウイルス増殖に影響しないことをreal-time PCRとプラークアッセイで検証し、IL-6阻害によるVEGFの抑制が、ウイルス増殖の阻害によって生じているのではないことを確認した。更に、非感染のHCECでは抗IL-6抗体の有無でVEGFが減少しないことも確認した。加えて、IL-6に制御されているVEGF以外のサイトカインをプロテインアレイで検証したところ、CCL7, CCL8, CXCL6, TGF- β 2を含む多くのサイトカインが抗IL-6抗体によるIL-6阻害に対して感受性を示した。

考 察

HCECへのHSV感染により抽出された発現変動遺伝子群412個におけるネットワーク解析においてIL-6が重要なメディエーターとして考えられた。IL-6はHCECへのHSV感染により、転写レベルでの制御をうけ、HSV感染応答因子群の存在下でVEGF発現誘導に関与していた。このことは角膜実質炎で問題となる血管新生に関与するVEGFが、ヒト角膜上皮への感染で既にIL-6を介して発現している事を示唆しており、注目に値する。プロテインアレイではIL-6を阻害することにより多くのサイトカインの発現が抑制され、IL-6とそれにより誘導されるサイトカインで形成されるネットワークは、MAP kinase, NF- κ B, JUN kinase, ERK経路に関連づけられ、IL-6が角膜上皮のHSV感染において中心的な役割を果たしていることが示唆された。

結 論

HSV-1のHCECへの感染により、MAP kinase経路を主とした炎症反応が誘導され、中でもIL-6はVEGFを含む多くの炎症性サイトカイン誘導に関与して、中心的な役割をもつことが示唆された。